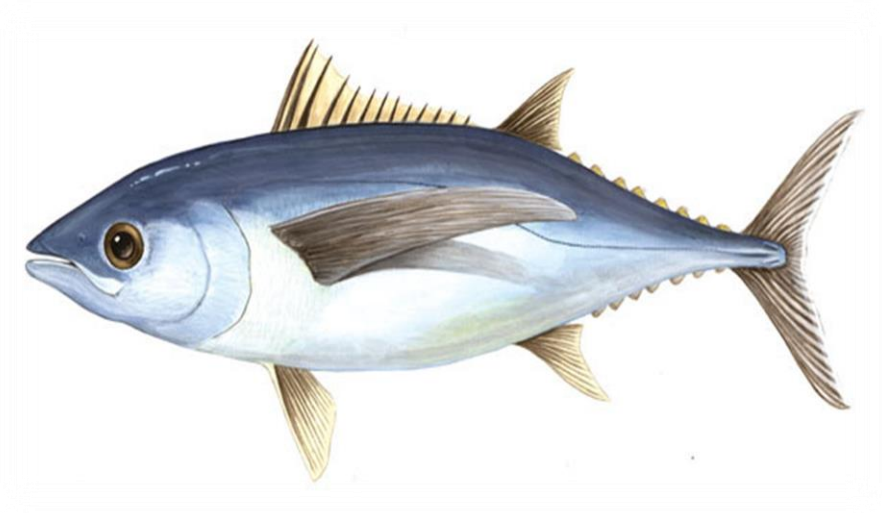
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών (IV)
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

<u>Διπλωματική Εργασία</u>

Χρήση νέων εργαλείων για τη μέτρηση της απόκρισης και την κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ και εφαρμογή τους στη διαχείριση ποιότητας και ασφάλειας τόνου (*Thunnus alalunga*) στην ψυκτική αλυσίδα

Βαρλάμη Κωνσταντίνα



Επιβλέπων καθηγητής: Π. Ταούκης

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2018

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία με θέμα «Χρήση νέων εργαλείων για τη μέτρηση της απόκρισης και την κινητική μελέτη ενζυμικών ΤΤΙ και εφαρμογή τους στη διαχείριση ποιότητας και ασφάλειας τόνου (*Thunnus alalunga*) στην ψυκτική αλυσίδα» εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Πέτρου Ταούκη, κατά τη διάρκεια του εαρινού εξαμήνου 2018.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την ευκαιρία να εργαστώ στην ομάδα του και για τις συμβουλές και τη συνεχή καθοδήγηση του κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη διδάκτορα Μαριάννα Γιαννόγλου, για την πολύτιμη καθοδήγησή της, το ενδιαφέρον και τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της σε όλα τα επίπεδα της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη διδάκτορα Θεοφανία Τσιρώνη για τη βοήθεια και την υποστήριξη της με καίριες συμβουλές και επισημάνσεις κατά την εκπόνηση της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές, τους υποψήφιους διδάκτορες, τους διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων για την άριστη συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον που επικρατούσε στο εργαστήριο καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου.

Τέλος, οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για την αγάπη, την στήριξη και τη συμπαράσταση τους σε όλη τη διάρκεια της ζωής μου, καθώς και στους φίλους μου, οι οποίοι συνέβαλαν ώστε τα φοιτητικά μου χρόνια να είναι μια όμορφη και αξέχαστη εμπειρία.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2018

Βαρλάμη Κωνσταντίνα

Περίληψη

Τα τρόφιμα αποτελούν πολύπλοκα συστήματα που υφίστανται μεταβολές, οι οποίες οδηγούν στην ποιοτική υποβάθμιση τους, ιδίως κατά τη διακίνηση τους στην ψυκτική αλυσίδα. Η ορθή τήρηση των συνιστώμενων ορίων θερμοκρασίας στην ψυκτική αλυσίδα αποτελεί επιτακτική ανάγκη, ειδικά για ευαλλοίωτα τρόφιμα όπως τα ιχθυηρά. Οι συχνά παρατηρούμενες θερμοκρασιακές αποκλίσεις συντήρησης αυξάνουν τους ρυθμούς ποιοτικής αλλοίωσης και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αυξήσουν το ρίσκο για την ασφάλεια του καταναλωτή.

Για την παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού ιστορικού των τροφίμων προτείνεται η χρήση χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών ή δεικτών TTI (Time Temperature Integrators or Indicators). Οι δείκτες TTI είναι απλές, αυτοκόλλητες, οικονομικές διατάξεις, που με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή, εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, προσδιορίζουν ολόκληρο ή μέρος του θερμοκρασιακού ιστορικού του τροφίμου, στο οποίο είναι προσαρμοσμένοι μέσω μιας ορατής, συνήθως χρωματικής απόκρισης. Ανήκουν στην έξυπνη συσκευασία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά της ημερομηνίας λήξης, παρέχοντας πληροφορίες για πιθανή κακομεταχείριση του προϊόντος.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI σε εύρος θερμοκρασιών 0 έως 25 ^{o}C και η συσχέτιση των TTI με τον έλεγχο της ποιότητας και της ασφάλειας στην ψυκτική αλυσίδα τόνου. Μελετήθηκαν η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και ο σχηματισμός ισταμίνης στον τόνο και έγινε συσχέτιση της σχηματιζόμενης ισταμίνης με τον κατάλληλο ενζυμικό δείκτη. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός επιλέχθηκε εξαιτίας της ικανότητας του να παράγει ισταμίνη, η οποία σε μη επιτρεπτές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσει σε σκομβροειδή δηλητηρίαση.

Στο πρώτο μέρος της διπλωματικής εργασίας έγινε κινητική μελέτη ενζυμικών TTI, που έχουν ως αρχή λειτουργίας την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η μείωση του pH και η οπτική χρωματική μεταβολή (από πράσινο σε κίτρινο και κόκκινο χρώμα). Ειδικότερα, μελετήθηκε η χρωματική μεταβολή δεικτών τύπου LP με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μείγμα τριλαουρίνης - τριπαλμιτίνης και δεικτών τύπου M με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα. Μελετήθηκαν δείκτες τύπου LP με συγκέντρωση ενζύμου 100U, 150U, 300U και 500U, σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 και 25 ^{o}C και τύπου M με συγκέντρωση ενζύμου 5U, 10U, 15U, 25U, 50U και 75U, σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10 και 15 ^{o}C και προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά τους. Για τον κάθε ένα από τους δύο τύπους ενζυμικών TTI που μελετήθηκαν (LP και M), αναπτύχθηκαν συνολικά μαθηματικά μοντέλα για τη συσχέτιση της απόκρισης των ενζυμικών δεικτών με τη

συγκέντρωση του περιεχόμενου ενζύμου, το χρόνο και τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Η ενέργεια ενεργοποίησης υπολογίσθηκε ίση με 143 kJ/mol για τους δείκτες τύπου LP και ίση με 88.2 kJ/mol για τους δείκτες τύπου M. Η αξιοπιστία των μοντέλων επιβεβαιώθηκε με πειράματα σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, μελετήθηκαν η μικροβιολογική ανάπτυξη *Morganella morganii* κατόπιν εμβολιασμού σε σάρκα μακρύπτερου τόνου (*Thunnus alalunga*) και η παραγωγή ισταμίνης από το μικροοργανισμό αυτό. Η ενέργεια ενεργοποίησης για το ρυθμό ανάπτυξης του *Morganella morganii* στο εύρος 15-25°C υπολογίσθηκε ίση με 105.1 kJ/mol και για το ρυθμό παραγωγής ισταμίνης ίση με 98.4 kJ/mol.

Στο τελευταίο μέρος της εργασίας, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση με στόχο την επιλογή κατάλληλου TTI για την παρακολούθηση της ασφάλειας κατά τη διακίνησή του τόνου στην ψυκτική αλυσίδα, βάσει του απαιτούμενου χρόνου παραγωγής ισταμίνης σε συγκέντρωση 50 και 100 ppm. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συσχέτιση μελετώμενου τροφίμου και δείκτη TTI είναι οι ενέργειες ενεργοποίησης και οι χρόνοι ζωής τους να είναι παραπλήσιοι. Από τα συνολικά μαθηματικά μοντέλα που προέκυψαν, καταλληλότεροι δείκτες για την παρακολούθηση της παραγωγής ισταμίνης προσδιορίσθηκαν οι LP 15U και M 6U για συγκεντρώσεις ισταμίνης 50 ppm και οι LP 10U και M 4U για συγκεντρώσεις ισταμίνης 100 ppm. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας δεδομένα προηγούμενης διπλωματικής εργασίας ως προς το χρόνο ζωής του τόνου έγινε συσχέτιση του με τα TTI που μελετήθηκαν και βρέθηκε πως καταλληλότερος δείκτης για την παρακολούθηση της ποιότητας και της διατηρησιμότητας στην ψυκτική αλυσίδα είναι ο M 50U.

Application of new tools for response measurement and kinetic study of enzymatic TTI and their application in quality management and safety of tuna (*Thunnus alalunga*) in the cold chain

Foods are complex systems that undergo changes which lead to quality deterioration, especially due to handling during distribution in the cold chain. The proper maintenance of temperature in the cold chain is essential, especially for perishable foods, such as seafood. Temperature is the main factor of deterioration of foods and any deviations from acceptable limits increase rates of quality deterioration and may increase safety risk.

In order to monitor the time – temperature history of foods, the application of Time Temperature Integrators or Indicators (TTI) has been proposed. TTI are simple, low-cost devices, which in an easily measurable change, dependent on time and temperature, determine all or part of the thermal history of the food to which they are attached, via a visible, usually color response. They are part of intelligent packaging and can be used supplementary to the expiration date, providing information about possible mishandling of the product.

The purpose of this diploma thesis was to study the kinetic response of enzymatic TTI in the temperature range 0-25 ^{o}C and the selection of appropriate TTI that can monitor safety of tuna in the cold chain. *Morganella morganii* growth and histamine formation in tuna were studied and there the obtained data were correlated with the response kinetics of the studied enzymatic TTI. The selection of the microorganism was based on its ability to produce histamine in fish in concentrations that may result in scombroid poisoning after consumption.

In the first part of the diploma thesis, kinetic study of enzymatic TTI was conducted, which operating principle is an enzyme-substrate reaction. The effect of the reaction is the decrease of pH value which leads to a visual color change (from green to yellow and finally to red). Color change of LP type indicators with enzyme lipase from *Rhizopus oryzae* and substrate a mixture of trilaourin and tripalmitin and of M type indicators with enzyme lipase from *Rhizopus oryzae* and substrate methyl myristate, was studied. LP-type indicators with enzyme concentrations of 100U, 150U, 300U and 500U were studied during storage at 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 and 25 ^{o}C and M-type with enzyme concentrations of 5U, 10U, 15U, 25U, 50U and 75U were studied at 0, 2.5, 5, 10 and 15 ^{o}C. The kinetic parameters of LP- and M-type TTI response were estimated. For each one of the studied enzymatic TTI (LP and M-type) mathematical models were developed that describe the response of the indicators as a function of enzyme concentration, storage time and temperature. The activation energy was

calculated equal to 143 kJ/mol for LP - type indicators and equal to 88.2 kJ/mol for M - type indicators. The reliability of the models was confirmed by experiments at variable conditions.

In the second part, the microbiological growth of *Morganella morganii* in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) and histamine formation after inoculation in tuna flesh were studied. The activation energy for *Morganella morganii*'s growth rates was calculated equal to 105.1 kJ/mol for the range 15-25°C and for histamine formation 98.4 kJ/mol.

Within the last part of the study, suitable TTI were selected that monitor safety of tuna during distribution in cold chain, based on the required time for production of histamine of 50 and 100 ppm. Prerequisite for the correlation of the studied food and TTI indicator is that their activation energies and response times are similar. Using the developed mathematical models, the most appropriate indicators for monitoring histamine production were determined to be LP 15U και M 6U for histamine concentrations of 50 ppm and LP 10U και M 4U for histamine concentrations of 100 ppm. Furthermore, using data from a previous thesis about the shelf life of tuna and after correlation with the studied TTI, M 50 U enzymatic TTI was selected for monitoring shelf life of tuna during refrigerated storage.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή 1

Κεφάλαιο 1: Χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες (Time Temperature Integrators, TTI) – Ποιότητα και Ασφάλεια τροφίμων 3

1.1 Ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων 3

1.1.1 Συντελεστές ποιότητας τροφίμων 4

1.1.2 Διατηρησιμότητα τροφίμων 4

1.1.3 Πρότυπα και προδιαγραφές ποιότητας τροφίμων 5

1.1.4 Αρχές κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων 6

1.1.5 Επίδραση περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση ποιότητας των τροφίμων 8

1.1.6 Υποβάθμιση ποιότητας των ψυγμένων τροφίμων-Εφαρμογή TTI για έλεγχο της ασφάλειας 9

1.2 Ορισμός και Αρχή Λειτουργίας των TTI 13

1.2.1 Ορισμός TTI 13

1.2.2 Αρχή λειτουργίας TTI 13

1.3 Χαρακτηριστικά και προδιαγραφές ενός ιδανικού TTI 13

1.4 Ταξινόμηση των TTI 14

1.5 Εξέλιξη των TTI 16

1.6 Σύγχρονα TTI 18

1.7 Κινητική απόκριση των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI 24

1.8 Αντιστοίχιση απόκρισης των δεικτών TTI με την ποιότητα τροφίμων 25

1.8.1 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας Teff 27

1.9 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί στην εφαρμογή των TTI 28

1.10 Εφαρμογές TTI σε τρόφιμα 29

1.11 Εφαρμογές των TTI 32

1.12 Στάση των καταναλωτών απέναντι στα TTI 33

1.13 Εφαρμογή TTI στη διατήρηση της ψυκτικής αλυσίδας 33

1.14 Πολιτική FIFO-LSFO & Ανάπτυξη συστήματος SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) 34

1.15 IQ-Freshlabel Project 36

1.16 Μελλοντικές τάσεις 37

Κεφάλαιο 2: Βιολογικά χαρακτηριστικά, σύσταση και μικροβιολογική αλλοίωση ιχθύων 39

2.1 Ποιοτική αλλοίωση ιχθύων 39

2.1.1 Βιογενείς αμίνες 39

2.1.2 Morganella morganii 41
2.1.3 Σκομβροειδής δηλητηρίαση 42
2.2 Τόνος 44
2.2.1 Θρεπτική αξία τόνου 44
2.2.2 Παραγωγή τόνου 45
2.2.3 Μεταθανάτια επεξεργασία και συντήρηση 46
2.2.4 Μακρύπτερος τόνος, Albacore Tuna, *Thunnus Alalunga* 46
Κεφάλαιο 3: Πειραματική Διαδικασία – Υλικά και Μέθοδοι 49
3.1 Εισαγωγή 49
3.2 Μελέτη απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών TTIs 49
3.2.1 Πειραματική Διαδικασία 50
3.2.2 Όργανα – Συσκευές πειραματικής διαδικασίας 52
3.3 Μελέτη αλλοίωσης τόνου 54
3.3.1 Μελέτη ανάπτυξης *Morganella morganii* 54
3.3.2 Ποσοτικοποίηση ισταμίνης με ανοσοενζυμική μέθοδο (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 55
Κεφάλαιο 4: Κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών TTI 59
4.1 Επεξεργασία απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI 59
4.1.1 Συνάρτηση απόκρισης ενζυμικών TTI 59
4.1.2 Προσδιορισμός κινητικών χαρακτηριστικών k_{ref} και E_a των ενζυμικών TTI 59
4.1.3 Έλεγχος αξιοπιστίας κινητικών μοντέλων 60
4.2 Συσχέτιση δεδομένων χρώματος που ελήφθησαν με το χρωματόμετρο X-rite και με την εφαρμογή (Vitsab APP) σε έξυπνο κινητό (smartphone) 60
4.3 Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών TTI 64
4.3.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 100U 65
4.3.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 150U 67
4.3.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 300U 70
4.3.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 500U 73
4.3.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 5U 76
4.3.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 10U 79
4.3.7 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 15U 81
4.3.8 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 25U 83
4.3.9 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 50U 85
4.3.10 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 75U 87
4.4 Έλεγχος αξιοπιστίας κινητικού μοντέλου 89
4.4.1 Έλεγχος αξιοπιστίας ενζυμικών TTI τύπου LP μετά από έκθεση σε εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ 90

4.4.2 Έλεγχος αξιοπιστίας ενζυμικών TTI τύπου M μετά από έκθεση σε εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ 91

4.5 Διάρκεια ζωής των ενζυμικών TTI 93

4.6 Εξαγωγή συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης των ενζυμικών TTI 94

Παράμετροι συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης TTI τύπου LP 95

Παράμετροι συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης TTI τύπου M 95

4.7 Στατιστική επεξεργασία και μελέτη αξιοπιστίας μαθηματικών μοντέλων 95

Κεφάλαιο 5: Κινητική μελέτη ανάπτυξης *Morganella morganii* και παραγωγής ισταμίνης σε τόνο 99

5.1 Μελέτη μικροβιολογικής ανάπτυξης *Morganella morganii* 99

5.2 Μελέτη σχηματισμού ισταμίνης στον τόνο 101

Κεφάλαιο 6: Διερεύνηση για την επιλογή κατάλληλου TTI για την παρακολούθηση του ρυθμού παραγωγής ισταμίνης σε τόνο 105

6.1 Εισαγωγή 105

6.2 Επιλογή κατάλληλων TTI για την παρακολούθηση της ασφάλειας τόνου 105

Κεφάλαιο 7: Σύνοψη αποτελεσμάτων 111

Συμπεράσματα 119

Προτάσεις 121

Βιβλιογραφία 123

Εισαγωγή

Η θερμοκρασία αποτελεί βασικό παράγοντα για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων. Είναι απαραίτητη η διατήρηση της θερμοκρασίας στα εκάστοτε συνιστώμενα επίπεδα, ιδίως για τρόφιμα που αλλοιώνονται γρήγορα, όπως τα ιχθυηρά, προκειμένου να ανασταλεί ενδεχόμενη μικροβιακή ανάπτυξη. Για παράδειγμα, έκθεση ιχθυηρών, όπως ο τόνος σε υψηλές θερμοκρασίες για σημαντικό χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ισταμίνης, ως αποτέλεσμα της μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών, όπως ο *Morganella morganii*.

Η ισταμίνη είναι τοξική βιογενής αμίνη, που σχετίζεται με είδη ιχθύων των οικογενειών *Scomberesocidae* και *Scombridae*, όπως ο τόνος. Στα είδη αυτά παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση του αμινοξέος ιστιδίνη. Η ιστιδίνη με τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης μετατρέπεται σε ισταμίνη. Τα όρια συγκέντρωσης σε ισταμίνη στα θαλασσινά είναι στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής κάτω από 50mg/kg και στην Ευρώπη κάτω από 100mg/kg (Dalgaard & Emborg, 2008).

Είναι επομένως πολύ σημαντικό να παρακολουθείται το ιστορικό των θερμοκρασιών στις οποίες έχει εκτεθεί το τρόφιμο. Μία εύκολη και πρακτική λύση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί επικουρικά της ημερομηνίας λήξης, με τη μορφή ζωντανής ημερομηνίας λήξης, είναι οι χρονοθερμοκρασιακοί ολοκληρωτές (TTI).

Ο χρονοθερμοκρασιακός δείκτης ή ολοκληρωτής (Time Temperature Integrator, TTI) ορίζεται ως μια απλή, χαμηλού κόστους διάταξη, η οποία δύναται με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, να προσδιορίσει ολόκληρο ή μέρος του θερμοκρασιακού ιστορικού του τροφίμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένη (Taoukis & Labuza, 1989). Η επίδραση της θερμοκρασίας καταγράφεται και μπορεί να γίνει αντιστοίχιση της με την ποιότητα σε όλα τα στάδια από την παραγωγή μέχρι το τρόφιμο να φτάσει στον καταναλωτή, με χρήση κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων.

Η χρήση των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για την παρακολούθηση της ορθής μεταχείρισης ευαλλοίωτων τροφίμων, όπως τα ιχθυηρά κατά τη διακίνηση τους στην ψυκτική αλυσίδα, όπου συνήθως υφίστανται σημαντικές θερμοκρασιακές μεταβολές, που έχουν ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας τους.

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI για τη συσχέτιση τους με τον έλεγχο της ποιότητας και της ασφάλειας στην ψυκτική αλυσίδα τόνου. Πιο

συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και ο σχηματισμός ισταμίνης στον τόνο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών TTI, που έχουν ως αρχή λειτουργίας την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος, με αποτέλεσμα μία οπτική χρωματική μεταβολή. Μελετήθηκε η χρωματική μεταβολή διαφορετικών συγκεντρώσεων δεικτών, τύπου LP με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μείγμα τριλαουρίνης - τριπαλμιτίνης και δεικτών τύπου M με ένζυμο την ίδια λιπάση και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα, σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά τους και αναπτύχθηκαν συνολικά μαθηματικά μοντέλα εξάρτησης της απόκρισης των δεικτών από τη συγκέντρωση περιεχόμενου ενζύμου, το χρόνο και τη θερμοκρασία αποθήκευσης.

Επιπλέον, μοντελοποιήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Morganella morganii* σε μακρύπτερο τόνο (*Thunnus alalunga*), μελετήθηκε ο σχηματισμός ισταμίνης σε τόνο κατόπιν εμβολιασμού του και προσδιορίσθηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά.

Καταλήγοντας, συσχετίσθηκαν ενζυμικά TTI κατάλληλης συγκέντρωσης με το χρόνο ζωής του τόνου και τον απαιτούμενο χρόνο παραγωγής ισταμίνης στα επιτρεπτά επίπεδα των 50 και 100ppm. Η εν λόγω συσχέτιση πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων ζωής του μελετώμενου τροφίμου και των μελετώμενων δεικτών TTI.

Κεφάλαιο 1: Χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες (Time Temperature Integrators, TTI) – Ποιότητα και Ασφάλεια τροφίμων

1.1 Ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων

Τα τρόφιμα από τη στιγμή της παραγωγής τους μέχρι τη στιγμή που φτάνουν στον καταναλωτή υφίστανται πολυάριθμες φυσικές, χημικές και μικροβιολογικές μεταβολές. Αποτελούν, δηλαδή δυναμικά συστήματα, τα οποία υφίστανται μια διαρκή υποβάθμιση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών. Για παράδειγμα, τα κατεψυγμένα τρόφιμα, τα οποία πρέπει να συντηρούνται, να αποθηκεύονται και να διακινούνται σωστά, ώστε να μπορούν να θεωρούνται μικροβιολογικώς σταθερά, υφίστανται αναντίστρεπτες αλλοιώσεις, είτε στα φυσικοχημικά, είτε στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους.

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

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί αδιαπραγμάτευτο παράγοντα για να είναι αποδεκτό ένα τρόφιμο. Ως ασφάλεια τροφίμων ορίζεται η κατάσταση των τροφίμων, η οποία δεν έχει δυσμενή επίπτωση στην υγεία του καταναλωτή ή η διασφάλιση των τροφίμων έναντι διαφόρων κινδύνων (μικροβιολογικών, χημικών, φυσικών). Ασφάλεια τροφίμου σημαίνει απουσία μικροβιολογικών (παθογόνα μικρόβια), χημικών (χημικά, φυτοφάρμακα κτλ.) και φυσικών (γυαλί, μέταλλο, κ.α.) κινδύνων. Είναι υποχρεωτικό να είναι ασφαλή όλα τα τρόφιμα που διακινούνται στην αγορά. Η ασφάλεια διακρίνεται σε απόλυτη ασφάλεια που δεν είναι εφικτή και σχετική ασφάλεια, η οποία ορίζεται ως η πρακτική σιγουριά πως δε θα προκληθεί ασθένεια ή τραυματισμός από την κατανάλωση ενός τροφίμου ή συστατικού με την προϋπόθεση ότι αυτό χρησιμοποιείται σωστά και η κατανάλωση του δεν υπερβαίνει κάποια ανώτατα όρια (Τζιά, 2010).

Προκειμένου, λοιπόν να εξασφαλισθεί η επίτευξη του στόχου της ασφάλειας σε όλα τα προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων αναπτύχθηκε το σύστημα HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points – Ανάλυση Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου). Το σύστημα αυτό είναι ένα ειδικό σύστημα, που εστιάζει στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (CCP: Critical Control Points), που είναι τα πιο σημαντικά στη ροή παραγωγής του τροφίμου και προσεγγίζει συστηματικά με τον καλύτερο δυνατό τρόπο την ασφάλεια του τροφίμου ελέγχοντας τα σημεία αυτά (Τζιά,2010). Σε ορισμένα κατεψυγμένα τρόφιμα ως κρίσιμα σημεία ελέγχου αναγνωρίζονται και

κάποια στάδια της ψυκτικής αλυσίδας. Με το HACCP αναγνωρίζονται οι πιθανοί κίνδυνοι που σχετίζονται με ένα τρόφιμο σε όλα τα στάδια παραγωγής του και ελαχιστοποιείται η πιθανότητα εμφάνισης προβλημάτων ασφάλειας.

1.1.1 Συντελεστές ποιότητας τροφίμων

Η ποιότητα ενός τροφίμου αναλύεται σε επί μέρους συντελεστές ποιότητας. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου διακρίνονται σε οργανοληπτικά ή εμφανή χαρακτηριστικά, τα οποία είναι εύκολο να εκτιμηθούν με τις αισθήσεις και σε μη εμφανή χαρακτηριστικά τα οποία δεν μπορούν να εκτιμηθούν με τις αισθήσεις, αλλά παίζουν ρόλο στην ασφάλεια και στη διατροφική αξία του τροφίμου και επηρεάζουν την εμπορική του αξία. Η μέτρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων γίνεται με φυσικές, χημικές, φυσικοχημικές και μικροβιολογικές ή οργανοληπτικές μεθόδους.

Οι συντελεστές ποιότητας των τροφίμων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 1. 1 Ταξινόμηση συντελεστών ποιότητας τροφίμου (Τζιά,2009).

Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	Μη εμφανή χαρακτηριστικά
Όραση- Εμφάνιση: Χρώμα, Ιξώδες, Στιλπνότητα, Μέγεθος και Σχήμα, Ελαττώματα	Αβλαβής νοθεία Θρεπτική αξία Τοξικότητα Διατηρησιμότητα – Χρόνος ζωής
Αφή-Κιναισθητική (υφή): Αίσθηση στο χέρι ή τα δάκτυλα, Στοματική αίσθηση	
Όσφρηση και γεύση-Άρωμα: Οσμή, γεύση	
Ακοή: Κοπή και μάσημα	

1.1.2 Διατηρησιμότητα τροφίμων

Τα τρόφιμα ως δυναμικά συστήματα υφίστανται ποιοτικές μεταβολές προς φθίνουσα κατεύθυνση, άρα έχουν πεπερασμένη διάρκεια ζωής (shelf life). Εξαίρεση αποτελούν ορισμένα τρόφιμα που με την ωρίμανση ή την παλαίωση τους βελτιώνεται η ποιότητα τους. Μέχρι σήμερα, δεν έχει διατυπωθεί κάποιος γενικά εφαρμόσιμος ορισμός της διατηρησιμότητας των τροφίμων. Κάθε προϊόν ανάλογα με τη φύση του και τη χρήση για την οποία προορίζεται έχει διαφορετική διάρκεια ζωής. Από το Διεθνές Ινστιτούτο Ψυγμένων Προϊόντων (International Institute of Refrigerator, IIR) υποδεικνύονται δύο διαφορετικοί ορισμοί:

- **Χρόνος Υψηλής Ποιότητας** (High quality life, HQL): ο χρόνος μετά την επεξεργασία του προϊόντος για την πρώτη αντιληπτή οργανοληπτική διαφορά (70-80% θετική απάντηση σε τριγωνικό τεστ).

- **Χρόνος Πρακτικής Διατήρησης** (PSL: Practical Shelf Life): ο χρόνος αποθήκευσης μετά την παραγωγή προϊόντος υψηλής αρχικής ποιότητας, στον οποίο το τρόφιμο είναι οργανοληπτικά κατάλληλο για χρήση ή κατανάλωση. Συνήθως ισχύει ότι ο χρόνος πρακτικής διατήρησης είναι δύο ή τρεις φορές μεγαλύτερος από το χρόνο υψηλής ποιότητας (HQL) (Ταούκης, 2009).

Από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα για την επισήμανση των προϊόντων υπάρχει και ο **Χρόνος Ελάχιστης Διατηρησιμότητας** (minimum durability), που ορίζεται ως χρόνος στον οποίο το τρόφιμο διατηρεί τα χαρακτηριστικά του, υπό κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης. Ο ορισμός αυτός αναφέρεται στο τρόφιμο και τις ιδιότητές του και όχι στη χρήση. Ο ορισμός αυτός πλησιάζει αρκετά με εκείνον που ορίστηκε παραπάνω ως χρόνος υψηλής ποιότητας (HQL).

Παρόλα αυτά, 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 Πρότυπα και προδιαγραφές ποιότητας τροφίμων

Η βιομηχανία των τροφίμων και οι καταναλωτές καθορίζουν με διαφορετικά κριτήρια την ποιότητα και το χρόνο ζωής των τροφίμων. Η επίτευξη της ποιότητας των τροφίμων προϋποθέτει την τήρηση νομικών προδιαγραφών, προδιαγραφών τροφίμου, προδιαγραφών βιομηχανίας/εταιρείας και προδιαγραφών καταναλωτή. Οι νομικές προδιαγραφές αναφέρονται σε όρια συγκέντρωσης συστατικών ή σε απουσία νοθείας ή μόλυνσης, σε όρια συνθηκών επεξεργασίας τροφίμων και σε απαγόρευση μόλυνσης των τροφίμων από κάποιο υλικό και είναι υποχρεωτικές από τη διεθνή ή ευρωπαϊκή νομοθεσία. Οι προδιαγραφές τροφίμου σχετίζονται με τον κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων και επηρεάζουν την εικόνα του καταναλωτή για το προϊόν. Οι προδιαγραφές βιομηχανίας/εταιρείας έχουν στόχο τον καθορισμό ποιοτικών προδιαγραφών των προϊόντων και εφαρμόζονται λόγω πίεσης από το μάρκετινγκ, ή λόγω ομάδας στην οποία ανήκει ένα προϊόν, ή όπου δεν εμπλέκονται νομοθετικές προδιαγραφές. Τέλος, οι προδιαγραφές καταναλωτή εκφράζουν τις απαιτήσεις του καταναλωτή για το προϊόν.

1.1.4 Αρχές κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων

Τα τρόφιμα αποτελούν πολύπλοκα συστήματα, τα οποία υφίστανται μεταβολές, με αποτέλεσμα την αλλοίωση και την υποβάθμιση της ποιότητας τους. Χρησιμοποιώντας τις βασικές αρχές της χημικής κινητικής, ο ρυθμός υποβάθμισης της ποιότητας μπορεί να εκφρασθεί ως συνάρτηση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων.

Ρυθμός υποβάθμισης ποιότητας: $\frac{dQ}{dt} = F(C_I, E_J)$ (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. CO_2, N_2, O_2, φως, μηχανικές καταπονήσεις)

Τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα φυσικοχημικά συστήματα, που περιλαμβάνουν πολυάριθμες φυσικές και χημικές μεταβλητές. Είναι αδύνατο και μη πρακτικό να καθορισθούν όλες ποσοτικά (Taoukis, 2001). Η καθιερωμένη μεθοδολογία περιλαμβάνει αρχικά την ταυτοποίηση των χημικών και βιολογικών αντιδράσεων που επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου. Στη συνέχεια, έπειτα από προσεκτική μελέτη των συστατικών του τροφίμου και των διεργασιών, προσδιορίζονται οι αντιδράσεις αυτές που έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο στο ρυθμό υποβάθμισης (Taoukis & Labuza, 1996). Θεωρώντας ότι οι περιβαλλοντικές παράμετροι E_j παραμένουν σταθερές ή έχουν αμελητέο ρόλο, η εξίσωση της ποιοτικής υποβάθμισης μπορεί να απλοποιηθεί. Στόχος είναι η εξαγωγή ενός εύκολου μοντέλου που θα περιγράφει αποτελεσματικά τη μεταβολή των συγκεντρώσεων των συντελεστών ποιότητας του τροφίμου συναρτήσει του χρόνου. Χρησιμοποιούνται οι ποσοτικά μετρήσιμες παράμετροι A και B, όπου A: επιθυμητή ποιοτική παράμετρος (για παράδειγμα θρεπτικά συστατικά, άρωμα) και B: παράμετρος που υποβαθμίζει το τρόφιμο (π.χ. ανεπιθύμητο άρωμα, μικροβιακό φορτίο, χρώμα).

Στα τρόφιμα, οι περισσότερες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι αμφίδρομες:

$$\alpha A + \beta B \leftrightarrow \gamma C + \delta D \quad (1.2)$$

Ο ρυθμός της αντίδρασης είναι:

$$r = \frac{-d[A]}{adt} = \frac{-d[B]}{\beta dt} = \frac{+d[C]}{\gamma dt} = \frac{+d[D]}{\delta dt} = k_f [A]^{\alpha}[B]^{\beta} - k_b [C]^{\gamma}[D]^{\delta} \quad (1.3)$$

Αν η k_b είναι αμελητέα συγκρινόμενη με την k_f ($k_f >> k_b$), τότε οι [C] και [D] είναι πολύ μικρές και προκύπτει ο ρυθμός μεταβολής των A και B:

$$r = \frac{-d[A]}{dt} = k[A]^m \quad (1.4)$$

$$r = \frac{d[B]}{dt} = k'[B]^{m'} \quad (1.5)$$

όπου:

k και k΄: φαινόμενες σταθερές ρυθμού αντίδρασης,

m και m΄: φαινόμενες τάξεις των αντιδράσεων και προσδιορίζονται πειραματικά με διαφορικές μεθόδους ή με μεθόδους με ολοκλήρωση (Hills & Grieger-Block, 1980).

Στις διαφορικές μεθόδους λογαριθμίζοντας τις εξισώσεις (1.4) και (1.5) προκύπτουν οι γραμμικές σχέσεις:

$$\log r_A = \log k + m \log[A] \quad (1.6)$$

$$\log r_B = \log k' + m' \log[B] \quad (1.7)$$

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

Στις μεθόδους με ολοκλήρωση, ολοκληρώνοντας τη σχέση (1.4) προκύπτει :

$$f(A) = -\int_{A_O}^{A} \frac{d[A]}{[A]^m} = kt \quad (1.8)$$

που είναι της μορφής Q(A) = kt και καλείται συνάρτηση ποιότητας Q(A).

Όπως φαίνεται και στον ακόλουθο πίνακα, οι συναρτήσεις ποιότητας Q(A) είναι διαφορετικές για κάθε τρόφιμο, ανάλογα με την τάξη της αντίδρασης. Στον πίνακα παρατίθενται οι συναρτήσεις ποιότητας Q(A) και ο χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$, ο χρόνος δηλαδή στον οποίο η ποιότητα έχει μειωθεί στο μισό της αρχικής της τιμής για φαινόμενη τάξη αντίδρασης μηδενική, πρώτη, δεύτερη και m≠1.

Πίνακας 1. 2 Συνάρτηση ποιότητας Q(A) και χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$, για φαινόμενη τάξη αντίδρασης μηδενική, πρώτη, δεύτερη και m≠1.

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≠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 χαρακτηρίζονται ως μηδενικής ή πρώτης τάξης όπως φαίνεται και στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 1. 3 Συναρτήσεις ποιότητας κινητικής μηδενικής και πρώτης τάξης.

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

1.1.5 Επίδραση περιβαλλοντικών παραμέτρων στην υποβάθμιση ποιότητας των τροφίμων

Στην προηγούμενη ενότητα οι κινητικές εξισώσεις αναφέρονται σε σταθερούς περιβαλλοντικούς παράγοντες E_j. Η μεταβολή των παραγόντων αυτών επηρεάζει σημαντικά τους ρυθμούς αντιδράσεων που συμβαίνουν σε ένα σύστημα. Τα κινητικά μοντέλα που περιγράφουν την απώλεια ποιότητας είναι χαρακτηριστικά για το εκάστοτε τρόφιμο, αλλά επηρεάζονται άμεσα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, άρα πρέπει να είναι γενικευμένα και να λαμβάνουν υπόψη και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Συνήθως, ενσωματώνονται στην σταθερά k, εκφράζοντας την ως συνάρτηση των παραγόντων του περιβάλλοντος: $k=k(E_j)$.

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

- Η θερμοκρασία
- Η ενεργότητα του νερού
- Η ολική και οι μερικές πιέσεις των διαφορετικών αερίων
- Το pH
- Οι ακτινοβολίες
- Οι μηχανικές πιέσεις

Ο κύριος παράγοντας που καθορίζεται αποκλειστικά από τις συνθήκες αποθήκευσης είναι η θερμοκρασία, στην οποία επικεντρώνεται η παρούσα εργασία (Taoukis, 2001).

1.1.5.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία καθορίζεται αποκλειστικά από τις συνθήκες αποθήκευσης, δεν ελέγχεται αρκετά από τη συσκευασία και επηρεάζει σημαντικά τους ρυθμούς των

αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε ένα τρόφιμο. Η μεταβολή του ρυθμού περιγράφεται από την εξίσωση Arrhenius:

$$k = k_{ref} * \exp\left[\frac{-E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \quad (1.9),$$

όπου

- k : η σταθερά ρυθμού αντίδρασης
- T_{ref} : η θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}
- k_{ref}: η σταθερά ρυθμού αντίδρασης σε θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}
- E_a: η ενέργεια ενεργοποίησης σε cal/mol
- R: η παγκόσμια σταθερά των αερίων (1,9872 cal/molK = 8,314 J/molK)
- T: η απόλυτη θερμοκρασία σε K

Λογαριθμίζοντας την εξίσωση (1.9) προκύπτει η γραμμική $\ln k = \ln k_{ref} - \frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)$ (1.10), από την οποία γνωρίζοντας διαφορετικά k σε διαφορετικές θερμοκρασίες T, μπορούν να προσδιορισθούν με γραμμική προσαρμογή από την κλίση της ευθείας το $-\frac{E_a}{R}$ και κατά συνέπεια η ενέργεια ενεργοποίησης E_α.

Δραστική θερμοκρασία T_{eff}

Η μεταβολή της συνάρτησης ποιότητας $Q(A)_t$ κατά την έκθεση 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: $Q(A)_t = \int_0^t k(T)dt = k_{ref} * \exp\left[\frac{-E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]t$ (1.11)

Η δραστική θερμοκρασία T_{eff} είναι η σταθερή θερμοκρασία έκθεσης, στην οποία η μεταβολή της ποιότητας είναι η ίδια με τη μεταβολή της ποιότητας σε συνθήκες μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας T(t) (Taoukis, 2001).

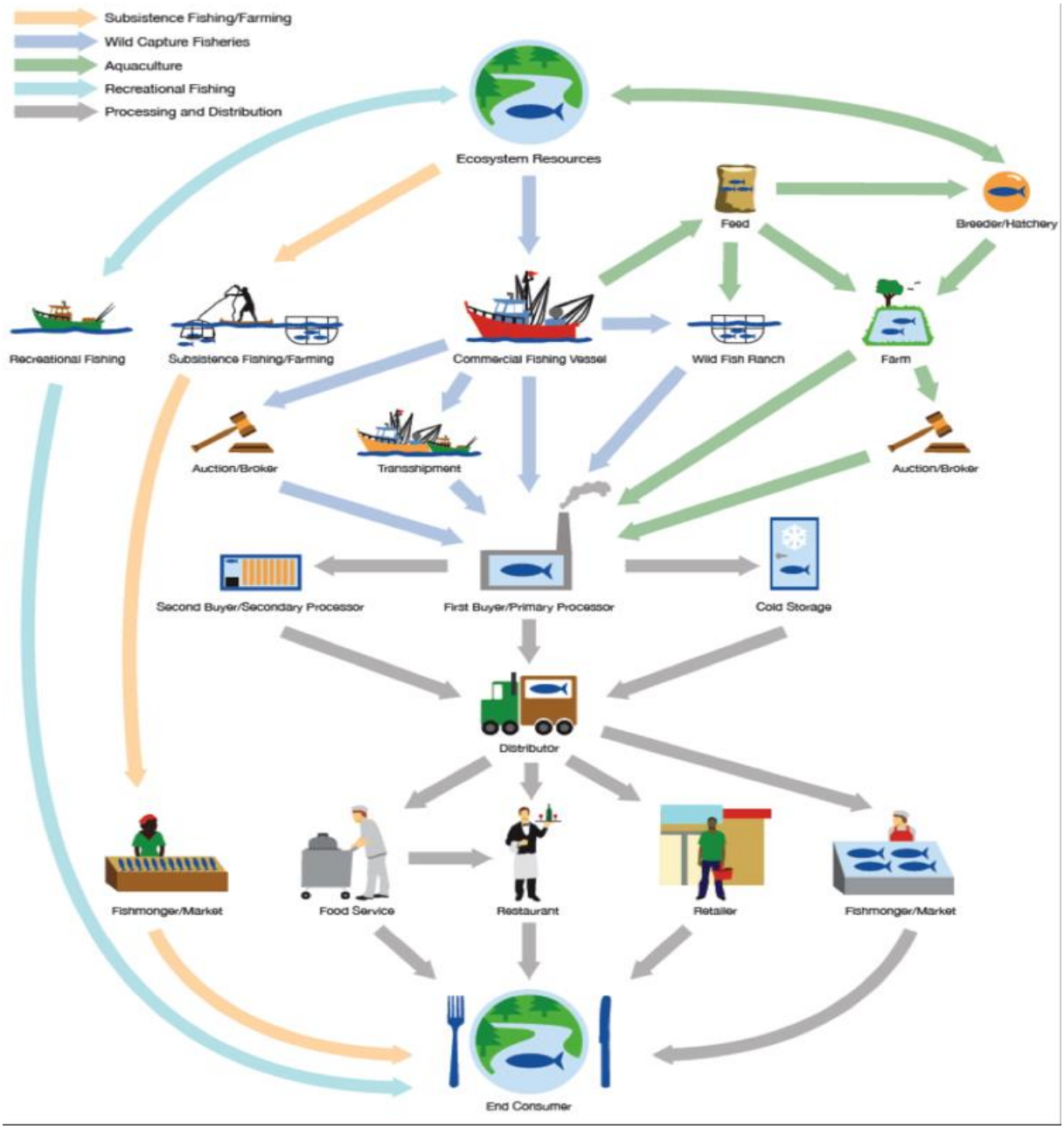
Η σχέση (1.11) μπορεί να γίνει:

$$Q(A)_t = k_{ref} * \exp\left[\frac{-E_a}{R}\left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]t \rightarrow T_{eff} = -\frac{-E_a T_{ref}}{E_a - R T_{ref} \ln \frac{Q(A)_t}{k_{ref} t}} \quad (1.12)$$

1.1.6 Υποβάθμιση ποιότητας των ψυγμένων τροφίμων-Εφαρμογή TTI για έλεγχο της ασφάλειας

Η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων αποτελείται από τα διάφορα στάδια μεταφοράς και αποθήκευσης των προϊόντων σε ενδιάμεσα σημεία διανομής, σε αποθήκες και στα ψυγεία πώλησης των υπεραγορών και των καταναλωτών, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.1. Ένα βασικό πρόβλημα στην ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων είναι η

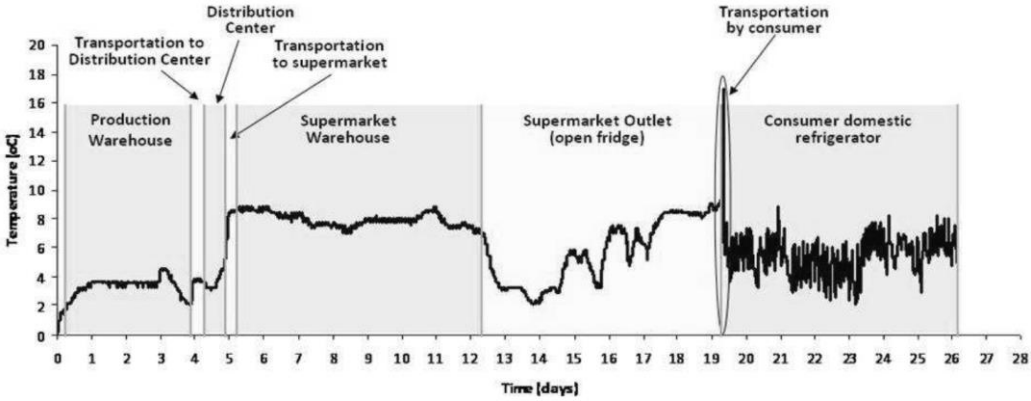
αδυναμία άμεσης παρακολούθησης και μέτρησης της αλληλουχίας των συνθηκών στις οποίες εκτίθενται τα προϊόντα από την στιγμή που φεύγουν από την άμεση επίβλεψη στη μονάδα παραγωγής μέχρι να φτάσουν στον καταναλωτή. Όμως, η παρακολούθηση των θερμοκρασιακών συνθηκών είναι απαραίτητη, ιδίως σε τρόφιμα όπως προϊόντα κρέατος, ιχθυηρά και γαλακτοκομικά, τα οποία πρέπει να διακινούνται και να συντηρούνται σε ψύξη (0 έως 4°C).



Εικόνα 1. 1 Ψυκτική αλυσίδα ιχθυηρών.

Πανελλαδική έρευνα για την παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού προφίλ της ψυκτικής αλυσίδας στην Ελλάδα για προϊόντα κρέατος (Gogou et al., 2015),

έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις από τους 4°C στην ψυκτική αλυσίδα, ειδικά στα ψυγεία και στις αποθήκες των υπεραγορών και στα ψυγεία οικιακής χρήσης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.2.



Εικόνα 1. 2 Χρονοθερμοκρασιακό προφίλ της ψυκτικής αλυσίδας κρέατος σε πανελλαδική έρευνα (Gogou et al.,2015)

Η ημερομηνία ανάλωσης που αναγράφεται στην ετικέτα των τροφίμων δίνει μια ενδιάμεση ένδειξη, με αποτέλεσμα συχνά σε περίπτωση καλής συντήρησης την απόρριψη καλών προϊόντων λόγω «λήξης» τους και σε περίπτωση κακής συντήρησης την κατανάλωση αλλοιωμένων προϊόντων που δεν έχουν φτάσει την αναγραφόμενη ημερομηνία ανάλωσης τους. Κρίνεται απαραίτητη επομένως, η ύπαρξη ενός συστήματος παρακολούθησης του χρονοθερμοκρασιακού ιστορικού των προϊόντων κατά τη διακίνηση τους στην ψυκτική αλυσίδα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, κινείται η χρήση των δεικτών TTI. Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες ή ολοκληρωτές (Time Temperature Integrators/Indicators, TTI) αποτελούν ένα σύστημα επισήμανσης τροφίμων, που λειτουργεί επικουρικά με την ημερομηνία λήξης, σαν μία "ζωντανή ημερομηνία λήξης" και ανήκουν στην έξυπνη συσκευασία. Με τη χρήση των TTIs καθίσταται δυνατός ο έλεγχος ενδεχόμενης κακομεταχείρισης του προϊόντος, σε ό,τι αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης. Χάρη στην εύκολα μετρήσιμη, χρωματική αλλαγή τους είναι εύκολο να παρακολουθηθεί το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό των τροφίμων, από το σημείο παραγωγής, τις ενδιάμεσες φάσεις μέχρι την στιγμή που φτάνει στον τελικό καταναλωτή. Λαμβάνουν ευρεία εφαρμογή σε ψυγμένα και κατεψυγμένα τρόφιμα, ωστόσο πραγματοποιούνται μελέτες και για τη χρήση τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Η εφαρμογή τους για την παρακολούθηση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής ψυγμένων τροφίμων έχει αξιολογηθεί με αρκετές μελέτες (π.χ. Vaikousi et al., 2008; Tsironi et al., 2011). Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες και έχουν αναπτυχθεί συστήματα με στόχο την επέκταση των δεικτών TTI από την παρακολούθηση ποιότητας στην παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων. Για παράδειγμα,

αναπτύχθηκε ένα μικροβιακό σύστημα TTI για την παρακολούθηση της ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes*, της *Salmonella* και του *Staphylococcus aureus* σε βόειο κιμά συσκευασμένου σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και σε μαγειρεμένο κοτόπουλο (Ellouze & Augustin, 2010). Επιπλέον, αναπτύχθηκε σύστημα TTI βασισμένο στην πολιτική διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας και στο σύστημα SMAS (Safety Monitoring and Assurance System), (Koutsoumanis et al., 2005), με στόχο τη βελτιστοποίηση κατανομής τροφίμων της ψυκτικής αλυσίδας.

1.2 Ορισμός και Αρχή Λειτουργίας των TTI

1.2.1 Ορισμός TTI

Ο χρονοθερμοκρασιακός δείκτης ή ολοκληρωτής (Time Temperature Integrator, TTI) ορίζεται ως μια απλή, χαμηλού κόστους διάταξη, η οποία δύναται με μια εύκολα μετρήσιμη αλλαγή εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία, να προσδιορίσει ολόκληρο ή μέρος του θερμοκρασιακού ιστορικού του τροφίμου στο οποίο είναι προσαρμοσμένη. Η μη αντιστρεπτή αλλαγή, που εκφράζεται από το TTI, είναι με τη μορφή μηχανικής καταπόνησης ή χρωματικής αλλαγής βασισμένη σε μηχανικά, χημικά ή ενζυματικά συστήματα (Taoukis & Labuza, 1989).

Οι δείκτες TTI ανήκουν στην έξυπνη συσκευασία (smart packaging), η οποία είναι μια τεχνολογία εύκολης χρήσης που παρακολουθεί τις συνθήκες του συσκευασμένου προϊόντος και παρέχει πληροφορίες για τη κατάσταση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων κατά τη διακίνηση τους.

1.2.2 Αρχή λειτουργίας TTI

Η αρχή λειτουργίας των TTIs βασίζεται σε μη αντιστρεπτή μηχανική, χημική, ηλεκτροχημική, ενζυμική ή μικροβιολογική αλλαγή από τη στιγμή ενεργοποίησής τους, που εκδηλώνεται σαν μια εύκολα μετρήσιμη οπτική απόκριση. Για παράδειγμα, η απόκριση αυτή μπορεί να είναι μεταβολή χρώματος ή παραμόρφωση ή μετακίνηση κάποια οπτικής ένδειξης. Κατά αυτόν τον τρόπο μέσω της απόκρισης καταγράφονται οι συνθήκες αποθήκευσης που έχει υποστεί ο δείκτης και προκύπτουν συμπεράσματα για την ποιοτική κατάσταση και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του τροφίμου, στο οποίο βρίσκεται. Ο βαθμός αξιοπιστίας αυτή της απόκρισης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές αρχές λειτουργίας του δείκτη.

1.3 Χαρακτηριστικά και προδιαγραφές ενός ιδανικού TTI

Για να είναι αξιόπιστος ένας δείκτης ως ποιοτικός δείκτης του τροφίμου πρέπει τα κινητικά χαρακτηριστικά της απόκρισής του να είναι παρόμοια με τη θερμοκρασιακή εξάρτηση των δράσεων ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου, όπως οι μικροβιολογικές αλλοιώσεις.

Για να είναι αποτελεσματικός ένας δείκτης TTI πρέπει να δείχνει μια συνεχή αναντίστρεπτη αλλαγή, ο ρυθμός της οποίας αυξάνει με τη θερμοκρασία και δεν αντιστρέφεται με μείωση της (Taoukis, 2001).

Ένας ιδανικός TTI πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις (Taoukis, 2001):

1. Να παρουσιάζει μια συνεχή, χρονοθερμοκρασιακά εξαρτώμενη αλλαγή.
2. Η αλλαγή να εκφράζεται ως μια απόκριση εύκολα μετρήσιμη και μη αντιστρεπτή.

3. Η αλλαγή αυτή να μιμείται ή να μπορεί να συσχετιστεί με το βαθμό ποιοτικής αλλοίωσης του τροφίμου και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του.
4. Να είναι αξιόπιστος και να δίνει σταθερές αποκρίσεις όταν εκτίθεται στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες.
5. Να έχει χαμηλό κόστος.
6. Να είναι ευέλικτος, έτσι ώστε διαφορετικές μορφές του να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορα θερμοκρασιακά συστήματα (π.χ. ψύξη, κατάψυξη, θερμοκρασία δωματίου) με χρήσιμες περιόδους απόκρισης από μερικές μέρες μέχρι και περισσότερο από ένα χρόνο.
7. Να είναι μικρός, εύκολα προσαρμόσιμος σαν τμήμα της συσκευασίας του τροφίμου και συμβατός με μια διεργασία συσκευασίας υψηλής ταχύτητας.
8. Να είναι σταθερός πριν την ενεργοποίησή του και να ενεργοποιείται εύκολα.
9. Να μην επηρεάζεται από τις υπόλοιπες περιβαλλοντικές συνθήκες πέραν της θερμοκρασίας, όπως το φως, οι ρυπαντές του αέρα και η σχετική υγρασία (RH).
10. Να είναι ανθεκτικός σε φυσιολογικές μηχανικές καταπονήσεις, χωρίς να επηρεάζεται η απόκρισή του.
11. Να μην είναι τοξικός και στην απίθανη περίπτωση επαφής του με το τρόφιμο να μην περικλείει κινδύνους.
12. Να είναι σε θέση να μεταφέρει με απλό και ξεκάθαρο τρόπο το μήνυμα στον καταναλωτή ή σε οποιονδήποτε άλλον ενδιαφερόμενο.
13. Η απόκρισή του να είναι οπτικά κατανοητή και επιπλέον να μπορεί να μετρηθεί εύκολα από ηλεκτρονικές συσκευές, ούτως ώστε οι πληροφορίες να λαμβάνονται, να αποθηκεύονται και να μεταδίδονται εύκολα και γρήγορα.

Στην πραγματικότητα δεν υπάρχει κανένας δείκτης TTI, τέτοιος ώστε να μπορεί να πληροί απολύτως όλες τις παραπάνω απαιτήσεις για να χαρακτηριστεί ως ιδανικός. Ωστόσο, με την εξέλιξη των δεικτών, πλέον το μοντέλο του ιδανικού TTI προσεγγίζεται αρκετά ικανοποιητικά από τους διαθέσιμους τύπους TTI.

1.4 Ταξινόμηση των TTI

Το αρχικό σύστημα ταξινόμησης των TTIs προτάθηκε από τους Schoen & Byrne (1972) (Taoukis & Labuza, 2003), οι οποίοι κατέταξαν τους χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες σε 6 κατηγορίες. Το 1976 ο Byrne αναθεώρησε την προηγούμενη ταξινόμηση, αντιλαμβανόμενος ότι η βασική λειτουργική διαφορά έγκειται στο αν ο δείκτης ανταποκρίνεται σε πάνω από μία προεπιλεγμένη θερμοκρασία ή αν ανταποκρίνεται συνεχώς, δίνοντας αθροιστική ένδειξη των θερμοκρασιακών συνθηκών στις οποίες εκτίθεται.

Έτσι, πρότεινε 3 τύπους:

- Δείκτες απόψυξης (defrost indicators)
- Χρονοθερμοκρασιακούς ολοκληρωτές (time-temperature integrators)
- Χρονοθερμοκρασιακούς ολοκληρωτές/δείκτες (time-temperature integrators /indicators)

Παρόμοιο σύστημα ταξινόμησης προτάθηκε από τους Singh & Wells το 1986, (Taoukis & Labuza, 2003):

- Δείκτες που δηλώνουν κακομεταχείριση (abuse indicators)
- Δείκτες μερικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ (Partial temperature history indicators)
- Δείκτες συνολικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ (Full temperature history indicators)

Η πιο πρόσφατη κατηγοριοποίηση που προτάθηκε από τους Taoukis & Labuza (2003), κατατάσσει τους δείκτες στις εξής κατηγορίες:

- **Δείκτες Κρίσιμης Θερμοκρασίας (CTI)**

Οι CTI δίνουν απόκριση πάνω ή κάτω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία αναφοράς. Δε δείχνουν το ιστορικό έκθεσης πάνω ή κάτω από τη θερμοκρασία αναφοράς και ανταποκρίνονται μόνο σε περίπτωση που το προϊόν έχει εκτεθεί σε ανεπιθύμητη θερμοκρασία για χρονικό διάστημα ικανό ώστε να προκληθεί μια αλλαγή κρίσιμη για την ασφάλεια ή την ποιότητα του. Επιπλέον, μπορούν να προειδοποιήσουν σε περιπτώσεις όπου φυσικοχημικές ή βιολογικές αντιδράσεις εμφανίζουν κάποια ασυνεχή αλλαγή στο ρυθμό τους.

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

Οι CTTI δίνουν απόκριση που αντικατοπτρίζει την αθροιστική έκθεση πέρα από τα όρια μίας κρίσιμης θερμοκρασίας και 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 αυτή θερμοκρασία.

- **Χρονοθερμοκρασιακοί Ολοκληρωτές ή Δείκτες (TTI)**

Οι δείκτες TTI 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. Επιπλέον, μπορούν να συσχετισθούν με συνεχείς εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία αντιδράσεις ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων.

Επιπρόσθετα, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση την αρχή λειτουργίας τους σε: μηχανικούς, χημικούς, ενζυμικούς, μικροβιολογικούς, δείκτες πολυμερισμού, ηλεκτροχημικούς, φωτοχημικούς και δείκτες διάχυσης.

Εικόνα 1. 3 a)Ενζυμικός δείκτης TTI b) Δείκτης πολυμερισμού TTI c) Μικροβιολογικός δείκτης TTI d) Φωτοχημικός δείκτης TTI e) Δείκτης διάχυσης TTI f) Χημικός δείκτης TTI.

1.5 Εξέλιξη των TTI

Η αναγνώριση της μεγάλης σημασίας των θερμοκρασιακών μεταβολών στην ποιότητα και στην ασφάλεια των τροφίμων, αποτέλεσε το κίνητρο για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού και χαμηλού κόστους χρονοθερμοκρασιακού δείκτη. Ο αρχικός προσανατολισμός των προσπαθειών αφορούσε τα κατεψυγμένα τρόφιμα. Η πρώτη εφαρμογή συσκευής που εντόπιζε τυχόν κακομεταχείριση χρονολογείται στο δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, όταν εφοδιαστικές ομάδες του Αμερικανικού στρατού τοποθετούσαν παγάκια στις συσκευασίες κατεψυγμένων τροφίμων. Εξαφάνιση του πάγου συνεπαγόταν κακομεταχείριση του τροφίμου. Ο πρώτος δείκτης που κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας («πατέντα») χρονολογείται στο 1933 (Midgley, 1933). Από τότε έχουν εκδοθεί πάνω από εκατό διαφορετικές αμερικανικές και διεθνείς πατέντες, που σχετίζονται με τους χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες (Taoukis, 2001). Αρχικά, ο Byrne έκανε μια γενική επισκόπηση των δεικτών το 1976 και μια πιο λεπτομερής παρουσίαση έγινε από τον

Taoukis το 1989. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται ορισμένες αξιόλογες πατέντες δεικτών με βάση τον τύπο και την αρχή λειτουργίας του TTI.

Πίνακας 1. 4 Πατέντες δεικτών με βάση τον τύπο και την αρχή λειτουργίας του TTI.

Έτος	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 & FreshPoint Coorporation	Φυσικοχημικός (OnVu TTI)
2008	Sun	Amylase Type TTI
2017	Røhr, Å. K. et al.	Διάχυσης (TTI)
2018	Kragt, A.J.J. et al.	Υγρών κρυστάλλων (TTI)

Το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο σύστημα TTI, το οποίο αναπτύχθηκε από τη Honeywell Corp.(Mineapoli, MN) (Renier & Morin, 1962), κρίθηκε αξιόπιστο, αλλά δεν έγινε εμπορικά διαθέσιμο, λόγω του υψηλού κόστους και όγκου του. Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 η αμερικανική κυβέρνηση προκάλεσε αναταραχή στην

έρευνα και την ανάπτυξη των TTI, καθιστώντας υποχρεωτική τη χρήση τους σε ορισμένα τρόφιμα. Δύο χρόνια αργότερα, η Artech Corp. (Falls Church, VA) ανέπτυξε εμπορικά ένα σύστημα TTI, το οποίο βασιζόταν στη χρωματική αλλαγή ενός οξειδώσιμου χημικού συστήματος ελεγχόμενου από τη θερμοκρασιακά εξαρτώμενη διείσδυση οξυγόνου μέσω μεμβράνης (Hu, 1972).

Μέχρι το 1976 έξι εταιρείες κατασκεύαζαν χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες (Kramer & Farquhar, 1976, Byrne,1976). Από αυτούς οι Artech, Check Spot Co, (Vancouver, WA) (US patent 2,971,852) και Tempil (S. Plainfield, NJ) κατηγοριοποιούνταν ως CTI, αν και ο Tempil μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως CTTI, ενώ οι I-Point (ενζυμικού τύπου) (Malmo, Sweden), Bio-Medical Sciences (Fairfield, NJ) (US patents 3,946,611 και 4,042,336) και ο 3M Co. (τύπου διάχυσης) (St Paul, MN) ήταν TTI.

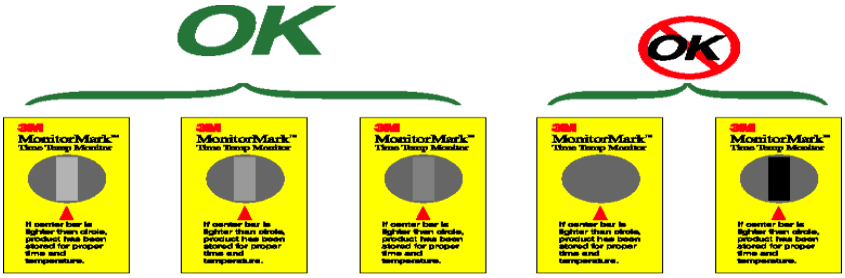
Ο δείκτης Tempil περιλάμβανε μία χρωματική αλλαγή σε κόκκινο χρώμα και επακόλουθη κίνηση όταν εκτίθετο πάνω από μία κρίσιμη θερμοκρασία. Στα τέλη της δεκαετίας του ’70 δεν είχε επιτευχθεί μεγάλη εμπορική εφαρμογή των TTI και η έρευνα μειώθηκε. Παρόλα αυτά παρέμειναν διαθέσιμα στην αγορά και συνεχίστηκε η ανάπτυξη ως προς τη βελτίωση των χαρακτηριστικών και της ποιότητας τους. Στις αρχές του ’80 εμπορικά διαθέσιμα ήταν τέσσερα TTI, εκ των οποίων ο 3M και ο I-Point. Επιπλέον, η Andover Labs (Weymouth, MA), εισήγαγε στην αγορά τους CTTI δείκτες Ambitemp και Tempchron, για χρήση στην ψυκτική αλυσίδα, με αρχή λειτουργίας τους τη μετακίνηση υγρού κατά μήκος τριχοειδούς σωλήνα.

1.6 Σύγχρονα TTI

Στη σύγχρονη εποχή, έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα εμπορικά διαθέσιμων χρονοθερμοκρασιακών δεικτών διάχυσης, φωτοχημικών, χημικών, πολυμερισμού, μικροβιολογικών και ενζυμικών δεικτών.

Δείκτες διάχυσης

Οι δείκτες διάχυσης έχουν ως αρχή λειτουργίας τη διάχυση ιξωδοελαστικού υλικού σε μια φωτοαντανακλαστική πορώδη μήτρα, με ρυθμό εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία. Αποτέλεσμα είναι η μεταβολή της διαπερατότητας του φωτός μέσα από την πορώδη μήτρα, δίνοντας μια ορατή απόκριση. Ο πρώτος δείκτης τέτοιου τύπου κυκλοφόρησε από την 3M Co., όπως αναφέρθηκε παραπάνω και ακολούθησε το 1997 ο Monitor mark© Time Temperature Monitor (Taoukis, 2001).



Εικόνα 1. 4 Δείκτης διάχυσης TTI 3M Monitor mark©

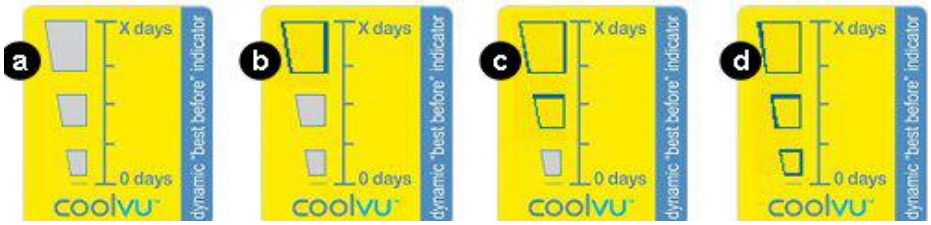
Φωτοχημικοί Δείκτες

Οι φωτοχημικοί δείκτες έχουν ως αρχή λειτουργίας φωτοχημική αντίδραση. Ο δείκτης ενεργοποιείται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), η οποία έχει ως αποτέλεσμα ένα σκούρο μπλε χρώμα, που αποχρωματίζεται σταδιακά με ρυθμό εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία. Παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί ο φωτοχημικός δείκτης OnVu™.

Εικόνα 1. 5 **Φωτοχημικός δείκτης TTI OnVuTM**

Χημικοί Δείκτες

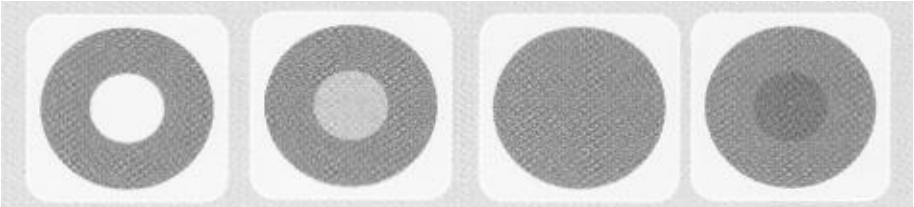
Οι χημικοί δείκτες έχουν ως αρχή λειτουργίας κάποια χημική αντίδραση και ενεργοποιούνται όταν έρθουν σε επαφή με την ετικέτα ενεργοποίησης με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό της εικόνας τους.



Εικόνα 1. 6 Δείκτης TTI CoolVU a) κατά την ενεργοποίηση, b) στην αρχή της μέσης ζωής του δείκτη, c) στο τέλος της μέσης ζωής του δείκτη, d) στο τέλος ζωής του δείκτη

Δείκτες Πολυμερισμού

Οι δείκτες πολυμερισμού έχουν ως αρχή λειτουργίας αντίδραση πολυμερισμού, σε στερεή φάση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να αποχρωματίζεται σταδιακά η εικόνα (Taoukis, 2001). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται ο δείκτης Fresh-Check^{R} Temptime Corp. (Morris Plains, NJ).

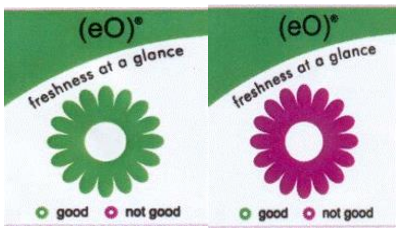


Εικόνα 1. 7 Δείκτης TTI Fresh-Check^{R} Temptime Corp. (Morris Plains, NJ)

Μικροβιολογικοί Δείκτες

Οι μικροβιολογικοί δείκτες έχουν ως αρχή λειτουργίας τη μείωση του pH, λόγω ανάπτυξης γαλακτικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα τη χρωματική μεταβολή από πράσινο σε φούξια ή τον αποχρωματισμό της εικόνας τους (Ellouze et al., 2008).

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται ο δείκτης (eO)©, της γαλλικής εταιρείας Cryolog (Gentilly, France).



Εικόνα 1. 8 Μικροβιολογικός δείκτης TTI, (eO)©

Ενζυμικοί Δείκτες

Οι ενζυμικοί δείκτες έχουν ως αρχή λειτουργίας τη χρωματική αλλαγή, ως αποτέλεσμα της μείωσης του pH, λόγω ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός λιπαρού υποστρώματος. Πριν την ενεργοποίηση του δείκτη, ένζυμο και υπόστρωμα βρίσκονται σε δύο ξεχωριστούς μικροθαλάμους. Κατά την ενεργοποίηση, σπάει με την επιβολή μηχανικής πίεσης το φράγμα που χωρίζει τους δύο θαλάμους και το ένζυμο και το υπόστρωμα αναμειγνύονται. Η υδρόλυση του υποστρώματος προκαλεί μεταβολή του pH, η οποία εκφράζεται με σταδιακή χρωματική αλλαγή από πράσινο σε κίτρινο (δίχρωμοι) ή από πράσινο σε κίτρινο και τελικά σε κόκκινο (τρίχρωμοι δείκτες) (Taoukis, 2001).

Στην παρούσα εργασία μελετώνται δείκτες TTI αυτού του τύπου, οπότε θα ακολουθήσει λεπτομερέστερη ανάλυση αυτών.

Ο δείκτης Check Point© της εταιρείας VITSAB, (Malmo, Sweden) είναι ο διάδοχος του δείκτη I-Point Time Temperature Monitor (VITSAB A.B., Malmo, Sweden). Ανάλογα με τα θερμοκρασιακά εύρη και τις επιδιωκόμενες διάρκειες ζωής των δεικτών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί συνδυασμοί τύπων και συγκεντρώσεων ενζύμου-υποστρώματος. Η χρωματική μεταβολή μπορεί να εκτιμηθεί εύκολα, καθώς τα αρχικά και τελικά χρώματα είναι εκτυπωμένα γύρω από το παράθυρο ανάγνωσης. Η συνεχής χρωματική μεταβολή μπορεί να μετρηθεί ενόργανα με χρωματόμετρο. (Taoukis & Labuza, 1989).

Οι ενζυμικοί δείκτες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση:

- ✓ το είδος ενζύμου-υποστρώματος
- ✓ την αναλογία συγκέντρωσης ενζύμου-υποστρώματος
- ✓ τα στάδια χρωματικής αλλαγής

Είδος ενζύμου-υποστρώματος

Πίνακας 1. 5 Τύποι VITSAB TTI ανάλογα με το είδος ενζύμου-υποστρώματος

Τύπος	Ένζυμο	Υπόστρωμα
L	*Rhizopus oryzae* λιπάση	Τριλαουρίνη
P	*Rhizopus oryzae* λιπάση	Τριπαλμιτίνη
B	*Rhizopus oryzae* λιπάση	Τριβουτυρίνη
C	*Rhizopus oryzae* λιπάση	Τρικαπροΐνη
M	*Rhizopus oryzae* λιπάση	Μυριστικός μεθυλεστέρας
LP	*Rhizopus oryzae* λιπάση	Μίγμα τριλαουρίνης- τριπαλμιτίνης
LM	*Rhizopus oryzae* λιπάση	Μίγμα τριλαουρίνης- μυριστικού μεθυλεστέρα

Αναλογία συγκέντρωσης ενζύμου-υποστρώματος

Πίνακας 1. 6 Τύποι VITSAB TTI ανάλογα με την αναλογία συγκέντρωσης ενζύμου-υποστρώματος

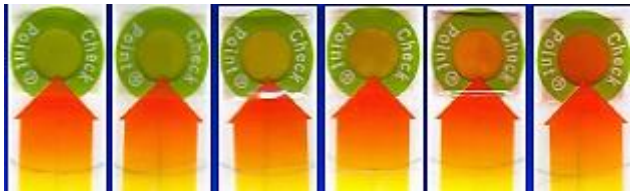
Τύπος	Θερμοκρασία	Διάρκεια ζωής
M4-30	4 ^{o}C	30 ημέρες
M4-5	4 ^{o}C	5 ημέρες
L5-24	5 ^{o}C	24 ημέρες
L5-8	5 ^{o}C	8 ημέρες
LM10-2	10 ^{o}C	2 ημέρες

Στάδια χρωματικής αλλαγής

Δίχρωμοι TTI: Στα δίχρωμα TTI συμβαίνει σταδιακή χρωματική αλλαγή από πράσινο σε κίτρινο χρώμα.

Εικόνα 1. 9 Χρωματική κλίμακα δίχρωμου Vitsab TTI

Τρίχρωμοι TTI: Στα τρίχρωμα TTI συμβαίνει σταδιακή χρωματική αλλαγή από πράσινο σε κίτρινο και τελικά σε κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 1. 10 Χρωματική κλίμακα τρίχρωμου Vitsab TTI

Στην ακόλουθη εικόνα φαίνεται ο τρόπος λειτουργίας του κεντρικού παραθύρου του τρίχρωμου δείκτη Vitsab, όπου αρχικά είναι μη ενεργοποιημένος, (άσπρο χρώμα) μετά αμέσως μετά την ενεργοποίηση του (πράσινο χρώμα), στη συνέχεια σε ενδιάμεση κατάσταση (κίτρινο χρώμα) και τέλος όταν έχει λήξει (πορτοκαλί - κόκκινο χρώμα).

Εικόνα 1. 11 Τρόπος λειτουργίας του τρίχρωμου δείκτη Vitsab

Ο τρίχρωμος δείκτης εξαιτίας της σαφής χρωματικής μεταβολής από πράσινο σε κίτρινο και έπειτα σε κόκκινο χρώμα, είναι πιο κατανοητός για χρήση από τους καταναλωτές, σε σχέση με τους δίχρωμους στους οποίους η χρωματική κλίμακα έχει στενότερο εύρος. Οι τρίχρωμοι δείκτες TTI δείχνουν και την ενδιάμεση κατάσταση του τροφίμου και όχι μόνο πότε το τρόφιμο είναι φρέσκο και πότε μη φρέσκο.

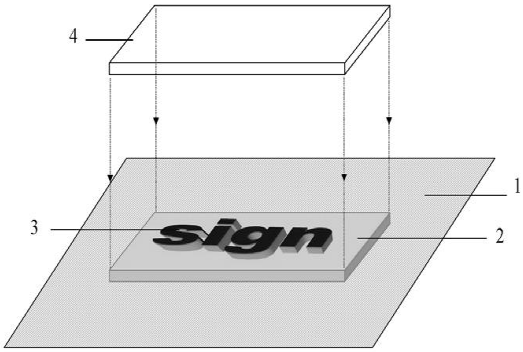
Συνεχώς, επιχειρείται η ανάπτυξη νέων βελτιωμένων συστημάτων TTI. Για παράδειγμα, πρόσφατα αναπτύχθηκε ένας νέος τύπος ενζυμικού δείκτη που ως αρχή λειτουργίας έχει την ενζυμική υδρόλυση αμύλου από μία α-αμυλάση (Yan et al., 2008).

Επιπλέον, αναπτύχθηκε ένα μικροβιακό TTI, που η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στην ανάπτυξη και τη μεταβολική δραστηριότητα του *Lactobacillus sakei*, που καθώς αναπτύσσεται, καταναλώνει γλυκόζη, παράγει γαλακτικό οξύ και προκαλεί μείωση του pH, μεταβάλλοντας το χρώμα ενός χημικού δείκτη, από κόκκινο σε κίτρινο, που προστίθεται στο σύστημα (Vaikousi et al., 2008).

Εικόνα 1. 12 Χρωματική μεταβολή μικροβιακού TTI (Vaikousi et al., 2008)

Ακόμη, ένα σύστημα χρωματομετρικού TTI αναπτύχθηκε το 2008, βασισμένο στην εξαφάνιση εκτυπωμένου μελανιού με την πάροδο του χρόνου. Αυτό το TTI είναι πολυστρωματικό και όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.12 αποτελείται από 1. ένα

πολυμερικό υπόβαθρο για εκτύπωση, 2. την εκτυπωμένη ένδειξη και 3. μία διαφανή πολυμερική επίστρωση (Galagan & Su, 2008).



Εικόνα 1. 13 Πολυστρωματική δομή χρωματομετρικού TTI (Galagan & Su, 2008)

Σε ερευνητικό επίπεδο το 2013 επιχειρήθηκε ο σχεδιασμός ενός συστήματος TTI με βάση ένα ισοενζυμικό μίγμα λακάσης από *Pleurotus ostreatus* και από *Trametes versicolor* και προέκυψε πως η ενέργεια ενεργοποίησης E_{α}, που αποτελεί σημαντικό παράγοντα στο σχεδιασμό αξιόπιστων TTI, μπορεί να εξατομικευθεί κατάλληλα με ένα μίγμα ενζύμων συγκεκριμενης αναλογίας, που προκύπτει από τον κανόνα ανάμιξης (Kim et al., 2013). Σε παρόμοια έρευνα προκειμένου να ελεγχθεί η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης χρησιμοποιήθηκε, ο παρεμποδιστικός παράγοντας για τη λακάση, νατραζίδιο, NaN_3 (Park et al., 2013).

Το 2015 αναπτύχθηκε ένα ενζυμικό σύστημα TTI, βασισμένο στην αντίδραση της λιπάσης από *Aspergillus niger* και τριβουτυρική γλυκερόλη (glycerol tributyrate), στο οποίο λόγω της αντίδρασης μειώνεται το pH, μεταβάλλοντας το χρώμα του δείκτη από μπλε σε κίτρινο (Wu et al., 2015).

Ακόμη ένα πρότυπο σύστημα TTI αναπτύχθηκε το 2016, βασισμένο σε ηλεκτροχημικό ψευδοτρανζίστορ (pseudo-transistor). Η συσκευή αυτή περιλαμβάνει ρολόι, αισθητήρα θερμοκρασίας και ηλεκτρικό διακόπτη και συνδυάζεται με τεχνική ανίχνευσης ραδιοσυχνοτήτων (radio frequency identification - RFID). Το TTI αυτό συνδυάζοντας αυτές τις δύο τεχνικές θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικά αξιόπιστο δείκτη για την παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού ιστορικού ευαλλοίωτων τροφίμων (Wan et al., 2016).

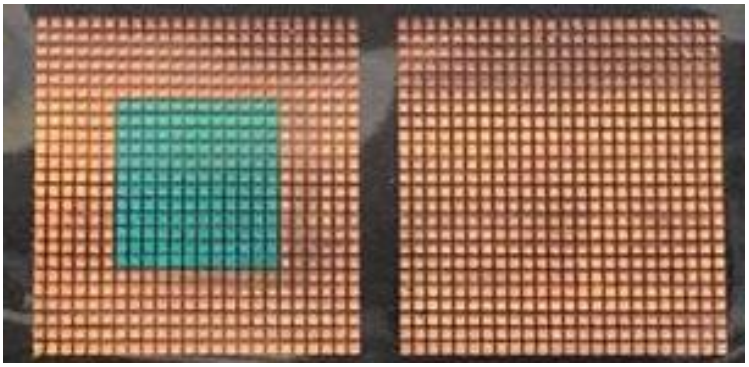
Επιπλέον έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα TTI διάχυσης παλμιτικού ισοπροπυλεστέρα (IPP) για τον έλεγχο της μικροβιακής ποιότητας μη παστεριωμένου χυμού του βοτάνου Angelica. Η απόκριση του δείκτη δίνεται από τη χρονοθερμοκρασιακά εξαρτώμενη απόσταση στην οποία έχει διαχυθεί ο εστέρας, μεσω πορώδους μήτρας (Kim et al., 2016).

Ο δείκτης Keep-it ®(Keep-it Technologies® AS, Oslo, Norway), βασίζεται σε μία χρονοθερμοκρασιακά εξαρτώμενη μετανάστευση ενός παράγοντα τροποποίησης

του pH σε ένα σύστημα πολυστροφισμού (U.S. Patent No. 9,612,162 B2) Washington, DC. Δείχνει τις ημέρες ζωής που απομένουν στο προϊόν (www.keep-it.no).

Εικόνα 1. 14 Δείκτης Keep-it ®. (Πηγή: www.keep-it.no)

Επιπλέον ένα πρότυπο σύστημα TTI αναπτύχθηκε από τη FreshStrips B.V., (Eindhoven, Netherlands) βασισμένο στη μνήμη σχήματος ενός μηχανικά ανάγλυφου χειρόμορφου νηματικού πολυμερικού δικτύου υγρών κρυστάλλων (Davies et al., 2013; Patent No. WO2018033595). Αν ο δείκτης εκτεθεί σε ακατάλληλες θερμοκρασίες το χρώμα στο παράθυρο ανάγνωσης μεταβάλλεται από πράσινο σε κόκκινο.



Εικόνα 1. 15 Απόκριση δείκτη TTI της FreshStrips.

1.7 Κινητική απόκριση των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI

Με τη χρήση των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI καθίσταται εφικτή η παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού ιστορικού του τροφίμου και μέσω μιας εύκολα μετρήσιμης απόκρισης, η μετάφραση της σε ποιότητα του τροφίμου. Προκειμένου, να επιλεγεί κατάλληλος και αποτελεσματικός δείκτης είναι απαραίτητη η γνώση των χαρακτηριστικών τους και η κινητική μαθηματική μοντελοποίηση της απόκρισης τους.

Για την εξαγωγή του μαθηματικού μοντέλου χρησιμοποιείται παρόμοια κινητική προσέγγιση με αυτήν της ποιοτικής υποβάθμισης τροφίμων. Έστω X η μετρήσιμη αλλαγή του TTI, τότε ορίζεται η συνάρτηση απόκρισης:

$$F(X) = kt \quad (1.13)$$

όπου k η σταθερά του ρυθμού, η οποία είναι θερμοκρασιακά εξαρτώμενη.

Η θερμοκρασιακά εξαρτώμενη σταθερά ρυθμού k ακολουθεί την κινητική Arrhenius, οπότε η συνάρτηση απόκρισης γίνεται της μορφής:

$$F(X) = k_{Iref}\exp\left[\frac{-E_{aI}}{R}\left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right]t \quad (1.14),$$

όπου k_{Iref}: η σταθερά ρυθμού απόκρισης του TTI σε θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} και E_{aI}: η ενέργεια ενεργοποίησης της απόκρισης του δείκτη.

Κατά τον ίδιο τρόπο για ένα TTI που εκτίθεται σε μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ ίδιο με του τροφίμου, τότε η συνάρτηση απόκρισης του με το χρόνο γίνεται:

$$F(X)_t = \int_0^t \mathrm{k}\mathrm{d}t = k_I \int_0^t \exp\left(\frac{-E_{aI}}{RT(t)}\right) \mathrm{d}t \quad (1.15),$$

όπου k_I και E_{aI}: οι κινητικές παράμετροι του συστήματος.

Χρησιμοποιώντας τη δραστική θερμοκρασία T_{eff}, η συνάρτηση απόκρισης γίνεται:

$$F(X)_t = k_I \exp\left(\frac{-E_{aI}}{RT_{eff}}\right) \quad (1.16)$$

1.8 Αντιστοίχιση απόκρισης των δεικτών TTI με την ποιότητα τροφίμων

Η συσχέτιση της απόκρισης του δείκτη TTI με την ποιότητα του τροφίμου δε γίνεται άμεσα. Προκειμένου να συσχετισθεί ένας δείκτης TTI με ένα τρόφιμο, πρέπει η εξάρτηση του ρυθμού απόκρισης του από τη θερμοκρασία με την θερμοκρασιακή εξάρτηση των δράσεων ποιοτικής υποβάθμισης τροφίμου να είναι παρόμοιες. Προκύπτει λοιπόν, πως για κάθε τρόφιμο απαιτείται η ύπαρξη ενός ξεχωριστού TTI, το οποίο είναι ασύμφορο και μη πρακτικό.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η θεώρηση μιας συνολικής καμπύλης θερμοκρασιακής εξάρτησης της διάρκειας ζωής μιας γενικής τάξης τροφίμων και κατασκευάστηκε δείκτης με όμοια καμπύλη θερμοκρασιακής εξάρτησης, όσον αφορά τον απαιτούμενο χρόνο για συγκεκριμένο σημείο της κλίμακας (Renie & Morin, 1962). Ωστόσο, στα τρόφιμα ακόμα και αν είναι του ίδιου τύπου, η ποιοτική υποβάθμιση δεν ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά οπότε υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις (Bengtsson et al., 1972). Άρα, η θερμοκρασιακή εξάρτηση του TTI πρέπει να

ταιριάζει με το εκάστοτε εξεταζόμενο τρόφιμο. (Haykawa & Wong, 1974; Krammer & Farquhar, 1976).

Η αντιστοίχιση της απόκρισης των δεικτών με την ποιότητα του τροφίμου είναι πολύπλοκη και αποτέλεσε αντικείμενων αρκετών μελετών, που είχαν στόχο τη συσχέτιση συγκεκριμένων TTI με συγκεκριμένα τρόφιμα (Rodriguez & Zaritzki, 1983; Mistry & Kosikowski, 1983; Dolan et al., 1985; Tinker et al., 1985). Στις μελέτες αυτές τα τρόφιμα αποθηκεύονταν σε διαφορετικές θερμοκρασίας και κατασκευάζονταν διαγράμματα απόκρισης των TTI και των τιμών των ποιοτικών παραμέτρων που εξετάζονταν ως προς το χρόνο, τα οποία στη συνέχεια επεξεργάζονταν στατιστικά. Σε όλες τις μελέτες γινόταν και οργανοληπτικός έλεγχος. Ωστόσο, υπήρχαν κάποια μειονεκτήματα σε αυτήν την προσέγγιση, καθώς σε ορισμένες έρευνες δε χρησιμοποιούνταν οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης, ούτε τα κατάλληλα TTI για τα συγκεκριμένα θερμοκρασιακά διαστήματα και τους χρόνους αποθήκευσης. Επιπλέον, ένα σημαντικό μειονέκτημα ήταν η περιορισμένη εφαρμογή τους. Εφόσον, δεν κατασκευάζονταν μοντέλα χρονοθερμοκρασιακής εξάρτησης των TTI, μπορούσαν να εφαρμοσθούν μόνο σε τρόφιμα για τις συγκεκριμένες συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν.

Για αυτό αναπτύχθηκε ένας σχεδιαγραμματικός αλγόριθμος για την εφαρμογή των TTI που επιτρέπει την εκτίμηση της τιμής του παράγοντα ποιότητα A, οποιαδήποτε χρονική στιγμή, από τη μετρούμενη αλλαγή X του δείκτη αυτή τη χρονική στιγμή (Taoukis & Labuza, 1989). Για να εφαρμοστεί το σχεδιάγραμμα απαιτείται η γνώση των κινητικών χαρακτηριστικών ποιότητας ($f(A)$,k_A,E_a) και των κινητικών χαρακτηριστικών απόκρισης του δείκτη TTI ($f(X)$,k_I,E_{aI}).

Τα βήματα του αλγορίθμου αυτού είναι τα εξής:

1. Υπολογίζεται η τιμή συνάρτησης απόκρισης $F(X)_t$ του TTI, από τη μετρούμενη τιμή X_t.

$$F(X)_t = F(X_t) \quad (1.17)$$

2. Γίνεται εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας, που περιγράφει την κατανομή της θερμοκρασίας, από τη σχέση:

$$T_{eff} = \frac{-E_{aI}}{R ln(\frac{F(X)_t}{K_I t})} \quad (1.18)$$

3. Από την T_{eff} και γνωρίζοντας τις παραμέτρους ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου, υπολογίζεται η συνάρτηση ποιότητας του $Q(A)_t$:

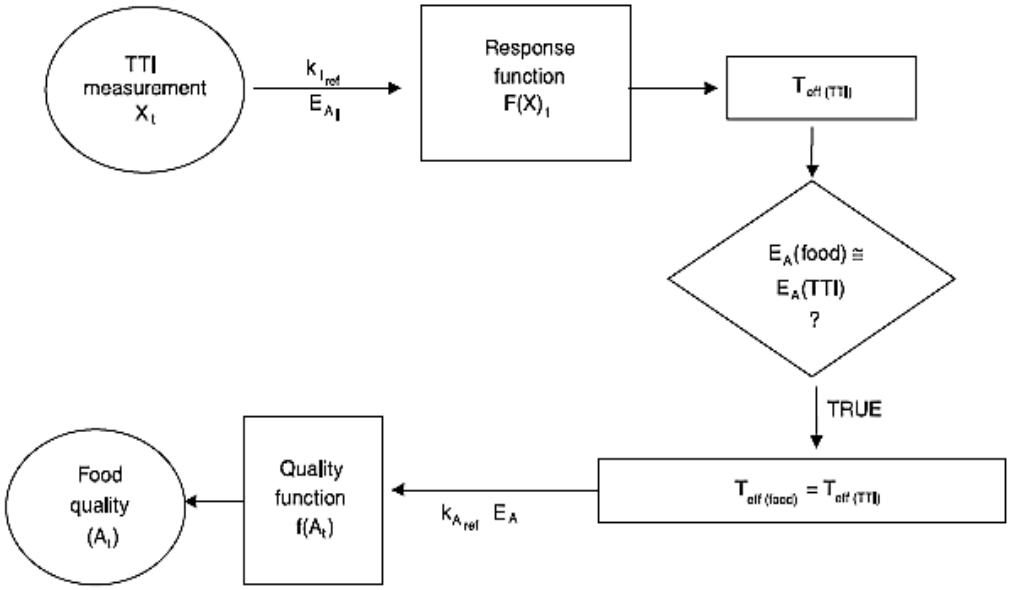
$$Q(A)_t = k_{Aref} * \exp[\frac{-E_a}{R}\left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}}\right)]t \quad (1.19)$$

4. Με βάση την τιμή της συνάρτησης ποιότητας $Q(A)_t$ υπολογίζεται η τιμή της ποιότητα At, που δείχνει το βαθμό ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου. Ο

δείκτης ποιότητας επιτρέπει και την εκτίμηση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής σε οποιαδήποτε μέση θερμοκρασία.

$$A_t = Q^{-1}[Q(A)_t] \quad (1.20)$$

Τα βήματα αυτά φαίνονται στο ακόλουθο σχεδιάγραμμα:



Εικόνα 1. 16 Σχεδιάγραμμα προσέγγισης για την εφαρμογή κατάλληλου TTI στον ποιοτικό έλεγχο τροφίμων

Στο παραπάνω μοντέλο έχει γίνει η υπόθεση ότι οι δραστικές θερμοκρασίες τροφίμου και TTI είναι ίσες, δηλαδή T_{eff} (τροφίμου)=T_{eff} (TTI), για δεδομένη κατανομή θερμοκρασίας, η οποία όμως ισχύει μόνο όταν και οι ενέργειες ενεργοποίησης είναι ίσες, δηλαδή E_α(τροφίμου)=E_α(TTI). Έχει διαπιστωθεί ότι όταν η διαφορά των ενεργειών ενεργοποίησης είναι μικρότερη από 40 kJ/mol τότε οι T_{eff} διαφέρουν κατά 0,4 έως 1,8^{o}C, άρα το σφάλμα στην εκτίμηση ποιότητα θα κυμαίνεται από 10 έως 15%, το οποίο σε αρκετές περιπτώσεις είναι αποδεκτό (Taoukis, 2001). Επομένως, όσο μικρότερη η διαφορά των ενεργειών ενεργοποίησης τροφίμου και TTI τόσο μικρότερο και το σφάλμα της ένδειξης του TTI για την ποιότητα του τροφίμου.

Η προσέγγιση αυτή για τη συσχέτιση απόκρισης TTI και ποιότητας βρίσκει εφαρμογή κυρίως σε ευαλλοίωτα ψυγμένα τρόφιμα (Taoukis & Labuza, 1999; Taoukis et al., 1999), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε κατεψυγμένα τρόφιμα υπό ορισμένες προϋποθέσεις σχετικά με την εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius και την παραδοχή ότι τα τρόφιμα δεν υπόκεινται σε απόψυξη κατά την αποθήκευση τους (Giannakourou & Taoukis, 2003a;b).

1.8.1 Σφάλματα στην εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας Teff

Σε διαφορετικές θερμοκρασιακές κατανομές η πραγματική δραστική θερμοκρασία του τροφίμου, T_{eff} (τροφίμου) μπορεί να διαφέρει από την εκτιμώμενη δραστική θερμοκρασία του TTI, T_{eff} (TTI) για τους εξής λόγους:

i.Διαφορά των τιμών ενεργοποίησης, E_α τροφίμου και TTI

Πρόκειται για συστηματικό και όχι στατιστικό σφάλμα, που είναι μικρότερο όσο η ενέργεια ενεργοποίησης του τροφίμου, E_α(τροφίμου) πλησιάζει αυτήν του TTI, E_α(TTI).

ii.Στατιστική αβεβαιότητα παραμέτρων εξίσωσης Arrhenius

Για την κινητική μελέτη των δεικτών TTI χρησιμοποιείται η εξίσωση Arrhenius, με την παραδοχή πως περιγράφει την ενζυμική αντίδραση. Κάνοντας γραμμική προσαρμογή υπολογίζονται οι παράμετροι E_α και k_o, έχοντας κάποιο σφάλμα το οποίο μειώνεται με τη χρήση τουλάχιστον 5 θερμοκρασιών.

iii.Μεταβλητότητα μετρήσεων απόκρισης δεικτών ίδιου μοντέλου στις ίδιες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας.

Για να περιοριστεί η μεταβλητότητα αυτή, απαιτείται ο καλύτερος έλεγχος της κατασκευής των TTI. Για να ελαχιστοποιηθεί αυτό το σφάλμα σε κινητικές μελέτες, είναι απαραίτητη η χρήση μεγάλου αριθμού δείγματος, του ίδιου δείκτη σε κάθε πειραματική διαδικασία.

1.9 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί στην εφαρμογή των TTI

Αρχικοί τύποι των TTIs εμφανίζονταν τεχνικώς αναποτελεσματικοί και αναξιόπιστοι, ωστόσο με την εξέλιξη τα TTIs της νέα γενιάς δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Η χρήση των ετικετών για ευπαθή τρόφιμα μπορεί να καταστείλει τις ανησυχίες των καταναλωτών που θέλουν υψηλής ποιότητας τρόφιμα, χωρίς ανησυχία για την ποιότητα τους και το κατά πόσο είναι φρέσκα. Η χρήση τους είναι ακόμα αρκετά περιορισμένη, παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν στη διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων κατά τη διακίνηση τους στην ψυκτική αλυσίδα. Επιπλέον, έχουν προστατευτική δράση ως προς την ασφάλεια των καταναλωτών και διευκολύνουν την καλύτερη διαχείριση τροφίμων, ώστε να μην υπάρχουν απώλειες. Η επιφυλακτικότητα αυτή οφείλεται σε κάποιους περιορισμούς που υπάρχουν και είναι οι εξής:

Η **αξιοπιστία** των δεικτών TTI έχει υποστεί πλήγμα λόγω κάποιων υπερβολικά ελπιδοφόρων ισχυρισμών από τους κατασκευαστές αρχικών μοντέλων και λόγω έλλειψης επαρκών δεδομένων από μελέτες σχετικά με την απώλεια ποιότητας των τροφίμων. Λόγω κακού σχεδιασμού οι πρώτες απόπειρες εφαρμογής των δεικτών ως ποιοτικών δεικτών ήταν ανεπιτυχείς, βλάπτοντας την αξιοπιστία τους. Ωστόσο, η σύγχρονη παραγωγή συστημάτων TTI έχει εξελιχθεί σε μεγάλο βαθμό και μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα (Taoukis & Labuza, 2003).

Το **κόστος** εξαρτάται από τον όγκο παραγωγής και αφού προς το παρόν δεν υπάρχει μαζική παραγωγή, λόγω χαμηλής ζήτησης, το κόστος παραμένει υψηλό. Παρόλα

αυτά αν καμφθούν οι υπόλοιποι περιορισμοί θα επιτευχθεί οικονομία κλίμακας και η οικονομική ανάλυση κόστους-οφέλους θα είναι υπέρ των δεικτών.

Η **εφαρμοσιμότητα** των δεικτών αποτελεί το σημαντικότερο περιορισμό στην εφαρμογή τους. Οι πρώιμες μελέτες απέτυχαν να δώσουν ένα σαφή τρόπο μετάφρασης της απόκρισης των δεικτών σε ποιότητα του τροφίμου. Αρχικά, προσεγγίστηκε με την κατασκευή καμπύλης θερμοκρασιακής εξάρτησης μιας γενικής κατηγορίας τροφίμων (π.χ. κατεψυγμένων) και την επιλογή δείκτη με παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση, το οποίο απορρίφθηκε καθώς τρόφιμα του ίδιου τύπου διαφέρουν σημαντικά στην ποιοτική υποβάθμιση τους συναρτήσει της θερμοκρασίας (Taoukis & Labuza, 2003).

Η **άγνοια των καταναλωτών** σχετικά με τη χρήση των δεικτών αποτελεί έναν επιπλέον πρόβλημα στην εφαρμογή τους, το οποίο μπορεί να αντιμετωπισθεί με ενημέρωση και πληροφόρηση τους (Sherlock et al., 1991, Pennanen et al., 2015).

Επιπρόσθετα, περιορισμούς στη χρήση τους θέτουν και οι ίδιοι οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες. Για παράδειγμα, TTI με αρχή λειτουργίας χημική ή ενζυμική αντίδραση αποδείχθηκε πως συχνά παρουσιάζουν ευαισθησία στη διάχυση αερίου διαμέσου πολυμερούς φιλμ, που χρησιμοποιείται για την παραλαβή των αντιδραστηρίων. Επιπλέον, το TTI Lifelines επηρεάζεται από το φως αποθήκευσης, πρόβλημα που μπορεί να αντιμετωπιστεί με ειδικό φίλτρο που θα παρεμπόδιζε το φως. Τέλος, τα TTI συχνά τοποθετούνται στο εξωτερικό της συσκευασίας, οπότε προκύπτει το ερώτημα αν η ετικέτα ελέγχει τη θερμοκρασίας του περιβάλλοντος γύρω από τη συσκευασία και όχι τη θερμοκρασία του προϊόντος. Θα μπορούσε ο δείκτης να τοποθετείται στο εσωτερικό με ένα παράθυρο ανάγνωσης, για να φαίνεται η κλίμακα. Έτσι θα παρέχονταν ακριβέστερες θερμοκρασιακές τιμές, αφού ο αισθητήρας θα αποκρινόταν καλύτερα στο ίδιο θερμικό περιεχόμενο με το τρόφιμο.

1.10 Εφαρμογές TTI σε τρόφιμα

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο τη συσχέτιση συγκεκριμένων TTI με συγκεκριμένα τρόφιμα. Στον ακόλουθο πίνακα αναφέρονται τέτοιες μελέτες:

Πίνακας 1. 7 Μελέτες για τη συσχέτιση τροφίμων με TTI.

Μελέτες	Τρόφιμο
Rodriguez & Zaritski, 1983	Κατεψυγμένο βοδινό κρέας
Mistry & Kosikowski, 1983; Grisius et al., 1987; Chen & Zall, 1987	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, 1987a	Κατεψυγμένος χυμός από πορτοκάλι
Chen & Zall, 1987b	Παστεριωμένη κρέμα
Chen & Zall, 1987b; 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., 1999	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,psetta maxima)
Els Bobelyn et al., 2006	Μανιτάρια
Tsironi et al., 2008	Κατεψυγμένος τόνος συσκευασμένος υπό κενό
Vaikousi et al., 2009	Κιμάς συσκευασμένος σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Ellouze et al., 2010	Συσκευασμένος βόειος κιμάς σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συσκευασμένο ψημένο φιλέτο κοτόπουλο
Tsironi et al., 2011	Φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα
Jin Young Han et al., 2012	Φιλέτο μοσχαριού
Kim et al., 2013	Χοιρινός κιμάς Κορέας
Brizio et al., 2014	Ψυγμένα φιλέτα κοτόπουλο
Giannoglou et al., 2014	Κατεψυγμένα θαλασσινά (Γλαυκοκαρχαρίας και Θράψαλο Ν.Ζηλανδίας)
Tsironi et al., 2016	Στρείδια

Επιπλέον, αρκετές διπλωματικές εργασίες του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου είχαν ως αντικείμενο μελέτης την εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών στη διαχείριση της αλυσίδας ψυγμένων και κατεψυγμένων τροφίμων, όπως παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 1. 8 Διπλωματικές εργασίες πάνω στα TTI, που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο του Ε.Μ.Π..

Συγγραφέας	Διπλωματική Εργασία
Αναστάσιος Σταματίου	Εφαρμογή TTI στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας φιλέτων ψαριού συσκευασμένων σε MAP (Αθήνα, 2008)
Ηλιάνα Μεταξά	Μελέτη νέων χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (TTI) για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας: Εφαρμογή σε προϊόντα κρέατος (Αθήνα, 2009)
Ελένη Πλατάκου	Εφαρμογή TTI στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας φιλέτων τιλάπιας (Αθήνα, 2010)
Κλεοπάτρα Τσατσαράγκου	Εφαρμογή TTI στη διαχείριση της αλυσίδας κατεψυγμένων θαλασσινών (Αθήνα, 2010)
Μαργαρίτα Λουκιανού	Εφαρμογή TTI στη διαχείριση της αλυσίδας ψυγμένων χελιών και κατεψυγμένου γλαυκοκαρχαρία (Αθήνα, 2011)
Αφροδίτη Τούλη	Έξυπνη συσκευασία: Μελέτη και εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (TTI) στην ψυκτική αλυσίδα κατεψυγμένων θαλασσινών (Αθήνα, 2013)
Μαρία Πολεμαρχάκη	Κινητική μελέτη έξυπνης συσκευασίας με εφαρμογή ενζυμικών και φωτοχημικών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών TTI για τον έλεγχο της ψυκτικής αλυσίδας βόειου κιμά (Αθήνα, 2015)
Καλλιόπη Καλλιούπη	Έξυπνη συσκευασία: Έρευνα και επιλογή συνδυασμού ενζύμου-υποστρώματος για την ανάπτυξη TTI με χρονοθερμοκρασιακή απόκριση κατάλληλη για τον έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας στην ψυκτική αλυσίδα στρειδιών (Αθήνα, 2016)
Νικόλας Περικλέους	Κινητική μελέτη και εφαρμογή έξυπνης συσκευασίας TTI στον έλεγχο και τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας καπνιστού σολομού. (Αθήνα, 2016)
Άννα-Μαρία Ευαγγελοπούλου	Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών και μικροβιακών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών TTI και της διατηρησιμότητας προϊόντων καπνιστής πέστροφας με εφαρμογή στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας. (Αθήνα, 2017)
Ειρήνη Παπαμιχαήλ	Έξυπνη συσκευασία για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας ιχθυηρών: Κινητική μελέτη απόκρισης Χρονοθερμοκρασιακών Ολοκληρωτών (TTI) και συσχέτιση με την παραγωγή ισταμίνης σε κέφαλο. (Αθήνα, 2017)

1.11 Εφαρμογές των TTI

Δεδομένου ότι η θερμοκρασία αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων, είναι σημαντικό να παρακολουθείται το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό τους κατά τη διακίνηση τους από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση. Είναι απαραίτητη επομένως, η χρήση χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εφαρμογή τους σε προϊόντα της ψυκτικής αλυσίδας. Ωστόσο, εκτός από την αναδυόμενη αγορά των κατεψυγμένων γευμάτων, άλλες κατηγορίες προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων, το φρέσκο κρέας, τα ψάρια, τα πουλερικά, τα οινοπνευματώδη ποτά, φάρμακα και καλλυντικά είναι πιθανοί στόχοι για τα καταναλωτικού τύπου TTIs.

Ακολούθως παρατίθενται ορισμένες εφαρμογές των δεικτών TTI:

- Η εταιρεία Milco© χρησιμοποιεί χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες σε χυμούς και γαλακτοκομικά προϊόντα.
- Η γαλλική αλυσίδα καταστημάτων Monoprix χρησιμοποιεί TTI πολυμερισμού σε ευαλλοίωτα προϊόντα δικής τους ετικέτας και τους δείκτες (eO)© σε συσκευασμένο φρέσκο χοιρινό.
- Οι δείκτες Heatmarker®, χρησιμοποιούνται σε ευαλλοίωτα φάρμακα.
- TTI πολυμερισμού χρησιμοποιούνται στην Ισπανία στα καταστήματα Continent.
- Οι δείκτες Fresh-Check®, χρησιμοποιούνται σε εμβόλια της Unicef.
- Οι δείκτες CheckPoint®, χρησιμοποιούνται σε υπό κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα θαλασσινά που εισάγονται στις Η.Π.Α..
- Χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες χρησιμοποιούνται από την εταιρεία Carrefour.
- Η εταιρεία Ernst Kneuss Geflugel A.G στην Ελβετία χρησιμοποιεί το φωτοχημικό δείκτη OnVuTM στις συσκευασίες φρέσκου κοτόπουλου.
- Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας χρησιμοποίησε τον 3M TTI για την παρακολούθηση εμβολίων. (Manske, 1985)
- Η αεροπορική εταιρεία British Airways έχει αναπτύξει μαζί με τη Vitsab, ένα σύστημα ελέγχου CheckPoint® Flight label1, για τις ψυγμένες έτοιμες τροφές στις πτήσεις.

Εικόνα 1. 17 Εφαρμογές TTI σε προϊόντα και ο δείκτης Vitsab Flight label1.

1.12 Στάση των καταναλωτών απέναντι στα TTI

Υπάρχει θετική ανταπόκριση των καταναλωτών απέναντι στη χρήση των δεικτών TTI, όπως προκύπτει από μελέτες που έχουν διεξαχθεί κατά καιρούς (Anonymous, 1991; Sherlock & Labuza, 1992). Σε μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο (511 ερωτηθέντες) η χρήση των TTI θεωρήθηκε καλή ιδέα σε ποσοστό 95%, διότι δίνουν πληροφορίες σχετικά με το αν το τρόφιμο είναι ασφαλές (28%) αν έχει διατηρηθεί στη σωστή θερμοκρασία (21%) και κατά πόσο είναι φρέσκο (16%). Επιπλέον, οι δείκτες θεωρήθηκαν ως ένα εργαλείο που εκπαιδεύει τους καταναλωτές να διατηρούν σωστά τα τρόφιμα στο σπίτι (Anonymous, 1991). Σε αντίστοιχη μελέτη στην Αμερική για κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα προέκυψε πως το 90% των ερωτηθέντων (104 ερωτηθέντες) επιθυμεί την ύπαρξη TTI στη συσκευασία και το 97% θεώρησε πως με την ύπαρξη TTI αυξάνεται η εμπιστοσύνη σχετικά με το πόσο φρέσκα είναι τα προϊόντα. Σύμφωνα, με την έρευνα αυτή, ένα ποσοστό της τάξης του 80% των ερωτηθέντων δε θα αγόραζε ένα προϊόν που δεν είχε φτάσει στην ημερομηνία ανάλωσης του, αν ο δείκτης είχε αλλάξει (Sherlock & Labuza, 1992). Σε έρευνα μικρότερης κλίμακας (21 ερωτηθέντες) στη Φινλανδία οι ερωτηθέντες θεώρησαν την ύπαρξη TTI ως έναν παράγοντα αυξημένης ασφάλειας, καθώς πλέον δε θα χρειάζεται να εμπιστεύονται μόνο τις αισθήσεις τους. Ωστόσο, υπάρχουν ανησυχίες και υποψίες ότι οι δείκτες μπορεί να δίνουν ανακριβείς πληροφορίες, προκαλώντας κινδύνους σε συνδυασμό με την αύξηση της τιμής (Mikkola, 1997; Anonymous, 1991).

Επιπλέον, σε έρευνα που έγινε στην Ευρώπη σε Φινλανδούς, Γάλλους, Έλληνες και Γερμανούς ερωτηθέντες προέκυψε πως θεωρούν την εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών χρήσιμη καθώς θα αυξηθεί η ασφάλεια των τροφίμων, ειδικά σε χώρες με θερμό κλίμα. Ωστόσο, υπάρχουν αμφιβολίες για αύξηση της τιμής λόγω της τεχνολογίας και πιθανή αύξηση σπατάλης τροφίμων (Pennanen et al., 2015).

1.13 Εφαρμογή TTI στη διατήρηση της ψυκτικής αλυσίδας

Μεγάλο μέρος των κατεψυγμένων προϊόντων τροφίμων, παρουσιάζει σημαντικές αποκλίσεις θερμοκρασίας από το συνιστώμενο εύρος σε ολόκληρη την ψυκτική αλυσίδα, συμπεριλαμβανομένης της λιανικής πώλησης και την οικιακή

αποθήκευση. Είναι σημαντική η εφαρμογή ενός βελτιστοποιημένου συστήματος διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας για τα κατεψυγμένα προϊόντα, που απαιτούν συνεχή παρακολούθηση των συνθηκών αποθήκευσης, από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση. Στα πλαίσια του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος Development, Modelling and Application of Time Temperature Integrators to monitor Chilled Fish Quality FAIR-CT96-1090, έγινε προσπάθεια συστηματικής μελέτης και μοντελοποίησης της διατηρησιμότητας διαφόρων φρέσκων και ελάχιστα επεξεργασμένων ιχθυηρών.

Η ανάλυση διατηρησιμότητας απαιτεί χρονική συσχέτιση μεταξύ των μετρούμενων χημικών/βιοχημικών αλλαγών, της μικροβιολογικής δραστηριότητας και της οργανοληπτικής ποιότητας. Παρότι κάθε ψάρι έχει δικό του μοτίβο αλλοίωσης εξαρτώμενο από εξωτερικούς και εσωτερικούς του παράγοντες, η μελέτη τους διευκολύνει τη δημιουργία ενός αξιόπιστου μοντέλου πρόρρησης (Dalgaard, 1995; Dalgaard & Huss, 1997). Μοντέλα οργανοληπτικής ποιότητας και ανάπτυξης της φυσικής μικροχλωρίδας αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες για ποικιλία ψαριών (Taoukis, 2001).

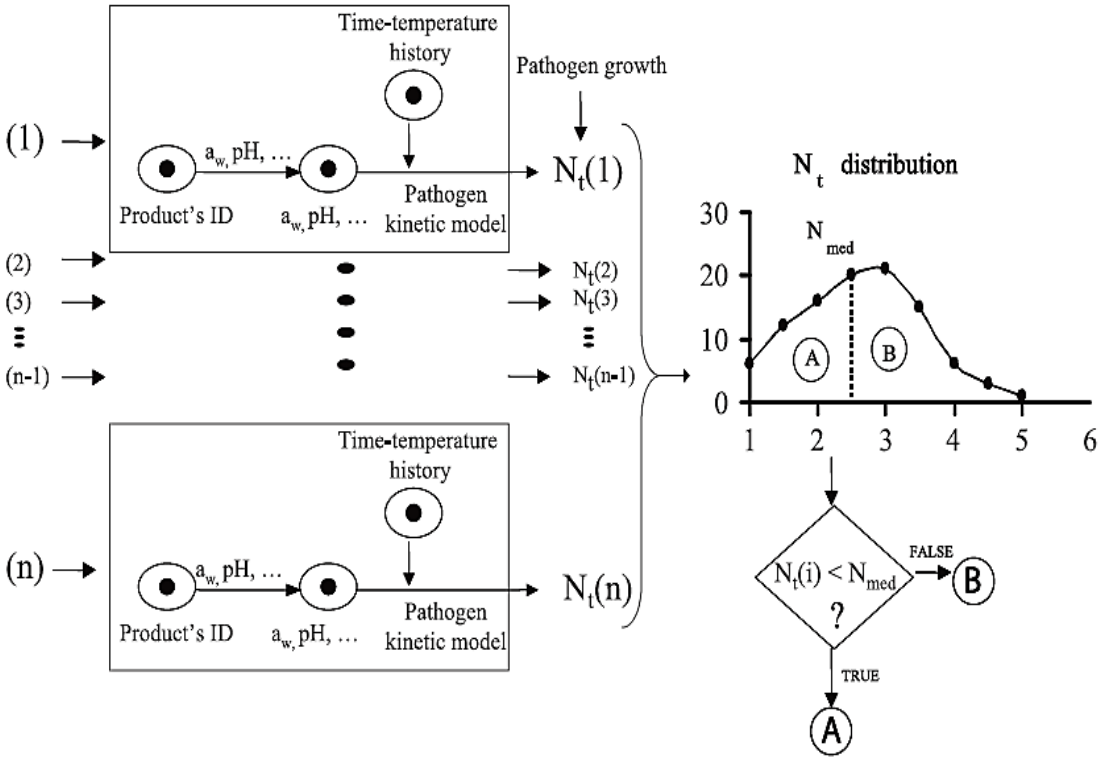
1.14 Πολιτική FIFO-LSFO & Ανάπτυξη συστήματος SMAS (Safety Monitoring and Assurance System)

Για τη διακίνηση των τροφίμων σήμερα χρησιμοποιείται η πολιτική FIFO (First In First Out), η οποία βασίζεται στην αρχή ότι αυτό που εισέρχεται πρώτο εξέρχεται και πρώτο στα διάφορα σημεία της αλυσίδας. Με αυτήν την προσέγγιση επιδιώκεται μια σταθερή κατάσταση, όπου όλα τα προϊόντα βρίσκονται στο ίδιο ποιοτικό επίπεδο. Αυτό όμως αποτελεί ένα μη ρεαλιστικό σενάριο, καθώς όλα τα προϊόντα δεν υφίστανται την ίδια μεταχείριση. Λύση στο πρόβλημα αυτό δίνουν οι δείκτες, οπότε εισάγεται μία άλλη πολιτική η LSFO (Least Shelf life First Out), όπου πρώτα εξέρχονται τα προϊόντα με μικρότερη διάρκεια ζωής.

Το SMAS αποτελεί ένα σύστημα, το οποίο αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Development and Modelling of a TTI based Safety and Monitoring System for Chilled Meat Products με κωδικό QLK1-CT2002-02545, 2003-2006. Το SMAS θα μπορούσε να αντικαταστήσει το «FIFO» και να βελτιστοποιήσει την εφοδιαστική αλυσίδα (logistics) διανομής των προϊόντων. Το SMAS είναι σύστημα βασισμένο σε χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες που εξασφαλίζει τόσο την ασφάλεια όσο και την ποιότητα των προϊόντων στην ψυκτική αλυσίδα. Βασίζεται σε κινητικά μοντέλα αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών τροφίμων, στα εγγενή χαρακτηριστικά του προϊόντος και στο χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό, χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες από την

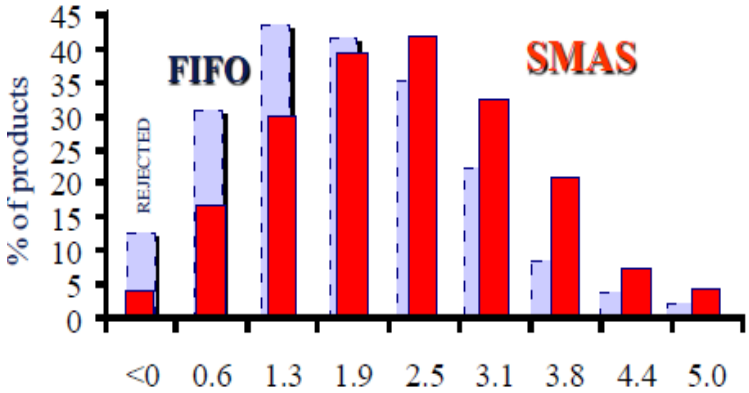
απόκριση των TTI σε καθορισμένα σημεία της ψυκτικής αλυσίδας, μειώνοντας αποτελεσματικά το ποσοστό των επικίνδυνων προϊόντων την στιγμή της κατανάλωσης (Koutsoumanis et al., 2005; Taoukis & Tsironi, 2016). Το SMAS αναπτύχθηκε για ψυγμένα προϊόντα κρέατος, αλλά θα μπορούσε να εφαρμοστεί εξίσου αποτελεσματικά για τα ψάρια ή άλλα προϊόντα της ψυκτικής αλυσίδας.

Στα σημαντικά σημεία ελέγχου προϋπόθεση του SMAS είναι η εισαγωγή των χαρακτηριστικών του προϊόντος και της απόκρισης του συνημμένου TTI στο τρόφιμο. Γίνεται η καταχώρηση των πληροφοριών σε φορητή εξοπλισμένη με το κατάλληλο λογισμικό μονάδα, ώστε να μεταφραστούν σε μικροβιακό φορτίο N_t και επικινδυνότητα (Koutsoumanis et al., 2005). Στο ακόλουθο λογικό διάγραμμα απεικονίζεται ο αλγόριθμος λήψης αποφάσεων σε ένα υποθετικό σημείο ελέγχου της ψυκτικής αλυσίδας. Τα προϊόντα με το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο N_t που βρίσκονται εντός αποδεκτών ορίων μεταφέρονται στον κοντινό προορισμό (B) για να καταναλωθούν συντομότερα, ενώ τα λιγότερο αλλοιωμένα μικροβιολογικά θα μετακινηθούν στη μακρινή αγορά (A).

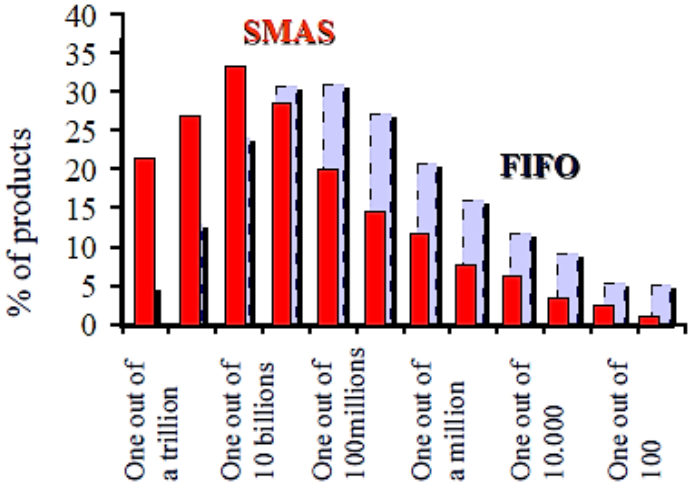


Εικόνα 1. 18 Λογικό διάγραμμα λήψης απόφασης σε κρίσιμα σημεία ελέγχου της αλυσίδας διακίνησης (Koutsoumanis et al., 2005)

Τα αποτελέσματα του συστήματος SMAS είναι η αύξηση της διάρκειας ζωής για κατανάλωση και η μείωση πιθανότητας ασθένειας.



Εικόνα 1. 19 Αύξηση διάρκειας ζωής με εφαρμογή του SMAS.



Εικόνα 1. 20 Μείωση πιθανότητας ασθένειας με εφαρμογή του SMAS.

1.15 IQ-Freshlabel Project

Στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου αναπτύχθηκε το πρόγραμμα IQ Freshlabel: Developing novel intelligent labels for chilled and frozen food products and promoting the influence of smart labels application on waste reduction, food quality and safety in the European supply chains. Το πρόγραμμα αυτό χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ξεκίνησε τον Αύγουστο του 2010 και ολοκληρώθηκε τον Ιανουάριο του 2014. Σε αυτό συμμετείχαν 18 φορείς, εκ των οποίων ακαδημαϊκά ινστιτούτα και μικρομεσαίες επιχειρήσεις από 9 διαφορετικές χώρες. Στόχος ήταν η ανάπτυξη καινοτόμων «έξυπνων» ενζυμικών και φωτοχημικών δεικτών TTI για χρήση στην αλυσίδα διακίνησης προς όφελος των καταναλωτών και της βιομηχανίας τροφίμων. Παράλληλα, υπήρξε ενημέρωση των καταναλωτών για τα πλεονεκτήματα της χρήσης έξυπνων ετικετών, με στόχο την αύξηση εμπιστοσύνης των καταναλωτών ως προς τα οφέλη των TTI (iq-freshlabel, 2010).

1.16 Μελλοντικές τάσεις

Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες TTI δύνανται να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για την παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων. Με την πάροδο των χρόνων όσο οι περιορισμοί και οι τυχόν αμφιβολίες για τη χρήση τους θα κάμπτονται, θα υπάρξει μεγάλη πρόοδος σε ότι αφορά την ποικιλία, τις εφαρμογές, την αξιοπιστία και την εμπορική χρήση των TTI. Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες, όπου εξετάζεται η χρήση των δεικτών TTI ως ποιοτικών δεικτών της ποιοτικής υποβάθμισης που υφίστανται τα τρόφιμα. Διεξάγεται και έρευνα εφαρμογής των TTI με κινητική μοντελοποίηση και προσεγγίσεις μικροβιολογίας πρόρρησης (predictive microbiology), ώστε να τεκμηριωθεί η δυνατότητα και οι περιορισμοί των TTI να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες ασφαλείας των τροφίμων. Ήδη η εταιρεία Vitsab έχει αναπτύξει, σε συνεργασία με τον U.S. FDA, ένα σύστημα εφαρμογής TTI κατά τη συγκομιδή στρειδιών προκειμένου να ελεγχθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών *Vibrio parahemolyticus* και *Vibrio vulnificus* (Ronnow, VITSAB, 2016).

Επιπλέον, στη σύγχρονη εποχή της τεχνολογίας και του Διαδικτύου σημαντικά υποσχόμενη είναι και η ανάπτυξη εφαρμογών (applications) για έξυπνα κινητά τηλέφωνα (smartphones), οι οποίες θα έχουν τη δυνατότητα ανάγνωσης της απόκρισης των δεικτών και μετάφρασης της σε ποιότητα του τροφίμου και εναπομένουσα διάρκεια ζωής. Ένα τέτοιο εγχείρημα με την ανάπτυξη της εφαρμογής μελετάται και στην παρούσα εργασία.

Με την πρόοδο και την εξέλιξη των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών διευκολύνεται η επιτυχής εφαρμογή συστημάτων βελτιστοποίησης της αλυσίδας τροφίμων όπως το σύστημα λήψης αποφάσεων SLDS (Shelf Life Decision System) (Giannakourou et al., 2001).

Κεφάλαιο 2: Βιολογικά χαρακτηριστικά, σύσταση και μικροβιολογική αλλοίωση ιχθύων

2.1 Ποιοτική αλλοίωση ιχθύων

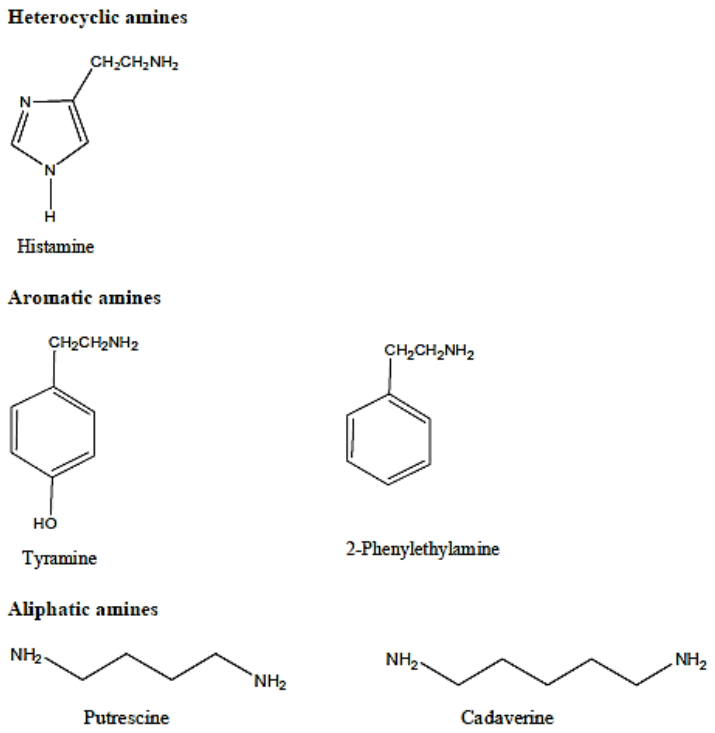
Τα προϊόντα ιχθύων αποτελούν ευαλλοίωτα τρόφιμα, τα οποία υποβαθμίζονται ποιοτικά, λόγω ενζυμικών, μικροβιολογικών και οξειδωτικών αντιδράσεων, που συμβαίνουν σε αυτά και επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Ποιοτικοί συντελεστές, όπως η θερμοκρασία, η ενεργότητα του νερού και το pH επηρεάζουν την ποιοτική υποβάθμισή τους. Πιο συγκεκριμένα, η μικροβιολογική ανάπτυξη ευνοείται σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας, υψηλού pH και παρουσία μεγάλης ποσότητας μη πρωτεϊνικού αζώτου και οξειδίου της τριμεθυλαμίνης. Σημαντική παράμετρο αλλοίωσης αποτελεί και η οξείδωση των λιπών τους, που μπορεί να προσδιορισθεί με δείκτες όπως ο αριθμός υπεροξειδίων (PV).

Η σημαντικότερη και πιο διευρυμένη αλλοίωση των ιχθυηρών είναι η ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Βακτήρια αναπτύσσονται στο εξωτερικό και στο εσωτερικό των ζωντανών ιχθύων, στο δέρμα, στα βράγχια και στη γαστρεντερική οδό. Ιδίως στα νωπά ιχθυηρά υπάρχει μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, που αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα τους. Παρά την πληθώρα μικροοργανισμών, δε σχηματίζονται από όλους πληθυσμοί ικανοί να οδηγήσουν σε αλλοίωση. Ο όρος «ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί» (specific spoilage organisms – SSO), χαρακτηρίζει το είδος της συνολικής μικροχλωρίδας που είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση του κάθε είδους (Τσιρώνη, 2010).

Η ποικιλόθερμη φύση των ιχθύων επιτρέπει την ανάπτυξη μεγάλου εύρους μικροοργανισμών κυρίως ψυχρότροφων αρνητικών κατά Gram ραβδόμορφων βακτηρίων, όπως τα *Pseudomonos, Moraxella, Acinetobacter, Shewanella, Flavobacterium, Vibrionaceae* και *Aeroemonadaceae* αλλά και θετικών κατά Gram, όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Corynebacterium* (Gram & Huss, 1996). Στα τροπικά ιχθυηρά αναπτύσσεται μεγαλύτερος αριθμός θετικών κατά Gram μικροοργανισμών και εντεροβακτηρίων (Liston, 1980). Η μικροβιακή ανάπτυξη και κατ' επέκταση η αλλοίωση δύναται να παρουσιάσει διαφορές ακόμα και ανάμεσα σε προϊόντα του ίδιου τύπου ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση τους.

2.1.1 Βιογενείς αμίνες

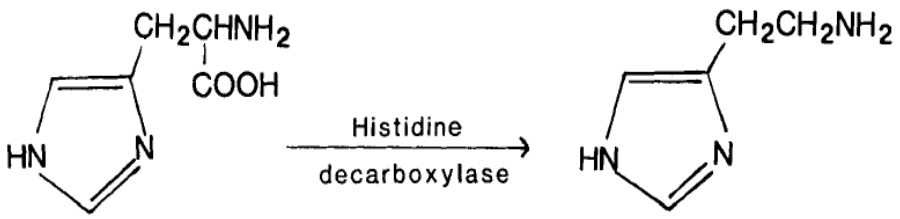
Οι βιογενείς αμίνες είναι οργανικές, βασικές αζωτούχες ενώσεις, χαμηλού μοριακού βάρους, που σχηματίζονται κυρίως από την αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων παρουσία μικροοργανισμών που περιέχουν το ένζυμο αποκαρβοξυλάση. Η κατανάλωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα τοξικών βιογενών αμινών, μπορεί να οδηγήσει σε τοξίνωση. Οι βιογενείς αμίνες που θεωρούνται πιο τοξικές και σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων είναι η ισταμίνη, η τυραμίνη, η πουτρεσκίνη, η κανταβερίνη και η φαινυλεθυλαμίνη (EFSA, 2011).



Εικόνα 2. 1 Δομή βιολογικών αμινών (EFSA, 2011).

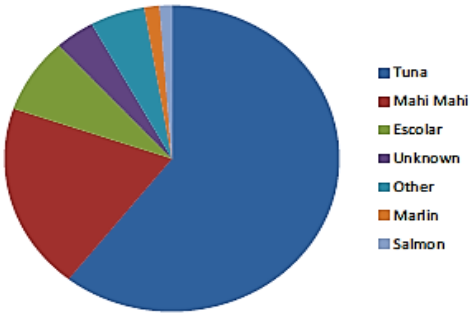
2.1.1.1 Ισταμίνη

Η ισταμίνη, (histamine), $C_5H_9N_3$, είναι τοξική βιογενής αμίνη, που σχετίζεται με είδη ιχθύων των οικογενειών *Scomberesocidae* και *Scombridae*, όπως ο τόνος και παράγεται υπό την επίδραση ορισμένων αλλοιογόνων βακτηρίων. Τα είδη ιχθύων, στα οποία αναπτύσσεται, έχουν υψηλή συγκέντρωση του αμινοξέος ιστιδίνη. Η ιστιδίνη με τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης αποκαρβοξυλιώνεται σε ισταμίνη. Ισταμίνη μπορεί να αναπτυχθεί και σε άλλα τρόφιμα όπως σε ώριμα τυριά (Taylor, 1986) και κρασί (Ough, 1971).



Εικόνα 2. 2 Αντίδραση σχηματισμού ισταμίνη από την αποκαρβοξυλίωση ιστιδίνης.

Το ένζυμο αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης εντοπίζεται σε ορισμένα βακτήρια, κυρίως κατά Gram αρνητικά. Ισχυρή παραγωγική ικανότητα ισταμίνης σε ιχθυηρά παρουσιάζουν τα βακτήρια *Morganella psychrotolerants*, *Klebsiella pneumonia, Photobacterium phosphoreum, Photobacterium psychrotolerants* και *Hafnia alvei*, τα οποία είναι ικανά να αναπτύξουν υψηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης σε μικρό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες 20-30 ^oC (Kanki et al., 2004; Emborg et al., 2006). Για παράδειγμα, η συντήρηση τόνου σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ισταμίνης, με την ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως ο *Morganella morganii*.



Εικόνα 2. 3 Ιχθυηρά υπεύθυνα για δηλητηρίαση λόγω ισταμίνης (Histamine fish poisoning) από το 1998 έως το 2012, (CDC Food Outbreak Outline Database).

Στο χρονικό διάστημα 1998 έως 2012, τα ιχθυηρά τα οποία σχετίστηκαν κυρίως με δηλητηριάσεις λόγω ισταμίνης στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, σύμφωνα με τον CDC, ήταν ο τόνος, το mahi mahi, το βουτυρόψαρο (escolar), το μαρλίν και ο σολομός.

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί προέκυψε πως κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασίες από 2 έως 10 ^{o}C υπήρξε ελάχιστος σχηματισμός ισταμίνης (Hardy & Smith, 1976), ενώ σε άλλες προέκυψε ότι σε θερμοκρασίες κάτω των 10 ^{o}C σχηματίζονται χαμηλά επίπεδα ισταμίνης (Park et al., 1980).

Ισταμίνη σε επικίνδυνα, για τον καταναλωτή, επίπεδα μπορεί να σχηματισθεί σε φρέσκα, κατεψυγμένα, αλλά και κονσερβοποιημένα ιχθυηρά. Για παράδειγμα στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1996, το 50% των τροφικών δηλητηριάσεων από ισταμίνη οφειλόταν σε κατανάλωση ψυγμένου τόνου συσκευασμένου υπό κενό (Tsironi et al., 2008).

Τα όρια συγκέντρωσης σε ισταμίνη στα θαλασσινά είναι στις Ηνωμένες κάτω από 50mg/kg και στην Ευρώπη είναι 100mg/kg (Dalgaard & Emborg, 2008).

2.1.2 Morganella morganii

Ο μικροοργανισμός *Morganella* morganii είναι κατά Gram αρνητικό βακτήριο, που ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηρίων *Enterobacteriaceae* και μπορεί να προκαλέσει μετεγχειρητικές ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις, όπως ουρολοιμώξεις. Πρώτη του αναφορά ως *Morgan's bacillus* έγινε το 1906 από το Βρετανό βακτηριολόγο H. de R. Morgan (Pulaski & Deitz, 1940). Είναι αναερόβιος και σχηματίζει ραβδόμορφες αποικίες, που εμφανίζουν υπόλευκο χρώμα. Μπορεί να αντιμετωπισθεί με αντιβιοτικά (π.χ. τρίτης και τέταρτης γενιάς κεφαλοσπορίνες), ωστόσο ορισμένα στελέχη του είναι ανθεκτικά σε ορισμένα αντιβιοτικά, όπως η αμπικιλλίνη (Falagas et al., 2006).

2.1.3 Σκομβροειδής δηλητηρίαση

Η σκομβροειδής δηλητηρίαση είναι μια οξεία ασθένεια που εμφανίζεται μετά την κατανάλωση ψαριών που περιέχουν υψηλά επίπεδα ισταμίνης ή άλλων βιογενών αμινών. Η πρώτη αναφορά στην ασθένεια έγινε το 1799 στη Βρετανία και έπειτα ξανά το 1950, όταν κατεγράφησαν κρούσματα της στην Ιαπωνία (Taylor, 1989). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν συνήθως έξαψη του προσώπου, εφίδρωση, εξάνθημα, καύση στο στόμα, διάρροια και κοιλιακές κράμπες και συνήθως λύνονται μέσα σε λίγες ώρες χωρίς ιατρική παρέμβαση. Μπορούν να εμφανισθούν σοβαρότερα συμπτώματα (π.χ. αναπνευστική δυσφορία, πρήξιμο της γλώσσας και του λαιμού και θολή όραση) και απαιτούν ιατρική θεραπεία με αντιισταμινικά. Στις Η.Π.Α. εκδηλώθηκε μεγάλη επιδημία το 1973, η οποία περιλάμβανε κατανάλωση κονσερβοποιημένου τόνου. Στα τέλη του 2006, κατεγράφησαν δύο επιδημίες, στη Λουϊζιάνα και στο Τενεσί, οι οποίες συσχετίστηκαν με την κατανάλωση φιλέτων τόνου (tuna steaks), εισηγμένων από την Ινδονησία και το Βιετνάμ αντιστοίχως (CDC., 2007).

Η ταχεία ψύξη των ιχθυηρών αμέσως μετά την αλίευση είναι το πιο αποτελεσματικό μέτρο για την πρόληψη της σκομβροείδωσης. Τα ιχθυηρά από την οικογένεια *Scombridae* (π.χ. τόνος και σκουμπρί) περιέχουν υψηλά επίπεδα ελεύθερης ιστιδίνης στον μυϊκό ιστό και είναι οι πιο συνηθισμένες πηγές σκομβροειδών δηλητηριάσεων. Η πιο αποτελεσματική πρόληψη της σκομβροειδούς δηλητηρίασης από ιχθυηρά είναι η επαρκής ψύξη των ιχθυηρών σε θερμοκρασία <4°C σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας από την αλίευση ως το στάδιο της κατανάλωσης.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος (οσμή και γεύση) δεν επαρκεί για την ανίχνευση της ισταμίνης και απαιτούνται χημικοί έλεγχοι. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι η ισταμίνη δεν καταστρέφεται όταν τα ιχθυηρά καταψύχονται ή μαγειρεύονται, καθιστώντας απαραίτητη την τήρηση των απαιτήσεων θερμοκρασίας σε όλα τα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας των τροφίμων (CDC., 2007).

Τα συμπτώματα της σκομβροειδούς δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι παρόμοια με εκείνα μιας αλλεργικής αντίδρασης. Πράγματι, η δηλητηρίαση αυτή είναι ασθένεια όχι τόσο γνωστή, αν και αντιστοιχεί στο 38% των επιδημιών που σχετίζονται με θαλασσινά στις ΗΠΑ (Dalgaard & Emborg, 2008). Ιδανικά, τα ιχθυηρά θα πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασία μικρότερη των 4°C, έτσι ώστε να παρεμποδίζεται η μικροβιακή ανάπτυξη και η αποκαρβοξυλάση ιστιδίνης να μην ενεργοποιείται. Αν τα ιχθυηρά συντηρηθούν σε υψηλές θερμοκρασίες για λίγες μόνο ώρες, τα βακτήρια μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταχύτατα. Στην πραγματικότητα, η αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης μπορεί να συνεχίσει να λειτουργεί ακόμα και όταν τα βακτήρια δεν είναι πλέον βιώσιμα (Hungerford,

2010). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνολογίες με ποικίλα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα για τη μέτρηση των επιπέδων ισταμίνης, με πιο διαδεδομένη και επίσημη μέθοδο ανάλυσης ισταμίνης την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (HPLC). Επειδή η HPLC δεν μπορεί να εφαρμοστεί παρά μόνο σε εξειδικευμένα χημικά εργαστήρια με κατάλληλο εξοπλισμό, χρησιμοποιούνται ταχείες δοκιμές, όπως ανάλυση με έγχυση δείγματος σε συνεχή ροή (FIA) και εμπορικά ποσοτικά kits ELISA, για διάγνωση σε πραγματικό χρόνο. (Feng et al., 2015).

2.2 Τόνος

Ο τόνος είναι ψάρι, του γένους *Thunnus thynnus*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των σκομβροειδών (Scombridae) και έχει κοκκινωπό κρέας, εξαιρετικής γεύσης, το οποίο μπορεί να ψηθεί, να τηγανισθεί, να καπνισθεί, ή να κονσερβοποιηθεί. Οι τόνοι αποτελούν κυρίως ωκεάνια ψάρια και είναι μοναδικά χάρη στο αγγειακό σύστημα μεταφοράς θερμότητας, που τους επιτρέπει να διατηρούν υψηλότερες θερμοκρασίες σώματος από αυτή του περιβάλλοντος νερού τους και χάρη στον υψηλό μεταβολικό ρυθμό τους (Collette, 1983).

Τα πιο γνωστά είδη τόνου είναι τα ακόλουθα:

- Παλαμίδα, Skipjack Tuna
- Κιτρινόπτερος τόνος, Yellowfin Tuna, *Thunnus albacares*
- Μακρύπτερος τόνος, Albacore Tuna, *Thunnus alalunga*
- Μεγαλόφθαλμος τόνος, Bigeye Tuna, *Thunnus obesus*
- Bonito
- Βόρειος ερυθρός τόνος, Northern Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus*
- Νότιος ερυθρός τόνος, Southern Bluefin Tuna, *Thunnus maccoyii*
- Tongol, Longtail tuna, *Thunnus tonggol*

2.2.1 Θρεπτική αξία τόνου

Η μέση χημική σύσταση του τόνου είναι 62% υγρασία, 22% πρωτεΐνες 16% λίπος και 1,1% ανόργανα συστατικά ως ποσοστό του εδώδιμου τμήματος (Belitz et al., 2015). Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα διατροφικά στοιχεία του κιτρινόπτερου τόνου (Yellowfin Tuna) ανά 100g τόνου.

Πίνακας 2. 1 Διατροφικά στοιχεία του κιτρινόπτερου τόνου (Yellowfin Tuna) ανά 100g τόνου (USDA, 2018).

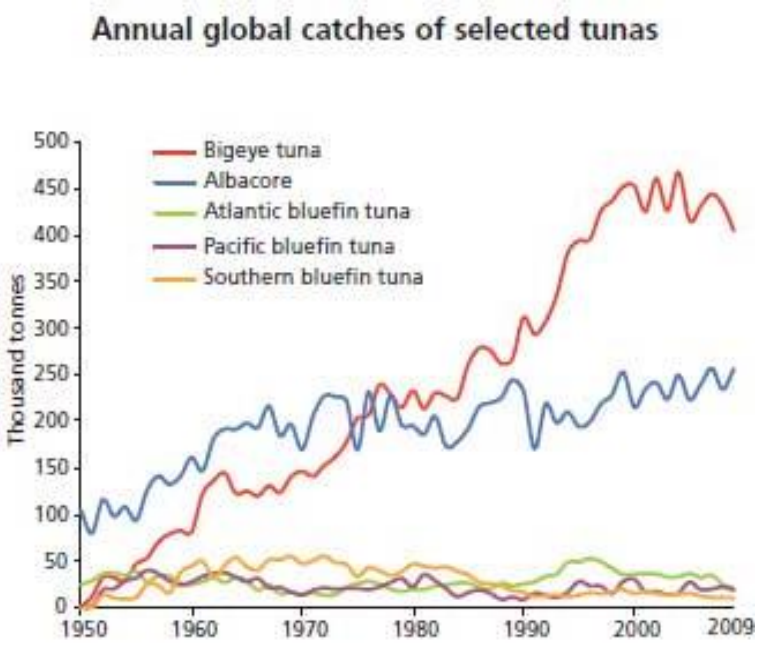
Διατροφικά στοιχεία	Ποσότητα/100g
Ενέργεια	109 kcal
Πρωτεΐνες	24,40 g
Λιπαρά	0,49 g
Σίδηρος, Fe	0,77
Ασβέστιο, Ca	4 mg
Μαγνήσιο, Mg	35 mg
Κάλιο, K	441 mg
Νάτριο, Na	45 mg
Φώσφορος, P	278 mg
Ψευδάργυρος, Zn	0,37 mg
Βιταμίνη B6	0,933 mg
Βιταμίνη B12	2,08 μg

2.2.2 Παραγωγή τόνου

Η ετήσια αλιεία τόνου το 1950 ήταν λιγότερο από 1 εκατομμύριο τόνους και έφτασε περίπου τα 6,5 εκατομμύρια τόνους το 2009. Όσον αφορά στα κύρια είδη τόνου, το μεγαλύτερο μέρος της παγκόσμιας αλιείας αποτελεί η παλαμίδα, Skipjack Tuna, που χρησιμοποιείται κυρίως για κονσερβοποίηση. Το 2009 η αλιεία του έφτασε τα 2,5 εκατομμύρια τόνους. Ακολουθεί ο κιτρινόπτερος τόνος, Yellowfin Tuna, ο οποίος χρησιμοποιείται κυρίως για κονσερβοποίηση και η αλιεία του είχε αυξητική τάση μέχρι το 2003, φτάνοντας τα 1,44 εκατομμύρια τόνους και από τότε έχει σταθεροποιηθεί περίπου στο 1 εκατομμύριο τόνους ετησίως. Στη συνέχεια, συναντάται ο μεγαλόφθαλμος τόνος, Bigeye Tuna, ο οποίος ομοιάζει αρκετά με τον κιτρινόπτερο τόνο. Η διαφορά τους βρίσκεται στο βάθος στο οποίο συναντώνται, καθώς ο μεγαλόφθαλμος τόνος ζει σε πιο βαθιά και κρύα νερά, γεγονός στο οποίο οφείλεται η μεγάλη περιεκτικότητα του σε λίπος, που τον καθιστά ιδιαίτερα επιθυμητό για την αγορά του sashimi. Τα επίπεδα αλιείας του μεγαλόφθαλμου τόνου το 2009 ήταν περίπου στους 400 χιλιάδες τόνους.

Σε μικρότερα επίπεδα αλιείας βρίσκονται ο μακρύπτερος τόνος, *Albacore Tuna*, ο οποίος χρησιμοποιείται κυρίως για κονσερβοποίηση η οποία αυξήθηκε από το 1950 έως το 1970 και από τότε αυξομειώνεται χωρίς σταθερή τάση και έφτασε το 2009 τους 256 χιλιάδες τόνους.

Τα χαμηλότερα επίπεδα αλιείας τόνου εμφανίζουν τα είδη του νότιου ερυθρού τόνου Ατλαντικού και Ειρηνικού, Atlantic, Pacific southern bluefin Tuna, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην παραγωγή sashimi, φτάνοντας τους 21 χιλιάδες τόνους το 2009.



Εικόνα 2. 4 Ετήσια παγκόσμια αλιεία επιλεγμένων ειδών τόνου (FAO, 2009).

2.2.3 Μεταθανάτια επεξεργασία και συντήρηση

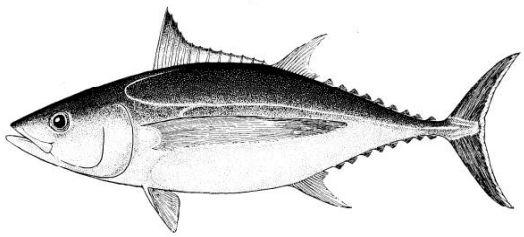
Τα ιχθυηρά συντηρούνται με διάφορες τεχνικές, όπως η ψύξη, η κατάψυξη, η κάπνιση, η συντήρηση με αλάτιση, η κονσερβοποίηση και η ξήρανση. Ο τόνος καταναλώνεται κυρίως φρέσκος, κατεψυγμένος ή κονσερβοποιημένος. Μετά την αλίευση τους καταψύχονται και υφίστανται επεξεργασία ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζονται, γίνονται φιλέτα ή πωλούνται ως sashimi. Τέλος, ορισμένοι ερυθροί τόνοι πωλούνται για το πλούσιο σε λιπαρά κοιλιακό κρέας τους και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένοι στην ιαπωνική αγορά, λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας και της σπανιότητας τους.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε τόνος του είδους *Thunnus Alalunga*, οπότε και ακολουθεί λεπτομερέστερη ανάλυση του.

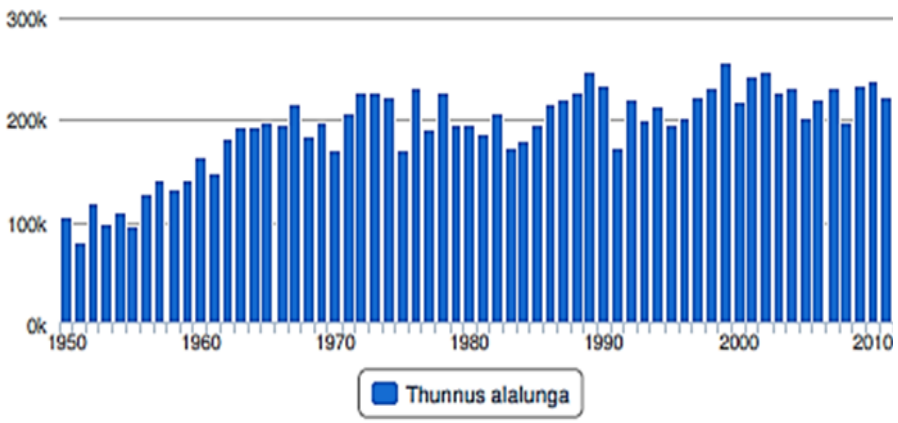
2.2.4 Μακρύπτερος τόνος, Albacore Tuna, *Thunnus Alalunga*

Ο μακρύπτερος τόνος, *Thunnus Alalunga*, γνωστός και ως Albacore Tuna, είναι ωκεάνιο ψάρι, συνήθως βρίσκεται σε κοπάδια, με ομαλό δέρμα, αεροδυναμικά πτερύγια και σώμα που του επιτρέπει να αναπτύσσει μεγάλες ταχύτητες. Το χρώμα του στη ράχη είναι σκούρο μεταλλικό μπλε, ενώ στην κοιλιά έχει ασημί-άσπρο χρώμα. Χαρακτηρίζεται από σκούρα κίτρινα και ανοικτά κίτρινα ραχιαία πτερύγια. Είναι είδος επιπελαγικό και μεσοπέλαγο, που συναντάται κυρίως σε επιφανειακά νερά θερμοκρασίας 13,5 έως 25,2 ^{o}C. Τα τελευταία χρόνια λόγω της υπεραλίευσης του έχουν μειωθεί αρκετά οι πληθυσμοί του σε βόρειο και νότιο Ατλαντικό κατατάσσοντας το στην κατηγορία των απειλούμενων για εξαφάνιση (near threatened). Είναι σχετικά μεγάλο ψάρι, που φτάνει περίπου τα 120 cm και τα 40 kg βάρος (το μεγαλύτερο καταγεγραμμένο ήταν στα Κανάρια νησιά). Είναι θηρευτής και τρέφεται με άλλα ψάρια, καρκινοειδή και καλαμάρια. Συχνά συγχέεται με τους μεγαλόφθαμους νεαρούς τόνους. Χρησιμοποιείται για κονσερβοποίηση, για σούσι και πωλείται ως φρέσκος ή κατεψυγμένος.

Η θρεπτική αξία του μακρύπτερου τόνου είναι για μερίδα 85 γραμμαρίων: νερό 62,21g, 109 θερμίδες, ολικό λίπος 2,52g, κορεσμένα λιπαρά 0,673g, Ω3 λιπαρά 0,733g, χοληστερόλη 36mg, πρωτεΐνη 20,08g (Ainsworth, 2009).



Εικόνα 2. 5 Μακρύπτερος τόνος, *Thunnus Alalunga*.



Εικόνα 2. 6 Στατιστικά ετήσιας παραγωγής *Thunnus alalunga* για την περίοδο 1950-2010 (FAO, Fishery Statistics, 2018).

Στην εικόνα 2.6 παρουσιάζονται τα στατιστικά της ετήσιας παραγωγής μακρύπτερου τόνου για την περίοδο 1950 έως 2010, όπου φαίνεται η αύξηση της παραγωγής του στις αρχές του 1970.

Στον ακόλουθο πίνακα φαίνεται η ετήσια παραγωγή μακρύπτερου τόνου, *Thunnus alalunga* για την περίοδο 2010-2016 (FAO, 2018), η οποία κυμαίνεται κατά μέσο όρο στις 230 χιλιάδες τόνους μακρύπτερου τόνου ετησίως.

Πίνακας 2. 2 Ετήσια παραγωγή μακρύπτερου τόνου, *Thunnus alalunga*, 2010-2016 (FAO, 2018).

Land Area	Ocean Area	Species	Scientific name	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Africa	Marine areas	Albacore	Thunnus alalunga	7 427	9 238	7 861	6 019	6 029	6 439	4 363
Americas	Marine areas	Albacore	Thunnus alalunga	19 590	20 343	19 985	20 884	20 441	18 867	16 679
Asia	Marine areas	Albacore	Thunnus alalunga	146 804	135 749	165 658	157 974	139 016	127 846	129 971
Europe	Marine areas	Albacore	Thunnus alalunga	17 982	20 223	25 197	20 161	28 635	24 256	28 259
Oceania	Marine areas	Albacore	Thunnus alalunga	48 976	35 643	38 087	36 235	41 877	44 316	28 620
Grand total				240 779	221 196	256 788	241 273	235 998	221 724	207 892

FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Branch - 23/08/2018

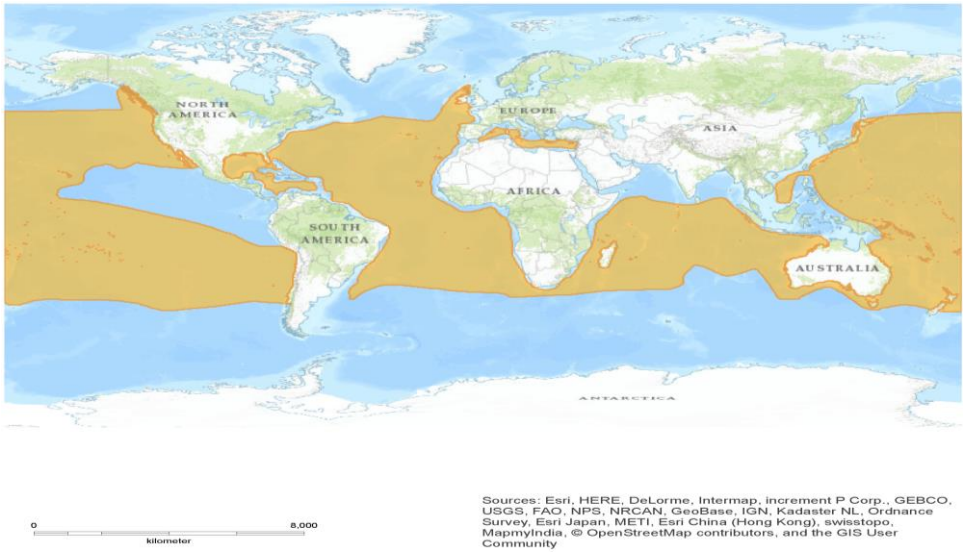
Στον πίνακα 2.3 παρουσιάζεται η ετήσια παραγωγή μακρύπτερου τόνου, *Thunnus alalunga*, στην Ελλάδα.

Πίνακας 2. 3 Ετήσια παραγωγή μακρύπτερου τόνου, *Thunnus alalunga*, στην Ελλάδα στο διάστημα 1998-2013 (FAO, 2018) (FISHSTATJ (Release: 3.04.8)).

Έτος	**1998**	**1999**	**2000**	**2001**	**2002**	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**2007**
Albacore σε τόνους	1152	2005	1786	1840	1352	950	773	622	401	448
Έτος	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**	**2012**	**2013**				
Albacore σε τόνους	191	116	125	165	165	93				

Κατά το χρονικό διάστημα 1998-2002 η παραγωγή ήταν περίπου 1627 τόνοι μακρύπτερου τόνου. Από το 2003 και έπειτα παρουσιάζεται μείωση της αλίευσης του συγκεκριμένου τόνου στην Ελλάδα με κατά μέσο όρο 639 τόνους μακρύπτερου τόνου ετησίως στο διάστημα 2003 έως 2007. Από το 2008 μέχρι και το 2013 η ετήσια παραγωγή τόνου ήταν περίπου 143 τόνοι τόνου.

Ο συγκεκριμένος τόνος εξαιτίας του άσπρου χρώματος του κρέατος του είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Συναντάται στον Ειρηνικό Ωκεανό, στον Ατλαντικό Ωκεανό, στη Μεσόγειο θάλασσα και στον Ινδικό Ωκεανό.



Εικόνα 2. 7 Γεωγραφική κατανομή *Thunnus alalunga*.

Καταλήγοντας, είναι πλέον εμφανές πως τα ιχθυηρά αποτελούν ευαλλοίωτα τρόφιμα, που υφίστανται συχνά ποιοτική υποβάθμιση. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η χρήση δεικτών TTI για τη χρονοθερμοκρασιακή παρακολούθηση στην ψυκτική αλυσίδα των ιχθυηρών.

Κεφάλαιο 3: Πειραματική Διαδικασία – Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Εισαγωγή

Σε ευαλλοίωτα τρόφιμα, όπως τα ιχθυηρά, είναι αναγκαίο να παρακολουθούνται η ασφάλεια και η ποιότητα τους, κατά τη διακίνηση τους στην ψυκτική αλυσίδα. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού προφίλ στο οποίο εκτίθενται κατά τη διακίνηση τους. Ο σκοπός αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (TTI), οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ολοκληρώνουν σε μία απλή μέτρηση, με μία εύκολα μετρήσιμη μεταβολή, το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου στο οποίο εφαρμόζονται. Προκειμένου να επιλεχθεί ο κατάλληλος δείκτης για τη μελέτη του εκάστοτε τροφίμου, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η συνάρτηση απόκρισης διαφόρων TTI να συσχετίζεται με παραμέτρους ποιότητας και ασφάλειας του τροφίμου.

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε:

- Η μελέτη της κινητικής απόκρισης ενζυμικών δεικτών τύπου LP με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μείγμα τριλαουρίνης - τριπαλμιτίνης και δεικτών τύπου M με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα, σε ισοθερμοκρασιακές και δυναμικές (VAR) συνθήκες.
- Ο προσδιορισμός μαθηματικού μοντέλου ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *Morganella morganii* και του σχηματισμού ισταμίνης σε τόνο (*Thunnus alalunga*) σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες.
- Η συσχέτιση της κινητικής απόκρισης των μελετώμενων TTI, με το σχηματισμό της τοξικής βιογενούς ισταμίνης, η οποία συνδέεται με την κατανάλωση ιχθυηρών, όπως ο τόνος. Κατά αυτόν τον τρόπο, έγινε επιλογή κατάλληλου TTI για τη διαχείριση της ασφάλειας του τόνου στην ψυκτική αλυσίδα.

3.2 Μελέτη απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών TTIs

Μελετήθηκαν TTIs ενζυμικού τύπου (Vitsab Time Temperature Integrators), που βασίζονται σε αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Στα ενζυμικά TTI, με την πάροδο του χρόνου, πραγματοποιείται αντίδραση ενζυμικής υδρόλυσης η οποία οδηγεί σε μείωση του pH, δίνοντας οπτική χρωματική αλλαγή. Το χρώμα μεταβάλλεται από πράσινο σε κίτρινο και τέλος σε κόκκινο χρώμα. Η εύκολα μετρήσιμη απόκριση της χρωματικής αλλαγής συσχετίζεται με το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του δείκτη.

Μελετήθηκε η χρωματική μεταβολή δεικτών τύπου LP (δείκτης Check Point© της εταιρείας VITSAB, Malmo, Sweden) με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μείγμα τριλαουρίνης - τριπαλμιτίνης και δεικτών τύπου M (δείκτης Check Point© της εταιρείας VITSAB, Malmo, Sweden) με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα.

3.2.1 Πειραματική Διαδικασία

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, τοποθετώντας για κάθε τύπο και συγκέντρωση ενζύμου από 5 επαναληπτικούς δείκτες TTI σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας.

Οι περιεκτικότητες σε ένζυμο των δεικτών και οι θερμοκρασίες στις οποίες μελετήθηκαν είναι:

Πίνακας 3. 1 Συγκεντρωτικός πίνακας συγκεντρώσεων και θερμοκρασιών των μελετώμενων TTI.

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

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

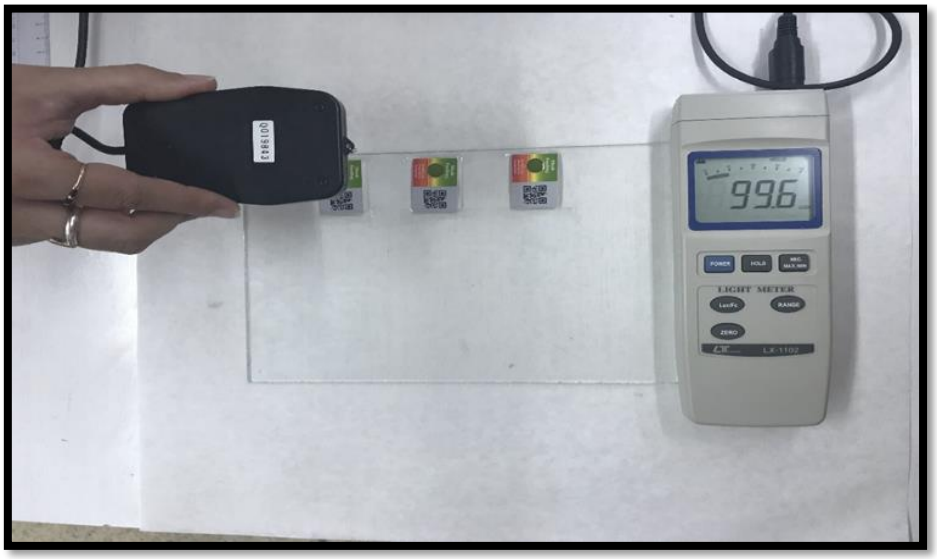
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε πείραμα σε μεταβαλλόμενες χρονοθερμοκρασιακές συνθήκες, προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία της κινητικής απόκρισης των TTI, με:

- ✓ έκθεση στους 3 °C για 8 ώρες,
- ✓ έκθεση στους 6 °C για 8 ώρες
- ✓ και έκθεση στους 10 °C για 8 ώρες.

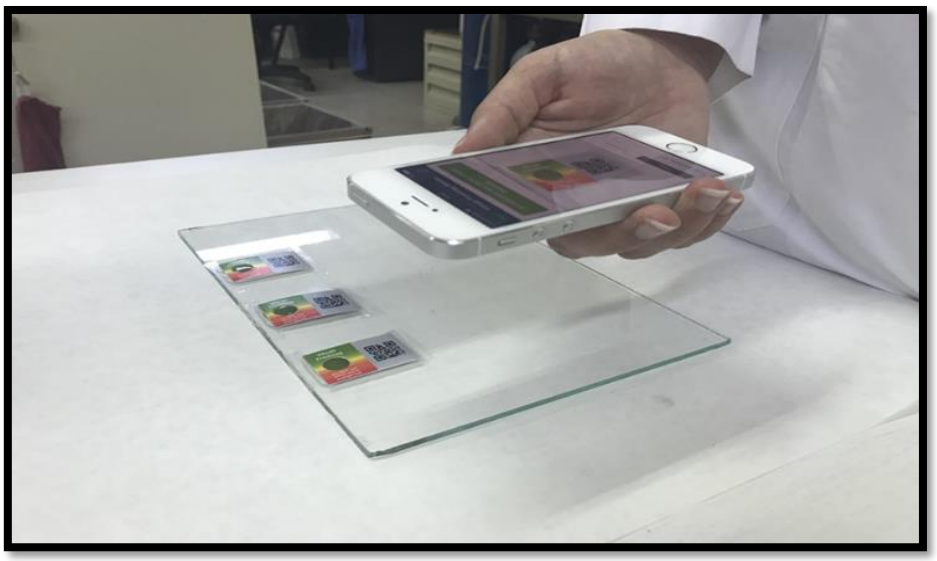
Αναλυτικά, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Αρχικά, οι ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες τοποθετήθηκαν σε γυάλινες πλάκες, ενεργοποιήθηκαν και έπειτα τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ελεγχόμενου θερμοκρασιακού περιβάλλοντος (SANYO MIR 253), στους οποίους ήταν τοποθετημένα ηλεκτρονικά καταγραφικά θερμοκρασίας (data loggers), για να ελέγχεται η θερμοκρασία των θαλάμων. Το γυαλί επιλέχθηκε χάρη στη μεγάλη θερμοχωρητικότητα του, που επιτρέπει τη διατήρηση της θερμοκρασίας κατά το σύντομο χρονικό διάστημα που διαρκεί η μέτρηση. Οι μετρήσεις της χρωματικής μεταβολής λαμβάνονταν με χρωματόμετρο (X-rite Eye-one Pro) και με κινητό

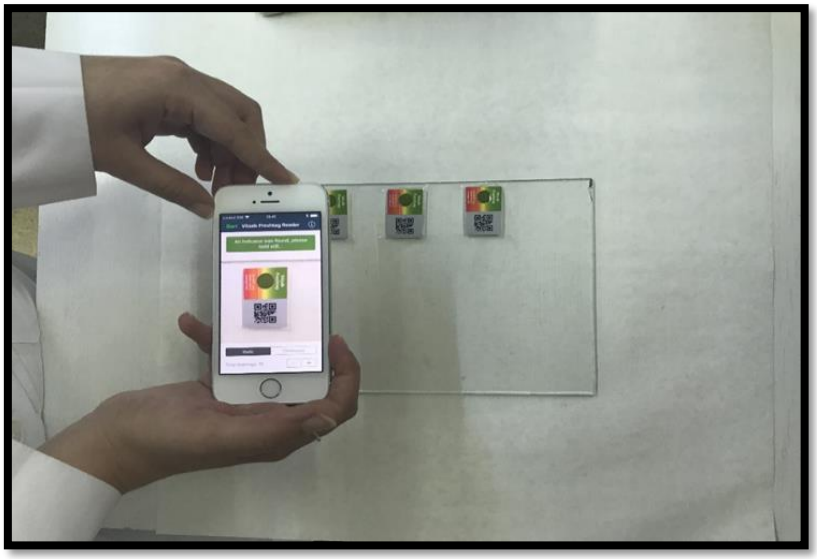
(smartphone – iPhone 5S) με χρήση της εφαρμογής VItsab App. Για κάθε τύπο δείκτη και συγκέντρωση ενζύμου εφαρμόστηκαν 5 επαναλήψεις στις μετρήσεις με το χρωματόμετρο και 3 επαναλήψεις στις μετρήσεις με το κινητό. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν στις ίδιες συνθήκες, πάντα στο ίδιο μέρος, ώστε να υπάρχουν σταθερές συνθήκες φωτισμού (περίπου στα 100 Lux) και προκειμένου να μένουν ανεπηρέαστες από τα χρώματα στον περιβάλλοντα χώρο, οι πλάκες τοποθετούνταν πάνω σε ένα λευκό χαρτί. Το κινητό κατά τη λήψη της μέτρησης ήταν σε απόσταση περίπου 8 cm από το δείκτη.



Εικόνα 3. 1 Μέτρηση του φωτισμού του περιβάλλοντος χώρου στο μέρος όπου γίνονται οι μετρήσεις.



Εικόνα 3. 2 Απόσταση 8 cm μεταξύ κινητού και δείκτη κατά τη διαδικασία λήψης μέτρησης.



Εικόνα 3. 3 Μέτρηση ενζυμικού χρονοθερμοκρασιακού δείκτη με το smartphone.

3.2.2 Όργανα – Συσκευές πειραματικής διαδικασίας

Ακολούθως, παρουσιάζονται τα όργανα και οι συσκευές, που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής εργασίας:

- ✓ Θάλαμοι ελεγχόμενου θερμοκρασιακού περιβάλλοντος (SANYO MIR 253)

Οι ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες μετά την ενεργοποίηση τους, τοποθετήθηκαν σε θαλάμους ελεγχόμενου θερμοκρασιακού περιβάλλοντος (SANYO MIR 253), στους οποίους βρίσκονται τοποθετημένα ηλεκτρονικά καταγραφικά θερμοκρασίας (data loggers), για να ελέγχεται η θερμοκρασία των θαλάμων.

Εικόνα 3. 4 Θάλαμοι ελεγχόμενου θερμοκρασιακού περιβάλλοντος, SANYO MIR 253.

Εικόνα 3. 5 Ηλεκτρονικό καταγραφικό θερμοκρασίας (data logger).

- ✓ Χρωματόμετρο X-rite Eye-1 Pro Colorimeter Illumination D50 (Michigan, USA)

Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων χρώματος (L, α, b) χρησιμοποιήθηκε το χρωματόμετρο X-rite Eye-1 Pro Colorimeter Illumination D50 (Michigan, USA).

Εικόνα 3. 6 Χρωματόμετρο (X-rite Eye1 pro).

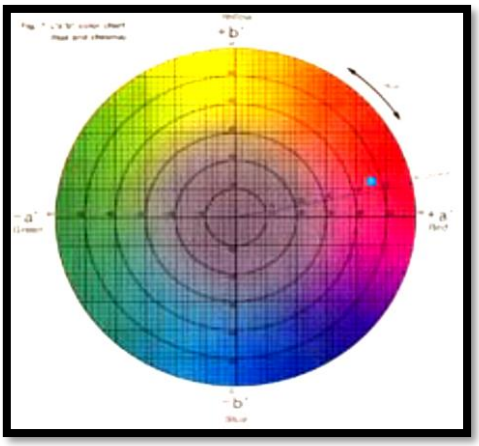
- ✓ Έξυπνο κινητό (smartphone) iPhone 5S, με την εφαρμογή VITSAB

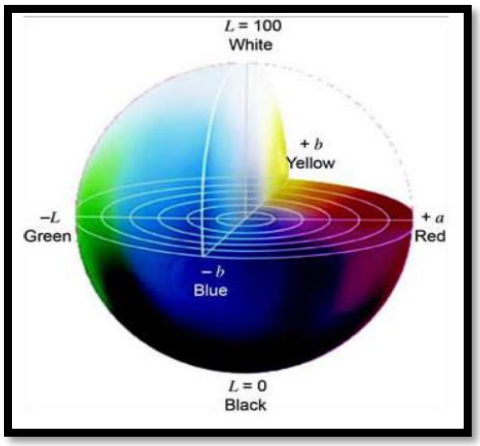
Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων χρώματος (L, α, b) χρησιμοποιήθηκε επιπλέον και έξυπνο κινητό (smartphone), iPhone 5S, το οποίο διέθετε εφαρμογή της εταιρίας VITSAB (VITSAB APP). Η εφαρμογή αυτή επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη λήψη μέτρησης του χρώματος του δείκτη, σαρώνοντάς τον. Έτσι, είναι εφικτή η εκτίμηση της διάρκειας ζωής του δείκτη, χωρίς την ανάγκη ενός χρωματόμετρου.

Εικόνα 3. 7 Smartphone – iPhone 5S.

Τόσο από το χρωματόμετρο, όσο και μέσω της εφαρμογής του κινητού λαμβάνονται παράμετροι L, a και b στο τριαξονικό σύστημα CIELab. Η παράμετρος L (0 έως 100) προσδιορίζει την φωτεινότητα, η παράμετρος a (-60 έως 60) στις αρνητικές τιμές προσδιορίζει το πράσινο χρώμα, ενώ στις θετικές τιμές το κόκκινο

και η παράμετρος b (-60 έως 60) στις αρνητικές τιμές προσδιορίζει το μπλε χρώμα, ενώ στις θετικές τιμές το κίτρινο. Από τις μετρήσεις των παραμέτρων, κατασκευάστηκαν διαγράμματα απόκρισης του δείκτη norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου και προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά τους.





Εικόνα 3. 8 Χρωματικό διάγραμμα L,α,b. **Εικόνα 3. 9 Απεικόνιση στο χώρο των L,α,b**

Χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους L,α και b δύναται να γίνει ο υπολογισμός τη συνολικής μεταβολής χρώματος (ΔC) και της συνολικής μεταβολής της οπτικής απόκρισης (ΔE), από τις ακόλουθες σχέσεις:

$$\Delta C = \sqrt{(\alpha - \alpha o)^2 + (b - bo)^2} \quad (3.1)$$

$$\Delta E = \sqrt{(L - Lo)^2 + (\alpha - \alpha o)^2 + (b - bo)^2} \quad (3.1)$$

όπου Lo: η τιμή φωτεινότητας μη ενεργοποιημένου TTI, αο: η τιμή α μη ενεργοποιημένου TTI και bo: η τιμή b μη ενεργοποιημένου TTI.

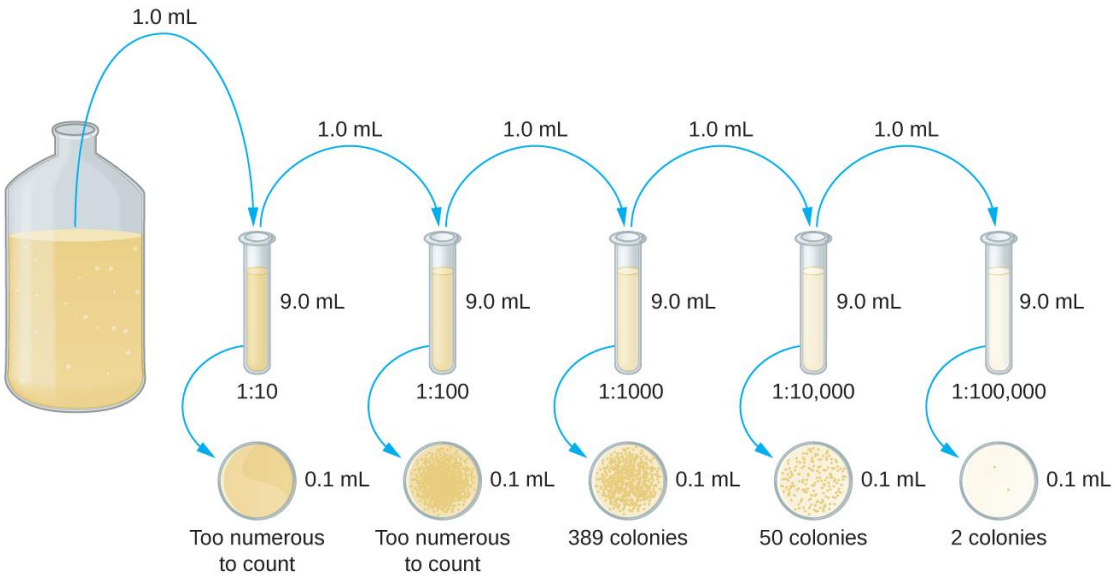
3.3 Μελέτη αλλοίωσης τόνου

3.3.1 Μελέτη ανάπτυξης *Morganella morganii*

Παράλληλα, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* σε τόνο σε θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20 και 25 ^{o}C και μελετήθηκε ο σχηματισμός ισταμίνης από τον μικροοργανισμό αυτό.

Για το σκοπό αυτό έγινε εμβολιασμός αποστειρωμένης (στους 121°C για 15 min) πολτοποιημένης σάρκας τόνου (*Thunnus alalunga*) με *Morganella morganii*. 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). Το εμβολιασμένο δείγμα τοποθετείται σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες (1 g στον καθένα) και σε τρυβλία (5g στο καθένα), τα οποία αποθηκεύονται σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (5, 10, 15, 20 και 25°C).

Για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου ακολουθείται η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και της επιφανειακής ανάπτυξης σε τρυβλία. Χρησιμοποιείται το μη επιλεκτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA). Φέρεται 0,1mL δείγματος στην επιφάνεια του υποστρώματος και ακολουθεί επάλειψη με τη βοήθεια στιλεό για όλες τις αραιώσεις. Κάθε μέτρηση γίνεται με δύο επαναλήψεις. Τα τρυβλία επωάζονται για 3 ημέρες σε θάλαμο θερμοκρασίας 30°C. Μετρώντας τον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονται προσδιορίζεται ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων, αφού μία αποικία αναπτύσσεται από ένα μικροβιακό κύτταρο.



Εικόνα 3. 10 Σχηματική αναπαράσταση μεθόδου διαδοχικών αραιώσεων και επιφανειακής ανάπτυξης σε τρυβλία

3.3.2 Ποσοτικοποίηση ισταμίνης με ανοσοενζυμική μέθοδο (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

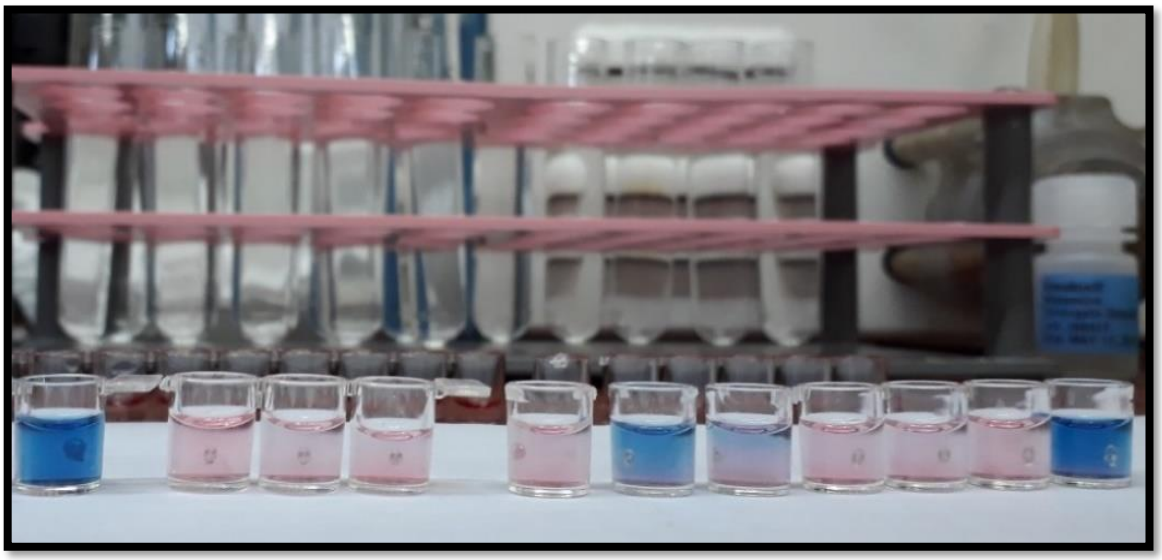
Η περιεχόμενη ισταμίνη στη σάρκα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ELISA (Veratox® for Histamine test kit, AOAC-RI #070703 approved method, Product No. 9505, Neogen, USA). Το αντίσωμα ακινητοποιείται σε μια στερεή επιφάνεια και προστίθεται το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο, αναμιγνύεται και απομακρύνεται η περίσσειά του. Η ανίχνευση των αντιγόνων που συνδέθηκαν με το αντίσωμα γίνεται με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος που είναι συζευγμένο με ένζυμο. Το αντίσωμα συνδέεται επίσης με το αντιγόνο και η δέσμευση ανιχνεύεται με χρήση χρωμοφόρου υποστρώματος, ώστε το ένζυμο να συνδεθεί με το δεύτερο αντίσωμα και να μετρηθεί η ένταση του χρώματος (αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου).

Αναλυτικά, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Αρχικά, τοποθετούνται 5 γραμμάρια του δείγματος σε 45 mL απιονισμένου νερού. Το μείγμα ανακινείται για 15-20s για να αποβληθεί ο ιστός του τόνου στο νερό και αφήνεται σε ηρεμία για 5 λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές. Το περιεχόμενο διηθείται. Η μέθοδος ELISA είναι πολύ ευαίσθητη και τα δείγματα πρέπει να αραιωθούν πριν γίνει το test. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 10 mL του ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης (extract diluent buffer) και 100μL του εκχυλίσματος. Σε κάθε δοχείο ανάμιξης (mixing well) τοποθετούνται 100μL συμπλόκου και 100μL δείγματος. Μεταφέρονται 100 μL στα δοχεία που φέρουν το αντίσωμα (antibody-coated wells) και αφήνονται να επωαστούν για 10 λεπτά αναμιγνύοντας τα για τα πρώτα 10 -20 δευτερόλεπτα. Τα δοχεία με το αντίσωμα ξεπλένονται 3 φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (diluted wash buffer), τοποθετούνται 100μL υποστρώματος αφήνονται να επωαστούν για 10 λεπτά, όπως και πριν, τοποθετούνται 100μL από το διάλυμα που σταματά την αντίδραση και ακολουθεί ανάγνωση με χρήση κατάλληλου φωτομέτρου (microwell reader) (Spectrostar Nano plate reader, BMG labtech, Ortenberg, Germany) στα 650 nm. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση κατάλληλου λογισμικού (MARS Data Analysis software v.3.01 R2, BMG labtech, Ortenberg, Germany).

Εικόνα 3. 11 Εμβολιασμένο δείγμα τόνου σε τρυβλίο για προσδιορισμό ισταμίνης.

Εικόνα 3. 12 Εκχύλιση δειγμάτων τόνου για προσδιορισμό ισταμίνης.



Εικόνα 3. 13 ELISA για προσδιορισμό σχηματισμού ισταμίνης σε εμβολιασμένο τόνο με *Morganella morganii*.

Εικόνα 3. 14 Φωτόμετρο (microwell reader) (Spectrostar Nano plate reader, BMG labtech, Ortenberg, Germany

Κεφάλαιο 4: Κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών TTI

4.1 Επεξεργασία απόκρισης των χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI

Ακολουθεί η επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων των ενζυμικών δεικτών TTI.

4.1.1 Συνάρτηση απόκρισης ενζυμικών TTI

Η απόκριση των ενζυμικών TTI προκύπτει με χρήση των παραμέτρων α και b των μετρήσεων χρώματος που ελήφθησαν κατά την πειραματική διαδικασία (Εξίσωση 4.1).:

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

όπου, α και b οι συντεταγμένες του χρώματος της κλίμακας CIELab. Ο δείκτης norm(a+b) δείχνει την απόκριση του TTI, η οποία συναρτήσει του χρόνου έχει σιγμοειδή μορφή. Η κινητική των ενζυμικών TTI έχει αποδειχθεί ότι περιγράφεται καλύτερα με το συγκεκριμένο κινητικό μοντέλο των δύο παραμέτρων.

Έτσι, η συνάρτηση απόκρισης δίνεται από τη σχέση:

$$\text{norm}(a+b) = \frac{1}{1+e^{\frac{k1-t}{k2}}} \quad (4.2)$$

όπου k_1, k_2 οι σταθερές των ρυθμών μεταβολής χρώματος του TTI. Το οπτικά παρατηρούμενο τελικό σημείο των ενζυμικών TTI αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης σε τιμή απόκρισης norm(a+b)=0.8.

4.1.2 Προσδιορισμός κινητικών χαρακτηριστικών k_{ref} και E_a των ενζυμικών TTI

Τα δεδομένα χρώματος που ελήφθησαν κατά τη μελέτη των ενζυμικών δεικτών επεξεργάστηκαν με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 μέσω του οποίου προσδιορίσθηκαν στην εκάστοτε μελετώμενη θερμοκρασία οι σταθερές k_1 και k_2 της Εξίσωσης 4.2. Ακολούθησε προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών των δεικτών με χρήση μη γραμμικής παλινδρόμησης του προγράμματος Systat 10.2 μέσω του οποίου προσδιορίσθηκαν οι τιμές των E_a, k_{1ref} και k_{2ref} με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} = 4 ^oC=277,15K, με χρήση της εξίσωσης:

$$\text{norm}(a+b) = \frac{1}{1+e^{\left\{\frac{k1ref*\exp[\frac{Ea}{R}\left(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref}\right)]-t}{k2ref*\exp[\frac{Ea}{R}\left(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref}\right)]}\right\}}} \quad (4.3).$$

4.1.3 Έλεγχος αξιοπιστίας κινητικών μοντέλων

Προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία των κινητικών μοντέλων που προέκυψαν για τους ενζυμικούς δείκτες LP και M, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (variable conditions). Επιλέχθηκε το ακόλουθο θερμοκρασιακό προφίλ:

- ✓ έκθεση των δεικτών στους 3 ^{o}C για 8 ώρες,
- ✓ έκθεση των δεικτών στους 6 ^{o}C για 8 ώρες
- ✓ και έκθεση των δεικτών στους 10 ^{o}C για 8 ώρες.

Προσδιορίστηκε η δραστική θερμοκρασία T_{eff}, η θερμοκρασία δηλαδή στην οποία τα TTI θα είχαν την ίδια απόκριση με το μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ στο οποίο υποβλήθηκαν, αν αποθηκεύονταν ισοθερμοκρασιακά. Για τον υπολογισμό της T_{eff} χρησιμοποιείται η σχέση:

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

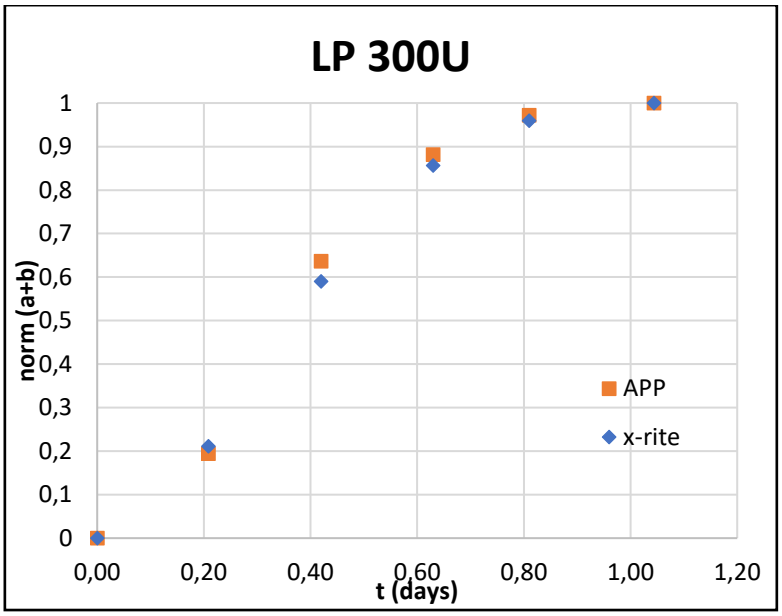
Με χρήση της T_{eff} και της εξίσωσης Arrhenius, προσδιορίστηκαν οι προβλεπόμενες σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_{1pred} και k_{2pred} και έγινε σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών χρόνων ζωής των δεικτών TTI.

4.2 Συσχέτιση δεδομένων χρώματος που ελήφθησαν με το χρωματόμετρο X-rite και με την εφαρμογή (Vitsab APP) σε έξυπνο κινητό (smartphone)

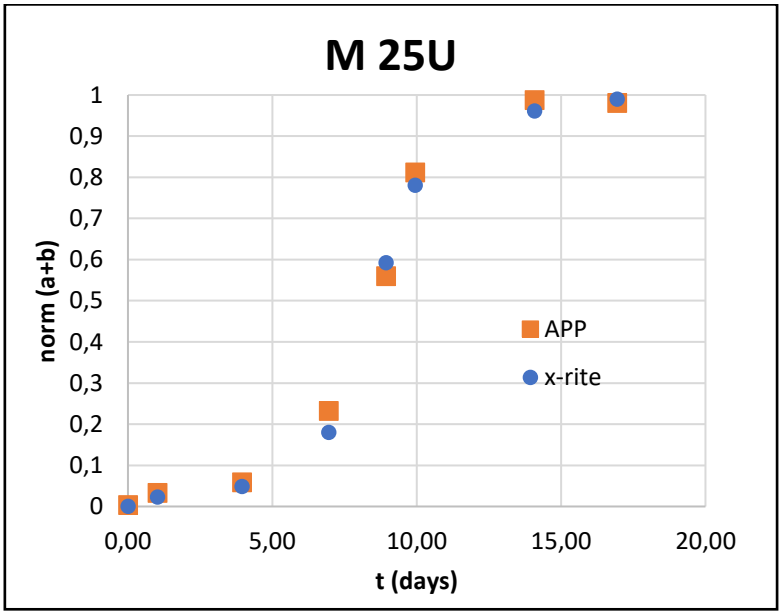
Η χρήση νέων εργαλείων, όπως είναι μία κατάλληλη εφαρμογή σε έξυπνο κινητό (smartphone), μπορεί να αποτελέσει μία εύκολη, πρακτική λύση, καθώς επιτρέπει σε κάθε χειριστή να μπορεί να ελέγχει το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου σε όλα τα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας, με μία φορητή συσκευή, μικρότερου κόστους από ένα εργαστηριακό χρωματόμετρο.

Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της εφαρμογής Vitsab (**Vitsab APP)** ως μετρητή χρώματος των ενζυμικών δεικτών, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των δεδομένων χρώματος που ελήφθησαν με χρήση του χρωματόμετρου X-rite και της προαναφερόμενης εφαρμογής. Συγκρίνοντας τις τιμές απόκρισης norm(a+b) των ενζυμικών δεικτών και κατ' επέκταση τη μεταβολή τους συναρτήσει του χρόνου τόσο για τις μετρήσεις που ελήφθησαν με το χρωματόμετρο x-rite όσο και με την εφαρμογή Vitsab, παρατηρήθηκε ότι οι καμπύλες σχεδόν ταυτίζονταν με τους 2 τρόπους μέτρησης.

Ενδεικτικά, παρατίθενται παρακάτω τα διαγράμματα απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για το δείκτη τύπου LP συγκέντρωσης 300U σε θερμοκρασία 15°C και για το δείκτη τύπου M συγκέντρωσης 25U σε θερμοκρασία 5°C.



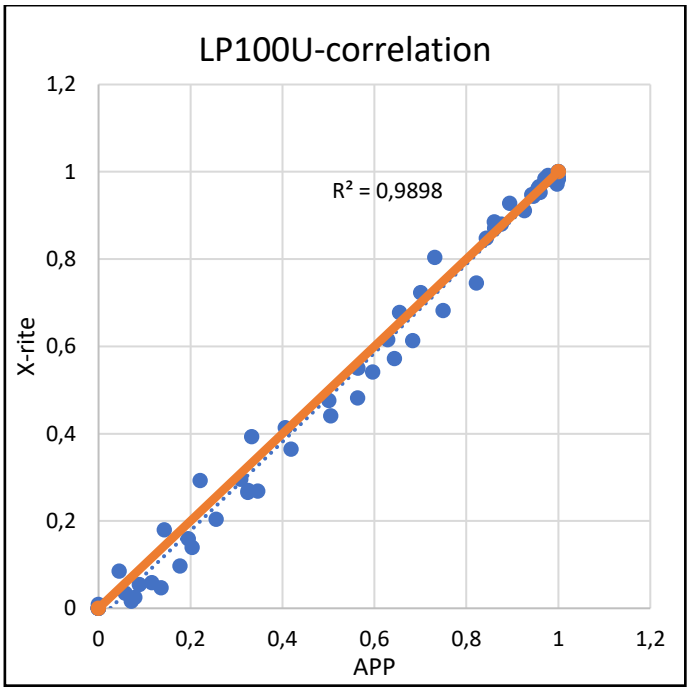
Διάγραμμα 4. 1 Σύγκριση μεταβολής norm (a+b) με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη LP 300U στους 15 °C για τις μετρήσεις με κινητό και χρωματόμετρο.



Διάγραμμα 4. 2 Σύγκριση μεταβολής norm (a+b) με το χρόνο για τον ενζυμικό δείκτη M 25U στους 5 °C για τις μετρήσεις με κινητό και χρωματόμετρο.

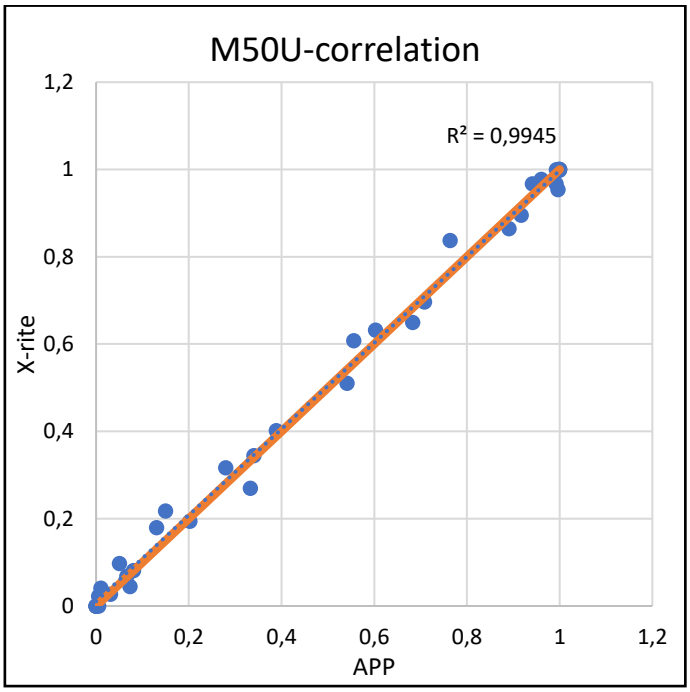
Προκειμένου να ελεγχθεί η απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων που ελήφθησαν με χρήση της εφαρμογής Vitsab και με το χρωματόμετρο X-rite, κατασκευάστηκαν διαγράμματα διασποράς των συναρτήσεων απόκρισης norm (a+b) που προέκυψαν με τους δύο τρόπους μέτρησης.

Παρατίθεται το διάγραμμα συσχέτισης των μετρήσεων με το χρωματόμετρο X-rite και με την εφαρμογή (Vitsab APP) σε έξυπνο κινητό (smartphone) για τον ενζυμικό δείκτη τύπου LP συγκέντρωσης 100U στις θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 και 25°C.



Διάγραμμα 4. 3 Συσχέτιση μετρήσεων με χρωματόμετρο x-rite και με κινητό (smartphone) για τον ενζυμικό δείκτη τύπου LP συγκέντρωσης 100U.

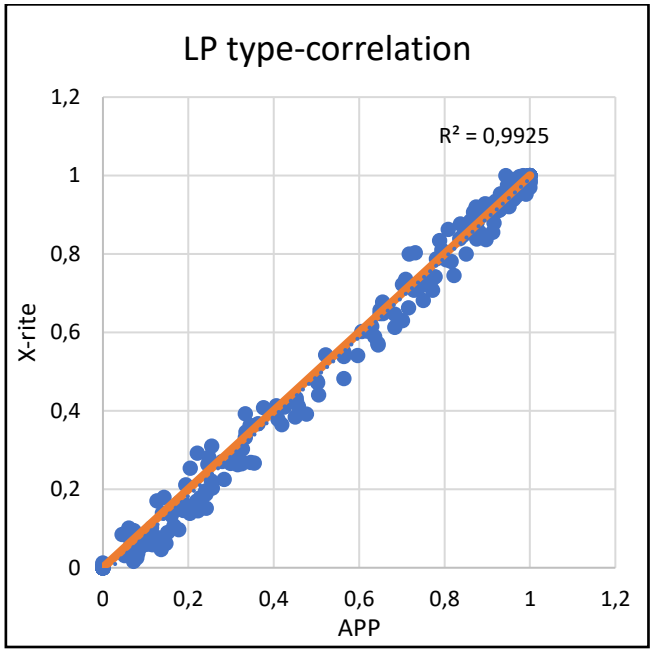
Παρατίθεται το διάγραμμα συσχέτισης των μετρήσεων με το χρωματόμετρο X-rite και με την εφαρμογή (Vitsab APP) σε έξυπνο κινητό (smartphone) για τον ενζυμικό δείκτη τύπου M συγκέντρωσης 50U στις θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10 και 15°C.



Διάγραμμα 4. 4 Συσχέτιση μετρήσεων με χρωματόμετρο x-rite και με κινητό (smartphone) για τον ενζυμικό δείκτη τύπου M συγκέντρωσης 50U.

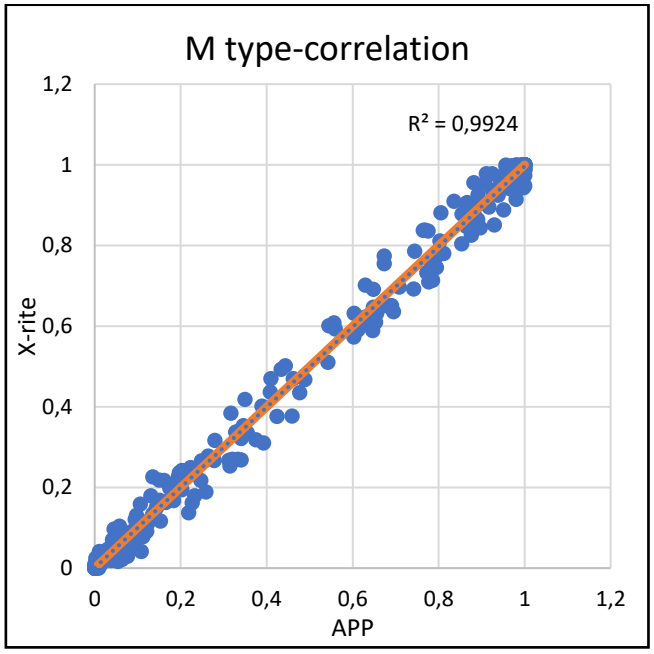
Παρατίθεται το διάγραμμα συσχέτισης των μετρήσεων με το χρωματόμετρο X-rite και με την εφαρμογή (Vitsab APP) σε έξυπνο κινητό (smartphone) για τους

ενζυμικούς δείκτες τύπου LP συγκέντρωσης 100U, 150U, 300U και 500U, στις θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 και 25ºC.



Διάγραμμα 4. 5 Συσχέτιση μετρήσεων με χρωματόμετρο x-rite και με κινητό (smartphone) για τον ενζυμικό δείκτη τύπου LP συγκεντρώσεων 100, 150, 300 και 500U.

Παρατίθεται το διάγραμμα συσχέτισης των μετρήσεων με το χρωματόμετρο X-rite και με την εφαρμογή (Vitsab APP) σε έξυπνο κινητό (smartphone) για τους ενζυμικούς δείκτες τύπου M συγκέντρωσης 5U, 10U, 15U, 25U, 50U και 75U στις θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10 και 15ºC.



Διάγραμμα 4. 6 Συσχέτιση μετρήσεων με χρωματόμετρο x-rite και με κινητό (smartphone) για τον ενζυμικό δείκτη τύπου M συγκεντρώσεων 5, 10, 15, 25, 50 και 75U.

Από τα παραπάνω διαγράμματα, συμπεραίνεται πως υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων με τους δύο τρόπους, δηλαδή όσο αυξάνει η απόκριση στις μετρήσεις με το χρωματόμετρο, αυξάνει και στις μετρήσεις με την εφαρμογή Vitsab. Τα σημεία του διαγράμματος κινούνται με ικανοποιητική ακρίβεια πάνω σε μία ευθεία, όπως φαίνεται και από τη διχοτόμο του διαγράμματος.

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται αναλυτικά τα εύρη των συντελεστών συσχέτισης, correlation,r για τους δείκτες τύπου LP συγκεντρώσεων 100U, 150U, 300U και 500U και τύπου M συγκεντρώσεων 5U, 10U, 15U, 25U, 50U και 75U.

Πίνακας 4. 1 Συντελεστές συσχέτισης για τους δείκτες τύπου LP συγκεντρώσεων 100U, 150U, 300U και 500U και M συγκεντρώσεων 5U, 10U, 15U, 25U, 50U και 75U.

Type	C (U)	Correlation, r
LP	**100**	0.994-0.999
	150	0.995-0.999
	300	0.996-0.999
	500	0.996-0.999
M	**5**	0.996-0.997
	10	0.995-0.999
	15	0.996-0.999
	25	0.997-0.999
	50	0.996-0.999
	75	0.995-0.999

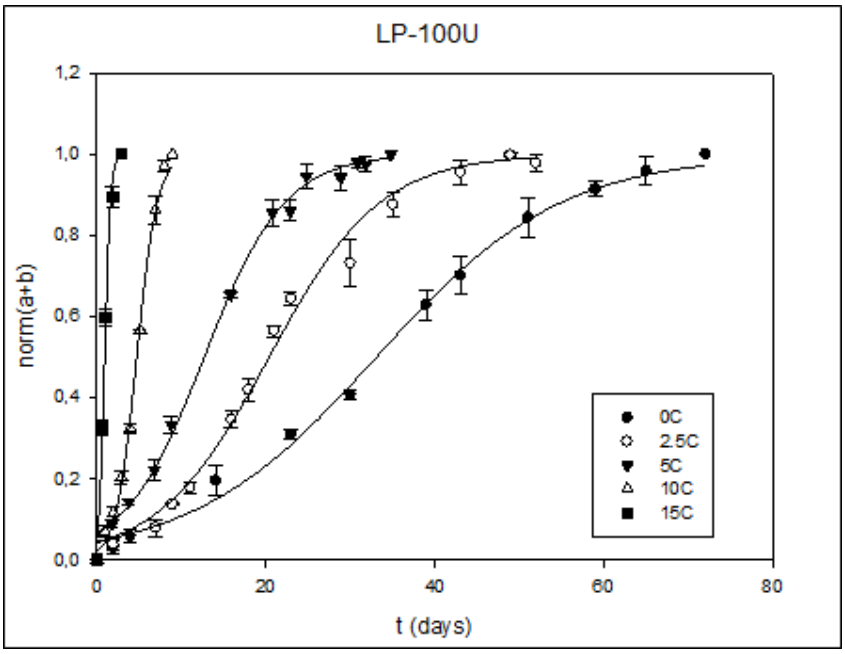
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.1 οι συντελεστές συσχέτισης κυμάνθηκαν για τους δείκτες τύπου LP από 0,994 έως 0,999 και για τους δείκτες τύπου M από 0,995 έως 0,999. Λόγω της ισχυρής συσχέτισης, η επεξεργασία συνεχίστηκε με τα δεδομένα που ελήφθησαν με χρήση της εφαρμογής Vitsab.

4.3 Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών TTI

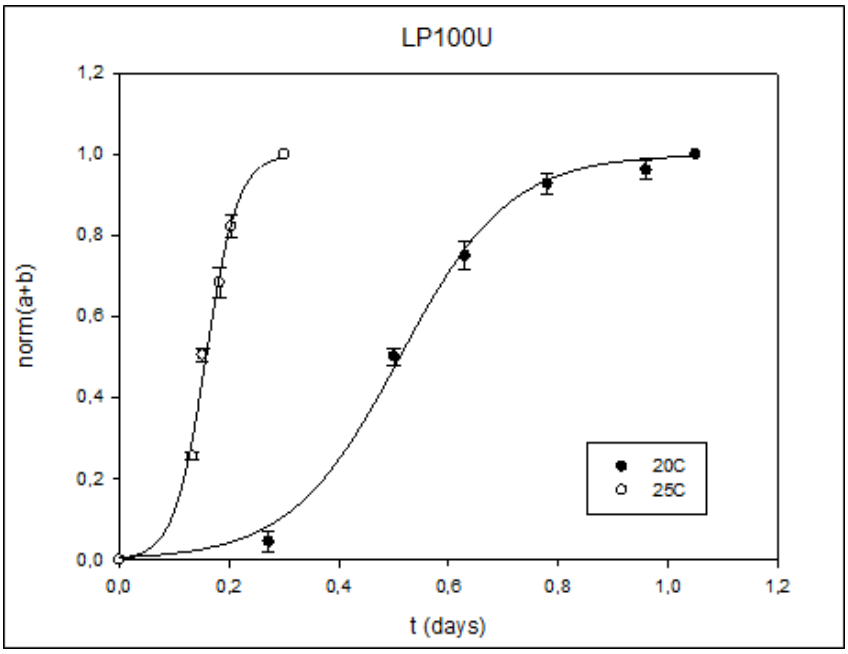
Οι ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες που μελετήθηκαν ήταν οι: LP 100U, LP 150U, LP 300U και LP 500U και οι M 5U, M 10U, M15U, M 25U, M 50U και M 75U. Για καθένα από τους παραπάνω δείκτες πραγματοποιήθηκαν ισοθερμοκρασιακά πειράματα σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 και 25 ^{o}C για τους δείκτες τύπου LP και σε θερμοκρασίες 0, 2.5, 5, 10 και 15 ^{o}C για τους δείκτες τύπου M. Τα δεδομένα χρώματος που ελήφθησαν κατά την αποθήκευση των ενζυμικών δεικτών επεξεργάστηκαν με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10, μέσω του οποίου προσδιορίστηκαν για την εκάστοτε θερμοκρασία, οι σταθερές k_1 και k_2 της σχέσης norm(a+b) = $\frac{1}{1+e^{\frac{k1-t}{k2}}}$. Με χρήση της εξίσωσης Arrhenius και του προγράμματος Systat 10.2 έγινε προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών E_a, k_{1ref} και k_{2ref} με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} = 4 ^{o}C=277,15K.

4.3.1 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 100U

Στα Διαγράμματα 4.7 και 4.8 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days) για το δείκτη LP 100U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15 °C και 20-25 °C, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4. 7 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.



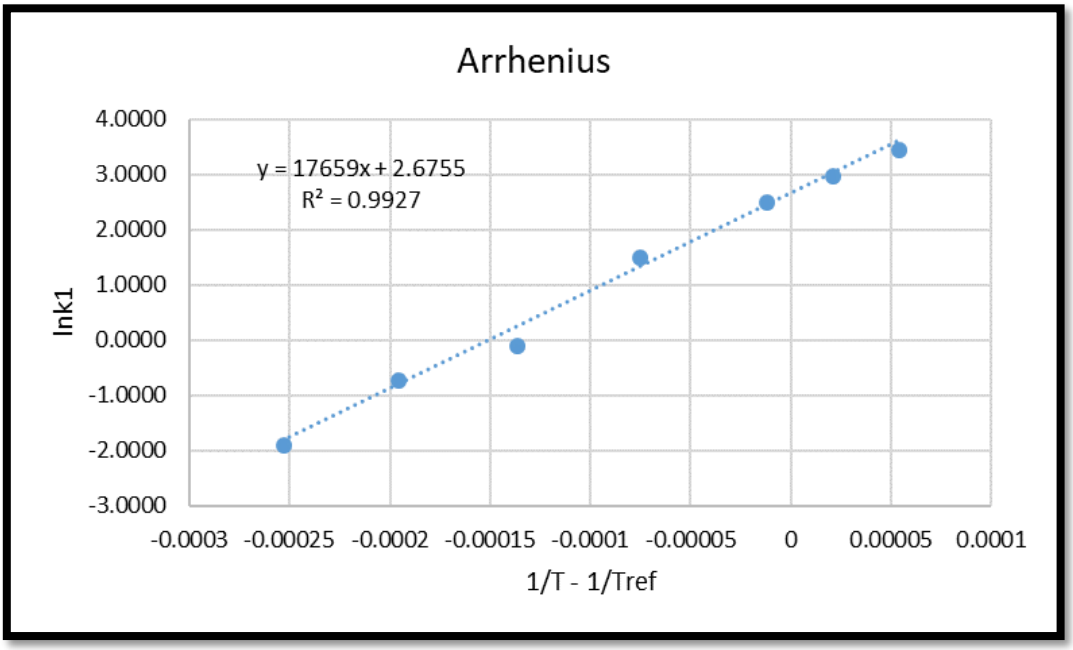
Διάγραμμα 4. 8 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 100U και για θερμοκρασίες 20 °C και 25°C.

Ακολούθησε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.2).

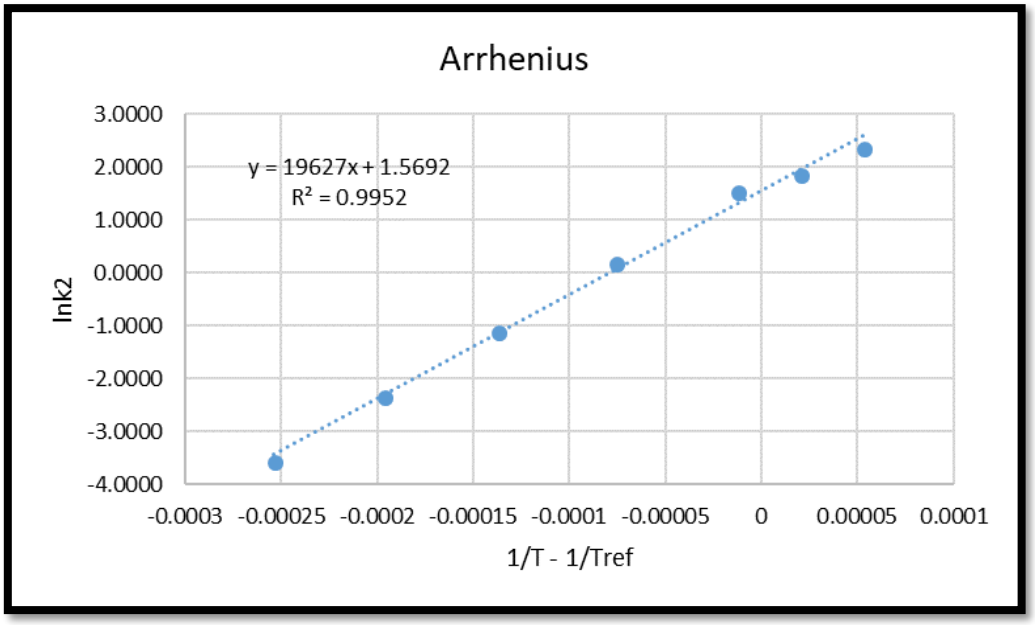
Πίνακας 4. 2 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη LP 100U.

T (°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	33.071	10.915	0.996
2.5	20.382	6.543	0.991
5	12.708	4.757	0.996
10	4.718	1.220	0.996
15	0.945	0.337	0.991
20	0.511	0.100	0.997
25	0.158	0.029	0.993

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη LP 100U.



Διάγραμμα 4. 9 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς $[(1/T) - (1/Tref)]$, με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 100U.



Διάγραμμα 4. 10 Γραμμική προσαρμογή lnk_2 ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 100U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη LP 100U.

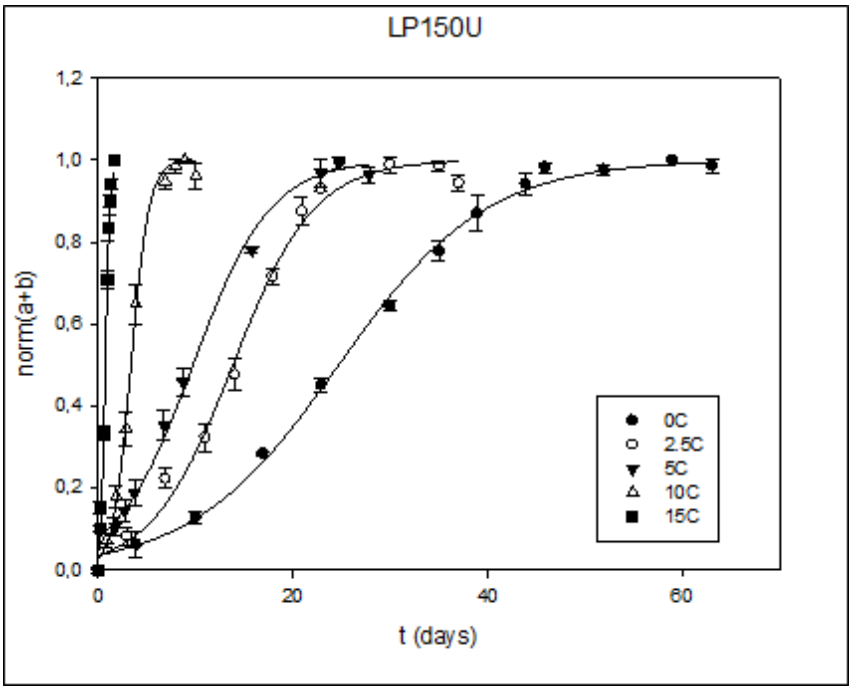
Πίνακας 4. 3 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 100U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
14.449	0.355	147.0	1.5	4.636	0.295	0.987

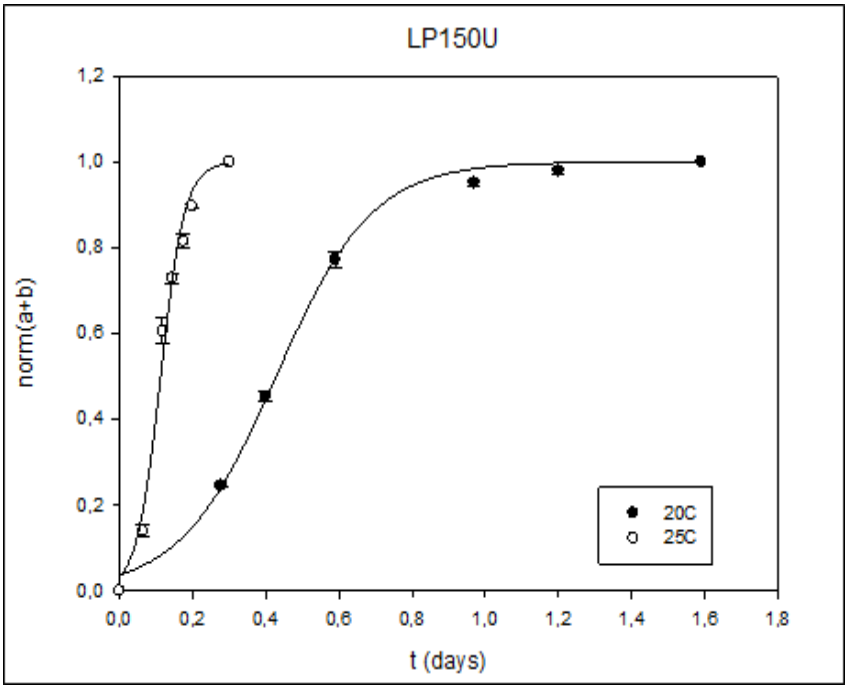
*S.E.= Standard Error

4.3.2 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 150U

Στα Διαγράμματα 4.11 και 4.12 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη LP 150U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C και 20-25°C, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4. 11 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 150U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.



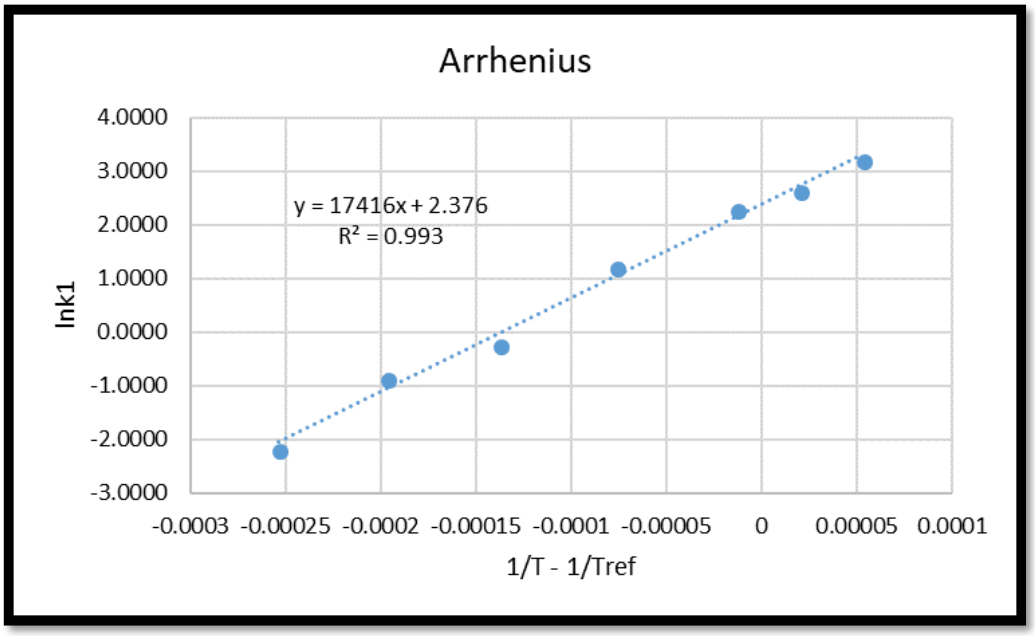
Διάγραμμα 4. 12 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 150U και για θερμοκρασίες 20 °C και 25°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.4).

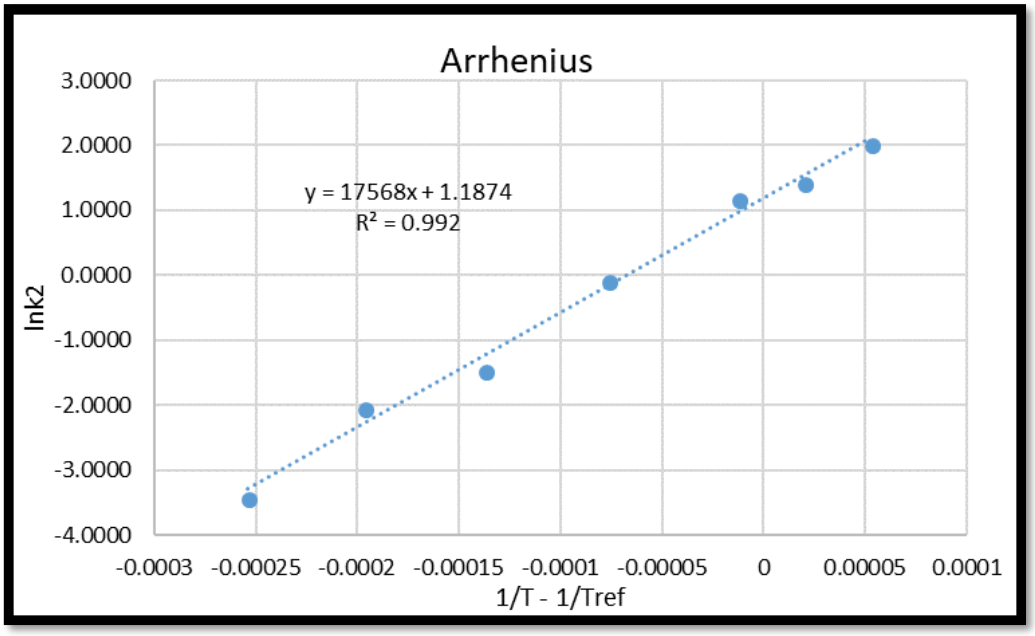
Πίνακας 4. 4 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη LP 150U.

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	24.724	7.543	0.997
2.5	13.873	4.181	0.992
5	9.778	3.267	0.993
10	3.415	0.926	0.997
15	0.792	0.236	0.996
20	0.428	0.131	0.997
25	0.113	0.033	0.987

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη LP 150U.



Διάγραμμα 4. 13 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς $[(1/T) - (1/Tref)]$, με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 150U.



Διάγραμμα 4. 14 Γραμμική προσαρμογή lnk_2 ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 150U.

Στον Πίνακα 4.5, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη LP 150U.

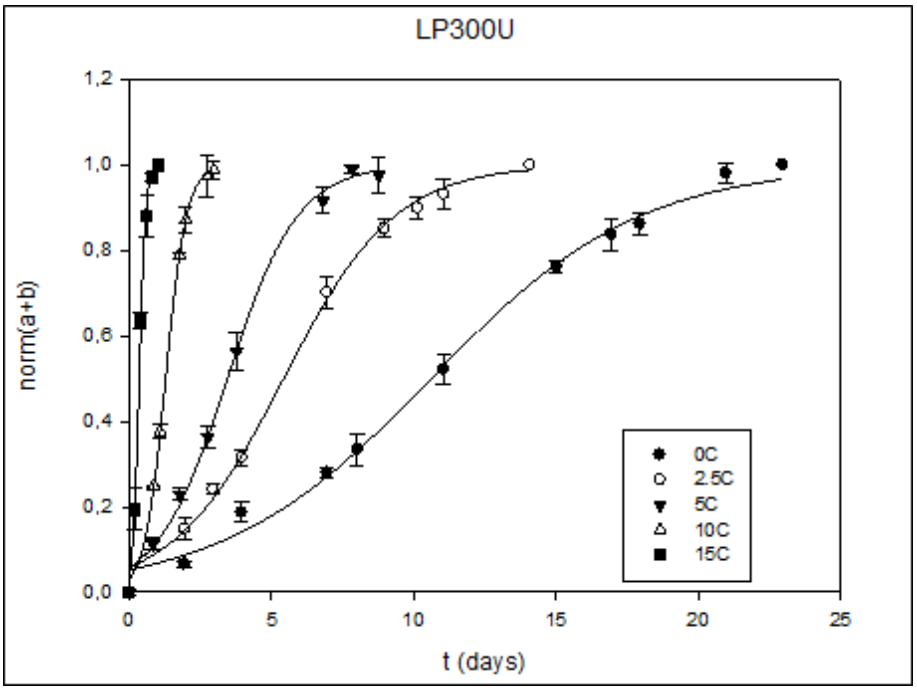
Πίνακας 4. 5 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 150U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
10.141	0.270	144.2	1.5	2.962	0.208	0.989

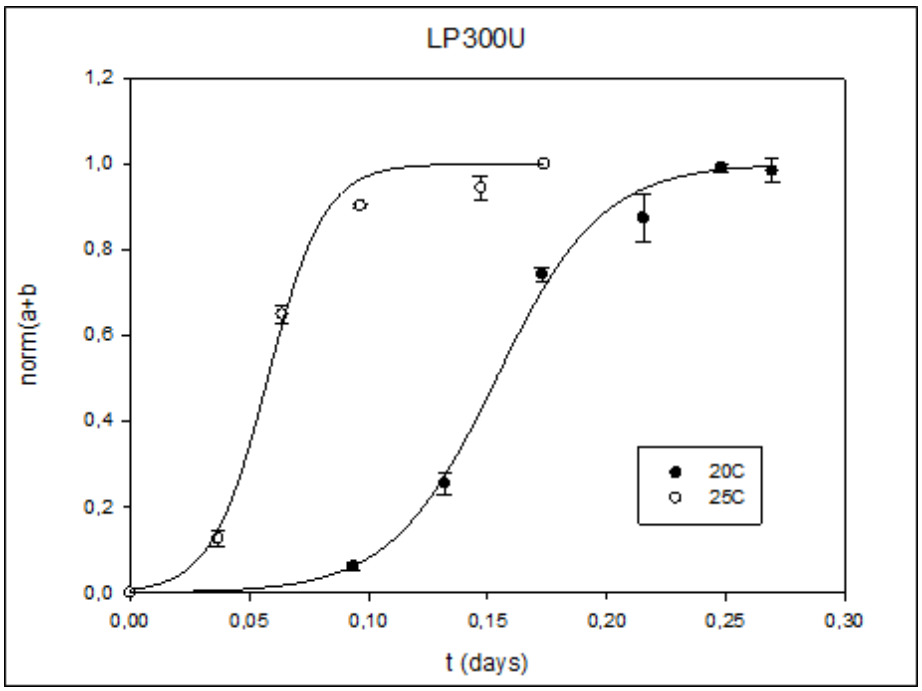
*S.E.= Standard Error

4.3.3 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 300U

Στα Διαγράμματα 4.15 και 4.16 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη LP 300U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C και 20-25°C, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4. 15 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 300U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.



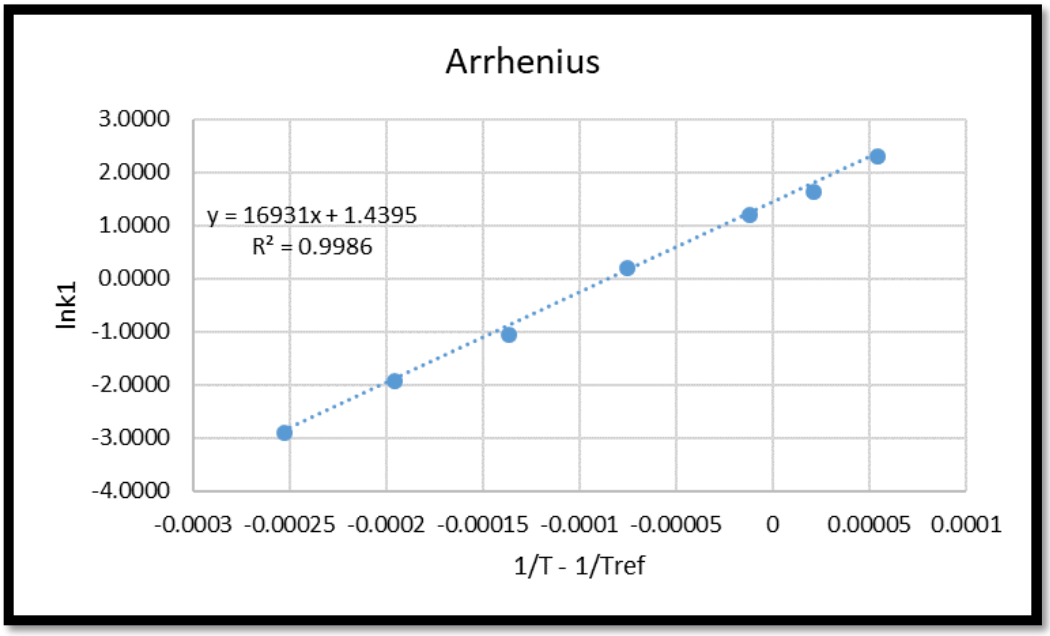
Διάγραμμα 4. 16 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 300U και για θερμοκρασίες 20 °C και 25°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.6).

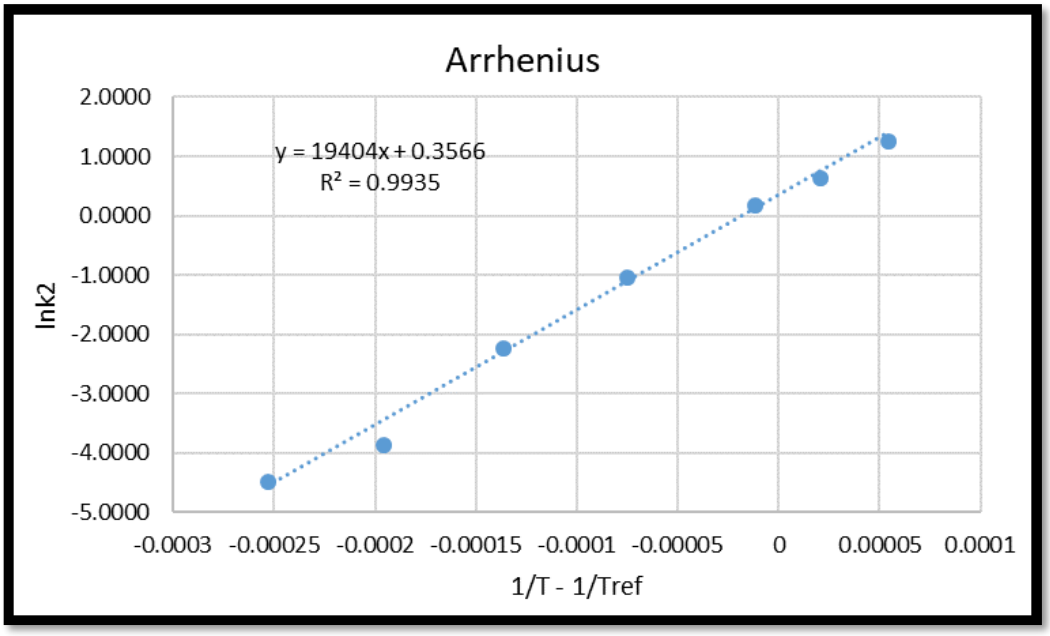
Πίνακας 4. 6 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη LP 300U.

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	10.610	3.676	0.994
2.5	5.436	1.953	0.996
5	3.460	1.233	0.996
10	1.292	0.369	0.999
15	0.366	0.112	0.997
20	0.154	0.022	0.994
25	0.058	0.012	0.992

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη LP 300U.



Διάγραμμα 4. 17 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς $[(1/T) - (1/Tref)]$, με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 300U.



Διάγραμμα 4. 18 Γραμμική προσαρμογή lnk_2 ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 300U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη LP 300U.

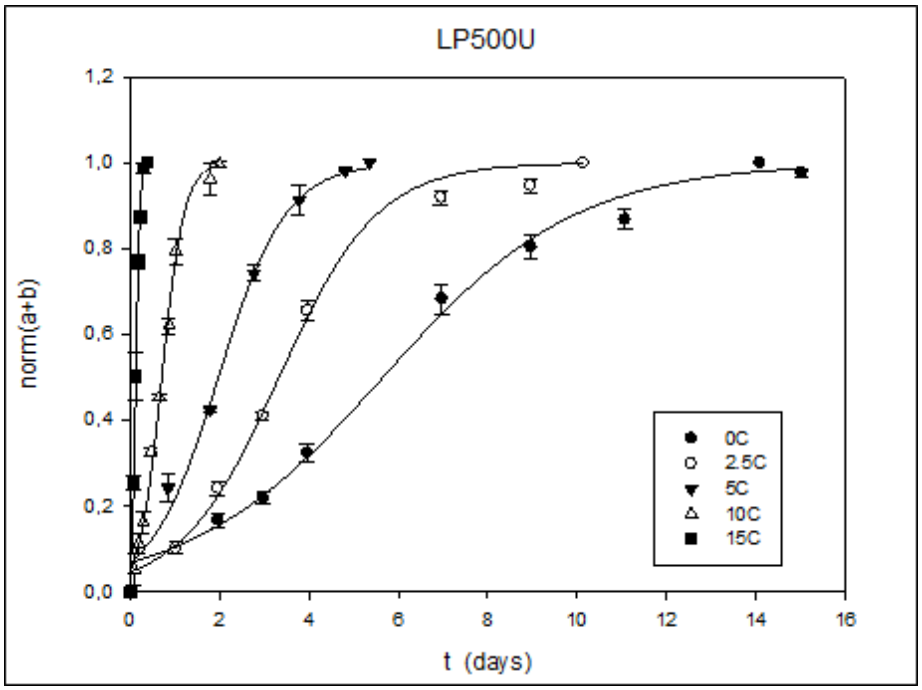
Πίνακας 4. 7 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 300U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
4.284	0.094	142,3	1.4	1.266	0.071	0.993

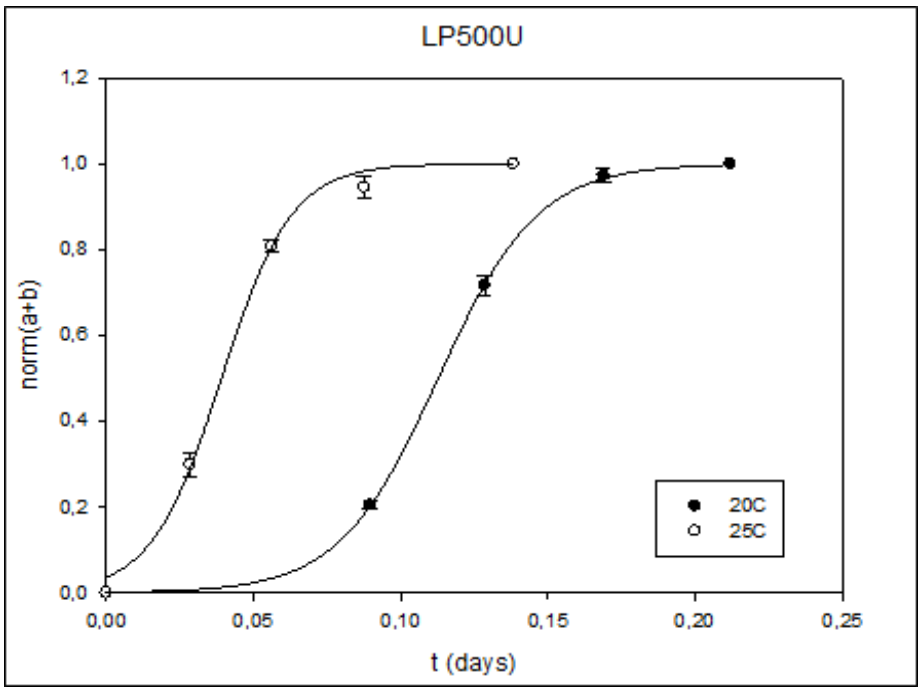
*S.E.= Standard Error

4.3.4 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου LP συγκέντρωσης 500U

Στα Διαγράμματα 4.19 και 4.20 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη LP 500U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C και 20-25°C, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4. 19 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 500U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.



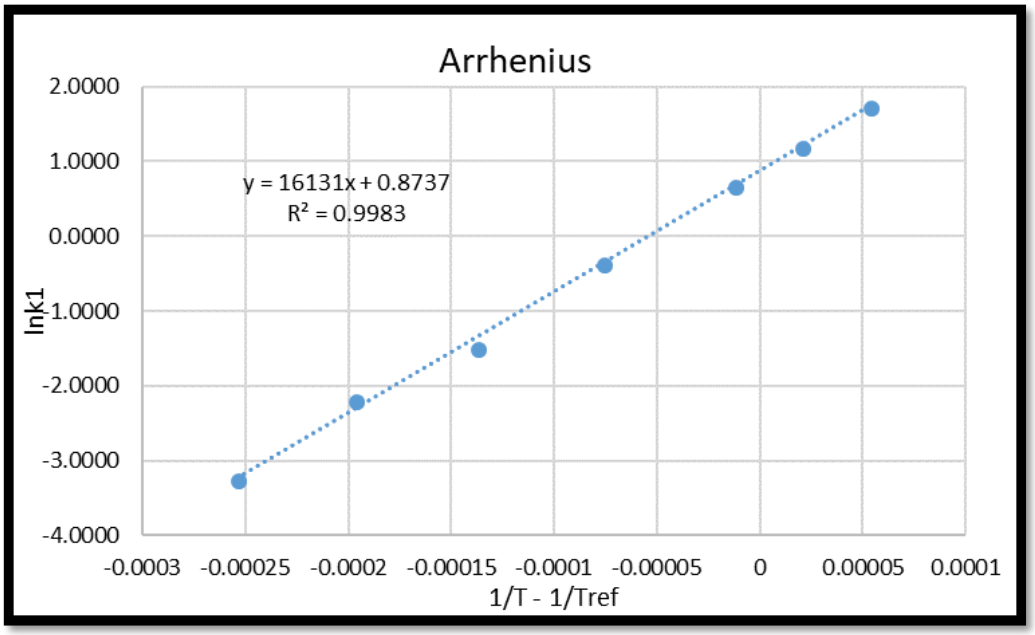
Διάγραμμα 4. 20 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη LP 500U και για θερμοκρασίες 20 °C και 25°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.8).

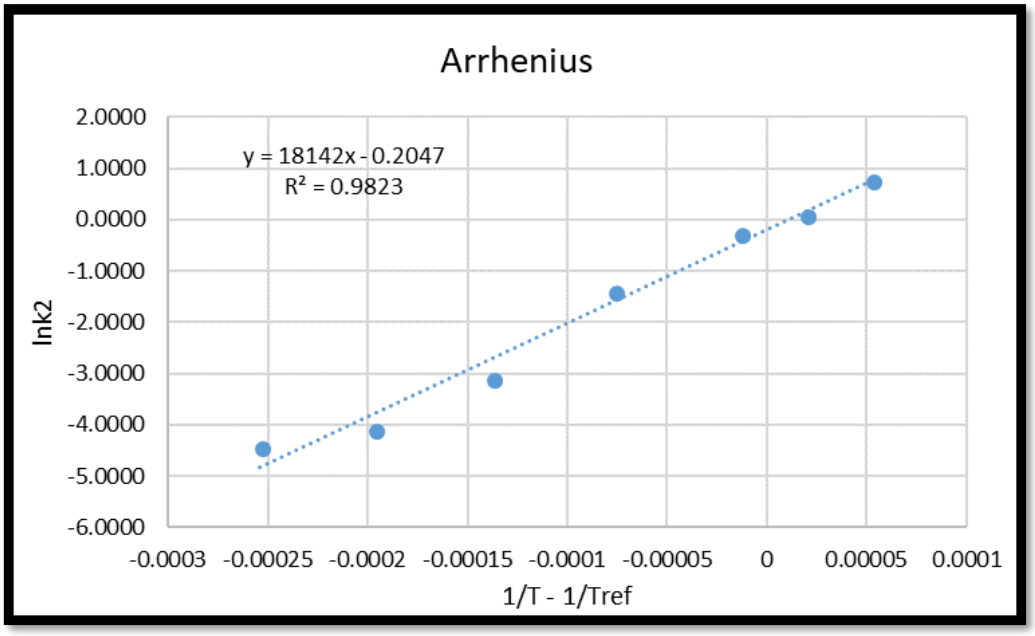
Πίνακας 4. 8 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη LP 500U.

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	5.652	2.161	0.991
2.5	3.327	1.099	0.994
5	1.969	0.756	0.991
10	0.705	0.249	0.993
15	0.225	0.045	0.995
20	0.113	0.017	1.000
25	0.039	0.012	0.996

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη LP 500U.



Διάγραμμα 4. 21 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 500U.



Διάγραμμα 4. 22 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_2$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη LP 500U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη LP 500U.

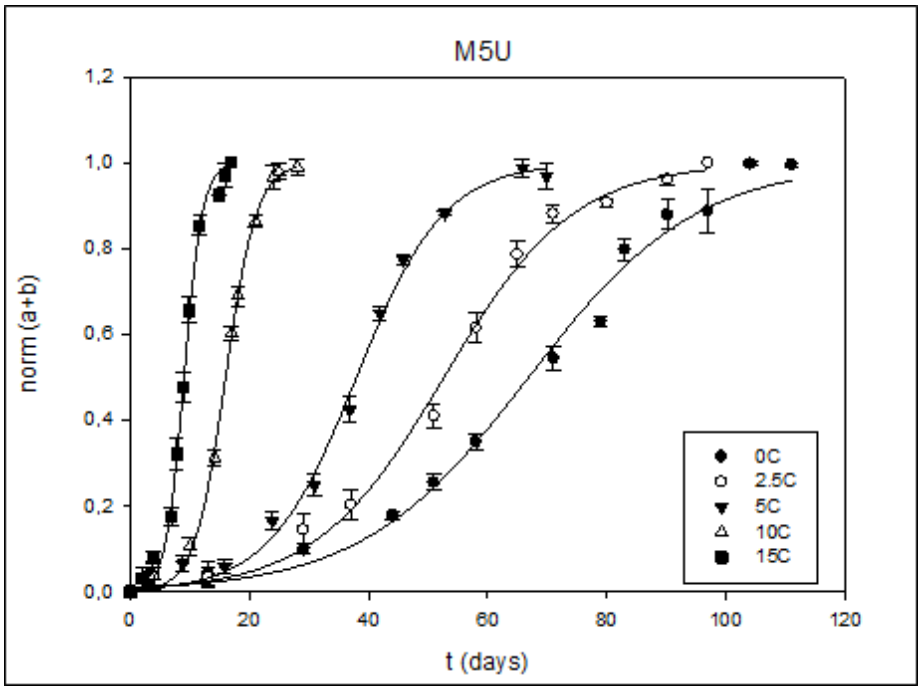
Πίνακας 4. 9 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη LP 500U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
2.443	0.053	133.2	1.4	0.814	0.042	0.995

*S.E.= Standard Error

4.3.5 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 5U

Στο Διάγραμμα 4.23 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη M-5U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C.



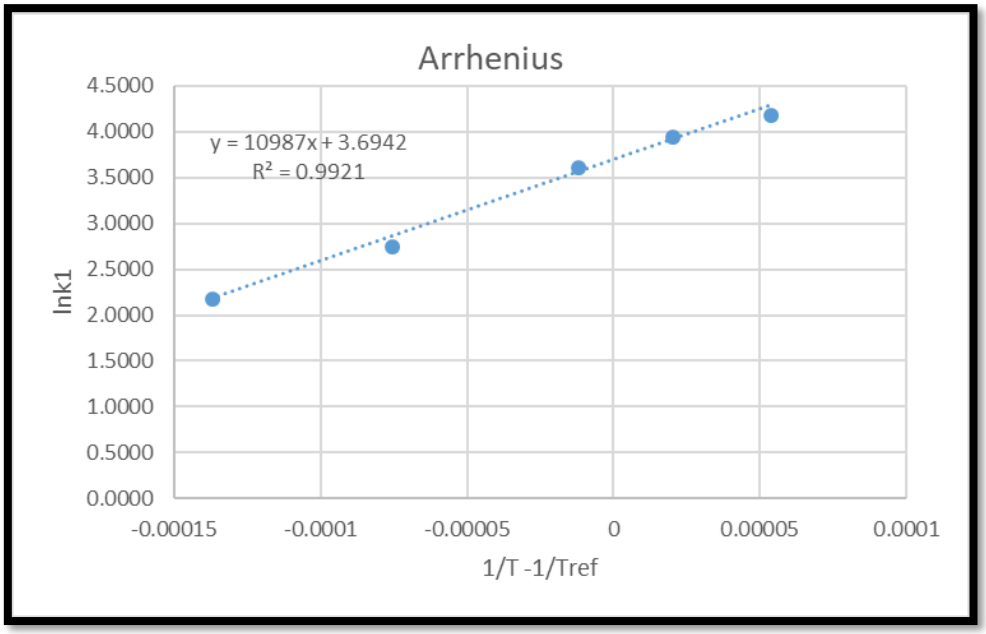
Διάγραμμα 4. 23 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη M 5U και για θερμοκρασίες 0 ºC, 2.5 ºC, 5 ºC, 10 ºC και 15ºC.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.10).

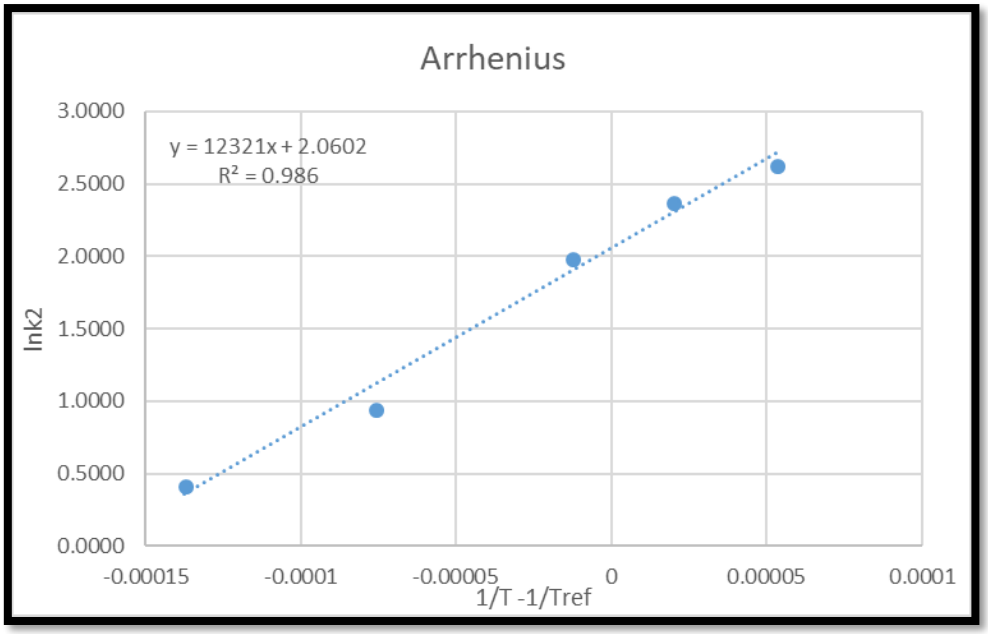
Πίνακας 4. 10 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη M 5U.

T(ºC)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	66.827	14.018	0.991
2.5	52.621	10.801	0.995
5	37.946	7.325	0.995
10	15.984	2.598	0.999
15	9.012	1.536	0.995

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 ºC, για το δείκτη M 5U.



Διάγραμμα 4. 24 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 5U.



Διάγραμμα 4. 25 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_2$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 5U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη M 5U.

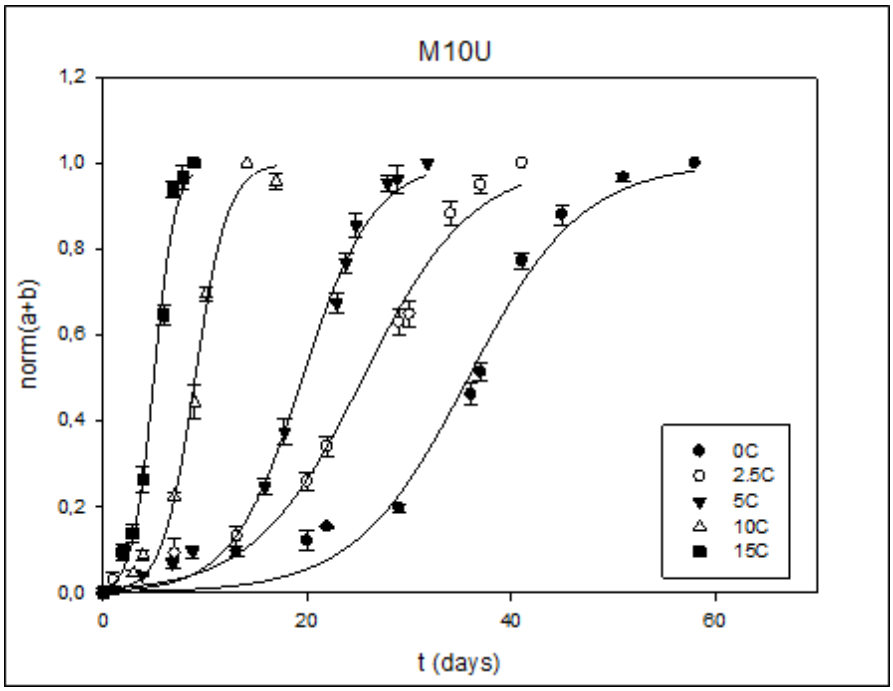
Πίνακας 4. 11 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 5U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
39.821	0.497	91.2	1.3	7.865	0.440	0.991

*S.E.= Standard Error

4.3.6 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 10U

Στο Διάγραμμα 4.26 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη M-10U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C.



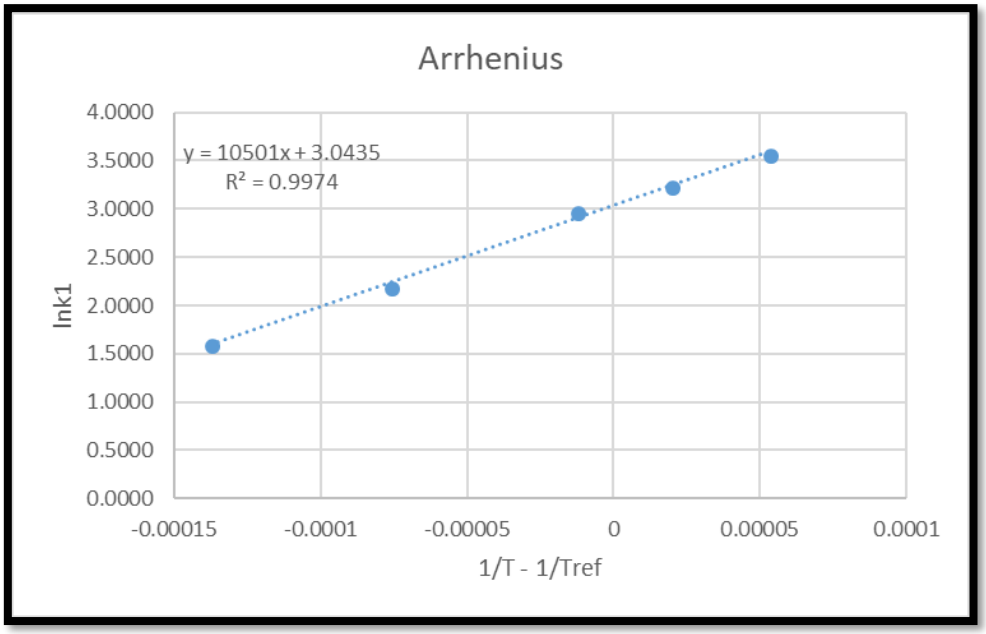
Διάγραμμα 4. 26 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη M 10U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.12).

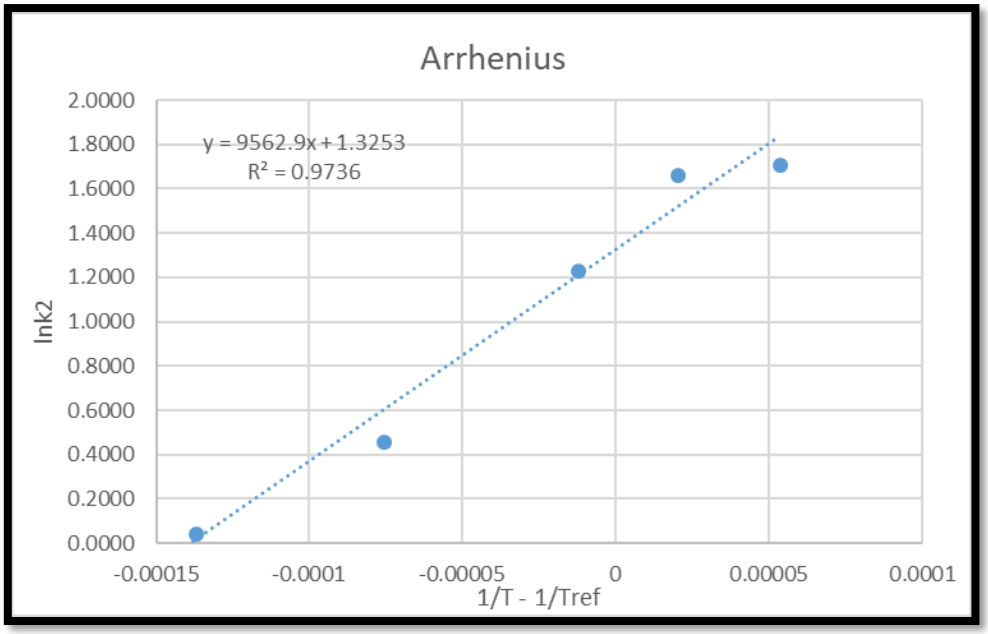
Πίνακας 4. 12 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη M 10U.

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	35.803	5.558	0.981
2.5	25.475	5.316	0.988
5	19.555	3.459	0.993
10	9.025	1.595	0.993
15	4.973	1.055	0.989

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη M 10U.



Διάγραμμα 4. 27 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 10U.



Διάγραμμα 4. 28 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_2$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 10U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη M 10U.

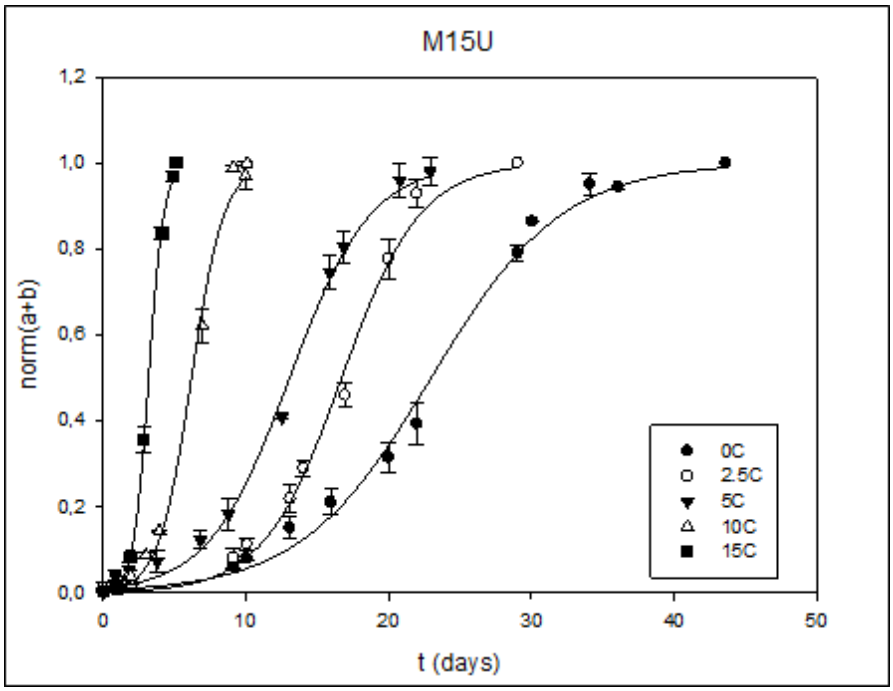
Πίνακας 4. 13 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 10U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
20.872	0.226	86.1	1.4	4.064	0.201	0.993

*S.E.= Standard Error

4.3.7 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 15U

Στο Διάγραμμα 4.29 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη M-15U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C.



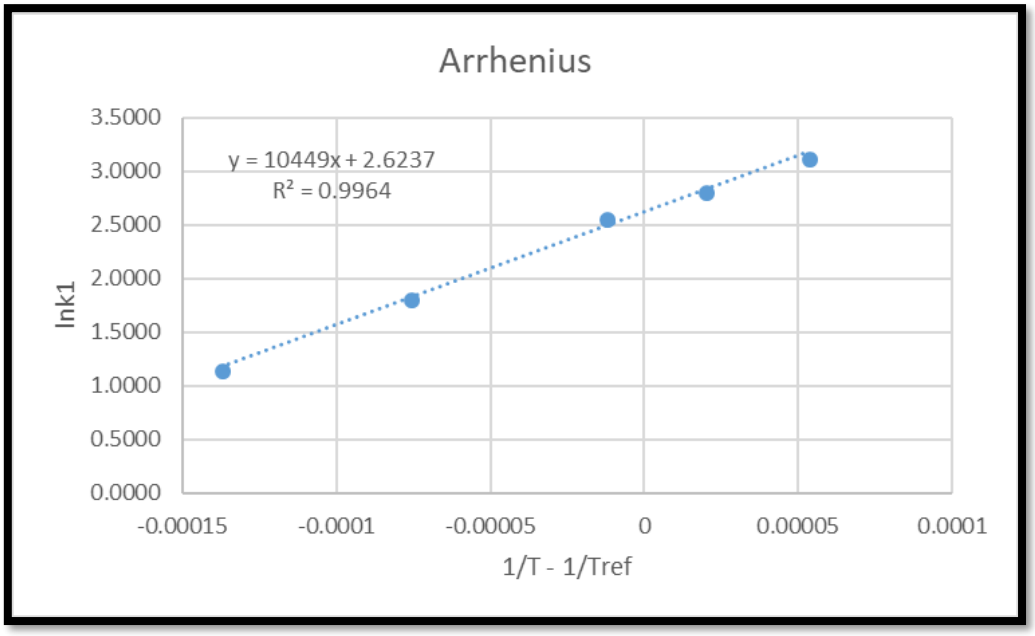
Διάγραμμα 4. 29 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη M 15U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.14).

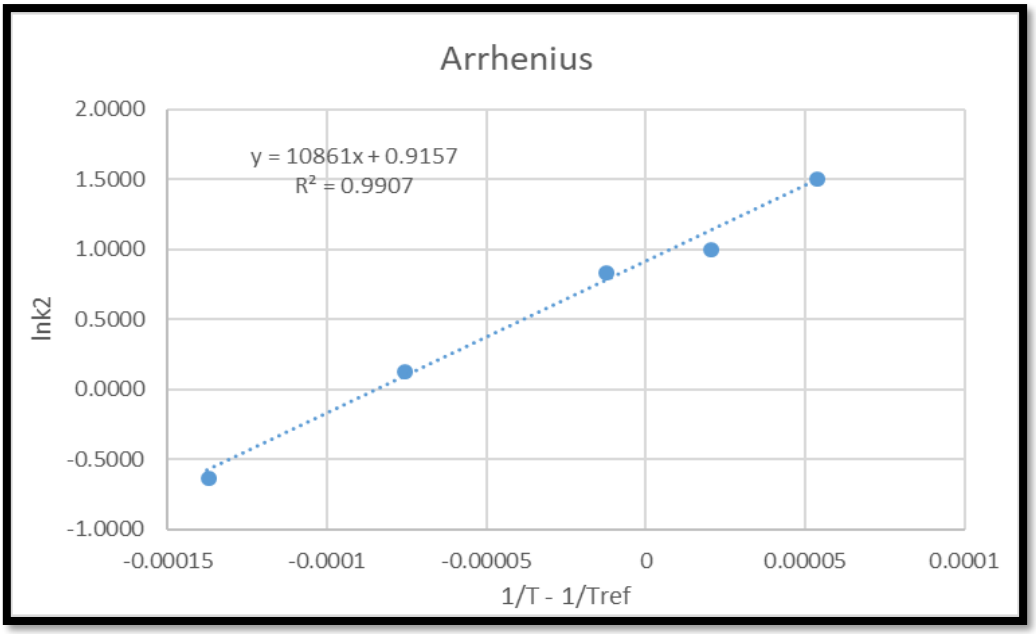
Πίνακας 4. 14 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη M 15U.

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	22.964	4.579	0.995
2.5	16.708	2.744	0.993
5	13.057	2.339	0.996
10	6.189	1.151	0.995
15	3.190	0.536	0.999

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη M 15U.



Διάγραμμα 4. 30 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 15U.



Διάγραμμα 4. 31 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_2$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 15U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη M 15U.

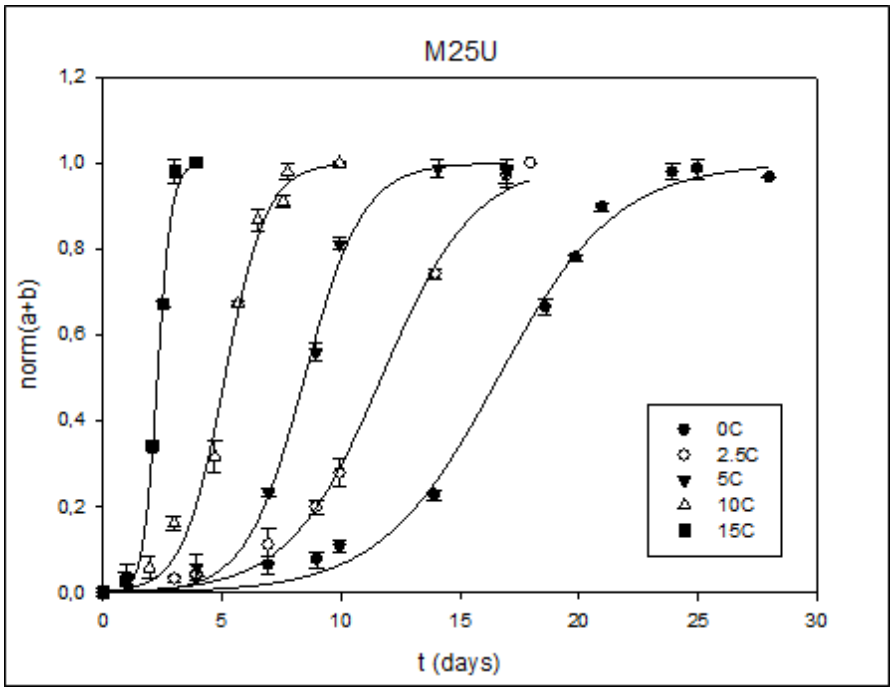
Πίνακας 4. 15 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 15U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
13.482	0.107	86.3	0.9	2.436	0.086	0.997

*S.E.= Standard Error

4.3.8 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 25U

Στο Διάγραμμα 4.32 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη M-25U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C.



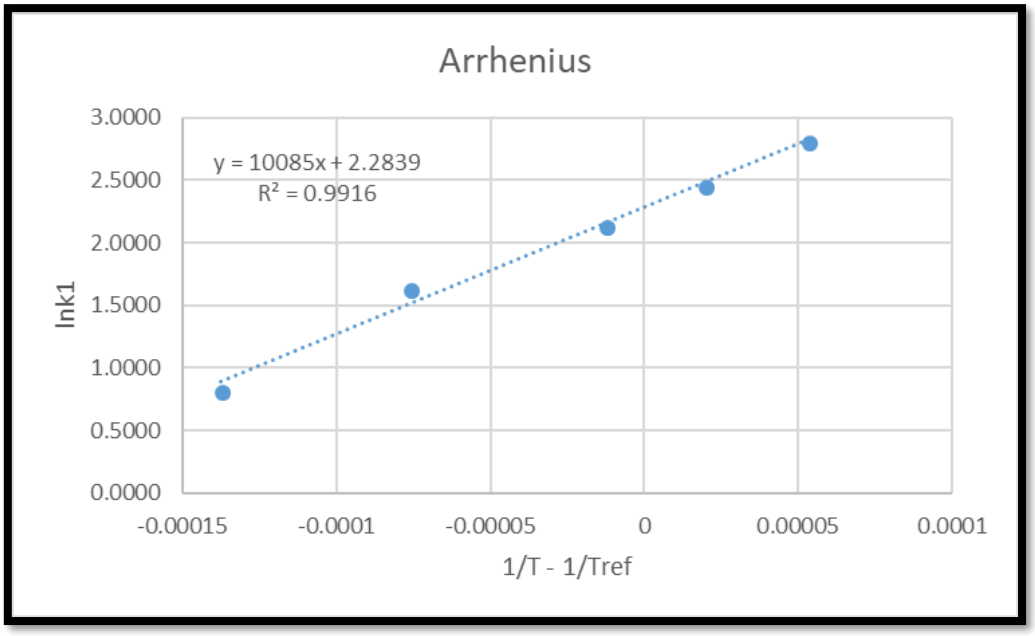
Διάγραμμα 4. 32 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη M 25U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.16).

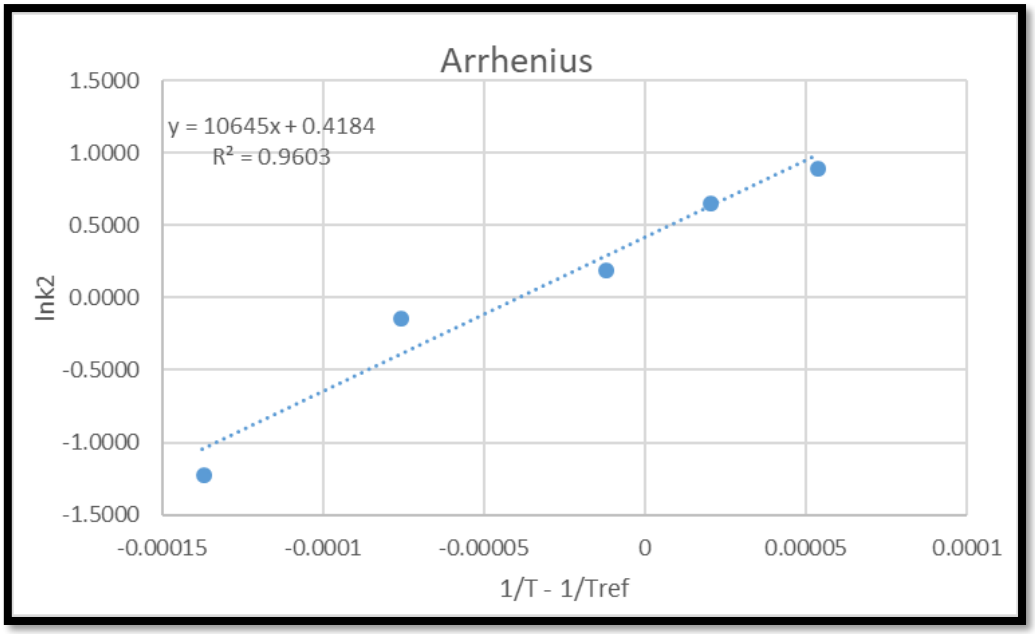
Πίνακας 4. 16 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη M 25U

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	16.598	2.489	0.994
2.5	11.689	1.952	0.996
5	8.460	1.224	0.996
10	5.113	0.879	0.991
15	2.280	0.299	0.994

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη M 25U.



Διάγραμμα 4. 33 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 25U.



Διάγραμμα 4. 34 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_2$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 25U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη M 25U.

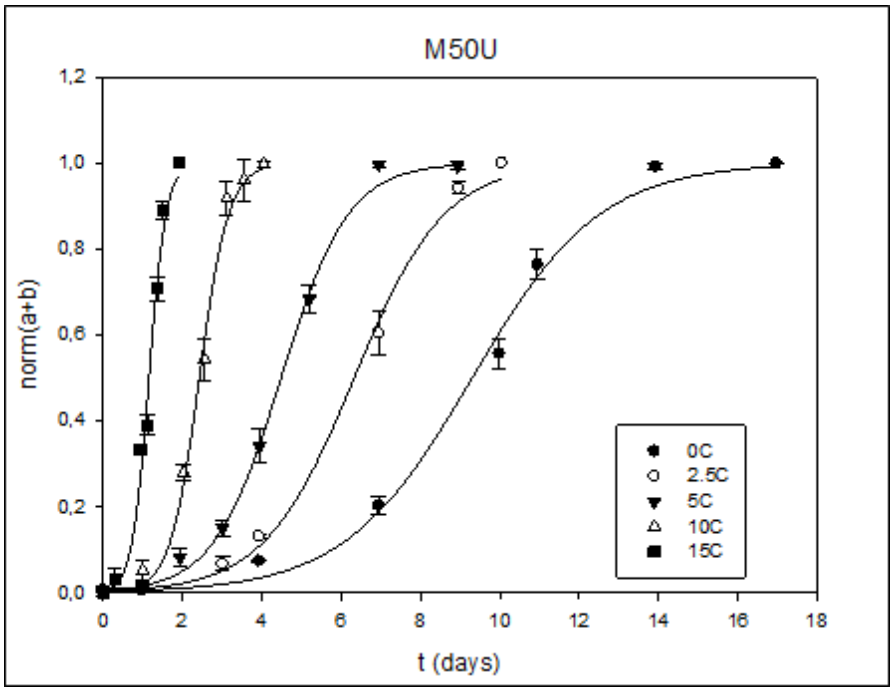
Πίνακας 4. 17 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 25U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
9.727	0.140	84.3	1.5	1.624	0.114	0.990

*S.E.= Standard Error

4.3.9 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 50U

Στο Διάγραμμα 4.35 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη M-50U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C.



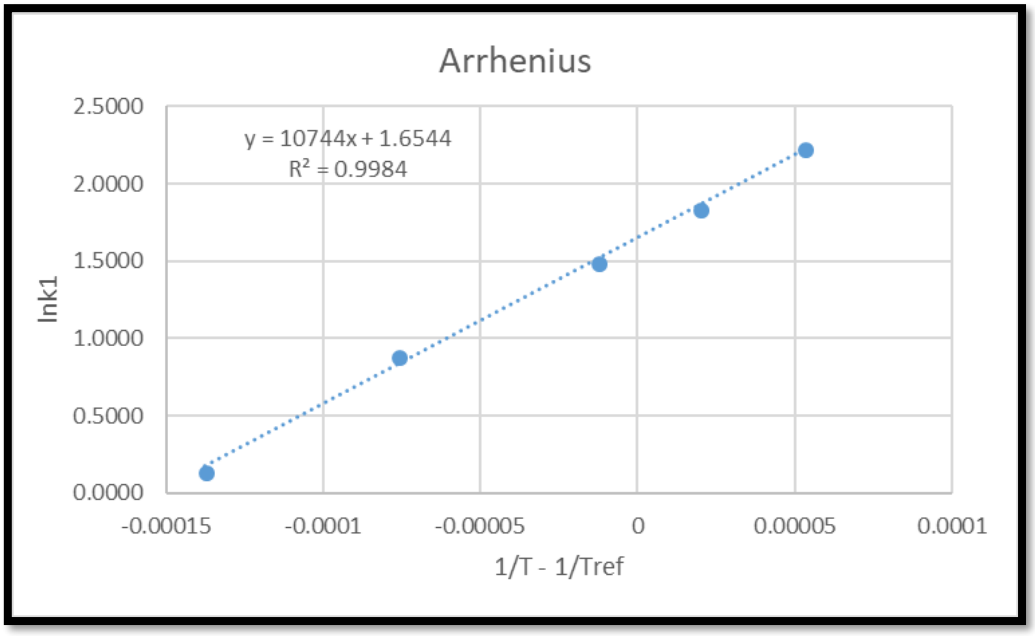
Διάγραμμα 4. 35 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη M 50U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.18).

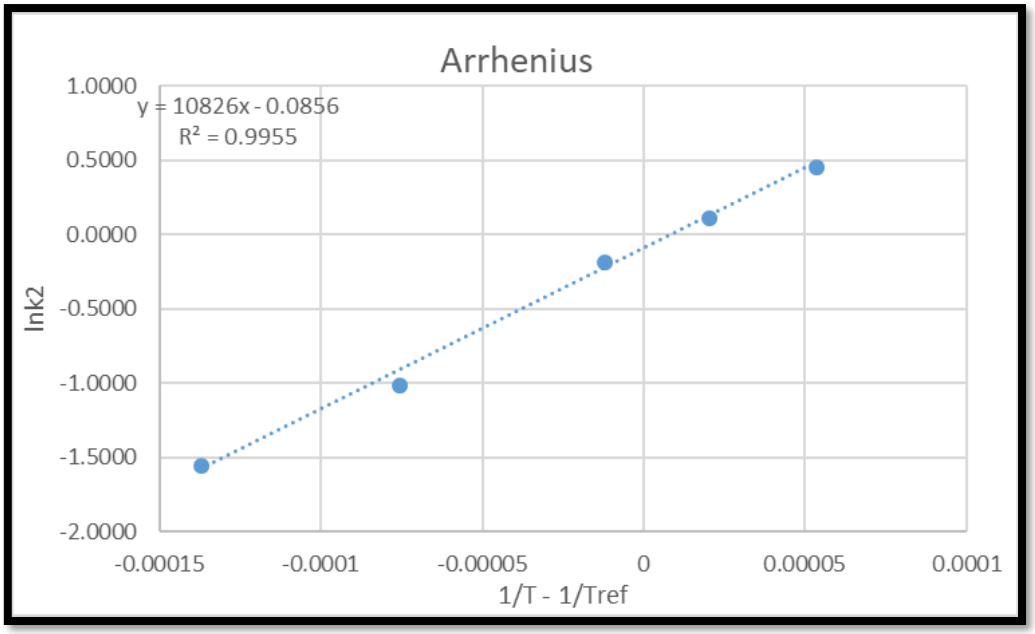
Πίνακας 4. 18 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη M 50U.

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	9.302	1.607	0.994
2.5	6.331	1.138	0.997
5	4.488	0.845	0.997
10	2.427	0.368	0.994
15	1.158	0.215	0.986

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη M 50U.



Διάγραμμα 4. 36 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 50U.



Διάγραμμα 4. 37 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_2$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 50U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη M 50U.

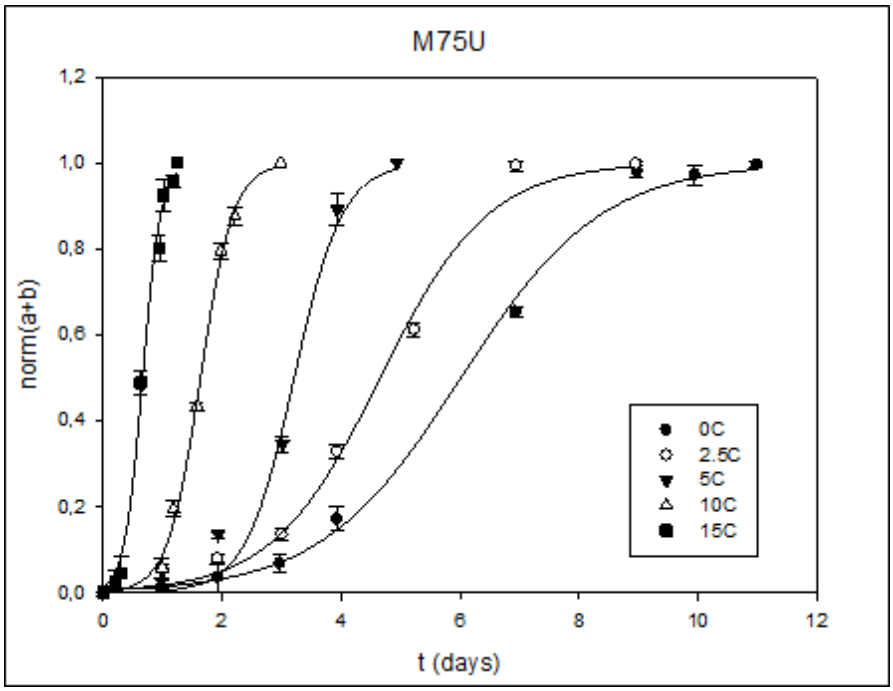
Πίνακας 4. 19 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 50U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
5.235	0.055	89.7	1.0	0.931	0.045	0.996

*S.E.= Standard Error

4.3.10 Κινητική μελέτη των ενζυμικών TTI τύπου M συγκέντρωσης 75U

Στο Διάγραμμα 4.38 παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης με το χρόνο αποθήκευσης (norm(a+b))-χρόνου (days)) για το δείκτη M-75U για θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 2.5, 5, 10, 15°C.



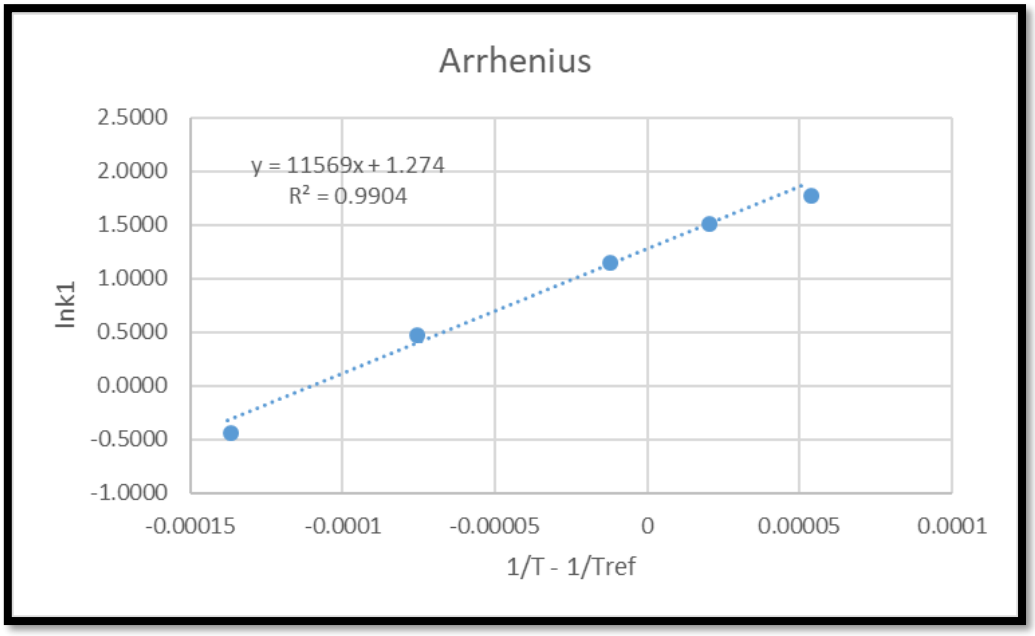
Διάγραμμα 4. 38 Μεταβολή απόκρισης norm(a+b) συναρτήσει του χρόνου για τον ενζυμικό δείκτη M 75U και για θερμοκρασίες 0 °C, 2.5 °C, 5 °C, 10 °C και 15°C.

Έπειτα, έγινε επεξεργασία των δεδομένων με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές k_1 και k_2 και οι συντελεστές συσχέτισης R^2, για την εκάστοτε θερμοκρασία (Πίνακας 4.20).

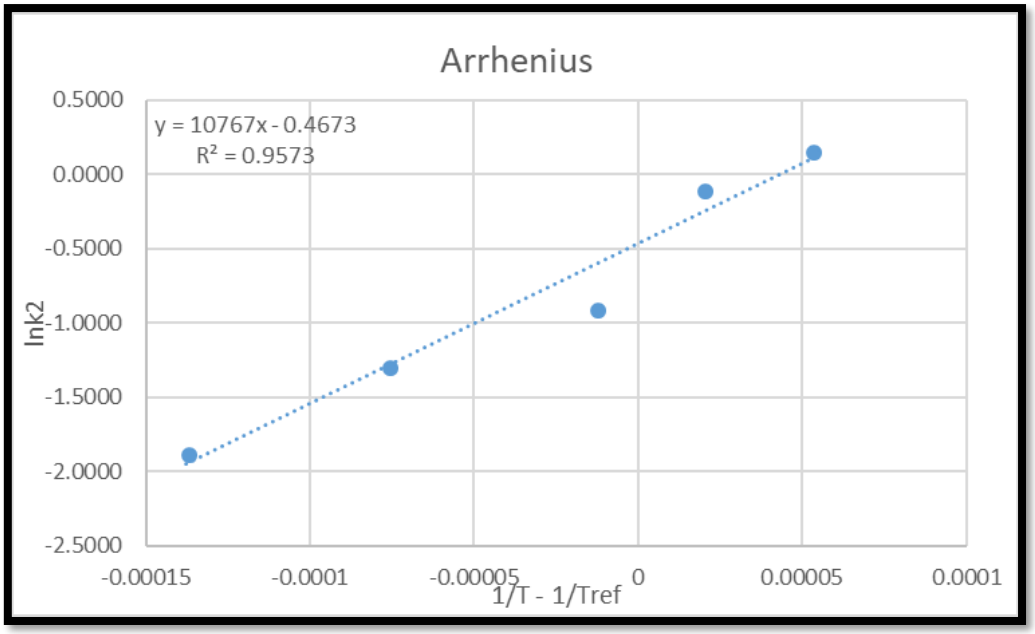
Πίνακας 4. 20 Σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 και συντελεστής συσχέτισης R^2, για ενζυμικό δείκτη M 75U.

T(°C)	k_1 (d)	k_2 (d)	R^2
0	6.013	1.178	0.997
2.5	4.656	0.906	0.993
5	3.211	0.406	0.986
10	1.636	0.275	0.997
15	0.663	0.153	0.993

Ακολούθως, παρατίθενται τα διαγράμματα Arrhenius, όπου έχει γίνει γραμμική προσαρμογή των $\ln k_1$ και των $\ln k_2$ αντίστοιχα, ως προς $[(1/T) - (1/T_{ref})]$, με θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}=4 °C, για το δείκτη M 75U.



Διάγραμμα 4. 39 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 75U.



Διάγραμμα 4. 40 Γραμμική προσαρμογή $\ln k_1$ ως προς [(1/T) – (1/Tref)], με θερμοκρασία αναφοράς Tref=4 °C, για το δείκτη M 75U.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα κινητικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Systat 10.2, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης για το δείκτη M 75U.

Πίνακας 4. 21 Κινητικά χαρακτηριστικά του ενζυμικού δείκτη M 75U.

k_{1ref} (d)	S.E.*	E_a (kJ/mol)	S.E.	k_{2ref} (d)	S.E.	R^2
3.598	0.063	94.2	1.9	0.664	0.047	0.991

*S.E.= Standard Error

Στον Πίνακα 4.22 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα κινητικά χαρακτηριστικά των TTI που μελετήθηκαν.

Πίνακας 4. 22 Κινητικά χαρακτηριστικά μελετώμενων ενζυμικών δεικτών TTI.

TTI	E_a (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
LP 100U	147.0	14.45	4.636	0.987
LP 150U	144.2	10.14	2.962	0.989
LP 300U	142.3	4.28	1.266	0.993
LP 500U	133.2	2.44	0.814	0.995
M 5U	91.2	39.82	7.865	0.991
M 10U	86.1	20.87	4.064	0.993
M 15U	86.3	13.48	2.436	0.997
M 25U	84.3	9.73	1.624	0.990
M 50U	89.7	5.24	0.931	0.996
M 75U	94.2	3.60	0.664	0.991

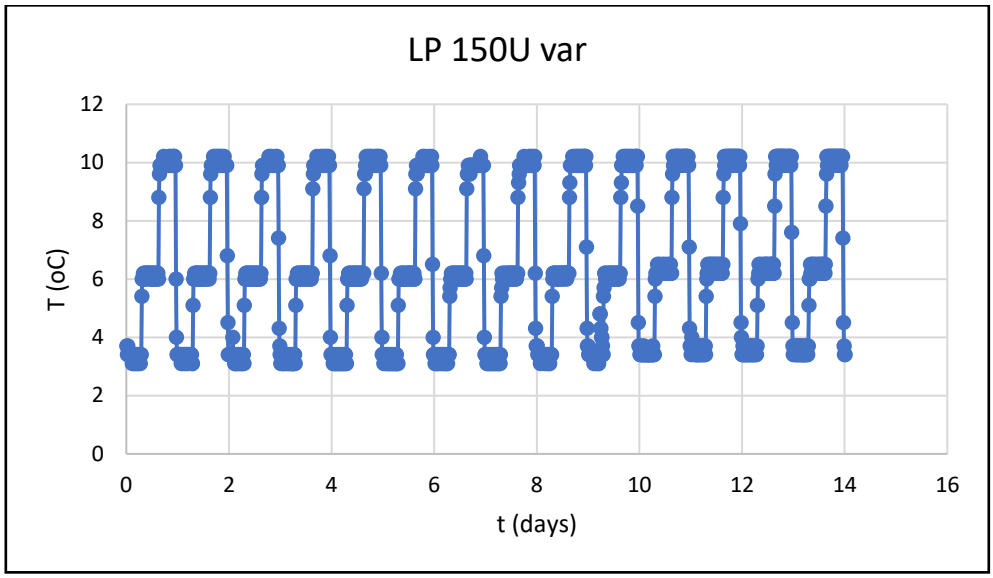
Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει πως για τα TTI του ίδιου τύπου (LP ή M) με αύξηση της συγκέντρωσης παρατηρείται μείωση των σταθερών k_{1ref} και k_{2ref}, όπως είναι αναμενόμενο, αφού είναι αντιστρόφως ανάλογες της απόκρισης norm(a+b). Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με αύξηση της θερμοκρασίας για TTI συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως στις υψηλές θερμοκρασίες 20 και 25°C οι δείκτες τύπου M εμφάνισαν μειωμένο ρυθμό αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος και κατ΄επέκταση μειωμένο ρυθμό μεταβολής χρώματος, οπότε οι συγκεκριμένες θερμοκρασίες δε συμπεριλήφθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη. Τέλος, το γεγονός ότι οι συντελεστές προσαρμογής R^2, κυμάνθηκαν σε εύρος τιμών από 0.987 έως 0.997, επιτρέπει τη θεώρηση των αποτελεσμάτων ως ικανοποιητικά αξιόπιστα.

4.4 Έλεγχος αξιοπιστίας κινητικού μοντέλου

Με στόχο τον έλεγχο της αξιοπιστίας των κινητικών μοντέλων των ενζυμικών δεικτών τύπου LP και M, πραγματοποιήθηκε πείραμα σε εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ των ενζυμικών δεικτών LP 150U και M 25U. Οι δείκτες αποθηκεύτηκαν σε μη ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, παρόμοιες των διακυμάνσεων της ψυκτικής αλυσίδας, με προφίλ έκθεσης στους 3 ^{o}C για 8 ώρες, στους 6 ^{o}C για 8 ώρες και στους 10 ^{o}C για 8 ώρες, προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο η απόκριση του δείκτη σε ισοθερμοκρασιακή συνθήκη ταυτίζεται με τη δραστική θερμοκρασία του εναλλασσόμενου προφίλ.

4.4.1 Έλεγχος αξιοπιστίας ενζυμικών TTI τύπου LP μετά από έκθεση σε εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ

Η μέση θερμοκρασιακή κατανομή (VAR), που εξήχθη από το καταγραφικό θερμοκρασίας (data logger) κατά τη διεξαγωγή του πειράματος του ενζυμικού δείκτη LP 150U, παρουσιάζεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4. 41 Θερμοκρασιακή κατανομή (VAR) του ενζυμικού δείκτη LP 150U.

Από τα δεδομένα του παραπάνω διαγράμματος και με χρήση της εξίσωσης:

$$T_{eff} = \left(\frac{Ea}{R}\right) * \frac{1}{\ln\left(\frac{\sum ki}{\sum ti}\right)} \quad (4.5)$$

όπου Ea η ενέργεια ενεργοποίησης, $ki = \exp\left(\left(-\frac{Ea}{R}\right) * \frac{1}{T}\right) * ti$ και ti: ο χρόνος λήψης μέτρησης του καταγραφικού, υπολογίστηκε η τιμή της δραστικής θερμοκρασίας T_{eff}.

Έπειτα, από τα υπολογισμένα κινητικά δεδομένα E_a, k_{1ref} και k_{2ref} του δείκτη LP 150U και από τη σχέση:

$$k_{pred} = k_{ref} * \exp\left[\left(\frac{Ea}{R}\right) * \left(\frac{1}{Teff} - \frac{1}{Tref}\right)\right] \quad (4.6)$$

με E_a = 8,314 J/mol/K και T_{ref} = 4°C προσδιορίστηκαν οι προβλεπόμενες σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_{1pred} και k_{2pred}.

Επομένως, υπολογίστηκε η προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη $F(X)_{pred}$, καθώς και τα όρια των προβλεπόμενων αποκρίσεων $F(X)_{pred,min}$ και $F(X)_{pred,max}$. Τα όρια υπολογίστηκαν, με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης, μεταξύ των lnk και $1/T-1/T_{ref}$, με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, προσδιορίζοντας τις μέγιστες και τις ελάχιστες τιμές των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη $E_{a,max}$, $k_{1ref,max}$, $k_{2ref,max}$, $E_{a,min}$, $k_{1ref,min}$ και $k_{2ref,min}$ και έπειτα τις τιμές $k_{1pred,min}$, $k_{2pred,min}$, $k_{1pred,max}$ και $k_{2pred,max}$. Έτσι υπολογίστηκαν, οι συναρτήσεις $F(X)_{pred,min}$ και $F(X)_{pred,max}$, όπου $F(X) = \frac{1}{1+exp\left(\frac{k1-t}{k2}\right)}$.

Παρατίθενται πίνακες με τα αποτελέσματα που προέκυψαν:

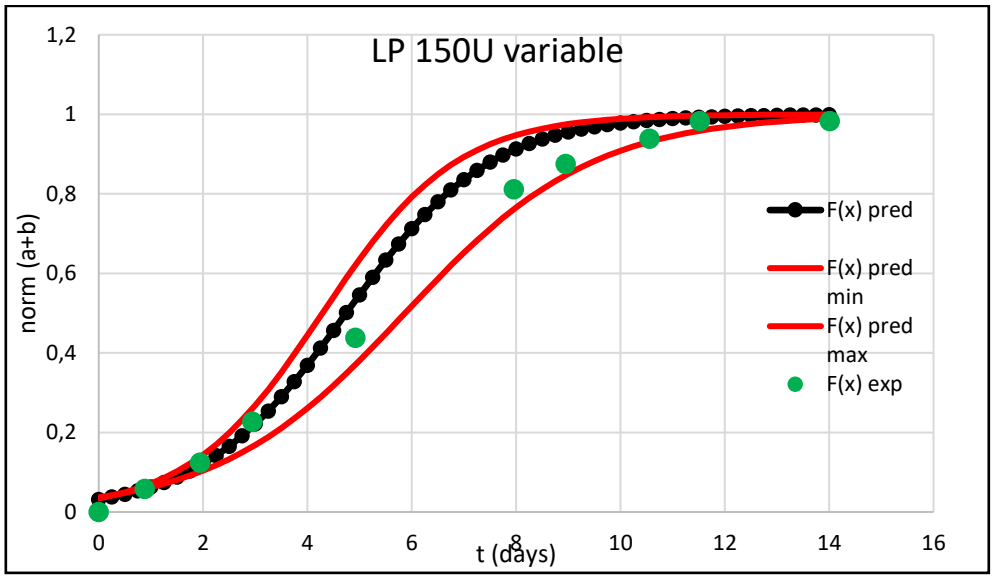
Πίνακας 4. 23 Πειραματικές και προβλεπόμενες σταθερές για τον δείκτη LP 150U.

T_{eff} (°C)	k_{1exp}(d)	k_{2exp}(d)	k_{1pred}(d)	k_{2pred} (d)
7.4	10.141	2.962	4.743	1.385

Πίνακας 4. 24 Μέγιστες και ελάχιστες προβλεπόμενες σταθερές (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) για τον δείκτη LP 150U

$k_{1pred,min}$(d)	$k_{2pred,min}$(d)	$k_{1pred,max}$(d)	$k_{2pred,max}$ (d)
4.288	1.282	5.873	1.799

Ακολουθεί το διάγραμμα με τις καμπύλες μεταβολής απόκρισης συναρτήσει του χρόνου για τα όρια των προβλεπόμενων αποκρίσεων $F(X)_{pred,min}$ και $F(X)_{pred,max}$ την προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη $F(X)_{pred}$ και την πειραματική απόκριση F(X)exp.



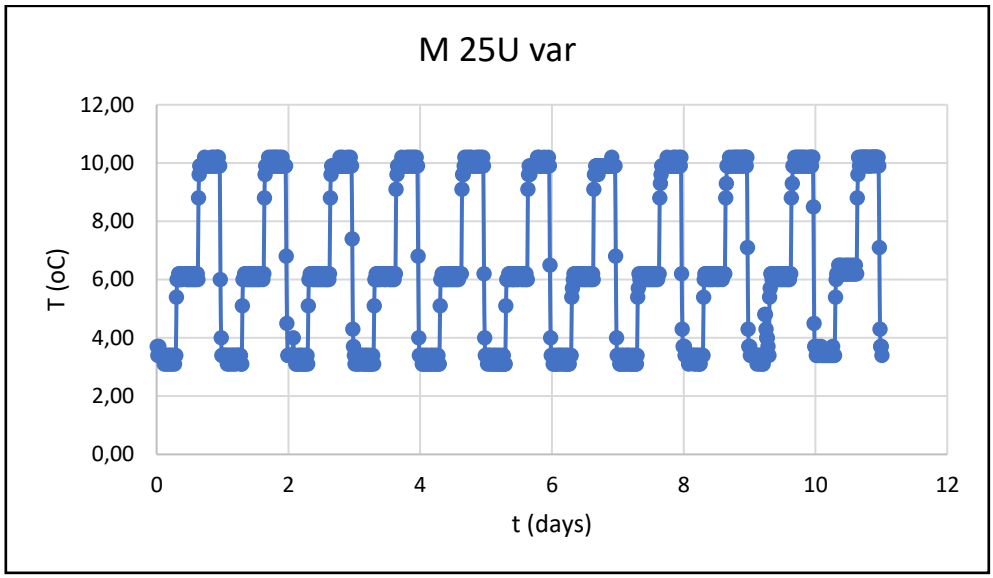
Διάγραμμα 4. 42 Απόκριση δείκτη LP 150U στο πείραμα εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ.

Από το διάγραμμα φαίνεται πως η πειραματική απόκριση είναι εντός ορίων των προβλεπόμενων αποκρίσεων και αρκετά κοντά στην προβλεπόμενη απόκριση, γεγονός που αυξάνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

4.4.2 Έλεγχος αξιοπιστίας ενζυμικών TTI τύπου M μετά από έκθεση σε εναλλασσόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ

Ομοίως έγινε η επεξεργασία και για τον ενζυμικό δείκτη M-25U. Η μέση θερμοκρασιακή κατανομή (VAR), που εξήχθη από το καταγραφικό θερμοκρασίας

(data logger) κατά τη διεξαγωγή του πειράματος του ενζυμικού δείκτη M 25U, παρουσιάζεται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4. 43 Θερμοκρασιακή κατανομή (VAR) του ενζυμικού δείκτη M 25U.

Από τα δεδομένα του παραπάνω διαγράμματος και με χρήση της (4.5), υπολογίστηκε η τιμή της δραστικής θερμοκρασίας $T_{eff.}$

Από τα υπολογισμένα κινητικά δεδομένα E_a, k_{1ref} και k_{2ref} και τη σχέση (4.6) προσδιορίστηκαν οι προβλεπόμενες σταθερές των ρυθμών απόκρισης k_{1pred} και k_{2pred}.

Επομένως, υπολογίστηκε η προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη $F(X)_{pred}$, καθώς και τα όρια των προβλεπόμενων αποκρίσεων $F(X)_{pred,min}$ και $F(X)_{pred,max}$. Τα όρια υπολογίστηκαν, με χρήση γραμμικής παλινδρόμησης, μεταξύ των lnk και $1/T-1/T_{ref}$, με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, προσδιορίζοντας τις μέγιστες και τις ελάχιστες τιμές των κινητικών χαρακτηριστικών του δείκτη $E_{a,max}$, $k_{1ref,max}$, $k_{2ref,max}$, $E_{a,min}$, $k_{1ref,min}$ και $k_{2ref,min}$ και έπειτα τις τιμές $k_{1pred,min}$, $k_{2pred,min}$, $k_{1pred,max}$ και $k_{2pred,max}$.

Έτσι υπολογίστηκαν, οι συναρτήσεις $F(X)_{pred,min}$ και $F(X)_{pred,max}$, όπου $F(X)=\frac{1}{1+exp(\frac{k1-t}{k2})}$. Παρατίθενται πίνακες με τα αποτελέσματα που προέκυψαν:

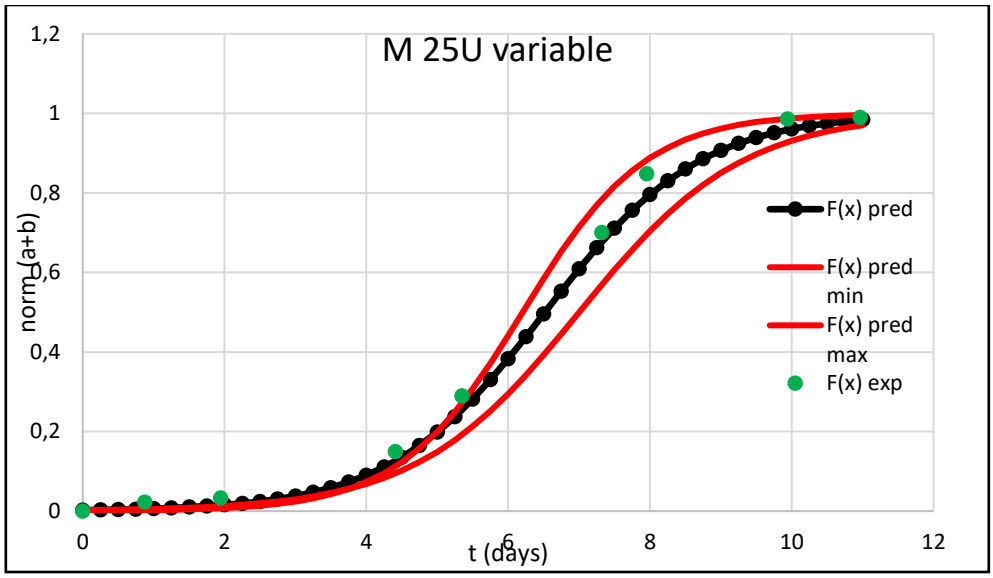
Πίνακας 4. 25 Πειραματικές και προβλεπόμενες σταθερές για τον δείκτη M 25U

T_{eff} (°C)	k_{1exp}(d)	k_{2exp}(d)	k_{1pred}(d)	k_{2pred} (d)
7.1	9,727	1,624	6,519	1,088

Πίνακας 4. 26 Μέγιστες και ελάχιστες προβλεπόμενες σταθερές (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) για τον δείκτη M 25U

$k_{1pred,min}$(d)	$k_{2pred,min}$(d)	$k_{1pred,max}$(d)	$k_{2pred,max}$ (d)
6,205	0,867	7,003	1,150

Ακολουθεί το διάγραμμα με τις καμπύλες μεταβολής απόκρισης συναρτήσει του χρόνου για τα όρια των προβλεπόμενων αποκρίσεων $F(X)_{pred,min}$ και $F(X)_{pred,max}$ την προβλεπόμενη απόκριση του δείκτη $F(X)_{pred}$ και την πειραματική απόκριση F(X)exp.



Διάγραμμα 4. 44 Απόκριση δείκτη M 25U στο πείραμα εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ.

Από το διάγραμμα προκύπτει πως τα αποτελέσματα του πειράματος μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα, καθώς η καμπύλη της πειραματικής απόκρισης βρίσκεται εντός ορίων των καμπυλών μέγιστης και ελάχιστης προβλεπόμενης απόκρισης και σχεδόν ταυτίζεται με την προβλεπόμενη απόκριση.

4.5 Διάρκεια ζωής των ενζυμικών TTI

Στον Πίνακα 4.27 , υπολογίζεται ο πειραματικός χρόνος απόκρισης (response time) των TTI στις διάφορες θερμοκρασίες διεξαγωγής των πειραμάτων, με χρήση της εξίσωσης $f(x) = \frac{\alpha}{1+e^{\frac{k1-t}{k2}}}$.

Οι χρόνοι ζωής υπολογίστηκαν θέτοντας στην εξίσωση α=1 και f(x)=norm(a+b)=0.8, τιμή που αντιστοιχεί στο τελικό σημείο της εκθετικής φάσης.

Πίνακας 4. 27 Πειραματική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου LP

LP-TYPE				
T (°C)	LP 100U	LP 150U	LP 300U	LP 500U
0	48.20	35.18	15.71	8.65
2.5	29.45	19.67	8.14	4.85
5	19.30	14.31	5.17	3.02
10	6.41	4.70	1.80	1.05
15	1.41	1.12	0.52	0.29
20	0.65	0.61	0.18	0.14
25	0.20	0.16	0.07	0.06

Προκύπτει πως αυξανομένης της συγκέντρωσης του δείκτη TTI, τόσο πιο σύντομος είναι ο χρόνος λήξης τους, αφού είναι ταχύτερη η αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος.

Πίνακας 4. 28 Πειραματική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου M

M-TYPE						
T (°C)	M 5U	M 10U	M 15U	M 25U	M 50U	M 75U
0	86.26	43.51	29.31	20.05	11.53	7.65
2.5	67.59	32.84	20.51	14.39	7.91	5.91
5	48.10	24.35	16.30	10.16	5.66	3.77
10	19.59	11.24	7.78	6.33	2.94	2.02
15	11.14	6.43	3.93	2.69	1.45	0.88

Αντίστοιχα, στους δείκτες TTI τύπου M, αυξανομένης της συγκέντρωσης του δείκτη TTI, τόσο πιο σύντομος είναι ο χρόνος λήξης τους, λόγω της ταχύτερης αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος.

4.6 Εξαγωγή συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης των ενζυμικών TTI

Για τη δυνατότητα επιλογής TTI κατάλληλης συγκέντρωσης για την παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων κατά τη διακίνησή τους στην ψυκτική αλυσίδα, για τον κάθε ένα από τους δύο τύπους ενζυμικών TTI που μελετήθηκαν (LP και M), προσδιορίστηκε ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο το οποίο εκφράζει την εξάρτηση της απόκρισης των ενζυμικών δεικτών από τη συγκέντρωση, το χρόνο και τη θερμοκρασία αποθήκευσης.

Η συγκεκριμένη εξίσωση προκύπτει αντικαθιστώντας στη συνάρτηση απόκρισης norm(a+b) = $\frac{1}{1+e^{\frac{k1-t}{k2}}}$, τις σταθερές k_1 και k_2 με τις αντίστοιχες εξισώσεις Arrhenius.

Άρα, προκύπτει: $$X = \frac{1}{1+e^{\left\{\frac{k1ref(C=1U)C^{-a}*\exp[\frac{Ea}{R}(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref})]-t}{k2ref(C=1U)*C^{-b}*\exp[\frac{Ea}{R}\left(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref}\right)]}\right\}}} \quad (4.7).$$

Με χρήση του προγράμματος Systat 10.2 προσδιορίστηκαν οι παράμετροι με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης. Παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν στους ακόλουθους πίνακες.

Παράμετροι συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης TTI τύπου LP

Πίνακας 4. 29 Παράμετροι Εξίσωσης 4.7 για τα ενζυμικά τύπου LP.

		S.E.*
$k_{1ref\ (C=1U)}$ (d)	1915.7	198.3
A	1.062	0.019
E_a (kJ/mol)	143	0.844
$k_{2ref\ (C=1U)}$ (d)	529.7	156
b	1.034	0.055
R^2	0.988	

*S.E.= Standard Error

Παράμετροι συνολικού μαθηματικού μοντέλου απόκρισης TTI τύπου M

Πίνακας 4. 30 Παράμετροι Εξίσωσης 4.7 για τα ενζυμικά TTI τύπου M.

		S.E.*
$k_{1ref\ (C=1U)}$ (d)	159.1	2.9
A	0.880	0.006
E_a (KJ/mol)	88.2	0.657
$k_{2ref\ (C=1U)}$ (d)	34.363	2.962
b	0.927	0.029
R^2	0.990	

*S.E.= Standard Error

4.7 Στατιστική επεξεργασία και μελέτη αξιοπιστίας μαθηματικών μοντέλων

Με χρήση των συνολικών μαθηματικών μοντέλων που προσδιορίστηκαν, στους Πίνακες 4.31 και 4.32, παρατίθενται οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής (days) στις μελετώμενες θερμοκρασίες αποθήκευσης για τους δείκτες LP και M, αντίστοιχα.

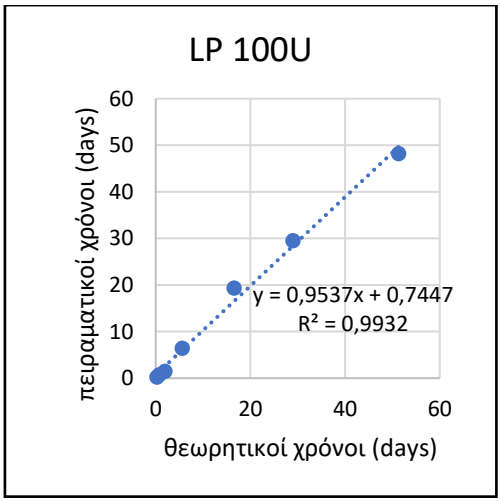
Πίνακας 4. 31 Θεωρητική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου LP.

LP-TYPE				
T (°C)	LP 100U	LP 150U	LP 300U	LP 500U
0	51.31	33.47	16.13	9.42
2.5	28.98	18.91	9.11	5.32
5	16.54	10.79	5.20	3.04
10	5.55	3.62	1.74	1.02
15	1.93	1.26	0.61	0.36
20	0.70	0.46	0.22	0.13
25	0.26	0.17	0.08	0.05

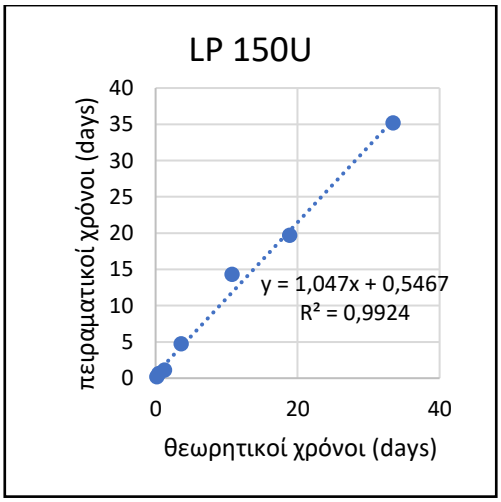
Πίνακας 4. 32 Θεωρητική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου M

M-TYPE						
T (°C)	M 5U	M 10U	M 15U	M 25U	M 50U	M 75U
0	86.38	46.61	32.49	20.62	11.13	7.76
2.5	60.73	32.77	22.85	14.50	7.83	5.46
5	42.97	23.19	16.16	10.26	5.54	3.86
10	21.91	11.82	8.24	5.23	2.82	1.97
15	11.44	6.17	4.30	2.73	1.47	1.03

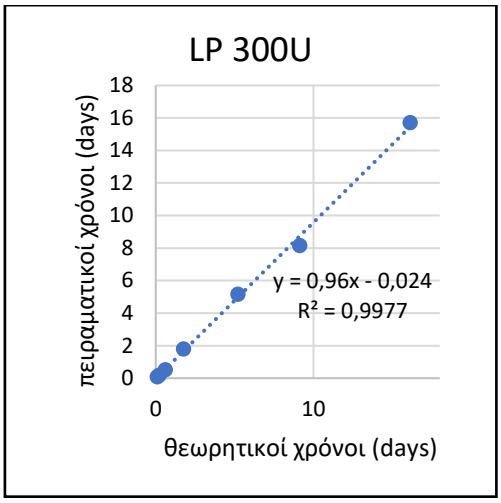
Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί η αξιοπιστία των μαθηματικών μοντέλων κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα συσχέτισης μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής, στα οποία έγινε γραμμική προσαρμογή και παρατίθενται ακολούθως. Όσο μικρότερη είναι η απόκλιση θεωρητικών και πειραματικών χρόνων ζωής, τόσο πιο κοντά στη μονάδα είναι η κλίση της γραμμής τάσης.



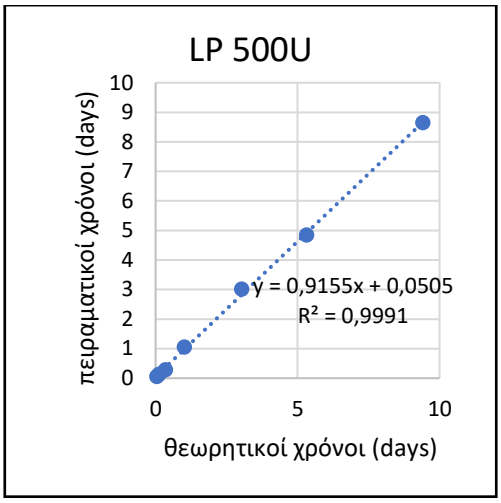
1.



2.



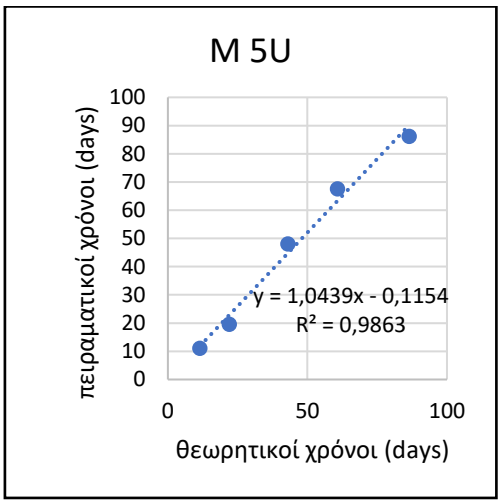
3.



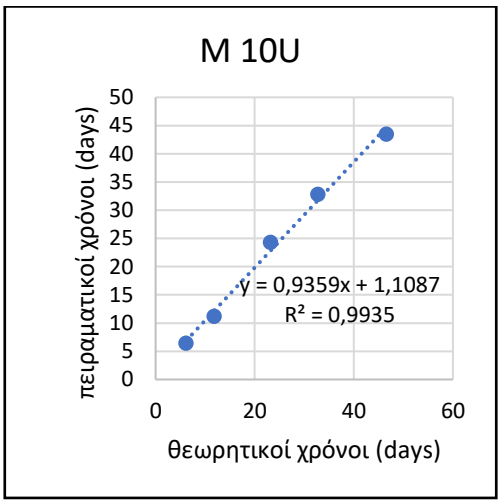
4.

Σχήμα 4.1 (1-4). Διαγράμματα συσχέτισης πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής ενζυμικών δεικτών τύπου LP.

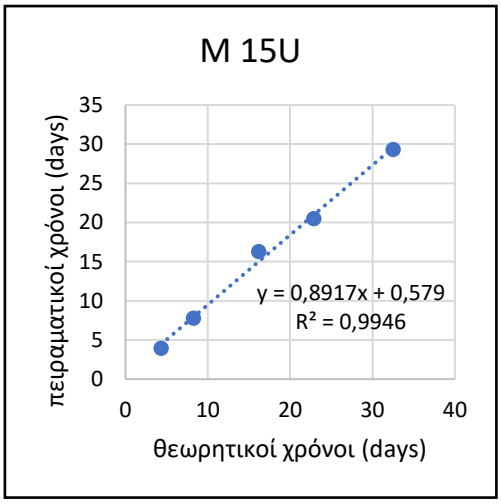
Για τα TTI τύπου LP προέκυψε ότι οι κλίσεις έχουν τιμές πολύ κοντά στη μονάδα, άρα δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση μεταξύ πειραματικών τιμών και θεωρητικών, όπως προέκυψαν από τα συνολικά μαθηματικά κινητικά μοντέλα, που προσδιορίστηκαν παραπάνω. Ομοίως και για τα τύπου M, όπως φαίνεται στα διαγράμματα και στο συγκεντρωτικό πίνακα με τις κλίσεις που ακολουθούν.



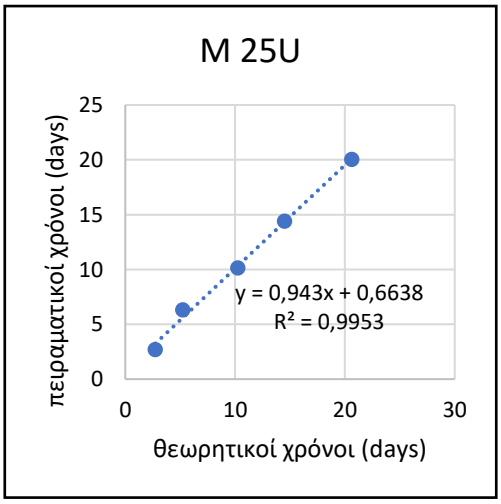
5.



6.

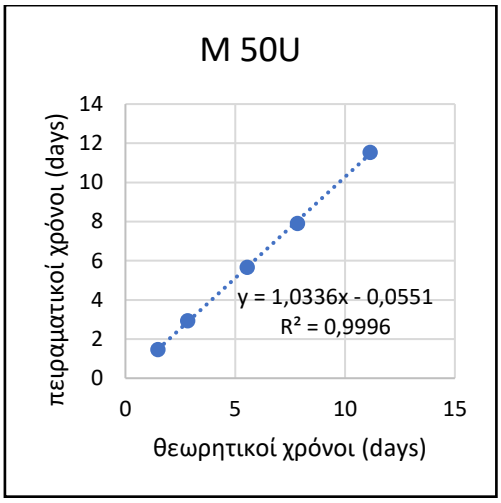


7.

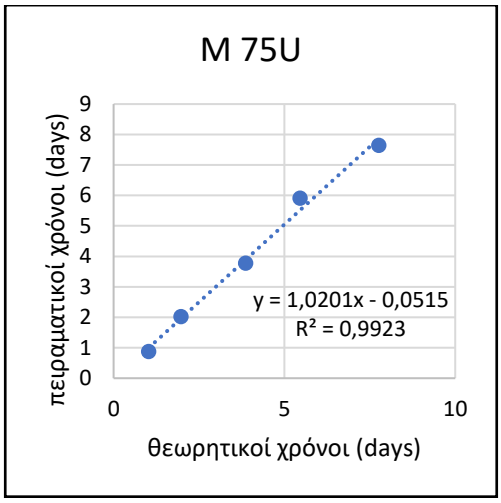


8.

9.



10.



Σχήμα 4.2 (5-10). Διαγράμματα συσχέτισης πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής ενζυμικών δεικτών τύπου Μ.

Παρατίθεται ο συγκεντρωτικός πίνακας με τις κλίσεις συσχέτισης πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής των ενζυμικών δεικτών.

Πίνακας 4. 33 Κλίσεις ευθειών συσχετισμού πειραματικών και θεωρητικών χρόνων ζωής TTI.

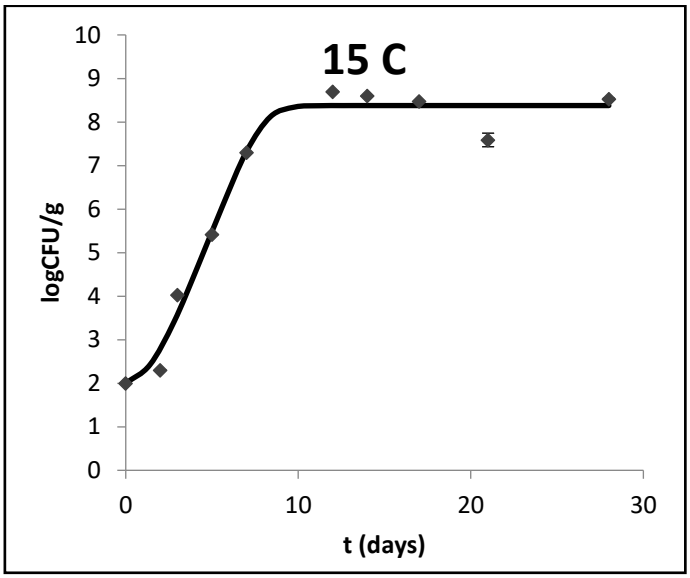
TTI	Κλίση
LP 100U	0,9537
LP 150U	1,0470
LP 300U	0,9600
LP 500U	0,9155
M 5U	1,0439
M 10U	0,9359
M 15U	0,8917
M 25U	0,9430
M 50U	1,0336
M 75U	1,0201

Επομένως, συμπεραίνεται πως τόσο για τους ενζυμικούς δείκτες τύπου LP συγκεντρώσεων 100, 150, 300 και 500U, όσο και για τους ενζυμικούς δείκτες τύπου M συγκεντρώσεων 5, 10, 15, 25, 50 και 75U, οι κλίσεις είναι πολύ κοντά στη μονάδα, άρα δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση μεταξύ πειραματικών τιμών και θεωρητικών, όπως προέκυψαν από τα συνολικά μαθηματικά κινητικά μοντέλα.

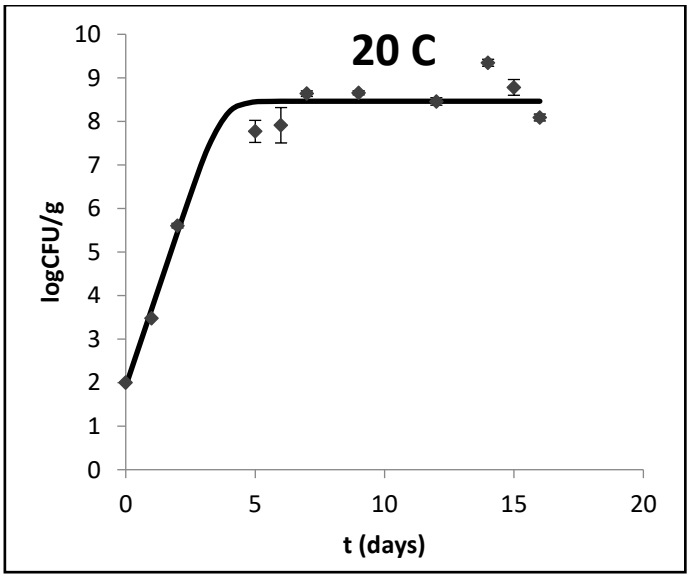
Κεφάλαιο 5: Κινητική μελέτη ανάπτυξης *Morganella morganii* και παραγωγής ισταμίνης σε τόνο

5.1 Μελέτη μικροβιολογικής ανάπτυξης *Morganella morganii*

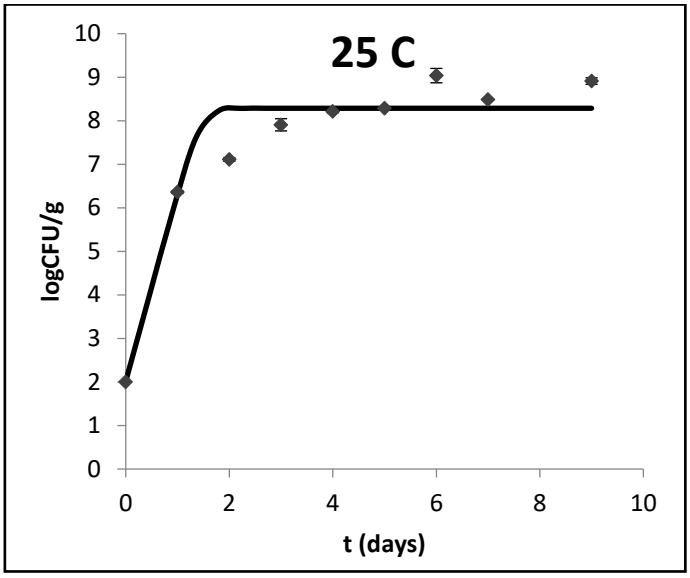
Τα πειραματικά δεδομένα ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* στις θερμοκρασίες 15, 20 και 25 ^{o}C προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Baranyi με χρήση του προγράμματος dmfit και παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες ανάπτυξης, καθώς και οι ρυθμοί ανάπτυξης που προσδιορίστηκαν.



Διάγραμμα 5. 1 Καμπύλη ανάπτυξης *Morganella morganii* στους 15 ^{o}C.



Διάγραμμα 5. 2 Καμπύλη ανάπτυξης *Morganella morganii* στους 20 ^{o}C.



Διάγραμμα 5. 3 Καμπύλη ανάπτυξης *Morganella morganii* στους 25 °C.

Στους 5°C και στους 10°C δεν παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη του *Morganella morganii* σε διάστημα ενός μήνα.

Στο πείραμα, όπως φαίνεται στα ανωτέρω διαγράμματα, σχηματίστηκε πληθυσμός 8 logCFU/g στις 8 ημέρες αποθήκευσης στους 15 °C και 8 logCFU/g στις 2 ημέρες αποθήκευσης στους 25 °C. Σε αντίστοιχη έρευνα ο *Morganella morganii* αναπτύχθηκε σε πληθυσμό 8 logCFU/g στις 7 ημέρες αποθήκευσης στους 15 °C και σε πληθυσμό 9 logCFU/g στις 3 ημέρες αποθήκευσης του στους 25°C (Nei,2014).

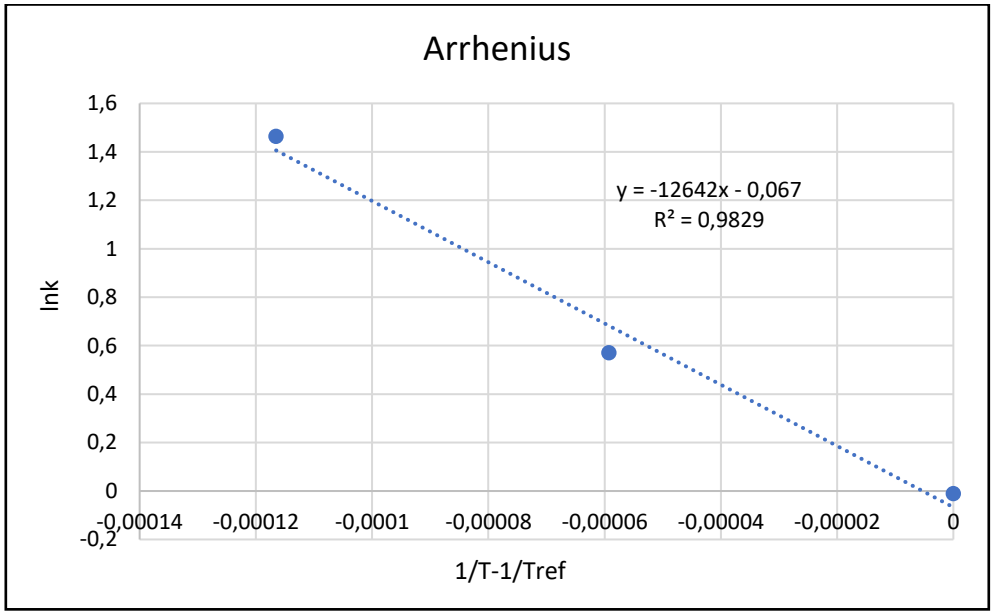
Παρατίθενται οι ρυθμοί ανάπτυξης του *Morganella morganii* σε θερμοκρασίες 15°C, 20°C και 25°C.

Πίνακας 5. 1 Ρυθμοί ανάπτυξης *Morganella morganii.*

Θερμοκρασία (°C)	15	20	25
k (d^{-1})	0.988	1.768	4.320
S.E.*	0.211	0.348	0.940

*Standard Error

Προέκυψε πως στις υψηλές θερμοκρασίες (20°C και 25°C) ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι σημαντικά υψηλότερος σε σχέση με τις χαμηλότερες. Ακολουθεί το διάγραμμα της εξίσωσης Arrhenius μετά από γραμμικοποίηση, όπου προσδιορίστηκαν η ενέργεια ενεργοποίησης E_a και ο ρυθμός μικροβιακής ανάπτυξης k_{ref} στη θερμοκρασία αναφοράς (15°C).



Διάγραμμα 5. 4 Μοντέλο Arrhenius για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Morganella morganii*.

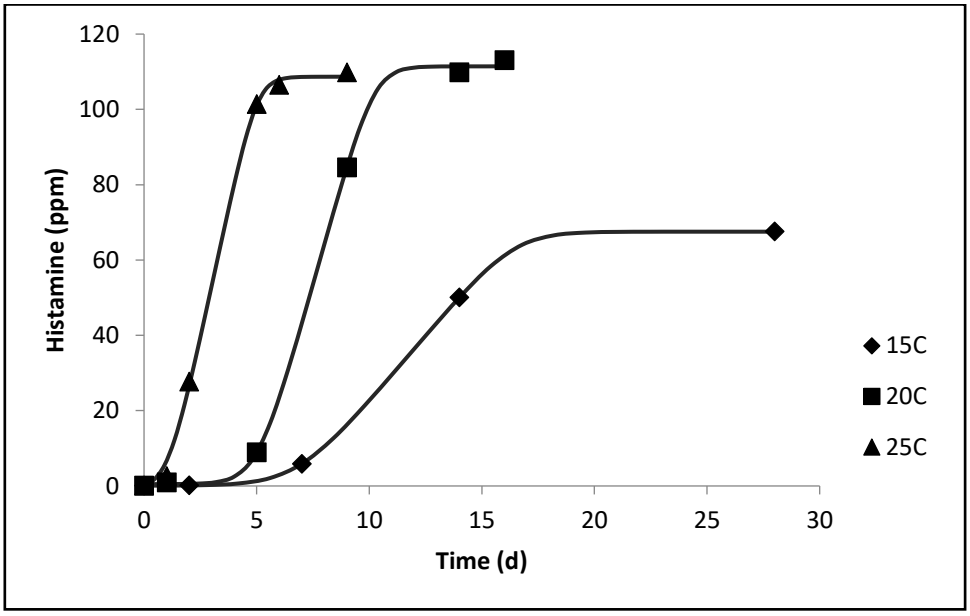
Από την εξίσωση που προέκυψε με γραμμική προσαρμογή, υπολογίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης του μικροοργανισμού:

Πίνακας 5. 2 Κινητικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης *Morganella morganii*.

E_a (KJ/mol)	105,1
K_{ref} (d^{-1})	0.935
R^2	0.983

5.2 Μελέτη σχηματισμού ισταμίνης στον τόνο

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ισταμίνης που σχηματίστηκε σε τόνο που εμβολιάστηκε με *Morganella morganii* και συντηρήθηκε σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες 15, 20 και 25°C, με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Baranyi, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα dmfit και παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Διάγραμμα 5. 5 Καμπύλη παραγωγής ισταμίνης στους 15,20 και 25°C.

Πίνακας 5. 3 Λανθάνουσα φάση και ρυθμός παραγωγής ισταμίνης σε θερμοκρασίες 15,20 και 25°C.

T (°C)	rate (d^{-1})	lag (d)
15	7.044	6.839
20	21.428	5.031
25	27.807	1.097

Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι χρόνοι που χρειάστηκε η ισταμίνη να φτάσει στο κατώτερο όριο των 50 ppm και το όριο των 100 ppm.

Πίνακας 5. 4 Απαιτούμενος χρόνος (days) για σχηματισμό ισταμίνης 50 και 100 ppm.

	ppm histamine	
	50	**100**
15 °C	14.6	20.8
20 °C	6.4	9.5
25 °C	2.9	4.5

Στους 15°C η συγκέντρωση της ισταμίνης έφτασε στα 50 ppm στις 14,5 ημέρες, στους 20°C στις 6,4 ημέρες και στους 25 °C στις 2,9 ημέρες, με αρχική ισταμίνη στο χρόνο to=0 days 0,051 ppm.

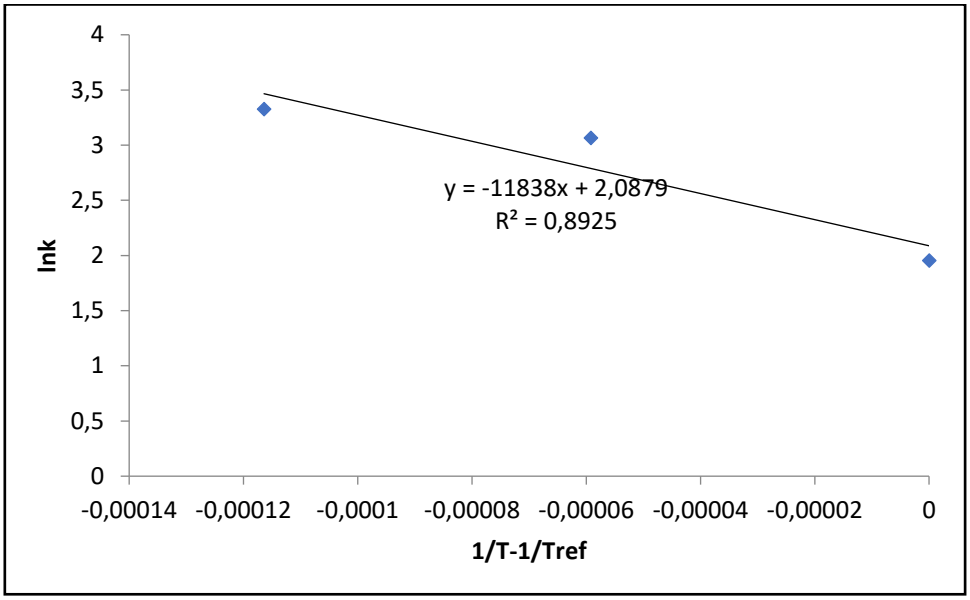
Βιβλιογραφικά σε αντίστοιχη έρευνα για το μακρύπτερο τόνο (*Thunnus alalunga*), η βέλτιστη θερμοκρασία για το σχηματισμό της ισταμίνης ήταν οι 25 °C. Προέκυψε ότι στους 25°C, η περιεκτικότητα ισταμίνης έφτασε τα 71,4 mg/kg μετά από 7 ημέρες (Kim et al, 1999).

Επιπλέον, σε ακόμη μία αντίστοιχη έρευνα που διεξήχθη σε δείγματα φρέσκου τόνου (*Thunnus albacares*), σε πείραμα 17 ημερών δεν παρατηρήθηκε καθόλου σχηματισμός ισταμίνης στους 0°C, ενώ στους 8°C και στους 20°C, η περιεκτικότητα ισταμίνης έφτασε τα μη αποδεκτά επίπεδα συγκέντρωσης 50ppm μετά τις 4 και τη 1 ημέρα αντίστοιχα (Guizani et al, 2005). Ο τόνος ανήκει στα ψάρια, που περιέχουν σημαντική ποσότητα ιστιδίνης στη σάρκα του και εμφανίζουν διαφορές στη συγκέντρωση της ακόμη και ανάμεσα στα διάφορα μέρη του ίδιου ψαριού (EFSA,2011).

Ο σχηματισμός ισταμίνης είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την παρουσία των υπεύθυνων βακτηρίων για την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε τόνο στους 20 ^{o}C προέκυψε πως ο μικροοργανισμός *Morganella morganii*, οδήγησε στο σχηματισμό ανιχνεύσιμης ισταμίνης μόλις μετά από 18 ώρες. Ωστόσο, παρότι η παρουσία του μικροοργανισμού οδηγεί στο σχηματισμό ισταμίνης, προκειμένου να αναπτυχθεί σημαντική ποσότητα σε σύντομο χρονικό διάστημα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, απαιτούνται και άλλοι παράγοντες, όπως η παρουσία ψευδομονάδων, οι οποίες απελευθερώνουν την ιστιδίνη από τις πρωτεΐνες του τόνου (Lopez-Sabater et al, 1995).

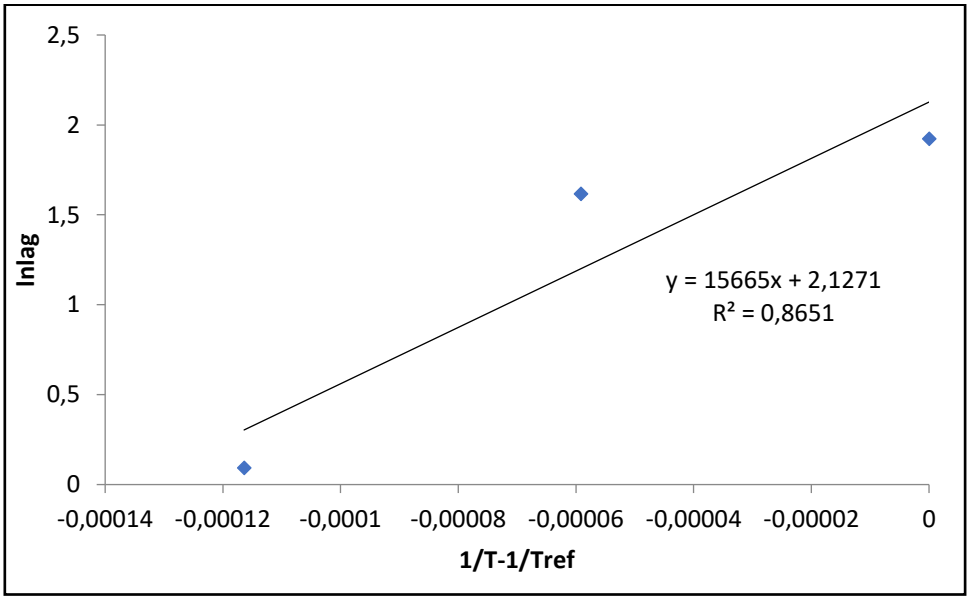
Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι καμπύλες σχηματισμού ισταμίνης και ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* εμφάνισαν μέγιστη τιμή σχεδόν στις ίδιες ημέρες. Επομένως, το μη αποδεκτό όριο συγκέντρωσης σχηματιζόμενης ισταμίνης παρατηρείται περίπου 1-2 ημέρες μετά το χρόνο, που απαιτήθηκε για να φτάσει η ανάπτυξη του υπεύθυνου μικροοργανισμού το μέγιστο πληθυσμό του.

Κατασκευάζονται τα διαγράμματα της εξίσωσης Arrhenius για το ρυθμό παραγωγής ισταμίνης και για τη λανθάνουσα φάση, από την οποία υπολογίζονται οι τιμές ενέργειας ενεργοποίησης E_a και ρυθμού k_{ref} στη θερμοκρασία αναφοράς (15°C).



Διάγραμμα 5. 6 Μοντέλο Arrhenius για το ρυθμό ανάπτυξης της ισταμίνης.

Από όπου προκύπτει E_a = 98.4 KJ/mol και k_{ref}=8.068 d^{-1}.



Διάγραμμα 5. 7 Μοντέλο Arrhenius για τη λανθάνουσα φάση της ισταμίνης.

Από όπου προκύπτει E_a = 130.2 KJ/mol και k_{ref}=8.391 d^{-1}.

Κεφάλαιο 6: Διερεύνηση για την επιλογή κατάλληλου TTI για την παρακολούθηση του ρυθμού παραγωγής ισταμίνης σε τόνο

6.1 Εισαγωγή

Στα κεφάλαια 4 και 5 παρουσιάστηκε η κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών TTI καθώς και της παραγωγής ισταμίνης σε τόνο, αντίστοιχα. Παρουσιάστηκαν μαθηματικά μοντέλα μέσω των οποίων υπολογίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά E_a και k_{ref} και οι χρόνοι ζωής τόσο των TTI όσο και του σχηματισμού ισταμίνης στα όρια των 50 και 100 ppm. Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η διερεύνηση που πραγματοποιήθηκε για την επιλογή κατάλληλου TTI για την παρακολούθηση της ασφάλειας του τόνου.

Το τελικό σημείο των ενζυμικών TTI αντιστοιχεί στο τέλος της εκθετικής φάσης σε τιμή απόκρισης X=norm(a+b)=0.8 και για τον σχηματισμό ισταμίνης τα κατώτατα όρια είναι 50 ppm στις Η.Π.Α και 100 ppm στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

6.2 Επιλογή κατάλληλων TTI για την παρακολούθηση της ασφάλειας τόνου

Η επιλογή κατάλληλου δείκτη TTI για τη μελέτη τροφίμου, προϋποθέτει τη συσχέτιση των χρόνων ζωής των TTI με τους χρόνους υποβάθμισης των παραμέτρων ποιότητας και ασφάλειας του τροφίμου. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ενέργεια ενεργοποίησης E_a και οι χρόνοι ζωής του μελετώμενου τροφίμου και των TTI να είναι παραπλήσιοι, δηλαδή E_a(τροφίμου) = E_a(TTI) και k_{ref}(τροφίμου) = k_{ref}(TTI). Έχει αποδειχθεί πως διαφορά στις ενέργειες ενεργοποίησης τροφίμου και TTI μικρότερη από 40 kJ/ mol, σημαίνει διαφορά στις δραστικές θερμοκρασίες T_{eff} από 0,4 έως 1,8^{o}C, που σημαίνει περίπου 15% σφάλμα απόκλισης, το οποίο είναι αποδεκτό σε πολλές περιπτώσεις (Taoukis, 2001).

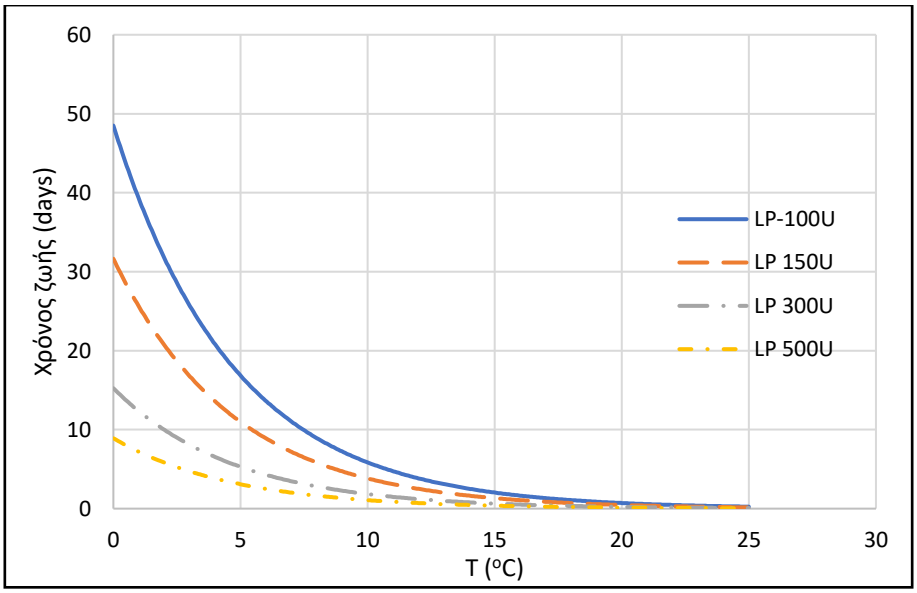
Σκοπός της εργασίας είναι η συσχέτιση της μεταβολής της απόκρισης ενζυμικών TTI με την παραγωγή ισταμίνης σε τόνο (*Thunnus alalunga*), η οποία σε επίπεδα που θεωρούνται μη αποδεκτά θα μπορούσε να οδηγήσει σε σκομβροειδή δηλητηρίαση.

Στον Πίνακα 6.1 παρατίθενται οι ενέργειες ενεργοποίησης των TTI τύπου LP και τύπου M που μελετήθηκαν, της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και του σχηματισμού ισταμίνης στον τόνο.

Πίνακας 6. 1 Ενέργειες ενεργοποίησης της απόκρισης των TTI τύπου LP και τύπου M, της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και του σχηματισμού ισταμίνης στον τόνο.

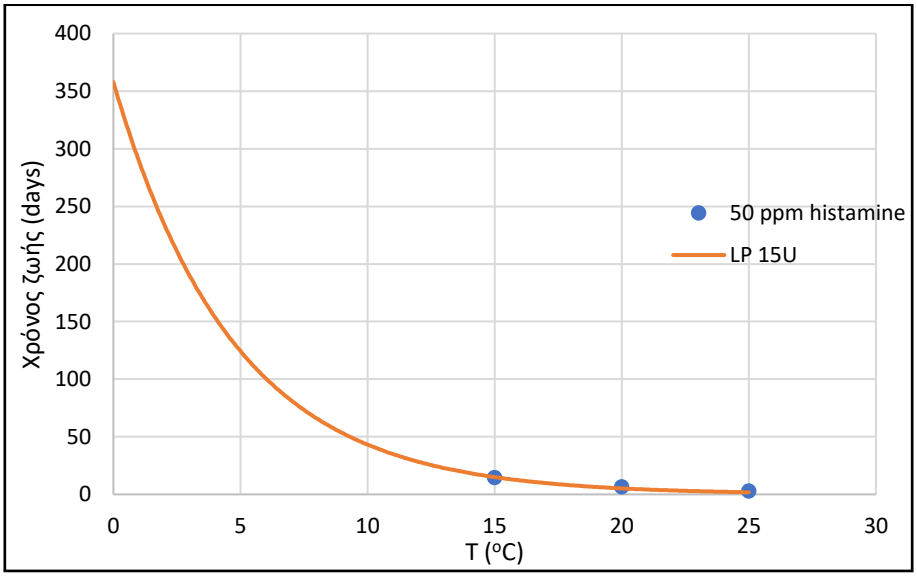
	LP-type TTI	M-type TTI	*Morganella morganii*	Ισταμίνη (rate)	Ισταμίνη (lag phase)
E_a (kJ/mol)	143.0	88.2	105.1	98.4	130.2

Στο Διάγραμμα 6.1 παρουσιάζονται οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής των μελετηθέντων δεικτών τύπου LP σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0-25ºC.



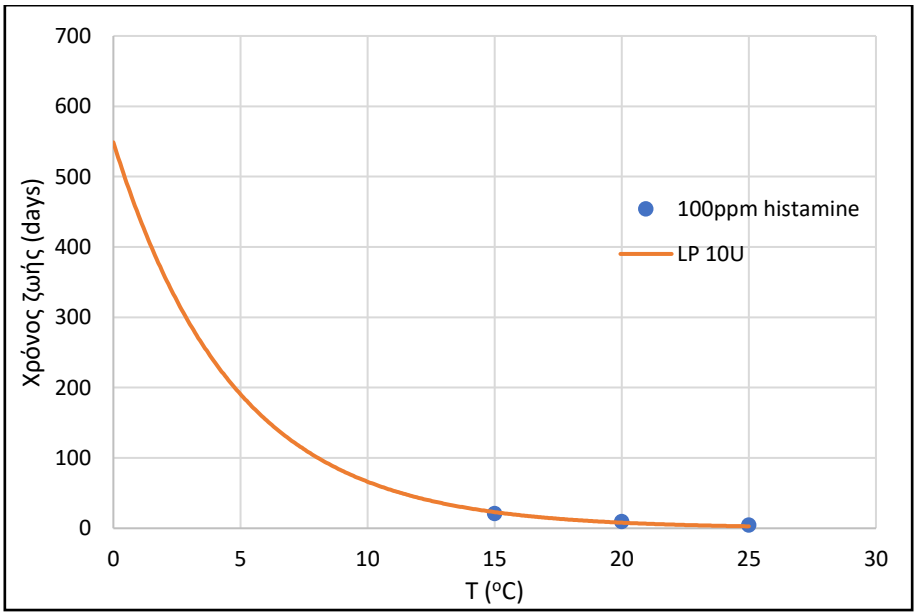
Διάγραμμα 6. 1 Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών δεικτών TTI τύπου LP.

Στα Διαγράμματα 6.2 και 6.3 παρουσιάζεται η επιλογή των κατάλληλων ενζυμικών δεικτών τύπου LP, για το σχηματισμό 50 και 100 ppm ισταμίνης, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 6. 2 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου LP και συγκέντρωσης 15U για το σχηματισμό 50 ppm ισταμίνης σε τόνο.

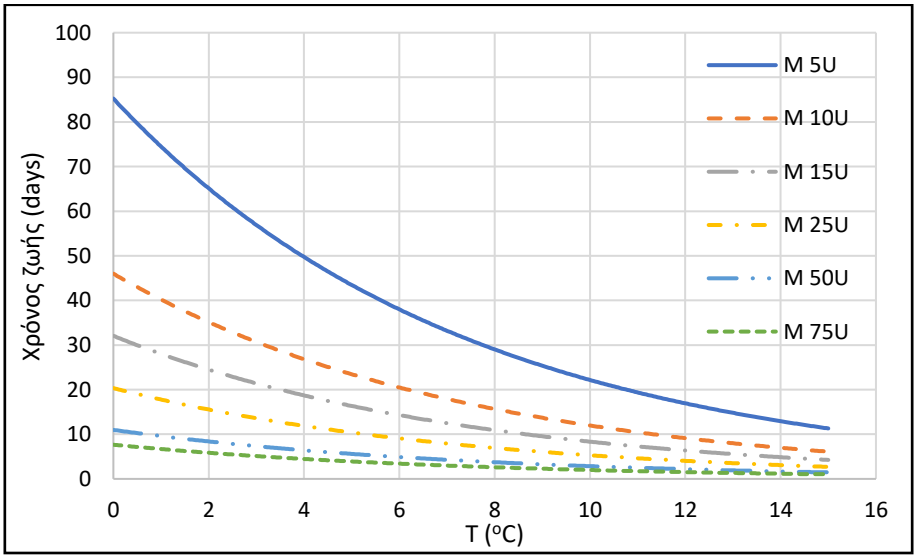
Προκύπτει ότι την καλύτερη συσχέτιση για το χρόνο που απαιτείται για το σχηματισμό 50 ppm ισταμίνης επιτυγχάνει ο δείκτης LP 15U. Η απόκριση του δείκτη ακολουθεί ικανοποιητικά το σχηματισμό ισταμίνης στον τόνο.



Διάγραμμα 6. 3 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου LP και συγκέντρωσης 10U για το σχηματισμό 100 ppm ισταμίνης σε τόνο.

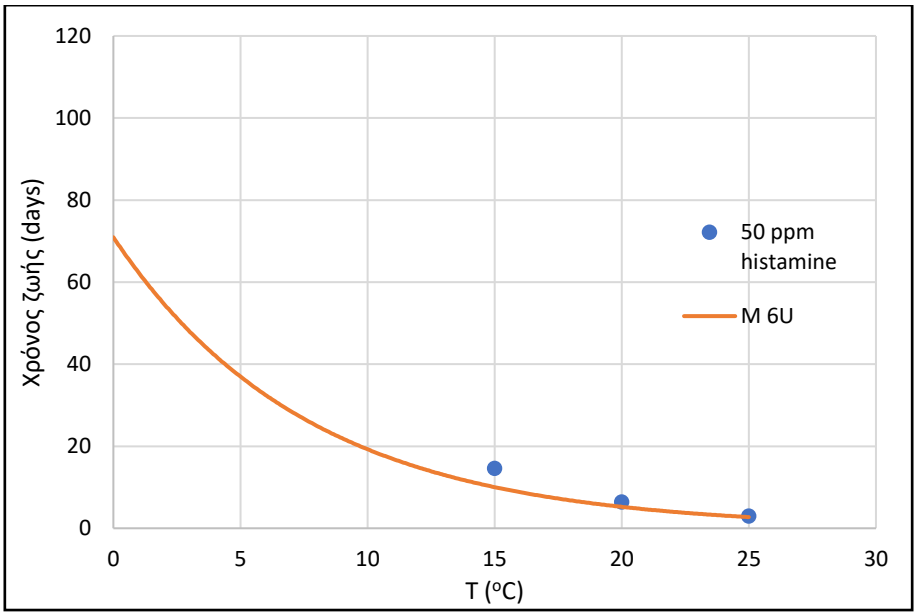
Προκύπτει ότι την καλύτερη συσχέτιση για το χρόνο που απαιτείται για το σχηματισμό 100 ppm ισταμίνης επιτυγχάνει ο δείκτης LP 10U. Η απόκριση του δείκτη ακολουθεί ικανοποιητικά το σχηματισμό ισταμίνης στον τόνο.

Στο Διάγραμμα 6.4 παρουσιάζονται οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής των μελετηθέντων δεικτών τύπου Μ σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0-15ºC.



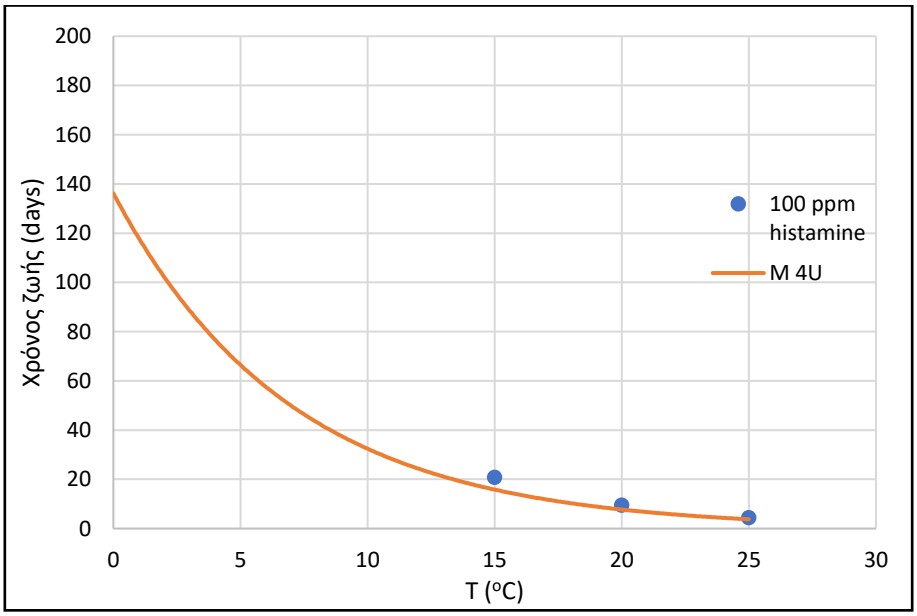
Διάγραμμα 6. 4 Θεωρητικοί χρόνοι ζωής των ενζυμικών δεικτών TTI τύπου Μ.

Στα Διαγράμματα 6.5 και 6.6 παρουσιάζεται η επιλογή των κατάλληλων ενζυμικών δεικτών τύπου M, για το σχηματισμό 50 και 100 ppm ισταμίνης, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 6. 5 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου M και συγκέντρωσης 6U για το σχηματισμό 50 ppm ισταμίνης σε τόνο.

Προκύπτει ότι η καλύτερη προσέγγιση για το χρόνο που απαιτείται για το σχηματισμό 50 ppm ισταμίνης επιτυγχάνεται με το δείκτη M 6U. Η απόκριση του δείκτη ακολουθεί ικανοποιητικά το σχηματισμό ισταμίνης στον τόνο στους 20 και στους 25ºC και δρα συντηρητικά στους 15ºC, προστατεύοντας τον καταναλωτή από πιθανώς μη αποδεκτό προϊόν.



Διάγραμμα 6. 6 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου M και συγκέντρωσης 4U για το σχηματισμό 100 ppm ισταμίνης σε τόνο.

Προκύπτει ότι την καλύτερη συσχέτιση για το χρόνο που απαιτείται για το σχηματισμό 100 ppm ισταμίνης στον τόνο επιτυγχάνει ο δείκτης M 4U. Η απόκριση του δείκτη σχεδόν ταυτίζεται με το σχηματισμό ισταμίνης στον τόνο στους 20 και στους 25°C και δρα συντηρητικά στους 15°C, προστατεύοντας τον καταναλωτή. Σε υψηλές θερμοκρασίες προτιμώνται δείκτες οι οποίοι έχουν συντηρητική δράση, δηλαδή λήγουν γρηγορότερα από το τρόφιμο, άρα προστατεύουν τον καταναλωτή.

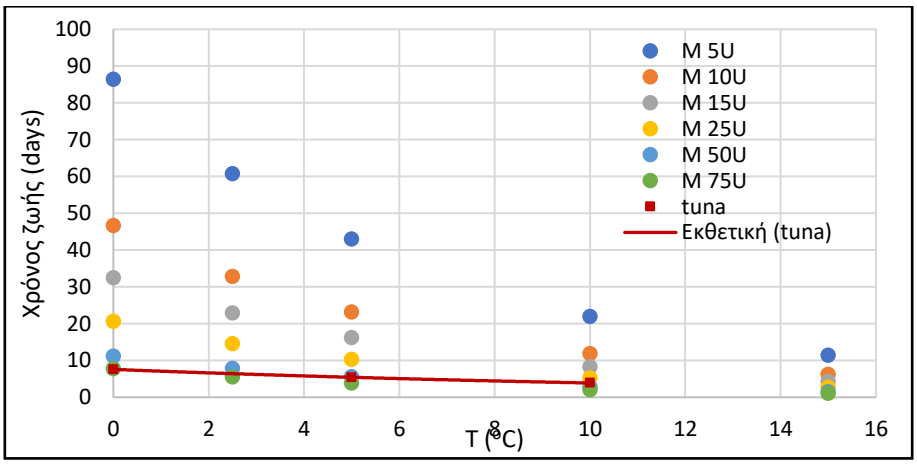
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα μακρύπτερου τόνου (tuna alalunga). Δείγματα του ίδιου τόνου μελετήθηκαν ως προς το χρόνο ζωής τους σε προηγούμενη διπλωματική εργασία «Έξυπνη συσκευασία για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας ιχθυηρών: Κινητική μελέτη απόκρισης Χρονοθερμοκρασιακών Ολοκληρωτών (TTI) και συσχέτιση με την ποιότητα και την παραγωγή ισταμίνης σε κέφαλο» (Παπαμιχαήλ, 2017). Ακολουθεί συσχέτιση των δεικτών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία με τους χρόνους ζωής του τόνου, που προσδιορίσθηκαν στην προηγούμενη διπλωματική. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο επικρατέστερος αλλοιογόνος μικροοργανισμός για αερόβια συσκευασμένα, ψυγμένα ιχθυηρά είναι οι ψευδομονάδες (Tsironi & Taoukis, 2012).

Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζονται οι χρόνοι ζωής για το μακρύπτερο τόνο (*Thunnus alalunga*) σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 5 και 10 °C βάσει του ορίου αποδοχής logcfu=7 για τις ψευδομονάδες:

Πίνακας 6. 2 Χρόνος ζωής τόνου (Παπαμιχαήλ, 2017).

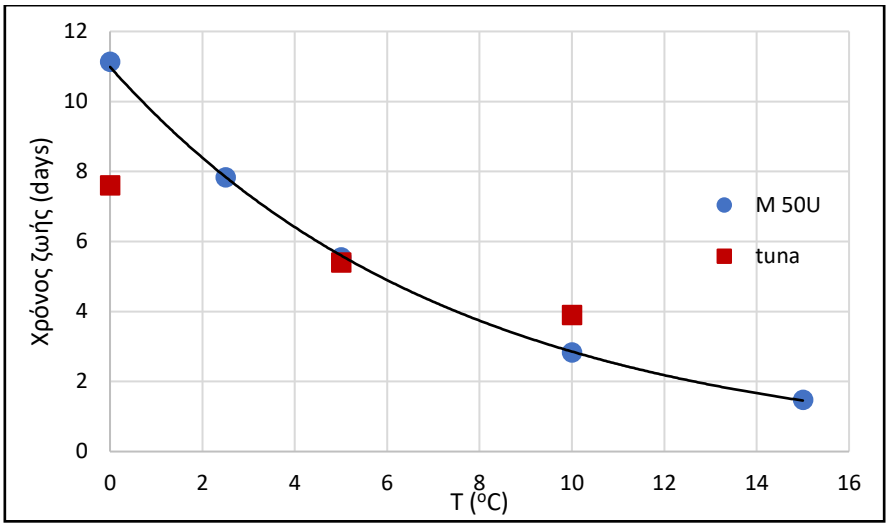
T (°C)	t (days)
0	7.6
5	5.4
10	3.9

Στο Διάγραμμα 6.7 παρουσιάζεται η συσχέτιση του χρόνου ζωής του τόνου με όριο αποδοχής logcfu=7 για τις ψευδομονάδες, με τους θεωρητικούς χρόνους ζωής των ενζυμικών TTI τύπου M.



Διάγραμμα 6. 7 Συσχέτιση χρόνου ζωής τόνου με όριο αποδοχής logcfu=7 για τις ψευδομονάδες με τους θεωρητικούς χρόνους ζωής των ενζυμικών TTI τύπου M.

Με κόκκινη γραμμή φαίνεται ο χρόνος ζωής του τόνου. Προκύπτει πως καλύτερη συσχέτιση δίνει ο δείκτης M 50U.



Διάγραμμα 6. 8 Συσχέτιση χρόνου ζωής τόνου με όριο αποδοχής logcfu=7 για τις ψευδομονάδες με το θεωρητικό χρόνο ζωής του ενζυμικού TTI M 50U.

Φαίνεται πως καλύτερη συσχέτιση στο χρόνο ζωής του τόνου στις θερμοκρασίες 5 και 10 °C δίνει ο δείκτης M 50U. Ο δείκτης έχει συντηρητική δράση στις υψηλές θερμοκρασίες, προστατεύοντας τον καταναλωτή, ενώ στους 0 °C, ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης στη συσκευασία του τροφίμου, εκτός και αν αλλάξει χρώμα (κοκκινίσει) ο δείκτης.

Κεφάλαιο 7: Σύνοψη αποτελεσμάτων

Η χρήση χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI μπορεί να αποτελέσει υποσχόμενη λύση για την παρακολούθηση τυχόν θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης τροφίμων, κατά τη διακίνηση τους στην ψυκτική αλυσίδα. Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI και η επιλογή κατάλληλου δείκτη για την παρακολούθηση της ποιότητας και της ασφάλειας σε τόνο.

Πιο συγκεκριμένα, έγινε κινητική μελέτη της απόκρισης ενζυμικών δεικτών TTI με τη διεξαγωγή ισοθερμοκρασιακών πειραμάτων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* και μελέτη του σχηματισμού ισταμίνης σε τόνο (*Thunnus alalunga*), ώστε να επιλεχθούν οι κατάλληλοι δείκτες για την παρακολούθηση της ψυκτικής αλυσίδας του.

Κινητική μελέτη ενζυμικών δεικτών TTI

Μελετήθηκαν ενζυμικοί χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες τύπου LP με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μείγμα τριλαουρίνης - τριπαλμιτίνης και δείκτες τύπου M με ένζυμο λιπάση από *Rhizopus oryzae* και υπόστρωμα μυριστικό μεθυλεστέρα. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των TTI που μελετήθηκαν και οι θερμοκρασίες στις οποίες διεξήχθησαν τα πειράματα.

Πίνακας 3. 2 Συγκεντρωτικός πίνακας συγκεντρώσεων και θερμοκρασιών των μελετώμενων TTI.

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

Η λήψη των πειραματικών δεδομένων έγινε με χρωματόμετρο X-rite και με την εφαρμογή Vitsab APP σε έξυπνο κινητό (smartphone). Η αξιοπιστία των μετρήσεων με την εφαρμογή επιβεβαιώθηκε με την πολύ καλή συσχέτιση των δεδομένων που ελήφθησαν με τους 2 τρόπους και η επεξεργασία συνεχίστηκε με τα δεδομένα που ελήφθησαν από την εφαρμογή της Vitsab (Διαγράμματα 4.1-4.6 και Πίνακας 4.1.).

Τα πειραματικά δεδομένα χρώματος επεξεργάστηκαν με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Sigmaplot 10 και προσδιορίστηκαν οι σταθερές ρυθμών απόκρισης k_1 και k_2 στην εκάστοτε θερμοκρασία. Επιπλέον, με το πρόγραμμα Systat 10.2 επιλύθηκε η εξίσωση 4.3 και προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (k_{1ref}, k_{2ref}, E_a) των δεικτών (Πίνακας 4.22).

$$\text{norm(a+b)} = \frac{1}{1+e^{\left\{\frac{k1ref*\exp[\frac{Ea}{R}(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref})]-t}{k2ref*\exp[\frac{Ea}{R}(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref})]}\right\}}} \quad (4.3).$$

Πίνακας 4. 34 Κινητικά χαρακτηριστικά μελετώμενων ενζυμικών δεικτών TTI.

TTI	E_a (kJ/mol)	k_{1ref} (d)	k_{2ref} (d)	R^2
LP 100U	147.0	14.45	4.636	0.987
LP 150U	144.2	10.14	2.962	0.989
LP 300U	142.3	4.28	1.266	0.993
LP 500U	133.2	2.44	0.814	0.995
M 5U	91.2	39.82	7.865	0.991
M 10U	86.1	20.87	4.064	0.993
M 15U	86.3	13.48	2.436	0.997
M 25U	84.3	9.73	1.624	0.990
M 50U	89.7	5.24	0.931	0.996
M 75U	94.2	3.60	0.664	0.991

Προέκυψε πως αυξανομένης της συγκέντρωσης του ενζύμου στο TTI, οι σταθερές k_{1ref} και k_{2ref} μειώνονται, αφού με αύξηση της συγκέντρωσης το χρώμα μεταβάλλεται ταχύτερα. Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με αύξηση της θερμοκρασίας για TTI συγκεκριμένης συγκέντρωσης.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η διάρκεια ζωής των δεικτών LP και M (Πίνακας 4.27 και 4.28).

Πίνακας 4. 35 Πειραματική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου LP

LP-TYPE				
T (°C)	**LP 100U**	**LP 150U**	**LP 300U**	**LP 500U**
0	48.20	35.18	15.71	8.65
2.5	29.45	19.67	8.14	4.85
5	19.30	14.31	5.17	3.02
10	6.41	4.70	1.80	1.05
15	1.41	1.12	0.52	0.29
20	0.65	0.61	0.18	0.14
25	0.20	0.16	0.07	0.06

Πίνακας 4. 36 Πειραματική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου M

M-TYPE						
T (°C)	M 5U	M 10U	M 15U	M 25U	M 50U	M 75U
0	86.26	43.51	29.31	20.05	11.53	7.65
2.5	67.59	32.84	20.51	14.39	7.91	5.91
5	48.10	24.35	16.30	10.16	5.66	3.77
10	19.59	11.24	7.78	6.33	2.94	2.02
15	11.14	6.43	3.93	2.69	1.45	0.88

Προέκυψε πως αυξανομένης της συγκέντρωσης του ενζύμου στο TTI, η διάρκεια ζωής μειώνεται, αφού με αύξηση της συγκέντρωσης η ενζυμική αντίδραση εξελίσσεται ταχύτερα.

Επιπλέον, με χρήση του προγράμματος Systat 10.2 και της εξίσωσης 4.7, προσδιορίστηκαν για τους δύο τύπους ενζυμικών δεικτών συνολικά μαθηματικά μοντέλα τα οποία συσχετίζουν την απόκριση των δεικτών με τη συγκέντρωση ενζύμου, τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσής τους. Τα αποτελέσματα των παραμέτρων παρατίθενται στους πίνακες 4.29 και 4.30.

$$X = \frac{1}{1+e^{\left\{\frac{k1ref(C=1U)C^{-a}*\exp[\frac{Ea}{R}(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref})]-t}{k2ref(C=1U)*C^{-b}*\exp[\frac{Ea}{R}(\frac{1}{T}-\frac{1}{Tref})]}\right\}}} \quad (4.7).$$

Πίνακας 4. 37 Παράμετροι Εξίσωσης 4.7 για τα ενζυμικά τύπου LP.

		S.E.*
$k_{1ref\ (C=1U)}$ (d)	1915.7	198.3
a	1.062	0.019
E_a (kJ/mol)	143	0.844
$k_{2ref\ (C=1U)}$ (d)	529.7	156
b	1.034	0.055
R^2	0.988	

*S.E.= Standard Error

Πίνακας 4. 38 Παράμετροι Εξίσωσης 4.7 για τα ενζυμικά TTI τύπου M.

		S.E.*
$k_{1ref\ (C=1U)}$ (d)	159.1	2.9
a	0.880	0.006
E_a (kJ/mol)	88.2	0.657
$k_{2ref\ (C=1U)}$ (d)	34.363	2.962
b	0.927	0.029
R^2	0.990	

*S.E.= Standard Error

Από τα παραπάνω συνολικά μαθηματικά μοντέλα και με χρήση της εξίσωσης 4.7 προσδιορίσθηκαν οι θεωρητικοί χρόνοι ζωής (Πίνακας 4.31 και 4.32) και έγινε σύγκριση με τους πειραματικούς για να ελεγχθεί η αξιοπιστία του μοντέλου (Σχήμα 4.1 και 4.2).

Πίνακας 4. 39 Θεωρητική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου LP.

T (°C)	LP 100U	LP 150U	LP 300U	LP 500U
0	51.31	33.47	16.13	9.42
2.5	28.98	18.91	9.11	5.32
5	16.54	10.79	5.20	3.04
10	5.55	3.62	1.74	1.02
15	1.93	1.26	0.61	0.36
20	0.70	0.46	0.22	0.13
25	0.26	0.17	0.08	0.05

Πίνακας 4. 40 Θεωρητική διάρκεια ζωής (days) ενζυμικών TTI τύπου M

T (°C)	M 5U	M 10U	M 15U	M 25U	M 50U	M 75U
0	86.38	46.61	32.49	20.62	11.13	7.76
2.5	60.73	32.77	22.85	14.50	7.83	5.46
5	42.97	23.19	16.16	10.26	5.54	3.86
10	21.91	11.82	8.24	5.23	2.82	1.97
15	11.44	6.17	4.30	2.73	1.47	1.03

Για την αξιοπιστία των πειραμάτων, μελετήθηκαν σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες συνθήκες, παρόμοιες με αυτές που υπάρχουν στην ψυκτική αλυσίδα, οι ενζυμικοί δείκτες LP 150U (T_{eff} = 7.4 °C) και M 25U (T_{eff} = 7.1 °C) και διαπιστώθηκε ότι είναι αξιόπιστοι.

Μελέτη μικροβιολογικής ανάπτυξης *Morganella morganii*

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Morganella morganii* σε τόνο σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (5, 10, 15, 20 και 25 °C). Στους 5 και στους 10 °C δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόσθηκαν στο μοντέλο Baranyi και προσδιορίστηκαν οι ρυθμοί ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Πίνακας 5.1). Έπειτα, με προσαρμογή των δεδομένων στην εξίσωση Arrhenius προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά (E_a, k_{ref}) ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5. 3 Κινητικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης *Morganella morganii*.

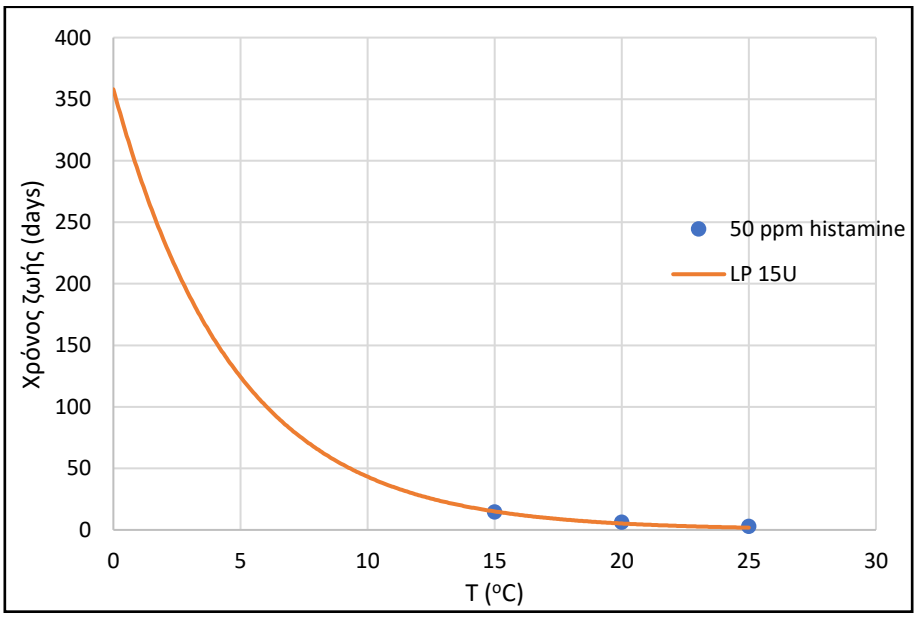
E_a (KJ/mol)	105.1
K_{ref} (d^{-1})	0.935
R^2	0.983

Μελέτη σχηματισμού ισταμίνης στον τόνο

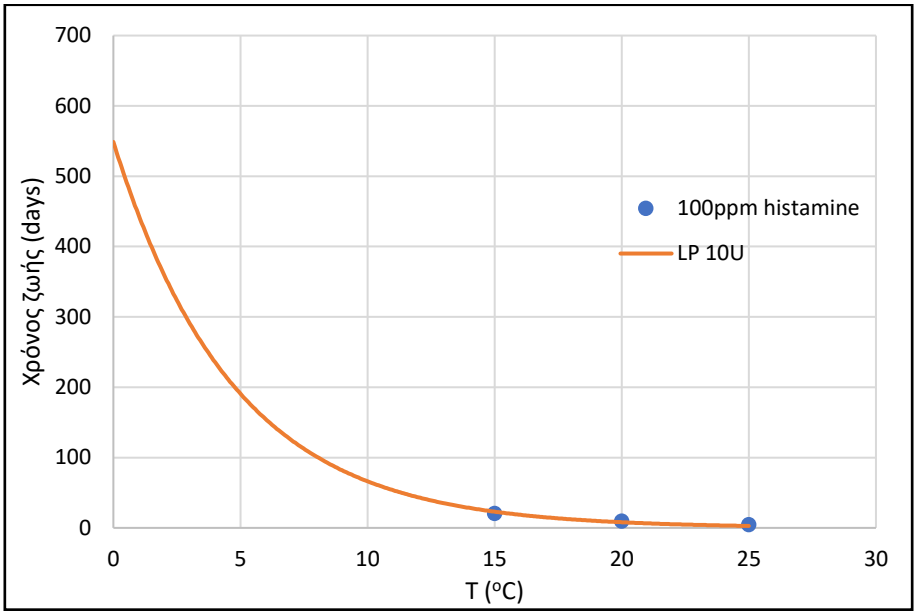
Χρησιμοποιώντας την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της σχηματιζόμενης ισταμίνης σε εμβολιασμένο με *Morganella morganii* τόνο, ο οποίος συντηρήθηκε σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες 15, 20 και 25°C. Οι ρυθμοί σχηματισμού και οι λανθάνουσες φάσεις που προέκυψαν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi δίνονται στον πίνακα 5.3. Έπειτα, με χρήση των γραμμικοποιημένων διαγραμμάτων Arrhenius για την εκθετική και τη λανθάνουσα φάση προσδιορίστηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά για το σχηματισμό ισταμίνης (Διάγραμμα 5.6 και 5.7).

Συσχέτιση TTI με την ποιοτική υποβάθμιση και το ρυθμό παραγωγής ισταμίνης σε τόνο

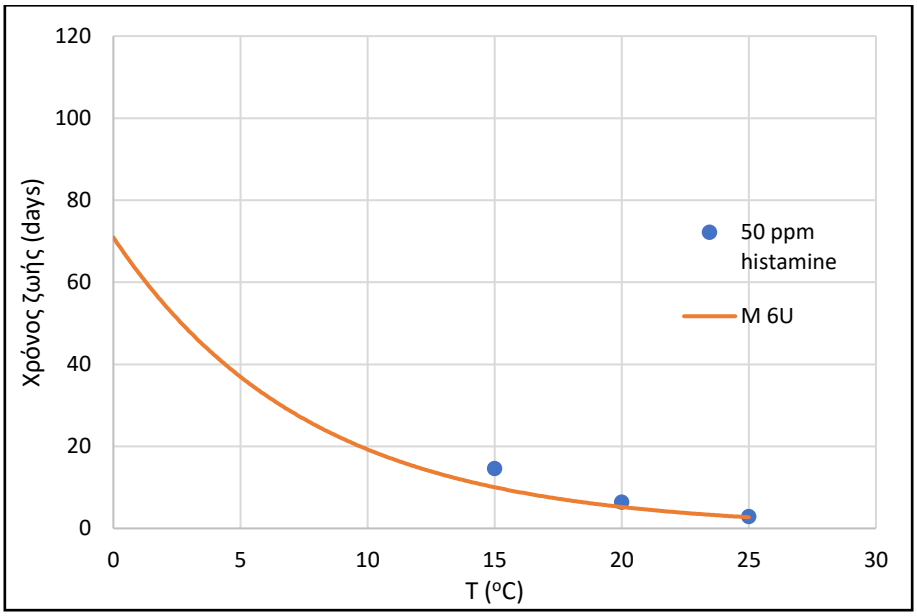
Συσχετίσθηκαν οι ρυθμοί απόκρισης των TTI με τους απαιτούμενους χρόνους για το σχηματισμό ισταμίνης σε συγκεντρώσεις που δυνητικά σχετίζονται με σκομβροειδή δηλητηρίαση (50 και 100ppm), όπως φαίνεται στα διαγράμματα 6.2 , 6.3, 6.5 και 6.6.



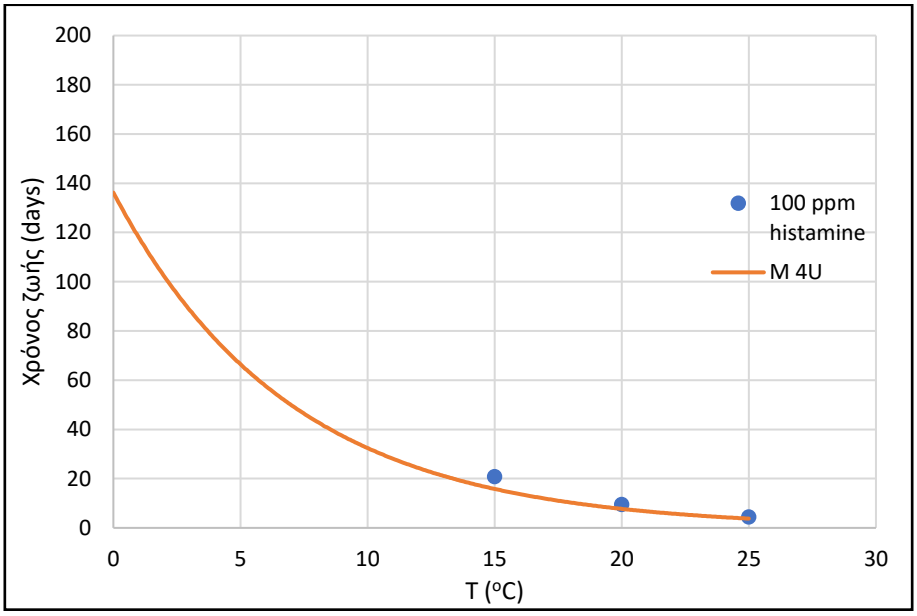
Διάγραμμα 6. 9 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου LP και συγκέντρωσης 15U για το σχηματισμό 50 ppm ισταμίνης σε τόνο.



Διάγραμμα 6. 10 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου LP και συγκέντρωσης 10U για το σχηματισμό 100 ppm ισταμίνης σε τόνο.



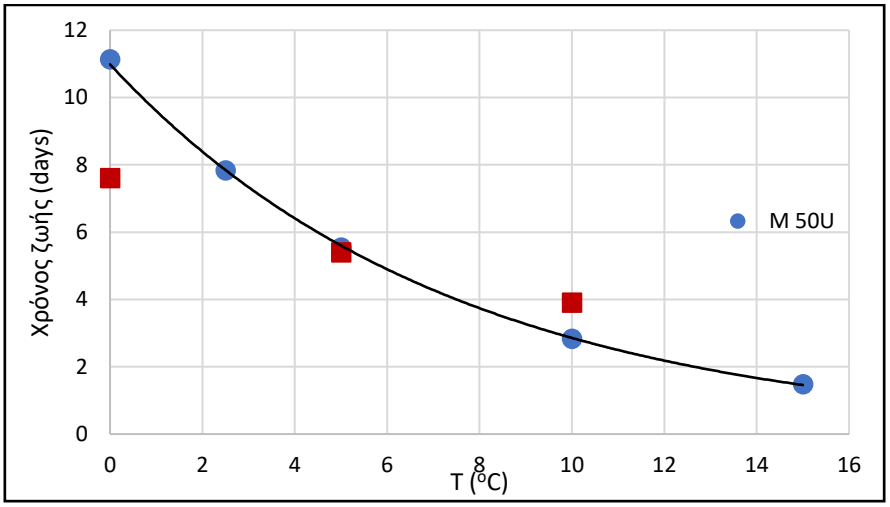
Διάγραμμα 6. 11 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου M και συγκέντρωσης 6U για το σχηματισμό 50 ppm ισταμίνης σε τόνο.



Διάγραμμα 6. 12 Συσχέτιση θεωρητικού χρόνου ζωής ενζυμικού δείκτη TTI τύπου M και συγκέντρωσης 4U για το σχηματισμό 100 ppm ισταμίνης σε τόνο.

Οι δείκτες οι οποίοι συσχετίσθηκαν με την παρακολούθηση σχηματισμού ισταμίνης ήταν οι LP 15U για συγκέντρωση ισταμίνης 50 ppm και LP 10U για συγκέντρωση ισταμίνης 100 ppm και οι M 6U για συγκέντρωση ισταμίνης 50ppm και M 4U για συγκέντρωση ισταμίνης 100 ppm.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των δεικτών με το χρόνο ζωής του τόνου, σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0, 5 και 10 ºC βάσει του ορίου αποδοχής logcfu=7 για τις ψευδομονάδες, χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη διπλωματική εργασία «Έξυπνη συσκευασία για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας ιχθυηρών: Κινητική μελέτη απόκρισης Χρονοθερμοκρασιακών Ολοκληρωτών (TTI) και συσχέτιση με την ποιότητα και την παραγωγή ισταμίνης σε κέφαλο» (Παπαμιχαήλ, 2017) (Πίνακας 6.2, Διάγραμμα 6.7 και 6.8).



Διάγραμμα 6. 13 Συσχέτιση χρόνου ζωής τόνου με όριο αποδοχής logcfu=7 για τις ψευδομονάδες με το θεωρητικό χρόνο ζωής του ενζυμικού TTI M 50U.

Από το διάγραμμα 6.8 συμπεραίνεται πως καλύτερη συσχέτιση στο χρόνο ζωής του τόνου στις υψηλές θερμοκρασίες άνω των 5 ^{o}C παρουσιάζει ο δείκτης M 50U. Έχει συντηρητική δράση στις υψηλές θερμοκρασίες, προστατεύοντας τον καταναλωτή, ενώ στις χαμηλότερες κάτω των 5°C, ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης στη συσκευασία του τροφίμου, εκτός και αν αλλάξει η απόκριση του δείκτη, δηλαδή αν κοκκινίσει.

Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρούσα διπλωματική είναι τα εξής:

- Στους χρονοθερμοκρασιακούς δείκτες TTI, που μελετήθηκαν, τύπου LP και M, μειώθηκε η διάρκεια ζωής, αυξανομένης της συγκέντρωσης του ενζύμου (Units).
- Στους δείκτες ίδιας συγκέντρωσης αυξανομένης της θερμοκρασίας, μειώθηκε η διάρκεια ζωής του δείκτη.
- Στα πειράματα εναλλασσόμενου χρονοθερμοκρασιακού προφίλ, επιβεβαιώθηκε η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, καθώς οι πειραματικές αποκρίσεις ήταν εντός ορίων των προβλεπόμενων αποκρίσεων.
- Παρατηρήθηκε πολύ καλή επαναληψιμότητα στις μετρήσεις, τόσο με το χρωματόμετρο όσο και με το κινητό.
- Προέκυψαν ακριβή μοντέλα απόκρισης, καθώς η συσχέτιση των θεωρητικών με των πειραματικών χρόνων ζωής ήταν ικανοποιητική.
- Επιβεβαιώθηκε ότι τα κινητικά χαρακτηριστικά ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου πρέπει να σχετίζονται με τα κινητικά χαρακτηριστικά του επιλεγμένου δείκτη, δηλαδή E_a (TTI) = E_a (τροφίμου).
- Στη μελέτη ανάπτυξης *Morganella morganii* στον τόνο, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ισταμίνης στις θερμοκρασίες 5 και 10 ^oC.
- Η έκθεση τροφίμων σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να οδηγήσει σε ποιοτικές αλλοιώσεις αλλά και σε δράσεις επιβλαβείς για την υγεία του καταναλωτή.
- Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες TTI χρησιμοποιούνται για να δείξουν ενδεχόμενη κακομεταχείριση των τροφίμων, παρακολουθώντας το χρονοθερμοκρασιακό ιστορικό τους, δρώντας συνεπικουρικά με την ημερομηνία λήξης και όχι για να την αντικαταστήσουν. Δεν μπορούν να προσδιορίσουν παράγοντες ασφάλειας, που οφείλονται σε παρουσία μικροοργανισμών ή χημικών κινδύνων.
- Στις κρίσιμες θερμοκρασιακές περιοχές άνω των 5 ^oC, συνίσταται η επιλογή δεικτών με συντηρητική απόκριση, ώστε να εξασφαλίζεται η ασφάλεια των καταναλωτών. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, ο χρόνος ζωής καθορίζεται από την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του τροφίμου και ο καταναλωτής μπορεί να βασισθεί στην αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης για την απόρριψη του προϊόντος, εκτός και αν η απόκριση του δείκτη έχει αλλάξει (π.χ. αν το χρώμα στο παράθυρο ανάγνωσης έχει κοκκινίσει).

Προτάσεις

Ορισμένες προτάσεις για τη συνέχιση της έρευνας είναι οι εξής:

- Να διερευνηθεί αν διαφορετικοί τύποι TTI, με διαφορετικά κινητικά χαρακτηριστικά, είναι κατάλληλοι ώστε να συσχετισθούν με τον τόνο.
- Να μελετηθεί η παραγωγή ισταμίνης σε άλλα ιχθυηρά και σε άλλα τρόφιμα, π.χ. τυριά.
- Να μελετηθεί η παραγωγή ισταμίνης σε άλλα είδη τόνου και από άλλους μικροοργανισμούς με ικανότητα σχηματισμού της, π.χ. *Photobacterium phosphoreum.*
- Να μελετηθεί ο σχηματισμός ισταμίνης σε ιχθυηρά, που έχουν επεξεργασθεί ή συντηρηθεί με μεθόδους που έχουν στόχο την αύξηση του χρόνου ζωής τους.
- Να γίνει παρακολούθηση του χρονοθερμοκρασιακού προφίλ σε συσκευασμένο τόνο κατά τη διακίνηση του στην ψυκτική αλυσίδα, προκειμένου να ελεγχθούν τα αποτελέσματα σε πραγματικές συνθήκες.
- Να μελετηθεί η συσχέτιση της κινητικής απόκρισης χρονοθερμοκρασιακών δεικτών TTI με την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών και σε άλλα ευαλλοίωτα τρόφιμα.
- Να μελετηθεί η συσχέτιση των μετρήσεων με έξυπνο κινητό (smartphone), μέσω της εφαρμογής και σε άλλους τύπους ενζυμικών TTI με διαφορετικό ένζυμο και υπόστρωμα.
- Να αναπτυχθούν και άλλα λογισμικά μέτρησης χρώματος δεικτών (όπως η εφαρμογή Vitsab APP), για άλλους τύπους TTI, π.χ. φωτοχημικούς.

Βιβλιογραφία

Ainsworth, M. (2009). Kitchen Pro Series: Guide to Fish and Seafood Identification, Fabrication and Utilization. Nelson Education.

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

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2015). Χημεία Τροφίμων, 4η έκδοση. Εκδόσεις Τζιόλα.

Bengtsson, N., Liljemark, A., Olssson, P., & Nilsson, B. (1972). attempt to systemize time-temperature-tolerance (TTT.) data as a basis for the development of time-temperature indicators. Bull Inst Int Froid.

Biegańska, M. (2017). Shelf-life Monitoring of Food Using Time-temperature Indicators (TTI) for Application in Intelligent Packaging. Towaroznawcze Problemy Jakości, (2), 75-85.

Bobelyn, E., Hertog, M. L., & Nicolaï, B. M. (2006). Applicability of an enzymatic time temperature integrator as a quality indicator for mushrooms in the distribution chain. Postharvest Biology and Technology, 42(1), 104-114.

Brizio, A. P. D. R., & Prentice, C. (2014). Use of smart photochromic indicator for dynamic monