

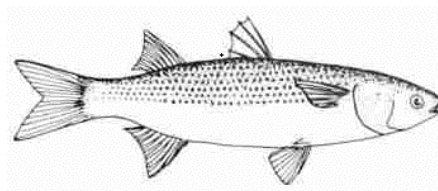
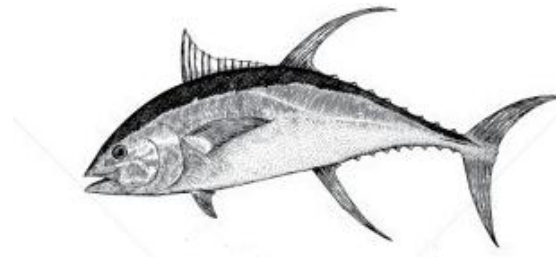


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

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

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Έξυπνη συσκευασία για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας
ιχθυηρών: Κινητική μελέτη απόκρισης Χρονοθερμοκρασιακών
Ολοκληρωτών (ΤΤΙ) και συσχέτιση με την ποιότητα και την
παραγωγή ισταμίνης σε κέφαλο και τόνο**



Ειρήνη Παπαμιχαήλ

Επιβλέπων καθηγητής: **Πέτρος Σ. Ταούκης**

Αθήνα, 2017

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το εαρινό εξάμηνο 2017 υπό την επίβλεψη του καθηγητή Πέτρου Ταούκη τον οποίο και ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ομάδα του καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και το ενδιαφέρον που μου έδειξε κατά τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη διδάκτορα Θεοφάνια Τσιρώνη, για την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, τις συμβουλές της αλλά και για την υπομονή και την προθυμία της να μου προσφέρει τη βοήθειά της σε όλα τα επίπεδα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στη διδάκτορα Μαριάννα Γιαννόγλου, η οποία με τη συνεχή βοήθεια το ενδιαφέρον και τις παρατηρήσεις της με βοήθησε ιδιαιτέρως, συμβάλλοντας στην ομαλή εκπόνηση αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Αθηνά Ντζιμάνη για την πολύτιμη βοήθειά της, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για την άριστη συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν καθ' όλη τη διάρκεια τη παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους δικούς μου ανθρώπους και πρώτα απ' όλα την οικογένειά μου, για την στήριξη και την πίστη τους σε εμένα σε όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής και μη πορείας μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στις φίλες μου Αννέτα και Ειρήνη, για την αγάπη και τη στήριξη που μου έδειξαν, τόσο κατά την εκπόνηση της Διπλωματικής μου εργασίας, όσο και γενικά στα φοιτητικά μου χρόνια κάνοντάς τα ακόμα πιο όμορφα.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2017

Ειρήνη Παπαμιχαήλ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σωστή διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας είναι καθοριστική για την ποιότητα και ασφάλεια των ιχθυηρών σε όλα τα στάδια, από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση. Η θερμοκρασία είναι ο παράγοντας αυτός που επηρεάζει περισσότερο τις διάφορες αντιδράσεις αλλοίωσης που λαμβάνουν χώρα στο τρόφιμο και ο έλεγχός της σε όλα τα στάδια διακίνησης του προϊόντος είναι πολύ σημαντικός, ειδικά για τα πιο ευαλλοιώτα τρόφιμα όπως είναι τα ιχθυηρά.

Μία πρακτική λύση που προτείνεται είναι η χρήση Χρονοθερμοκρασιακών Δεικτών ή Ολοκληρωτών ΤΠΙ (Time Temperature Indicators or Integrators). Ένας δείκτης ΤΠΙ αποτελεί μια χαμηλού κόστους διάταξη, συνήθως υπό την μορφή ετικέτας, η οποία μπορεί με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, να δείξει το θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένη μέσω μιας ορατής, συνήθως χρωματικής απόκρισης. Τα ΤΠΙ εντάσσονται στην έξυπνη συσκευασία και η αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται σε φυσικοχημικές, χημικές, μικροβιολογικές ή ενζυμικές δράσεις.

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη της απόκρισης διαφορετικών ενζυμικών ΤΠΙ σε διάφορες θερμοκρασίες (0-25°C) και η εύρεση και συσχέτιση του κατάλληλου ΤΠΙ με προϊόντα ιχθύων (κέφαλου και τόνου) για τον έλεγχο της ποιότητας και της ασφάλειάς τους στην ψυκτική αλυσίδα. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η παραγωγή ισταμίνης σε κέφαλο κι έγινε αντιστοίχιση αυτής με κατάλληλο ενζυμικό δείκτη.

Σε πρώτο στάδιο έγινε μελέτη ενζυμικών ΤΠΙ που βασίζονται στην αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία με σταθερό ρυθμό και προκαλεί μεταβολή του pH η οποία μεταφράζεται οπτικά με μια χρωματική αλλαγή (από πράσινο σε κίτρινο και στη συνέχεια σε κόκκινο χρώμα). Μελετήθηκαν δείκτες που με ένζυμο μικροβιακή λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα (χαρακτηρίζονται ως τύπου M) σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10, 15°C και δείκτες με την ίδια λιπάση και υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης-τριπαλμιτίνης (χαρακτηρίζονται ως τύπου LP) σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25°C. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά τους. Οι περιεκτικότητες σε ένζυμο των δεικτών που μελετήθηκαν ήταν για τα τύπου M 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 και 100 Units και για τα τύπου LP ΤΠΙ 100, 150, 300 και 500 Units.

Για καθένα από τους δύο τύπους δεικτών πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη συνολικού μαθηματικού μοντέλου εξάρτησης από τη θερμοκρασία, το χρόνο και τη συγκέντρωση περιεχόμενου ενζύμου. Η ενέργεια ενεργοποίησης υπολογίστηκε για τους δείκτες τύπου LP ίση με 141,9 kJ/mol και για τους τύπου M ίση με 86,8 kJ/mol.

Η αξιοπιστία των δεικτών επιβεβαιώθηκε μέσω πειραμάτων σε θερμοκρασιακά εναλλασσόμενες συνθήκες.

Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε μελέτη διατηρησιμότητας σε κέφαλο (*Mugil cephalus*) και τόνο (*Thunnus alalunga*) με σκοπό την επιλογή κατάλληλων ΤΠΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειάς τους σε ισοθερμοκρασιακές (0-15°C) και δυναμικές συνθήκες. Η μελέτη συμπεριλάμβανε τον προσδιορισμό της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών, της μεταβολής του pH καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση. Αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν ικανοποιητικά την ανάπτυξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηρίων με ενέργειες ενεργοποίησης για τον κέφαλο 107,8 kJ/mol, 101,6kJ/mol και 95,9kJ/mol αντίστοιχα, ενώ για τον τόνο 31,6kJ/mol, 42,3kJ/mol και 32,0 kJ/mol, αντίστοιχα. Οι χρόνοι ζωής για τον κέφαλο υπολογίστηκαν σε 14,7 ημέρες στους 0°C, σε 9,6 στους 2,5°C, στους 5°C σε 6,3, στους 10°C σε 2,8 ενώ στους 15°C σε 1,2 ημέρες. Αντίστοιχα για τον τόνο στους 0°C η διάρκεια ζωής του ιχθύος ήταν 7,6 ημέρες, 5,4 ημέρες στους 5°C και 3,9 ημέρες στους 10°C.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μαθηματική προτυποποίηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* σε κέφαλο και του σχηματισμού ισταμίνης από τον εν λόγω μικροοργανισμό. Η ενέργεια ενεργοποίησης για την ανάπτυξη του *Morganella morganii* βρέθηκε ίση με 154,3 kJ/mol ενώ για την παραγωγή ισταμίνης η ενέργεια ενεργοποίησης του ρυθμού ανάπτυξης υπολογίστηκε ίση με 79,3 kJ/mol ενώ της λανθάνουσας φάσης της ίση με 90,0 kJ/mol. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε πείραμα σε εναλλασσόμενες χρονοθερμοκρασιακές συνθήκες για τα δύο μοντέλα και κρίθηκαν και τα δύο αξιόπιστα.

Στο τελικό στάδιο της διπλωματικής εργασίας, έγινε συσχετισμός της κινητικής απόκρισης των ενζυμικών δεικτών με το χρόνο ζωής των δειγμάτων κεφάλου, το χρόνο ζωής των δειγμάτων τόνου καθώς και με τον απαιτούμενο χρόνο για την παραγωγή ισταμίνης σε περιεκτικότητες 50, 100 και 200 ppm, βάσει της μελέτης παραγωγής ισταμίνης σε κέφαλο ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης *Morganella morganii*. Προκειμένου να γίνει επιτυχής επιλογή ΤΠΙ για τον συσχετισμό έγινε σύγκριση μεταξύ των ενεργειών ενεργοποίησης των ρυθμών μικροβιακής ανάπτυξης και των ρυθμών απόκρισης ΤΠΙ.

Με βάση τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα που προέκυψαν για τα ενζυμικά ΤΠΙ ο δείκτης που κρίθηκε ως ο καταλληλότερος για την παρακολούθηση της ποιότητας του κέφαλου στην ψυκτική αλυσίδα ήταν ο LP 300U, του τόνου ο M 75U και τα ΤΠΙ που παρακολουθούν ικανοποιητικά την παραγωγή ισταμίνης ήταν τα M 11U, M 7U και M 4U για συγκεντρώσεις ισταμίνης 50, 100 και 200ppm αντίστοιχα.

Smart packaging for the management of the cold chain of fisheries: Kinetic study of Time Temperature Integrator (TTI) response and correlation to quality of mullet and tuna and histamine production.

The effective management of the chill chain is critical to the quality and safety of fish at all stages, from production to consumption. Temperature is the main factor that affects more the deterioration reactions in food products. Controlling it during the chilled distribution is of great importance especially for perishable food products such as fish.

A practical solution that is proposed is the use of Time-Temperature Integrators (TTI). A TTI can be defined as low-cost device, usually in the form of a label that can show an easily measurable, time-temperature dependent change that reflects the temperature history of a food product to which it is attached through a visible response, usually in the form of a color development. TTIs are a form of smart packaging and their principle of operation is based on physicochemical, chemical, microbiological or enzymatic reactions.

The purpose of this diploma thesis was to study the kinetic response of different enzymatic TTI in various temperatures (0-25°C). The suitable TTI was selected and correlated with fish products (*Mugil cephalus* & *Thunnus alalunga*) for safety and quality monitoring at every stage of the cold chain. In addition, the histamine production in mullet has been studied and correlated with a suitable enzymatic indicator.

In the first part, study of enzymatic TTI based on the enzyme-substrate reaction was conducted. This reaction is carried out at a fixed temperature at a constant rate and causes a change in pH which translates visually to a color change (from green to yellow and then red). TTI that are based on *Rhizopus oryzae* lipase and methyl myristate as substrate (M type) were studied at temperatures 0, 2.5, 5, 10 and 15°C temperatures. TTI that had the lipase from *Rhizopus oryzae* and as substrate a mixture of tripalmitin and trilaourin (LP type TTI) were also studied at 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 and 25°C. The concentrations of the enzymatic indicators tested were for the M type 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 and 100 Units and for the LP type TTI 100, 150, 300 and 500 Units.

For each of these two types of enzymatic TTI a mathematical model was developed depending on temperature, time and concentration of the enzyme. The activation energy for the LP type TTI was calculated equal to 141,9kJ/mol and for the M type

equal to 86,8kJ/mol. The reliability of the TTI response model was validated by experiments at variable conditions.

In order to choose suitable TTI for monitoring the quality and safety of mullet (*Mugil cephalus*) and tuna (*Thunnus alalunga*) in the cold chain microbial spoilage, pH change and sensory scoring were evaluated during isothermal storage at 0-15°C and at variable conditions. The microbiological spoilage of fish was described by mathematical models of the growth of total viable count, *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* spp. with activation energy calculated equal to 107,8kJ/mol, 101,6kJ/mol and 95,9kJ/mol respectively for the microbiological growth in mullet, whereas for tuna the activation energies were estimated equal to 31,6kJ/mol, 42,3kJ/mol and 32,0kJ/mol respectively. The shelf life of mullet was estimated 14,8 days at 0°C, 9,6 days at 2,5°C, 6,3 days at 5°C, 2,8 at 10°C and 1,3 days at 15°C. In the case of tuna, shelf life was estimated 7,6 days at 0°C, 5,4 days at 5°C, and at 10°C 3,9 days.

Subsequently, mathematical models were developed for *Morganella morganii* growth and histamine formation in mullet. The activation energy of *Morganella morganii* growth was calculated equal to 154,3kJ/mol, the activation energy of histamine's formation rate equal to 79,3kJ/mol and for its lag phase equal to 90,0 kJ/mol. At the same time the reliability of both mathematical models was validated by experiments at variable conditions.

The last part of the present study was the selection and correlation of appropriate indicators with the shelf life of mullet, tuna as well as the time required for the formation of 50, 100 and 200 ppm of histamine in mullet as a result of *Morganella morganii* growth. In order to have a successful match of the suitable TTI for the above cases the activation energies were compared.

Based on the mathematical models that were developed for the enzymatic TTI, the indicators that were suitable for monitoring the quality and safety of mullet and tuna at all points of cold chain were LP 300U and M 75U respectively. Similarly, the TTI that can effectively monitor with histamine production are M 11U, M 7U and M 4U for histamine concentrations 50, 100 and 200 ppm respectively.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1. ΧΡΟΝΟΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΙ ΟΛΟΚΛΗΡΩΤΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΨΥΚΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	3
1.1 Ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων.....	3
1.1.1 Συντελεστές ποιότητας τροφίμων.....	3
1.1.2 Διατηρησιμότητα (διάρκεια ζωής) τροφίμου και καθορισμός της.....	4
1.1.3 Ασφάλεια των τροφίμων.....	4
1.1.4 Αρχές κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων.....	5
1.1.5 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων.....	8
1.1.5.1 Επίδραση της θερμοκρασίας.....	8
1.1.6 Υποβάθμιση της ποιότητας των ψυγμένων τροφίμων – Εφαρμογή ΤΤΙ για την ασφάλεια των προϊόντων.....	9
1.2 Ορισμός, Αρχή Λειτουργίας, Ταξινόμηση ΤΤΙ.....	11
1.2.1 Ορισμός.....	11
1.2.2 Αρχή λειτουργίας των ΤΤΙ.....	12
1.2.3 Ταξινόμηση ΤΤΙ.....	12
1.3 Χαρακτηριστικά και απαιτήσεις για έναν ιδανικό ΤΤΙ.....	14
1.4 Εξέλιξη των ΤΤΙ.....	15
1.5 Σύγχρονα συστήματα ΤΤΙ.....	17
1.6 Κινητική απόκριση των δεικτών ΤΤΙ.....	21
1.7 Αντιστοίχιση απόκρισης ΤΤΙ με την ποιότητα των τροφίμων.....	22
1.8 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας T_{eff}	26
1.9 Εφαρμογή ΤΤΙ σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων.....	26
1.10 Αίτια περιορισμού της χρήσης και εφαρμογής των ΤΤΙ και μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητάς τους.....	28
1.11 Η στάση των καταναλωτών απέναντι στα ΤΤΙ.....	30
1.12 Εφαρμογές των ΤΤΙ.....	31
1.13 Εφαρμογή ΤΤΙ στην ψυκτική αλυσίδα ιχθύων.....	32
1.14 Σύστημα FIFO-LSFO.....	33

1.15 Ανάπτυξη και εφαρμογή συστήματος SMAS (Safety Monitoring and Assurance System)	33
2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΣΥΣΤΑΣΗ & ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΙΧΘΥΩΝ	37
2.1 Εισαγωγή.....	37
2.2 Κέφαλος	37
2.2.1 Διατροφική αξία κέφαλου	38
2.2.2 Παραγωγή κέφαλου	39
2.2.3 Μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης.....	40
2.3 Τόνος.....	40
2.3.1 Διατροφική αξία τόνου	41
2.3.2 Παραγωγή τόνου	41
2.3.3 Μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης.....	42
2.4 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθύων	43
2.4.1. Γενικά	43
2.4.2 Ανάπτυξη και παραγωγή ισταμίνης σε ιχθυηρά	44
2.4.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή ισταμίνης σε ιχθυηρά.....	45
2.4.4 Επιτρεπτά όρια	46
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
3.1 Εισαγωγή.....	47
3.2 Μελέτη ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών	47
3.2.1 Πειραματική διαδικασία.....	48
3.2.2 Συσκευές πειραματικής διαδικασίας	49
3.3 Μελέτη αλλοίωσης ιχθυηρών	51
3.3.1 Πειραματική Διαδικασία	51
3.3.1.1 Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου	51
3.3.1.2 Μέτρηση pH	53
3.3.1.3 Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων	53
3.3.1.4 Προσδιορισμός ανάπτυξης του <i>Morganella morganii</i>	54
3.3.1.5 Προσδιορισμός σχηματισμού Ισταμίνης.....	54
4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΤΙ	57
4.1 Επεξεργασία απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών	57
4.1.1 Καθορισμός της συνάρτησης $F(X_c)$ των ενζυμικών ΤΤΙ	57

4.1.2 Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών k και EA των ενζυμικών ΤΤΙ.....	57
4.1.3 Έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων	58
4.2 Κινητική Μελέτη της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ	58
4.2.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 100U.....	59
4.2.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 150U.....	61
4.2.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 300U.....	64
4.2.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 500U.....	67
4.2.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 5U	70
4.2.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 10U.....	73
4.2.7 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 15U.....	75
4.2.8 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 20U.....	77
4.2.9 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 25U.....	79
4.2.10 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 50U.....	82
4.2.11 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 75U.....	84
4.2.12 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 100U.....	86
4.2.13 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U	90
4.2.14 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ για τον ενζυμικό δείκτη M 25U.....	92
4.3 Διάρκεια ζωής των ΤΤΙ	94
4.4 Προσδιορισμός συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ.....	95
4.5 Μελέτη αξιοπιστίας των μαθηματικών μοντέλων - στατιστική επεξεργασία ..	96
5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΙΧΘΥΗΡΑ.....	101
5.1 Εισαγωγή.....	101
5.2 Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής ιχθύων.....	101
5.2.1 Μικροβιολογική ανάπτυξη ιχθύων	101
5.2.2 Μέτρηση pH.....	104
5.2.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση δειγμάτων κέφαλου και τόνου	106
5.2.4 Μελέτη σε δυναμικές συνθήκες.....	117

5.3 Μέτρηση μικροβιακού φορτίου σε δείγματα ψαριών και προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi.....	120
5.3.1 Μικροβιολογική μελέτη δειγμάτων κέρατος.....	120
5.3.2 Μικροβιολογική μελέτη δειγμάτων τόνου.....	122
5.3.3 Εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών από τη θερμοκρασία συντήρησης.....	124
5.3.4 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής.....	128
5.3.5 Έλεγχος αξιοπιστίας αποτελεσμάτων.....	129
5.4 Μαθηματικό μοντέλο ανάπτυξης του <i>Morganella morganii</i> σε κέρατο.....	131
5.5 Μαθηματικό μοντέλο παραγωγής ισταμίνης σε κέρατο.....	136
6. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΙΧΘΥΗΡΩΝ.....	143
6.1 Εισαγωγή.....	143
6.2 Επιλογή κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας κέρατος και τόνου.....	143
7. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	153
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	163
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	165
Δικτυακοί τόποι.....	172
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	173

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ιχθυηρά αποτελούν μία ιδιαίτερα ευαλλοιώτη ομάδα τροφίμων. Οι αλλοιώσεις των νωπών ψαριών, που διατηρούνται για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, οφείλονται κυρίως σε μικροβιολογικούς παράγοντες (Sofra et al., 2017) που συνήθως εκδηλώνονται ως μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος (Gram & Huss, 1996).

Η θερμοκρασία είναι ένας πολύ σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας και οι διακυμάνσεις της μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ασφάλεια και το ρυθμό υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων. Η έκθεση σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τις προδιαγραφές για την ψυκτική αλυσίδα, έχουν σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης αλλοιογόνων και δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την ταχύτερη υποβάθμιση των ιχθυηρών. Παράλληλα, σε συγκεκριμένες κατηγορίες ιχθύων η έκθεσή τους για ικανό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες άνω των 5°C, αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα παραγωγής ισταμίνης, μιας τοξικής βιογενούς αμίνης, ως συνέπεια της ανάπτυξης συγκεκριμένων μικροοργανισμών όπως ο *Morganella morganii* (Centers for Disease, C. and Prevention, 2007).

Μέχρι σήμερα, πληροφορίες σχετικά με τη διάρκεια ζωής ενός προϊόντος λαμβάνονται σχεδόν αποκλειστικά από την ημερομηνία λήξης η οποία είναι τυπωμένη στη συσκευασία του προϊόντος. Η χρήση της δεν εγγυάται την ασφάλεια του προϊόντος ούτε παρέχει πληροφορίες για τον κύκλο ζωής αυτού μετά την εκτύπωση της ημερομηνίας. Επομένως, για την εξασφάλιση της ασφάλειας της αλυσίδας διακίνησης από τον παραγωγό στον καταναλωτή, πολλές βιομηχανίες τροφίμων παρακινούνται να αναπτύξουν εργαλεία ανίχνευσης προκειμένου να μπορούν να παρακολουθούν τη θερμοκρασία στην οποία υποβάλλεται το προϊόν σε κάθε στάδιο της εφοδιαστικής αλυσίδας. Τέτοια αποτελεσματικά εργαλεία για συνεχή παρακολούθηση του χρονικού και του θερμοκρασιακού ιστορικού προϊόντων ψυγείου αναφέρονται γενικά ως χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες ή ολοκληρωτές (Galagan and Su, 2008; Galagan et al., 2010; Kreyenschmidt et al., 2010; Riva et al., 2001; Taoukis and Labuza 1989; Tsironi et al., 2008). Ο χρονοθερμοκρασιακός δείκτης ή ολοκληρωτής (Time Temperature Integrator, TTI) μπορεί να οριστεί ως μια απλή, οικονομική διάταξη, η οποία μπορεί με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, να δείξει ολόκληρο ή μέρος του θερμοκρασιακού ιστορικού του τροφίμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένη (Taoukis et al., 2012).

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη ενζυμικών TTI και η εύρεση και αντιστοίχιση κατάλληλων δεικτών με το χρόνο ζωής ιχθυηρών για την

παρακολούθηση της ψυκτικής τους αλυσίδας, καθώς και με την παραγωγή ισταμίνης.

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε μελέτη της απόκρισης ενζυμικών ΤΤΙ που βασίζονται στην αντίδραση κατάλληλων ενζύμων-υποστρωμάτων, η οποία μεταφράζεται οπτικά με μια χρωματική αλλαγή. Μελετήθηκαν δύο τύποι ενζυμικών δεικτών οι οποίοι είχαν ένζυμο μικροβιακή λιπάση *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα ή υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης-τριπαλμιτίνης, αντίστοιχα. Προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά δεικτών διαφορετικών ενζυμικών συγκεντρώσεων σε διάφορες θερμοκρασίες.

Ακολούθως, έγινε μικροβιολογική μελέτη σε κέφαλο (*Mugil cephalus*) και τόνο (*Thunnus alalunga*). Η μελέτη συμπεριλάμβανε τον προσδιορισμό της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών, της μεταβολής του pH καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση σε διάφορες θερμοκρασίες. Ακόμη, αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηρίων και προσδιορίστηκαν οι χρόνοι ζωής τους, ώστε να γίνει συσχετισμός και αντιστοίχιση της μικροβιακής ανάπτυξης στα ιχθυηρά με κατάλληλους ΤΤΙ.

Στη συνέχεια, για την περιγραφή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morgani* σε κέφαλο και για τον σχηματισμό ισταμίνης από τον εν λόγω μικροοργανισμό, ακολούθησε ανάπτυξη κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων και προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών.

Τέλος, έγινε συσχετισμός της κινητικής απόκρισης των ενζυμικών δεικτών με τους χρόνους ζωής των δειγμάτων κεφάλου και τόνου καθώς και με τον απαιτούμενο χρόνο για την παραγωγή ισταμίνης σε κέφαλο. Η αντιστοίχιση κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της υποβάθμισης ποιότητας κεφάλου και τόνου καθώς και της παραγωγής ισταμίνης κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα, έγινε μετά από σύγκριση των κινητικών χαρακτηριστικών και των χρόνων ζωής ΤΤΙ και ιχθυηρών.

1. ΧΡΟΝΟΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΙ ΟΛΟΚΛΗΡΩΤΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΨΥΚΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

1.1 Ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων

Τα **τρόφιμα** είναι πολύπλοκα συστήματα - μίγματα χημικών συστατικών τα οποία προέρχονται από φυτικές ή ζωικές πρώτες ύλες. Βασικά συστατικά των τροφίμων είναι οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα λιπαρά καθώς και τα ανόργανα συστατικά, μέταλλα και οι ομάδες οργανικών συστατικών όπως βιταμίνες, ένζυμα και νερό που υπάρχουν σε μικρότερες αναλογίες.

Το τρόφιμο προκειμένου να μπορεί να διατεθεί προς κατανάλωση πρέπει να υφίσταται επεξεργασία για συντήρηση, βελτίωση της ποιότητας και της θρεπτικότητας, καθώς και για επέκταση του χρόνου ζωής του. Οι διαδικασίες παραγωγής και συντήρησης των τροφίμων πρέπει να είναι κατάλληλες, προκειμένου να παρέχουν προϊόντα ασφαλή και αρεστά στον καταναλωτή.

Ως **ποιότητα τροφίμου** ορίζεται ο βαθμός προσαρμογής αυτού στις απαιτήσεις του καταναλωτή, που έχουν σχέση με τη θρεπτικότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητές του. Αποτελεί το σύνολο των χαρακτηριστικών του τροφίμου, τα οποία στοχεύουν στην ικανοποίηση των εκφρασμένων ή ευνοούμενων αναγκών του καταναλωτή, και που τελικά καθορίζουν το βαθμό αποδοχής του προϊόντος από αυτόν (Τζιά, 2010).

1.1.1 Συντελεστές ποιότητας τροφίμων

Η ποιότητα ενός τροφίμου μπορεί να αναλυθεί σε επί μέρους συνιστώσες- χαρακτηριστικά ποιότητας- ή μπορεί να αποτελείται από διάφορους συντελεστές ποιότητας. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ή συντελεστές ποιότητας ενός τροφίμου διακρίνονται σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ή εμφανή χαρακτηριστικά, τα οποία μπορούν να εκτιμηθούν εύκολα με τις αισθήσεις, και σε μη εμφανή χαρακτηριστικά, τα οποία δεν μπορούν να εκτιμηθούν εύκολα με τις αισθήσεις αλλά παίζουν σπουδαίο ρόλο στην υγεία, τη διατροφική αξία ή έχουν οικονομική σημασία. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου μπορούν να μετρηθούν με φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές και μικροβιολογικές ή οργανοληπτικές μεθόδους. Επιπρόσθετα χαρακτηριστικά της ποιότητας των τροφίμων αποτελούν η συμφωνία με τη νομοθεσία, η συσκευασία, η τιμή, η διαθεσιμότητα και η ασφάλεια (Τζιά, 2010).

1.1.2 Διατηρησιμότητα (διάρκεια ζωής) τροφίμου και καθορισμός της

Τα τρόφιμα έχουν πεπερασμένη διατηρησιμότητα ή διάρκεια ζωής καθώς η ποιότητα αυτών κινείται προς φθίνουσα κατεύθυνση (εξαιρούνται κάποια τρόφιμα που με ωρίμανση και παλαίωση βελτιώνεται η ποιότητά τους). Γενικά, δεν έχει διατυπωθεί κάποιος ευρύτερα εφαρμόσιμος ορισμός της διατηρησιμότητας των τροφίμων. Ο καθορισμός της διάρκειας ζωής και των κριτηρίων που οριοθετούν το τέλος της εξαρτώνται από το προϊόν και από τη χρήση για την οποία προορίζεται. Από το Διεθνές Ινστιτούτο Ψυγμένων Προϊόντων (International Institute of Refrigerator, IIR) υποδεικνύονται δύο διαφορετικοί ορισμοί.

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).

Χρόνος Πρακτικής Διατήρησης (Practical Shelf Life, PSL): είναι ο χρόνος αποθήκευσης, μετά την παραγωγή προϊόντος αρχικής υψηλής ποιότητας, στον οποίο το τρόφιμο είναι οργανοληπτικά αποδεκτό.

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

Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα για την επισήμανση των προϊόντων εισήγαγε το **Χρόνο Ελάχιστης Διατηρησιμότητας** (Minimum Durability), ο οποίος ορίζεται ως χρόνος που το τρόφιμο διατηρεί τα χαρακτηριστικά του, υπό κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης. Ένας τέτοιος ορισμός πλησιάζει αρκετά εκείνον του χρόνου υψηλής ποιότητας (HQL). Ωστόσο, όποιος ορισμός και αν χρησιμοποιηθεί, είναι απαραίτητο να συνοδεύεται από περαιτέρω διευκρινήσεις και οδηγίες, π.χ. πρέπει να γίνεται σαφές τι σημαίνει οργανοληπτική ποιότητα και ποιες είναι οι εκάστοτε μέθοδοι μέτρησης και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για να οριστούν τα επιτρεπτά όρια αποδοχής (Ταούκης, 2012).

1.1.3 Ασφάλεια των τροφίμων

Η ασφάλεια των τροφίμων (food safety) ορίζεται ως η κατάσταση των τροφίμων η οποία έχει δυσμενή επίπτωση στην υγεία του καταναλωτή ή η διασφάλιση των τροφίμων έναντι διαφόρων κινδύνων (μικροβιολογικών, φυσικών, χημικών). Ασφάλεια για τα τρόφιμα σημαίνει απουσία μικροβιολογικών (παθογόνα βακτήρια), χημικών (χημικά, φυτοφάρμακα, κ.τ.λ.) και φυσικών (γυαλί, μέταλλο, κ.ά.) κινδύνων. Αντίστοιχα τα τρόφιμα που δεν περιέχουν κινδύνους (δυσμενείς παράγοντες για την υγεία) καλούνται ασφαλή. Όλα τα τρόφιμα που κινούνται στην αγορά πρέπει από τη νομοθεσία να είναι ασφαλή.

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

Για τους παραπάνω λόγους η ασφάλεια εξετάζεται ιδιαίτερα στα τρόφιμα, και γι' αυτό το λόγο έχει αναπτυχθεί το σύστημα **HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points - Ανάλυση Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου)**, που είναι ένα εξιδεικευμένο σύστημα το οποίο σχετίζεται άμεσα με την ασφάλεια των τροφίμων -σύστημα διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων. Το σύστημα HACCP επικεντρώνεται στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (CCPs: critical control points) που είναι τα πιο σημαντικά στη ροή της παραγωγής του τροφίμου και προσεγγίζει συστηματικά με τον καλύτερο δυνατό τρόπο την ασφάλεια του τροφίμου ελέγχοντας τα σημεία αυτά. Ως κρίσιμα σημεία ελέγχου αναγνωρίζονται και ορισμένα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας για διάφορα ελάχιστα επεξεργασμένα κατεψυγμένα προϊόντα. Η παρακολούθηση αυτών των σημείων ελέγχου αποδεικνύεται σημαντική για τη διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων (Τζιά, 2010).

1.1.4 Αρχές κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων

Με εφαρμογή των βασικών αρχών της χημικής κινητικής, η έκφραση του ρυθμού υποβάθμισης της ποιότητας ενός τροφίμου μπορεί να δοθεί ως μία συνάρτηση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων:

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

Όπου

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

Ο ρυθμός μεταβολής της ποιότητας είναι πολύπλοκο φαινόμενο και περιλαμβάνει φυσικές και χημικές μεταβλητές και σταθερές, οι οποίες στην πλειοψηφία τους είναι αδύνατο ή μη πρακτικό να καθοριστούν ποσοτικά. Η συνήθης μεθοδολογία περιλαμβάνει την αναγνώριση των χημικών και βιολογικών δράσεων που επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου, και στη συνέχεια, μετά

από προσεκτική μελέτη των συστατικών του τροφίμου και της χρησιμοποιούμενης διεργασίας, προσδιορίζονται οι αντιδράσεις που έχουν τη σημαντικότερη επίδραση στο ρυθμό της κινητικής αλλοίωσης (Labuza, 1985). Εξαιρώντας την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων E_j , θεωρώντας ότι παραμένουν σταθεροί ή ότι η επίδρασή τους είναι αμελητέα, μπορεί να αναπτυχθεί ένα απλοποιημένο σχεδιάγραμμα αντιδράσεων που να εκφράζει την επίδραση της συγκέντρωσης των αντιδρώντων συστατικών. Ο στόχος είναι ουσιαστικά η διαμόρφωση ενός μοντέλου που θα περιγράφει τη μεταβολή των συγκεντρώσεων των συστατικών εκείνων που σχετίζονται με την ποιότητα του τροφίμου, ως συναρτήσεις του χρόνου.

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

$$r_A = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^m \quad (1.2)$$

$$r_B = \frac{d[B]}{dt} = k'[B]^{m'} \quad (1.3)$$

όπου

- A: επιθυμητή ποιοτική παράμετρος π.χ. θρεπτικό συστατικό, άρωμα
- B: παράμετρος που υποβαθμίζει το τρόφιμο π.χ. ανεπιθύμητο άρωμα, χρώμα, μικροβιακό φορτίο

Τα k και k' (φαινόμενες σταθερές ρυθμού αντίδρασης) και τα m και m' (φαινόμενες τάξεις των αντιδράσεων) προσδιορίζονται πειραματικά με διαφορικές μεθόδους ή με μεθόδους με ολοκλήρωση (Hills & Grieger-Block, 1980).

Με ολοκλήρωση της σχέσης (1.2) προκύπτει η συνάρτηση ποιότητας Q(A) και ορίζεται ως εξής.

$$Q(A) = - \int_{A_0}^A \frac{d[A]}{[A]^m} = kt \quad (1.4)$$

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

Πίνακας 1.1 Συναρτήσεις ποιότητας και χρόνοι ημιζωής για διαφορετικές φαινόμενες τάξεις αντιδράσεων.

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

Οι περισσότερες αντιδράσεις αλλοίωσης που έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική περιγραφή της διατηρησιμότητας των τροφίμων χαρακτηρίζονται ως μηδενικής ή πρώτης τάξης και φαίνονται στον πίνακα (1.2).

Πίνακας 1.2: Σημαντικές αντιδράσεις αλλοίωσης που ακολουθούν κινητική μηδενικής ή πρώτης φαινόμενης τάξης.

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

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

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

1.1.5 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων

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

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

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

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

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

1.1.5.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση στο ρυθμό των αντιδράσεων, δηλαδή του συντελεστή k που αναφέρθηκε παραπάνω. Η επίδραση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση Arrhenius (1.5).

$$k = k_{ref} e^{-\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} \quad (1.5)$$

όπου

- T_{ref} : η θερμοκρασία αναφοράς σε K,
- k_{ref} : η σταθερά του ρυθμού της αντίδρασης σε θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} ,
- k : ο συντελεστής Arrhenius ή σταθερά Arrhenius,
- E_A : η ενέργεια ενεργοποίησης σε cal/mol,
- R : η παγκόσμια σταθερά των αερίων (1,9872 cal/mol/K) και
- T : η απόλυτη θερμοκρασία σε K.

Δραστική Θερμοκρασία (T_{eff})

Η μεταβολή της συνάρτησης ποιότητας $Q(A)_t$ 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:

$$Q(A)_t = \int_0^t k(T) dt = k_{ref} e^{\frac{-E_A}{R} \left(\frac{1}{T(t)} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} t \quad (1.6)$$

Ένας άλλος τρόπος έκφρασης της τιμής του $Q(A)_t$ 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 παραπάνω σχέση γίνεται:

$$Q(A)_t = k_{ref} e^{\frac{-E_A}{R} \left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} t \rightarrow T_{eff} = - \frac{E_A T_{ref}}{E_A - R T_{ref} \ln \left(\frac{Q(A)_t}{k_{ref} t} \right)} \quad (1.7)$$

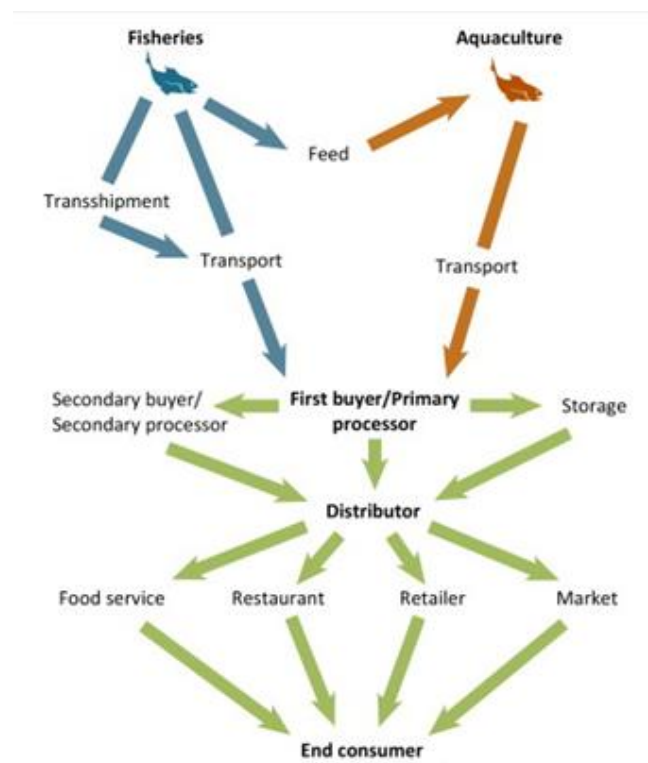
1.1.6 Υποβάθμιση της ποιότητας των ψυγμένων τροφίμων – Εφαρμογή ΤΤΙ για την ασφάλεια των προϊόντων

Η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων, εξακολουθεί να χαρακτηρίζεται από μεγάλες απώλειες ποιότητας λόγω σημαντικών αποκλίσεων από τις προδιαγραφές θερμοκρασίας. Για τα προϊόντα που πρέπει να διακινηθούν και να συντηρηθούν σε ψύξη (δηλαδή ιδανικά στους 0 ως 4°C), όπως είναι τα προϊόντα κρέατος, ψαριών, γαλακτοκομικά κτλ, η θερμοκρασία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό υποβάθμισης και την τελική ποιότητα των προϊόντων και αποτελεί έτσι την σημαντικότερη κρίσιμη παράμετρο.

Η ψυκτική αλυσίδα περιλαμβάνει τα διάφορα στάδια μεταφοράς και αποθήκευσης, σε ενδιάμεσα σημεία διανομής, στις αποθήκες, τα ψυγεία πώλησης των σουπερ μάρκετ, τα ψυγεία των καταναλωτών και άλλα πιθανά στάδια. Τα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας των ιχθυηρών παρουσιάζονται στο σχήμα (1.1).

Το βασικό πρόβλημα που παρουσιάζεται είναι ότι η αλληλουχία των συνθηκών που υφίστανται τα προϊόντα όταν φύγουν από την άμεση επίβλεψη που είναι εφικτή στη μονάδα παραγωγής, είναι δύσκολο να μετρηθεί. Πανελλαδική καταγραφή των

Θερμοκρασιών στη ψυκτική αλυσίδα κρέατος, συμπεριλαμβανομένης και της οικιακής αποθήκευσης, έδειξε ότι στο 40% των περιπτώσεων υπήρξαν τμήματα της ψυκτικής αλυσίδας που ξεπερνούν τους 6°C, ενώ κατεγράφησαν και θερμοκρασίες άνω των 10°C, με πιο συχνές τις αποκλίσεις στα οικιακά ψυγεία. Ένα συσκευασμένο προϊόν κρέατος μπορεί να διατηρεί αποδεκτή ποιότητα για 10 ημέρες στους 4°C, ενώ μόνο για 3 ημέρες στους 10°C. Έτσι η ημερομηνία ανάλωσης που αναγράφεται στην ετικέτα τους δίνει συνήθως μια ενδιάμεση ένδειξη, με αποτέλεσμα να έχουμε στις περιπτώσεις ορθής συντήρησης απόρριψη καλών προϊόντων λόγω λήξης τους, και σε κάποιες περιπτώσεις κακής συντήρησης, προϊόντα αλλοιωμένα πριν την ημερομηνία ανάλωσης.



Σχήμα 1.1: Ψυκτική αλυσίδα ιχθυηρών

Επιπρόσθετα, τα προϊόντα ιχθύων, εκτός αν συσκευαστούν, μεταφερθούν και αποθηκευτούν σωστά, αλλοιώνονται σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Η διάρκεια ζωής των ψαριών επηρεάζεται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων, όπως η τροφή τους, το αρχικό μικροβιακό φορτίο τους, η εποχή, η γεωγραφική προέλευση και ο τρόπος ψαρέματος (Shewan, 1961; Reay & Shewan, 1949; Koutsoumanis, 2001). Μια μεγάλη ποσότητα κατεψυγμένων προϊόντων εκτίθεται σε θερμοκρασίες που αποκλίνουν σημαντικά από τις συνιστώμενες. Η εφαρμογή ενός συστήματος διασφάλισης της βέλτιστης ποιότητας και ασφάλειας των προϊόντων στην ψυκτική αλυσίδα απαιτεί συνεχή έλεγχο και παρακολούθηση των συνθηκών αποθήκευσης από την παραγωγή στην κατανάλωση (Tsironi et al., 2008).

Ουσιαστική λύση θα αποτελούσε ένας πρακτικός τρόπος παρακολούθησης του ιστορικού χρόνου-θερμοκρασίας του κάθε προϊόντος και με βάση αυτόν η βελτίωση της διαχείρισης των προϊόντων στην ψυκτική αλυσίδα. Ως ένας ιδιαίτερα υποσχόμενος τέτοιος τρόπος, είναι οι δείκτες ΤΤΙ. **Οι Χρονοθερμοκρασιακοί Δείκτες ή Ολοκληρωτές ΤΤΙ** (ΤΤΙ=Time Temperature Indicators or Integrators) είναι ένα πρωτοποριακό σύστημα επισημάνσης των τροφίμων, που μπορεί να λειτουργήσει ταυτόχρονα με την ημερομηνία λήξης. Έχουν τη μορφή μιας ζωντανής, χαμηλού κόστους αυτοκόλλητης ετικέτας ή είναι ενσωματωμένοι στην ίδια τη συσκευασία του τροφίμου. Οι ΤΤΙ επιτρέπουν τον έλεγχο ενδεχόμενης κακομεταχείρισης του προϊόντος όσον αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης, οι δείκτες ΤΤΙ παρακολουθούν το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό των τροφίμων, σε όλη την πορεία τους από το σημείο παραγωγής, τις ενδιάμεσες φάσεις διανομής μέχρι τον τελικό καταναλωτή. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά της ημερομηνίας ανάλωσης, ως ζωντανή ημερομηνία λήξης. Οι δείκτες αυτοί προσφέρουν έναν αποτελεσματικό και εύκολο στη χρήση τρόπο ανίχνευσης προβληματικών σημείων στην ψυκτική αλυσίδα (Ταουκίς & Labuza, 1989a,b). Βασισμένα σε αξιόπιστα μοντέλα διάρκειας ζωής και στα κινητικά χαρακτηριστικά της απόκρισης των ΤΤΙ, μπορεί να ελεγχθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και να μεταφραστεί ποσοτικά σε ποιότητα τροφίμου από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση (Fu & Labuza, 1993; Ταουκίς 2012).

Οι ΤΤΙ έχουν προταθεί και για τον έλεγχο του χρονοθερμοκρασιακού ιστορικού διάφορων θαλασσινών, όπως για παράδειγμα, του κατεψυγμένου σολωμού (Otwell, 1997), φιλέτων γατόψαρου (Benner et al., 1999), της μεσογειακής γόπας (Ταουκίς et al., 1999) και των φρέσκων θαλασσινών (Mendoza et al., 2004). Περισσότερα για τον ρόλο των ΤΤΙ στη βελτίωση του συστήματος διασφάλισης ποιότητας των τροφίμων και την συστηματική εφαρμογή τους στην ψυκτική αλυσίδα αναλύονται στη συνέχεια του κεφαλαίου.

1.2 Ορισμός, Αρχή Λειτουργίας, Ταξινόμηση ΤΤΙ

1.2.1 Ορισμός

Ο χρονοθερμοκρασιακός δείκτης ή ολοκληρωτής (Time Temperature Integrator, ΤΤΙ) μπορεί να οριστεί ως μια απλή, χαμηλή κόστους διάταξη, η οποία μπορεί με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, να δείξει ολόκληρο ή μέρος του θερμοκρασιακού ιστορικού του τροφίμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένη (Ταουκίς & Labuza, 1989).

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες ανήκουν στην κατηγορία της έξυπνης συσκευασίας. Η **έξυπνη συσκευασία** είναι μια τεχνολογία εύκολης χρήσης που δίνει

πληροφορίες για το συσκευασμένο προϊόν και διευκολύνει τη λήψη αποφάσεων για τη διατήρηση της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων.

1.2.2 Αρχή λειτουργίας των ΤΤΙ

Η αρχή λειτουργίας των ΤΤΙ βασίζεται σε μια μη αντιστρεπτή μηχανική, χημική ηλεκτροχημική, ενζυματική ή μικροβιολογική αλλαγή η οποία συχνά εκφράζεται ως μια ορατή απόκριση με τη μορφή μηχανικής καταπόνησης ή χρωματικής αλλαγής. Ο ρυθμός της αλλαγής αυτής εξαρτάται από τη θερμοκρασία, και αυξάνεται με την αύξηση αυτής. Επομένως, η ορατή απόκριση αποτελεί μια ένδειξη των συνθηκών στις οποίες έχει εκτεθεί ο χρονοθερμοκρασιακός ολοκληρωτής. Ο βαθμός στον οποίο αυτή η απόκριση ανταποκρίνεται σε ένα πραγματικό χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό εξαρτάται από το είδος του δείκτη και τις φυσικοχημικές αρχές λειτουργίας του.

1.2.3 Ταξινόμηση ΤΤΙ

Ένα πρώτο σύστημα ταξινόμησης εισήχθη από τους Schoen & Byrne (1972), οι οποίοι διαχώρισαν τους χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες σε 6 κατηγορίες. Η ταξινόμηση αυτή αναθεωρήθηκε από τον Byrne ο οποίος αντιλήφθηκε ότι η βασική λειτουργική διαφορά έγκειται στο αν ο δείκτης ανταποκρίνεται πάνω από μία προεπιλεγμένη θερμοκρασία ή ανταποκρίνεται συνεχώς, δίνοντας μια αθροιστική ένδειξη των θερμοκρασιακών συνθηκών στις οποίες εκτίθεται. Ο ίδιος, πρότεινε 3 τύπους:

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

Ένα παρόμοιο σύστημα ταξινόμησης προτάθηκε από τους Singh & Wells (1985):

- Δείκτες που δηλώνουν κακομεταχείριση
- Δείκτες μερικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ
- Δείκτες συνολικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ

Με βάση την πιο πρόσφατη κατηγοριοποίηση που προτάθηκε από τους Taoukis & Labuza (2003), οι δείκτες χωρίζονται στις ακόλουθες τρεις κατηγορίες:

Δείκτες Κρίσιμης Θερμοκρασίας (CTI)

Οι δείκτες κρίσιμης θερμοκρασίας (CTI) δίνουν απόκριση όταν η θερμοκρασία είναι πάνω ή κάτω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία αναφοράς. Περιλαμβάνουν ένα

χρονικό στοιχείο (συνήθως σύντομο, από μερικά λεπτά μέχρι λίγες ώρες) αλλά δε δείχνουν το ιστορικό έκθεσης πάνω ή κάτω από τη θερμοκρασία αναφοράς. Ανταποκρίνονται μόνο στην περίπτωση που το προϊόν έχει εκτεθεί σε μια ανεπιθύμητη θερμοκρασία για χρονικό διάστημα τέτοιο ώστε να προκληθεί μια αλλαγή κρίσιμη είτε για την ασφάλεια είτε για την ποιότητα αυτού. Ακόμα, μπορούν να προειδοποιήσουν σε περιπτώσεις όπου διάφορες είτε φυσικοχημικές, είτε βιολογικές αντιδράσεις εμφανίζουν κάποια ασυνεχή αλλαγή στο ρυθμό τους.

Ολοκληρωτές Κρίσιμης Θερμοκρασίας - Χρόνου (CTTI)

Οι ολοκληρωτές κρίσιμης θερμοκρασίας (CTTI) δίνουν απόκριση η οποία αντικατοπτρίζει την αθροιστική έκθεση πέρα από τα όρια μίας κρίσιμης θερμοκρασίας. Η απόκριση αυτή μπορεί να μεταφραστεί σε ισοδύναμο χρόνο έκθεσης στην κρίσιμη θερμοκρασία. Είναι χρήσιμοι ως ένδειξη προβλημάτων στην αλυσίδα διακίνησης προϊόντων καθώς και για προϊόντα στα οποία πραγματοποιούνται αντιδράσεις που επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων πέρα από την κρίσιμη θερμοκρασία.

Χρονο-θερμοκρασιακοί Ολοκληρωτές ή Δείκτες (TTI)

Οι δείκτες TTI (Time Temperature Integrators) ή TTM (Time Temperature Monitors) δίνουν μία συνεχή θερμοκρασιακά εξαρτώμενη απόκριση με βάση το θερμοκρασιακό ιστορικό του προϊόντος. Ολοκληρώνουν, σε μία μόνο μέτρηση, το συνολικό χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να δείξουν μία μέση θερμοκρασία διακίνησης του τροφίμου. Επίσης, μπορούν να συσχετισθούν με συνεχείς εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία αντιδράσεις υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων.

Ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης που χρησιμοποιείται, είναι με βάση την αρχή λειτουργίας των δεικτών. Επομένως διαχωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες.

- Μηχανικοί δείκτες
- Χημικοί δείκτες
- Ενζυμικοί δείκτες
- Μικροβιολογικοί δείκτες
- Πολυμερικοί δείκτες
- Ηλεκτροχημικοί δείκτες
- Φωτοχημικοί δείκτες
- Δείκτες διάχυσης

1.3 Χαρακτηριστικά και απαιτήσεις για έναν ιδανικό ΤΤΙ

Η αποτελεσματικότητα ενός ΤΤΙ προϋποθέτει την ένδειξη μία συνεχούς αλλαγής, ο ρυθμός της οποίας αυξάνει με τη θερμοκρασία και ο οποίος δεν αντιστρέφεται όταν η θερμοκρασία μειώνεται (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς & Labuza, 2003). Πιο αναλυτικά, ένας ιδανικός ΤΤΙ πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά (Ταουκίς, 2001; Ταουκίς & Labuza, 2003):

- Να εμφανίζει μια συνεχή, χρονοθερμοκρασιακά εξαρτώμενη αλλαγή.
- Η αλλαγή να εκφράζεται ως μία απόκριση εύκολα μετρήσιμη και μη αντιστρεπτή.
- Η αλλαγή αυτή να μιμείται ή να μπορεί να συσχετιστεί με το βαθμό ποιοτικής αλλοίωσης του τροφίμου και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του.
- Να είναι αξιόπιστος και να δίνει σταθερές αποκρίσεις όταν εκτίθεται στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες.
- Να έχει χαμηλό κόστος.
- 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.
- Να είναι μικρός, εύκολα προσαρμόσιμος ως κομμάτι της συσκευασίας του τροφίμου καθώς και συμβατός με μια διεργασία συσκευασίας υψηλής ταχύτητας.
- Να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής πριν την ενεργοποίηση και να ενεργοποιείται εύκολα.
- Να επηρεάζεται αποκλειστικά από την θερμοκρασία και όχι από τις υπόλοιπες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το φως, η σχετική υγρασία και οι ρυπαντές του αέρα.
- Να είναι ανθεκτικός σε φυσιολογικές μηχανικές καταπονήσεις χωρίς να μεταβάλλεται η απόκρισή του.
- Να μην είναι τοξικός και να μην αποτελεί κίνδυνο στην απίθανη περίπτωση επαφής του με το τρόφιμο.
- Να είναι σε θέση να μεταβιβάζει με απλό και ξεκάθαρο τρόπο το μήνυμα στον δέκτη της πληροφορίας του, είτε αυτός είναι ο καταναλωτής ή οποιοδήποτε άλλος ενδιαφερόμενος.
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.

Παρόλο που κανένας χρονοθερμοκρασιακός δείκτης μέχρι στιγμής δεν ικανοποιεί απολύτως όλες τις παραπάνω απαιτήσεις, η εξέλιξη των δεικτών έχει οδηγήσει σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο και πλέον το μοντέλο του ιδανικού ΤΤΙ προσεγγίζεται αρκετά ικανοποιητικά από τους διαθέσιμους τύπους.

1.4 Εξέλιξη των TTI

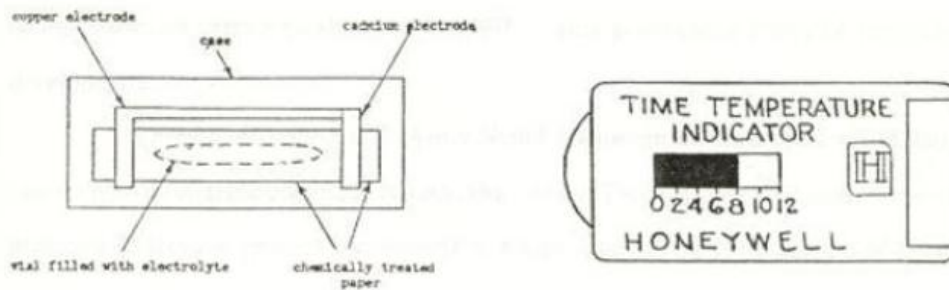
Οι προσπάθειες ανάπτυξης ενός αποτελεσματικού και οικονομικού δείκτη, ξεκίνησαν από την περίοδο όπου έγινε εμφανής η σημασία των μεταβολών της θερμοκρασίας στην ποιότητα του τελικού τροφίμου. Αρχικά το ενδιαφέρον στράφηκε στα ψυγμένα τρόφιμα. Η πρώτη εφαρμογή μιας συσκευής που μπορεί να δείχνει κακομεταχείριση τροφίμου, χρονολογείται από το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, όταν ομάδες εφοδιαστών του Αμερικανικού στρατού τοποθετούσαν παγάκια σε κάθε συσκευασία κατεψυγμένου τροφίμου. Η εξαφάνιση του πάγου, ισοδυναμούσε με κακομεταχείριση (Schoen & Byrne, 1972). Ο πρώτος “πατενταρισμένος” δείκτης χρονολογείται το 1933 (Midgley, 1933). Από τότε έχουν εκδοθεί πάνω από εκατό διαφορετικές αμερικάνικες και διεθνείς πατέντες οι οποίες σχετίζονται με τους χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες. Ο Byrne, (1976), έκανε μια γενική επισκόπηση των πρώτων δεικτών και ο Ταουκίς (1989), έκανε μια λεπτομερή παρουσίαση των TTI. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται αξιόλογες πατέντες δεικτών, οι οποίες έχουν ταξινομηθεί χρονολογικά με βάση τον τύπο και την αρχή λειτουργίας του TTI.

Πίνακας 1.3 Διάφορα συστήματα TTI με βάση τον τύπο και τον τρόπο απόκρισης.

Χρονολογία	Εφευρέτης	Αρχή λειτουργίας
1991	Jalinski, T.J.	Χημικός (TTI)
1991	Jalinski, T.J.	Χημικός (TTI)
1991	Thierry, A.	Χημικός (CTI)
1991	Swartzel, K.R.	Φυσικοχημικός (TTI)
1992	Jalinski, T.J.	Χημικός (CTI)
1993	Veitch, R.J.	Φυσικοχημικός (TTI)
1993	Loustaunau, A.	Φυσικός (CTI)
1994	Loustaunau, A.	Φυσικός (CTI)
1994	Veitch, R.J.	Φυσικοχημικός (CTI)
1995	Prusik, T.	Φυσικοχημικός (TTI)
1996	Cannelongo, J.F.	Φυσικός (CTI)
1996	Veitch, R.J.	Φυσικός (CTI)
1997	Arens R. et al.	Φυσικοχημικός (TTI)
1997	Schneider, N.	Φυσικός (CTI)
1999	Simons, M.J.	Φυσικοχημικός (CTI)
2000	Schaten, B.B.	Φυσικός (CTI)
2000	Leak & Rönnow	Ενζυμικός (TTI)
2000	Prusik, T.	Φυσικός (CTTI)
2000	Ram, A.T.	Χημικός (TTI)
2000	Bray, A.V.	Φυσικός (TTI)
2001	Simons, M.J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2001	Qiu, J.	Φυσικοχημικός (TTI)

2002	Qiu, J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2003	Haarer D.	Φυσικοχημικός (TTI)
2005	Bauer & Knorr	Pressure TT (PTTI)
2006	Ciba & Fresh Point Coorporation	Φωτοχημικός (OnVu TTI)
2008	Sun	Amylase Type TTI

Ο πρώτος εμπορικά διαθέσιμος TTI δημιουργήθηκε από την Honeywell Corp. (Minneapolis, MN) (Renier & Morin, 1962). Δε διατέθηκε όμως στην αγορά λόγω του υψηλού κόστους και του μεγάλου όγκου του.



Σχήμα 1.2: Αναλυτική και γενική εικόνα του πρώτου TTI από την Honeywell Corp.

Στις αρχές του 1970, οι Ηνωμένες Πολιτείες κατέστησαν υποχρεωτική τη χρήση των δεικτών αυτών σε συγκεκριμένα τρόφιμα (OTA, 1979) δημιουργώντας αναταραχή στην έρευνα των TTI. Ερευνητές από τις Ηνωμένες Πολιτείες ανέπτυξαν χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες που βασίζονταν στη χρωματική αλλαγή οξειδώσιμου χημικού συστήματος ελεγχόμενου από την -εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία- διείσδυση του οξυγόνου μέσω μιας μεμβράνης (Hu, 1972). Μετά από συνεχείς μελέτες διάρκειας πάνω από δύο χρόνια, εμφανίστηκε ένα σύστημα TTI με δυνατότητες εμπορικής χρήσης, και εισήχθη από την Artech Corp (Falls Church, VA). Μέχρι το 1976, έξι εταιρείες κατασκεύασαν θερμοκρασιακούς δείκτες τουλάχιστον σε στάδιο πρωτοτύπων (Kramer & Farquhar, 1976). Οι δείκτες Artech, Check Spot Co (Vancouver, WA) (US patent 2,971,852) και Tempil (S. Plainfield, NJ) χαρακτηρίστηκαν ως CTI δείκτες ενώ οι δείκτες I-Point (Malmö, Sweden), Bio-Medical Sciences (Fairfield, NJ) (US patents 3,946,611 και 4,042,336) και οι 3M Co. (St. Paul, MN) χαρακτηρίστηκαν ως TTI δείκτες. Ο δείκτης Tempil μπορούσε να λειτουργήσει και ως CTTI δείκτης. Η αρχή λειτουργίας του ήταν ουσιαστικά μια χρωματική αλλαγή σε κόκκινο χρώμα όταν εκτιθόταν σε θερμοκρασία πάνω από την κρίσιμη. Ο δείκτης I-Point ήταν ένας ενζυμικός δείκτης και ο 3M ένας χρονοθερμοκρασιακός δείκτης διάχυσης.

Ως το τέλος του 1970, παρά τη μεγάλη ανάπτυξη των ΤΤΙ από διάφορες εταιρείες, η εμπορική τους εφαρμογή ήταν περιορισμένη, και η ερευνητική δραστηριότητα γύρω από τους δείκτες μειώθηκε. Στις αρχές του 1980, τέσσερα συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των I-Point και των 3M ΤΤΙ ήταν εμπορικά διαθέσιμα. Το Andover Labs (Weymouth, MA) εμπορευόταν τους δείκτες Ambitemp και Tempchron μέχρι το 1985. Και τα δύο αυτά συστήματα ήταν για χρήση στην ψυκτική αλυσίδα και αποτελούσαν CΤΤΙ. Η λειτουργία τους βασιζόταν στη μετακίνηση ενός υγρού κατά μήκος ενός τριχοειδούς σωλήνα.

1.5 Σύγχρονα συστήματα ΤΤΙ

Οι ερευνητικές και βιομηχανικές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν επικεντρωθεί σε τύπους ΤΤΙ οι οποίοι ικανοποιούν τις προδιαγραφές ενός επιτυχημένου και αποτελεσματικού ΤΤΙ και έχουν εξελιχθεί στους κυριότερους εμπορικούς δείκτες στην αγορά. Η λειτουργία αυτών βασίζεται κυρίως σε αρχές μοριακής διάχυσης, αντιδράσεις πολυμερισμού, αντίδραση μεταφοράς ριζών, ενζυμικές και μικροβιακές μεταβολές

Πίνακας 1.4: Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ΤΤΙ, η αρχή λειτουργίας και ο τρόπος απόκρισης τους.

Τύπος ΤΤΙ	Αρχή λειτουργίας	Απόκριση
Μοριακής διάχυσης	Διάχυση ενός ιξωδοελαστικού υλικού σε μια φωτο-αντανακλαστική πορώδη μήτρα. Ενεργοποιείται με αφαίρεση του φιλμ μεταξύ του πολυμερούς και της μήτρας	Σταδιακή μεταβολή της διαπερατότητας του φωτός μέσα από την πορώδη μήτρα
Πολυμερισμού	Αντίδραση πολυμερισμού, που λαμβάνει χώρα σε στερεή φάση	Μεταβολή του χρώματος (αποχρωματισμός εικόνας)
Χημικοί-Φυσικοί	Κάποια φυσικοχημική αντίδραση. Ενεργοποιείται τοποθετώντας την ταινία ενεργοποίησης πάνω στον δείκτη	Μεταβολή του χρώματος ή αποχρωματισμός εικόνας
Φωτοχημικοί	Αντίδραση μεταφοράς ριζών. Ενεργοποιείται με έκθεση του δείκτη σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)	Μεταβολή του χρώματος από σκούρο μπλε σε ανοιχτό γκρι
Μικροβιολογικοί	Μείωση του pH ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης γαλακτικών βακτηρίων	Μεταβολή του χρώματος (από πράσινο σε φούξια) ή αποχρωματισμός εικόνας

<p>Ενζυμικοί</p>	<p>Μείωση του pH ως αποτέλεσμα ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης. Ενεργοποιείται με ρήξη του διαχωριστή ενζύμου – υποστρώματος και ανάμιξη</p>	<p>Μεταβολή του χρώματος από πράσινο σε κίτρινο ή/και κόκκινο</p>
-------------------------	--	---



Σχήμα 1.3: Παραδείγματα εμπορικών δεικτών TTI

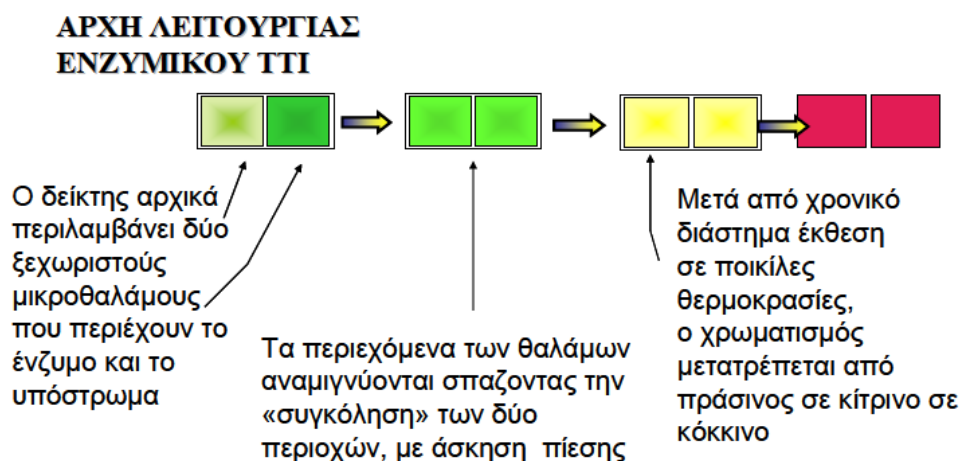
Ενζυμικοί Χρονοθερμοκρασιακοί Δείκτες

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα μελετήσουμε ενζυμικούς TTI γι αυτό το λόγο θα γίνει πιο λεπτομερής ανάλυση στο συγκεκριμένο τύπο. Όπως αναφέρθηκε και στον παραπάνω πίνακα, η λειτουργία του δείκτη βασίζεται σε μια χρωματική αλλαγή η οποία προκαλείται λόγω μείωσης του pH ως αποτέλεσμα ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός λιπαρού υποστρώματος. Πριν την ενεργοποίηση, το ένζυμο και το υπόστρωμα βρίσκονται σε δύο ξεχωριστούς μικροθαλάμους. Κατά την ενεργοποίηση σπάει με επιβολή μηχανικής πίεσης το φράγμα που χωρίζει τους δύο θαλάμους και το ένζυμο αναμειγνύεται με το υπόστρωμα. Η υδρόλυση του υποστρώματος προκαλεί μεταβολή pH, η οποία μεταφράζεται σε μια σταδιακή χρωματική αλλαγή.

Η χρωματική αυτή αλλαγή είναι ιδιαίτερα ευκρινής και σχετίζεται με την εξέλιξη της χρονο-θερμοκρασιακής επιβάρυνσης του προϊόντος. Διαφορετικά μίγματα ενζύμου-υποστρώματος χρησιμοποιούνται για διαφορετικά θερμοκρασιακά διαστήματα και διάρκειες ζωής. Διαφορετικοί συνδυασμοί τύπου και συγκέντρωσης ενζύμου-υποστρώματος ανάλογα με την επιδιωκόμενη διάρκεια ζωής του δείκτη και τα θερμοκρασιακά εύρη μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Τα αρχικά και τελικά χρώματα

αναφοράς εκτυπώνονται γύρω από το παράθυρο της αντίδρασης, έτσι ώστε να είναι πιο εύκολη η οπτική αναγνώριση και εκτίμηση της χρωματικής αλλαγής. Η συνεχής χρωματική αλλαγή μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλα όργανα (Ταουκίς & Labuza, 1989).

Η εταιρεία VITSAB (VITSAB A.B., Malmö, Sweden) έχει κατασκευάσει πολλά ενζυμικά 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 12 – 27 kcal/mole. Η μεγάλη αυτή ακτίνα εμβέλειας οφείλεται στο γεγονός ότι σαν υπόστρωμα για την ενζυμική αντίδραση μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά και διαφορετικά λιπίδια καθένα από τα οποία δίνει και μια διαφορετική ενέργεια ενεργοποίησης.



Σχήμα 1.4: Διαμόρφωση και διαδικασία ενεργοποίησης και λειτουργίας του ενζυμικού δείκτη *Check Point*[®] της VITSAB.

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

- Το είδος ενζύμου και υποστρώματος.

Πίνακας 1.5: Διαφορετικοί τύποι Vitsab TTI ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος.

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

- Τη συγκέντρωση και την αναλογία ενζύμου – υποστρώματος (που συνεπάγεται διαφορετική διάρκεια ζωής).

Πίνακας 1.6: Διαφορετικοί τύποι Vitsab TTI με βάση την αναλογία ενζύμου-υποστρώματος

Τύπος	Θερμοκρασία	Διάρκεια ζωής
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

- Τα στάδια χρωματικής αλλαγής.

- Δίχρωμοι (Bicolor) TTI: Στα TTI αυτά το “παράθυρο ελέγχου” μόλις ενεργοποιείται φέρει βαθύ πράσινο χρώμα, το οποίο στο τέλος της αντίδρασης καταλήγει σε κίτρινο.



Σχήμα 1.5: Χρωματική απόκριση του δίχρωμου δείκτη της Vitsab.

- Τρίχρωμοι (Tricolor) TTI: Το “παράθυρο ελέγχου” μόλις ενεργοποιείται φέρει βαθύ πράσινο χρώμα το οποίο στη μέση της αντίδρασης γίνεται κίτρινο, και στο τέλος της αντίδρασης κόκκινο.



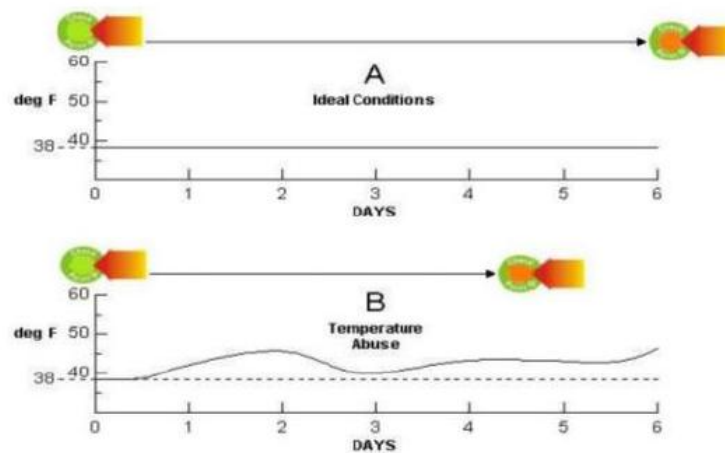
Σχήμα 1.6: Χρωματική απόκριση του τρίχρωμου δείκτη της Vitsab.

Οι τρίχρωμοι και οι δίχρωμοι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες έχουν διαφορετικό στόχο. Πιο συγκεκριμένα, οι τρίχρωμοι TTI παρέχουν τη δυνατότητα ένδειξης της ενδιάμεσης κατάστασης του τροφίμου (κίτρινο χρώμα) και όχι μόνο των ακραίων καταστάσεων του φρέσκου και του μη φρέσκου (πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα) όπως οι δίχρωμοι TTI. Επομένως οι δεύτεροι, 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, δεδομένου ότι καθίσταται πιο εύκολη η παρακολούθηση των σταδίων χρωματικής μεταβολής, ενώ οι δίχρωμοι δείκτες είναι λιγότερο κατανοητοί απουσία χρωματικής κλίμακας. Παρόλα αυτά οι

δίχρωμοι TTI μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως από τη βιομηχανία, αλλά και από άλλους εμπλεκόμενους φορείς στην αλυσίδα τροφίμων.

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

Σχήμα 1.7: Χρωματική κλίμακα TTI της Vitsab.



Σχήμα 1.8: Χρόνος λήξης του ενζυμικού TTI Check Point[®] της Vitsab σε σταθερές και μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες

1.6 Κινητική απόκριση των δεικτών TTI

Η απόκριση ενός TTI είναι το αποτέλεσμα ενός βιολογικού, φυσικού, χημικού, φωτοχημικού ή φυσικοχημικού φαινομένου το οποίο εξαρτάται από τις χρονοθερμοκρασιακές συνθήκες στις οποίες αυτό υποβάλλεται. Προκειμένου να γίνει σωστή επίλογή, χρήση και εφαρμογή ενός TTI, πολύ σημαντικός παράγοντας είναι ο σωστός σχεδιασμός της απόκρισής τους ο οποίος βασίζεται στην γνώση των δεικτών και των χαρακτηριστικών τους.

Γι αυτό το λόγο σχεδιάζεται ένα μαθηματικό μοντέλο αντίστοιχο με αυτό της ποιοτικής υποβάθμισης. Εάν X η μετρήσιμη αλλαγή του TTI, μπορεί να οριστεί συνάρτηση απόκρισης $F(X)$ με μορφή

$$F(X)=kt \quad (1.8)$$

όπου

- $F(X)$: η συνάρτηση απόκρισης του TTI και
- k : η σταθερά του ρυθμού

Η απόκριση του ΤΤΙ ακολουθεί μια θερμοκρασιακή εξάρτηση τύπου Arrhenius επομένως όταν εκτίθεται στην ίδια θερμοκρασιακή κατανομή με το τρόφιμο, η συνάρτηση απόκρισής του σε χρόνο t περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$F(X)_t = \int_0^t k dt = k_I \int_0^t \exp\left(\frac{-E_{aI}}{RT(t)}\right) dt \quad (1.9)$$

Όπου k_I , E_{aI} οι κινητικές παράμετροι της σταθεράς ρυθμού k λόγω εξάρτησης τύπου Arrhenius.

Αντίστοιχα, η $F(X)_t$ συναρτήσει της δραστικής θερμοκρασίας θα εκφράζεται ως εξής.

$$F(X)_t = k_I \exp\left(\frac{-E_{aI}}{RT_{eff}}\right) \quad (1.10)$$

1.7 Αντιστοίχιση απόκρισης ΤΤΙ με την ποιότητα των τροφίμων

Η κατανόηση της μεγάλης επίδρασης που έχει η θερμοκρασία διατήρησης στην ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων αποτέλεσε σημείο έναρξης της ανάπτυξης των ΤΤΙ. Όμως ο συσχετισμός της απόκρισης αυτών με μια τιμή που να εκφράζει την ποιότητα των τροφίμων δεν είναι άμεσος.

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

Γρήγορα όμως έγινε αντιληπτό ότι μια γενίκευση σαν αυτή δεν ήταν καθόλου αξιόπιστη, δεδομένο ότι ακόμα και τρόφιμα του ίδιου τύπου είχαν σημαντικές αποκλίσεις στη συμπεριφορά της ποιοτικής υποβάθμισης και τη θερμοκρασιακή εξάρτηση (Bengtsson et al., 1972).

Επομένως φάνηκε ότι η θερμοκρασιακή εξάρτηση της συμπεριφοράς των ΤΤΙ πρέπει να ταιριάζει με αυτή του συγκεκριμένου τροφίμου το οποίο εξετάζεται (Haykawa & Wong, 1974; Krammer & Farquhar, 1976). Η προσέγγιση αυτή απαιτούσε την ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού ΤΤΙ πράγμα που ήταν πρακτικά αδύνατο. Εξάλλου, μια άλλη σημαντική παράλειψη ήταν ότι οι καμπύλες συσχετισμού της απόκρισης με τη θερμοκρασία για τα ΤΤΙ και της ποιοτικής υποβάθμισης με τη θερμοκρασία για τα τρόφιμα θα έπρεπε να είναι της ίδιας μορφής (π.χ. γραμμική). Η πολυπλοκότητα της αντιστοίχισης της απόκρισης των δεικτών με την ποιότητα των

προϊόντων, είχε ως αποτέλεσμα την πραγματοποίηση πληθώρας πειραματικών μελετών (Rodriguez & Zaritzki, 1983; Mistry & Kosikowski, 1983; Dolan et al., 1985; Tinker et al., 1985). Στόχος των μελετών αυτών ήταν η συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων ΤΠΙ και συγκεκριμένων τροφίμων.

Οι μελέτες αυτές βασίζονταν στην αποθήκευση των τροφίμων σε διαφορετικές θερμοκρασίες και στη δημιουργία διαγραμμάτων απόκρισης των ΤΠΙ και των τιμών των επιλεγμένων παραμέτρων ποιότητας των τροφίμων ως προς το χρόνο. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν στατιστική επεξεργασία του συσχετισμού της απόκρισης των ΤΠΙ με τις ποιοτικές παραμέτρους των τροφίμων. Σε όλες τις μελέτες που έγιναν, πραγματοποιήθηκαν οργανοληπτικές αναλύσεις των ποιοτικών παραμέτρων των τροφίμων.

Παρά τις χρήσιμες πληροφορίες που πρόσφεραν οι παραπάνω μελέτες, παρουσίασαν τα παρακάτω μειονεκτήματα.

- Κάποιες έρευνες δεν χρησιμοποιούσαν τις κατάλληλες θερμοκρασίες αποθήκευσης ούτε τα κατάλληλα ΤΠΙ για τα συγκεκριμένα θερμοκρασιακά διαστήματα και χρόνους αποθήκευσης.
- Από τη στιγμή που δεν κατασκευάζονταν μοντέλα που να δείχνουν τη χρονοθερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης των ΤΠΙ, η εφαρμογή τους περιοριζόταν μόνο σε τρόφιμα και για τις συγκεκριμένες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε σημαντικότερο μειονέκτημα ακόμα και των καλύτερων μελετών.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι προφανές πως προκειμένου να κατασκευαστεί ένα ικανοποιητικό ΤΠΙ είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μιας προσέγγισης που να επιτρέπει το συσχετισμό της απόκρισης ενός συγκεκριμένου τύπου ΤΠΙ με τη μεταβολή της ποιότητας και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής ενός τροφίμου, το οποίο έχει υποστεί οποιαδήποτε σταθερή ή μεταβλητή θερμοκρασιακή έκθεση. Επιπρόσθετα, είναι πολύ σημαντικό να υπάρξει μια ολοκληρωμένη μελέτη του ΤΠΙ για την ανάπτυξη κινητικών μοντέλων που να επιτρέπουν την ενσωμάτωσή του στην προηγούμενη προσέγγιση. Τέλος, σύμφωνα με αυτά τα κινητικά μοντέλα, πρέπει να εξετάζεται η αξιοπιστία των ΤΠΙ για την πρόβλεψη της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων κάτω από μεταβλητές θερμοκρασιακές συνθήκες.

Από τις κινητικές εξισώσεις, οι οποίες περιγράφουν την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων και την απόκριση ενός ΤΠΙ εκτεθειμένου στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες, μπορεί να αναπτυχθεί ένα τέτοιο σχεδιάγραμμα που να επιτρέπει την

εκτίμηση της τιμής του παράγοντα ποιότητας A, οποιαδήποτε χρονική στιγμή, από τη μετρούμενη αλλαγή X του δείκτη στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Το σχεδιάγραμμα θα βασίζεται στη γνώση των κινητικών χαρακτηριστικών της ποιοτικής υποβάθμισης: $Q(A)$, k_A , E_A , του τροφίμου και των κινητικών χαρακτηριστικών απόκρισης του ΤΤΙ: $F(X)$, k_i , E_{Ai} . Η εισαγόμενη πληροφορία θα είναι η μετρούμενη απόκριση X του ΤΤΙ στο χρόνο t.

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

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

$$F(X)_t = F(X_t) \quad (1.11)$$

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

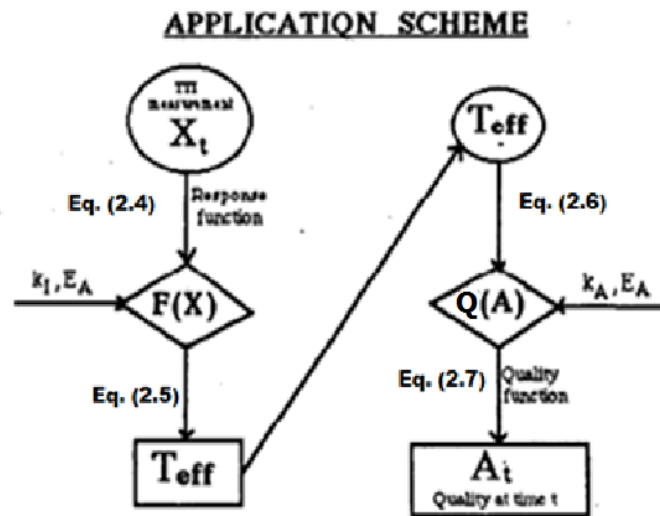
$$T_{eff} = \frac{-E_{Ai}}{R \ln \left(\frac{F(X)_t}{K_i t} \right)} \quad (1.12)$$

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, $Q(A)_t$, χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση.

$$Q(A)_t = k_{Aref} \cdot e^{\left(-\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right)} \cdot t \quad (1.13)$$

4. Με βάση την τιμή της συνάρτησης ποιότητας $Q(A)_t$ 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.

$$A_t = Q^{-1}(Q(A)_t) \quad (1.14)$$



Σχήμα 1.9: Απεικόνιση της συστηματικής προσέγγισης για την εφαρμογή των ΤΤΙ στον έλεγχο ποιότητας των τροφίμων.

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

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

1.8 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας T_{eff}

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

- Η μεταβλητότητα των μετρήσεων της απόκρισης μεταξύ δεικτών του ίδιου μοντέλου στις ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας
Προκειμένου να περιοριστεί αυτή η μεταβλητότητα είναι απαραίτητος ο καλύτερος έλεγχος της κατασκευής των ΤΤΙ. Σε κινητικές μελέτες των ΤΤΙ για να ελαχιστοποιηθεί το σφάλμα πρέπει να χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός δείγματος, του ίδιου δείκτη, σε κάθε πειραματική διαδικασία.
- Η στατιστική αβεβαιότητα για τις παραμέτρους της εξίσωσης Arrhenius
Στην κινητική μελέτη των ΤΤΙ χρησιμοποιείται η σχέση Arrhenius έχοντας κάνει την παραδοχή ότι η ενζυμική αντίδραση περιγράφεται από αυτήν. Με γραμμική προσαρμογή υπολογίζονται οι παράμετροι E_a και k_0 , συνοδευόμενοι με κάποιο σφάλμα. Η πιθανότητα σφάλματος μειώνεται με τη χρήση τουλάχιστον 5 θερμοκρασιών.
- Η διαφορά των τιμών E_a μεταξύ του τροφίμου και του ΤΤΙ
Πρόκειται για συστηματικό και όχι στατιστικό σφάλμα. Το σφάλμα στον υπολογισμό της T_{eff} είναι μικρότερο, όσο η E_a του ΤΤΙ προσεγγίζει αυτή του τροφίμου.

1.9 Εφαρμογή ΤΤΙ σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων

Από τη συσχέτιση της ποιότητας των τροφίμων με την απόκριση των ΤΤΙ προέκυψαν πολλές πειραματικές μελέτες ώστε να δημιουργηθούν συσχετισμοί μεταξύ συγκεκριμένων προϊόντων και συγκεκριμένων ΤΤΙ. Οι μελέτες αυτές παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1.7: Μελέτες συσχετισμού συγκεκριμένων προϊόντων με ΤΤΙ.

Μελέτες	Τρόφιμο
Rodriguez & Zaritzki, 1983	Κατεψυγμένο βοδινό κρέας
Mistry & Kosikowski, 1983; Grisius et al., 1987; Chen & Zall, 1987a	Παστεριωμένο πλήρες γάλα
Dolan et al., 1985	Παγωτό
Singh & Wells, 1985	Κατεψυγμένο χάμπουργκερ
Tinker et al., 1985	Κατεψυγμένα φιλέτα βακαλάου
Cambell, 1986	Ψυγμένες σαλάτες
Zall et al., 1986	Γάλα UHT
Chen & Zall, 1987b	Κατεψυγμένος χυμός από πορτοκάλι
Chen & Zall, 1987a	Παστεριωμένη κρέμα

Chen & Zall, 1987a; Shellhammer & Singh, 1991	Cottage cheese
Wells & Singh, 1988	Κατεψυγμένες φράουλες
Wells & Singh, 1988	Κατεψυγμένο μαρούλι και ντομάτες
Yoon et al., 1994	Κατεψυγμένο χοιρινό κρέας
Ronnow et al., 1998 (FDA)	Παστό / καπνιστό ψάρι (τοξίνη clostridium botulinum)
Ronnow et al., 1999	Κατεψυγμένος φρέσκος σολομός
Taoukis et al., 1999a, 1999b	Ψυγμένα ψάρια
Wendle et al., 2003	Θερμικά επεξεργασμένο γάλα
Giannakourou & Taoukis, 2003	Ρώσικη σαλάτα και μελιτζανοσαλάτα
Giannakourou & Taoukis, 2003	Κατεψυγμένα λαχανικά
M. Smolander et al., 2003	Συσκευασμένο κοτόπουλο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Giannakourou et al., 2004	Ψυγμένα ψάρια
Alfaro et al., 2005	Φρέσκα ψάρια (καλκάνι, rsetta maxima)
Els Bobelyn et al., 2006	Μανιτάρια
Tsironi et al., 2008	Κατεψυγμένος τόνος συσκευασμένος υπό κενό
Vaikousi et al., 2009	Κιμάς συσκευασμένος σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Ellouze et al., 2010	Συσκευασμένος βόειος κιμάς σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συσκευασμένο ψημένο φιλέτο κοτόπουλο
Tsironi et al., 2011	Φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Jin Young Han et al., 2012	Φιλέτο μοσχαριού
Kim et al., 2013	Χοιρινός κιμάς Κορέας
Brizio et al., 2014	Ψυγμένα φιλέτα κοτόπουλου
Giannoglou et al., 2014	Κατεψυγμένα θαλασσινά (Γλάυκοκαρχαρίας και Θράψαλο Ν.Ζηλανδίας)
Tsironi et al., 2016	Στρείδια

Η εφαρμογή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών στη διαχείριση της αλυσίδας ψυγμένων και κατεψυγμένων προϊόντων, έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών διπλωματικών εργασιών στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π. με στόχο τη συσχέτιση και μελέτη της απόκρισης χρονοθερμοκρασιακών δεικτών με προϊόντα. Στον παρακάτω πίνακα (1.7) παρουσιάζονται αυτές οι διπλωματικές εργασίες.

Πίνακας 1.8: Διπλωματικές εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο του Ε.Μ.Π..

Διπλωματική Εργασία	Συγγραφέας
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας φιλέτων ψαριού συσκευασμένων σε MAP (Αθήνα 2008)	Αναστάσιος Σταματίου
Μελέτη νέων χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας: Εφαρμογή σε προϊόντα κρέατος (Αθήνα 2009)	Ηλιάνα Μεταξά
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας φιλέτων τιλάπιας (Αθήνα 2010)	Ελένη Πλατάκου
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της αλυσίδας κατεψυγμένων θαλασσινίων (Αθήνα 2010)	Κλεοπάτρα Τσατσαράγκου
Εφαρμογή ΤΤΙ στη διαχείριση της αλυσίδας ψυγμένων χελιών και κατεψυγμένου γλαυκοκαρχαρία (Αθήνα 2011)	Μαργαρίτα Λουκιανού
Έξυπνη συσκευασία: Μελέτη και εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) στη ψυκτική αλυσίδα κατεψυγμένων θαλασσινίων (Αθήνα 2013)	Αφροδίτη Τούλη
Κινητική μελέτη έξυπνης συσκευασίας με εφαρμογή ενζυμικών και φωτοχημικών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών ΤΤΙ για τον έλεγχο της ψυκτικής αλυσίδας βόειου κιμά (Αθήνα 2015)	Μαρία Πολεμαρχάκη
Έξυπνη συσκευασία: Έρευνα και επιλογή συνδυασμού ενζύμου–υποστρώματος για την ανάπτυξη ΤΤΙ με χρονοθερμοκρασιακή απόκριση κατάλληλη για τον έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας στη ψυκτική αλυσίδα στρειδιών (Αθήνα 2016)	Καλλιόπη Καλλιούπη

1.10 Αίτια περιορισμού της χρήσης και εφαρμογής των ΤΤΙ και μεγιστοποίηση της αποτελεσματικότητάς τους

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να ελέγχεται η θερμοκρασιακή έκθεση προϊόντων τροφίμων καθ' όλη τη διάρκεια της διακίνησής τους, από την παραγωγή μέχρι την παράδοση στα σουπερμάρκετ. Οι πληροφορίες των ΤΤΙ μπορούν να χρησιμεύσουν για συνολική και διαρκή παρακολούθηση του προϊόντος. Αυτό διευκολύνει τον εντοπισμό και τη διόρθωση ασθενών κρίκων της ψυκτικής αλυσίδας. Πάρα τις δυνατότητες των ΤΤΙ να συμβάλλουν ουσιαστικά στη βελτίωση της διακίνησης των τροφίμων και στη μείωση των απωλειών οι αρχικές προσδοκίες δεν ικανοποιήθηκαν. Οι κυριότερες αιτίες που οδηγούν σε αυτή την επιφυλακτικότητα, είναι οι εξής.

- Κόστος
- Αξιοπιστία
- Εφαρμοσιμότητα

Το κόστος έχει να κάνει με το μέγεθος της παραγωγής, και δεδομένου ότι προς το παρόν οι δείκτες δεν παράγονται μαζικά λόγω χαμηλής ζήτησης το κόστος παραμένει υψηλό. Παρ' όλα αυτά, αν όλα τα υπόλοιπα ερωτήματα απαντηθούν, η ανάλυση του οικονομικού οφέλους θα είναι υπέρ των δεικτών.

Όσον αφορά το ζήτημα της αξιοπιστίας, πηγάζει στα πρώιμα στάδια των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών λόγω έλλειψης επαρκών δεδομένων τόσο από μελέτες όσο και από τους προμηθευτές. Οι πρώτες απόπειρες που έγιναν προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι δείκτες για τον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων ήταν ανεπιτυχείς λόγω κακού σχεδιασμού. Σύγχρονα συστήματα ΤΠ έχουν εξασφαλίσει υψηλά επίπεδα ποιότητας στην παραγωγή και μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα.

Το ζήτημα της εφαρμοσιμότητας όμως, αποτελεί το πιο σοβαρό εμπόδιο στη χρήση των ΤΠ. Πολλές πρώιμες μελέτες δεν κατάφεραν να εισάγουν μια ξεκάθαρη μεθοδολογία στο πως η χρονοθερμοκρασιακή απόκριση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέτρο ποιοτικού ελέγχου. Η αρχική προσέγγιση ήταν να δημιουργείται μια καμπύλη εξάρτησης για μια γενική κατηγορία τροφίμων, για παράδειγμα κατεψυγμένων, και να επιλέγεται ένας δείκτης που να έχει παρόμοια θερμοκρασιακή καμπύλη εξάρτησης με το χρόνο με αυτή. Μια τέτοια γενίκευση όμως αποδείχτηκε αναποτελεσματική αφού τρόφιμα του ίδιου τύπου διαφέρουν σημαντικά στην απώλεια της ποιότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Εκτός από τα παραπάνω αίτια τα οποία είναι μεγάλης σημασίας, η άγνοια των καταναλωτών σχετικά με την ημερομηνία λήξης και τη βελτίωση της παρεχόμενης πληροφόρησης με την εφαρμογή των δεικτών, αποτελεί ένα πρόσθετο πρόβλημα στη χρήση των ΤΠ (Cook, 1990; Sherlock & Labuza, 1991). Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε (Anonymus, 1989), η παρουσία δείκτη μπορεί να επηρεάσει θετικά τον καταναλωτή.

Οι περιορισμοί που εμφανίζουν οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες παρατίθενται στη συνέχεια.

- Οι χημικοί ή ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες αποδείχθηκε ότι συχνά παρουσιάζουν μια ευαισθησία στη διάχυση αερίου διαμέσου πολυμερούς φιλμ που χρησιμοποιείται για να περιλάβει τα αντιδραστήρια.

- Το TTI Lifelines επηρεάζεται από το φως αποθήκευσης. Για την αποφυγή αυτού του προβλήματος μπορεί να γίνει χρήση ειδικού φίλτρου ως παρεμποδιστής φωτός.
- 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 παρέχει ακριβέστερες θερμοκρασιακές τιμές καθώς θα επέτρεπε στον αισθητήρα να αποκριθεί καλύτερα στο ίδιο θερμικό περιεχόμενο με αυτό του τροφίμου και ν' αναγνωστεί με εύκολο τρόπο.

1.11 Η στάση των καταναλωτών απέναντι στα TTI

Η ιδέα των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών είχε πολύ θετική ανταπόκριση σε μελέτες που έγιναν σε καταναλωτές (Anonimus, 1991 Sherlock & Labuza, 1992). Σε μια έρευνα που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, η πλειοψηφία των ερωτηθέντων (95%) θεωρεί ότι τα TTI είναι μια καλή ιδέα επειδή δείχνουν αν το τρόφιμο είναι ασφαλές (28%), αν διατηρείται στη σωστή θερμοκρασία (21%) και αν είναι φρέσκο (16%). Σε μια αντίστοιχη αμερικάνικη έρευνα το 90% θεωρεί ότι οι δείκτες αυτοί είναι μια επιθυμητή προσθήκη ενώ το 97% πιστεύει ότι θα συμβάλλουν στη βεβαιότητα ως προς την φρεσκότητα του προϊόντος (Sherlock & Labuza, 1992). Η μελέτη αυτή διεξήχθη προκειμένου να φανεί η αντίδραση των καταναλωτών στη χρήση TTI σε γαλακτοκομικά προϊόντα ψυγείου. Επιπρόσθετα, σε μια μικρή έρευνα που διεξήχθη (μεγέθους 21 ερωτηθέντων) από τους Mikkola et al. (1997) στη Φινλανδία, έγινε φανερό ότι η αυξημένη ασφάλεια αποτέλεσε μεγάλο πλεονέκτημα γιατί οι καταναλωτές δε θα χρειάζεται πια να εμπιστεύονται μόνο τις αισθήσεις τους. Ως μειονέκτημα, αναφέρθηκε η υποψία για ανακριβείς πληροφορίες από τους δείκτες σε συνδυασμό με την αύξηση της τιμής του προϊόντος και των απωλειών (Anon., 1991; Mikkola et al., 1997).

Τέλος, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Προγράμματος QLK12002-02545 (2003-2006) με τίτλο “Development and Modeling of a TTI-based Safety Monitoring and Assurance System (SMAS) for Chilled Meat Products” (project QLK1-CT2002-02545, 2003-2006) προσδιορίστηκε η στάση των καταναλωτών απέναντι στους χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες. Σε έρευνα 800 καταναλωτών ερωτήθηκαν καταναλωτές τεσσάρων ευρωπαϊκών χωρών, της Ελλάδας, της Ιρλανδίας, της Ολλανδίας και της Σουηδίας. Μετά από σύντομη εκπαίδευση πάνω στο θέμα, οι περισσότεροι ερωτηθέντες απάντησαν ότι οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες θα είναι εύκολοι στην ανάγνωση κι ότι θα δίνουν

επιπλέον πληροφορίες ως προς την ημερομηνία λήξης. Ήταν έντονα υπέρ της χρήσης αυτών, δηλώνοντας ότι θα προτιμούσαν να αγοράσουν προϊόντα με συσκευασία που περιέχει ΤΠΙ. Ένα 80% των ερωτηθέντων θεώρησαν την απόκριση των ΤΠΙ πιο αξιόπιστη από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης. Επιπλέον, σε ποσοστό 85% των ερωτηθέντων δήλωσαν ότι επειδή η ανάγνωση του δείκτη είναι εύκολη, δε θα υπήρχε σύγχυση με την παράλληλη χρήση της υποχρεωτικά αναγραφόμενης ημερομηνίας λήξης. Τέλος, περίπου οι μισοί καταναλωτές θα πλήρωναν ένα παραπάνω ποσό αν συμπεριλαμβανόταν ο δείκτης ΤΠΙ στη συσκευασία του προϊόντος.

1.12 Εφαρμογές των ΤΠΙ

Είναι πλέον προφανές ότι ο έλεγχος της έκθεσης των προϊόντων σε διάφορες θερμοκρασίες από την παραγωγή μέχρι τα ράφια του σουπερμάρκετ είναι μεγάλης σημασίας. Καθίσταται αναγκαία, λοιπόν, η χρήση οικονομικών και εύκολων δεικτών, όπως χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΠΙ. Οι πληροφορίες που δίνονται από τους δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συνεχή έλεγχο των προϊόντων αλλά και προκειμένου να εντοπιστούν και να διορθωθούν πιθανά προβλήματα και ασθενείς κρίκοι της ψυκτικής αλυσίδας. Μερικά από τα προϊόντα στα οποία μπορούν να εφαρμοστούν είναι φρέσκο κρέας, φρέσκα φρούτα και λαχανικά, κατεψυγμένα τρόφιμα (κρέας, λαχανικά κ.ά.), γαλακτοκομικά προϊόντα, γλυκά (σοκολάτες, καραμέλες), μπίρα και άλλα οινοπνευματώδη καθώς και σε καλλυντικά και φάρμακα. Παρακάτω παρατίθενται κάποια παραδείγματα εφαρμογών αυτών.

- Οι ΤΠΙ Fresh-Check[®] χρησιμοποιούνται σε όλα τα εμβόλια που διανέμονται από τη Unicef.
- Χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες διάχυσης έχουν χρησιμοποιηθεί από αλυσίδα σουπερμάρκετ (Cub Foods Supermarket) στις ΗΠΑ.
- ΤΠΙ πολυμερισμού χρησιμοποιούνται στην αλυσίδα καταστημάτων Monoprix στη Γαλλία σε μερικά ευαλλοίωτα προϊόντα δικής τους ετικέτας.
- Χρησιμοποιούνται στην αλυσίδα λιανικής πώλησης της εταιρείας Carrefour σε συσκευασμένα φρούτα και σαλάτες.
- Η εταιρεία Milco[®] χρησιμοποιεί χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες σε γαλακτοκομικά προϊόντα και χυμούς.
- ΤΠΙ πολυμερισμού χρησιμοποιούνται στην Ισπανία στα πολυκαταστήματα Continent.
- Ο ενζυμικού τύπου δείκτης L5-8 CheckPoint[©] χρησιμοποιήθηκε για τη διανομή φρέσκων συσκευασμένων θαλασσινών.
- Μια άλλη εφαρμογή που αναφέρθηκε από την εταιρεία VITSAB είναι οι ετικέτες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της θερμοκρασίας γευμάτων που

σερβίρονται σε πτήσεις. Η απόκριση του ΤΤΙ ελέγχεται πριν το σερβίρισμα κάθε γεύματος. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε έξυπνη ετικέτα ενζυμικού τύπου Checkpoint B7-24 σε πτήσεις εντός Ηνωμένου Βασιλείου.

- Ο φωτοχημικός ΤΤΙ OnVu™ χρησιμοποιείται σε όλες τις συσκευασίες φρέσκου κοτόπουλου της εταιρείας Ernst Kneuss Gefluga A.G. στην Ελβετία.



a.



b.

Σχήμα 1.10: a. Σύστημα ελέγχου smart label της British Airway. b Εφαρμογή των OnVu από την ελβετική εταιρεία Ernst Kneuss Gefluga A.G.

1.13 Εφαρμογή ΤΤΙ στην ψυκτική αλυσίδα ιχθύων

Η συσχέτιση ΤΤΙ με την ποιότητα ψυγμένων ιχθύων αποτέλεσε αντικείμενο του ερευνητικού προγράμματος Development, Modelling and Application of Time-Temperature Integrators to monitor Chilled Fish Quality με κωδικό έργου FAIR-CT96-1090. Η ψυκτική αλυσίδα ιχθύων παρουσιάζει σημαντικές απώλειες λόγω αλλοίωσης. Κομμάτι αυτού του προγράμματος αποτέλεσε η συστηματική μελέτη και μοντελοποίηση της διάρκειας ζωής διαφορετικών ψαριών και ελάχιστα επεξεργασμένων προϊόντων ψαριού. Η ανάλυση της διατηρησιμότητας απαιτεί μια χρονική συσχέτιση μεταξύ των μετρούμενων χημικών ή/και βιοχημικών αλλαγών, των μικροβιολογικών μεταβολών και της οργανοληπτικής ποιότητας. Παρ' όλο που κάθε είδος ψαριού, εξαρτώμενο από τους συγκεκριμένους εξωτερικούς και εσωτερικούς παράγοντες, έχει το δικό του μοτίβο αλλοίωσης, η μελέτη της επίδρασης των παραπάνω παραγόντων προσφέρει έδαφος για μεγαλύτερη κατανόηση του φαινομένου της αλλοίωσης και για τη δημιουργία ενός πιο αξιόπιστου μοντέλου πρόρρησης (Dalgaard, 1995; Dalgaard & Huss, 1995). Μοντέλα οργανοληπτικής ποιότητας και ανάπτυξης της φυσικής μικροχλωρίδας αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν σε μεταβλητές θερμοκρασιακές συνθήκες για μια ποικιλία ψαριών. Επομένως, μέσα σε αυτά τα πλαίσια μελετήθηκε η φυσική μικροχλωρίδα διαφορετικών μεσογειακών ψαριών εμπορικού ενδιαφέροντος όπως το λαυράκι, ο μπακαλιάρος και το μπαρμπούνι και μοντελοποιήθηκε η αλλοίωση που προκαλούν τα βακτήρια *Pseudomonas* spp. και *Shewanella putrefaciens*. Τελος

τα μοντέλα αυτά συσχετίστηκαν με την οργανοληπτική διάρκεια ζωής (Ταουκίς et al., 1999; Koutsoumanis & Nychas, 2000; Koutsoumanis et al., 2000).

1.14 Σύστημα FIFO-LSFO

Οι πληροφορίες που παρέχονται από ένα χρονοθερμοκρασιακό δείκτη μπορούν να μεταφραστούν σε εναπομένουσα διάρκεια ζωής σε κάθε στάδιο της ψυκτικής αλυσίδας, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της διαχείρισης αποθεμάτων. Μια τέτοια καινοτόμα χρήση των ΤΤΙ προτάθηκε αρχικά από τους Labuza & Ταουκίς (1990). Μια προσέγγιση που χρησιμοποιείται σήμερα είναι αυτή του συστήματος πρώτο εισερχόμενο, πρώτο εξερχόμενο (**First in First out, FIFO**) σύμφωνα με το οποίο τα προϊόντα τα οποία παραλαμβάνονται πρώτα ή/και έχουν τη συντομότερη ημερομηνία λήξης στην ετικέτα αποστέλλονται, τοποθετούνται στα ράφια και πωλούνται πρώτα. Σκοπός αυτού του συστήματος είναι η επίτευξη μιας σταθερής κατάστασης, όπου όλα τα προϊόντα θα πωλούνται στο ίδιο επίπεδο ποιότητας. Με αυτόν τον τρόπο, η ποιότητα ουσιαστικά αποτελεί μια χρονική συνάρτηση. Με τη χρήση των δεικτών, μπορεί να υπάρξει ένα σύστημα κατά το οποίο μπορεί να αποφευχθεί αυτή η μη ρεαλιστική προϋπόθεση. Έτσι εισάγεται μια άλλη προσέγγιση, λιγότερη διάρκεια ζωής, πρώτο εξερχόμενο και ονομάζεται **LSFO (Least self-Life First Out)**. Ένα τέτοιο σύστημα μπορεί να μειώσει σε μεγάλο βαθμό τη δυσαρέσκεια των καταναλωτών αφού το μικρό ποσοστό μη αποδεκτών από άποψη ποιότητας προϊόντων σε χρόνο εντός του αναγραφόμενου στη συσκευασία, θα μειωθεί. Επιπρόσθετα, στοχεύει στη μείωση των απορριπτόμενων προϊόντων από πλευράς καταναλωτή, προωθώντας σε επιλεγμένα σημεία λήψης αποφάσεων στον κύκλο ζωής των προϊόντων, τα προϊόντα αυτά με τη συντομότερη διάρκεια ζωής σύμφωνα με την απόκριση του ΤΤΙ (Ταουκίς et al., 1998; Giannakourou & Ταουκίς, 2003).

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

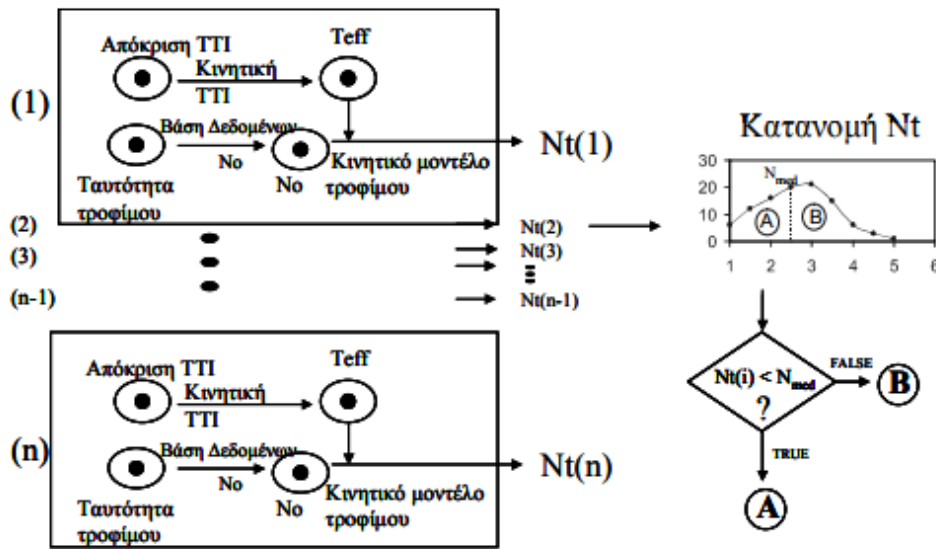
Η μελέτη και ανάπτυξη ενός συστήματος βασισμένου σε χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες που θα εξασφαλίζει τόσο την ασφάλεια όσο και την ποιότητα των προϊόντων στην ψυκτική αλυσίδα, αποτελεί το επόμενο βήμα στην τεχνολογία των ΤΤΙ (Koutsoumanis et al., 2005; Tsironi et al., 2008). Η ανάπτυξη και εφαρμογή ενός τέτοιου συστήματος ήταν το αντικείμενο του Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Προγράμματος SMAS.

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”, και συντονίστηκε από το Εργαστήριο

Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (κωδικός έργου QLK1-CT-2002-02545), στα πλαίσια της δράσης Τρόφιμα, Διατροφή, Υγεία του 5ου Προγράμματος Πλαισίου. Το έργο επικεντρώνεται στην ανάπτυξη επικυρωμένων μοντέλων πρόρρησης και ανάπτυξης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο κρέας κα στην κινητική απόκρισης επιλεγμένων ΤΤΙ και το σχεδιασμό σχήματος εφαρμογής για τη μετάφραση της απόκρισης των ΤΤΙ στη μικροβιολογική ποιότητα του κρέατος.

Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί επαληθευμένα μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης παθογόνων και ειδικών μικροοργανισμών αλλοίωσης (Specific spoilage organisms SSO), στοιχεία για την κατανομή του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και για την ύπαρξη πιθανών παθογόνων, τη συνεχή θερμοκρασιακή καταγραφή μέσω των ΤΤΙ και τη συσχέτιση της οργανοληπτικής αποδεκτότητας με τον τελικό πληθυσμό μικροοργανισμών, ο οποίος και σηματοδοτεί την ημερομηνία λήξης του προϊόντος. Με τη βοήθεια όλων των παραπάνω και με τη χρήση ενός λογισμικού προσδιορίζονται η πραγματική εναπομένουσα ζωή καθώς και η επικινδυνότητα (risk assessment) των προϊόντων σε κρίσιμα σημεία της ψυκτικής αλυσίδας.

Με βάση την κατανομή της εναπομένουσας διατηρησιμότητας που υπολογίζεται σε οποιοδήποτε στάδιο διακίνησης, μπορούν να ληφθούν αποφάσεις προκειμένου τα προϊόντα να έχουν τις βέλτιστες συνθήκες μεταχείρισης, μεταφοράς και αποθήκευσης. Ο κυριότερος στόχος είναι να επιτευχθεί μια στενότερη κατανομή ποιότητας στο τελικό στάδιο της κατανάλωσης και να περιοριστούν οι πιθανότητες ασθένειας του καταναλωτή. Το SMAS θα μπορούσε να αντικαταστήσει την πρακτική FIFO και να οδηγήσει σε ελαχιστοποίηση της επικινδυνότητας και βελτιστοποίηση της ποιότητας.

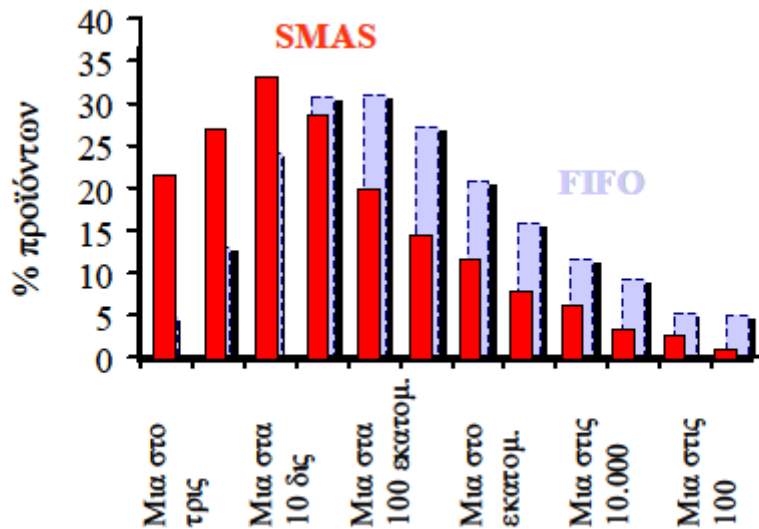


Σχήμα 1.11: Λογικό διάγραμμα του αλγόριθμου λήψης απόφασης σε κρίσιμα σημεία ελέγχου της αλυσίδας διακίνησης.

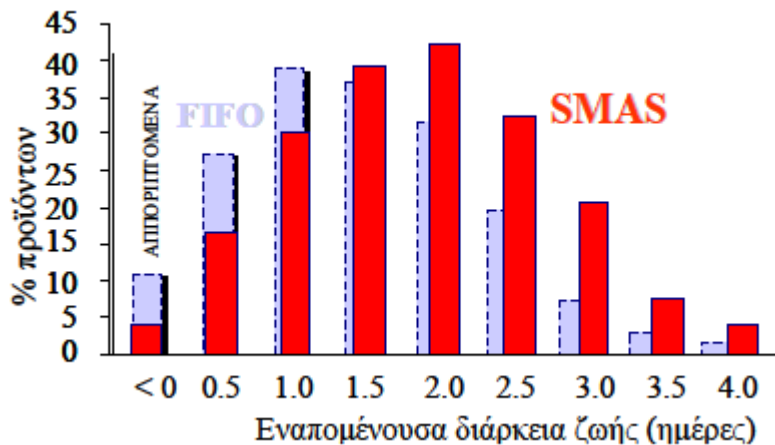
Το παραπάνω λογικό διάγραμμα αλγόριθμου αποτελεί τη βάση σχεδιασμού του SMAS. Παρουσιάζει το μηχανισμό λήψης αποφάσεων σε ένα σημείο ελέγχου της ψυκτικής αλυσίδας όπου τα προϊόντα μοιράζονται ανάλογα με την απόκριση του δείκτη. Το μοίρασμα αυτό θα μπορούσε να γίνει και με το σύστημα FIFO που αναλύθηκε πιο πάνω ή να στηριχθεί στην πραγματική ποιοτική υποβάθμιση του κάθε προϊόντος μεμονωμένα (Giannakourou et al., 2001). Με βάση την τεχνική του προγράμματος SMAS τα προϊόντα με το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο N_t που όμως είναι ακόμα σε αποδεκτά επίπεδα, θα κατευθυνθούν προς τον πιο κοντινό προορισμό (B) ώστε να καταναλωθούν ταχύτερα ενώ τα λιγότερο προσβεβλημένα, θα μεταφερθούν σε μια πιο μακρινή αγορά (A).

Στα σημαντικά σημεία απόφασης της ψυκτικής αλυσίδας, η εφαρμογή του SMAS προϋποθέτει την εισαγωγή της απόκρισης του συνημμένου στο τρόφιμο ΤΠΙ και των χαρακτηριστικών του προϊόντος. Αυτές οι πληροφορίες καταχωρούνται απευθείας σε μια φορητή, εξοπλισμένη με το κατάλληλο λογισμικό εργαλείο του SMAS, μονάδα, έτσι ώστε να γίνει δυνατή η αυτόματη “μετάφραση” αυτών των δεδομένων σε ποιότητα, N_t και επικινδυνότητα. Στο λογισμικό του SMAS, χρησιμοποιούνται κινητικές εξισώσεις για την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης, όπως το λογισμικό μοντέλο 4 παραμέτρων, λαμβάνοντας υπόψη και την εκθετική φάση ανάπτυξης μ_{max} (h^{-1}) και τη λανθάνουσα φάση (h). Η θερμοκρασιακή εξάρτηση εκφράζεται μαθηματικά με την εξίσωση Arrhenius ή Belehradek (Taoukis, 2003).

Το τελικό αποτέλεσμα αυτού του προγράμματος απεικονίζεται στα παρακάτω σχήματα. Πρόκειται δηλαδή για μείωση της πιθανότητας ασθένειας και αύξηση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής κατά την κατανάλωση (Koutsoumanis et al., 2003).



Σχήμα 1.12: Ραβδόγραμμα μείωσης της πιθανότητας ασθένειας με την εφαρμογή του SMAS.



Σχήμα 1.13: Ραβδόγραμμα βελτίωσης της κατανομής ποιότητας με την εφαρμογή του SMAS.

2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΣΥΣΤΑΣΗ & ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΙΧΘΥΩΝ

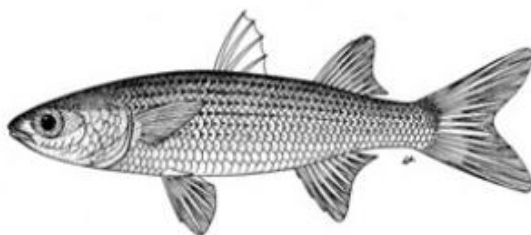
2.1 Εισαγωγή

Όπως με τα περισσότερα ζωικά προϊόντα, τα ιχθυηρά και τα προϊόντα ιχθυηρών περιέχουν νερό, πρωτεΐνες και άλλες αζωτούχες ενώσεις, λίπη, υδατάνθρακες, ανόργανα άλατα και βιταμίνες. Παρόλα αυτά, η χημική σύσταση τους μεταβάλλεται σε μεγάλο βαθμό από το ένα ψάρι στο άλλο εξαρτώμενη από την ηλικία, το φύλο, το περιβάλλον και την εποχή (FAO, 2017).

Τα ιχθυηρά αποτελούν μία ιδιαίτερα ευαλλοίωτη ομάδα τροφίμων συγκριτικά με τα υπόλοιπα τρόφιμα. Επομένως, για να υπολογιστεί ο χρόνος ζωής των ιχθύων είναι σημαντικό να προσδιοριστούν οι αιτίες των αλλοιώσεων που παρατηρούνται στο προϊόν και το καθιστούν μη αποδεκτό οργανοληπτικά αλλά και ακατάλληλο για κατανάλωση. Οι αλλοιώσεις των νωπών ψαριών, που διατηρούνται για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, οφείλονται κυρίως σε μικροβιολογικούς παράγοντες. Η μικροβιολογική αλλοίωση στα τρόφιμα μπορεί να λάβει διάφορες μορφές. Ωστόσο, όλες αυτές αποτελούν συνέπεια την μικροβιακής ανάπτυξης και δράσης, που συνήθως εκδηλώνονται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Gram & Huss, 1996).

2.2 Κέφαλος

Ο Κέφαλος (*Mugil cephalus*) είναι ψάρι μήκους 30 – 70 εκατοστών. και ανήκει στην οικογένεια των μουγλιδών (*Mugilidae*). Τα κυριότερα είδη είναι ο γκριζος και ο χρυσόχρωμος κέφαλος. Ο πιο κοινός γκριζος κέφαλος έχει μάτια σκεπασμένα με βλέφαρα κάθετα που αφήνουν λεπτή σχισμή στην κόρη του ματιού. Το πέπλο αυτό φτάνει μέχρι το βραχιακό επικάλυμμα. Αντίθετα ο χρυσόχρωμος κέφαλος δεν έχει τέτοιο πέπλο στα μάτια του.



Εικόνα 2.1: *Mugil cephalus*, (FAO, 2017).

Οι κέφαλοι ζουν σε ιδιαίτερα αλατισμένα και φρέσκα νερά τα οποία είναι ζεστά ή κυμαίνονται από 8 έως 24°C. Ζουν κυρίως σε ρηχά νερά, μέσα σε λιμάνια, σε λιμνοθάλασσες σε ποτάμια και καμιά φορά σε λίμνες με αμμώδεις ή λασπώδεις βυθούς (Texas Parks, 2005). Οι ενήλικες σχηματίζουν συνήθως κοπάδια κοντά σε αμμώδεις ή λασπώδεις βυθούς με πυκνή βλάστηση (Bester, 2004). Οι κέφαλοι τρέφονται κυρίως με ζωοπλαγκτόν, νεκρή οργανική ύλη και τρίμματα λίθων. Ο κέφαλος ζει συνήθως 4 με 7 χρόνια, ενώ η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής που έχει σημειωθεί είναι 13 χρόνια (Texas Parks & Wildlife Department, 2005). Γεννούν στο πέλαγος από τον Ιούλιο μέχρι τον Οκτώβριο. Το κοινό αυγοτάραχο προέρχεται από τους θηλυκούς κεφάλους (μπάφες).

2.2.1 Διατροφική αξία κέφαλου

Πίνακας 2.1: Διατροφικά στοιχεία γκριζου κέφαλου (USDA Nutrient Database, 2016).

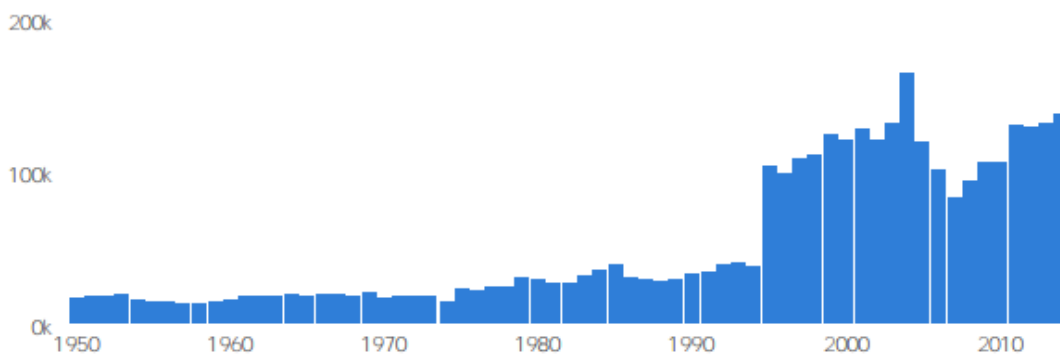
Διατροφικά στοιχεία κέφαλου (ποσότητα/100g)	
Νερό	77,01g
Ενέργεια	33 kcal
Πρωτεΐνη	19,35g
Συνολικά λιπαρά	3,79g
Υδατάνθρακες	
Μεταλλικά Στοιχεία	
Ασβέστιο (Ca)	41 mg
Σίδηρος (Fe)	1,02 mg
Μαγνήσιο (Mg)	29 mg
Φώσφορος (P)	221 mg
Κάλιο (K)	357 mg
Νάτριο (Na)	65 mg
Ψευδάργυρος (Zn)	0,52 mg
Βιταμίνες	
Βιταμίνη C	1,2 mg
Βιταμίνη B1	0,09 mg
Βιταμίνη B2	0,08 mg
Βιταμίνη B3	5,2 mg
Βιταμίνη B6	0,425 mg
Βιταμίνη B9	9 µg
Βιταμίνη B-12	0,22 µg
Βιταμίνη A	37µg
Βιταμίνη E	1mg
Βιταμίνη D	1,5µg
Βιταμίνη K	0,1µg
Λιπαρά	
Κορεσμένα λιπαρά	1,116 g
Μονοακόρεστα λιπαρά	1,078 g
Πολυακόρεστα λιπαρά	0,715 g
Χοληστερίνη	49 mg

2.2.2 Παραγωγή κέφαλου

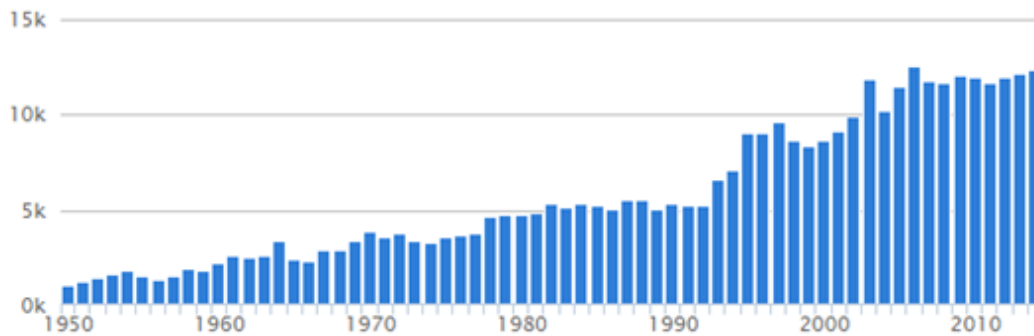
Ο κέφαλος καλλιεργείται για αιώνες σε μεγάλες λίμνες σε πολλές χώρες. Ιχθυοκαλλιέργειες υπήρχαν παραδοσιακά σε μεσογειακές χώρες, στη βορειοανατολική Ασία, στο Ταιβάν, στην Κίνα, στο Μεξικό, το Περού, την Ιαπωνία και τη Χαβάη. Οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας κεφάλων έχουν τώρα εξελιχθεί και ειδικά στην Ιταλία. Ιδιαίτερα σημαντικό είδος υδατοκαλλιέργειας αποτελεί και στην Αίγυπτο όπου πραγματοποιείται παραδοσιακά για αιώνες σε λίμνες και η παραγωγή του αυξήθηκε πολύ γρήγορα την περίοδο 1998-2003. Στην εικόνα 2.2 παρουσιάζονται οι κυριότερες χώρες παραγωγής κέφαλου. Στη συνέχεια δίνονται τα στατιστικά της παραγωγής και της αλιείας του κέφαλου (σχήματα 2.1 και 2.2).



Εικόνα 2.2: Κυριότερες χώρες παραγωγής *Mugil cephalus* (FAO Fishery Statistics, 2006).



Σχήμα 2.1: Στατιστικά παραγωγής κέφαλου (FAO Fishery Statistics, 2017).



Σχήμα 2.2: Στατιστικά αλιείας κέφαλου (FAO Fishery Statistics, 2017).

2.2.3 Μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης

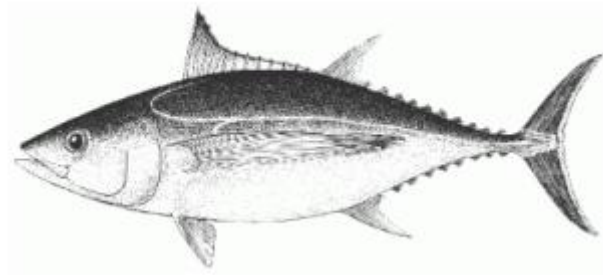
Στη Μεσόγειο, ο κέφαλος συνήθως διατίθεται στην αγορά φρέσκος και ψυγμένος. Ο κέφαλος καταναλώνεται κυρίως φρέσκος, όμως στην Αίγυπτο και σε κάποιες αραβικές χώρες, μπορεί να συντηρείται και με υγρή αλάτιση για επέκταση της διατηρησιμότητάς του.

2.3 Τόνος

Πρόκειται για γνωστό ωκεάνιο ψάρι της οικογένειας των Σκομβριδών (*Scombridae*), κυρίως του γένους Θύννος (*Thunnus*). Οι τόνοι έχουν σώμα υδροδυναμικό και συμπαγές και μπορούν να φτάσουν σε μεγάλες ταχύτητες, μέχρι 70 χιλιόμετρα την ώρα. Το κρέας του τόνου είναι κόκκινο, σε αντίθεση με άλλα ψάρια που έχουν λευκό κρέας. Αυτή η απόχρωση οφείλεται στη παρουσία μυοσφαιρίνης στους μύες του τόνου. Η μυοσφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη που προσδένει οξυγόνο και οι τόνοι την υπερεκφράζουν. Κάποια από τα μεγαλύτερα είδη τόνου έχουν χαρακτηριστικά θερμόαιμων οργανισμών, καθώς μπορούν να αυξήσουν τη θερμοκρασία του σώματός τους σε μεγαλύτερη τιμή από το νερό που τους περιβάλλει και με αυτό το τρόπο μπορούν να ζήσουν σε ψυχρές θάλασσες.

Τα πιο διαδεδομένα είδη τόνου σε παγκόσμιο επίπεδο είναι τα παρακάτω.

- Βόρειος ερυθρός (Northern bluefin, *Thunnus thynnus*)
- Νότιος ερυθρός (Southern bluefin, *Thunnus maccoyii*)
- Μακρύπτερος (Albacore, *thunnus alalunga*).
- Κιτρινόπτερος (Yellowfin, *Thunnus albacares*)
- Παλαμίδα του ατλαντικού (Bonito, *Sarda sarda*)
- Παλαμίδα (Skipjack, *Katsuwonus pelamis*)
- Μεγαλόφθαλμος (Bigeye, *Thunnus obesus*)
- Tongol (*Thunnus tonggol*)



Εικόνα 2.3: Μακρύπτερος τόνος (*thunnus alalunga*).

2.3.1 Διατροφική αξία τόνου

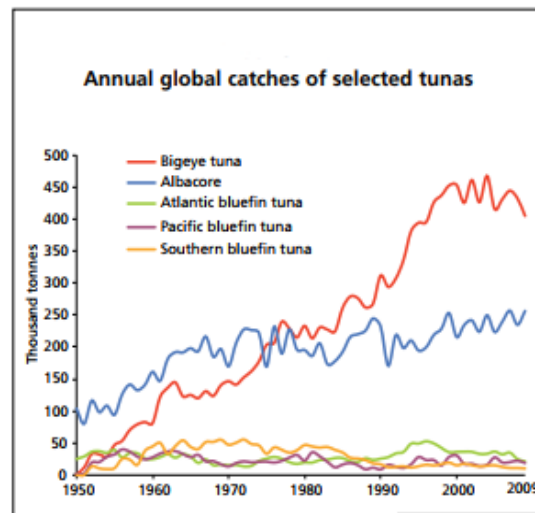
Πίνακας 2.2: Διατροφικά στοιχεία μακρύπτερου τόνου *Thunnus alalunga* (USDA Nutrient Database, 2016).

Διατροφικά στοιχεία τόνου (ποσότητα/100g)	
Ενέργεια	117 kcal
Πρωτεΐνη	26g
Συνολικά λιπαρά	0,7g
Υδατάνθρακες	0,2g
Μεταλλικά Στοιχεία	
Ασβέστιο (Ca)	9 mg
Σίδηρος (Fe)	0,9 mg
Μαγνήσιο (Mg)	41 mg
Φώσφορος (P)	310 mg
Κάλιο (K)	252 mg
Νάτριο (Na)	38 mg
Ψευδάργυρος (Zn)	0,5 mg
Βιταμίνες	
Βιταμίνη B1	0,13 mg
Βιταμίνη B2	0,1 mg
Βιταμίνη B3	20,7 mg
Βιταμίνη B6	0,94 mg
Βιταμίνη B9	4μg
Βιταμίνη B12	2,8 μg
Βιταμίνη A	4μg
Βιταμίνη E	0,7mg
Βιταμίνη D	7μg
Λιπαρά	
Κορεσμένα λιπαρά	0,15 g
Μονοακόρεστα λιπαρά	0,11 g
Πολυακόρεστα λιπαρά	0,23 g

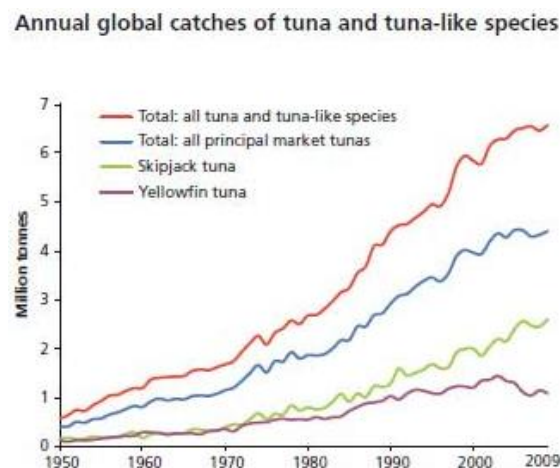
2.3.2 Παραγωγή τόνου

Η ετήσια παγκόσμια αλίευση τόνου έφτασε το 2009 περίπου στα 6,5 εκατομμύρια τόνους ψαριών. το 1950 η αλίευση του τόνου δεν ξεπερνούσε το 1 εκατομμύριο

τόνους, στη συνέχεια όμως υπήρξε μια ραγδαία αύξηση. Τα ετήσια παγκόσμια ποσοστά δίνονται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 2.3 και 2.4).



Σχήμα 2.3: Ετήσια αλιεία ανά είδος τόνου (FAO, 2009).



Σχήμα 2.4: Ετήσια αλιεία τόνου και τονοειδών (FAO, 2009).

Οι ιχθυοκαλλιέργειες τόνου αποτελούν μόλις το 0,1% της αλιείας. Τα μόνα είδη που έχουν καλλιεργηθεί είναι ο βόρειος και ο νότιος ερυθρός τόνος καθώς και ο κιτρινόπτερος με τον τελευταίο όμως να βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο.

2.3.3 Μέθοδοι επεξεργασίας και συντήρησης

Ο τόνος είναι ένα ψάρι το οποίο καταναλώνεται κυρίως φρέσκο, κατεψυγμένο ή κονσερβοποιημένο. Τα αλιεύματα με παραγάδι που γίνονται για βιομηχανίες συνήθως επεξεργάζονται μέσα στα σκάφη πριν τοποθετηθούν σε φρεάτια ψαριών για την κατάψυξη με άλμη. Συνήθως τα περισσότερα ψάρια καταψύχονται κατευθείαν επειδή είναι μικρά και αλιεύονται μαζικά, όμως σε κάποια μεγάλα

ψάρια (όπως για παράδειγμα κάποιοι μεγάλοι κιτρινόπτεροι) αφαιρούνται τα βράγχια, τα πτερύγια και τα σπλάχνα. Αφού γίνει η εκφόρτωση μπορεί να γίνει περαιτέρω επεξεργασία. Στην αγορά φρέσκων ψαριών, κάποιοι ερυθροί τόνοι πωλούνται μόνο για το κοιλιακό κρέας το οποίο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Μερικά μεγάλα ψάρια πωλούνται ως φιλέτα (αποκόβονται από το κόκκαλο από τις δύο μεριές) ή μικρά κομμάτια (πωλούνται έτοιμα ως sashimi). Ο τόνος που χρησιμοποιείται για κονσερβοποίηση μεταφέρεται συνήθως ως μικρότερα φιλέτα τα οποία περιέχουν καθαρό ψάρι το οποίο δηλαδή έχει φιλεταριστεί, έχουν αφαιρεθεί το δέρμα και τα κόκκαλα, έχει βραστεί και είναι έτοιμο για συσκευασία υπό κενό (Miyaki et al., 2010)

2.4 Μικροβιακή αλλοίωση ιχθύων

2.4.1. Γενικά

Τα προϊόντα ιχθύων, λόγω του υδατικού περιβάλλοντος ανάπτυξης, του υψηλού σχετικά pH του κρέατός τους και της παρουσίας μεγάλης ποσότητας μη πρωτεϊνικού αζώτου (non protein nitrogen, NPN) και οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO), παρουσιάζουν ταχύτατη μικροβιολογική ανάπτυξη και συνεπώς αλλοίωση. Η αύξηση του pH (>6.0) στην σάρκα του ψαριού μετά την θανάτωσή του είναι μείζονος σημασίας. Οι περισσότεροι ιχθύες περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα υδατανθράκων (<0.5%) στο μυϊκό τους ιστό ενώ μετά την θανάτωση τους παράγεται επίσης μικρή ποσότητα γαλακτικού οξέος. Αυτό έχει σημαντικές επιπτώσεις στη μικροβιολογική αλλοίωση των ιχθύων αφού μεταβολές στο pH επιτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.

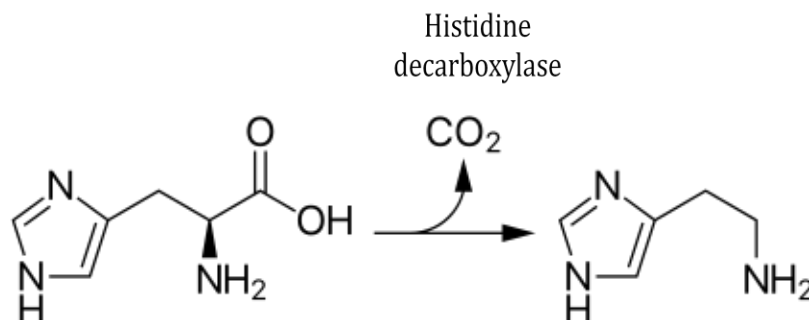
Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται τόσο στις εξωτερικές όσο και τις εσωτερικές επιφάνειες των ιχθύων (βράγχια, δέρμα, σπλάχνα κλπ.). Η ποικιλόθερμη φύση των ιχθύων επιτρέπει την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στη θερμοκρασία του θαλασσινού νερού είναι οι ψυχρότροφοι Gram-αρνητικοί, τα ραβδόμορφα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* και *Aeroomonadaceae* αλλά και οι Gram-θετικοί οργανισμοί, όπως οι *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Corynebacterium* μπορούν επίσης να ανιχνευθούν σε διάφορες αναλογίες (Gram & Huss, 1996). Η χλωρίδα στους τροπικούς ιχθύες εμφανίζει συχνά μεγαλύτερο αριθμό Gram(+) οργανισμών και εντεροβακτηρίων, αλλά σε γενικές γραμμές είναι όμοια με την αντίστοιχη των ιχθύων που αναπτύσσονται σε ψυχρότερες θάλασσες (Liston, 1980).

Είναι γνωστό ότι ο κυρίαρχος παράγοντας μικροβιακής αλλοίωσης των ιχθύων είναι η ανάπτυξη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas spp.* Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί για πρόκληση αλλοίωσης λόγω δύο σημαντικών τους χαρακτηριστικών.

Πρώτον, είναι ψυχότροφοι και επομένως η βέλτιστη θερμοκρασία αναπαραγωγής τους ανήκει στο εύρος θερμοκρασιών συντήρησης σε ψύξη. Δεύτερον, μεταβολίζουν διάφορες ουσίες στη σάρκα των ιχθύων με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων που συμβάλλουν στην αλλοίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των ιχθύων. Λόγοι που καθιστούν τα βακτήρια αυτά κυρίαρχο παράγοντα μικροβιακής αλλοίωσης είναι επίσης ο μικρός χρόνος αναπαραγωγής τους, ανταγωνιστικές ή συνεργιστικές αντιδράσεις, η ικανότητά τους να μεταβολίζουν μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια καθώς και η γενικότερη βιοχημική τους δραστηριότητα (Nickelson, 2001).

2.4.2 Ανάπτυξη και παραγωγή ισταμίνης σε ιχθυηρά

Η ισταμίνη ($C_5H_9N_3$) είναι μια τοξική βιογενής αμίνη, που μπορεί να παραχθεί κατά την επεξεργασία ή/και αποθήκευση ψαριών και ορισμένων άλλων τροφίμων (π.χ. Ελβετικά τυριά), συνήθως με τη δράση συγκεκριμένων αλλοιογόνων βακτηρίων. Σχετίζεται κυρίως με είδη ιχθύων των οικογενειών *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresosidae*, δηλαδή είδη με υψηλή συγκέντρωση του αμινοξέος ιστιδίνη. Το συγκεκριμένο αμινοξύ με τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης, το οποίο βρίσκεται σε μεγάλο αριθμό βακτηρίων που ενδημούν ή αλλοιώνουν τα συγκεκριμένα ψάρια, μετατρέπεται σε ισταμίνη (ΕΦΕΤ, 2013).



Εικόνα 2.4: Αντίδραση σχηματισμού ισταμίνης.

Έτσι, όταν, μετά την αλίευση, μεσολαβήσει μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι την ψύξη των αλιευμάτων ή όταν η επεξεργασία των ψαριών γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα, τότε αυξάνει σε μεγάλο βαθμό η πιθανότητα παραγωγής ισταμίνης συνέπεια της ανάπτυξης συγκεκριμένων βακτηρίων. Η οικολογία του θαλάσσιου περιβάλλοντος περιλαμβάνει είδη των γενών *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. και *Photobacterium* spp., τα οποία αποτελούν φυσική μικροχλωρίδα των ψαριών. Άλλα βακτήρια, όπως τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae*), αποτελούν μετα-συλλεκτικές επιμολύνσεις λόγω της μη ορθής διαχείρισης των αλιευμάτων και αυτά θεωρούνται πιο σημαντικά για την ανάπτυξη της ισταμίνης. Είδη όπως *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* και *Hafnia alvei*, είναι ικανά να παράξουν με μεγάλη ταχύτητα, υψηλές συγκεντρώσεις

ισταμίνης σε μεσόφιλες θερμοκρασίες (20-30°C). Το βακτήριο *Morganella* είναι μοναδικό στο ότι όσα από τα βακτήρια έχουν απομονωθεί και από τα δύο είδη αυτού του γένους (*Morganella morganii* και *Morganella psychrotolerans*) φαίνεται να είναι ισχυροί παραγωγοί ισταμίνης (Taylor et al., 1978, Emborg et al., 2006a).

2.4.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή ισταμίνης σε ιχθυηρά

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή ισταμίνης (Behling & Taylor., 1982). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η αποθήκευση των ιχθύων στους 0°C περιορίζει την παραγωγή ισταμίνης. Ιδανικά τα ψάρια πρέπει να διατηρούνται στους 0°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, προκειμένου τα βακτήρια να μην μπορούν να αναπτυχθούν και η αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης να μην ενεργοποιείται. Αν τα ψάρια αφεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες για λίγες ώρες τα βακτήρια μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε πολύ μεγάλες ποσότητες. Για παράδειγμα, ένα ψάρι αποθηκευμένο 2-3 ώρες στους 20°C μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα σχηματισμό τοξικών επιπέδων ισταμίνης (Centers for Disease, C. and Prevention, 2007). Μάλιστα, το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης μπορεί να συνεχίσει να δρα ακόμα κι αν τα βακτήρια δεν είναι βιώσιμα (Hungerford, 2010).

Όσων αφορά την αποθήκευση στους 2-10°C, κάποιες μελέτες έδειξαν ελάχιστο ή μηδαμινό σχηματισμό ισταμίνης σ' αυτές τις θερμοκρασίες (Hardy & Smith, 1976; Smith et al., 1980; Klausen & Lund, 1986) ενώ άλλες έδειξαν ότι μπορούν να παραχθούν χαμηλά επίπεδα ισταμίνης κάτω από τους 10°C (Baldrati et al., 1980; Morii et al., 1986). Οι Behling & Taylor (1982) υποθέτουν ότι αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στον τύπο και το επίπεδο της μικροβιακής χλωρίδας στην κάθε μελέτη. Ανακάλυψαν ότι το χαμηλότερο θερμοκρασιακό όριο παραγωγής τοξικολογικά σημαντικού επιπέδου ισταμίνης στον τόνο ήταν στους 15°C για 2 στελέχη του *M. morganii*.

Η παρουσία της τοξίνης δεν περιορίζεται σε φρέσκα και κατεψυγμένα ψάρια αλλά μπορεί να βρεθεί και σε κονσερβοποιημένα ή καπνιστά/αλίπαστα ψάρια σε συγκεντρώσεις ικανές να προκαλέσουν τοξίνωση. Το 1996 το 50% όλων των περιπτώσεων δηλητηρίασης από ισταμίνη (Histamine Fish Poisoning – HFP) στο Ηνωμένο Βασίλειο είχε σχετιστεί με την κατανάλωση ψυγμένου τόνου σε συσκευασία υπό κενό, ενώ αρκετές περιπτώσεις είχαν αναφερθεί και στη Β. Αμερική (Tsironi et al., 2008). Η ισταμίνη είναι εξαιρετικά σταθερή όταν παραχθεί και δεν επηρεάζεται από το μαγείρεμα. Μπορεί να επιβιώσει της κονσερβοποίησης και δεν μειώνεται κατά την ψύξη ή την κατάψυξη. Παρ' όλα αυτά, μετά το μαγείρεμα προκειμένου η ισταμίνη να συνεχίσει να παράγεται πρέπει το ψάρι να έρθει ξανά σε επαφή με το βακτήριο που παράγει το ένζυμο. Γι αυτό το λόγο ο σχηματισμός ισταμίνης είναι πιο κοινός σε ωμά, μη κατεψυγμένα ψάρια (FDA, 2011).

Επιπλέον, υψηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης δεν συνοδεύονται απαραίτητα από άλλες ενδείξεις αλλοίωσης που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην απόρριψη του προϊόντος. Προκειμένου να επιτευχθεί ο έλεγχος της παραγωγής ισταμίνης στα ψάρια συστήνεται η ταχύτατη ψύξη μετά το θάνατό τους. Η διαδικασία αυτή αναστέλλει την ενεργότητα της βακτηριακής αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης.

2.4.4 Επιτρεπτά όρια

Η σχέση μεταξύ του επιπέδου της ισταμίνης και της τοξικότητας του ψαριού δεν είναι ξεκάθαρη, παρ' όλα αυτά είναι γνωστό ότι η περιεκτικότητα μεγαλύτερη των 200ppm σε ένα ψάρι είναι σημαντική από τοξικολογική άποψη, και μια περιεκτικότητα μεγαλύτερη των 50ppm αποτελεί ένδειξη ότι το ψάρι έχει εκτεθεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Murray et al., 1982; Arnold & Brown, 1978).

Για τους υγιείς ενήλικες μπορεί να προκύψει δηλητηρίαση όταν το επίπεδο ισταμίνης σε προϊόντων ψαριού που καταναλώνονται είναι τουλάχιστον 50mg. δεδομένου ότι μία μερίδα ιχθύος είναι 250g υπολογίζεται ένα όριο συγκέντρωσης 200mg/kg. Σύμφωνα με τους κανονισμούς στις Ηνωμένες Πολιτείες τα θαλασσινά είναι ασφαλή για κατανάλωση όταν η συγκέντρωση της ισταμίνης είναι κάτω από 50mg/kg. Το αντίστοιχο επιτρεπτό όριο στην Ευρώπη είναι 100mg/kg (FAO/WHO, 2013).

Συμπερασματικά, με βάση όσα αναφέρθηκαν στα παραπάνω κεφάλαια, τα ιχθυηρά είναι ευαλλοιώτα τρόφιμα και οι απώλειες ποιότητας κατά την διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα καθιστούν αδήριτη ανάγκη τη συνεχή θερμοκρασιακή παρακολούθησή τους. Η λύση που προτείνεται στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι η χρήση χρονοθερμοκρασιακών δεικτών για τον έλεγχο και την παρακολούθηση της ψυκτικής αλυσίδας των ιχθύων.

Στα επόμενα κεφάλαια, γίνεται μελέτη της απόκρισης ενζυμικών δεικτών σε διάφορες θερμοκρασιακές συνθήκες, σταθερές και μη, και στη συνέχεια πραγματοποιείται κινητική μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης σε δείγματα κέφαλου (*Mugil Cephalus*) και τόνου (*Thunnus Alalunga*) σε διάφορες θερμοκρασίες. Τέλος, γίνεται συσχέτιση της απόκρισης των ΤΠΙ με την μικροβιακή ανάπτυξη των ιχθυηρών με στόχο την εύρεση του κατάλληλου ΤΠΙ για τον έλεγχο της ποιότητας κατά την αποθήκευση και τη διακίνησή τους. Ταυτόχρονα έγινε μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και της παραγωγής ισταμίνης από αυτόν σε κέφαλο, και έγινε συσχέτιση του θεωρητικού χρόνου ζωής των ενζυμικών ΤΠΙ με τον απαιτούμενο χρόνο για την παραγωγή ισταμίνης.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Εισαγωγή

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που παρουσιάστηκε στα προηγούμενα κεφάλαια προκύπτει ότι η σωστή διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας για την ασφάλεια και ποιότητα ευαλλοίωτων τροφίμων όπως είναι τα ψάρια, απαιτεί την παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού ιστορικού τους. Γι αυτό το λόγο στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μελέτη και εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών, οι οποίοι σε μία μόνο μέτρηση ολοκληρώνουν το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου. Προϋπόθεση για την εύρεση του κατάλληλου δείκτη είναι η συσχέτιση της συνάρτησης απόκρισης διαφόρων ΤΠΙ με παραμέτρους αλλοίωσης και ασφάλειας του τροφίμου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η επίτευξη των ακόλουθων στόχων:

- Η μελέτη της κινητικής απόκρισης νέων ενζυμικών δεικτών ΤΠΙ που έχουν ως ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης και τριπαλμιτίνης (τύπου LP) και δεικτών με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα (τύπου M).
- Η κινητική μελέτη της αλλοίωσης ιχθύων.
- Η μελέτη του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και σχηματισμού ισταμίνης σε κέφαλο, σε τέσσερις ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10, 15 και 20°C) και σε δυναμικές συνθήκες (var).
- Η επιλογή και εφαρμογή κατάλληλου ΤΠΙ για τον έλεγχο της ποιότητας και ασφάλειας επιλεγμένων ιχθυηρών. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της συσχέτισης της κινητικής απόκρισης επιλεγμένων ΤΠΙ με την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών καθώς και με την παραγωγή τοξίνης (ισταμίνης) που συνδέεται με την κατανάλωση ιχθυηρών.

3.2 Μελέτη ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της κινητικής απόκρισης των ενζυμικών δεικτών. Η λειτουργία των δεικτών αυτών βασίζεται σε μια χρωματική αλλαγή η οποία προκαλείται λόγω μείωσης του pH ως αποτέλεσμα ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός λιπαρού υποστρώματος. Κατά την ενεργοποίηση των δεικτών σπάει με επιβολή μηχανικής πίεσης το φράγμα που χωρίζει τους δύο ξεχωριστούς μικροθαλάμους που βρίσκονται αρχικά το ένζυμο και το υπόστρωμα,

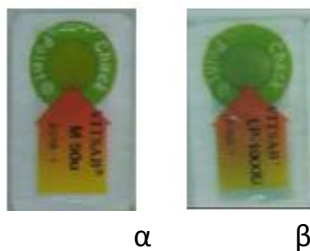
και αναμειγνύονται. Η υδρόλυση του υποστρώματος προκαλεί μεταβολή pH, η οποία μεταφράζεται σε μια σταδιακή χρωματική αλλαγή (από πράσινο σε κίτρινο και στη συνέχεια σε κόκκινο χρώμα). Η χρωματική αυτή αλλαγή σχετίζεται με το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του δείκτη (περισσότερες λεπτομέρειες περιγράφονται στο Κεφάλαιο 1 σελ. 18).

Οι ενζυμικοί δείκτες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής.

- Τύπου LP (δείκτης Check Point® της VITSAB), με ένζυμο μικροβιακή λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μίγμα τριλαουρίνης-τριπαλμιτίνης.
- Τύπου M (δείκτης Check Point® της VITSAB), με ένζυμο μικροβιακή λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα.

3.2.1 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών.



Εικόνα 3.1: Ενεργοποιημένοι δείκτες (α)M-type, (β) LP-type.

Στη συνέχεια εκτελέστηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές και σε μεταβαλλόμενες συνθήκες. Συγκεκριμένα, ορισμένος αριθμός δειγμάτων από κάθε ΤΤΙ τοποθετήθηκε σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας. Ταυτόχρονα, τοποθετήθηκαν ΤΤΙ και σε θάλαμο μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας ώστε να πραγματοποιηθεί έλεγχος της αξιοπιστίας της κινητικής απόκρισης των ΤΤΙ. Στον πίνακα (3.1) φαίνονται οι θερμοκρασίες αποθήκευσης, οι ενζυμικές συγκεντρώσεις και ο αριθμός ετικετών για κάθε τύπο ΤΤΙ.

Πίνακας 3.1: Θερμοκρασίες αποθήκευσης, ενζυμικές συγκεντρώσεις και αριθμός ετικετών για κάθε τύπο ΤΤΙ.

Τύπος	Συγκεντρώσεις (Units)	Θερμοκρασίες (°C)	Αριθμός δειγμάτων/θερμοκρασία
M	5,10,15,20,25,50,75,100	0, 2.5, 5, 10, 15	5
LP	100,150,300,500	0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25	5

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

Για το πείραμα σε μεταβαλλόμενες χρονοθερμοκρασιακές συνθήκες επιλέχτηκε το παρακάτω προφίλ.

- Έκθεση στους 5°C για 5 ώρες,
- Έκθεση στους 8°C για 5 ώρες και
- Έκθεση στους 10°C για 2 ώρες.

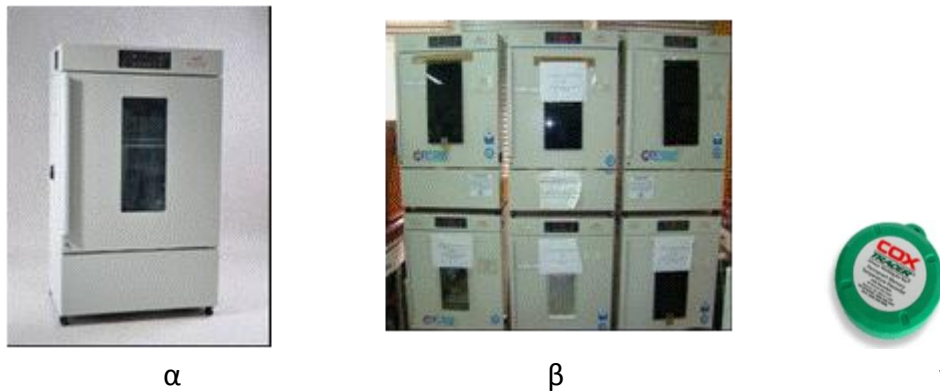
Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε κάθε θερμοκρασία και για κάθε ΤΤΙ γινόταν μέτρηση του χρώματος με χρήση του χρωματόμετρου X-rite Eye1pro Colorimeter Illumination D50 (Michigan, USA). Στη συνέχεια, και μετά από επεξεργασία των παραμέτρων του χρώματος προέκυψαν οι συναρτήσεις απόκρισης των ΤΤΙ.

3.2.2 Συσκευές πειραματικής διαδικασίας

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συσκευές:

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

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

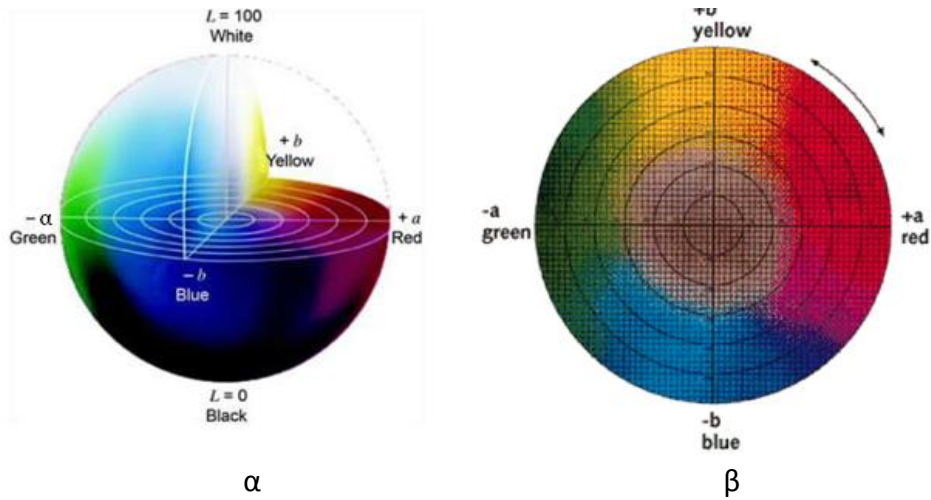


Εικόνα 3.2: (α,β) θάλαμοι ελεγχόμενου θερμοκρασιακού περιβάλλοντος, SANYO MIR 253 και (γ) ηλεκτρονικό καταγραφικό θερμοκρασίας (data logger)

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

Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων χρώματος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή X-rite Eye1pro Colorimeter Illumination D50. Η συσκευή αυτή προσδιορίζει τις παραμέτρους L, a και b στο τριαξονικό σύστημα CIE Lab. Η παράμετρος a (κυμαίνεται από -60 έως 60) όταν παίρνει αρνητικές τιμές προσδιορίζει το πράσινο χρώμα, ενώ στις θετικές τιμές προσδιορίζει το κόκκινο χρώμα. Επίσης, η

παράμετρος b (κυμαίνεται από -60 έως 60) στις αρνητικές τιμές προσδιορίζει το μπλε χρώμα ενώ στις θετικές τιμές το κίτρινο χρώμα. Το L (κυμαίνεται από 0 έως 100) προσδιορίζει την φωτεινότητα του δείγματος.



Εικόνα 3.3 (α) Απεικόνιση στο χώρο των L , a και b και (β) το χρωματικό διάγραμμα a και b .

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



Εικόνα 3.4: Χρωματόμετρο X-rite Eye1pro.

$$\Delta C = \sqrt{(a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (3.1)$$

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2} \quad (3.2)$$

Όπου

- L_0 η τιμή της φωτεινότητας ενός μη ενεργοποιημένου ΤΤΙ.
- a_0 η τιμή της παραμέτρου a ενός μη ενεργοποιημένου ΤΤΙ.
- b_0 η τιμή της παραμέτρου b ενός μη ενεργοποιημένου ΤΤΙ.

3.3 Μελέτη αλλοίωσης ιχθυερών

Βάσει των αποτελεσμάτων της κινητικής μελέτης της υποβάθμισης της ποιότητας και της ασφάλειας των μελετώμενων ιχθυερών, πραγματοποιήθηκε μελέτη για την επιλογή των κατάλληλων ΤΠΙ για την αντιστοίχιση τους με το χρόνο ζωής του κέφαλου (*Mugil Cephalus*) και του τόνου (*Thunnus alalunga*). Με βάση τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα που προέκυψαν για κάθε τύπο ΤΠΙ και λαμβάνοντας υπόψιν τους χρόνους ζωής των προς μελέτη τροφίμων, προέκυψαν οι καταλληλότεροι για την παρακολούθηση του κάθε ψαριού δείκτες.

3.3.1 Πειραματική Διαδικασία

Για τον κέφαλο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές και μη συνθήκες (0, 5, 10 και 15°C) και σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες ($T_{\text{eff}}=7.4^{\circ}\text{C}$) ενώ για τον τόνο σε θερμοκρασίες (0, 5 και 10°C). Κατά τη διάρκεια των συγκεκριμένων πειραμάτων στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν:

- Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου
- Μέτρηση pH
- Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων

Στη συνέχεια σχεδιάστηκε το μαθηματικό μοντέλο ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και του σχηματισμού ισταμίνης σε κέφαλο, σε πέντε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10, 15 και 20°C) και σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενη συνθήκη (var).

3.3.1.1 Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου

Για τον υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα εφαρμόστηκε η μέθοδος της επιφανειακής ανάπτυξης σε τρυβλία. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη γνώση του ότι από ένα μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται μια και μόνο αποικία και συνεπώς η μέτρηση αποικιών δίνει τον αριθμό των μικροοργανισμών από τον οποίο προήλθαν. Οι διαδικασίες δειγματοληψίας, παρασκευής αραιώσεων και επίστρωσης των τρυβλίων πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες.



α



β

Εικόνα 3.5: (α) Φιλέτο κέφαλου και (β) φιλέτο τόνου όταν λήφθηκαν από τον προμηθευτή.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, 10g φιλέτου ιχθύος (εικόνα 3.5α & 3.5β) φέρονται σε αποστειρωμένη σακούλα και προστίθεται σε αυτή 90g αποστειρωμένου ορού Ringer. Το μείγμα ομογενοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη χρήση του Stomacher (Bagmixer interscience, France). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL φέρονται 9mL ορού Ringer. Από το ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται 1mL και τοποθετείται σε έναν σωλήνα και το μίγμα αναδεύεται. Από αυτό λαμβάνεται 1mL και φέρεται στον επόμενο σωλήνα. Κάθε αραιώση αποτελεί υποδεκαπλάσια της προηγούμενης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου επιτευχθούν οι επιθυμητές αραιώσεις (όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών στο δείγμα, τόσο περισσότερες αραιώσεις απαιτούνται).

Οι μικροοργανισμοί που μετρήθηκαν ήταν η **ολική μικροβιακή χλωρίδα** οι **ψευδομονάδες (*Pseudomonas spp.*)** και τα **εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae spp.*)**.

A. Ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών

Για τη μέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας χρησιμοποιήθηκε το μη επιλεκτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA) της Merck. Το θρεπτικό υλικό διανέμεται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια λαμβάνεται 0,1mL δείγματος, το οποίο φέρεται στην επιφάνεια του υποστρώματος και ακολουθεί επάλειψη με τη βοήθεια στυλέο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλες τις αραιώσεις. Για κάθε αραιώση πραγματοποιούνται διπλά δείγματα. Τα τρυβλία αφήνονται να επώασουν για 2-3 ημέρες σε θάλαμο θερμοκρασίας 30°C.

Για τη μέτρηση των *Pseudomonas spp.* Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα Cetrimide Agar (CFC) της Merck. Το θρεπτικό υλικό διανέμεται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια λαμβάνεται 0,1mL δείγματος, το οποίο φέρεται στην επιφάνεια του υποστρώματος και ακολουθεί επάλειψη με τη βοήθεια στυλέο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλες τις αραιώσεις. Για κάθε αραιώση πραγματοποιούνται διπλά δείγματα. Τα τρυβλία αφήνονται να επώασουν για 1-2 ημέρες σε θάλαμο θερμοκρασίας 30°C.

B. Ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών

Για τη μέτρηση των *Enterobacteriaceae spp.* χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD). Από το κάθε δείγμα λαμβάνεται 1mL και τοποθετείται σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο Petri. Μέρος του θρεπτικού υλικού διανέμεται στα τρυβλία έως ότου καλυφθεί το δείγμα που έχει τοποθετηθεί. Τα τρυβλία ανακινούνται προσεκτικά και το υπόστρωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί. Ακολουθεί μία δεύτερη στρώση υποστρώματος, ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια της πρώτης. Η διαδικασία της δεύτερης επίστρωσης εξασφαλίζει

αναερόβιες συνθήκες. Τα τρυβλία αφήνονται για επώαση στους 30°C για 1-2 ημέρες.

Μετά την επώαση των τρυβλίων, καταμετρούνται οι αναπτυσσόμενες αποικίες. Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιείται σε κατάλληλη αραιώση, ώστε να υπάρχουν 50-200 αποικίες ανά τρυβλίο. Λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση του δείγματος, υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών που περιέχει 1g δείγματος και μεταφράζεται σε logcfu/g, πολλαπλασιάζοντας με το αντίστροφο της αραιώσης.

3.3.1.2 Μέτρηση pH

Η μέτρηση pH (pH-meter 338, AMEL Instruments, Milan, Italy) (Εικόνα 3.6) πραγματοποιήθηκε σε ομογενοποιημένο μίγμα 10% δείγματος σε διάλυμα Ringer, αμέσως μετά τη μικροβιολογική ανάλυση.



Εικόνα 3.6: Πεχάμετρο AMEL Instruments 338

3.3.1.3 Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων

Πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση της σάρκας των ιχθύων κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους με απώτερο σκοπό τον καθορισμό του οργανοληπτικού ορίου αποδοχής τους.

Για τη βαθμολόγηση χρησιμοποιήθηκε κλίμακα από το 1 έως το 9, όπου

- 9: φρέσκο προϊόν και
- 1: εμφανείς αλλοιώσεις (εικόνα 3.7).

Ως όριο αποδοχής ορίστηκε ο βαθμός 5.

Το έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου που συμπληρώθηκε από τους δοκιμαστές παρατίθεται στο παράρτημα.



Εικόνα 3.7: Φιλέτο κεφάλου που έχει περάσει το όριο οργανοληπτικής αποδοχής.

3.3.1.4 Προσδιορισμός ανάπτυξης του *Morganella morganii*

Αποστειρωμένα (στους 121°C για 15 min) πολτοποιημένα κομμάτια κρέατος κεφάλου (*Mugil cephalus*) εμβολιάστηκαν με καλλιέργεια *Morganella morganii* σε φορτίο 2,4 logcfu/g. Για τον εμβολιασμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κλινική καλλιέργεια του μικροοργανισμού αυτού και παρασκευάστηκε το εμβόλιο μετά από δύο διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα (Nutrient Agar, Merck) με επώαση για 24 ώρες στους 37°C. Τα ομογενοποιημένα δείγματα συντηρήθηκαν σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες και αποθηκεύτηκαν τόσο σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 5, 10, 15 και 20°C) όσο και σε μεταβαλλόμενες. Το φορτίο του *Morganella morganii* προσδιορίστηκε με τη μέθοδο επιφανειακής επίστρωσης σε Nutrient Agar (Merck).

3.3.1.5 Προσδιορισμός σχηματισμού Ισταμίνης

Η ισταμίνη στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε με HPLC. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε (Yen & Hsieh, 1991; Ntzimani et al., 2008; Balamatsia et al., 2006) εκτός από την ισταμίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό άλλων βιογενών αμινών που αναπτύσσονται στα ψάρια και σε άλλα τρόφιμα, όπως θρυπταμίνη, πουτρεσκίνη, καδαβερίνη, σπερμιδίνη, σπερμίνη και τυραμίνη.

Η κατεργασία των δειγμάτων που αναλύονται για τον προσδιορισμό της ισταμίνης περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο επιτυγχάνεται η εκχύλιση της ισταμίνης από το δείγμα με κατάλληλους διαλύτες και στο δεύτερο στάδιο γίνεται επισήμανση της ισταμίνης με κοινό χρωμοφόρο. Ο άμεσος και ταυτόχρονος προσδιορισμός των βιογενών αμινών δεν είναι εφικτός εξ' αιτίας της απουσίας κοινού χρωμοφόρου στην δομή τους. Για το λόγο αυτό συνήθως προηγείται ένα στάδιο σχηματισμού παραγώγων, πριν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των βιογενών αμινών. Το στάδιο αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή μιας ανιχνεύσιμης ομάδας στη δομή των βιογενών αμινών. Η ένωση η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον παραπάνω σκοπό είναι το βενζυλοχλωρίδιο (Paleologos et al., 2003). Η προετοιμασία επομένως των δειγμάτων γίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει εκχύλιση με διάλυμα τριχλωροξικού οξέος (TCA) 6% v/v και καταβύθιση, με σκοπό την απομόνωση των βιογενών αμινών. Στο

δεύτερο στάδιο γίνεται ο σχηματισμός παραγώγων των βιογενών με σκοπό την παραγωγή κοινού χρωμοφόρου για την διευκόλυνση του προσδιορισμού των βιογενών αμινών με HPLC (Paleologos et al., 2003).

Για τον προσδιορισμό των βιογενών αμινών, στην παρούσα μελέτη της ισταμίνης, παρασκευάστηκαν 10mL πρότυπων διαλυμάτων ισταμίνης (histamine dihydrochloride) του 1 mg/mL.

1. Το πρώτο στάδιο (εκχύλιση) περιλαμβάνει τα εξής:

- 5 g δείγματος ομογενοποιούνται με 10mL υδατικού διαλύματος TCA 6% v/v (διαλύτης εκχύλισης). Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται σε πλαστικούς σωλήνες με χρήση ράβδου.
- Τα μείγματα φυγοκεντρώνται στις 8000rpm για 35min στους 4°C.
- Ακολουθεί διήθηση των μειγμάτων με ηθμό Whatman N° 2. Για να γίνει πιο εύκολη η διήθηση διαβρέχουμε τους ηθμούς με μια μικρή ποσότητα TCA.
- Σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 mL μεταφέρονται με πιπέτα 10 mL διηθήματος. Σε περίπτωση που κατά την διήθηση δεν προκύψουν 10 mL ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 10 mL με διάλυμα TCA 6% v/v.
- Μεταφέρουμε τα διαλύματα σε φιάλες Universal.

2. Το δεύτερο στάδιο (παραγωγοποίηση) περιλαμβάνει τα εξής:

- Από τα διαλύματα κάθε δείγματος του πρώτου σταδίου και τα πρότυπα διαλύματα παραλαμβάνονται 2mL και προστίθενται 1mL NaOH 2M και 10μL διαλύματος βενζυλοχλωριδίου (benzoyl chloride- αντιδραστήριο επισήμανσης).
- Το παραπάνω διάλυμα αναδεύεται ισχυρά σε vortex και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 30°C για 40 min, ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός των παραγώγων των βιογενών αμινών με κοινό χρωμοφόρο.
- Στη συνέχεια σταματάμε τον σχηματισμό των παραγώγων με την προσθήκη 1 mL κορεσμένου διαλύματος NaCl και προσθέτουμε 4 mL δι-αιθυλαιθέρα για να εκχυλιστούν τα παράγωγα των βιογενών αμινών.
- Πραγματοποιείται ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της αιθερικής στοιβάδας.
- Στη συνέχεια γίνεται εξάτμιση του αιθέρα και επαναδιάλυση με 0,5 mL μεθανόλης.
- Γίνεται προσδιορισμός των βιογενών αμινών με HPLC.

Συνθήκες HPLC

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες νερό και μεθανόλη (Merck, Darmstadt, Germany) υψηλής καθαρότητας (HPLC) και πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης. Ο προσδιορισμός της ισταμίνης έγινε με βάση τη μέθοδο (Yen & Hsieh, 1991) με κάποιες τροποποιήσεις (Ntzimani et al., 2008).

4. ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΤΤΙ

4.1 Επεξεργασία απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών

4.1.1 Καθορισμός της συνάρτησης $F(X_c)$ των ενζυμικών ΤΤΙ

Στα ενζυμικά ΤΤΙ, η μεταβολή χρώματος εκφράζεται ως:

$$X = \text{norm}(a + b) = \frac{(a + b) - (a + b)_{\min}}{(a + b)_{\max} - (a + b)_{\min}} \quad (4.1)$$

Όπου a και b οι συντεταγμένες του χρώματος της κλίμακας CIELab που ελήφθησαν μέσω κατάλληλου λογισμικού του χρωματόμετρου X-rite (Giannakourou et al., 2004).

Η εξίσωση (4.1) δείχνει την απόκριση του δείκτη, 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** δίνεται από τη σχέση (4.2).

$$\text{norm}(a + b) = \frac{1}{1 + e^{\frac{k_1 - t}{k_2}}} \quad (4.2)$$

Όπου k_1 , k_2 οι σταθερές των ρυθμών μεταβολής χρώματος των ΤΤΙ.

4.1.2 Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών k και E_a των ενζυμικών ΤΤΙ

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα κινητικά χαρακτηριστικά των ενζυμικών ΤΤΙ, έγινε επεξεργασία της σιγμοειδούς καμπύλης $F(X_c)$ στο υπολογιστικό πρόγραμμα SigmaPlot 10, από όπου εξήχθησαν οι σταθερές k_1 και k_2 για κάθε θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα. Στη συνέχεια, για να υπολογιστεί η θερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ, με χρήση της εξίσωσης Arrhenius, η εξίσωση (4.2) γίνεται της μορφής:

$$\text{norm}(a + b) = \frac{1}{1 + e^{\frac{k_{1ref} \cdot c^{-a} \cdot e^{\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} - t}{k_{2ref} \cdot c^{-b} \cdot e^{\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right)}}}} \quad (4.3)$$

Επομένως, με βάση την παραπάνω εξίσωση και εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση με χρήση του προγράμματος Systat 10.2 προκύπτουν η ενέργεια ενεργοποίησης E_a και οι δύο σταθερές του ρυθμού απόκρισης, k_{1ref} και k_{2ref} .

4.1.3 Έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων

Ο έλεγχος της αξιοπιστίας του κινητικού μοντέλου πραγματοποιείται μέσω της επεξεργασίας των μετρήσεων του πειράματος σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (variable temperature conditions).

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, υπολογίστηκε η T_{eff} , δηλαδή η θερμοκρασία που θα είχε την ίδια επίδραση στο ΤΤΙ με τις προαναφερόμενες θερμοκρασίες του χρονοθερμοκρασιακού κύκλου με τη βοήθεια της σχέσης 4.4.

$$T_{eff} = \frac{Ea}{R} \frac{1}{\ln\left(\frac{\sum ki}{\sum ti}\right)} \quad (4.4)$$

Εν συνεχεία, με την τιμή που προέκυψε για την εν λόγω θερμοκρασία και με χρήση της σχέσης Arrhenius προσδιορίστηκαν οι προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού απόκρισης (k_{pred}). Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων των διαφόρων ΤΤΙ συγκρίνοντας τους πειραματικούς με τους θεωρητικούς χρόνους ζωής (response time).

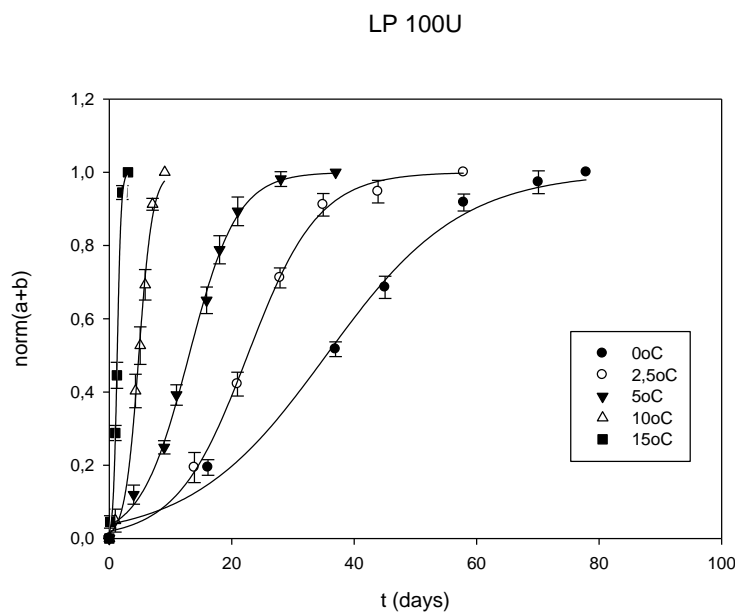
4.2 Κινητική Μελέτη της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ

Οι ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν ήταν τύπου LP και M στις εξής συγκεντρώσεις: LP (100U, 150U, 300U, 500U) και M (5U, 10U, 15U, 20U, 25U, 50U, 75U, 100U).

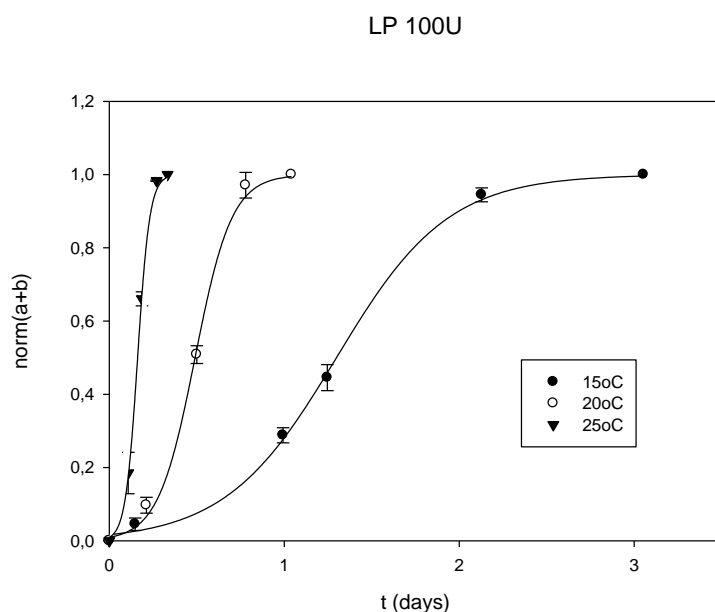
Για κάθε από τους παραπάνω δείκτες πραγματοποιήθηκαν ισοθερμοκρασιακά πειράματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Για τους δείκτες τύπου LP έγινε ισοθερμοκρασιακή μελέτη στους 0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C και 25°C ενώ για τους τύπου M στις θερμοκρασίες 0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C και 15°C. Εφαρμόστηκαν 5 επαναλήψεις για τον κάθε δείκτη. Σύμφωνα με τις πειραματικές μετρήσεις του χρώματος, όπως μετρήθηκαν από το χρωματόμετρο X-rite (τιμές L, a, και b), κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα απόκρισης του δείκτη $\text{norm}(a+b)$ συναρτήσεως του χρόνου και κατασκευάστηκε η συνάρτηση απόκρισης $F(Xc)$ για όλες τις θερμοκρασίες στις οποίες μελετήθηκε. Έπειτα έγινε ο προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών E_a , k_{1ref} , k_{2ref} των ΤΤΙ με θερμοκρασία αναφοράς $T_{ref}=4^\circ\text{C}$ (277,15K).

4.2.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 100U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $\chi_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσεως του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C) ξεχωριστά. Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή 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 LP 100U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{\text{ref}}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.1: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C και 15°C .



Σχήμα 4.2: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U και για θερμοκρασίες 15°C , 20°C και 25°C .

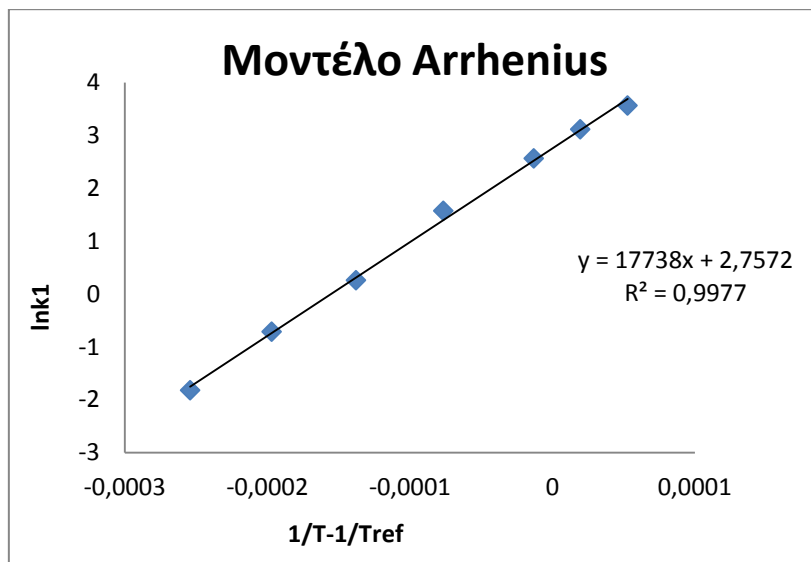
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP 100U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίσθηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

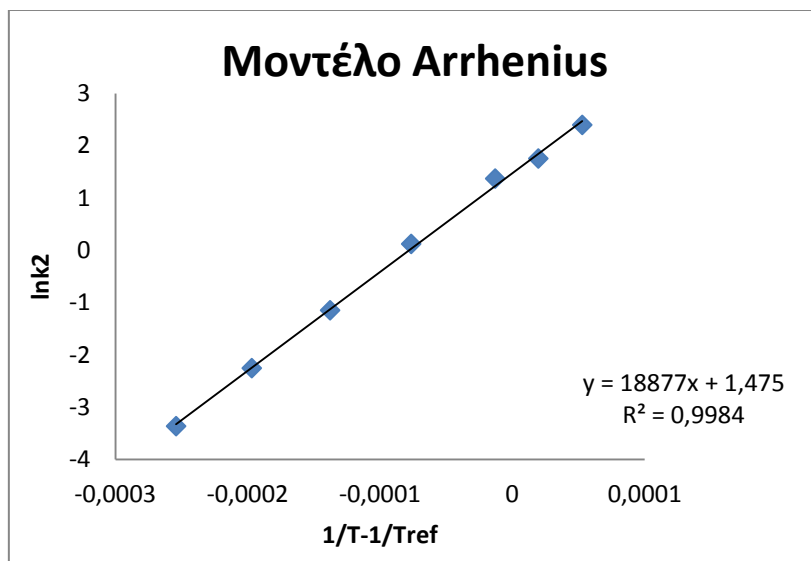
Πίνακας 4.1: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη LP 100U.

T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	35,426	10,996	0,994
2,5	22,592	5,788	0,998
5	13,026	3,945	0,997
10	4,830	1,130	0,996
15	1,299	0,318	0,999
20	0,490	0,105	0,998
25	0,162	0,035	0,999

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 100U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.3: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 100U.



Σχήμα 4.4: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 100U.

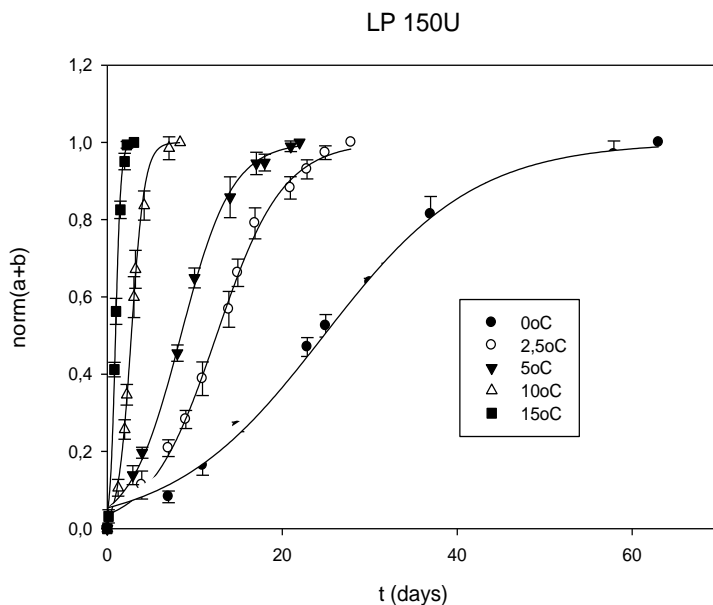
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη LP 100U που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.2: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 100U.

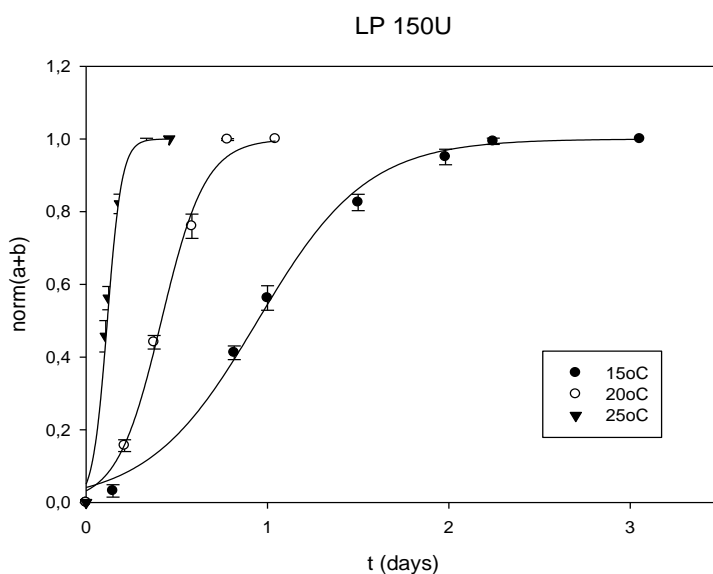
$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
15,895	4,405	147,9	0,977

4.2.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 150U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσεως του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C) ξεχωριστά. Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 150U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.5: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 150U και για θερμοκρασίες $0^{\circ}C$, $5^{\circ}C$, $10^{\circ}C$ και $15^{\circ}C$.



Σχήμα 4.6: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 150U και για θερμοκρασίες $15^{\circ}C$, $20^{\circ}C$ και $25^{\circ}C$.

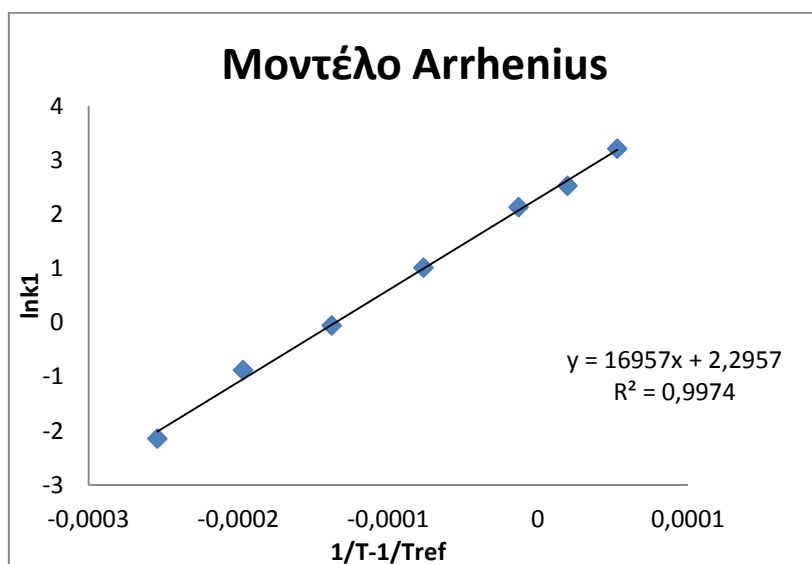
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP 150U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίσθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

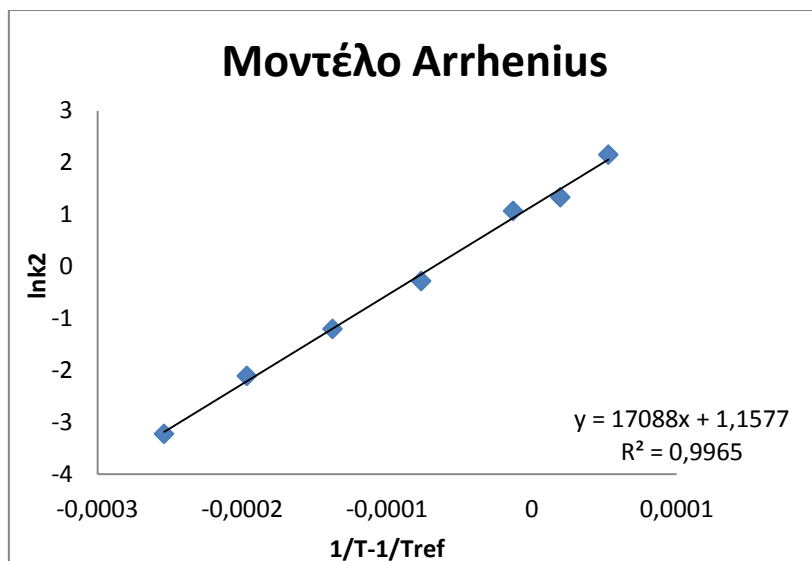
Πίνακας 4.3: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη LP 150U.

T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R ²
0	24,8	8,63	0,995
2,5	12,5	3,80	0,997
5	8,42	2,92	0,997
10	2,75	0,756	0,997
15	0,946	0,301	0,996
20	0,415	0,122	0,994
25	0,117	0,040	0,994

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 150U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.7: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 150U.



Σχήμα 4.8: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 150U.

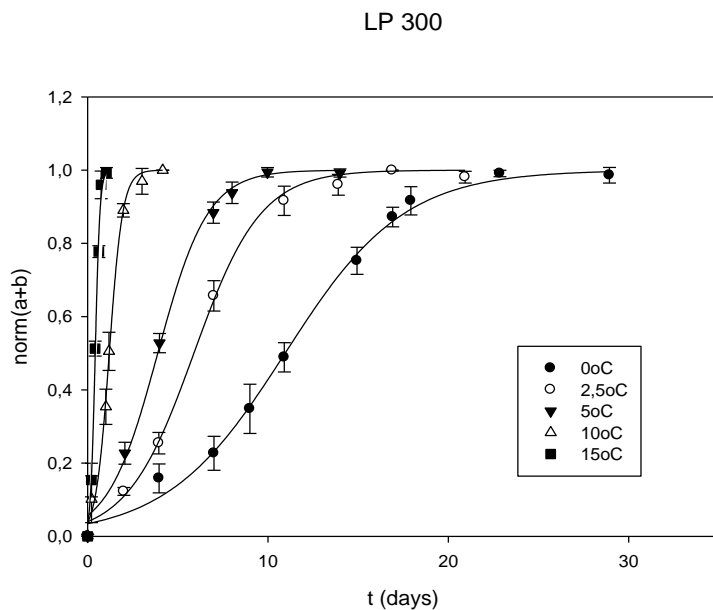
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.4: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 150U.

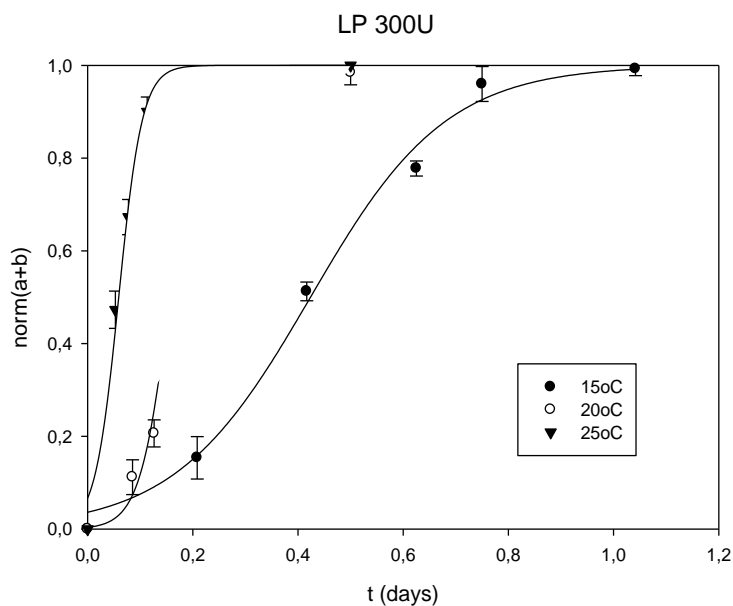
$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	Ea (kJ/mol)	R^2
9,769	3,171	140,8	0,984

4.2.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 300U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσεως του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C) ξεχωριστά. Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 300U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.9: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 300U και για θερμοκρασίες $0^{\circ}C$, $5^{\circ}C$, $10^{\circ}C$ και $15^{\circ}C$.



Σχήμα 4.10: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 300U και για θερμοκρασίες $15^{\circ}C$, $20^{\circ}C$ και $25^{\circ}C$.

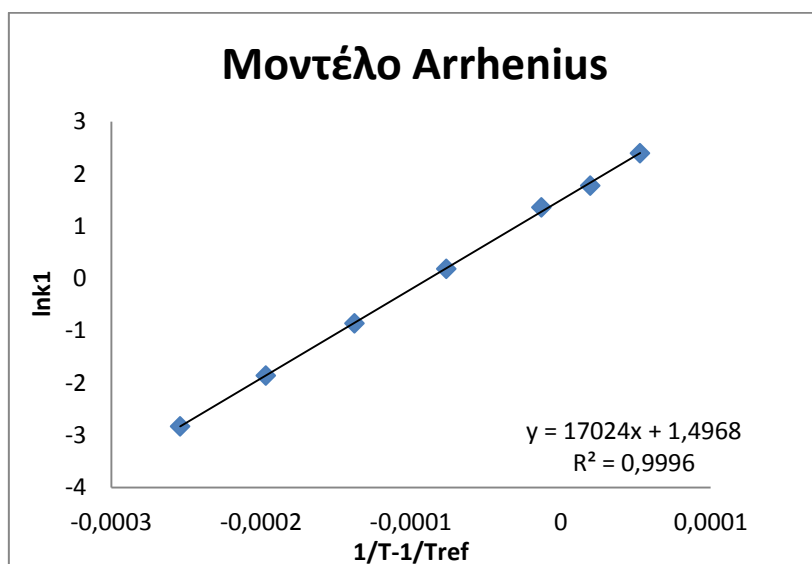
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP 300U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

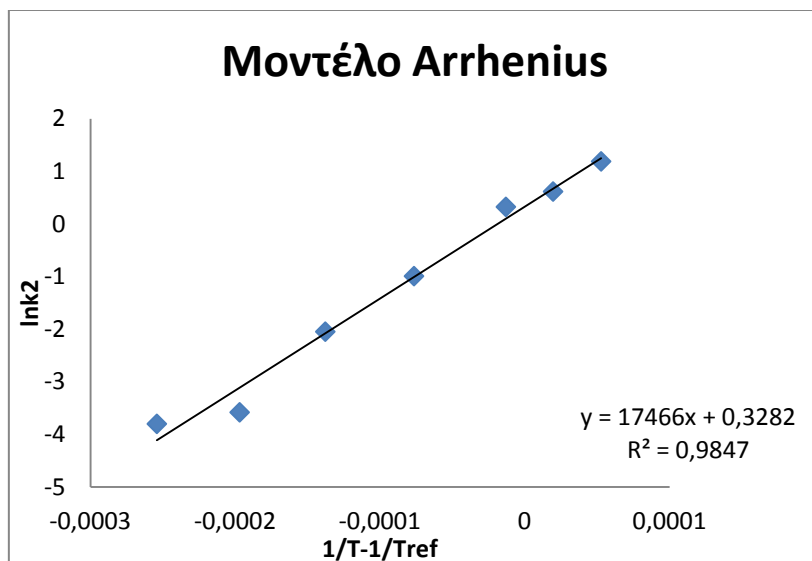
Πίνακας 4.5: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη LP 300U.

T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R ²
0	10,951	3,285	0,996
2,5	5,895	1,853	0,997
5	3,890	1,385	0,996
10	1,201	0,371	0,996
15	0,424	0,129	0,994
20	0,156	0,028	0,988
25	0,059	0,022	0,988

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 300U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.11: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 300U.



Σχήμα 4.12: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 300U.

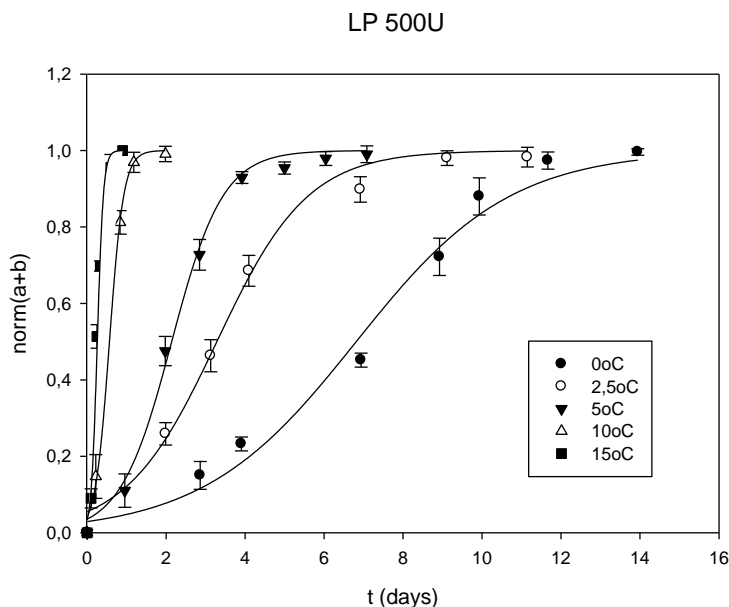
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.6: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 300U.

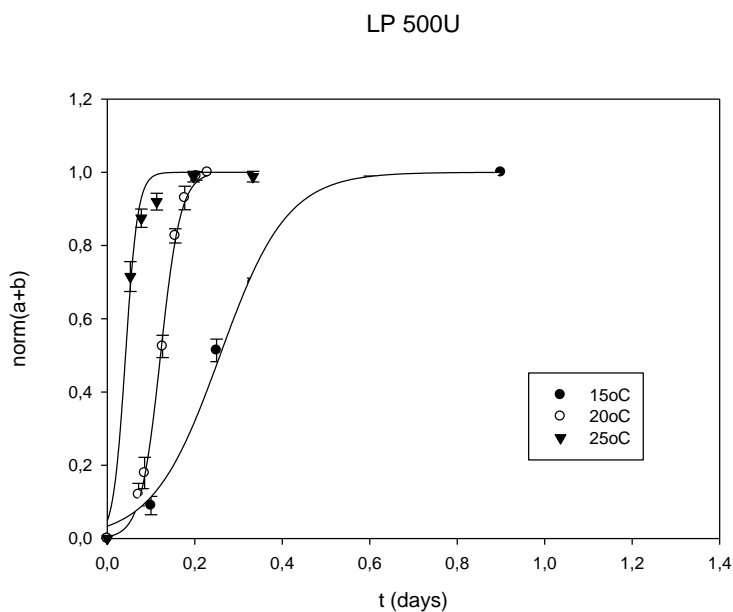
$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
4,451	1,326	141,5	0,988

4.2.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP 500U

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C) και για υψηλές θερμοκρασίες (15°C , 20°C , 25°C) ξεχωριστά. Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 500U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.13: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 500U και για θερμοκρασίες $0^{\circ}C$, $5^{\circ}C$, $10^{\circ}C$ και $15^{\circ}C$.



Σχήμα 4.14: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 500U και για θερμοκρασίες $15^{\circ}C$, $20^{\circ}C$ και $25^{\circ}C$.

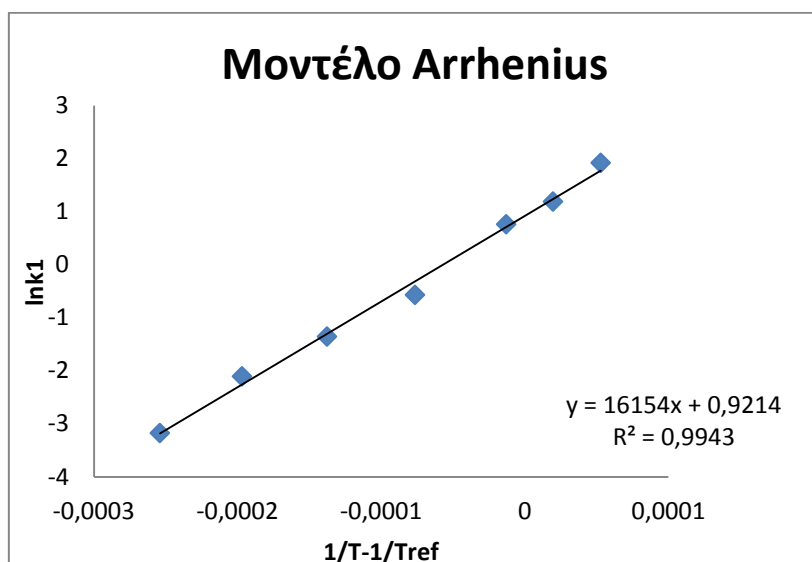
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη LP 500U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίσθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

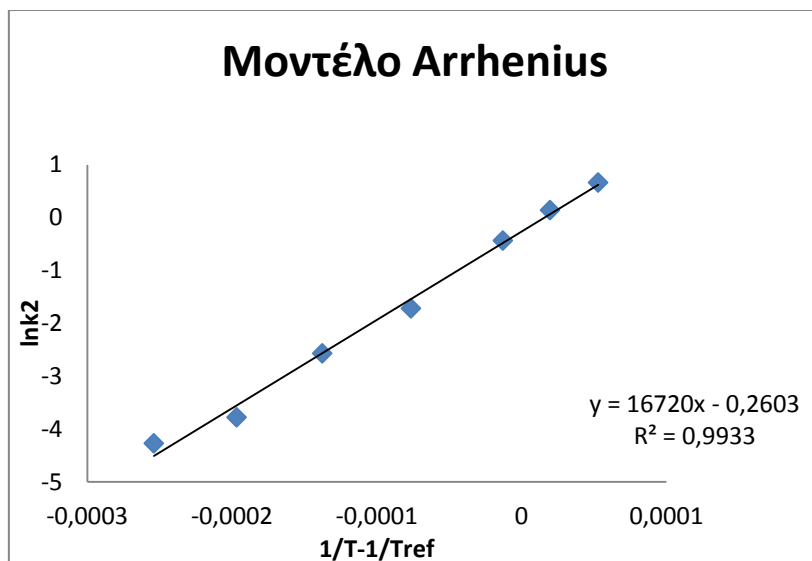
Πίνακας 4.7: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη LP 500U.

T (°C)	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	R ²
0	6,814	1,946	0,987
2,5	3,285	1,155	0,991
5	2,142	0,649	0,995
10	0,565	0,180	0,998
15	0,258	0,077	0,994
20	0,122	0,023	0,999
25	0,042	0,014	0,984

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 500U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.15: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 500U.



Σχήμα 4.16: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη LP 500U.

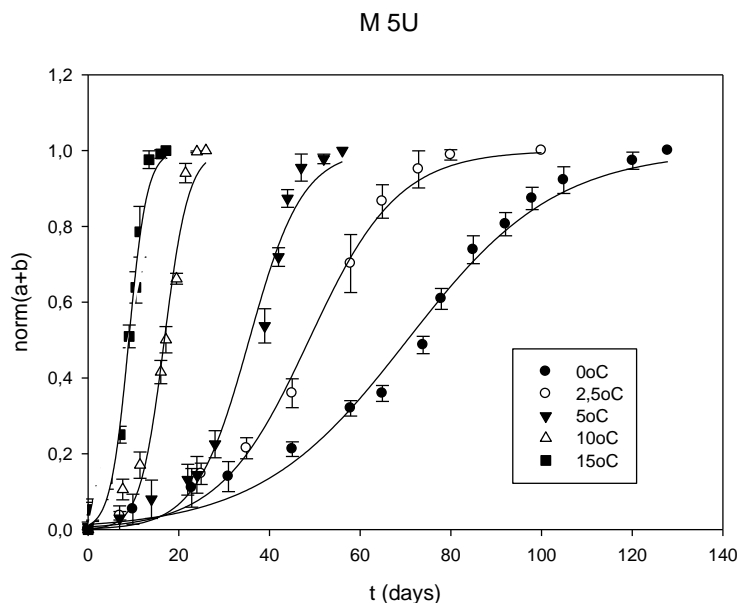
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.8: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 500U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	Ea (kJ/mol)	R^2
2,578	0,784	134,6	0,964

4.2.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 5U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 5U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.17: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 5U και για θερμοκρασίες $0^{\circ}C$, $5^{\circ}C$, $10^{\circ}C$ και $15^{\circ}C$.

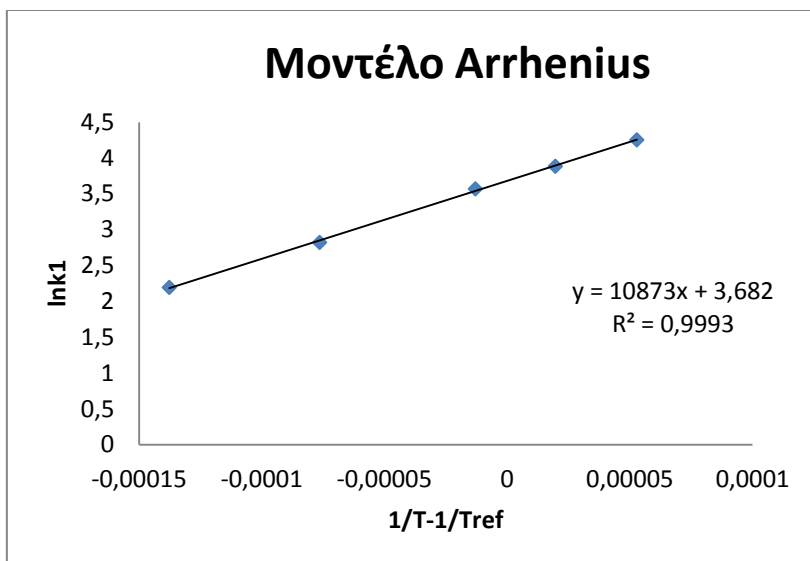
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 5U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

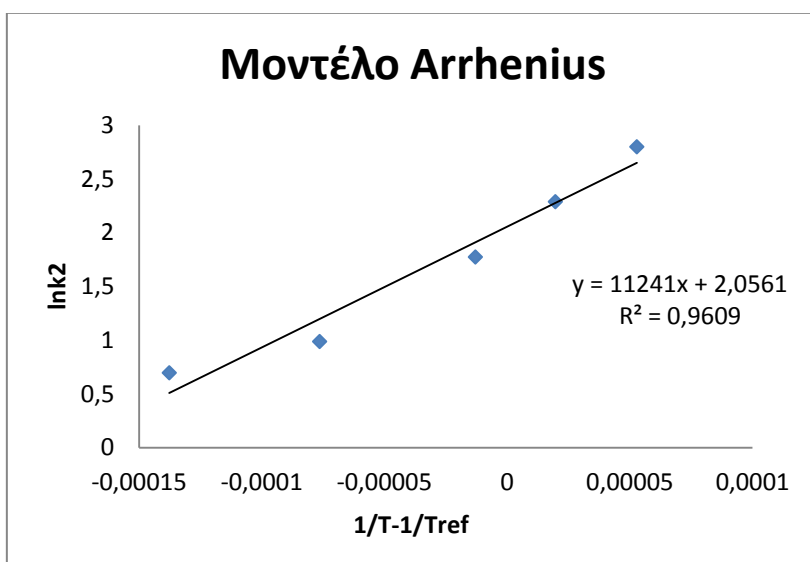
Πίνακας 4.9: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 5U.

T ($^{\circ}C$)	k_1 (h^{-1})	k_2 (h^{-1})	R^2
0	70,416	16,421	0,988
2,5	48,710	9,851	0,994
5	35,523	5,889	0,984
10	16,824	2,682	0,980
15	8,980	2,005	0,991

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 5U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}C$.



Σχήμα 4.18: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 5U.



Σχήμα 4.19: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 5U.

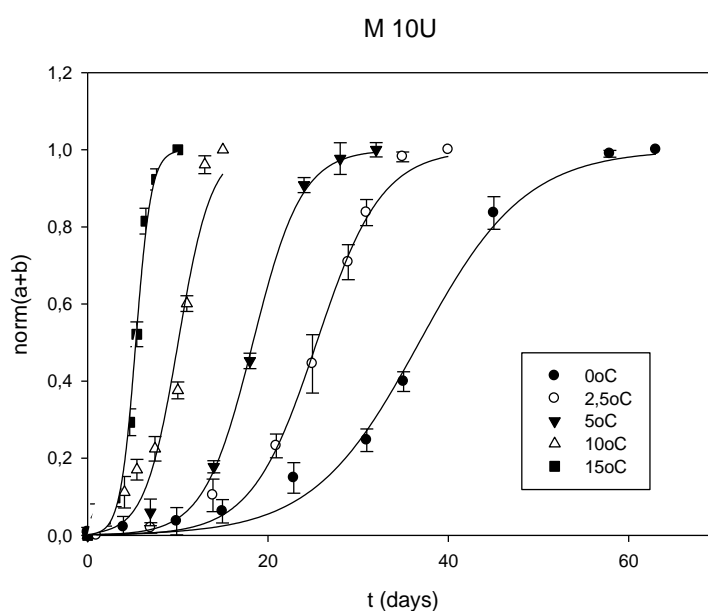
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.10: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 5U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
39,723	7,789	91,2	0,984

4.2.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 10U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή 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 M 10U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{\text{ref}}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.20: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 10U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C και 15°C .

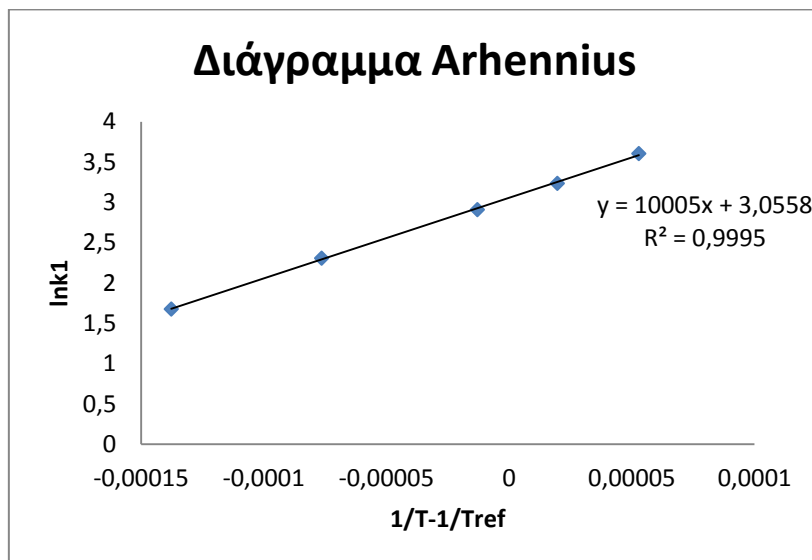
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 10U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίσθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Sigmaplot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

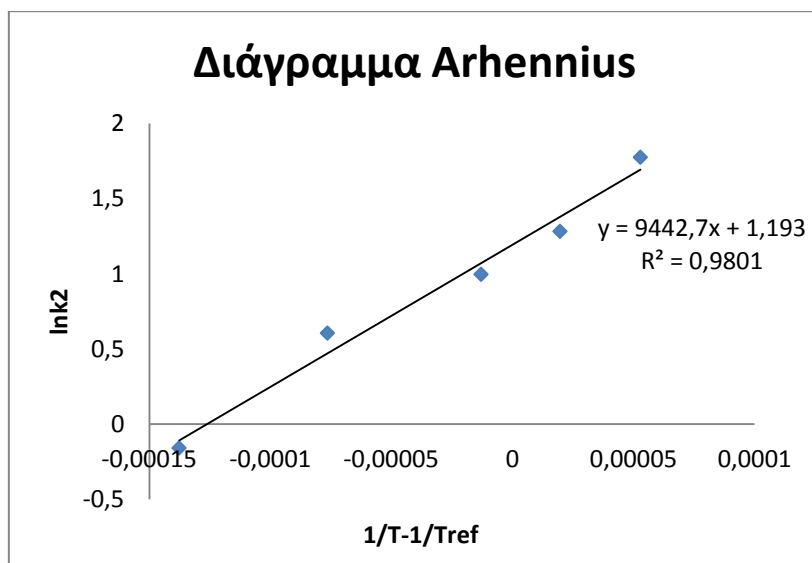
Πίνακας 4.11: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 10U.

T ($^\circ\text{C}$)	k_1 (h^{-1})	k_2 (h^{-1})	R^2
0	36,773	5,902	0,994
2,5	25,405	3,607	0,994
5	18,338	2,711	0,998
10	10,041	1,834	0,955
15	5,343	0,854	0,997

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 10U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.21: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 10U.



Σχήμα 4.22: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 10U.

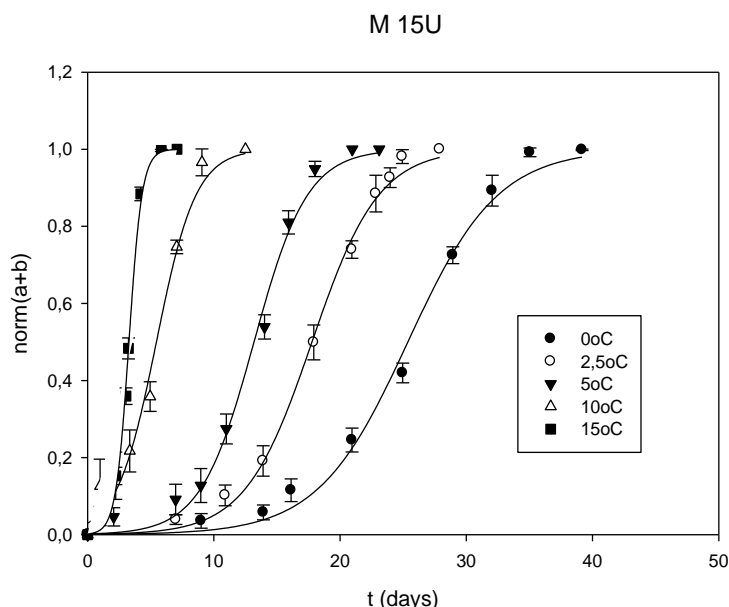
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.12: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 10U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	Ea (kJ/mol)	R ²
39,723	7,789	91,2	0,984

4.2.7 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 15U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C, 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 15U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.23: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 15U και για θερμοκρασίες 0°C, 5°C, 10°C και 15°C.

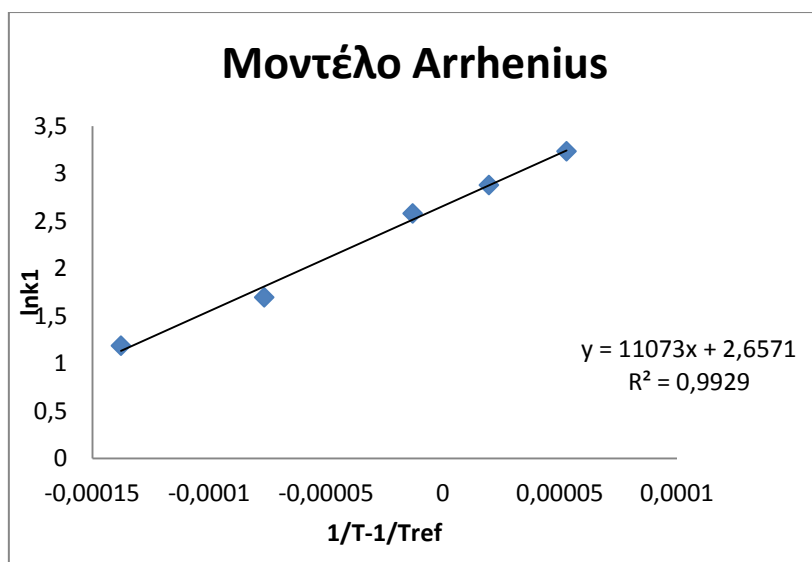
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 15U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

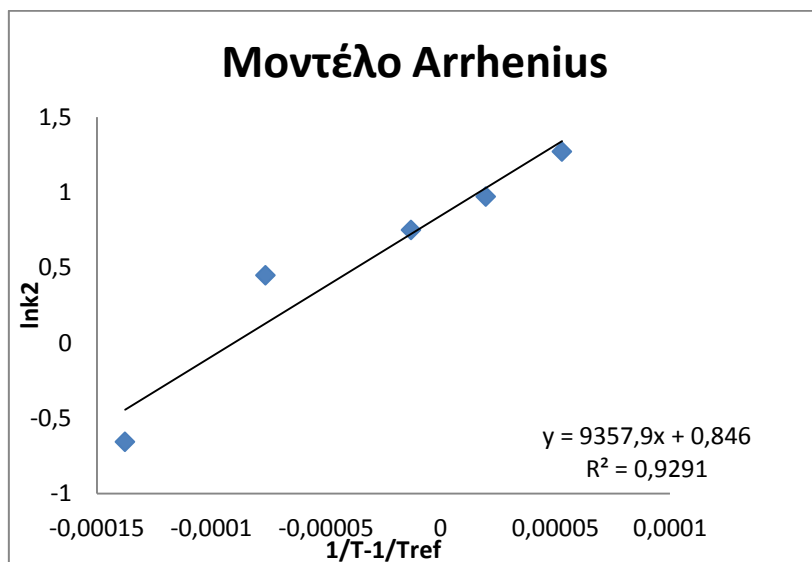
Πίνακας 4.13: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 15U.

T (°C)	$k_1 (h^{-1})$	$k_2 (h^{-1})$	R ²
0	25,370	3,561	0,993
2,5	17,775	2,641	0,997
5	13,183	2,116	0,994
10	5,451	1,566	0,986
15	3,276	0,518	0,997

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 15U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.24: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 15U.



Σχήμα 4.25: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 15U.

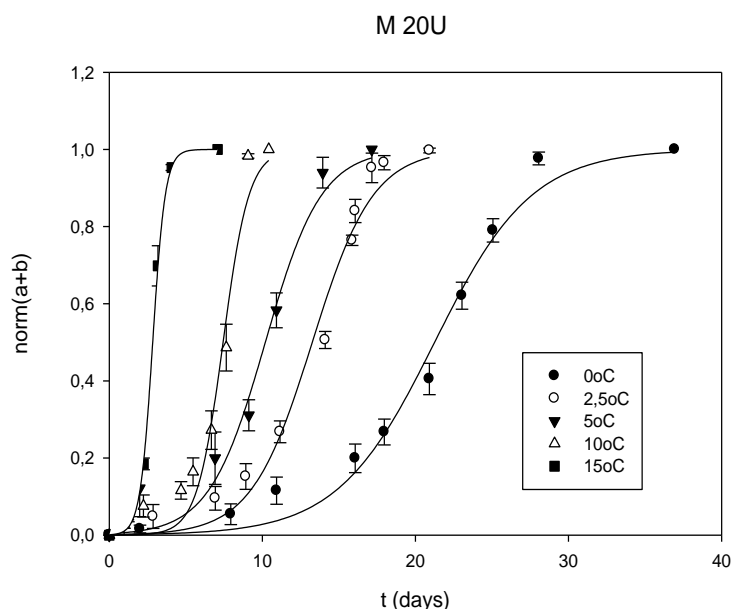
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.14: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 15U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
14,325	2,376	89,9	0,982

4.2.8 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 20U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 20U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.26: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 20U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C και 15°C .

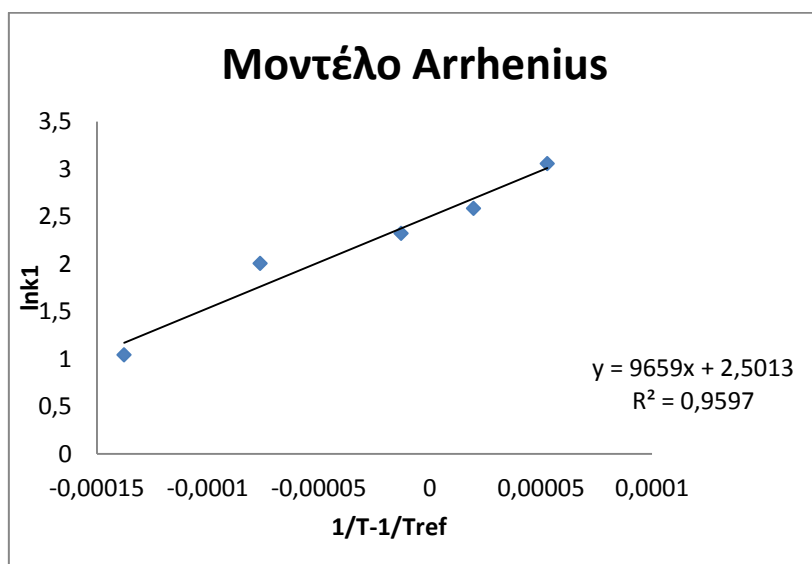
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 20U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

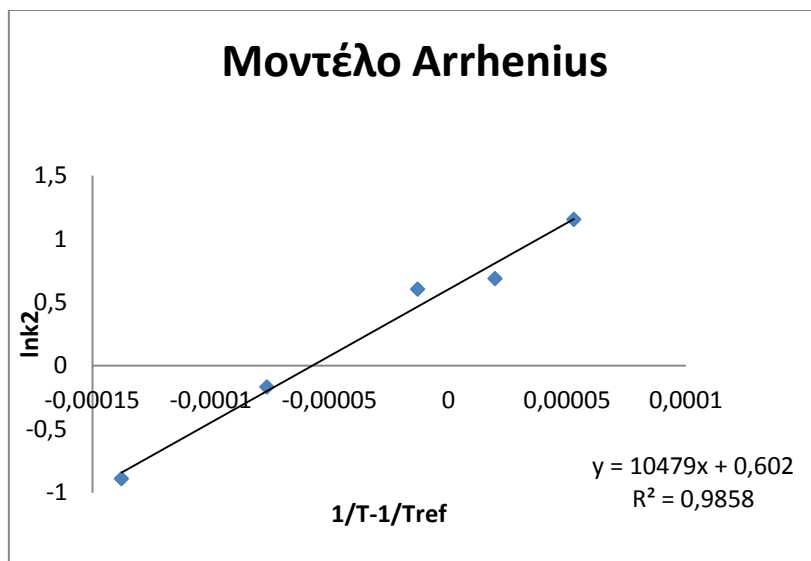
Πίνακας 4.15: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 20U.

T (°C)	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	R ²
0	21,252	3,171	0,985
2,5	13,261	1,989	0,985
5	10,195	1,830	0,978
10	7,432	0,846	0,969
15	2,838	0,411	0,999

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 20U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.27: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 20U.



Σχήμα 4.28: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 20U.

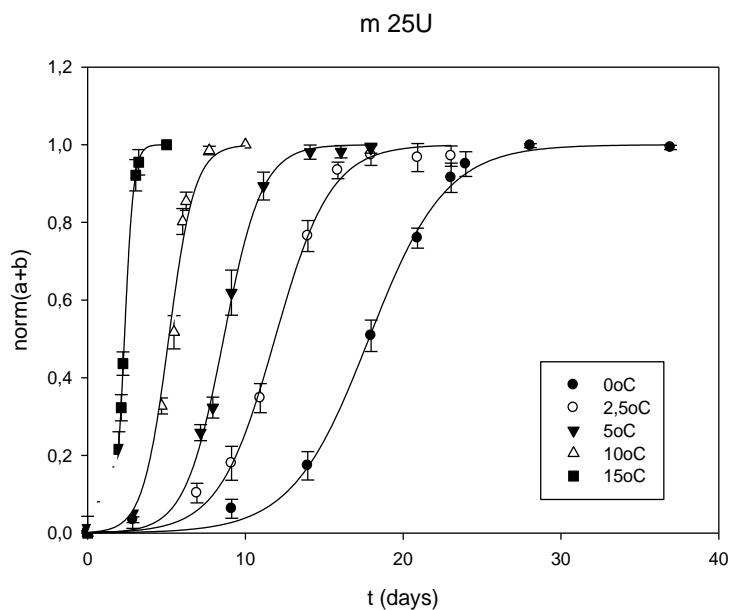
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.16: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 20U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	Ea (kJ/mol)	R^2
12,041	2,125	76,9	0,896

4.2.9 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 25U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 25U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.29: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 25U και για θερμοκρασίες $0^{\circ}C$, $5^{\circ}C$, $10^{\circ}C$ και $15^{\circ}C$.

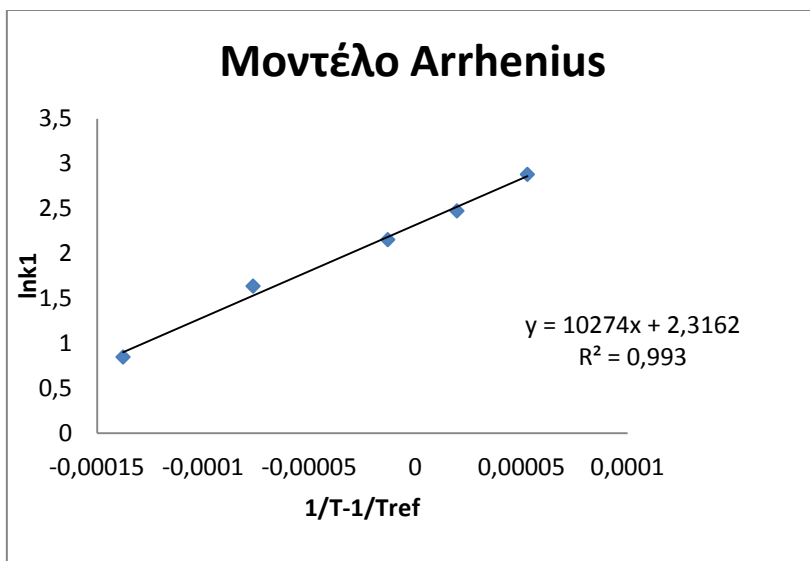
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 25U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

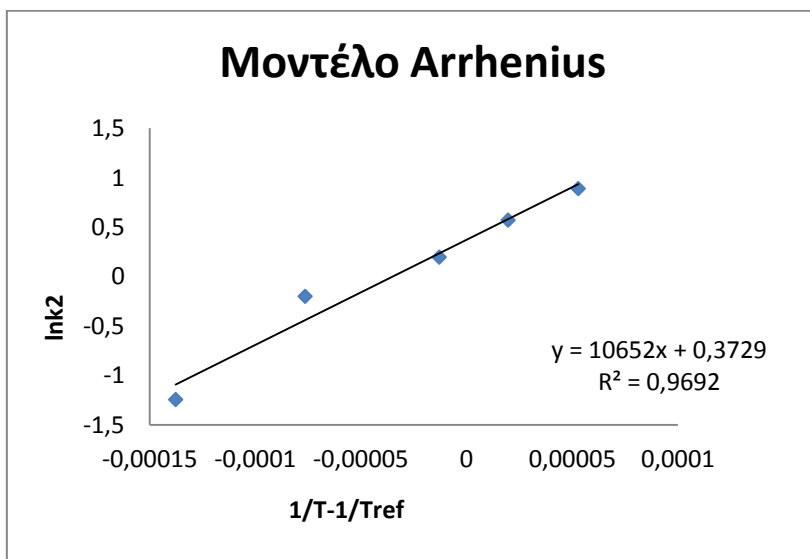
Πίνακας 4.17: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 25U.

T ($^{\circ}C$)	k_1 (h^{-1})	k_2 (h^{-1})	R^2
0	17,822	2,437	0,998
2,5	11,870	1,772	0,997
5	8,616	1,218	0,996
10	5,137	0,819	0,990
15	2,333	0,288	0,998

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 25U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}C$.



Σχήμα 4.30: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 25U.



Σχήμα 4.31: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 25U.

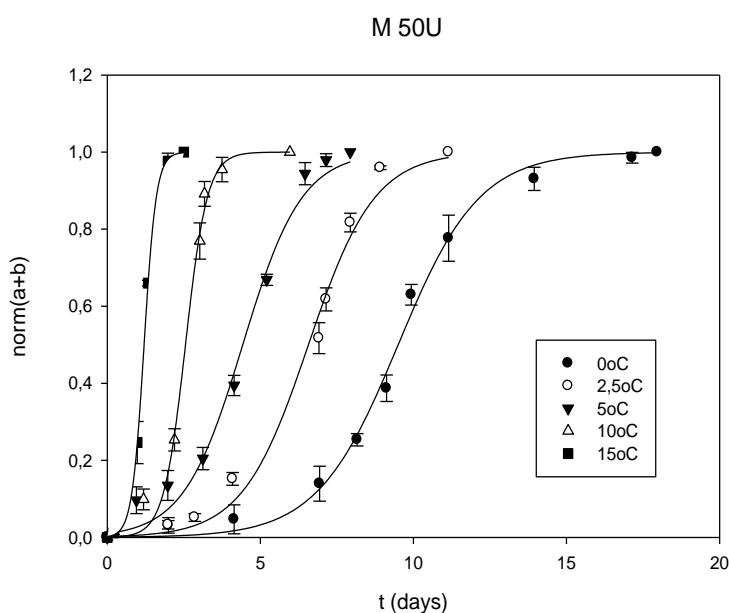
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.18: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 25U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
10,101	1,668	84,7	0,977

4.2.10 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 50U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή 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 M 50U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{\text{ref}}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.32: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 50U και για θερμοκρασίες 0°C , 5°C , 10°C και 15°C .

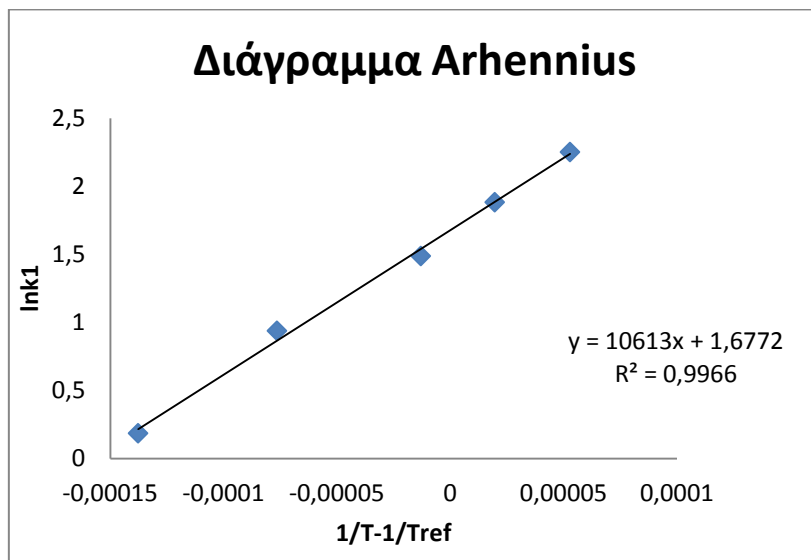
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 50U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

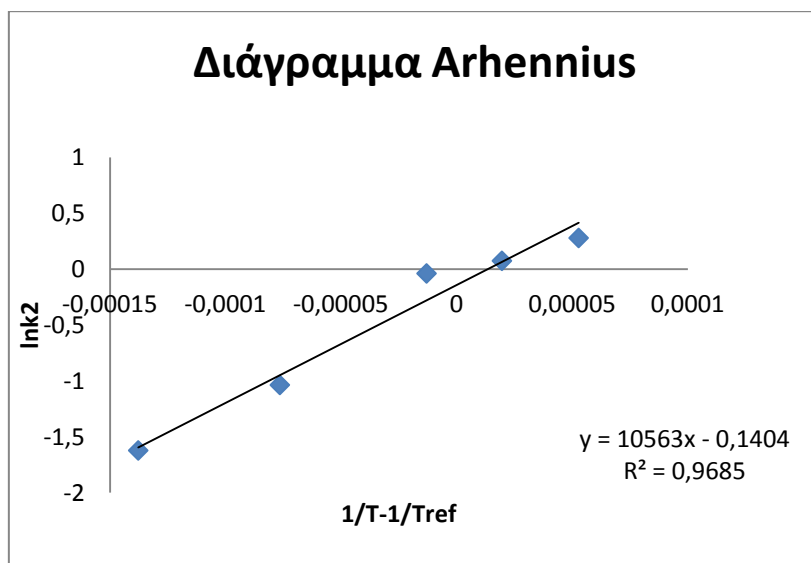
Πίνακας 4.19: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 50U.

T ($^\circ\text{C}$)	k_1 (h^{-1})	k_2 (h^{-1})	R^2
0	9,501	1,324	0,995
2,5	6,571	1,079	0,990
5	4,425	0,964	0,989
10	2,555	0,355	0,993
15	1,203	0,198	1,000

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 50U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.33: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 50U.



Σχήμα 4.34: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 50U.

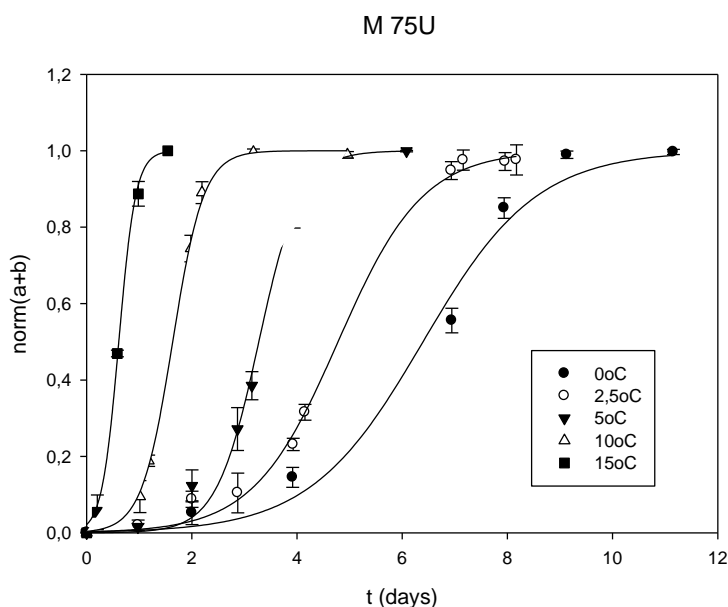
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.20: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 50U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	Ea (kJ/mol)	R ²
5,365	0,901	88,4	0,988

4.2.11 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 75U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C, 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 75U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.35: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $\text{norm}(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 75U και για θερμοκρασίες 0°C, 5°C, 10°C και 15°C.

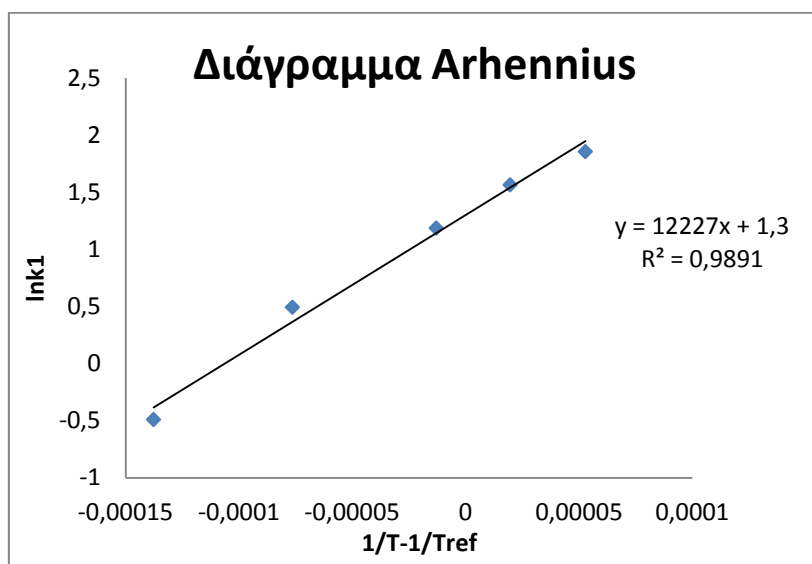
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 75U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

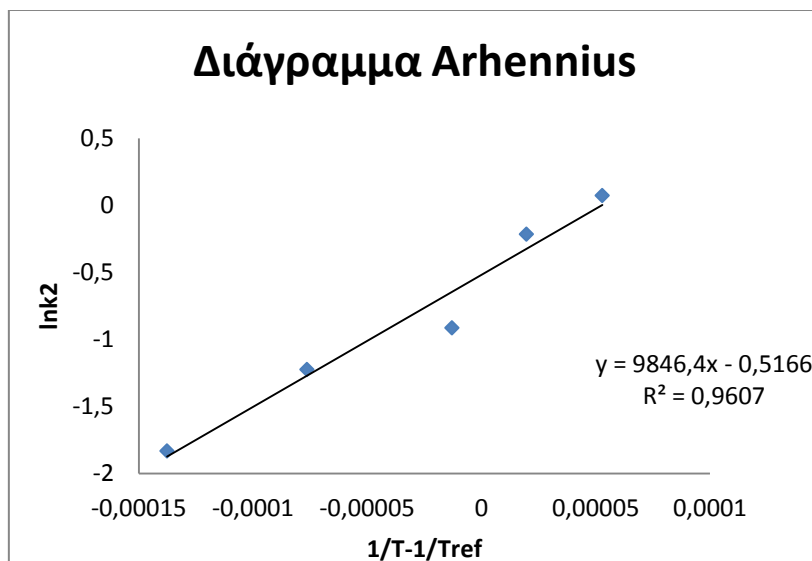
Πίνακας 4.21: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 75U.

T (°C)	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	R ²
0	6,396	1,077	0,988
2,5	4,780	0,807	0,997
5	3,274	0,402	0,993
10	1,637	0,294	0,999
15	0,612	0,160	0,998

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 75U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 4.36: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 75U.



Σχήμα 4.37: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 75U.

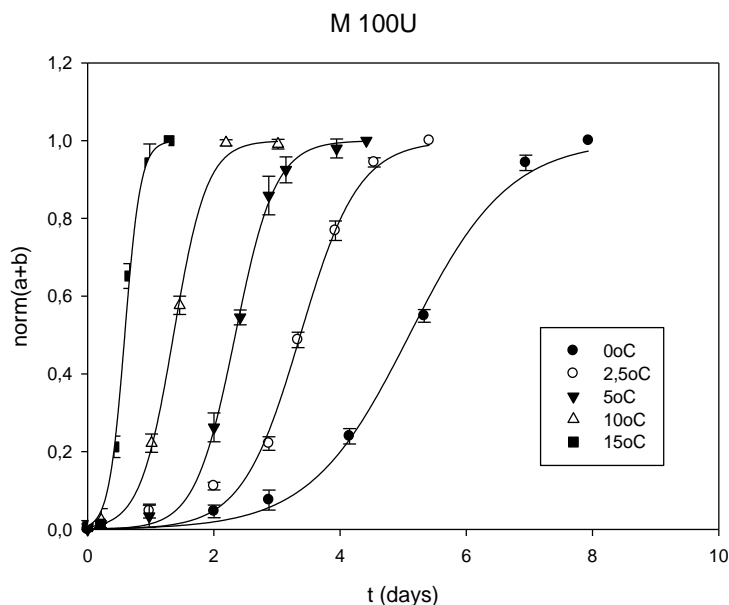
Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.22: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 75U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
3,658	0,622	96,8	0,977

4.2.12 Κινητική μελέτη των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M 100U

Παρακάτω παρουσιάζονται το συνολικό διάγραμμα της μεταβολής της απόκρισης $X_c(\text{norm}(a+b))$ συναρτήσει του χρόνου (days) για θερμοκρασίες ψύξης (0°C , $2,5^\circ\text{C}$, 5°C , 10°C , 15°C). Στη συνέχεια παρατίθενται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T) - (1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 100U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^\circ\text{C}$.



Σχήμα 4.38: Συνολικό διάγραμμα της μεταβολής απόκρισης $norm(a+b)$ με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 100U και για θερμοκρασίες $0^{\circ}C$, $5^{\circ}C$, $10^{\circ}C$ και $15^{\circ}C$.

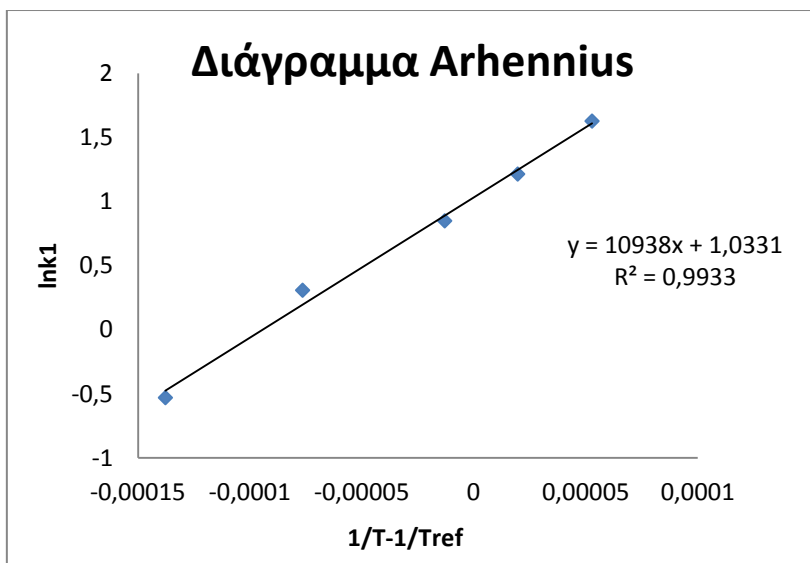
Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη M 100U

Οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για κάθε θερμοκρασία, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot 10 και δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

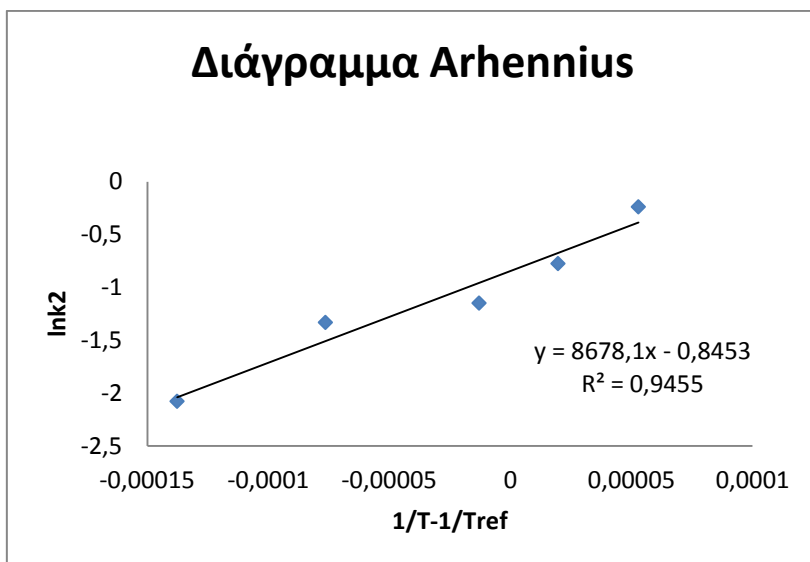
Πίνακας 4.23: Σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 , k_2 και συντελεστές συσχέτισης για τον δείκτη M 100U.

T ($^{\circ}C$)	k_1 (h^{-1})	k_2 (h^{-1})	R^2
0	5,098	0,789	0,997
2,5	3,371	0,461	0,994
5	2,340	0,317	0,999
10	1,362	0,264	0,998
15	0,589	0,125	0,999

Παρακάτω παραθέτονται τα γραμμικοποιημένα διαγράμματα Arrhenius, δηλαδή η γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ και των $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 100U. Ως θερμοκρασία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η $T_{ref}=4^{\circ}C$.



Σχήμα 4.39: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_1$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 100U.



Σχήμα 4.40: Γραμμική προσαρμογή του $\ln k_2$ ως προς $(1/T)-(1/T_{ref})$ για τον δείκτη M 100U.

Τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη που προέκυψαν από την επεξεργασία προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα Systat 10.2 και με την μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.24: Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 100U.

$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
2,766	0,447	89,9	0,984

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται συγκεντρωτικά τα κινητικά χαρακτηριστικά όλων των δεικτών.

Πίνακας 4.25: Κινητικά χαρακτηριστικά των ενζυμικών δεικτών.

Τύπος ΤΤΙ	C (units)	$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
LP	100	15,895	4,405	147,9	0,977
LP	150	9,769	3,171	140,8	0,984
LP	300	4,451	1,326	141,5	0,988
LP	500	2,578	0,784	134,6	0,964
M	5	39,723	7,789	91,2	0,984
M	10	39,723	7,789	91,2	0,984
M	15	14,325	2,376	89,9	0,982
M	20	12,041	2,125	76,9	0,896
M	25	10,101	1,668	84,7	0,977
M	50	5,365	0,901	88,4	0,988
M	75	3,658	0,622	96,8	0,977
M	100	2,766	0,447	89,9	0,984

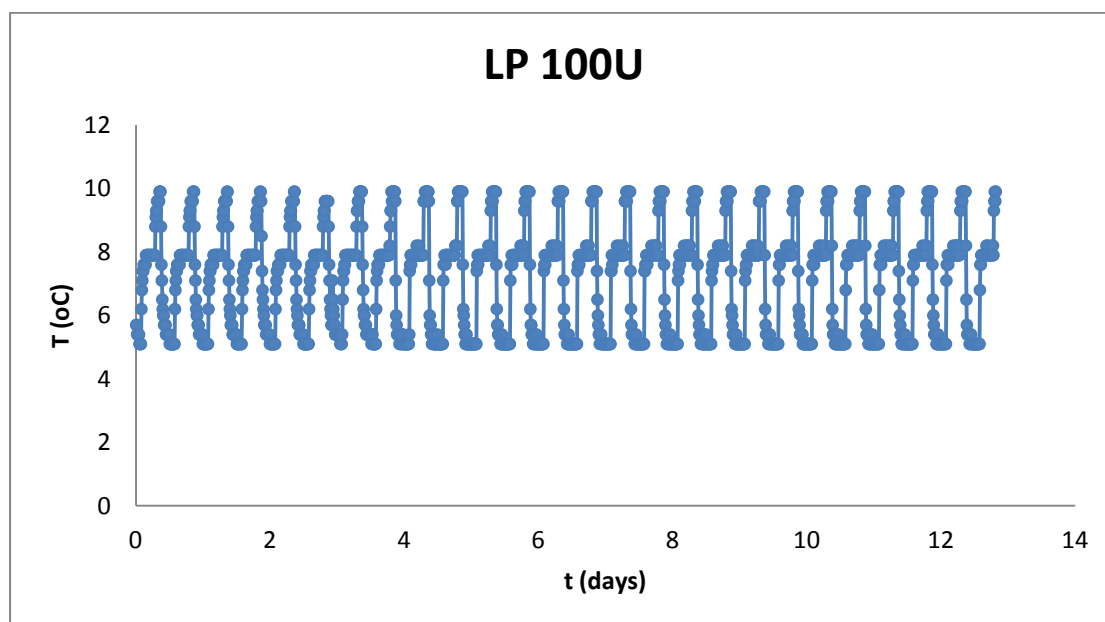
Παρατηρήσεις

- Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω καθώς και όπως παρατηρούμε συγκεντρωτικά στον παραπάνω πίνακα, παρατηρείται αρκετά υψηλός συντελεστής προσαρμογής R^2 , ο οποίος αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, με αύξηση της θερμοκρασίας που υποβάλλεται το ΤΤΙ μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Πειραματικά αυτό επιβεβαιώνεται αφού πραγματοποιείται πιο γρήγορη μεταβολή χρώματος των δεικτών με την αύξηση θερμοκρασίας.
- Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουμε και με αύξηση της συγκέντρωσης του δείκτη σε σταθερή θερμοκρασία. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ίδιου τύπου δείκτη τόσο πιο γρήγορη είναι η χρωματική αλλαγή αυτού.
- Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι σε υψηλές θερμοκρασίες (20°C, 25°C), οι δείκτες M έδειχναν να απενεργοποιούνται μερικώς και γι αυτό το λόγο τα πειραματικά αποτελέσματα στις συγκεκριμένες συνθήκες δεν έχουν προστεθεί στη μελέτη. Οι λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό χρειάζονται περαιτέρω μελέτη.

4.2.13 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U

Προκειμένου να μελετήσουμε την αξιοπιστία του κινητικού μοντέλου των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP, έγινε μελέτη της απόκρισης του ενζυμικού δείκτη LP 100U σε εναλλασσόμενες χρονικά θερμοκρασιακές συνθήκες.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση θερμοκρασιακή κατανομή (var) που εξήχθη από το καταγραφικό θερμοκρασίας κατά τη διεξαγωγή του εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού πειράματος.



Σχήμα 4.41: Χρονοθερμοκρασιακό προφίλ ενζυμικού δείκτη LP 100U.

Σύμφωνα με το παραπάνω χρονοθερμοκρασιακό προφίλ και με τη χρήση της E_a για τον δείκτη LP 100U, υπολογίστηκε η τιμή της T_{eff} με χρήση του παρακάτω τύπου.

$$T_{eff} = \frac{E_a}{R} \frac{1}{\ln \left(\frac{\sum k_i t_i}{\sum t_i} \right)} \quad (4.4)$$

Ακόμη, υπολογίστηκαν οι προβλεπόμενες σταθερές τους ρυθμού απόκρισης $k_{1,pred}$ και $k_{2,pred}$ μέσω της σχέσης:

$$k_{pred} = k_{ref} \cdot e^{\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} \quad (4.5)$$

Όπου

- $T_{ref}=4^{\circ}\text{C}=277.15\text{K}$
- $R=8,314\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
- k_{ref1}, k_{ref2} τα κινητικά χαρακτηριστικά που υπολογίστηκαν παραπάνω.

Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό των ελάχιστων και μέγιστων τιμών των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη ($E_{a_{min}}$, $E_{a_{max}}$, $k_{1_{refmin}}$, $k_{2_{refmin}}$, $k_{1_{refmax}}$ και $k_{2_{refmax}}$) πραγματοποιήθηκε γραμμική παλινδρομική ανάλυση (Regression) για διάστημα εμπιστοσύνης 95% με χρήση του Excel, όπου εξαρτημένη μεταβλητή θεωρήθηκε η $\ln k$ και ανεξάρτητη η $(1/T)-(1/T_{ref})$. Με τη χρήση της εξίσωσης Arrhenius υπολογίστηκαν οι θεωρητικές τιμές των ρυθμών απόκρισης ($k_{1_{pred}}$, $k_{2_{pred}}$), καθώς και τα μέγιστα και ελάχιστα αυτών. Τέλος, προσδιορίστηκε η προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη ($norm(a+b)_{pred}$) αλλά και η ελάχιστη και μέγιστη τιμή της.

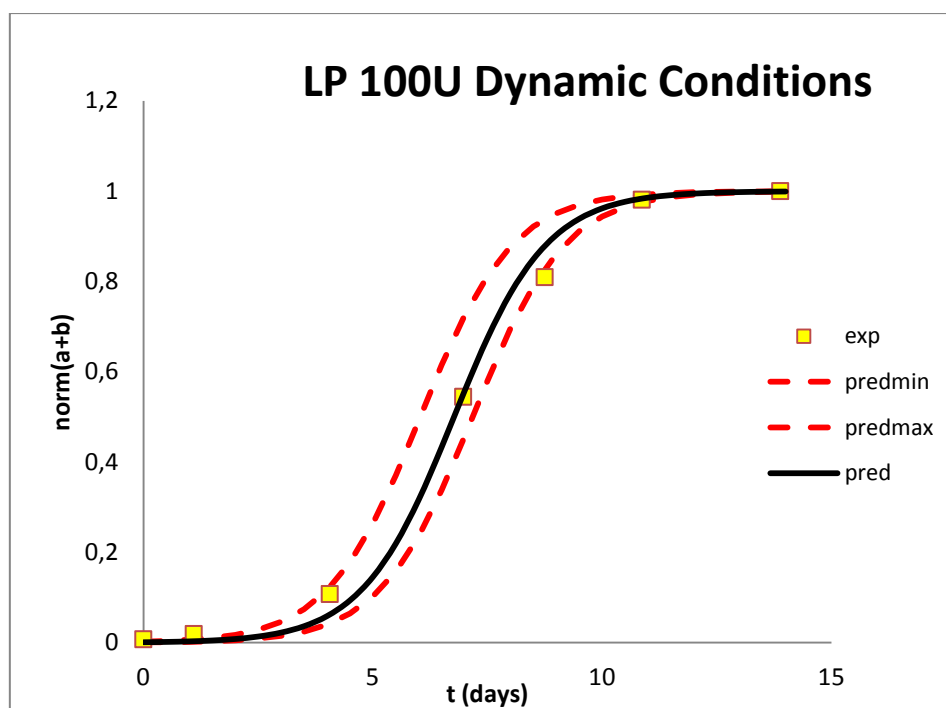
Με τη βοήθεια της σχέσης 4.4, η T_{eff} υπολογίστηκε ίση με $7,4^{\circ}C$. Στους παρακάτω πίνακες δίνονται οι πειραματικές και προβλεπόμενες σταθερές για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U καθώς και τα μέγιστα και τα ελάχιστα αυτών.

Πίνακας 4.26: Προβλεπόμενες και πειραματικές σταθερές του ρυθμού για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U.

$k_{1_{exp}} (d)$	$k_{2_{exp}} (d)$	$k_{1_{pred}} (d)$	$k_{2_{pred}} (d)$
6,467	1,619	7,499	2,078

Πίνακας 4.27: Μέγιστες και ελάχιστες προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U για διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

$k_{1_{predmin}} (d)$	$k_{1_{predmax}} (d)$	$k_{2_{predmin}} (d)$	$k_{2_{predmax}} (d)$
6,594	7,897	1,758	2,063

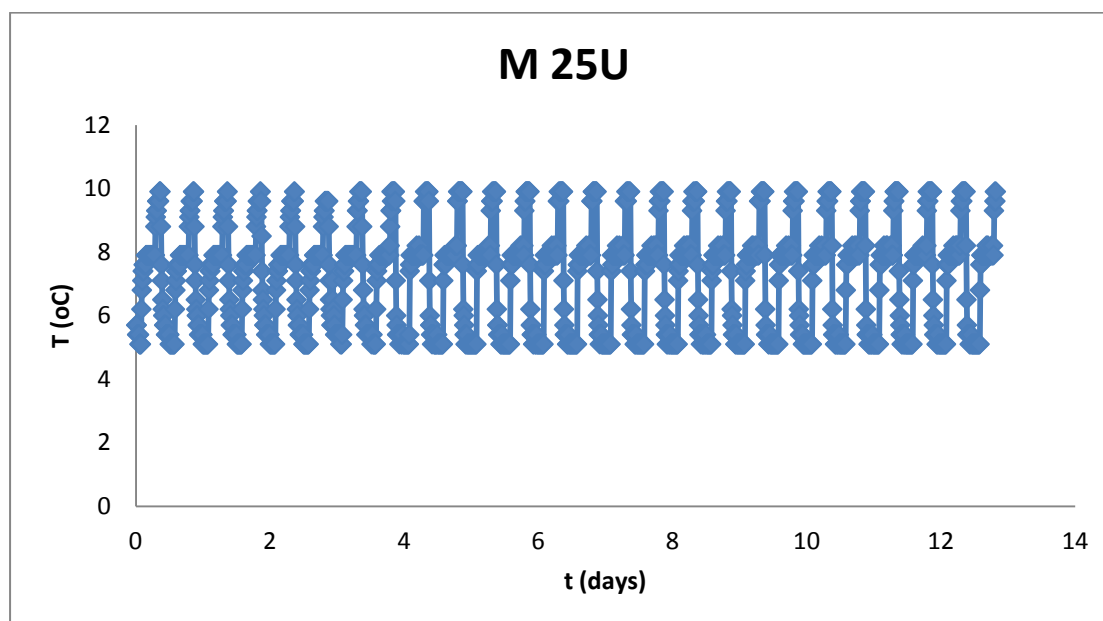


Σχήμα 4.42: Απόκριση του δείκτη LP 100U για το εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ

4.2.14 Πείραμα εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ για τον ενζυμικό δείκτη M 25U

Προκειμένου να μελετήσουμε την αξιοπιστία του κινητικού μοντέλου των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M, έγινε μελέτη της απόκρισης του ενζυμικού δείκτη M 25U σε εναλλασσόμενες χρονικά θερμοκρασιακές συνθήκες.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση θερμοκρασιακή κατανομή (\bar{T}) που εξήχθη από το καταγραφικό θερμοκρασίας κατά τη διεξαγωγή του εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού πειράματος.



Σχήμα 4.43: Χρονοθερμοκρασιακό προφίλ ενζυμικού δείκτη M 25U.

Όμοια με την διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον δείκτη LP 100U, με βάση το παραπάνω χρονοθερμοκρασιακό προφίλ και με τη χρήση της E_a για τον δείκτη M 25U, υπολογίστηκε η τιμή της T_{eff} καθώς και οι προβλεπόμενες σταθερές τους ρυθμού απόκρισης k_{1pred} και k_{2pred} .

Στη συνέχεια, για τον υπολογισμό των ελάχιστων και μέγιστων τιμών των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη ($E_{a_{min}}$, $E_{a_{max}}$, $k_{1refmin}$, $k_{2refmin}$, $k_{1refmax}$ και $k_{2refmax}$) πραγματοποιήθηκε γραμμική παλινδρομική ανάλυση (Regression) για διάστημα εμπιστοσύνης 95% με χρήση του Excel, όπου εξαρτημένη μεταβλητή θεωρήθηκε η $\ln k$ και ανεξάρτητη η $(1/T)-(1/T_{ref})$. Με τη χρήση της εξίσωσης Arrhenius υπολογίστηκαν οι θεωρητικές τιμές των ρυθμών απόκρισης (k_{1pred} , k_{2pred}), καθώς και τα μέγιστα και ελάχιστα αυτών. Τέλος, προσδιορίστηκε η προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη ($norm(a+b)_{pred}$) αλλά και η ελάχιστη και μέγιστη τιμή της.

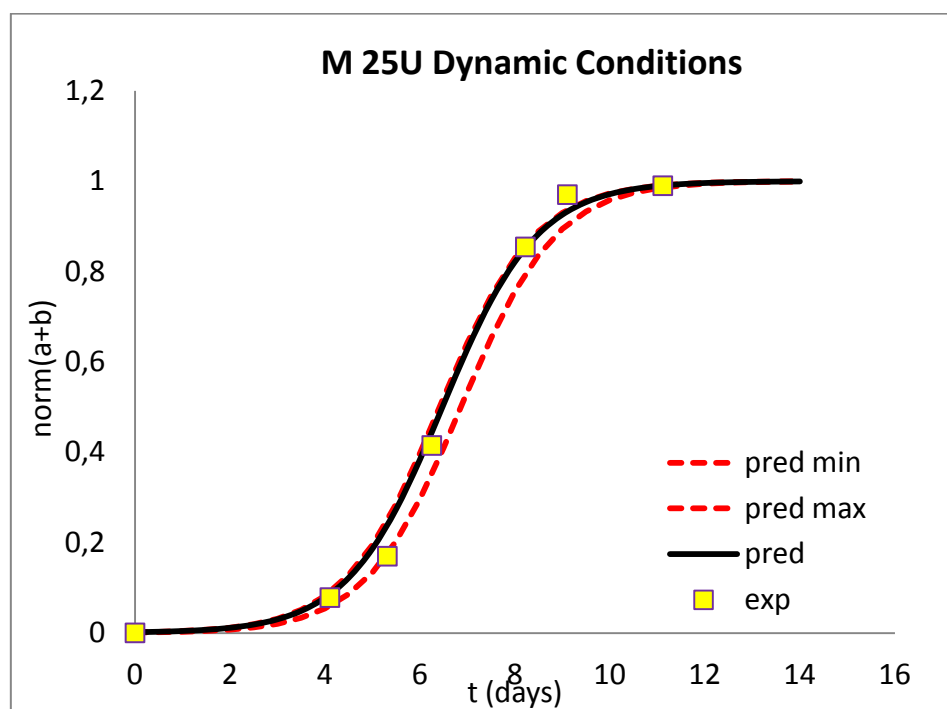
Η T_{eff} υπολογίστηκε ίση με $7,4^{\circ}\text{C}$. Στους παρακάτω πίνακες δίνονται οι πειραματικές και προβλεπόμενες σταθερές για τον ενζυμικό δείκτη M 25U καθώς και τα μέγιστα και τα ελάχιστα αυτών.

Πίνακας 4.28: Προβλεπόμενες και πειραματικές σταθερές του ρυθμού για τον ενζυμικό δείκτη M 25U.

$k_{1\text{exp}} \text{ (d)}$	$k_{2\text{exp}} \text{ (d)}$	$k_{1\text{pred}} \text{ (d)}$	$k_{2\text{pred}} \text{ (d)}$
5,332	0,899	6,551	1,082

Πίνακας 4.29: Μέγιστες και ελάχιστες προβλεπόμενες σταθερές του ρυθμού για τον ενζυμικό δείκτη M 25U για διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

$k_{1\text{predmin}} \text{ (d)}$	$k_{1\text{predmax}} \text{ (d)}$	$k_{2\text{predmin}} \text{ (d)}$	$k_{2\text{predmax}} \text{ (d)}$
6,222	6,898	0,824	1,035



Σχήμα 4.44: Απόκριση του δείκτη M 25U για το εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ.

4.3 Διάρκεια ζωής των ΤΤΙ

Εκτός από τα κινητικά χαρακτηριστικά των ενζυμικών δεικτών, υπολογίστηκε και η διάρκεια ζωής αυτών. Το τελικό σημείο (όριο λήξης) των ενζυμικών ΤΤΙ αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης σε τιμή απόκρισης $X = \ln(m(a+b)) = 0,8$. Η τιμή αυτή προσδιορίστηκε από οπτικό έλεγχο των δεικτών που μελετήθηκαν.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται αναλυτικά οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης (διάρκεια ζωής) των ΤΤΙ στις θερμοκρασίες που διεξήχθησαν τα πειράματα. Οι χρόνοι αυτοί δίνονται σε μέρες.

Πίνακας 4.30: Πειραματική διάρκεια ζωής (response time) σε μέρες, των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP σε θερμοκρασίες 0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C και 25°C.

T (°C)	100U	150U	300U	500U
0	50,7	36,7	15,5	9,51
2,5	30,6	17,8	8,46	4,89
5	18,5	12,5	5,81	3,04
10	6,40	3,80	1,72	0,815
15	1,74	1,36	0,603	0,364
20	0,636	0,584	0,195	0,154
25	0,210	0,173	0,0902	0,061

Πίνακας 4.31: Πειραματική διάρκεια ζωής (response time) σε μέρες, των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M σε θερμοκρασίες 0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C και 15°C.

T(°C)	5U	10U	15U	20U	25U	50U	75U	100U
0	93,2	45,0	30,31	25,7	21,2	11,3	7,89	6,19
2,5	62,4	30,4	21,4	16,0	14,3	8,07	5,90	4,01
5	43,7	22,10	16,1	12,7	10,3	5,76	3,83	2,78
10	20,5	12,6	7,62	8,61	6,27	3,05	2,05	1,73
15	11,8	6,53	3,99	3,41	2,73	1,48	0,835	0,762

Με βάση τους παραπάνω πίνακες παρατηρούμε ότι τόσο με αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου όσο και με αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία υποβάλλεται ο δείκτης, τόσο συντομότερος είναι ο χρόνος λήξης του. Αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι με αύξηση της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας γίνεται ταχύτερα η αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος.

4.4 Προσδιορισμός συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ

Από το σύνολο των κινητικών χαρακτηριστικών των ενζυμικών ΤΤΙ προσδιορίστηκε ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο για κάθε τύπο (LP και M). Το μοντέλο αυτό περιγράφεται από την παρακάτω δοθείσα εξίσωση, η οποία προέκυψε έπειτα από αντικατάσταση της σχέσης Arrhenius στη συνάρτηση απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ και περιγράφει την απόκριση των ενζυμικών ΤΤΙ συναρτήσει του χρόνου (days), της θερμοκρασίας (K) και της συγκέντρωσης του ενζύμου των δεικτών (units).

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \frac{k_{1ref} (C=1) C^{-a} \exp \left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] - t}{k_{2ref} (C=1) C^{-b} \exp \left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right]}} \quad (4.6)$$

Για να υπολογιστούν οι παράμετροι της εξίσωσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SYSTAT 10.2 και η μέθοδος της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας αυτής παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Παράμετροι συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης ΤΤΙ τύπου LP

Πίνακας 4.32: Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP.

k_{1ref} (C=1U) (d)	2117,7
a	1,074
E_A (kJ/mol)	141,9
k_{2ref}(C=1U) (d)	522
b	1,033
R²	0,972

Παράμετροι συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης ΤΤΙ τύπου M

Πίνακας 4.33: Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M.

k_{1ref} (C=1U)(d)	162,0
a	0,877
E_A (kJ/mol)	86,8
k_{2ref}(C=1U)(d)	31,646
b	0,913
R²	0,961

4.5 Μελέτη αξιοπιστίας των μαθηματικών μοντέλων - στατιστική επεξεργασία

Για τη σύγκριση μεταξύ των πειραματικών και των θεωρητικών χρόνων των ΤΤΙ που μελετήθηκαν για κάθε συγκέντρωση, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα συσχέτισής τους. Οι πειραματικές με τις θεωρητικές τιμές έχουν μικρή απόκλιση αν η κλίση της γραμμής τάσης που εφαρμόζουμε είναι πολύ κοντά στη μονάδα. Όταν η κλίση είναι ίση με 1, τότε υπάρχει τέλεια συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και των θεωρητικών χρόνων ζωής.

Οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής για τους ενζυμικούς δείκτες τύπου LP και M αντίστοιχα, δίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 4.34: Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών δεικτών τύπου LP.

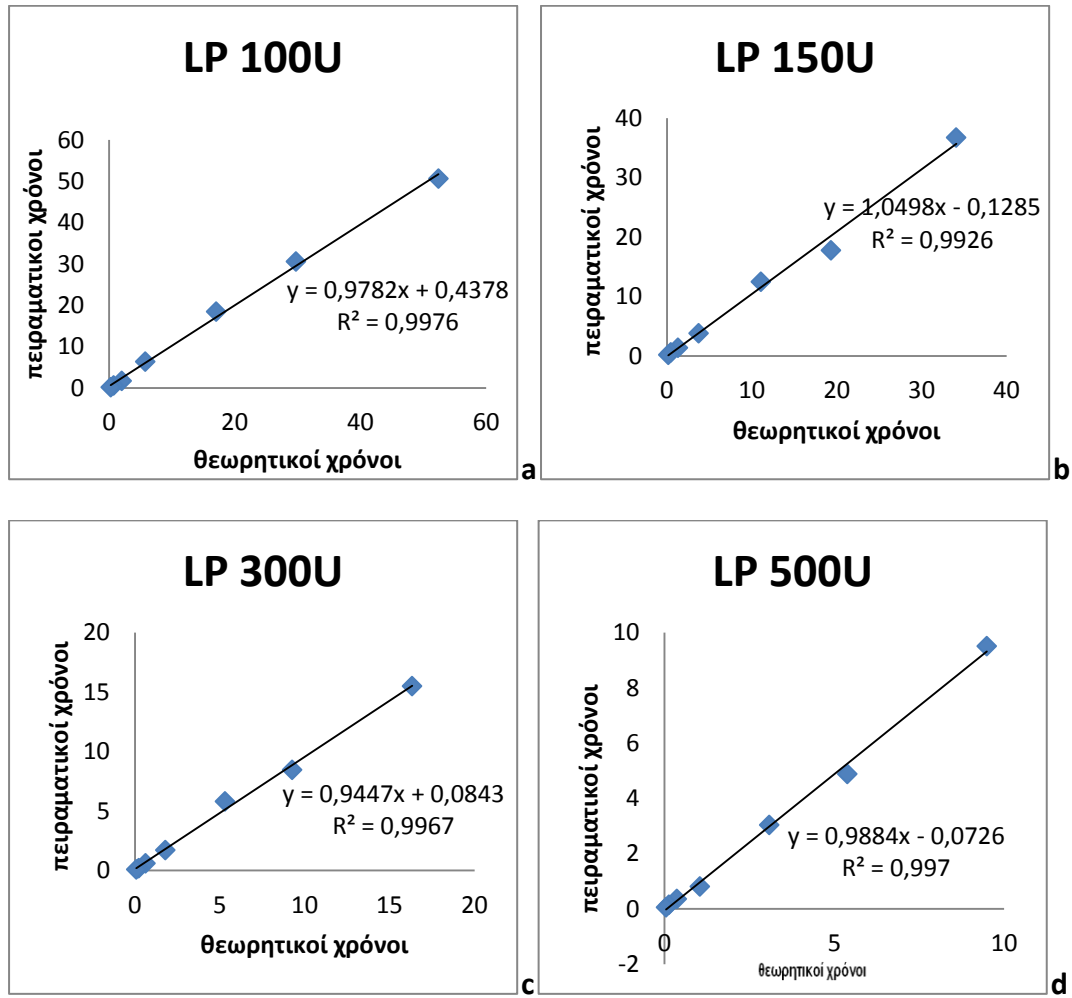
T(°C)/ C(units)	0	2,5	5	10	15	20	25
100	52,4	29,8	17,1	5,77	2,03	0,739	0,278
150	34,1	19,3	11,1	3,75	1,32	0,480	0,181
300	16,3	9,27	5,31	1,80	0,632	0,230	0,087
500	9,50	5,39	3,09	1,05	0,367	0,134	0,050

Πίνακας 4.35: Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών δεικτών τύπου M.

T(°C)/ C(units)	0	2,5	5	10	15
5	86,1	60,9	43,3	22,3	11,8
10	46,6	33,0	23,5	12,1	6,38
15	32,6	23,0	16,4	8,45	4,46
20	25,3	17,9	12,7	6,55	3,46
25	20,7	14,7	10,4	5,38	2,84
50	11,2	7,95	5,65	2,91	1,54
75	7,85	5,55	3,95	2,04	1,07
100	6,09	4,31	3,06	1,58	0,833

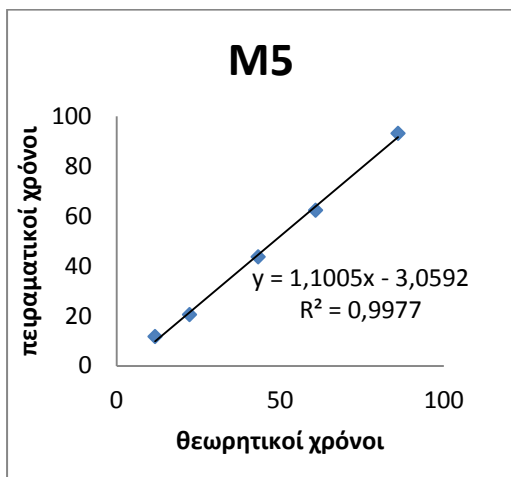
Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα σύγκρισης των θεωρητικών και των πειραματικών χρόνων ζωής των ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών.

LP ΤΤΙ

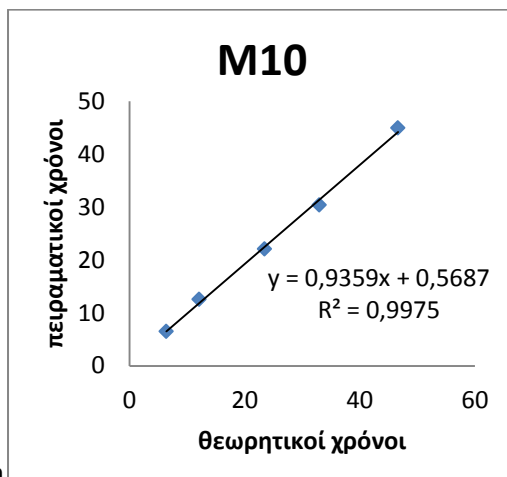


Σχήμα 4.45(a-d): Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τους ενζυμικούς δείκτες LP.

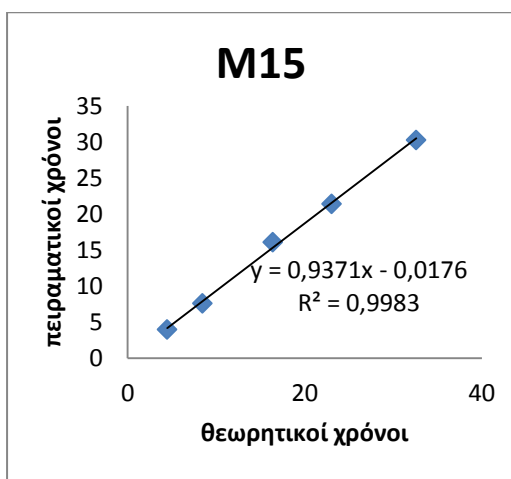
Μ ΤΤΙ



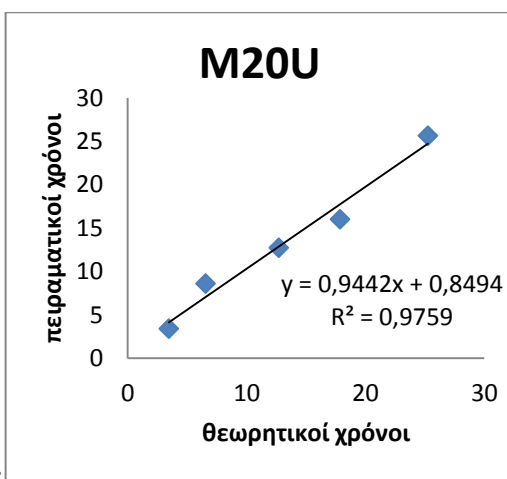
a



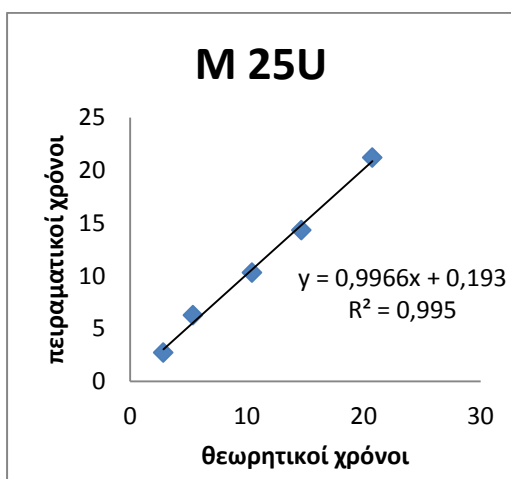
b



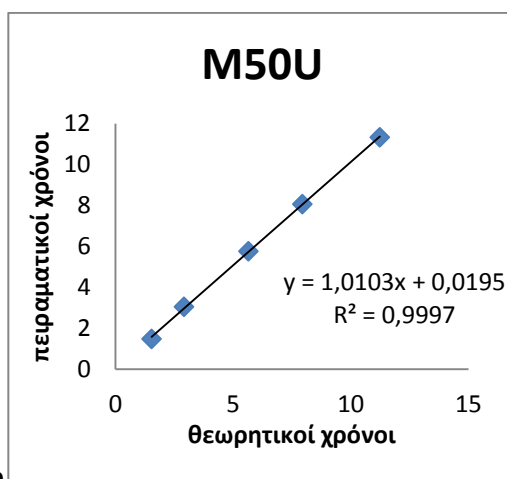
c



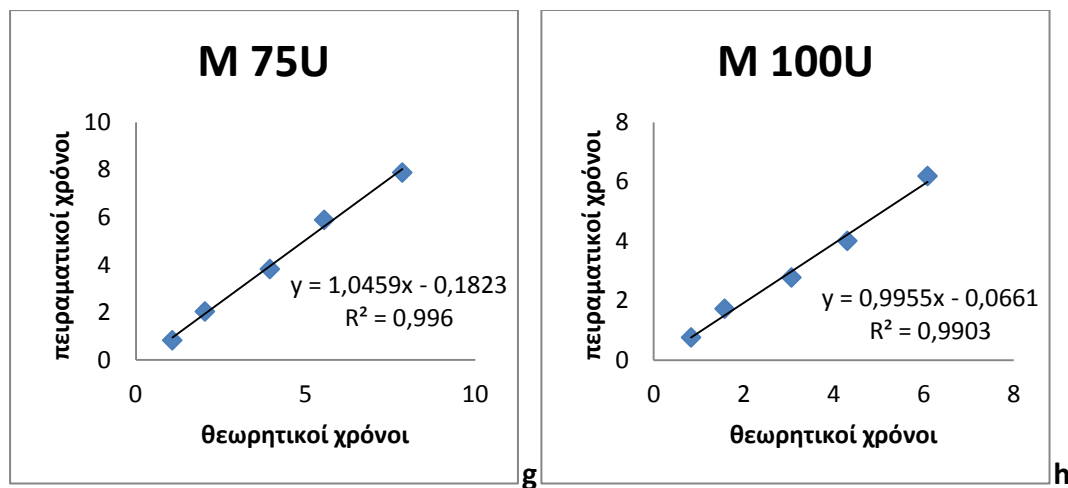
d



e



f



Σχήμα 4.46(a-h): Συσχέτιση πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής για τους ενζυμικούς δείκτες M.

Στους παρακάτω πίνακες δίνονται συγκεντρωτικά οι τιμές της κλίσης των ευθειών συσχέτισης.

Πίνακας 4.36: Κλίση ευθειών συσχετισμού θεωρητικών και πειραματικών χρόνων για τους δείκτες ΤΤΙ τύπου LP.

C (Units)	κλίση ευθείας
100	0,978
150	1,050
300	0,945
500	0,988

Πίνακας 4.37: Κλίση ευθειών συσχετισμού θεωρητικών και πειραματικών χρόνων για τους δείκτες ΤΤΙ τύπου M.

C (Units)	κλίση ευθείας
5	1,101
10	0,936
15	0,937
20	0,944
25	0,997
50	1,010
75	1,046
100	0,996

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι οι κλίσεις των διαγραμμάτων συσχετισμού πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής των δεικτών έχουν τιμές πολύ κοντά στη μονάδα. Επομένως οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP και M έχουν ελάχιστη απόκλιση από τους χρόνους απόκρισης που πρόεκυψαν από τα κινητικά μοντέλα.

5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΕ ΙΧΘΥΗΡΑ

5.1 Εισαγωγή

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, μετρήθηκε το μικροβιακό φορτίο κέφαλου και τόνου τόσο σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (0, 2,5, 5, 10 και 15°C για τον κέφαλο, και 0, 5, 10°C για τον τόνο) όσο και σε δυναμικές συνθήκες (θερμοκρασίες από 5 μέχρι 10°C για τον κέφαλο).

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε δυναμικές συνθήκες είχε ως στόχο την επιβεβαίωση του μοντέλου που προέκυψε από τα ισοθερμοκρασιακά πειράματα.

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

Κατά τη διάρκεια των συγκεκριμένων πειραμάτων στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν:

- Μέτρηση του μικροβιακού φορτίου.
- Μέτρηση pH.
- Οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων.
- Μοντελοποίηση της ανάπτυξης του *Morganella morganii* και της παραγωγής ισταμίνης στον κέφαλο.

Για την αλλοίωση των ιχθύων, μετρήθηκαν:

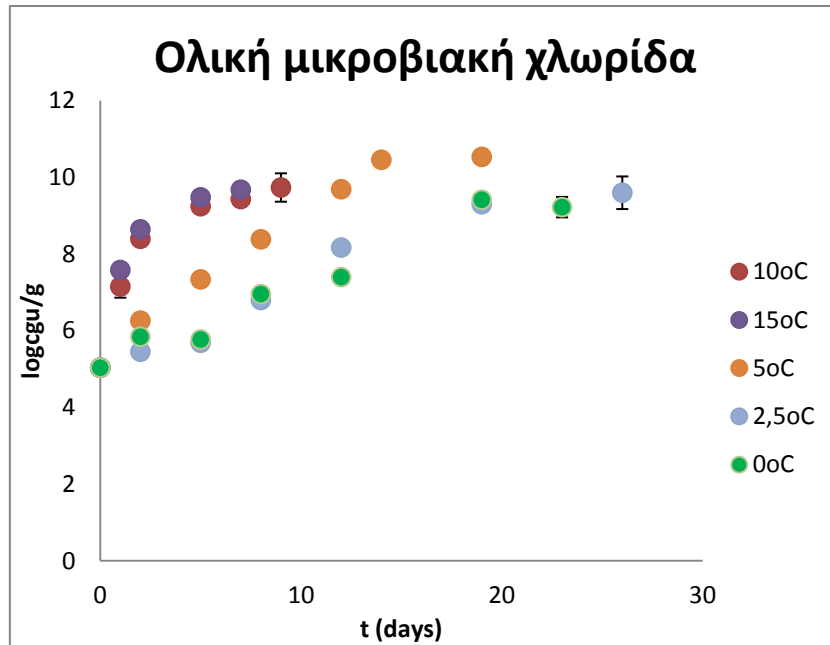
- Η ολική μικροβιακή χλωρίδα
- Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων.
- Ο πληθυσμός εντεροβακτηρίων.

5.2 Επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στην ποιότητα και τη διάρκεια ζωής ιχθύων

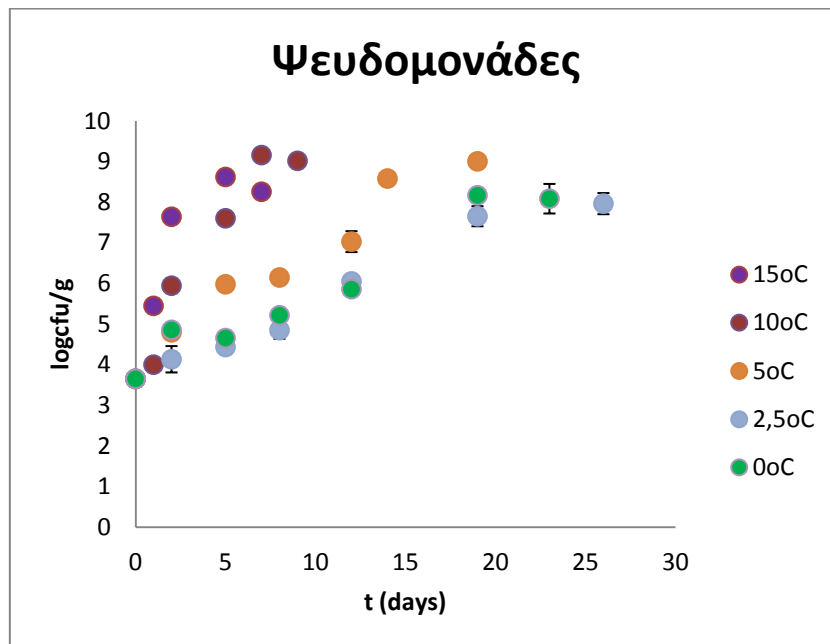
5.2.1 Μικροβιολογική ανάπτυξη ιχθύων

Στα παρακάτω διαγράμματα εμφανίζονται οι μετρήσεις της ολικής μικροβιακής χλωρίδας όσο και των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηρίων αρχικά για τον κέφαλο και στη συνέχεια για τον τόνο.

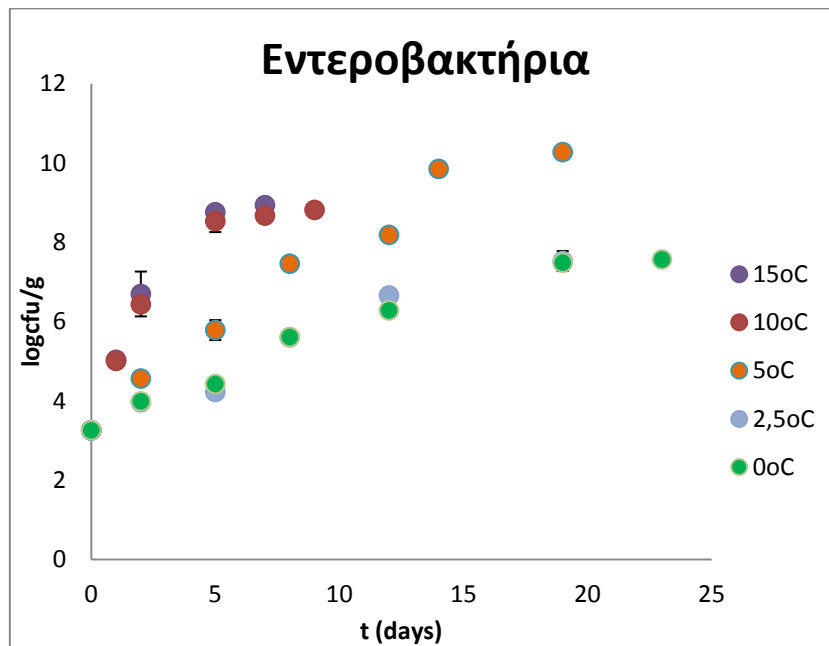
Για τον κέφαλο



Σχήμα 5.1: Εξέλιξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα κέφαλου.

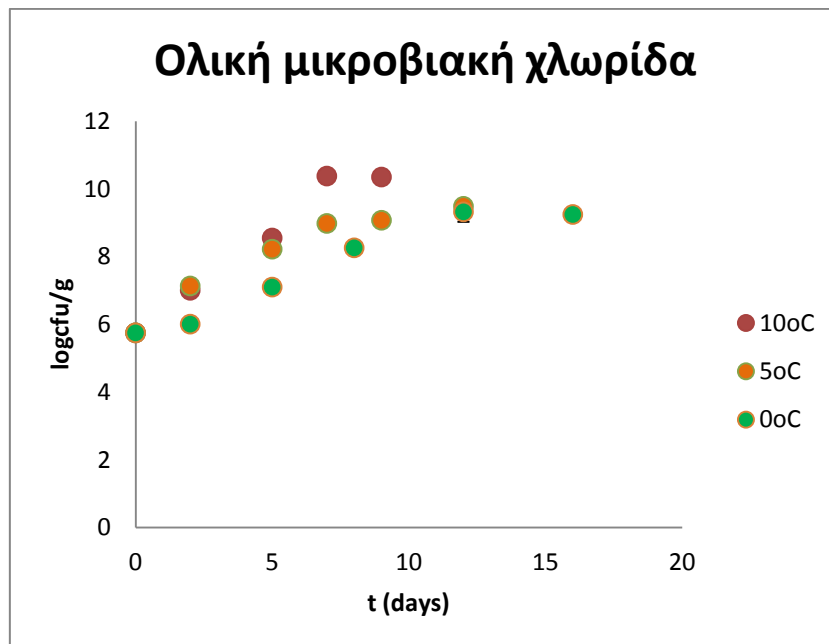


Σχήμα 5.2: Εξέλιξη των ψευδομονάδων σε δείγματα κέφαλου.

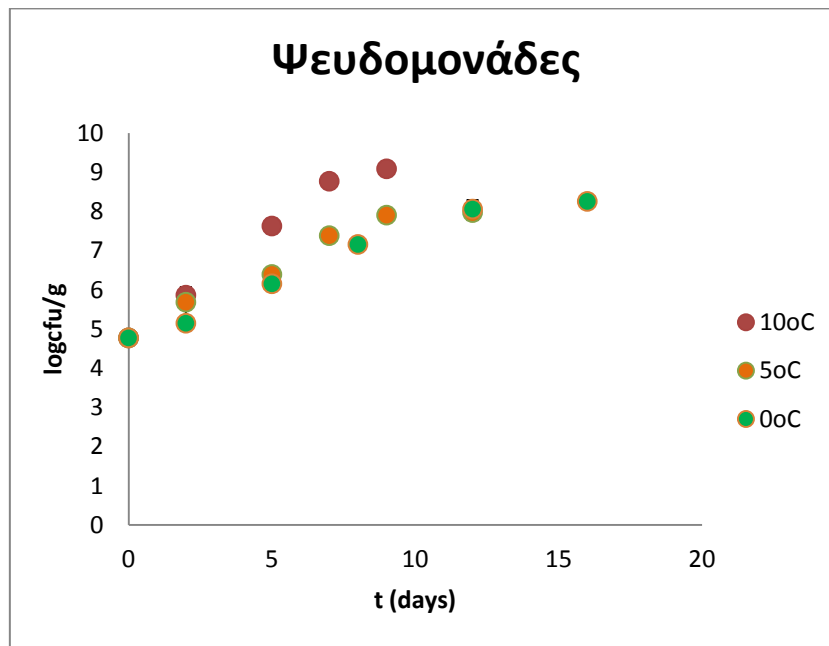


Σχήμα 5.3: Εξέλιξη των εντεροβακτηρίων σε δείγματα κέφαλου.

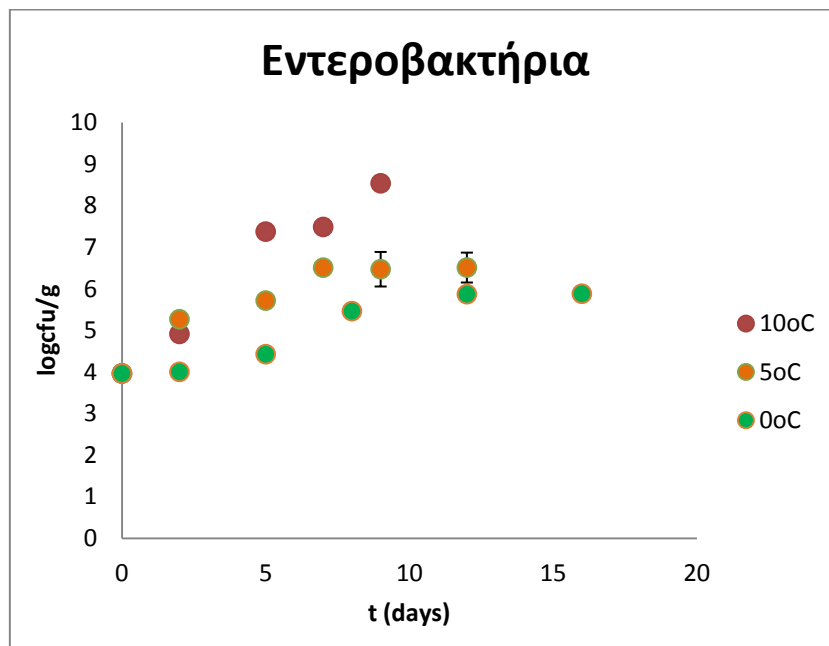
Για τον τόνο



Σχήμα 5.4: Εξέλιξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα τόνου



Σχήμα 5.5: Εξέλιξη των ψευδομονάδων σε δείγματα τόνου.



Σχήμα 5.6: Εξέλιξη των εντεροβακτηρίων σε δείγματα τόνου

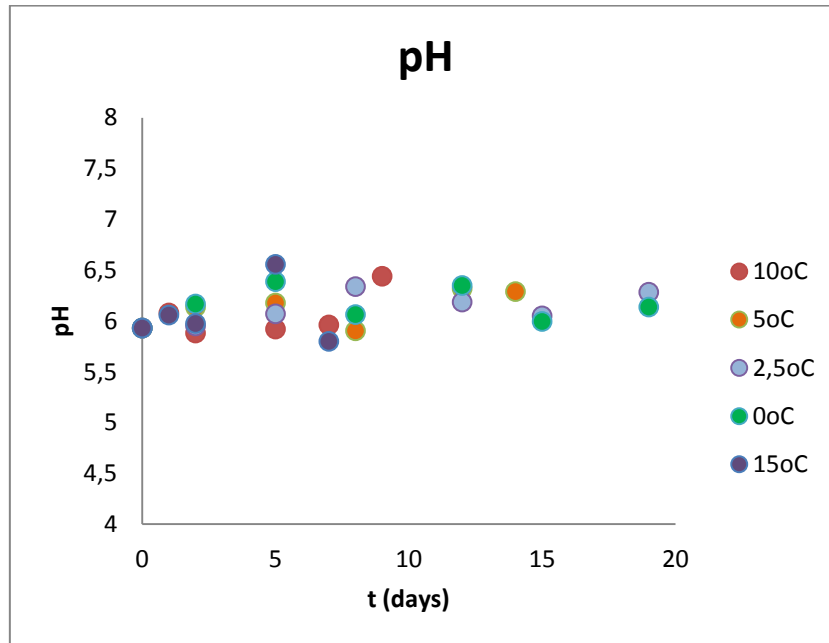
Παρατηρούμε ότι τόσο στα δείγματα τόνου όσο και στοu κέφαλου η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε επιτάχυνση της μικροβιακής ανάπτυξης.

5.2.2 Μέτρηση pH

Στα παρακάτω διαγράμματα δίνεται η μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου και για τα δύο ψάρια. Ο παράγοντας του pH είναι πολύ σημαντικός στη μικροβιολογική μελέτη των ψαριών καθώς συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη μικροοργανισμών λόγω των μεταβολικών ουσιών που παράγονται κατά την ανάπτυξη τους. Πιο

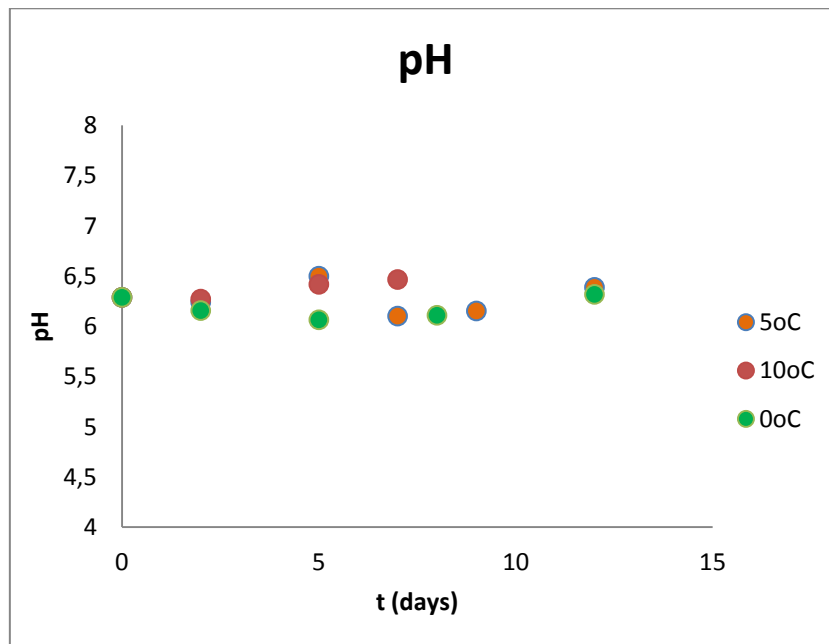
συγκεκριμένα οι *Pseudomonas sp.* παράγουν κυρίως αλκαλικά προϊόντα, σε αντίθεση με τα εντεροβακτήρια που παράγουν κυρίως οξέα.

Για τον κέφαλο



Σχήμα 5.7: Χρονοθερμοκρασιακή πορεία του pH σε δείγματα κέφαλου.

Για τον τόνο



Σχήμα 5.7: Χρονοθερμοκρασιακή πορεία του pH σε δείγματα τόνου.

Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του κέφαλου, το pH κυμαίνεται από 5,7 μέχρι 6,4 ενώ στην περίπτωση του τόνου από 6 μέχρι 6,5. Οι μεταβολές που παρατηρούνται

κατά τη συντήρηση των δειγμάτων δεν παρουσιάζουν συσχέτιση με το χρόνο και τη θερμοκρασία συντήρησης.

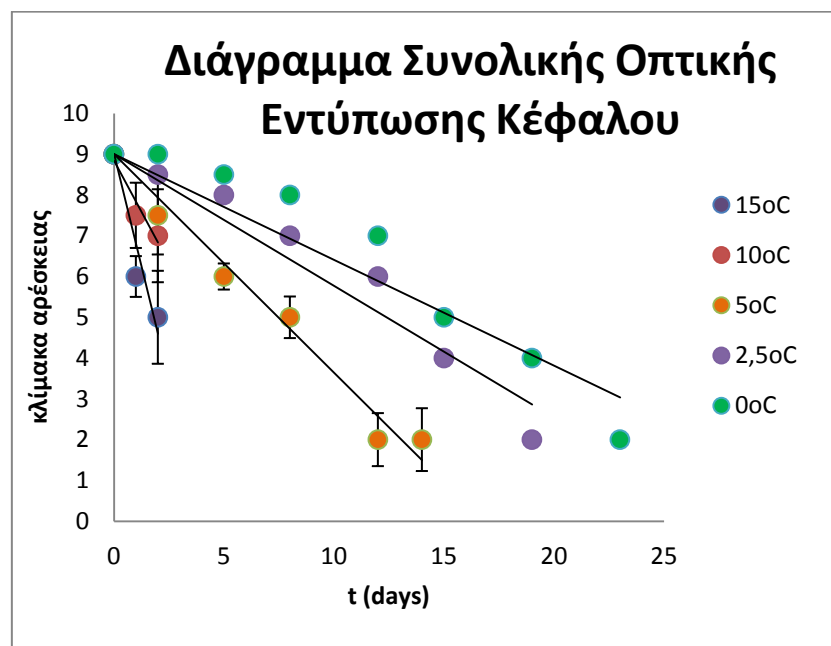
5.2.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση δειγμάτων κέφαλου και τόνου

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων ως προς τη συνολική οπτική εντύπωση, το χρώμα, το άρωμα, τη φρεσκότητα και τη συνολική γενική εντύπωση από πέντε δοκιμαστές. Η κλίμακα ορίστηκε από 1 έως 9, όπου 9 ορίζεται το πολύ καλό (φρέσκο) ψάρι και 1 το ψάρι με εμφανείς αλλοιώσεις. Ως όριο αποδοχής θεωρούμε το 5 για τη συνολική εντύπωση.

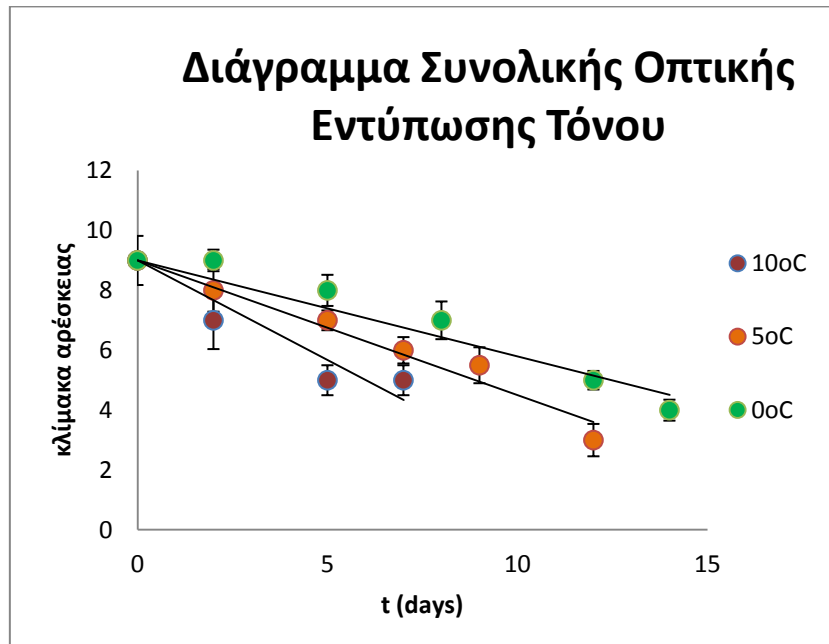
Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα των οργανοληπτικών αποτελεσμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα οποία έχει εφαρμοστεί γραμμική γραμμή τάσης.

- Συνολική Οπτική Εντύπωση

Η συνολική οπτική εντύπωση είναι το πρώτο από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αντιλαμβάνεται ο δοκιμαστής ή ο καταναλωτής και είναι ιδιαίτερα σημαντικό κριτήριο για την αξιολόγηση του τροφίμου.



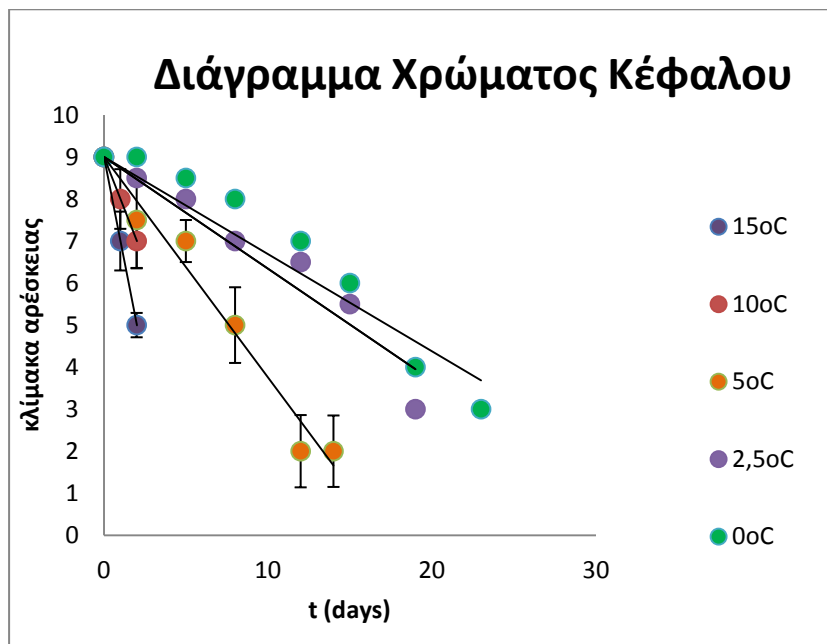
Σχήμα 5.8: Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής οπτικής εντύπωσης κέφαλου.



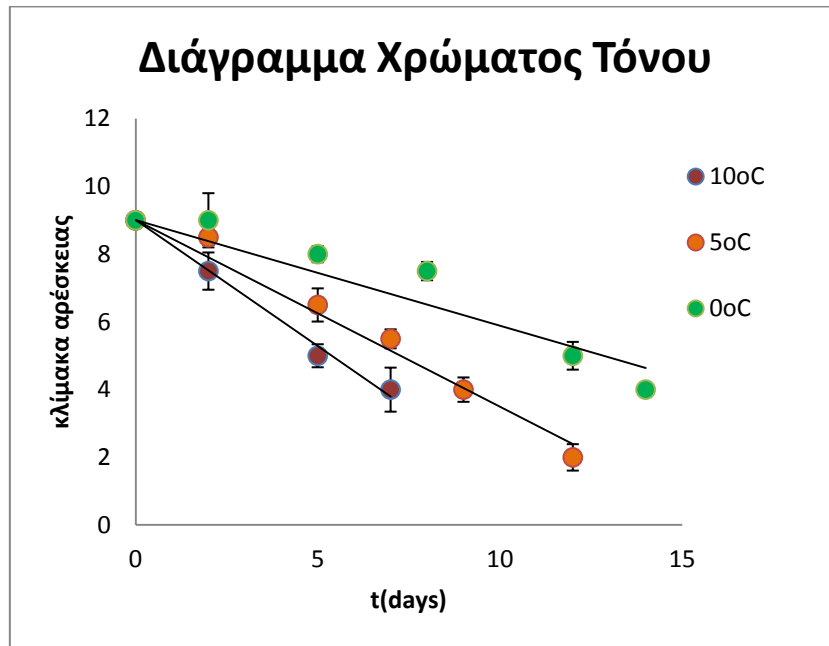
Σχήμα 5.9: Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής οπτικής εντύπωσης τόνου.

- Χρώμα

Το χρώμα είναι το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της εμφάνισης των τροφίμων. Το χρώμα είναι συνήθως το πρώτο χαρακτηριστικό που αντιλαμβάνεται κανείς και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή ή την αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων.

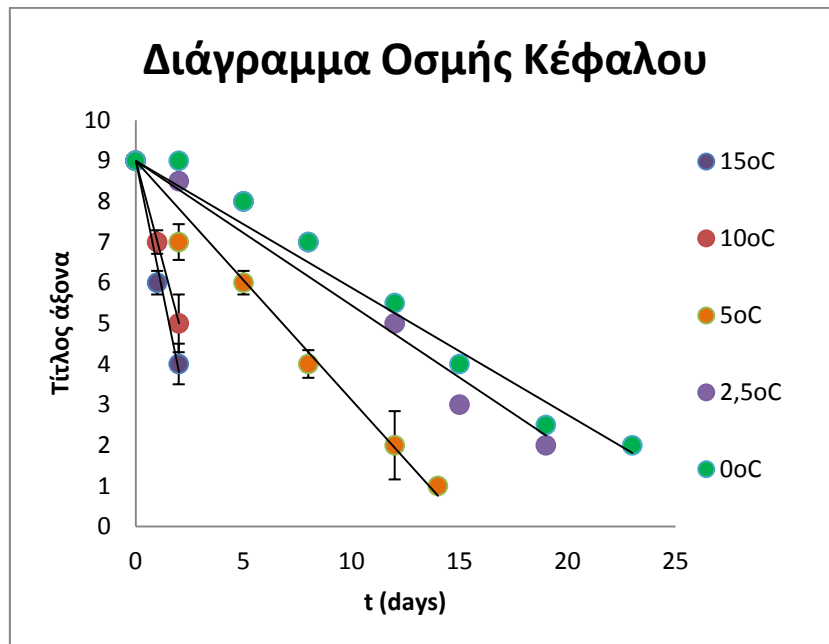


Σχήμα 5.10: Διάγραμμα βαθμολόγησης χρώματος κέφαλου.

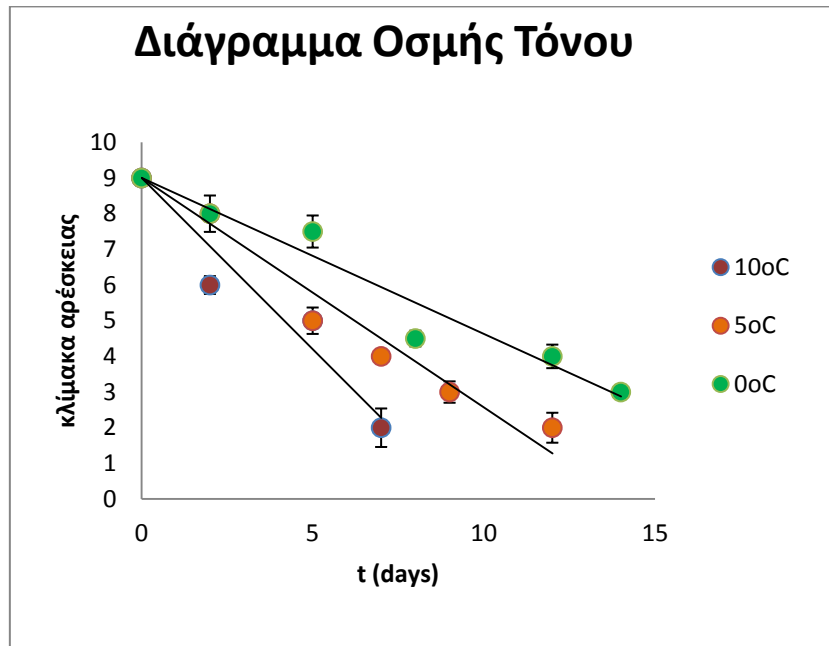


Σχήμα 5.11: Διάγραμμα βαθμολόγησης χρώματος τόνου.

- Οσμή

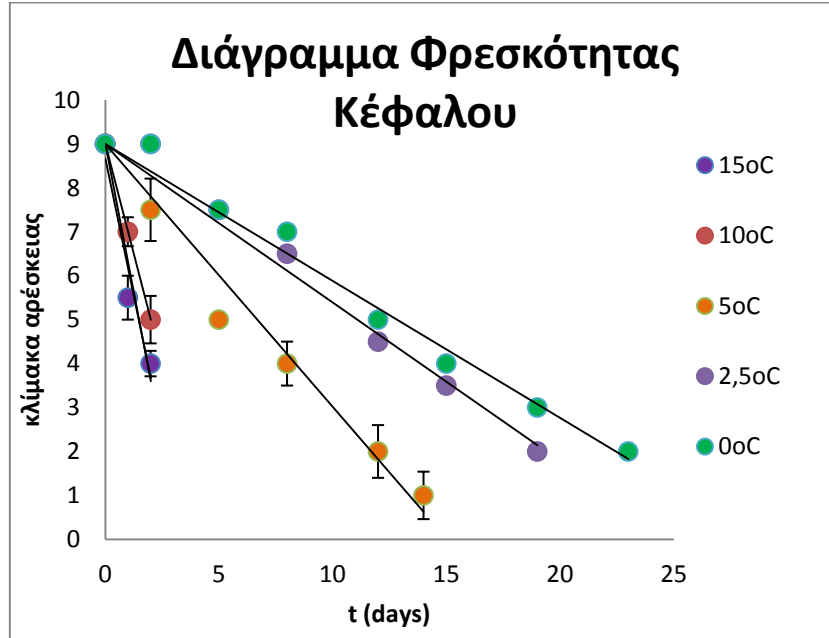


Σχήμα 5.12: Διάγραμμα βαθμολόγησης αρώματος κέφαλου.

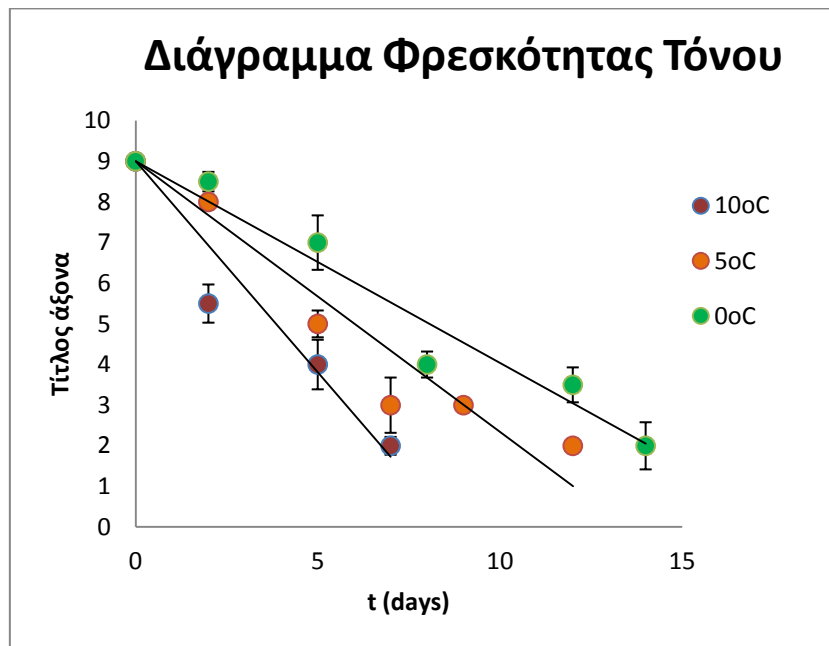


Σχήμα 5.13: Διάγραμμα βαθμολόγησης αρώματος τόνου.

- Φρεσκότητα



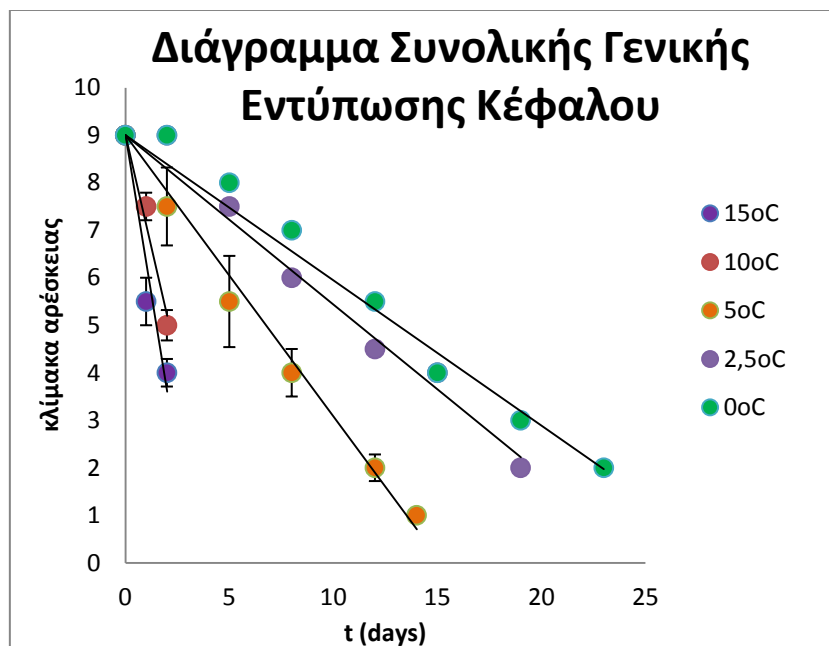
Σχήμα 5.14: Διάγραμμα βαθμολόγησης φρεσκότητας κέφαλου.



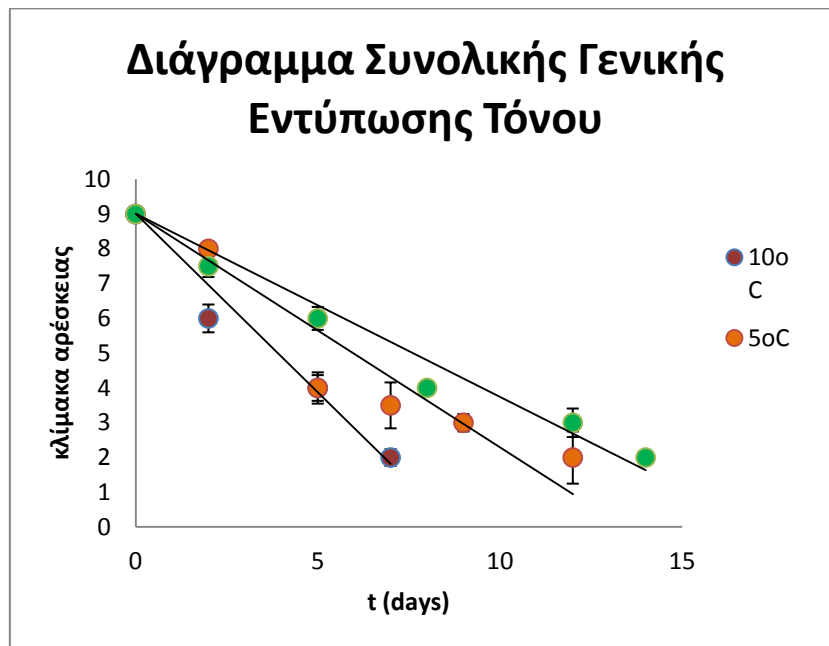
Σχήμα 5.15: Διάγραμμα βαθμολόγησης φρεσκότητας τόνου.

- Συνολική γενική εντύπωση

Η συνολική εντύπωση εκφράζει τον συνδυασμό των παραπάνω οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και το βαθμό αποδεκτότητας του τροφίμου.



Σχήμα 5.16: Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής γενικής εντύπωσης κέφαλου.



Σχήμα 5.17: Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής γενικής εντύπωσης τόνου.

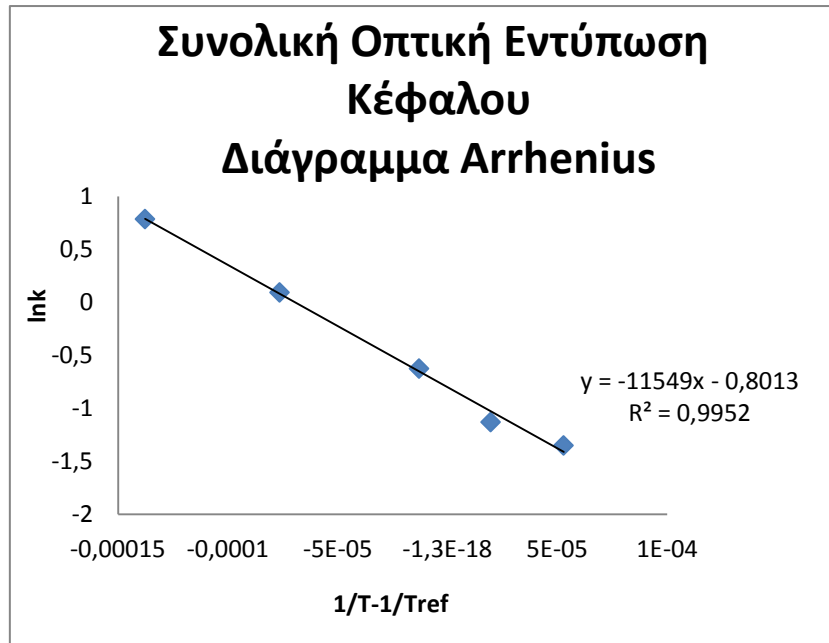
Από τα παραπάνω διαγράμματα είναι φανερό ότι ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων έχει σημαντική επίδραση στην αρέσκεια των δοκιμαστών ($p < 0,05$) ως προς όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων που εξετάστηκαν στις μελετώμενες θερμοκρασίες αποθήκευσης.

Φαίνεται επίσης ότι και για τα δύο μελετώμενα είδη ψαριού, ο ρυθμός υποβάθμισης της οργανοληπτικής ποιότητας ήταν σημαντικά υψηλότερος στις υψηλές θερμοκρασίες (10 και 15°C) απ' ό τι στις χαμηλότερες.

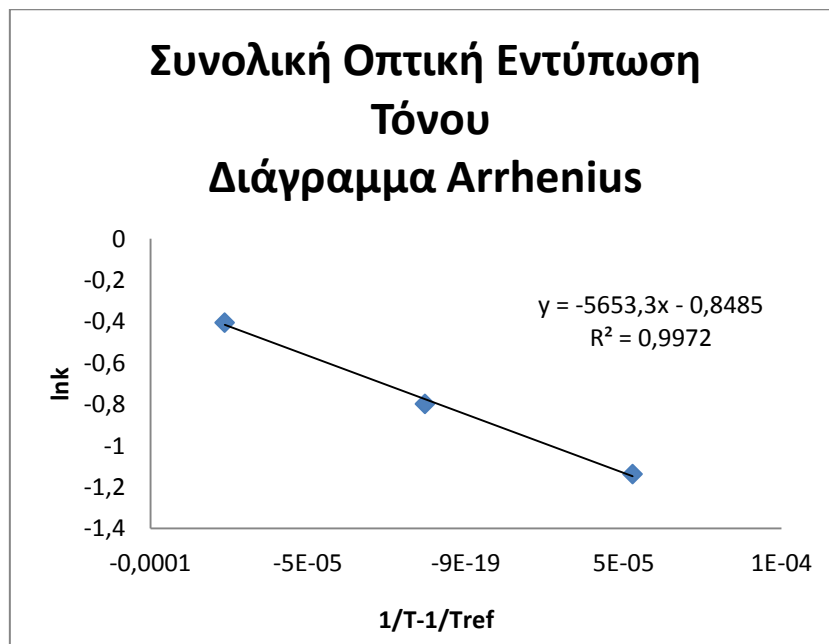
Με βάση το διάγραμμα της συνολικής γενικής εντύπωσης, παρατηρούμε ότι ο χρόνος που τα δείγματα ήταν αποδεκτά από τους καταναλωτές στις υψηλότερες θερμοκρασίες ήταν μικρότερος από 5 μέρες, ενώ στις πιο χαμηλές στην περίπτωση του κέφαλου ξεπερνάει τις 10 (0, 2,5°C) και του τόνου τις 7 (0°C).

Εν συνεχεία, εφαρμόζεται η εξίσωση Arrhenius για τους ρυθμούς μεταβολής της βαθμολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν, προκειμένου να εκφραστεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην οργανοληπτική ποιότητα των μελετούμενων προϊόντων.

Συνολική Οπτική Εντύπωση

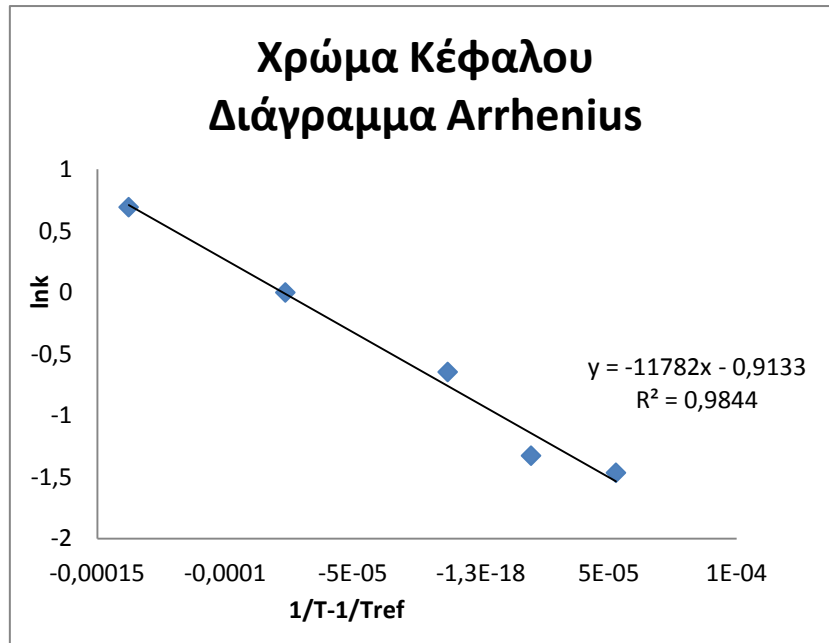


Σχήμα 5.18: Διάγραμμα Arrhenius συνολικής οπτικής εντύπωσης κέφαλου.

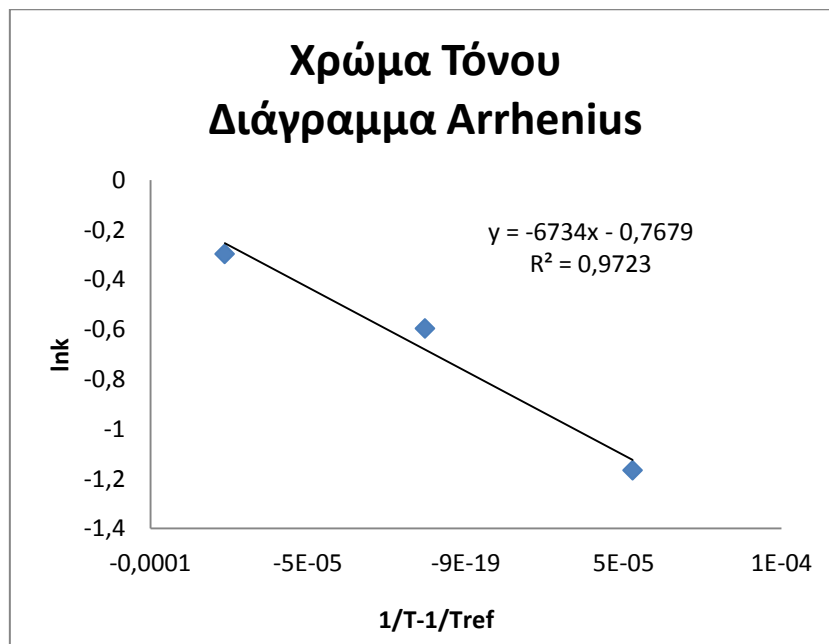


Σχήμα 5.19: Διάγραμμα Arrhenius συνολικής οπτικής εντύπωσης τόνου.

Χρώμα

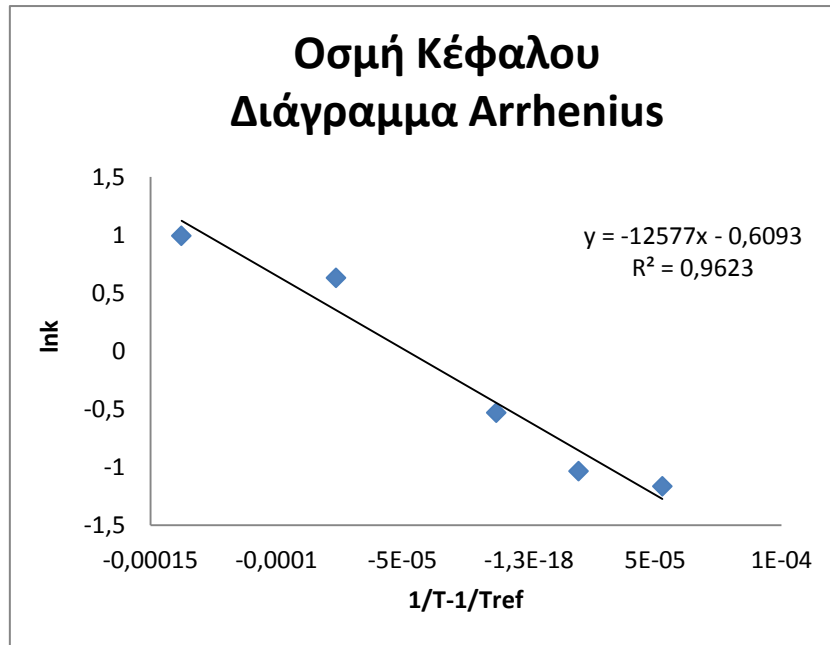


Σχήμα 5.20: Διάγραμμα Arrhenius χρώματος κέφαλου.

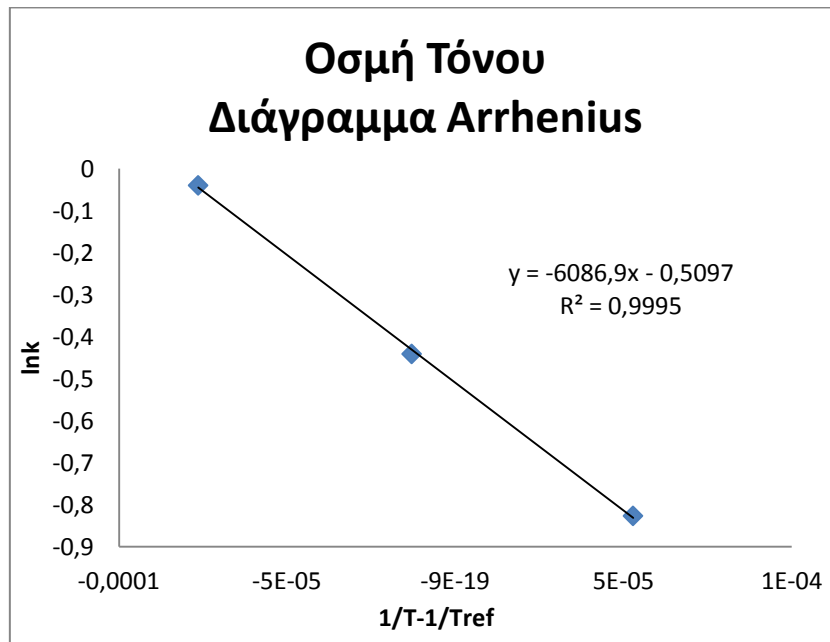


Σχήμα 5.21: Διάγραμμα Arrhenius χρώματος τόνου.

Οσμή

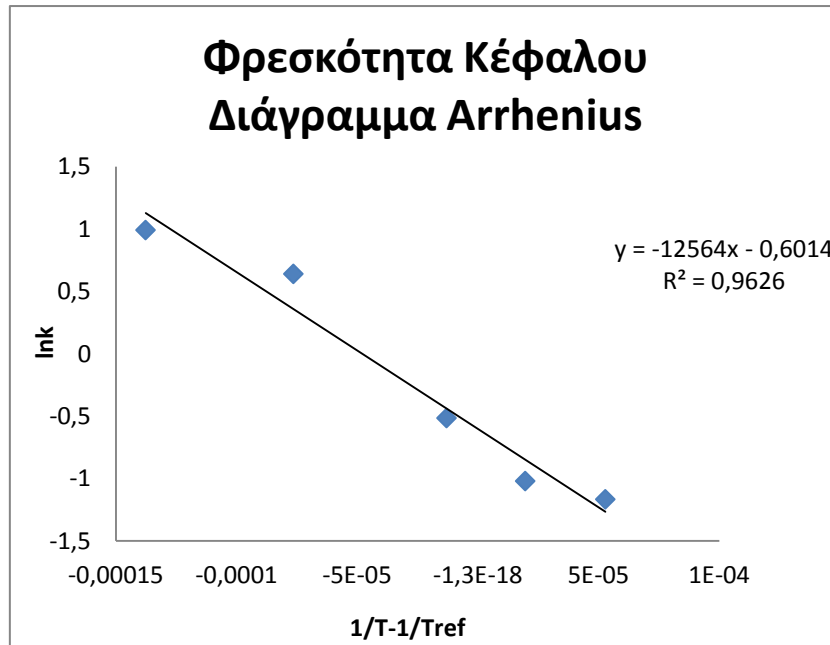


Σχήμα 5.22: Διάγραμμα Arrhenius οσμής κέφαλου.

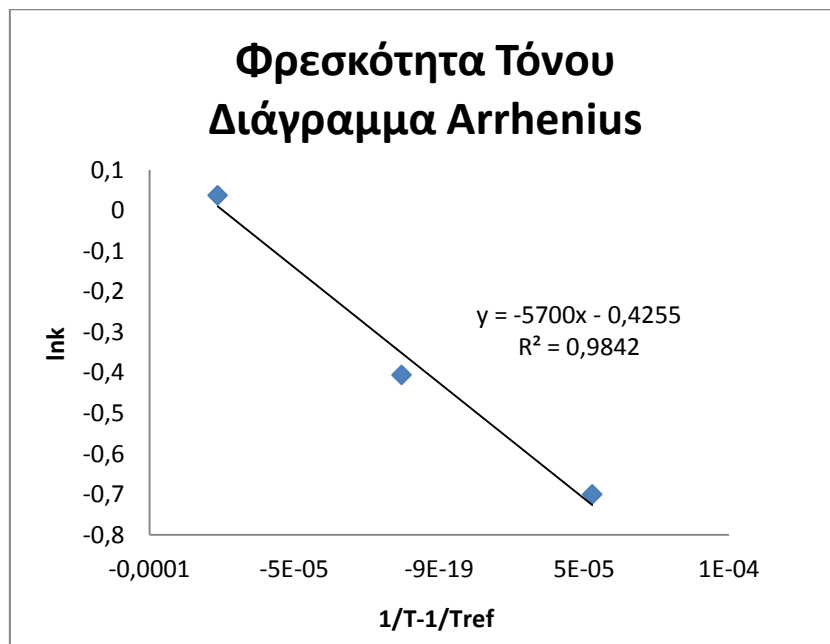


Σχήμα 5.23: Διάγραμμα Arrhenius οσμής τόνου.

Φρεσκότητα

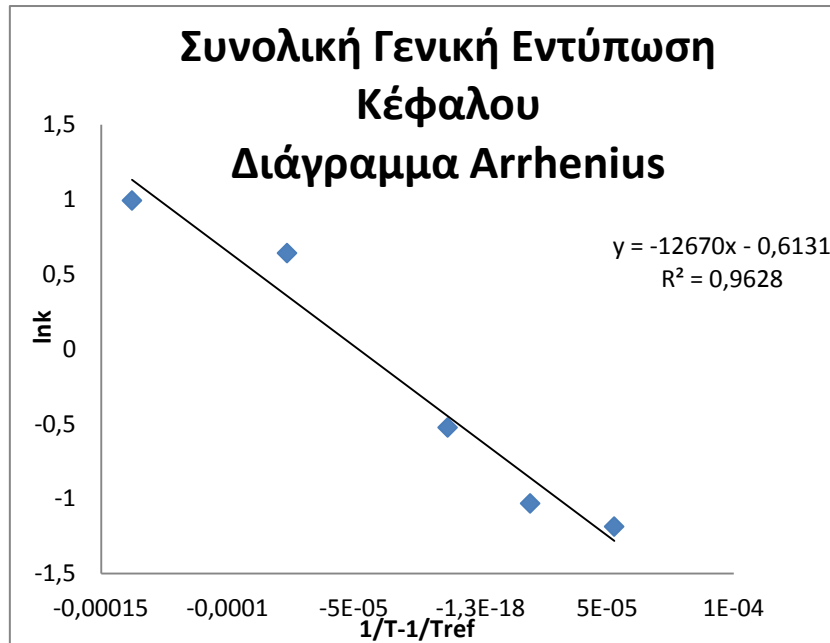


Σχήμα 5.24: Διάγραμμα Arrhenius φρεσκότητας κέφαλου.

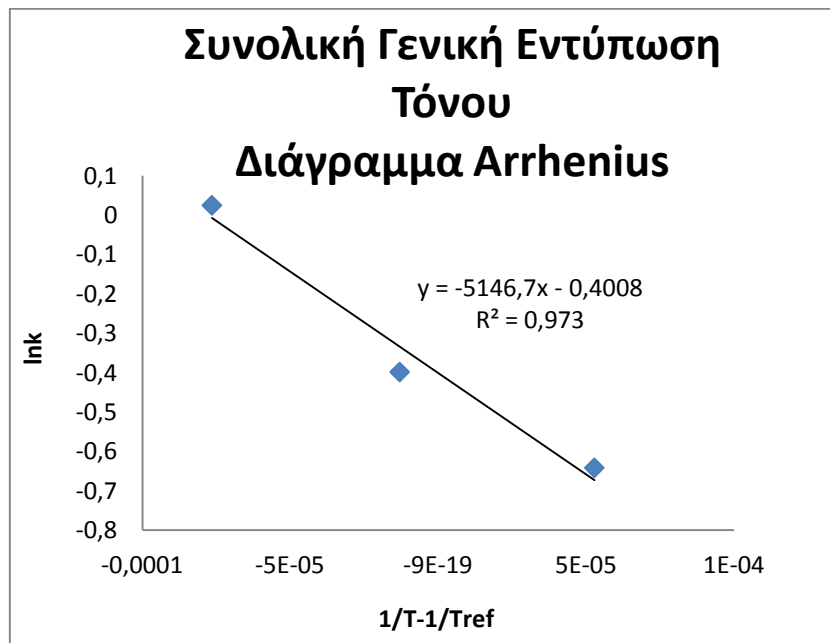


Σχήμα 5.25: Διάγραμμα Arrhenius φρεσκότητας τόνου.

Συνολική γενική εντύπωση



Σχήμα 5.26: Διάγραμμα Arrhenius συνολικής εντύπωσης κέφαλου.



Σχήμα 5.27: Διάγραμμα Arrhenius συνολικής γενικής εντύπωσης τόνου.

Στους παρακάτω πίνακες δίνονται οι ενέργειες ενεργοποίησης E_a και οι ρυθμοί k του κάθε οργανοληπτικού χαρακτηριστικού, για τον κέφαλο και τον τόνο αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 5: Κινητική μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης και παραγόντων υποβάθμισης ποιότητας & ασφάλειας σε ιχθυηρά

Πίνακας 5.1: Κινητικά χαρακτηριστικά αξιολόγησης οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κέφαλου.

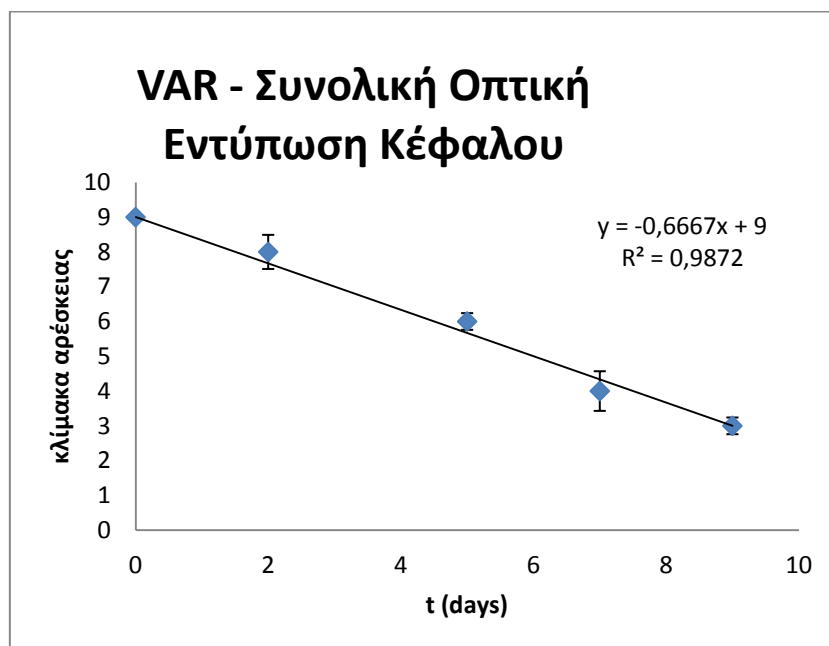
Κέφαλος			
	$k(d^{-1})$	E_a (kJ/mol)	R^2
Συνολική Οπτική Εντύπωση	0,443	94,5	0,995
Χρώμα	0,401	98,0	0,984
Οσμή	0,544	104,6	0,962
Φρεσκότητα	0,548	104,5	0,963
Συνολική εντύπωση	0,542	105,3	0,963

Πίνακας 5.2: Κινητικά χαρακτηριστικά αξιολόγησης οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τόνου.

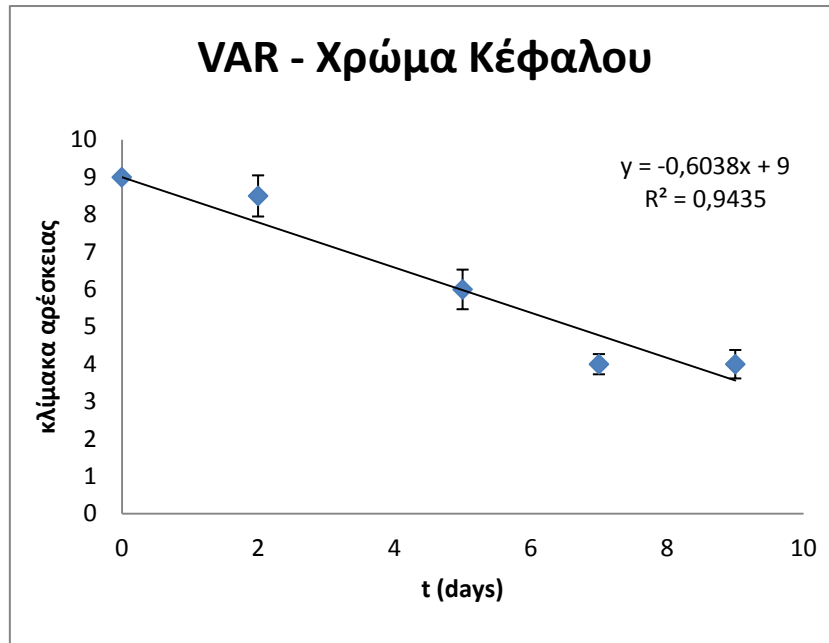
Τόνος			
	$k(d^{-1})$	E_a (kJ/mol)	R^2
Συνολική Οπτική Εντύπωση	0,471	21,4	0,997
Χρώμα	0,490	50,4	0,972
Οσμή	0,581	46,5	0,999
Φρεσκότητα	0,628	37,7	0,984
Συνολική εντύπωση	0,616	42,9	0,973

5.2.4 Μελέτη σε δυναμικές συνθήκες

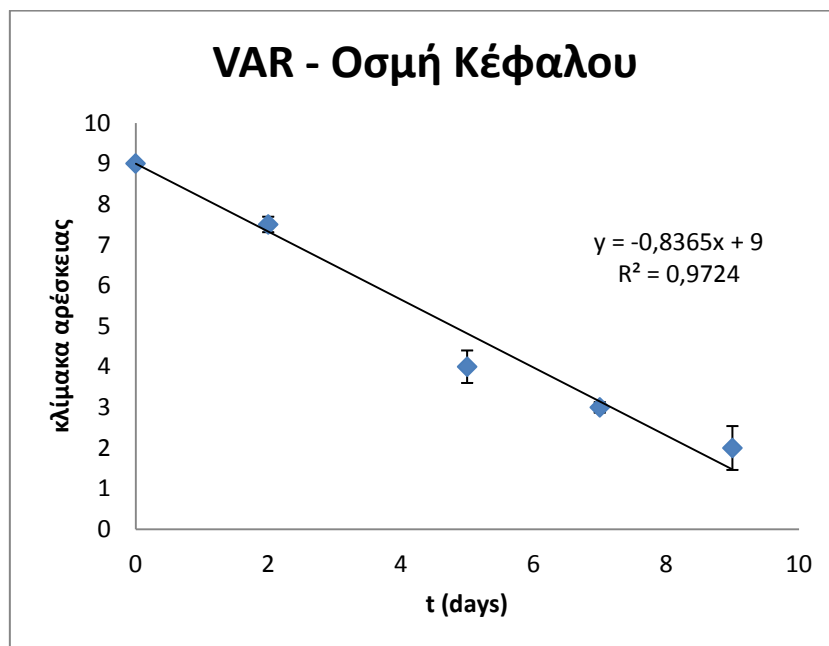
Δείγματα κέφαλου συντηρήθηκαν σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες που αντιστοιχούν σε $T_{eff}=7,4^{\circ}C$ όπως μελετήθηκε και στο κεφάλαιο 4. Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων αυτών παρουσιάζονται παρακάτω.



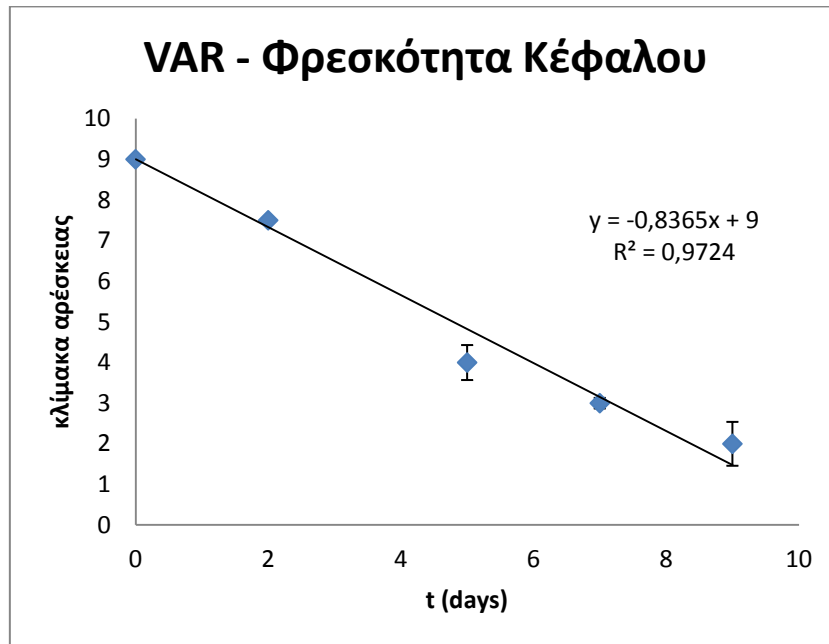
Σχήμα 5.28: Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής ολικής εντύπωσης κέφαλου σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.



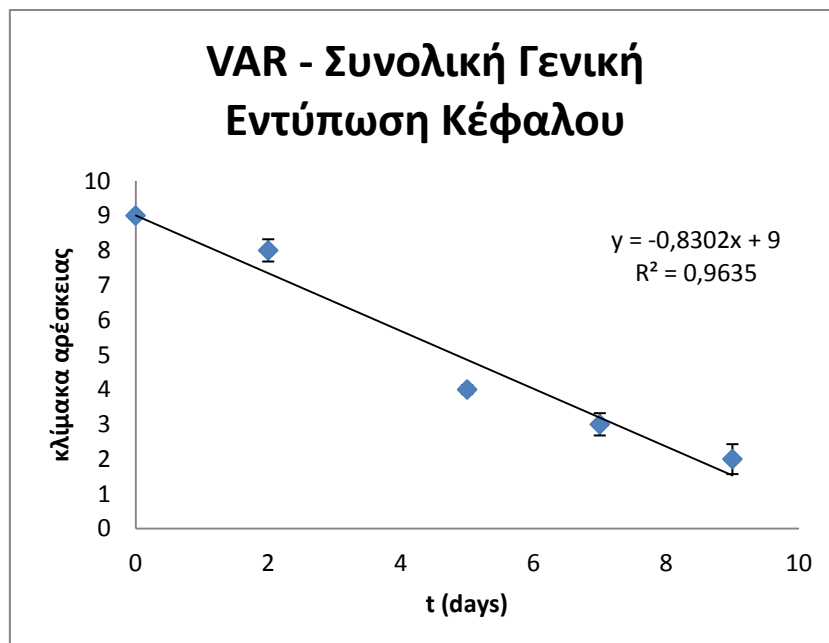
Σχήμα 5.29: Διάγραμμα βαθμολόγησης χρώματος κέφαλου σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.



Σχήμα 5.30: Διάγραμμα βαθμολόγησης οσμής κέφαλου σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.



Σχήμα 5.31: Διάγραμμα βαθμολόγησης φρεσκότητας κέφαλου σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.



Σχήμα 5.32: Διάγραμμα βαθμολόγησης συνολικής γενικής εντύπωσης κέφαλου σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.

Στη συνέχεια δίνονται οι πειραματικοί και οι θεωρητικοί ρυθμοί αλλοίωσης του κέφαλου στο θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενο πείραμα για κάθε οργανοληπτικό χαρακτηριστικό που μελετήθηκε καθώς και το αντίστοιχο σφάλμα πρόβλεψης.

Πίνακας 5.3: Πειραματικοί και οι θεωρητικοί ρυθμοί αλλοίωσης του κέρατος σε δυναμικές συνθήκες.

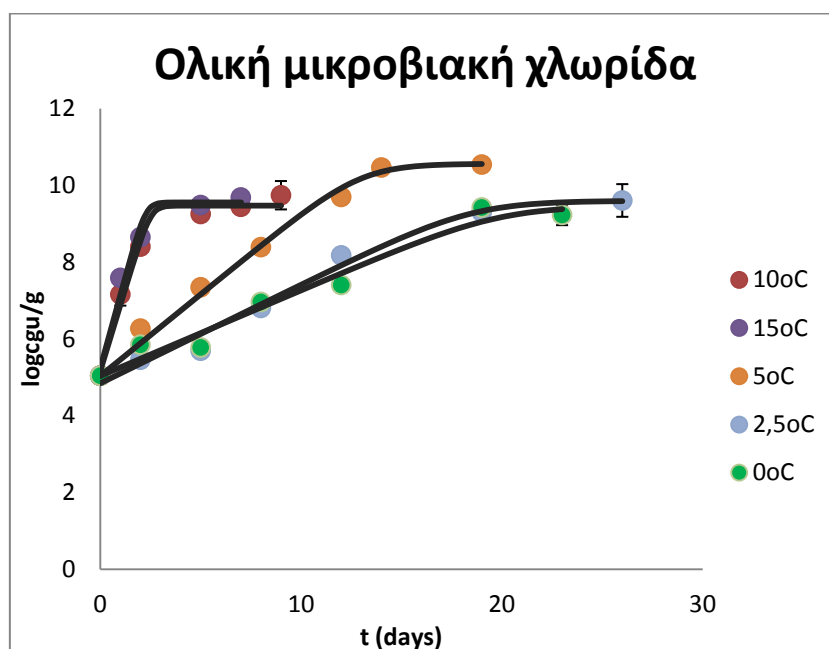
	$k_{pred} (d^{-1})$	$k_{exp} (d^{-1})$	RE(%)
Συνολική Οπτική	0,728	0,667	8,379
Χρώμα	0,672	0,604	10,119
Άρωμα	0,942	0,837	11,146
Φρεσκότητα	0,949	0,837	11,802
Συνολική	0,943	0,830	11,983

Παρατηρούμε ότι το σφάλμα σε όλες τις τιμές είναι εντός του ορίου $\pm 20\%$ που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Gougouli et al., 2008).

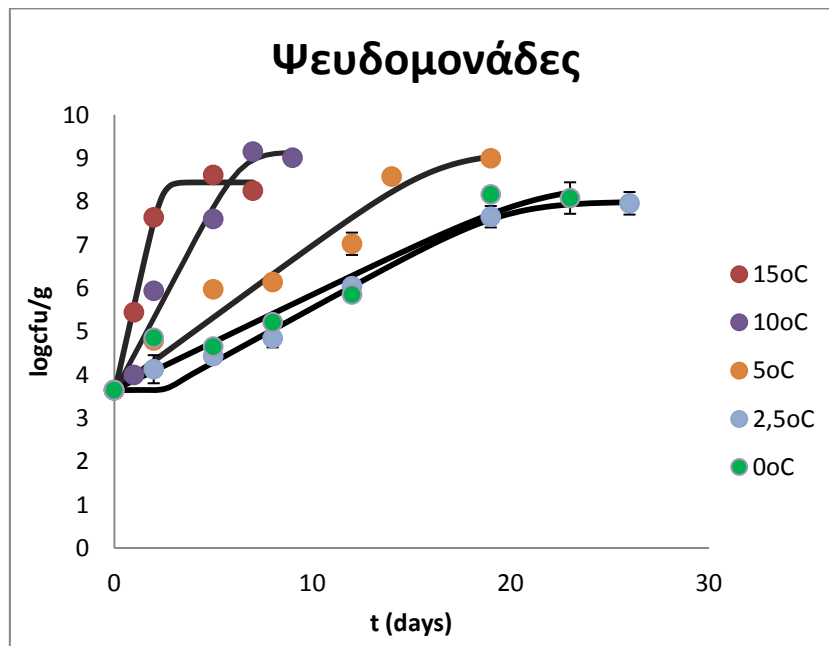
5.3 Μέτρηση μικροβιακού φορτίου σε δείγματα ψαριών και προσαρμογή στο μοντέλο Baranyi

5.3.1 Μικροβιολογική μελέτη δειγμάτων κέρατος

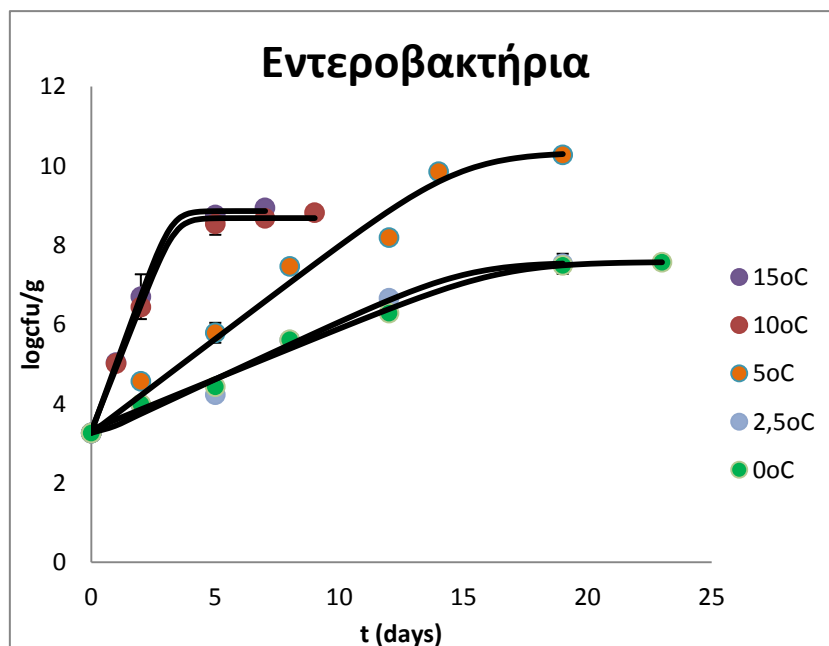
Στο παρακάτω διάγραμμα παρατίθενται συνολικά οι καμπύλες ανάπτυξης για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια σε δείγματα κέρατος κατά την αποθήκευση του σε θερμοκρασίες 0, 2,5, 5, 10, 15°C. Τα σημεία είναι οι πειραματικές μετρήσεις και οι καμπύλες είναι σιγμοειδούς μορφής και προκύπτουν από το προσαρμοσμένο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.33: Διάγραμμα ολικής μικροβιακής χλωρίδας κέρατος για θερμοκρασίες 0, 2,5, 5, 10, 15°C με προσαρμοσμένες καμπύλες στο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.34: Διάγραμμα ψευδομονάδων κέραλου για θερμοκρασίες 0,2,5,5,10,15°C με προσαρμοσμένες καμπύλες στο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.35: Διάγραμμα εντεροβακτηρίων κέραλου για θερμοκρασίες 0,2,5,5,10,15°C με προσαρμοσμένες καμπύλες στο μοντέλο Baranyi.

Από την προσομοίωση των πειραματικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi προέκυψαν οι εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης των παραπάνω θερμοκρασιών. Οι ρυθμοί αυτοί ορίζονται από την παρακάτω σχέση.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = k \cdot t \quad (5.1)$$

Όπου

- N_0 το αρχικό μικροβιακό φορτίο
- N το μικροβιακό φορτίο σε χρόνο t

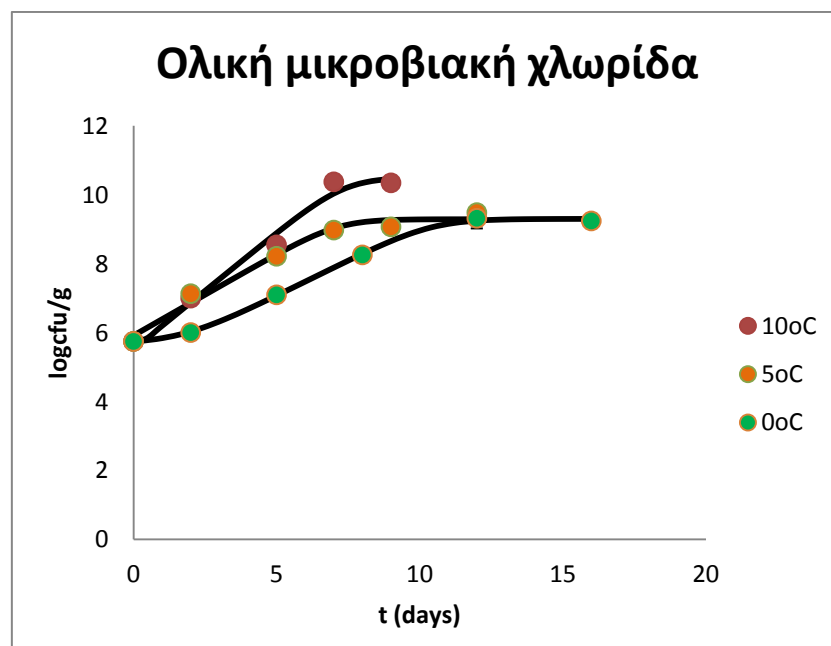
Οι ρυθμοί $k(d)$ για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια των εξεταζόμενων θερμοκρασιών δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.4: Ρυθμοί ανάπτυξης $k(d^{-1})$ για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια για θερμοκρασίες 0, 2,5, 5, 10, 15°C).

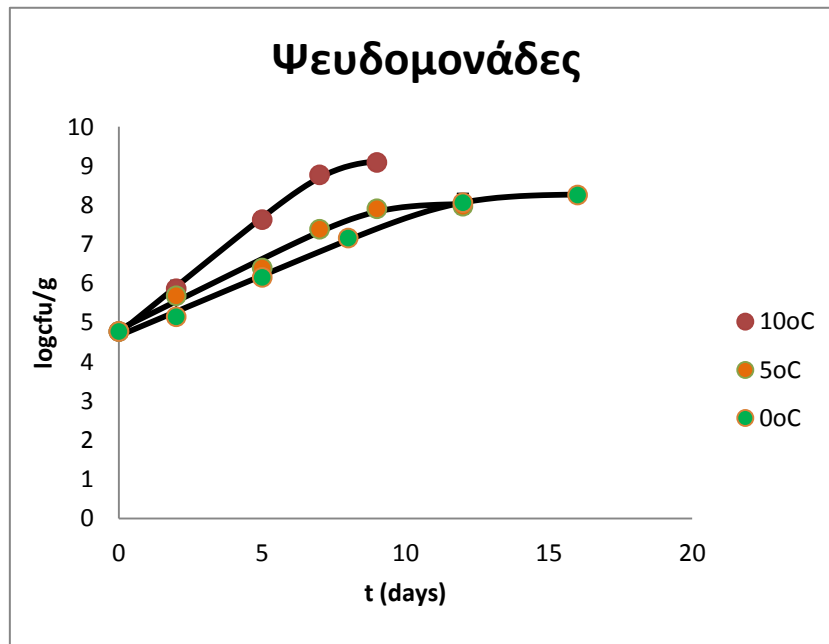
	0°C	2,5°C	5°C	10°C	15°C
Ολική μικροβιακή χλωρίδα	0,223	0,257	0,425	1,719	1,904
Ψευδομονάδες	0,220	0,251	0,335	0,869	2,027
Εντεροβακτήρια	0,256	0,291	0,474	1,591	1,724

5.3.2 Μικροβιολογική μελέτη δειγμάτων τόνου

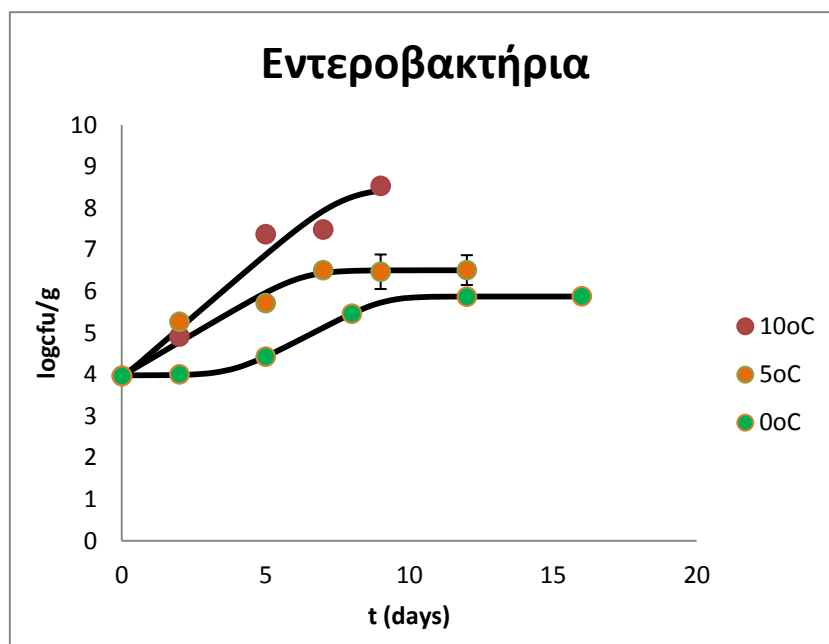
Στο παρακάτω διάγραμμα παρατίθενται συνολικά οι καμπύλες ανάπτυξης για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια σε δείγματα τόνου κατά την αποθήκευση του σε θερμοκρασίες 0, 5, 10°C. Τα σημεία είναι οι πειραματικές μετρήσεις και οι καμπύλες είναι σιγμοειδούς μορφής και προκύπτουν από το προσαρμοσμένο μοντέλο Baranyi



Σχήμα 5.36: Διάγραμμα ολικής μικροβιακής χλωρίδας τόνου για θερμοκρασίες 0,5,10°C με προσαρμοσμένες καμπύλες στο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.37: Διάγραμμα ψευδομονάδων τόνου για θερμοκρασίες 0,5,10°C με προσαρμοσμένες καμπύλες στο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.38: Διάγραμμα εντεροβακτηρίων τόνου για θερμοκρασίες 0,5,10°C με προσαρμοσμένες καμπύλες στο μοντέλο Baranyi.

Οι ρυθμοί $k(d)$ για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια των εξεταζόμενων θερμοκρασιών δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.5: Ρυθμοί $k(d^{-1})$ για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια για θερμοκρασίες 0, 5, 10°C.

	0°C	5°C	10°C
Ολική μικροβιακή χλωρίδα	0,414	0,414	0,414
Ψευδομονάδες	0,307	0,307	0,307
Εντεροβακτήρια	0,361	0,361	0,361

5.3.3 Εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών από τη θερμοκρασία συντήρησης

Οι ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης που υπολογίστηκαν παραπάνω, προσαρμόστηκαν στη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius η οποία δίνεται παρακάτω.

$$\ln k = \ln k_{ref} + \frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \quad (5.2)$$

Όπου

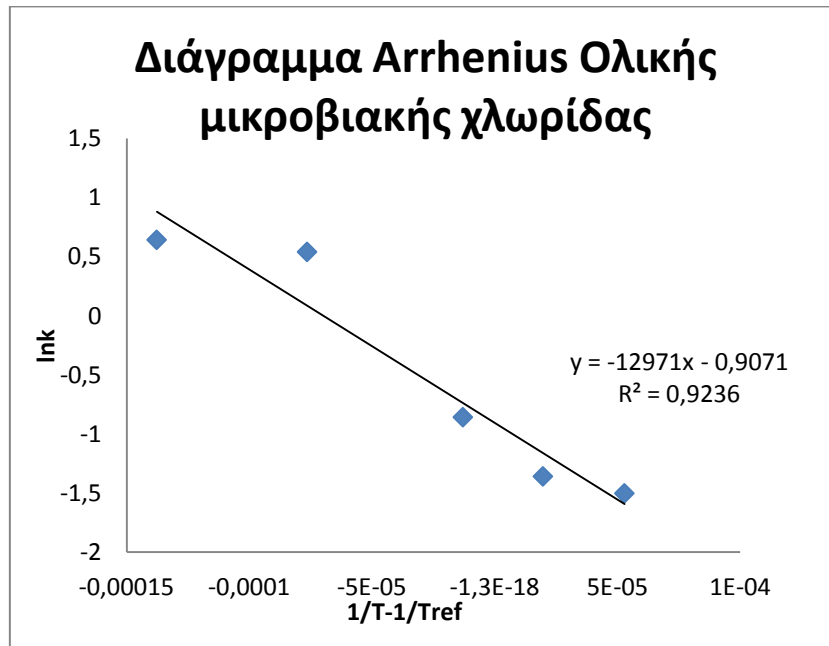
- k η σταθερά ανάπτυξης των μικροοργανισμών
- k_{ref} η σταθερά ανάπτυξης σε θερμοκρασία αναφοράς (4°C)
- Ea η ενέργεια ενεργοποίησης (kJ/mol)
- R η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/mol·K)
- T η απόλυτη θερμοκρασία (K)

Με χρήση της εξίσωσης Arrhenius και της εξίσωσης (5.1), προέκυψε η κινητική εξίσωση ανάπτυξης μικροοργανισμών στα ψάρια.

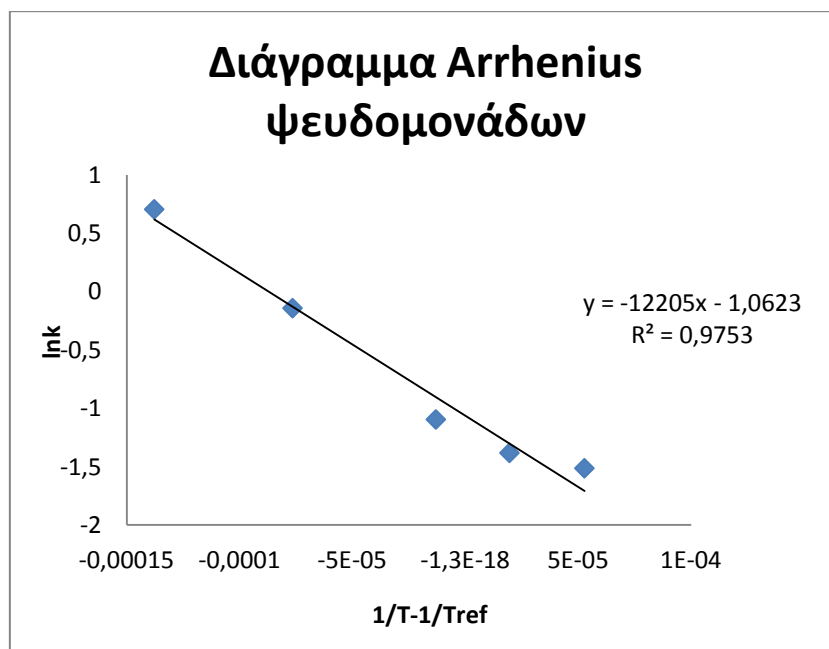
$$\log N = \log N_0 + \left(k_{ref} e^{\frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right)} \right) \quad (5.3)$$

Μελέτη δειγμάτων κέφαλου

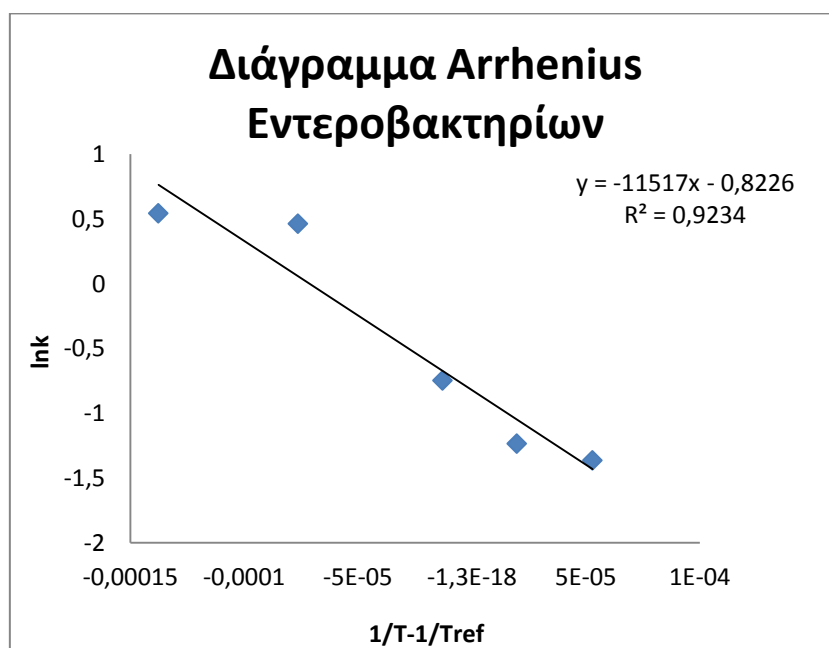
Η προσαρμογή της γραμμικοποιημένης εξίσωσης Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδα, των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηρίων για τα δείγματα κέφαλου, παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα.



5.39: Μοντέλο Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στον κέφαλο.



5.40: Μοντέλο Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων στον κέφαλο.



5.41: Μοντέλο Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων στον κέφαλο.

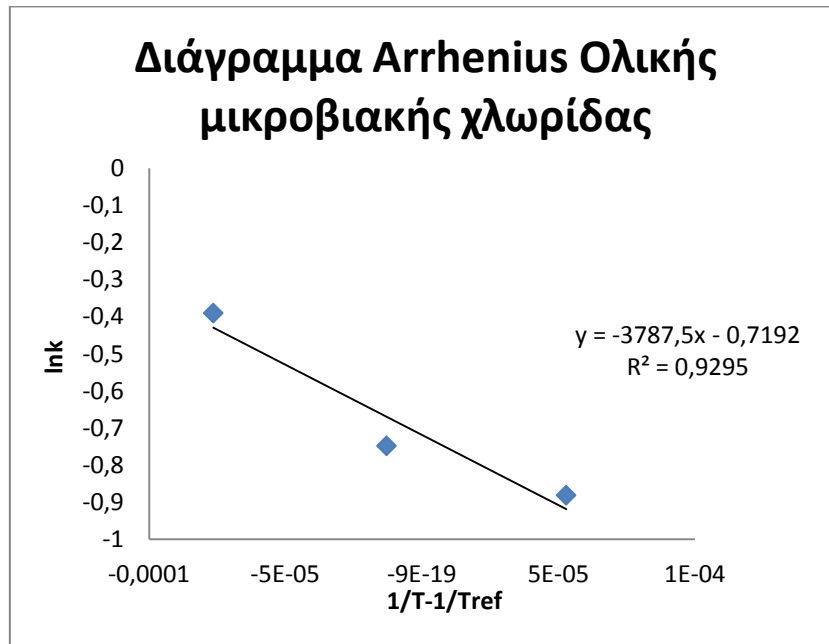
Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται οι ενέργειες ενεργοποίησης και οι ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης στη θερμοκρασία αναφοράς που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα.

Πίνακας 5.6: Κινητικά χαρακτηριστικά για την μικροβιακή ανάπτυξη στον κέφαλο.

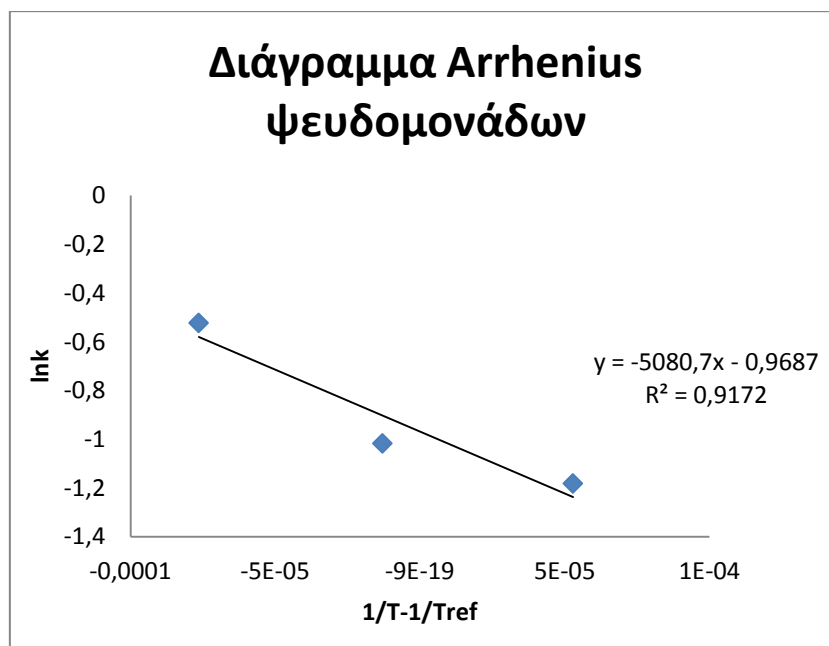
	$k_{ref} (d^{-1})$	$E_a (kJ/mol)$	R^2
Ολική μικροβιακή χλωρίδα	0,404	107,8	0,907
Ψευδομονάδες	0,346	101,5	0,975
Εντεροβακτήρια	0,439	95,8	0,923

Μελέτη δειγμάτων τόνου

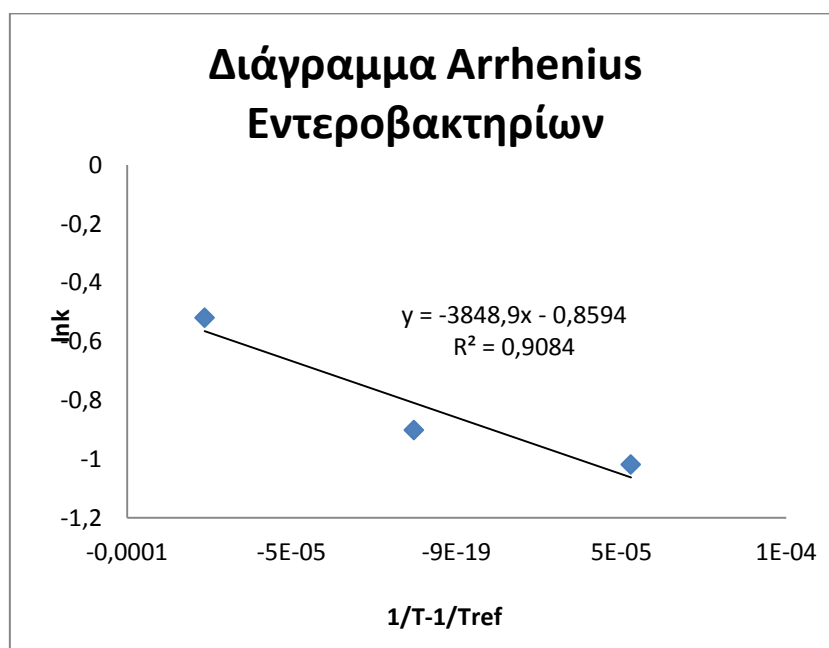
Η προσαρμογή της γραμμικοποιημένης εξίσωσης Arrhenius για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια για τα δείγματα τόνου, παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα.



5.42: Μοντέλο Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στον τόνο.



5.43: Μοντέλο Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των ψευδομονάδων στον τόνο.



5.44: Μοντέλο Arrhenius στους ρυθμούς ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων στον τόνο.

Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται οι ενέργειες ενεργοποίησης και οι ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης στη θερμοκρασία αναφοράς που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα.

Πίνακας 5.7: Κινητικά χαρακτηριστικά για την μικροβιακή ανάπτυξη στον τόνο.

	$k_{ref} (d^{-1})$	$E_a (kJ/mol)$	R^2
Ολική μικροβιακή χλωρίδα	0,487	31,5	0,930
Ψευδομονάδες	0,380	42,1	0,969
Εντεροβακτήρια	0,423	32,0	0,908

5.3.4 Προσδιορισμός του χρόνου ζωής

Χρόνος ζωής κέφαλου

Παρακάτω γίνεται προσδιορισμός του χρόνου ζωής (shelf life) του κέφαλου με αντικατάσταση θεωρητικών δεδομένων του ρυθμού ανάπτυξης της ολικής μικροχλωρίδας στην εξίσωση (5.1). Τόσο οι ψευδομονάδες όσο και τα εντεροβακτήρια παρουσίασαν αντίστοιχους ρυθμούς ανάπτυξης και φορτία, γι' αυτό το λόγο ο υπολογισμός της διάρκειας ζωής του κέφαλου έγινε με βάση την ολική μικροβιακή χλωρίδα που περιλαμβάνει και τα δύο είδη μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο προσδιορισμός της διατηρησιμότητας βασίζεται κυρίως στην ανάπτυξη των ψευδομονάδων (Tsironi & Taoukis, 2012; Choulitoudi et al, 2016) Ωστόσο, η ολική μικροβιακή χλωρίδα χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης αλλοίωσης

για τον υπολογισμό του χρόνου ζωής προϊόντων αλιευμάτων (Frangos et al, 2010). Ως όριο, χρησιμοποιούμε το φορτίο 8 cfu/g για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, το οποίο ταυτίζεται με την οργανοληπτική απόρριψη του κέρατος σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Η αρχική τιμή που χρησιμοποιήθηκε είναι $\log N_0=5$ cfu/g.

Οι θεωρητικοί ρυθμοί εκθετικής ανάπτυξης αλλά και ο χρόνος ζωής στις μελετώμενες θερμοκρασίες δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.8: Θεωρητικοί ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης και χρόνοι ζωής για τον κέρατο.

T(°C)	k_{pred} (d ⁻¹)	Shelf life (d)
0	0,203	14,7
2,5	0,313	9,6
5	0,478	6,3
10	1,088	2,8
15	2,410	1,2

Χρόνος ζωής τόνου

Παρακάτω γίνεται προσδιορισμός του χρόνου ζωής (shelf life) του τόνου με αντικατάσταση θεωρητικών δεδομένων του ρυθμού ανάπτυξης των ψευδομονάδων στην εξίσωση (5.1). Οι ψευδομονάδες αποτέλεσαν τον επικρατέστερο αλλοιογόνο μικροοργανισμό όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία για αερόβια συσκευασμένα, ψυγμένα ιχθυηρά (Tsironi & Taoukis, 2012; Choulitoudi et al, 2016). Ως όριο, χρησιμοποιήθηκε το φορτίο 7 logcfu/g το οποίο ταυτίζεται με την οργανοληπτική απόρριψή του σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Για τους υπολογισμούς της διατηρησιμότητας με χρήση του το εξαγόμενου μαθηματικού μοντέλου, η αρχική τιμή ήταν $\log N_0=4,8$ cfu/g.

Οι θεωρητικοί ρυθμοί εκθετικής ανάπτυξης αλλά και οι χρόνοι ζωής στις μελετώμενες θερμοκρασίες δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

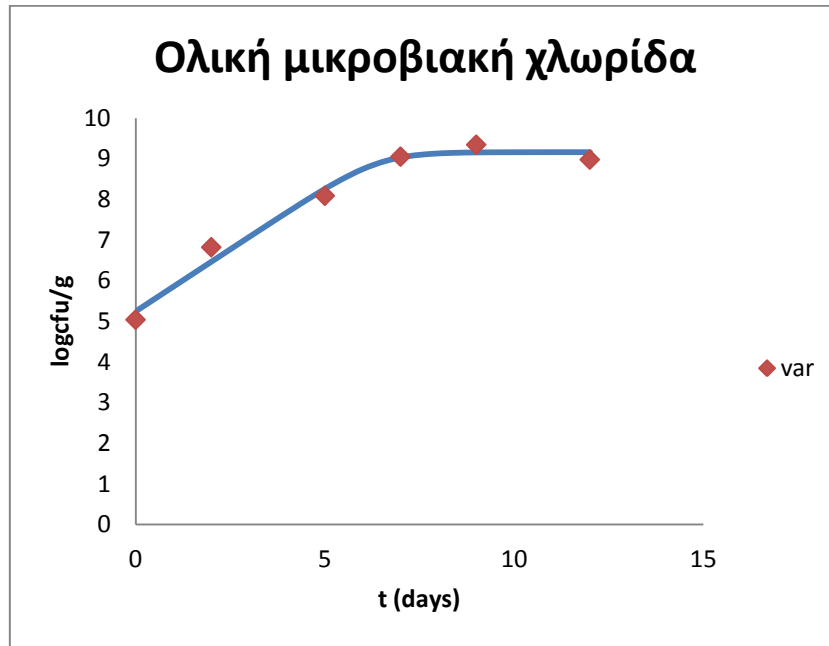
Πίνακας 5.9: Θεωρητικοί ρυθμοί μικροβιακής ανάπτυξης και χρόνος ζωής για τον τόνο.

T(°C)	k_{pred} (d ⁻¹)	Shelf life (d)
0	0,290	7,6
5	0,405	5,4
10	0,560	3,9

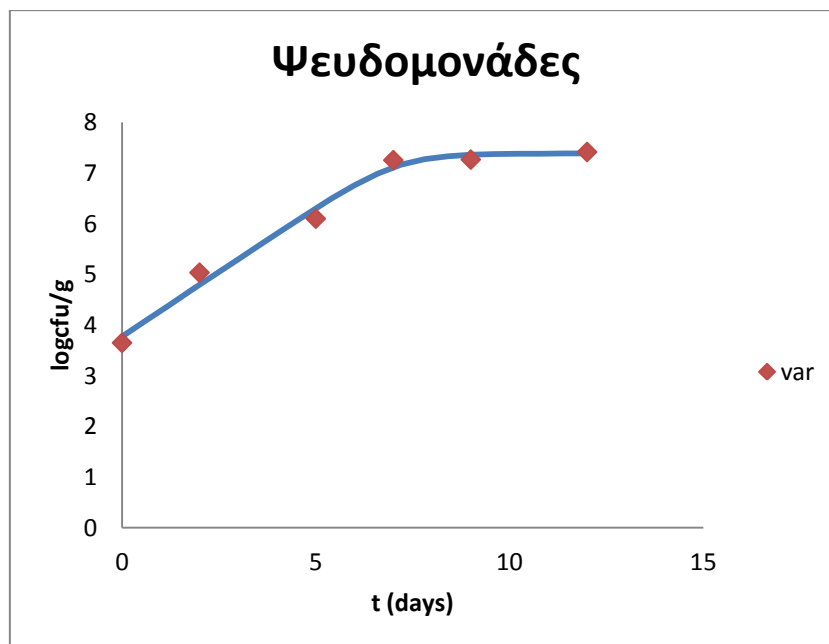
5.3.5 Έλεγχος αξιοπιστίας αποτελεσμάτων

Προκειμένου να μελετήσουμε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, έγινε μελέτη σε δείγματα κέρατος σε εναλλασσόμενες χρονικά θερμοκρασιακές συνθήκες.

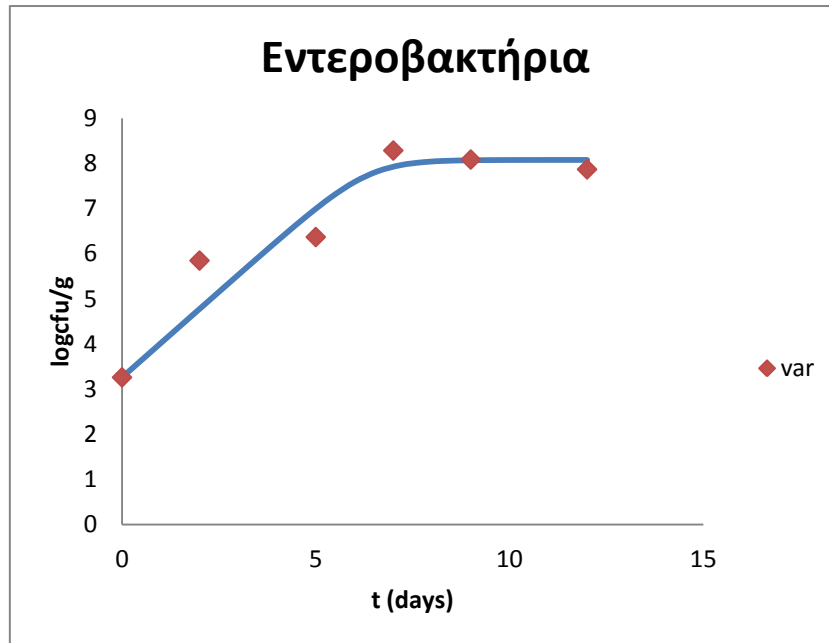
Στα παρακάτω διαγράμματα παρατίθενται οι καμπύλες ανάπτυξης για την ολική μικροβιακή χλωρίδα, τις ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια σε δείγματα κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασιακά εναλλασσόμενες συνθήκες. Τα σημεία είναι οι πειραματικές μετρήσεις και οι καμπύλες είναι σιγμοειδούς μορφής και προκύπτουν από το προσαρμοσμένο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.45: Διάγραμμα ανάπτυξης ολικής μικροβιακής χλωρίδας κέφαλου για μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες με προσαρμοσμένη καμπύλη στο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.46: Διάγραμμα ανάπτυξης ψευδομονάδων κέφαλου για μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες με προσαρμοσμένη καμπύλη στο μοντέλο Baranyi.



Σχήμα 5.47: Διάγραμμα ανάπτυξης εντεροβακτηρίων κέφαλου για μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες με προσαρμοσμένη καμπύλη στο μοντέλο Baranyi.

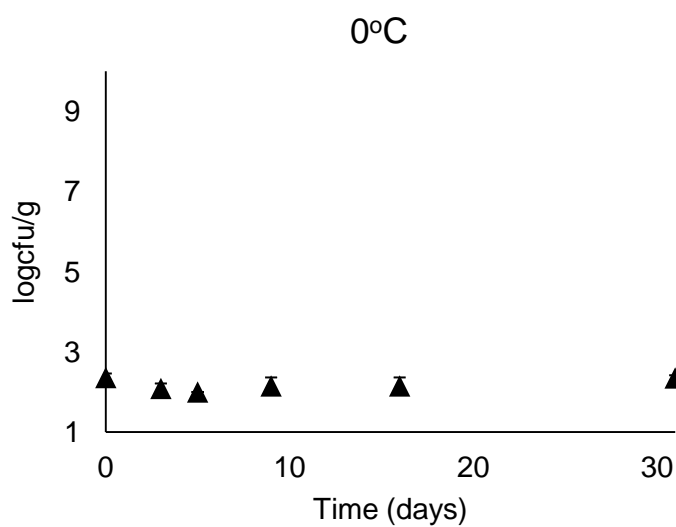
Στον πίνακα που ακολουθεί συμπεριλαμβάνονται οι θεωρητικοί εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηρίων σε δείγματα κέφαλου, καθώς και το % σφάλμα της πρόβλεψης για την κάθε περίπτωση.

Πίνακας 5.10: Θεωρητικοί και πειραματικοί ρυθμοί ανάπτυξης σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες αποθήκευσης δειγμάτων κέφαλου.

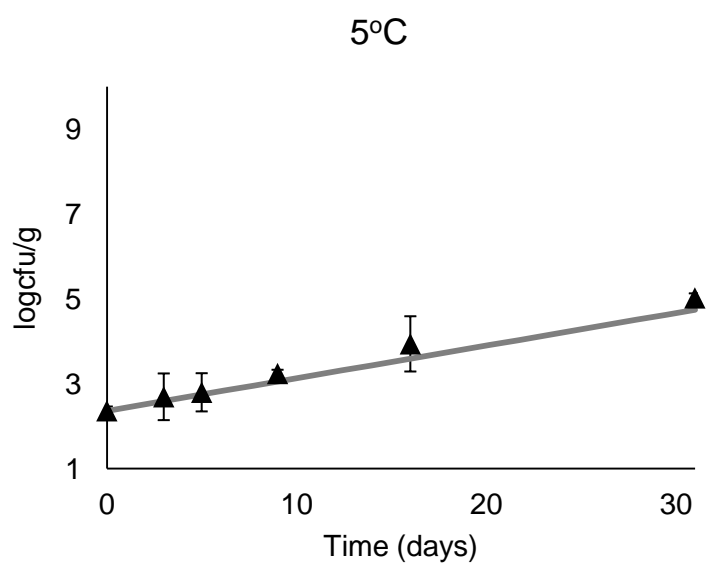
	$k_{pred} (d^{-1})$	$k_{exp} (d^{-1})$	RE(%)
Ολική μικροβιακή χλωρίδα	0,712	0,612	14,1
Ψευδομονάδες	0,589	0,510	13,5
Εντεροβακτήρια	0,727	0,758	4,2

5.4 Μαθηματικό μοντέλο ανάπτυξης του *Morganella morganii* σε κέφαλο

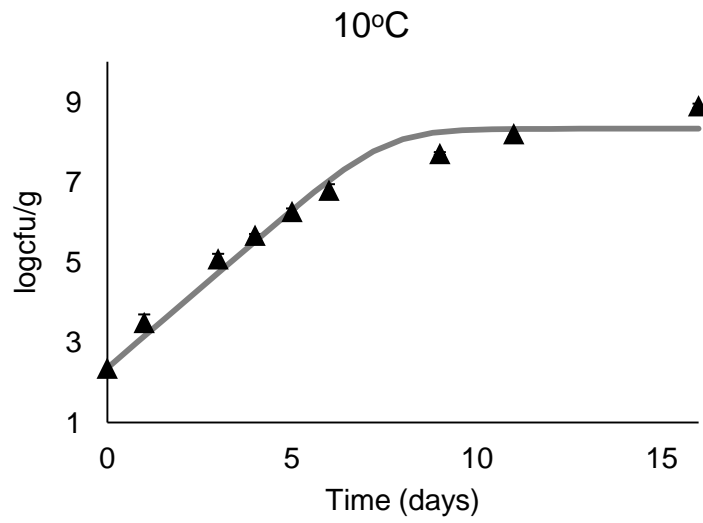
Σε δείγματα κέφαλου έγινε ο προσδιορισμός ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15, 20°C) καθώς και θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες. Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα της παρατηρούμενης ανάπτυξης του μικροοργανισμού (observed) καθώς και οι ρυθμοί ανάπτυξης που προέκυψαν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi με χρήση του προγράμματος dmfit.



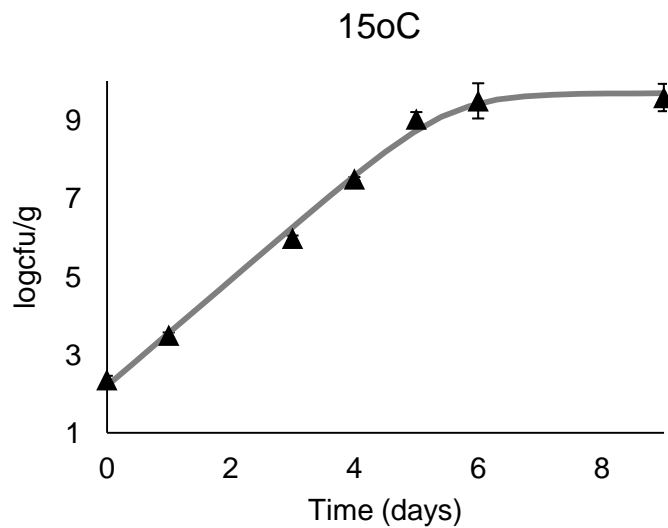
Σχήμα 5.48: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* στους 0°C.



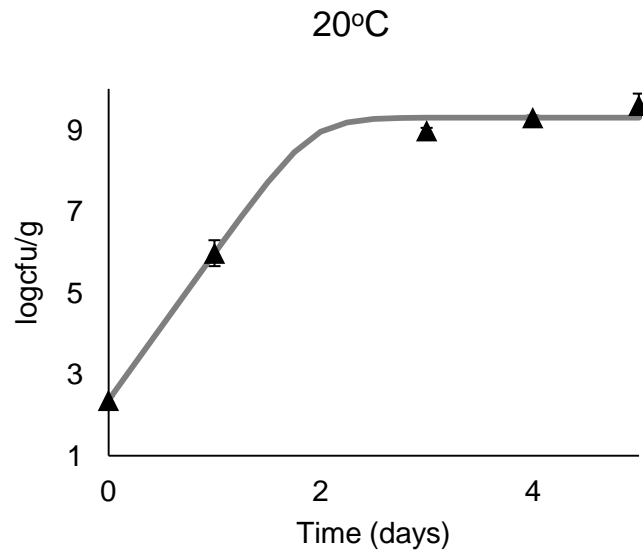
Σχήμα 5.49: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* στους 5°C.



Σχήμα 5.50: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* στους 10°C.



Σχήμα 5.51: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* στους 15°C.



Σχήμα 5.52: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* στους 20°C.

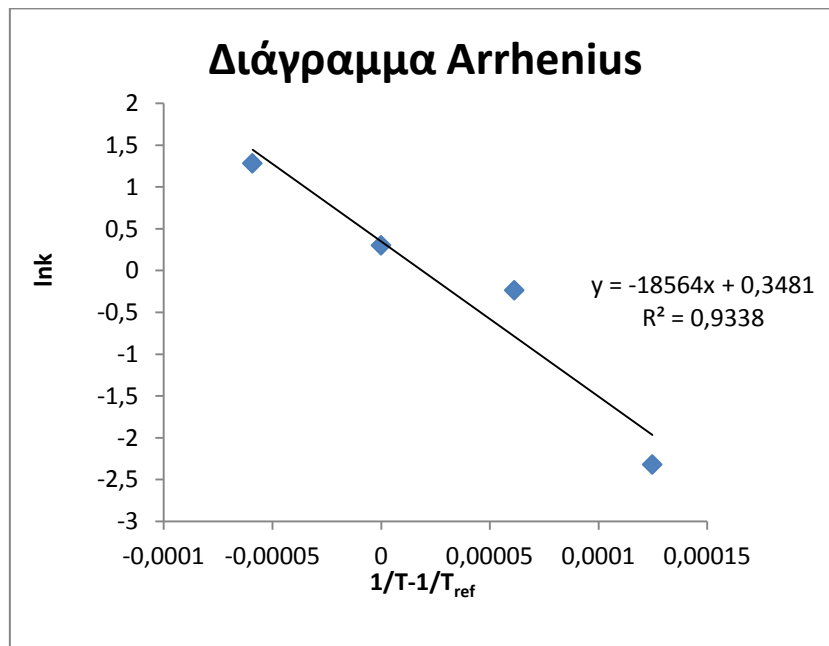
Σημειώνεται ότι στους 0°C δεν υπήρξε μικροβιακή ανάπτυξη σε διάρκεια ενός μήνα.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι ρυθμοί ανάπτυξης του *Morganella morganii* σε στις θερμοκρασίες 5,10,15 και 20°C.

Πίνακας 5.11: Ρυθμοί ανάπτυξης του *Morganella morganii* για θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20°C.

T (°C)	k (d ⁻¹)
5	0,099
10	0,792
15	1,355
20	3,615

Στη συνέχεια έγινε χρήση των ρυθμών ανάπτυξης του *Morganella morganii* που υπολογίστηκαν, προκειμένου να σχεδιαστεί το διάγραμμα της γραμμικοποιημένης εξίσωσης Arrhenius με βάση το οποίο προσδιορίστηκαν η ενέργεια ενεργοποίησης E_a και ο ρυθμός μικροβιακής ανάπτυξης k_{ref} στη θερμοκρασία αναφοράς (15°C). Οι τιμές αυτές δίνονται στον πίνακα (5.12).

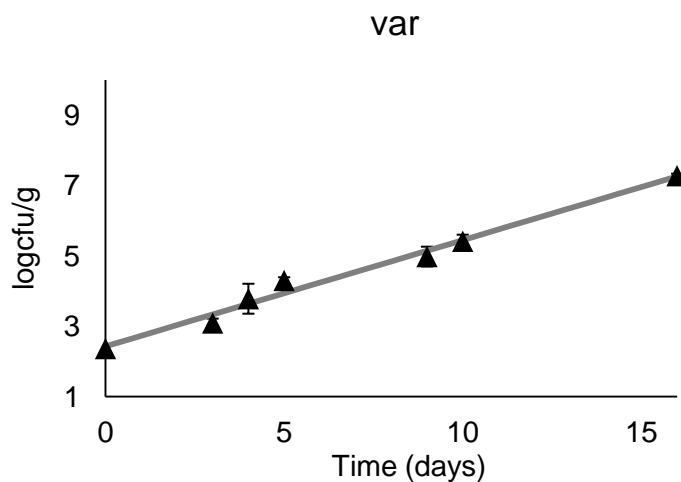


Σχήμα 5.53 Εφαρμογή του γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius για τη μικροβιακή ανάπτυξη του *morganella morganii*.

Πίνακας 5.12: Κινητικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης του *morganella morganii*.

E_a (kJ/mol)	154,3
k_{ref} (d ⁻¹)	1,416
R^2	0,934

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε πείραμα σε δυναμικές συνθήκες προκειμένου να επαληθευτεί η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii*.



Σχήμα 5.54: Καμπύλη ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.

Η T_{eff} στο μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακά πείραμα βρέθηκε ίση με $7,4^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια παρατίθενται οι πειραματικός και ο θεωρητικός ρυθμος ανάπτυξης του *Morganella morganii*.

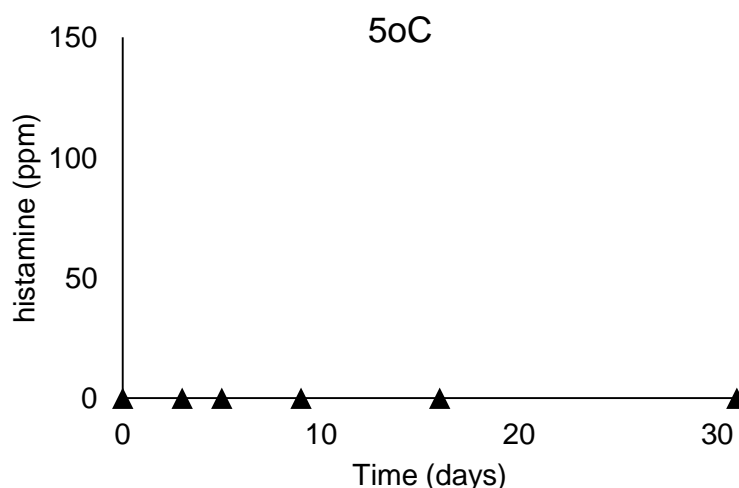
Πίνακας 5.13: Πειραματικός και θεωρητικός ρυθμός ανάπτυξης του *Morganella morganii* σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.

$k_{\text{exp}} (\text{d}^{-1})$	$k_{\text{pred}} (\text{d}^{-1})$	RE (%)
0,292	0,247	18,1

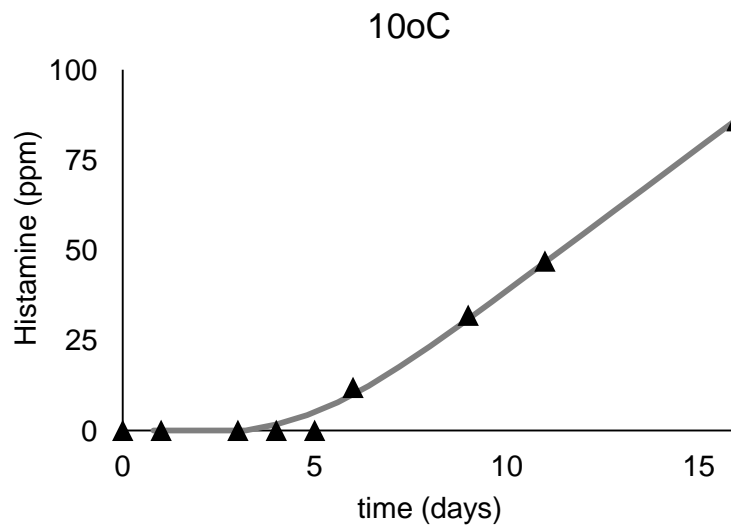
Το σφάλμα είναι μικρότερο από 20% που είναι το όριο αποδοχής όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Dalgaard et al., 1997; Gougouli et al., 2008).

5.5 Μαθηματικό μοντέλο παραγωγής ισταμίνης σε κέφαλο

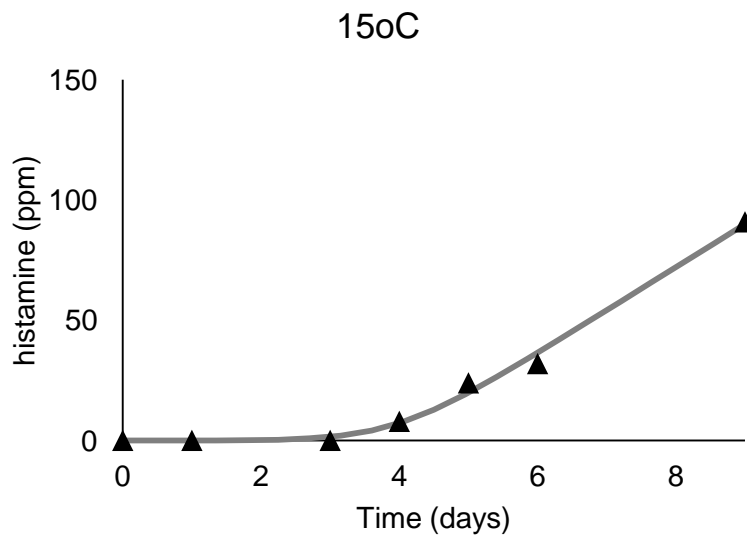
Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης της ισταμίνης σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα. Στη συνέχεια παρατίθενται και οι ρυθμοί ανάπτυξης και οι λανθάνουσες φάσεις (lag phase) που προέκυψαν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi με χρήση του προγράμματος dmfit.



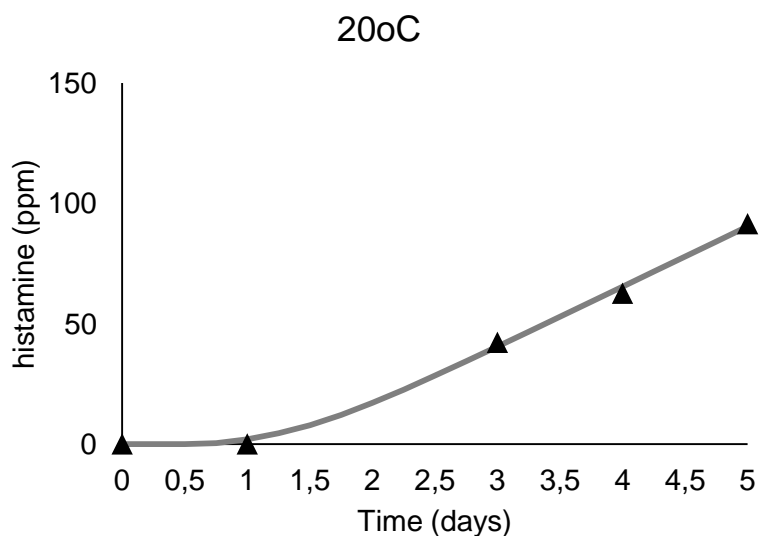
Σχήμα 5.55: Καμπύλη παραγωγής ισταμίνης στους 5°C .



Σχήμα 5.56: Καμπύλη παραγωγής ισταμίνης στους 10°C.



Σχήμα 5.57: Καμπύλη παραγωγής ισταμίνης στους 15°C.



Σχήμα 5.58: Καμπύλη παραγωγής ισταμίνης στους 20°C.

Παρατηρείται ότι στους 0°C και στους 5°C δεν υπήρξε σχηματισμός ισταμίνης σε διάρκεια ενός μήνα. Στους 10°C η ισταμίνη έφτασε σε συγκέντρωση 50ppm στις 11,5 ημέρες, στους 15°C στις 6,2 ημέρες και στους 20°C στις 3,4 ημέρες.

Επιπλέον, στις θερμοκρασίες που πραγματοποιήθηκε και μελέτη μικροβιακής αλλοίωσης, ο χρόνος που απαιτήθηκε για να φτάσει το τρόφιμο σε μη αποδεκτά επίπεδα ήταν σημαντικά μικρότερος (2,8 ημέρες στους 10°C και 1,2 ημέρες στους 15°C) από το χρόνο που χρειάστηκε ώστε οι τιμές της ισταμίνης να φτάσουν το κατώτερο επιτρεπτό όριο (50ppm).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε αντίστοιχη έρευνα που διεξήχθη για τον τόνο, στους 0°C δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ισταμίνης κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος που ήταν 17 μέρες ενώ στους 8°C και στους 20°C, η περιεκτικότητα ισταμίνης στον τόνο έφτασε σε μη αποδεκτά επίπεδα (50mg/kg) μετά τις 4 και τη μία ημέρα αντίστοιχα (Guizani et al, 2005). Οι αποκλίσεις στους χρόνους ζωής ενδεχομένως οφείλονται στο ότι ο τόνος είναι από τα ψάρια που περιέχουν σημαντική ποσότητα ιστιδίνης στη σάρκα τους (EFSA, 2011).

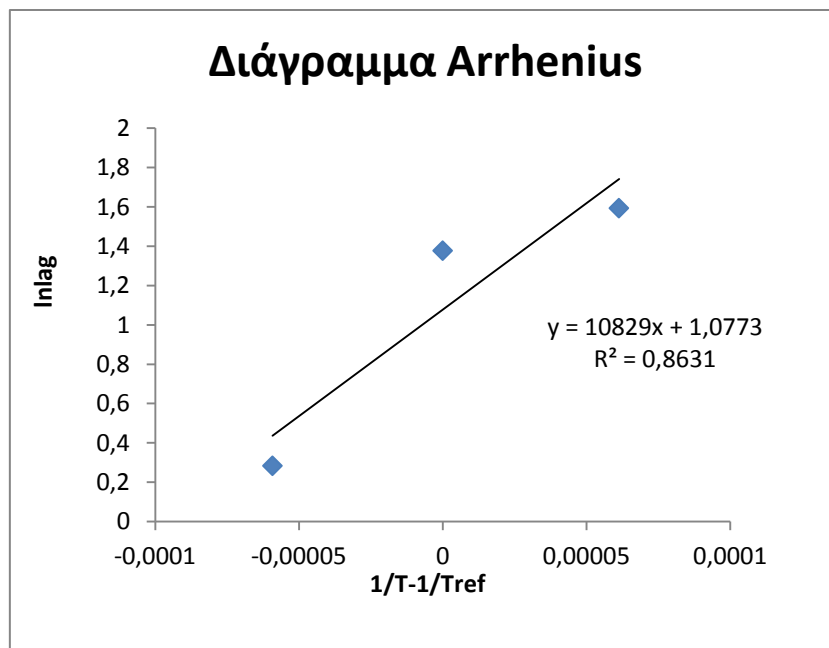
Αν και η παραγωγή ισταμίνης μπορεί να αποτελέσει παράγοντα ασφάλειας των ιχθυηρών, η παραγωγή της απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες (μεγαλύτερες από 10°C), στις οποίες ευαλλοιώτα τρόφιμα όπως τα νωπά ιχθυηρά έχουν πολύ περιορισμένο χρόνο ζωής. Η πιθανότητα να παραχθεί ισταμίνη σε ένα προϊόν εντός του χρόνου ζωής είναι πιο σημαντική στην περίπτωση ιχθυηρών τα οποία έχουν υποστεί μερική επεξεργασία (π.χ. αλάτιση, κάπνιση) ή συσκευασία (π.χ. τροποποιημένη ατμόσφαιρα) στα οποία επιτυγχάνεται επέκταση του χρόνου ζωής (Ozogul et al, 2004).

Κεφάλαιο 5: Κινητική μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης και παραγόντων υποβάθμισης ποιότητας & ασφάλειας σε ιχθυηρά

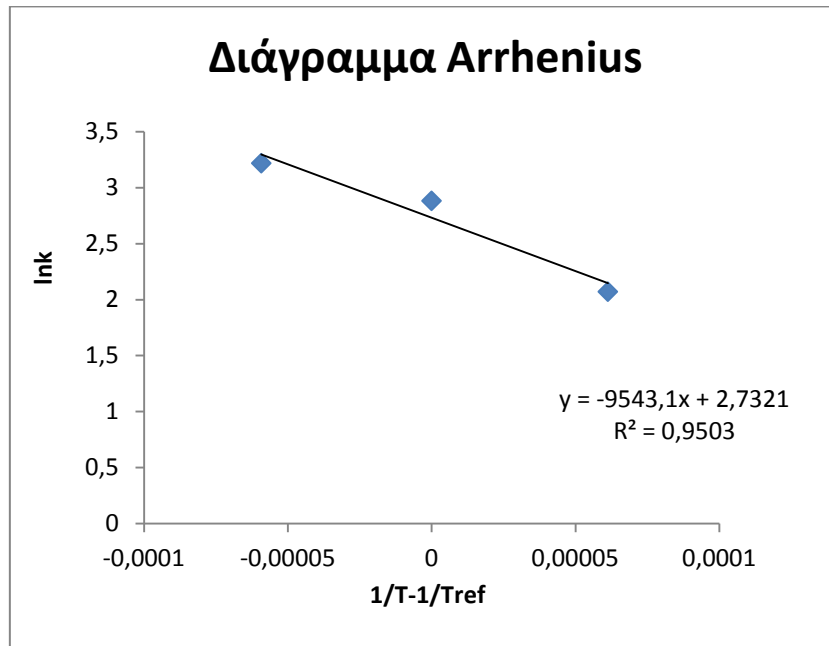
Πίνακας 5.14: Ρυθμοί παραγωγής ισταμίνης και οι λανθάνουσες φάσεις (lag phase) για θερμοκρασίες 10, 15, 20°C.

T (°C)	k (d ⁻¹)	lag (d)
10	7,946	4,921
15	17,883	3,964
20	25,021	1,328

Στη συνέχεια έγινε χρήση του ρυθμού παραγωγής ισταμίνης και της λανθάνουσας φάσης στις μελετώμενες θερμοκρασίες, προκειμένου να σχεδιαστούν τα διαγράμματα της γραμμικοποιημένης εξίσωσης Arrhenius με βάση τα οποία προσδιορίστηκαν οι τιμές ενέργειας ενεργοποίησης E_a και ρυθμών k_{ref} στη θερμοκρασία αναφοράς (15°C). Οι τιμές αυτές δίνονται στον πίνακα 5.15.



Σχήμα 5.59: Εφαρμογή του γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius για τη λανθάνουσα φάση του σχηματισμού της ισταμίνης.

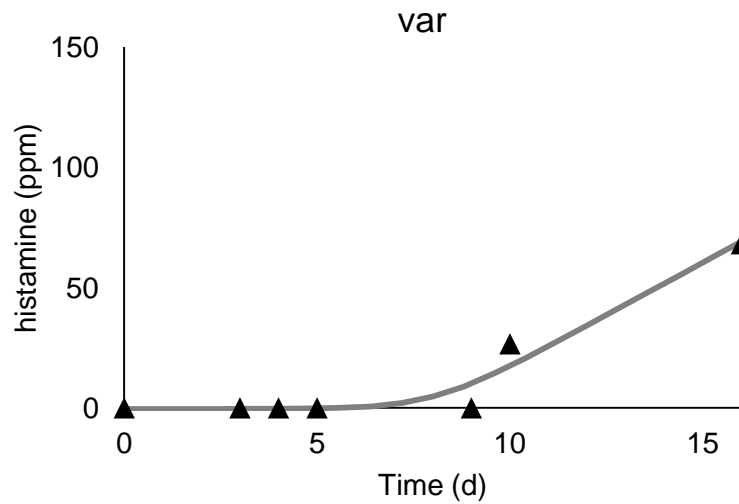


Σχήμα 5.60: Εφαρμογή του γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius για εκθετική φάση του σχηματισμού της ισταμίνης

Πίνακας 5.15: Κινητικά χαρακτηριστικά του σχηματισμού ισταμίνης.

	k (d^{-1})	$\ln k$ (d)
E_a (kJ/mol)	79,3	90,0
k_{ref}	15,365	2,937
R^2	0,950	0,863

Η T_{eff} στο μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακά πείραμα βρέθηκε ίση με $7,4^{\circ}C$. Στη συνέχεια παρατίθενται οι πειραματικός και ο θεωρητικός ρυθμός ανάπτυξης του *Morganella morganii*.



Σχήμα 5.61: Καμπύλη παραγωγής ισταμίνης σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες

Πίνακας 5.16: Πειραματικός και θεωρητικός ρυθμός σχηματισμού ισταμίνης σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.

	kexp (d⁻¹)	kpred(d⁻¹)	RE (%)
k	7,431	6,265	18,61
lag	8,030	8,128	1,2

Το σφάλμα είναι μικρότερο από 20% που είναι το όριο αποδοχής όπως ορίζεται στη βιβλιογραφία. (Dalgaard et al., 1997; Gougouli et al., 2008).

6. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΙΧΘΥΗΡΩΝ

6.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό έγινε μελέτη για την επιλογή των κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας κέφαλου και τόνου.

Σημειώνεται ότι το τελικό σημείο των ενζυμικών ΤΤΙ αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης σε τιμή απόκρισης $X = \text{norm}(a+b) = 0,8$ και ότι για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε για τον κέφαλο και τον τόνο αρχικό φορτίο ίσο με $5 \log \text{cfu/g}$ και $4,8 \log \text{cfu/g}$ αντίστοιχα και όριο λήξης ίσο με $8 \log \text{cfu/g}$ και $7 \log \text{cfu/g}$ αντίστοιχα.

6.2 Επιλογή κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας κέφαλου και τόνου

Προκειμένου να γίνει επιλογή κατάλληλων ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ποιότητας του κάθε τροφίμου, πρέπει να γίνει συσχέτιση των χρόνων ζωής των ΤΤΙ με εκείνων του τροφίμου. Για να πραγματοποιηθεί η συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ και του χρόνου ζωής των ψαριών, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η Ενέργεια Ενεργοποίησης και οι χρόνοι ζωής του τροφίμου και των ΤΤΙ να έχουν παραπλήσιες τιμές ($E_{\text{Ατροφίμου}} = E_{\text{ΑΤΤΙ}}$) και $k_{\text{refτροφίμου}} = k_{\text{refΤΤΙ}}$. Όταν η διαφορά των $E_{\text{Δ}}$ είναι μικρότερη από 40 kJ/mol , τότε το σφάλμα στην εκτίμηση της ποιότητας θα είναι λιγότερο από 15%, το οποίο είναι συνήθως αποδεκτό (Ταουκίς & Labuza, 1989a).

Στη συνέχεια γίνεται συσχέτισμός του ΤΤΙ με:

- το χρόνο ζωής των δειγμάτων κέφαλου.
- το χρόνο ζωής των δειγμάτων τόνου.
- με τον απαιτούμενο χρόνο για την παραγωγή ισταμίνης σε επίπεδα που σχετίζονται με σκομβροειδωση, βάσει της μελέτης παραγωγής ισταμίνης σε κέφαλο ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης *Morganella morganii*.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι ενέργειες ενεργοποίησης για τους ρυθμούς μικροβιακής ανάπτυξης (ολική μικροβιακή χωρίδα) στον κέφαλο και τον τόνο (ψευδομονάδες) καθώς και για τους ρυθμούς απόκρισης των μελετώμενων ΤΤΙ

τύπου Μ και LP. Επίσης, δίνεται και η ενέργεια ενεργοποίησης της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και του σχηματισμού ισταμίνης.

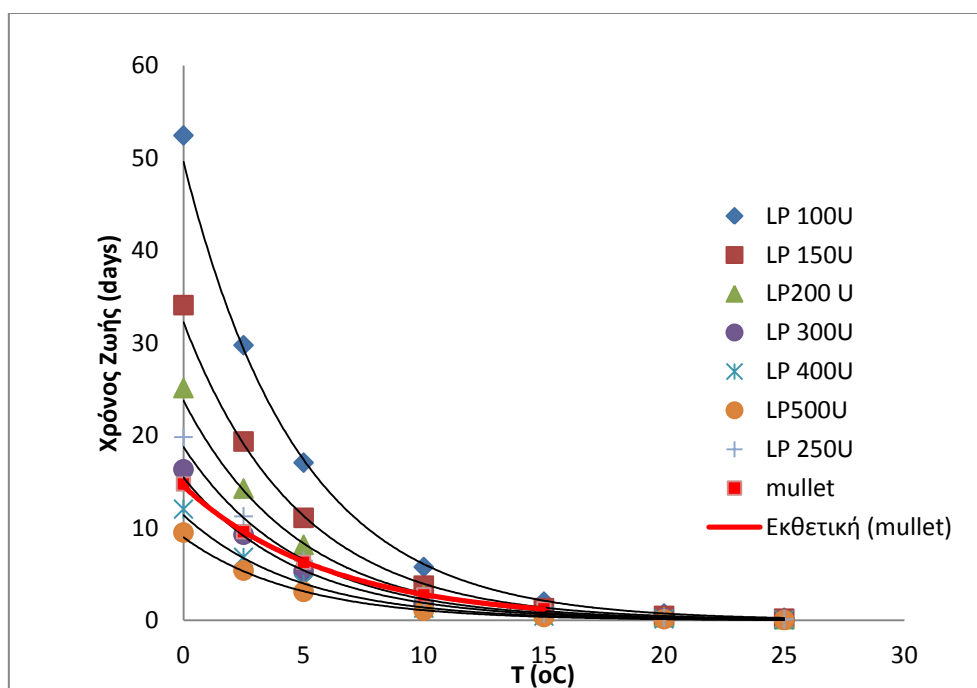
Πίνακας 6.1: Ενέργειες ενεργοποίησης τόνου, κεφάλου, σχηματισμού ισταμίνης και των ΤΤΙ τύπου Μ και LP

	ΟΜΧ Κέφαλος	Ψευδομονάδες Τόνος	Ισταμίνη (lag phase)	Ισταμίνη (εκθετική φάση)	Μ – ΤΤΙ	LP - ΤΤΙ
Ea (kJ/mol)	107,8	42,2	90,0	79,3	86,8	141,9

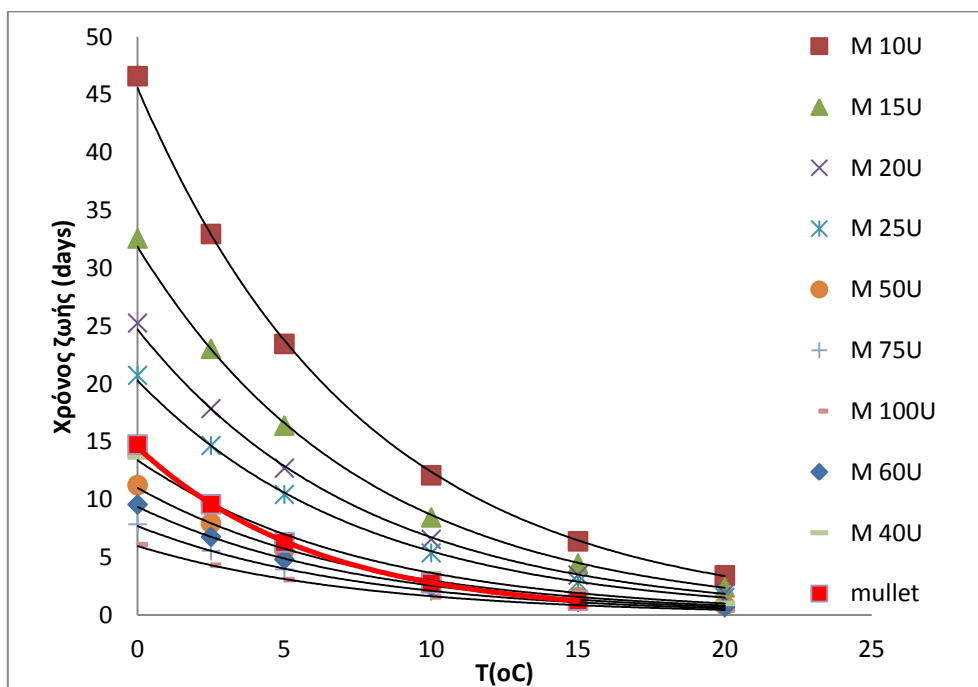
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα συσχέτισης των θεωρητικών χρόνων ζωής των δεικτών με το χρόνο ζωής του κεφάλου και του τόνου αντίστοιχα.

Για τον κέφαλο

Συσχετισμός ΤΤΙ με χρόνο το ζωής κεφάλου που προσδιορίστηκε από μικροβιολογική ανάλυση

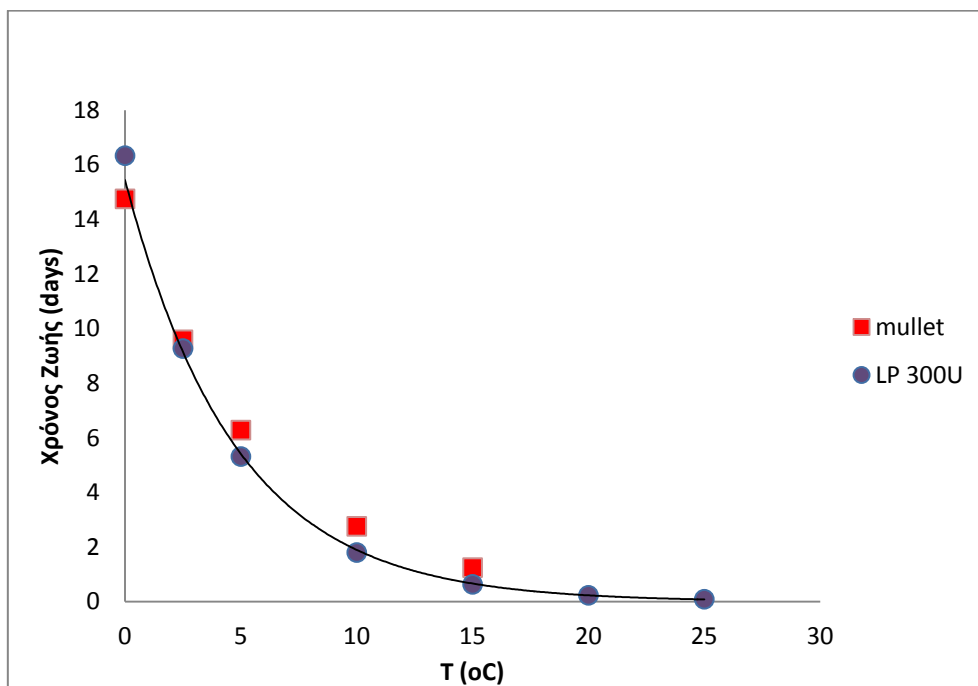


Σχήμα 6.1: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP με το χρόνο ζωής κεφάλου με όριο αποδοχής logcfu=8 για την ολική μικροβιακή χλωρίδα.



Σχήμα 6.2: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών ΤΤΙ τύπου Μ με το χρόνο ζωής κέφαλου με όριο αποδοχής $\log_{10}cfu=8$ για την ολική μικροβιακή χλωρίδα.

Από τα παραπάνω διαγράμματα συμπεραίνουμε πως καλύτερος συσχετισμός μπορεί να γίνει με τον δείκτη LP 300U. Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζεται ο συσχετισμός του συγκεκριμένου δείκτη με τον κέφαλο.



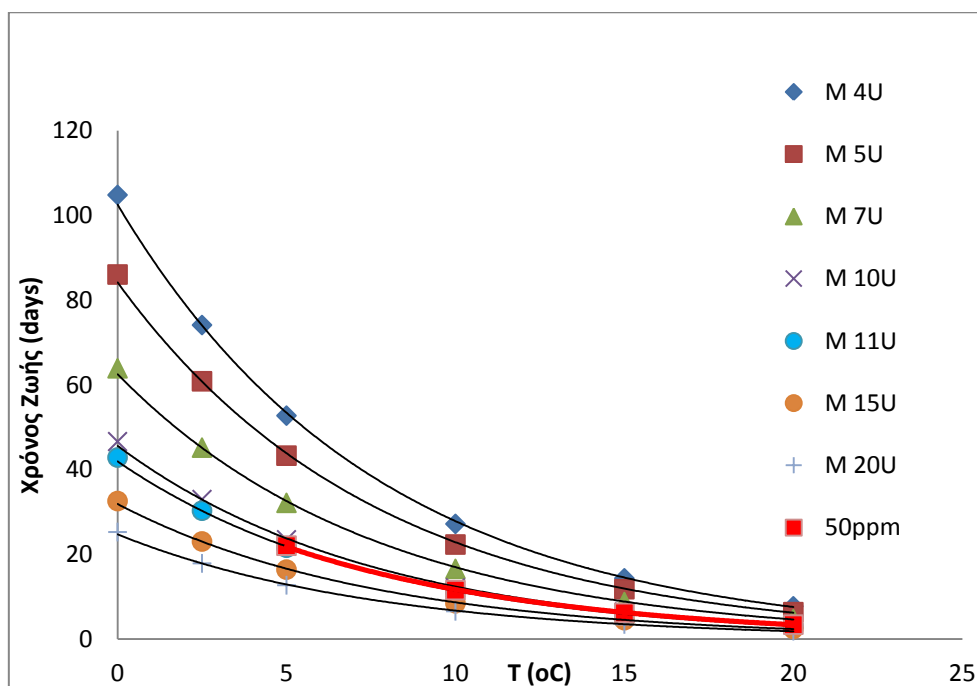
Σχήμα 6.3: Συσχέτιση του θεωρητικού χρόνου απόκρισης του ενζυμικού μελετούμενου ΤΤΙ LP 300U με το χρόνο ζωής του κέφαλου με όριο αποδοχής $\log_{10}cfu=8$ για την ολική μικροβιακή χλωρίδα.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, ο χρόνος ζωής του κεφάλου συσχετίζεται ικανοποιητικά με τον ενζυμικό δείκτη LP 300U. Από το σχήμα 6.3 προκύπτει ότι ο δείκτης δρα συντηρητικά για την προστασία του καταναλωτή σε υψηλές θερμοκρασίες προειδοποιεί δηλαδή τον χρήστη ότι η ποιότητα του τροφίμου δεν είναι ενδεδειγμένη πριν τη λήξη του, ενώ στις χαμηλές θερμοκρασίες (<2,5°C) ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου.

Συσχετισμός ΤΤΙ με τον απαιτούμενο χρόνο που προσδιορίστηκε από μικροβιολογική ανάλυση μελέτης για σχηματισμό ισταμίνης

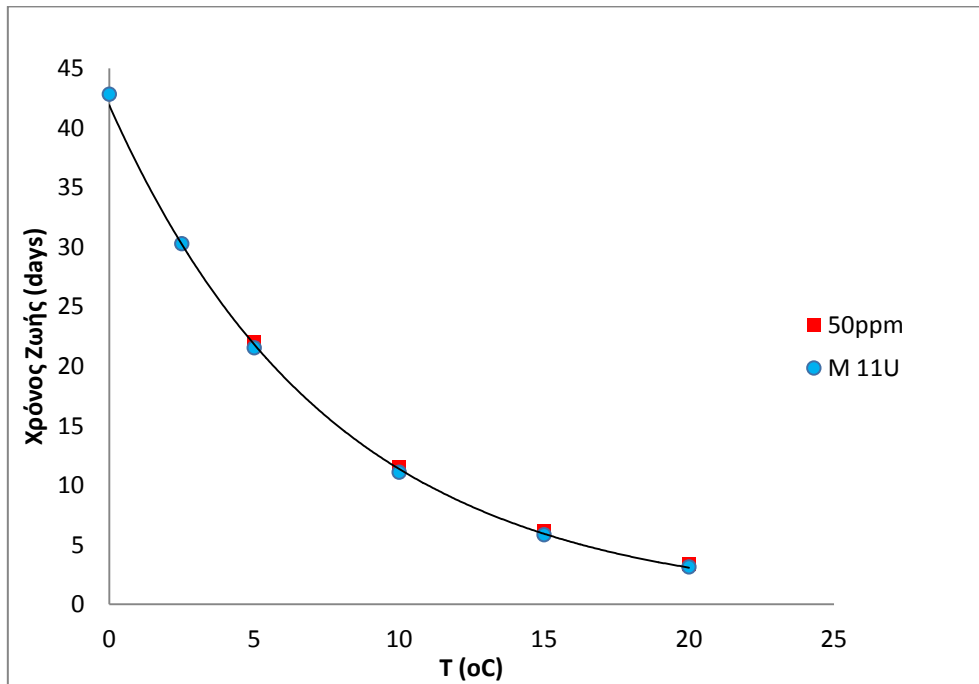
Δεδομένου ότι το γενικό όριο τροφικής δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι 200mg/kg, το όριο στους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης 100mg/kg και στις Η.Π.Α. 50mg/kg, θα γίνει συσχετισμός ΤΤΙ και για τις τρεις αυτές συγκεντρώσεις.

Παρακάτω δίνονται τα διαγράμματα συσχετισμού των παραπάνω συγκεντρώσεων ισταμίνης.



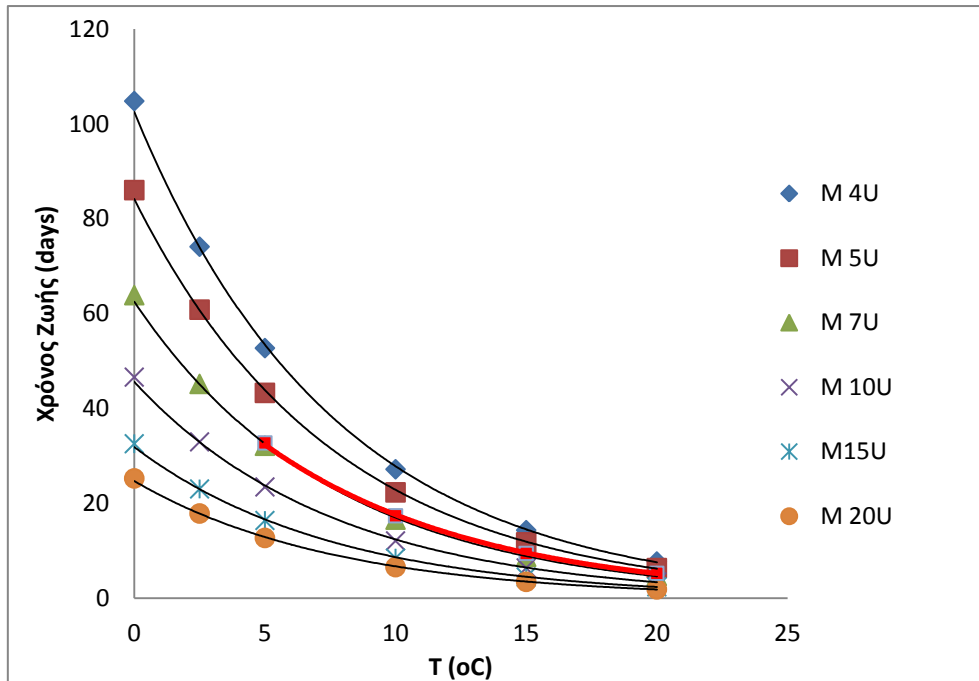
Σχήμα 6.4: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών ΤΤΙ τύπου Μ με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 50mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κεφάλου.

Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνουμε πως καλύτερος συσχετισμός μπορεί να γίνει με τον δείκτη Μ 11U. Στο σχήμα 6.5 παρουσιάζεται ο συσχετισμός αυτός.

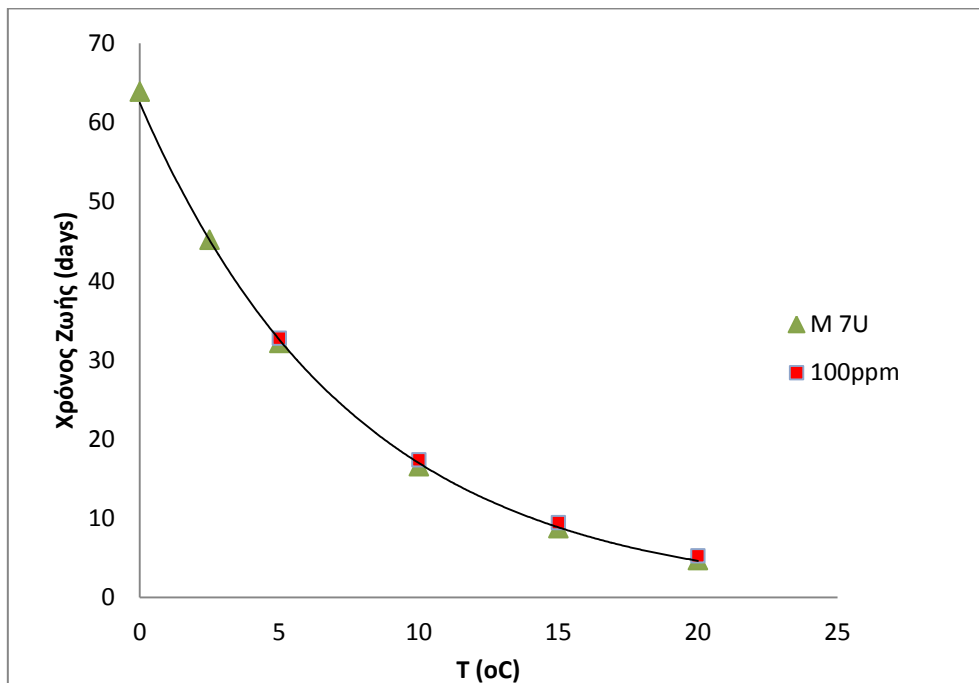


Σχήμα 6.5: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού ΤΤΙ M11U με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 50mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, ο απαιτούμενος χρόνος για το σχηματισμό 50mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου θα μπορούσε να συσχετιστεί καλύτερα με τον ενζυμικό δείκτη M 11U. Η απόκριση του δείκτη σχεδόν ταυτίζεται με την παραγωγή ισταμίνης στον κέφαλο.

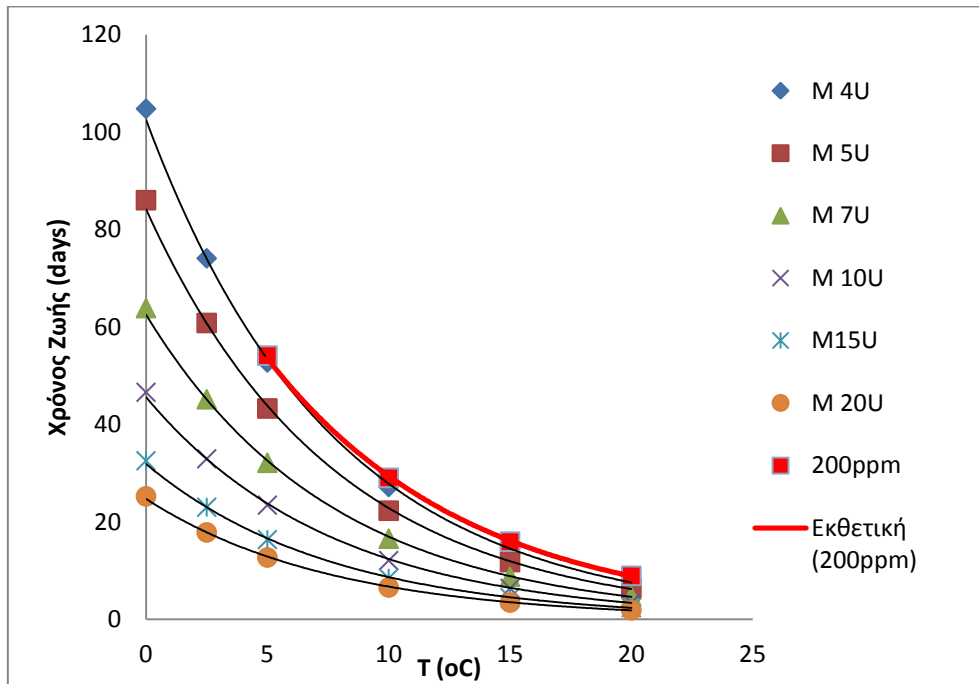


Σχήμα 6.6: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών ΤΤΙ τύπου Μ με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 100mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.

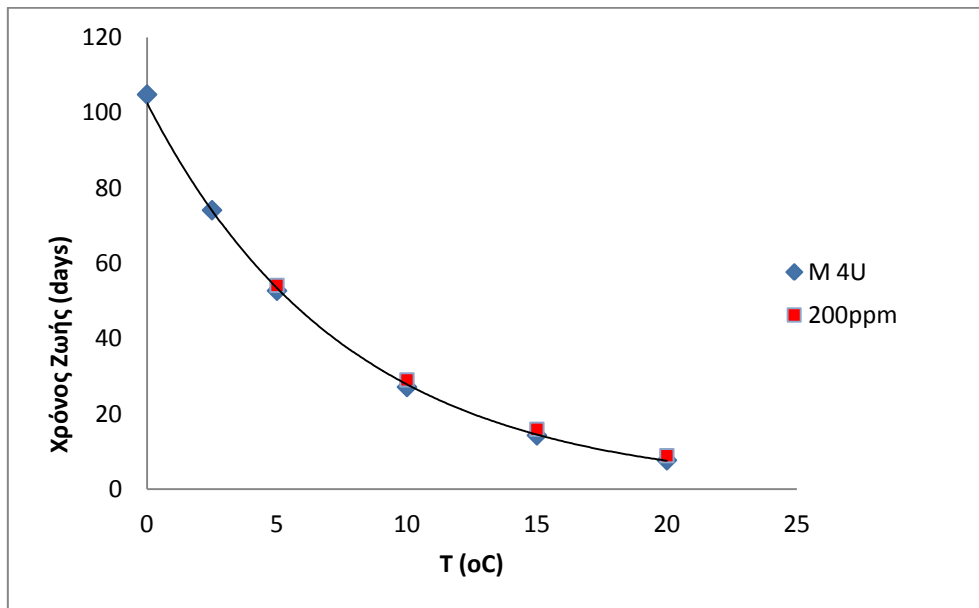


Σχήμα 6.7 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού ΤΤΙ Μ 7U με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 100mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, ο χρόνος ζωής θα μπορούσε να συσχετιστεί καλύτερα με τον ενζυμικό δείκτη Μ 7U.



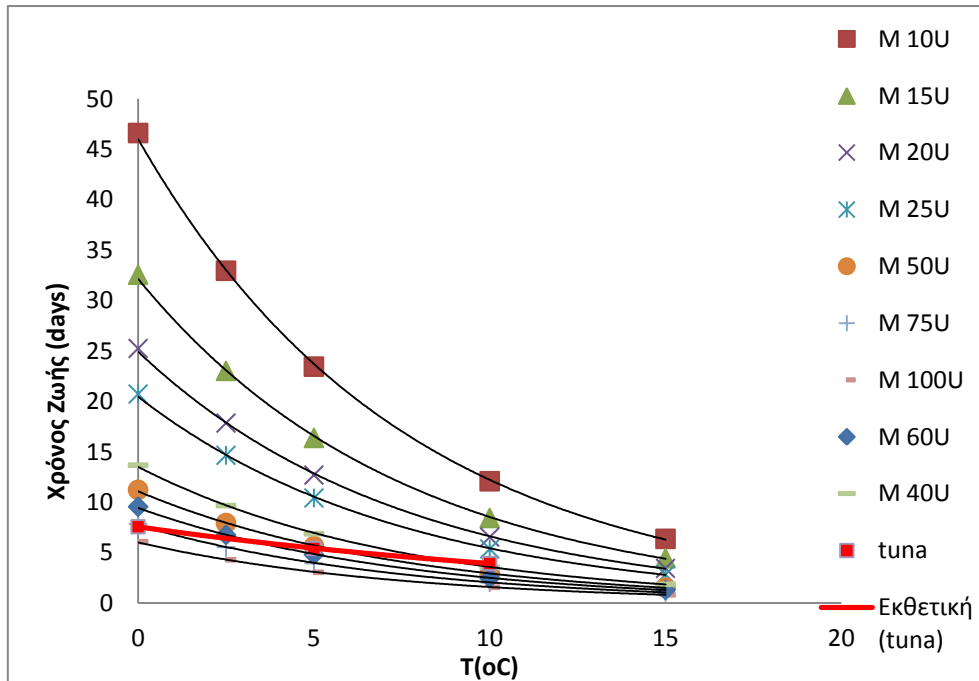
Σχήμα 6.8: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών ΤΤΙ τύπου Μ με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 200mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.



Σχήμα 6.9: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού ΤΤΙ Μ 4U με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 200mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.

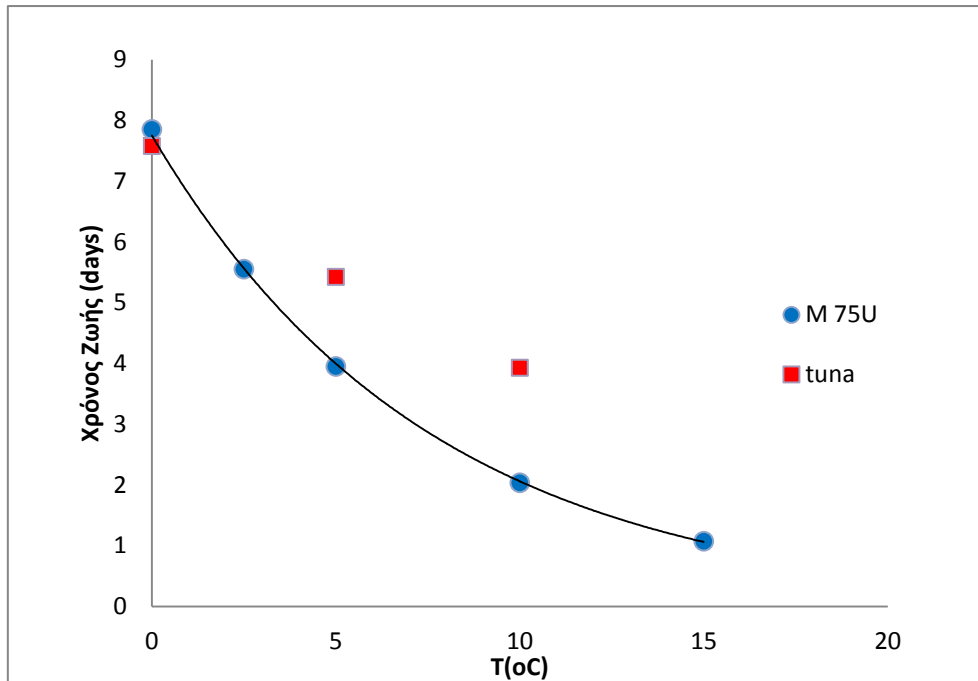
Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, ο χρόνος ζωής θα μπορούσε να συσχετιστεί καλύτερα με τον ενζυμικό δείκτη Μ 4U. Από το σχήμα 6.9 φαίνεται ότι η απόκριση του δείκτη ακολουθεί με ακρίβεια την παραγωγή ισταμίνης στον κέφαλο.

Για τον τόνο



Σχήμα 6.10: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικών ΤΤΙ τύπου Μ με το χρόνο ζωής τόνου με όριο αποδοχής $\log_{10}cfu=7$ για τις ψευδομονάδες.

Από τα παραπάνω διαγράμματα συμπεραίνουμε πως καλύτερος συσχετισμός μπορεί να γίνει με τον δείκτη Μ 75U. Στο σχήμα 6.6 παρουσιάζεται ο συσχετισμός του συγκεκριμένου δείκτη με τον τόνο.



Σχήμα 6.11: Συσχέτιση του θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού μελετούμενου ΤΤΙ M 75U με το χρόνο ζωής του τόνου με όριο αποδοχής $\log_{cfu}=7$ για τις ψευδομονάδες.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, ο χρόνος ζωής του τόνου θα μπορούσε να συσχετιστεί καλύτερα με τον ενζυμικό δείκτη M 75U. Γενικά παρατηρούμε ότι ο συσχετισμός αυτός δεν είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικός λόγω της απόκλισης των ενεργειών ενεργοποίησης E_a για την απόκριση του δείκτη και τη μικροβιακή ανάπτυξη στον τόνο. Παρ' όλα αυτά από το σχήμα 6.11 φαίνεται ότι ο δείκτης δρα συντηρητικά για την προστασία του καταναλωτή σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ στους 0°C ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου.

7. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σκοπό αυτής της εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών ΤΤΙ καθώς και η επιλογή των κατάλληλων χρονοθερμοκρασιακών ενζυμικών δεικτών για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας ιχθυηρών. Πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ για τον υπολογισμό των συναρτήσεων απόκρισης και των χαρακτηριστικών των δεικτών ΤΤΙ στις θερμοκρασίες μελέτης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης σε επιλεγμένα ιχθυηρά καθώς και μελέτη της παραγωγής ισταμίνης στον κέφαλο από τον μικροοργανισμό *Morganella morganii*, ώστε να γίνει επιλογή κατάλληλων δεικτών.

Κινητική μελέτη ενζυμικών δεικτών ΤΤΙ

Οι ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν, οι συγκεντρώσεις καθώς και οι θερμοκρασίες στις οποίες έγιναν τα πειράματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7.1: Συγκεντρώσεις και θερμοκρασίες αποθήκευσης των ενζυμικών δεικτών τύπου LP και M που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική.

Τύπος	Συγκεντρώσεις (Units)	Θερμοκρασίες (°C)
M	5,10,15,20,25,50,75,100	0, 2.5, 5, 10, 15
LP	100,150,300,500	0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25

Πραγματοποιήθηκε προσαρμογή σιγμοειδούς καμπύλης $F(X_C)$ στο υπολογιστικό πρόγραμμα Sigmaplot 10.0 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 , k_2 για κάθε θερμοκρασία. Με τη βοήθεια του προγράμματος Systat 10.2 και με τη χρήση της εξίσωσης (4.3) προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (E_a , k_{1ref} , k_{2ref} , R^2) κάθε ενζυμικού δείκτη (Πίνακας 4.25). Στη συνέχεια υπολογίστηκε και η διάρκεια ζωής τους (Πίνακες 4.30 και 4.31).

Πίνακας 4.25: Κινητικά χαρακτηριστικά των ενζυμικών δεικτών.

Τύπος ΤΤΙ	C (units)	$k_{1ref}(d)$	$k_{2ref}(d)$	E_a (kJ/mol)	R^2
LP	100	15,895	4,405	147,9	0,977
LP	150	9,769	3,171	140,8	0,984
LP	300	4,451	1,326	141,5	0,988
LP	500	2,578	0,784	134,6	0,964
M	5	39,723	7,789	91,2	0,984
M	10	39,723	7,789	91,2	0,984
M	15	14,325	2,376	89,9	0,982
M	20	12,041	2,125	76,9	0,896

M	25	10,101	1,668	84,7	0,977
M	50	5,365	0,901	88,4	0,988
M	75	3,658	0,622	96,8	0,977
M	100	2,766	0,447	89,9	0,984

Πίνακας 4.30: Πειραματική διάρκεια ζωής (response time) σε μέρες των ενζυμικών ΤΠΙ τύπου LP σε θερμοκρασίες 0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C και 25°C.

T (°C)	100U	150U	300U	500U
0	50,7	36,7	15,5	9,51
2,5	30,6	17,8	8,46	4,89
5	18,5	12,5	5,81	3,04
10	6,40	3,80	1,72	0,815
15	1,74	1,36	0,603	0,364
20	0,636	0,584	0,195	0,154
25	0,210	0,173	0,0902	0,061

Πίνακας 4.31: Πειραματική διάρκεια ζωής (response time) σε μέρες των ενζυμικών ΤΠΙ τύπου M σε θερμοκρασίες 0°C, 2,5°C, 5°C, 10°C και 15°C.

T (°C)	5U	10U	15U	20U	25U	50U	75U	100U
0	93,2	45,0	30,31	25,7	21,2	11,3	7,89	6,19
2,5	62,4	30,4	21,4	16,0	14,3	8,07	5,90	4,01
5	43,7	22,10	16,1	12,7	10,3	5,76	3,83	2,78
10	20,5	12,6	7,62	8,61	6,27	3,05	2,05	1,73
15	11,8	6,53	3,99	3,41	2,73	1,48	0,835	0,762

Για τους δύο τύπους ενζυμικών ΤΠΙ, M και LP, αναπτύχθηκαν δύο συνολικά ανεξάρτητα μαθηματικά μοντέλα τα οποία περιγράφονται από την παρακάτω εξίσωση (Εξίσωση 4.6). Στη συνέχεια δίνονται οι πίνακες 4.32 και 4.33 με τις παραμέτρους των μοντέλων για τους δείκτες τύπου LP και M αντίστοιχα.

$$X = F(X_C) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{1ref} (C=1) C^{-a} \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] - t}{k_{2ref} (C=1) C^{-b} \exp\left[\frac{E_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]}\right)} \quad (4.6)$$

Πίνακας 4.32: Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP.

$k_{1ref(C=1U)}(d)$	2117,7
a	1,074
E_A (kJ/mol)	141,9
$k_{2ref(C=1U)}(d)$	522
b	1,033
R^2	0,972

Πίνακας 4.33: Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου M.

$k_{1ref(C=1U)}(d)$	162,0
a	0,877
E_A (kJ/mol)	86,8
$k_{2ref(C=1U)}(d)$	31,646
b	0,913
R^2	0,961

Με βάση τις παραπάνω παραμέτρους για τον κάθε ενζυμικό τύπο ΤΤΙ, υπολογίστηκαν οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής (πίνακες 4.34, 4.35) και συγκρίθηκαν με τους πειραματικούς (Διαγράμματα 4.45, 4.46).

Διαπιστώθηκε ότι η κλίση της γραμμής τάσης που εφαρμόζουμε είναι πολύ κοντά στη μονάδα επομένως οι πειραματικοί χρόνοι απόκρισης των ενζυμικών ΤΤΙ τύπου LP και M έχουν ελάχιστη απόκλιση από τους χρόνους απόκρισης που πρόέκυψαν από τα κινητικά μοντέλα.

Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΤΙ, μειώνονται οι σταθερές k_1 και k_2 , οι οποίες είναι αντιστρόφως ανάλογες του ρυθμού απόκρισης. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου στο ΤΤΙ, τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση του ρυθμού μεταβολής χρώματος. Επιπρόσθετα, όμοια αποτελέσματα έχουμε και με αύξηση της θερμοκρασίας που υποβάλλεται το ΤΤΙ. Επίσης, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου, μειώνεται και η διάρκεια ζωής του, αφού όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου, τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται και η ενζυμική αντίδραση. Για την αξιοπιστία των ενζυμικών δεικτών, πραγματοποιήθηκε μελέτη της απόκρισης των δεικτών LP 100U και M 25U σε δυναμικές συνθήκες ($T_{eff}=7.4^{\circ}C$). Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν και για τους δύο δείκτες τους κατέστησαν αξιόπιστους.

Μελέτη μικροβιολογικής ανάπτυξης σε ιχθυηρά

Για τη μελέτη της μικροβιολογικής ανάπτυξης σε κέφαλο (*Mugil cephalus*) και τόνο (*Thunnus alalunga*) πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές και δυναμικές συνθήκες. Διερευνήθηκε η ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών και διαπιστώθηκε ότι ο κύριος αλλοιογόνος μικροοργανισμός για τον τόνο είναι οι ψευδομονάδες, αφού το φορτίο στα δείγματα στο τέλος της συντήρησης ήταν αντίστοιχο του ολικού μικροβιακού φορτίου. Στην περίπτωση του κέφαλου παρατηρήθηκε παρόμοια ανάπτυξη ψευδομονάδων και εντεροβακτηρίων οπότε η μελέτη βασίστηκε στο φορτίο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας που περιέγραψε ικανοποιητικά την ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών. Γενικά παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας, δηλαδή η υψηλότερη θερμοκρασία οδηγεί σε ταχύτερη ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για τον υπολογισμό του χρόνου ζωής των ιχθυηρών το όριο μικροβιολογικής ανάπτυξης ήταν η τιμή $\log N=8$ cfu/g για την ολική μικροβιακή χλωρίδα στον κέφαλο και η τιμή $\log N=7$ cfu/g για τις ψευδομονάδες στον τόνο.

Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH και οργανοληπτική αξιολόγηση. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στο pH κατά τη συντήρηση των δειγμάτων των ιχθύων δεν παρουσιάζει συσχέτιση με το χρόνο και τη θερμοκρασία συντήρησης.

Με βάση τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ιχθύων, προκύπτει ότι και για τα δύο μελετώμενα είδη ψαριού, ο ρυθμός υποβάθμισης της οργανοληπτικής ποιότητας ήταν σημαντικά υψηλότερος στις υψηλές θερμοκρασίες (10 και 15°C) απ' ότι στις χαμηλότερες. Με βάση τα διαγράμματα 5.16 και 5.17 της συνολικής εντύπωσης (βλ. Κεφάλαιο 5, παράγραφο 5.2.3), προκύπτει ότι ο χρόνος που τα δείγματα ήταν αποδεκτά από τους δοκιμαστές στις υψηλότερες θερμοκρασίες ήταν μικρότερος από 5 μέρες, ενώ στις πιο χαμηλές θερμοκρασίες στην περίπτωση του κέφαλου ξεπερνάει τις 10 (0 και 2,5°C) και του τόνου τις 7 ημέρες (0°C).

Στη συνέχεια, έγινε προσαρμογή των μικροβιολογικών μετρήσεων στο μοντέλο Baranyi και προέκυψαν οι ρυθμοί ανάπτυξης για κάθε θερμοκρασία (Πίνακες 5.4 και 5.5). Με αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης, αυξάνεται ο εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης όλων των μικροοργανισμών και στα δύο ψάρια, δηλαδή το τρόφιμο αλλοιώνεται πιο γρήγορα. Σε επόμενο βήμα, κάνοντας χρήση του γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius, υπολογίζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά (E_A , k_{ref}) των μοντέλων μικροβιακής ανάπτυξης του κέφαλου και του τόνου (Πίνακες 5.6 και 5.7 αντίστοιχα).

Επιπρόσθετα έγινε προσδιορισμός του χρόνου ζωής των δύο ιχθυηρών με αντικατάσταση των θεωρητικών δεδομένων του ρυθμού ανάπτυξης της ολικής μικροχλωρίδας στην εξίσωση (5.1) για τον κέφαλο, και των ψευδομονάδων για τον

τόνο. Τα αποτελέσματα δίνονται στους πίνακες 5.8 και 5.9 αντίστοιχα για το κάθε τρόφιμο.

Προκειμένου να μελετηθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, έγινε μελέτη της αλλοίωσης δειγμάτων κέφαλου αποθηκευμένων σε δυναμικές συνθήκες ($T_{\text{eff}}=7,4^{\circ}\text{C}$). Στον πίνακα 5.10 δίνονται οι πειραματικοί και οι θεωρητικοί εκθετικοί ρυθμοί ανάπτυξης για μεταβλητές συνθήκες. Παρατηρείται ότι υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ τους, επομένως τα μοντέλα που προέκυψαν είναι αξιόπιστα για εφαρμογή στις δυναμικές συνθήκες της ψυκτικής αλυσίδας.

Σε επόμενο στάδιο, έγινε προσδιορισμός της ανάπτυξης του παθογόνου *Morganella morganii* στον κέφαλο σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες (0, 5, 10, 15, 20°C) καθώς και σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες προκειμένου τελικά να εξαχθεί μοντέλο παραγωγής ισταμίνης. Οι ρυθμοί ανάπτυξης που προέκυψαν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi δίνονται στον πίνακα 5.11. Στους 0°C δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια ενός μήνα συντήρησης. Στη συνέχεια με εφαρμογή του γραμμικοποιημένου μοντέλου Arrhenius, υπολογίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (E_A , k_{ref}) της ανάπτυξης του *Morganella morganii* και πραγματοποιήθηκε επαλήθευση του μοντέλου με μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακά πείραμα ($T_{\text{eff}}=7,4^{\circ}\text{C}$). Δεδομένου ότι το σφάλμα μεταξύ πειραματικού και θεωρητικού ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού αυτού υπολογίστηκε χαμηλότερο από 20% , τα αποτελέσματα θεωρούνται αξιόπιστα (Dalgaard et al., 1997; Gougouli et al., 2008).

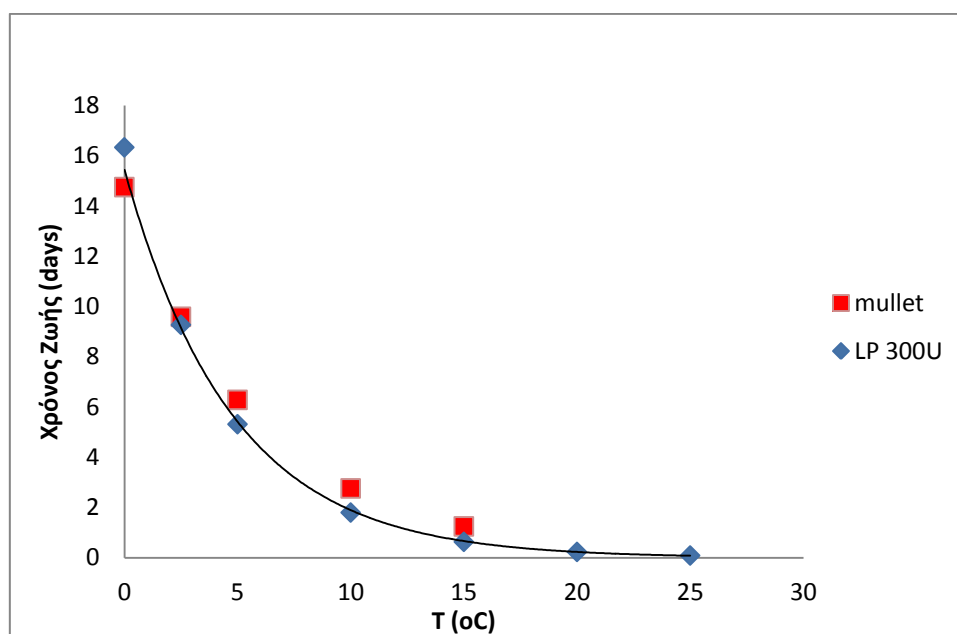
Τέλος, οι ρυθμοί σχηματισμού και οι λανθάνουσες φάσεις (lag phase) που προέκυψαν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi για την συγκέντρωση της ισταμίνης σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες δίνονται στον πίνακα 5.14. Προκύπτει ότι στους 5°C δεν υπήρξε παραγωγή της τοξίνης καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης και ότι οι χρόνοι ζωής των ιχθυηρών είναι σημαντικά μικρότεροι από το χρόνο που απαιτείται για να παραχθεί ισταμίνη σε μη αποδεκτά επίπεδα. Με χρήση των γραμμικοποιημένων διαγραμμάτων Arrhenius για την εκθετική φάση και τη λανθάνουσα φάση προκύπτουν τα κινητικά χαρακτηριστικά για το σχηματισμό ισταμίνης (πίνακας 5.15). Προκειμένου να γίνει επαλήθευση του μοντέλου, πραγματοποιήθηκε μελέτη της παραγωγής ισταμίνης σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες ($T_{\text{eff}}=7,4^{\circ}\text{C}$) και με σύγκριση των πειραματικών και των θεωρητικών ρυθμών το μοντέλο εκτιμήθηκε ως αξιόπιστο (πίνακας 5.16).

Συσχέτιση της κινητικής αλλοίωσης ιχθύων με κατάλληλο δείκτη ΤΤΙ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη μικροοργανισμών και συσχέτιση της ανάπτυξής τους με τη κινητική απόκριση επιλεγμένων ΤΤΙ.

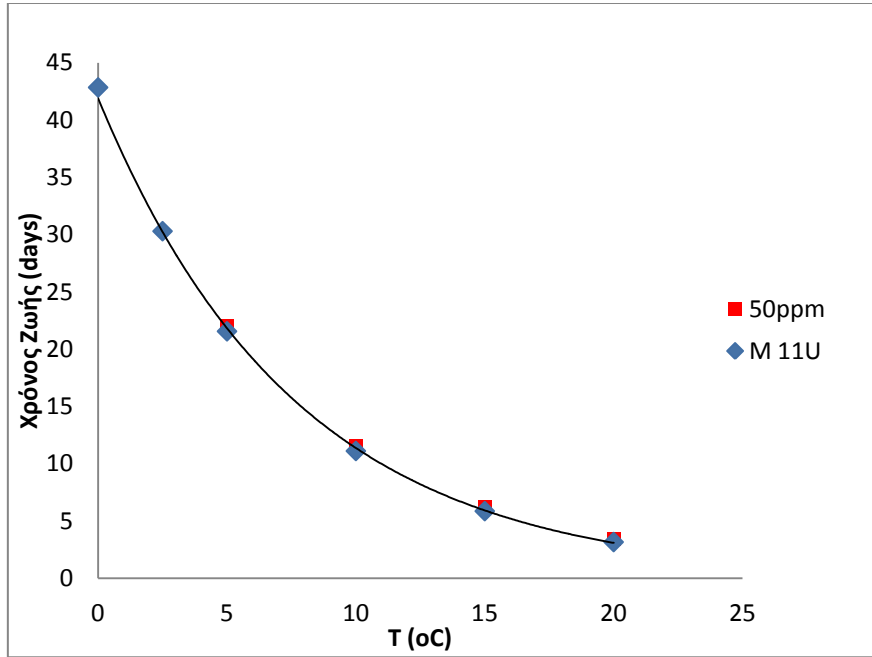
Συγκεκριμένα έγινε συσχετισμός με το χρόνο ζωής των δειγμάτων κεφάλου, το χρόνο ζωής των δειγμάτων τόνου καθώς και με τον απαιτούμενο χρόνο για την παραγωγή ισταμίνης σε επίπεδα που σχετίζονται με σκοβροείδωση, βάσει της μελέτης παραγωγής ισταμίνης σε κέφαλο ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης *Morganella morganii*. Προκειμένου να γίνει επιτυχής επιλογή ΤΤΙ για τον συσχετισμό έγινε σύγκριση μεταξύ των Ενεργειών ενεργοποίησης των ρυθμών μικροβιακής ανάπτυξης και των ρυθμών απόκρισης ΤΤΙ.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα συσχέτισης που προαναφέρθηκαν.

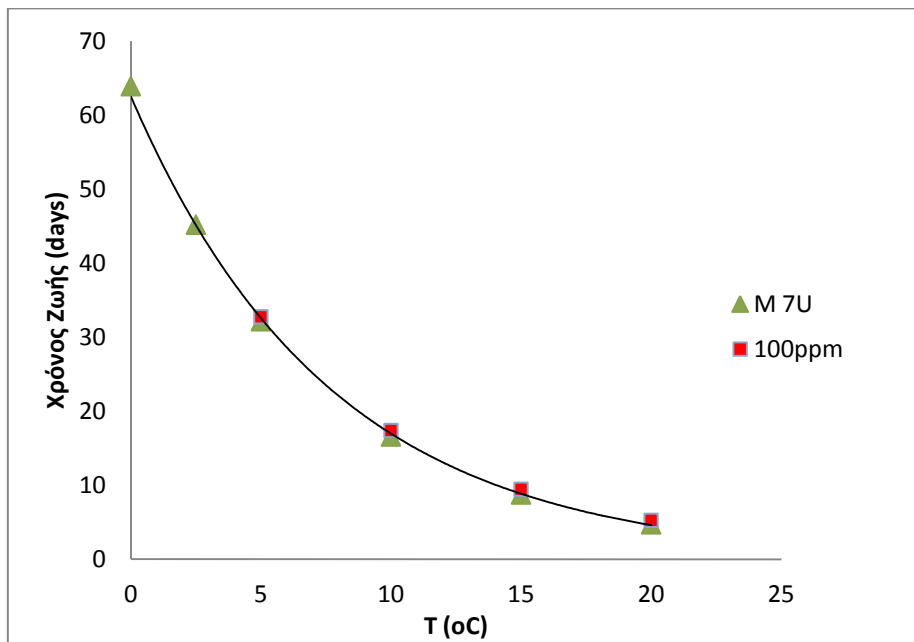


Σχήμα 6.3: Συσχέτιση του θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού μελετούμενου ΤΤΙ LP 300U με το χρόνο ζωής του κέφαλου με όριο αποδοχής $\log_{cfu}=8$ για την ολική μικροβιακή χλωρίδα.

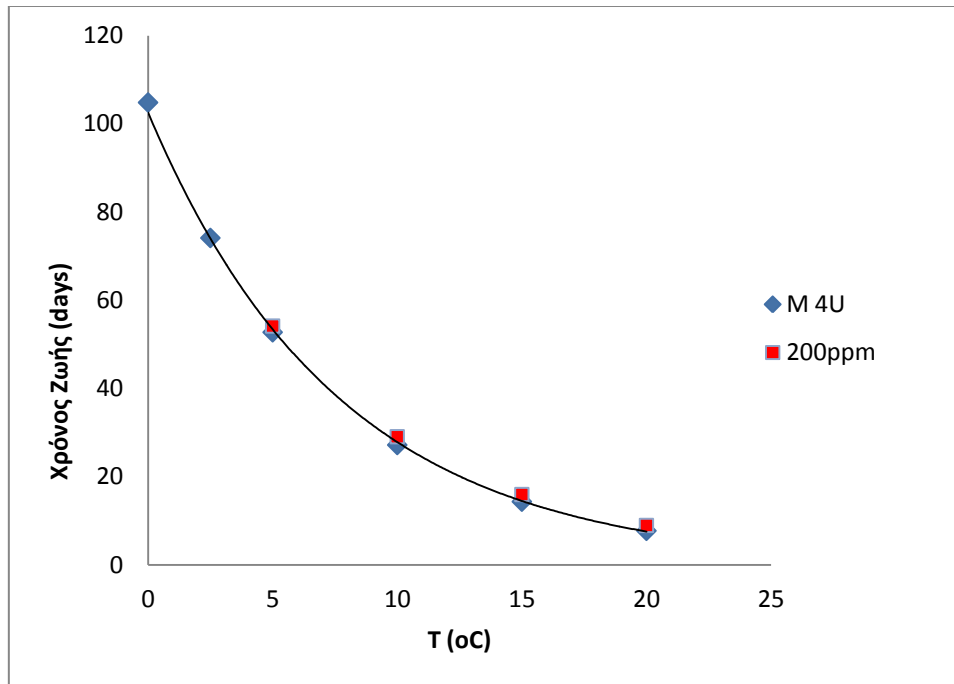
Από το σχήμα 6.3 προκύπτει ότι ο δείκτης δρα συντηρητικά για την προστασία του καταναλωτή, σε υψηλές θερμοκρασίες προειδοποιεί το χρήστη ότι η ποιότητα του τροφίμου δεν είναι ενδεδειγμένη πριν τη λήξη του, ενώ στις χαμηλές θερμοκρασίες ($<2,5^{\circ}\text{C}$) ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου.



Σχήμα 6.5: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού TTI M11U με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 50mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.



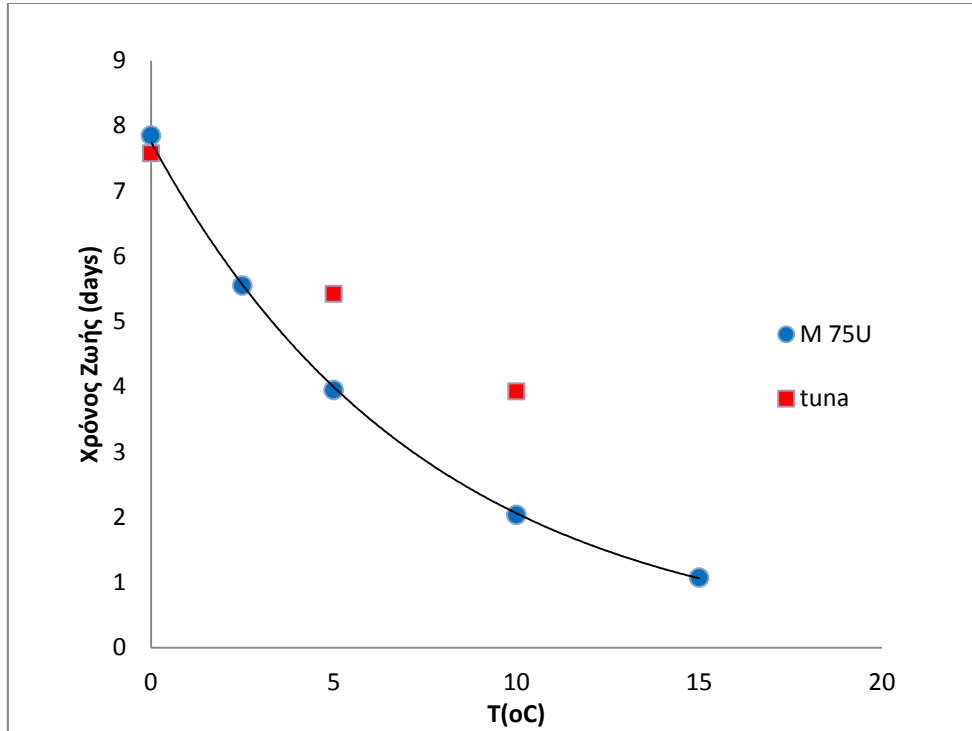
6.7 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού TTI M 7U με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 100mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.



Σχήμα 6.9: Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού ΤΤΙ Μ 4U με τον απαιτούμενο χρόνο για το σχηματισμό 200mg/kg ισταμίνης σε σάρκα κέφαλου.

Από τα σχήματα 6.7-6.9 προκύπτει ότι η απόκριση των επιλεγμένων δεικτών ακολουθεί με ικανοποιητική ακρίβεια την παραγωγή ισταμίνης στον κέφαλο.

Αναφορικά με την υποβάθμιση της ποιότητας του τόνου κατά τη συντήρηση σε ψύξη και την επιλογή κατάλληλου ΤΤΙ για την παρακολούθηση της ψυκτικής αλυσίδας του, παρακάτω παρουσιάζεται η συσχέτιση με τον πιο κατάλληλο δείκτη από τους μελετώμενους στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 6.11: Συσχέτιση του θεωρητικού χρόνου ζωής του ενζυμικού μελετούμενου ΤΤΙ Μ 75U με το χρόνο ζωής του τόνου με όριο αποδοχής $\log_{10}cfu=7$ για τις ψευδομονάδες.

Παρατηρείται ότι ο συσχετισμός αυτός δεν είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικός. Αυτό οφείλεται στην απόκλιση των ενεργειών ενεργοποίησης E_a ($E_{a_{\text{τόνου}}}=42,2\text{kJ/mol}$, $E_{a_{\text{ΜΤΤΙ}}}=86,82\text{kJ/mol}$ και $E_{a_{\text{LPΤΤΙ}}}=141,92\text{kJ/mol}$). Παρ' όλα αυτά από το σχήμα 6.11 προκύπτει ότι ο δείκτης δρα συντηρητικά για την προστασία του καταναλωτή σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ στους 0°C ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία είναι τα ακόλουθα:

Από την κινητική μελέτη των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (ΤΤΙ) αποδείχθηκε ότι για τους ενζυμικούς δείκτες τύπου LP και M, με αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου (Units), μειώθηκε η διάρκεια ζωής του δείκτη.

Για τους ενζυμικούς δείκτες ίδιας συγκέντρωσης ενζύμου (Units) με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται μείωση της διάρκειας ζωής του δείκτη.

Για κάθε ΤΤΙ που μελετήθηκε στις 5 πειραματικές επαναλήψεις σε κάθε θερμοκρασία αποθήκευσης, παρατηρήθηκε πολύ ικανοποιητική επαναληψιμότητα.

Η συσχέτιση που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των πειραματικών τιμών των χρόνων απόκρισης των ΤΤΙ με τις αντίστοιχες θεωρητικές τιμές που προέκυψαν από τα μαθηματικά μοντέλα απόκρισης, ήταν πολύ καλή.

Προκειμένου να γίνει επιλογή κατάλληλου δείκτη ΤΤΙ για τη διαχείριση ασφάλειας και ποιότητας κάθε τροφίμου επιβεβαιώθηκε ότι τα κινητικά χαρακτηριστικά των παραγόντων αλλοίωσης αυτού είναι απαραίτητο να σχετίζονται με τα αντίστοιχα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη.

Στις κρίσιμες θερμοκρασιακές περιοχές ($>5^{\circ}\text{C}$) συνίσταται να επιλέγεται χρονοθερμοκρασιακός δείκτης που να έχει συντηρητική δράση, δηλαδή το τρόφιμο να έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τον δείκτη, προκειμένου να προστατεύεται ο καταναλωτής. Για τις χαμηλές θερμοκρασίες ($<5^{\circ}\text{C}$) ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου.

Κατά τη μικροβιακή μελέτη του κέφαλου (*Mugil cephalus*) παρατηρήθηκε ότι οι ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια αναπτύχθηκαν με παρόμοιους ρυθμούς και τα τελικά φορτία ήταν παρόμοια με την ολική μικροβιακή χλωρίδα των δειγμάτων.

Στην περίπτωση του τόνου (*Thunnus alalunga*) ο επικρατέστερος αλλοιογόνος μικροοργανισμός ήταν οι ψευδομονάδες.

Κατά τη μελέτη παραγωγής της ισταμίνης στον κέφαλο, παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασίες αποθήκευσης μικρότερες των 5°C, δεν πραγματοποιήθηκε παραγωγή ισταμίνης σε χρονικό διάστημα ενός μήνα.

Παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος που απαιτήθηκε για να φτάσουν οι τιμές της ισταμίνης σε μη αποδεκτά επίπεδα ήταν μεγαλύτερος από τον χρόνο ζωής του κέφαλου.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ΤΠΙ δε πρέπει θεωρηθούν δείκτες για την παρουσία παθογόνων ή χημικών κινδύνων στα τρόφιμα, καθώς δε μπορούν να προβλέψουν την πιθανότητα επιμόλυνσης αυτού από παθογόνους μικροοργανισμούς ή χημικά, ούτε πραγματοποιούν άμεσο προσδιορισμό τους. Για την επιλογή των κατάλληλων ΤΠΙ, χρησιμοποιούνται σενάρια επιμόλυνσης του τροφίμου και συντήρησης σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, ώστε το ΤΠΙ να προειδοποιήσει το χρήστη όταν το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του συνδέεται με παράγοντες ασφάλειας (π.χ. ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, παραγωγή τοξίνης).

Για τη συνέχιση της παρούσας διπλωματικής εργασίας προτείνονται τα ακόλουθα:

Η διερεύνηση της καταλληλότητας άλλων τύπων ΤΠΙ με διαφορετικά κινητικά χαρακτηριστικά (χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης), για τη συσχέτισή του με τον τόνο, δεδομένης της μεγάλης απόκλισης των ενεργειών ενεργοποίησης που παρατηρήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα.

Η περαιτέρω μελέτη παραγωγής ισταμίνης στον κέφαλο και σε άλλες θερμοκρασίες.

Η μελέτη παραγωγής ισταμίνης σε ιχθυηρά στα οποία χρησιμοποιούνται μέθοδοι συντήρησης που αυξάνουν το χρόνο ζωής τους.

Η μελέτη για συσχέτιση της κινητικής απόκρισης χρονοθερμοκρασιακών δεικτών ΤΠΙ με την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών σε άλλα ευαλλοίωτα τρόφιμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anonymous, 1989. Time-Temperature indicators Packaging Strategies.

Anonymous, 1991. Time-temperature indicators: Research into consumer attitudes and behaviour. Ministry of Agriculture. Fisheries and Food National Consumer Council. MAFF-Publications, London.

Balamatsia C.C., Paleologos E.K., Kontominas M.G., Savvaidis I.N., 2006. Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4°C: possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Antonie van Leeuwenhoek* (2006) 89: 9-17.

Bengtsson N., Liljemark A., Olsson P., Nilsson B., 1972. An attempt to Systemize Time-Temperature Tolerance Data as a Basis for the Development of Time-Temperature Indicators. *Intl. Inst. Refrig. Bull. Suppl. 2*: 303-311.

Bester, C. 2004. Ichthyology at the Florida Museum of Natural History (On-line). Accessed July 16, 2017
<<http://www.flmnh.ufl.edu/fish/Gallery/Descript/StripedMullet/StripedMullet.html>.

Byrne C.H., 1976. Temperature Indicators - the state of the art. *Food Technol.* 30(6), 66-68.

Centers for Disease, C. and Prevention, 2007. Scombroid fish poisoning associated with tuna steaks—Louisiana and Tennessee, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56:817–819.

Chen J.H., Zall R.R., 1987a. Packaged milk, cream and cottage cheese can be monitored for freshness using polymer indicator labels. *Dairy Food Sanitation*, 7 (8) 402-5.

Chen J.H. and Zall R.R., 1987b. Refrigerated Orange Juice can be monitored for freshness using a polymer indicator label. *Dairy Food Sanitation*, 7 280-3.

Choulitoudi E., Bravou K., Bimpilas A., Tsironi T., Tsimogiannis D., Taoukis P., Orepoulou V., 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of *Satureja thymbra* in gilthead seabream fillets edible coating. *Food and Bioproducts Processing*, 100 (2016) 570–577.

Cook R., 1990. Marketing food safety: A double - edged sword. *Perishable Handling* (Univ. of California - Davis), 69.

Dalgaard P., Huss H. H., 1995. Mathematical modeling used for evaluation and prediction of microbial fish spoilage. In: Seafood safety, processing and biotechnology. Kreamer, D., Shahidi F. and Y. Jones, (eds). Technomic Pub Co Inc. Lancaster, Canada. p73-89.

DalgaardP., 1995, Modelling of microbial activity and prediction of shelf–life for packed fresh fish, Int J of Food Microbiol, 26 305–17.

Dalgaard, P., Emborg, J., Kjolby, A., Sorensen, N.D. and Ballin, N.Z., 2008. Histamine and biogenic amines: formation and importance in seafood. [book auth.] T. Borresen. Improving seafood products for the consumer. Cambridge, England : CRC Press, Woodhead Publishing Ltd, 2008.

Dolan K.D., Singh R.P. and Wells J.H., 1985. Evaluation of time-temperature related quality changes in ice cream during storage. J. Food Proc. Preserv., (9) 253-71.

Ellouze M., Austin J-C, 2010. Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. International Journal of Food Microbiology 138, 119-129.

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal 9, 2393–2486.

Fu, B., & Labuza, T. P. 1993. Shelf-life prediction: theory and application. *Food Control*, 4(3), 125-133.

FAO/WHO, 2013. Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report.

Frangos L., Pyrgotou N., Giatrakou V., Ntzimani A., Savvaidis I.N., 2010. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food Microbiology 27 (2010) 115–121.

Galagan Y. and Su W.-F, 2008. Fadable ink for time–temperature control of food freshness: Novel new time–temperature indicator. Food Research International 41 (2008) 653–657.

Giannakourou M. and Taoukis P.S., 2003a. Application of a TTI-based distribution management system for quality optimisation of frozen vegetables at the consumer end. J.Food Sci. 68(1), 201-209.

Giannakourou M. and Taoukis P.S., 2003b. Kinetic modelling of Vitamin C loss in frozen green vegetables at variable storage conditions. Food Chemistry, 83, 33-4.

Giannakourou M., Koutsoumanis K., Nychas G-J and Taoukis P.S., 2001. Development and assessment of an intelligent shelf life decision system for quality optimization of the food chill chain. *J Food Protection* 64(7), 1051-1057.

Giannoglou, M., Touli, A., Platakou, E., Tsironi, T. and Taoukis, P.S., 2014. Predictive modeling and selection of TTI smart labels for monitoring the quality and shelf life of frozen seafood, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 294-301.

Gram L., Huss H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, volume 22, Issue 1, November 1996, p121-137.

Guizani N., Al-Busaidy M.A., Al-Belushi I.M., Mothershaw A., Rahman M.S., 2005. The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Research International*, 38 (2005) 215–222.

HU K.H., 1972. Time-temperature indicating system 'writes' status of product shelf-life. *Food Technology*, 26(8): 56-62.

Hungerford JM. 2010. Scombroid poisoning: a review. *Toxicon* 56: 231–243

Kim Y.-M., Paik H.-D. and Lee D.-S., 2002. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin- coated plastic packaging film. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 998-1002.

Krammer A. and Farquhar J.W., 1976. Testing of Time-Temperature Indicating and Defrost Devices, *Food Technol.*, 32(2): 50, 53, 56.

Koutsoumanis K. and Sofos J.N., 2005. Microbiology of carcasses and cuts. In: Jensen W., Devine C., and Dikeman, M. eds. *Encyclopedia of Meat Sciences*. Academic Press.

Koutsoumanis K., Stamatiou A.P., Drosinos E.H., Nychas G.-J.E., 2008, Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora, *Food Microbiol* 25. 915-921.

Koutsoumanis K. and Gougouli M., 2015. Use of Time Temperature Integrators in food safety management. *Food Science & Technology* 43 (2015) 236-244.

Koutsoumanis K., and Nychas E., 2000. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf- life procedure. *Int J Food Microbiol*, 60 171–84.

Koutsoumanis K., Taoukis P. S., Drosinos E., Nychas E., 2000. Applicability of an Arrhenius model for the combined effect of temperature and CO₂ packaging on the spoilage microflora of fish. *Appl Env Microbiol*, 66 3528–34.

Kreyenschmidt J., Christiansen H.A., Hubner V.R, Petersen B., 2010. A novel photochromic time–temperature indicator to support cold chain management. *International Journal of Food Science and Technology*, 45 (2010), pp. 208-215

Labuza T.P. and Contreras-Medellin R., 1981. Prediction of Moisture Protection Requirements for Foods, *Cereal Foods World* 26: 335-34.

Labuza T.P. and Kamman J., 1983. Reaction Kinetics and Accelerated Tests Simulation as a Function of Temperature, In: *Applications of Computers in Food Research*. Saguy, I., (Ed). Marcel Dekker, New York, chap.4.

Labuza T.P. and Riboh D., 1982. Theory and Application of Arrhenius Kinetics to the Prediction of Nutrient Losses in Food, *Food Technol.* 36, 66-74.

Labuza T.P., 1980. The effect of water activity on reactions kinetics of food deterioration. *Food Technol.* 34 (4), 36-41.

Labuza T.P., 1982. *Shelf Life Dating of Foods*, Food & Nutrition Press, Westport, CT.

Labuza, T.P., and Schmidl, M.K., 1985. Accelerated Shelf Life Testing of Food Products. *Food Technology*, Vol. 39, (9): 57-62, 64, 134.

Labuza T.P., Fu B., Taoukis P.S., 1992. Prediction for Shelf Life and Safety of Minimally Processed CAP/MAP Chilled Foods: A Review, *Journal of Food Protection*, 55:741-750.

Mikkola V., Lahteenmaki L., Hurme E., Heinio, R., Kaarianen, T. and Ahvenainen, R. 1997. Consumer attitudes towards oxygen absorbers in food packages, VTT Research notes 1858, VTT.

Mistry V.V. and Kosikowski F.V., 1983. Use of time – temperature indicators as quality control devices for market milk. *J. Food Protection*, 46 (1) 52-57.

Ntzimani AG., Paleologos EK., Savvaidis IN., Kontominas MG. (2008) Formation of biogenic amines and relation to microbial flora and sensory changes in smoked turkey breast fillets stored under various packaging conditions at 4 degrees C. *Food Microbiology* 2008 May;25(3):509-17.

Otwell, S. 1997. Time, Temperature, Travel – a quality balancing act. *Seafood Int.* (Sept) 57–61.

Ozogul F., Polat A., Ozogul Y., 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* 85 (2004) 49–57.

Paleologos E.K., S.D. Chytiri, Savvaidis I.N. & Kontominas M.G. (2003). Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, 1010, 217-224.

Renier J.J. & Morin W.T., 1962. Time-Temperature Indicators, *Intl. Inst. Refrig. Bull. Annex*, 1: 425-435.

Rodriguez and Zaritzki, 1983. Development of time temperature integrator for frozen beef, *J. Food Sci.* 48 (1983). p. 1526–1531.

Schoen H.M. and Byrne C.H., 1972. Defrost indicators: many designs have been patented yet there is no ideal indicator. *Food Technol.* 26(10): 46-50.

Sherlock , M., Fu B., Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1991. A systematic evaluation of Time Temperature Indicators for use as consumer tags. *Journal of Food Protection*, 54(11), 885-889.

Sherlock M. and Labuza T.P., 1992. Consumers' perceptions of consumer type time-temperature indicators for use on refrigerated dairy foods. *J. Food Distrib. Res.*

Singh R.P. and Wells J.H., 1985. Use of time-temperature indicators to monitor quality of frozen hamburger. *Food Technology*, 39 (12) 42-5.

Taoukis P.S., El Meskine A., Labuza T.P., 1988. Moisture Transfer and Shelf Life of Packaged Foods, in *Food and Packaging Interactions*, Hotchkiss, J.H., Ed., ACS Symposium Series, No.365, 243-261.

Taoukis P.S., 1989. Time - Temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products, Ph.D. Thesis, University of Minnesota, p.227.

Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1989a. Applicability of Time Temperature Indicators as shelf-life monitors of food products. *J. Food Sci.*, 54(4) 737-8.

Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1989b. Reliability of Time-Temperature Indicators as Food Quality Monitors Under Non Isothermal Conditions, *Journal of Food Science*. 54(4): 789-792

Taoukis P.S., Reineccius G.A., Labuza T.P., 1990. Application of Time-Temperature Indicators to Monitor Quality of Flavoured Products.

Taoukis P.S., Fu B., Labuza T.P., 1991. Time-Temperature Indicators, *Food Technology*, 45(10):70-82.

Taoukis P.S., Bili M., Gianakourou M., 1998. Application of shelf life modelling of chilled salad products to a TTI based distribution and stock rotation system. *Acta Horticulturae* 476, International Society for Horticultural Science (ISHS), Leiden, Netherlands, p. 131-140.

Taoukis P.S. and Labuza T.P., 1999. Chemical Time-Temperature Integrators as Quality Monitors in the Chill Chain. *Predictive Microbiology Applied to Chilled Food Preservation* (Proc. of the International Symposium, Quimper, France. June 16-18, 1997). C.M. Bourgeois and T.A. Roberts. (eds). *Refrigeration Science and Technology Proceedings Series*, International Institute of Refrigeration (IIR). Paris, France, 291-300.

Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G.J.E., 1999a. Use of time temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions, *International Journal of Food Microbiology* 53 (1999), p. 21–31.

Taoukis P.S., Koutsoumanis K., Nychas G.J.E., 1999b. Applicability of Time-Temperature Indicators as quality monitors of MAP chilled fish stored in variable conditions, presented at the Institute Food Technologists (IFT) 59 Annual Meeting, Chicago, IL.

Taoukis P.S., 2001. Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In: *Food Process Modelling*. Tijkskens LMM, Hertog MLATM, Nicolai BM, editors. Washington DC: CRC Press. Ch 19. p. 401-431.

Taoukis P.S. and Labuza T.P., 2003. Time-Temperature Indicators (TTIs). In: *Novel Food Packaging Techniques*. R. Ahvenainen, editor. Woodhead Publishing Limited, UK. Ch 6. p. 103-126.

Texas Parks & Wildlife Department (On-line). Accessed July 16, 2017
<<http://www.tpwd.state.tx.us/huntwild/wild/species/mullet/>.

Tinker J.H., Slavin J.W., Learson R.J., Empola V.G., 1985. Evaluation of automated time-temperature monitoring system in measuring for freshness of chilled fish. IIF-IIR Commissions C2, D3 4 286-90.

Tsironi T., Gogou E., Velliou E., Taoukis P.S. 2008. Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) on shelf life optimization of vacuum packed chilled tuna. *International Journal of Food Microbiology* 128(1), 108-115.

Tsironi T., Ronnow P., Giannoglou M., Taoukis P.S. , 2016. Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements: The case of *Vibrio* spp. growth during transportation of oysters. *J. Food Control*, (2016) 1-6.

Tsironi T., Stamatiou A., Giannoglou M., Velliou E., Taoukis P.S., 2011. Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets LWT - Food Science and Technology 44 (2011), 1156-1163.

Tsironi T.N., Taoukis P.S., 2012. Shelf-life extension of gilthead seabream fillets by osmotic treatment and antimicrobial agents. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.

Vaikousi H., Biliaderis C.G. and Koutsoumanis K., 2009. Applicability of a microbial Time Temperature Indicator (TTI) for monitoring spoilage of modified atmosphere packed minced meat. International Journal of Food Microbiology 133 (2009), 272–278.

Wells J.H and Singh R.P., 1988. Application of time-temperature indicators in monitoring changes in quality attributes of perishable and semi- perishable foods. J. Food Sci., 53 148-152.

Yen, G. C., & Hsieh, C. L. (1991). Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. Journal of Food Science, 56(1), 158e160.

ΕΦΕΤ 2013. Εθνικά Προγράμματα Επίσημου Ελέγχου Ασφάλειας & Ποιότητας των τροφίμων έτους 2012. Δειγματοληψία & Ανάλυση.

Ταούκης Π.Σ., 2005. Έλεγχος και διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας με χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες-SMAS. Ημερίδα: 'Η Ιχθυοασιμότητα στα τρόφιμα'.

Ταούκης Π.Σ., Τσιρώνη Θ., Γιαννόγλου Μ., Πλατάκου Ε., 2012, ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟ-ΜΕΣΑΙΕΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ: Μεθοδολογία προσδιορισμού διατηρησιμότητας κατεψυγμένων τροφίμων - Εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών για τον έλεγχο της ποιότητας τροφίμων, Αθήνα

Ταούκης Π.Σ., Ωραιοπούλου Β., 2006. Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία Χημεία και Μηχανική Διεργασιών των τροφίμων, Επιστήμη και Μηχανική Βιολογικών Συστημάτων και Προϊόντων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π.. Αθήνα.σελ. 66-80.

Τζιά Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., 2007. Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Αθήνα. σελ.9, 185 – 188.

Τζιά Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., 2009. Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Αθήνα. σελ.9, 185 – 188.

Τζιά Κ., Ωραιοπούλου Β., 2010. Σχεδιασμός Βιομηχανιών Τροφίμων – Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Αθήνα: Εκδόσεις Ε.Μ.Π., 2008.σελ. 213-221.

Τσιρώνη Ν. Θεοφανία, 2010. Μελέτη μη θερμικών προκατεργασιών για την βελτίωση της διατηρησιμότητας ιχθυρών, διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Δικτυακοί τόποι

- <http://www.usda.gov>
- <http://www.fao.org>
- <http://www.fda.gov>
- <http://www.freshckeck.com>
- <http://www.iq-freshlabel.eu>
- <http://www.smas.chemeng.ntua.gr>
- <http://www.vitsab.com>
- <http://atuna.com>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΕΝΤΥΠΟ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΕΦΑΛΟΥ

Ημερομηνία:

Όνοματεπώνυμο δοκιμαστή:

1. Βαθμολόγηση συνολικής οπτικής εντύπωσης-χρώματος

Βαθμολογήστε την συνολική οπτική εντύπωση με κλίμακα 1-9 (1=πολύ κακό και 9=πολύ καλό).

Δείγμα	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Βαθμολογήστε το χρώμα με κλίμακα 1-9 (1=πολύ κακό και 9=πολύ καλό).

Δείγμα	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Παρατηρήσεις:

2. Βαθμολόγηση αρώματος-φρεσκότητας

Βαθμολογήστε το άρωμα με κλίμακα 1-9 (1=πολύ κακό και 9=πολύ καλό).

Δείγμα	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Βαθμολογήστε τη φρεσκότητα με κλίμακα 1-9 (1=πολύ κακό και 9=πολύ καλό).

Δείγμα	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Παρατηρήσεις:

3. Βαθμολόγηση συνολικής εντύπωσης

Βαθμολογήστε τη συνολική εντύπωση με κλίμακα 1-9 (1=πολύ κακό και 9=πολύ καλό).

Δείγμα	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Παρατηρήσεις: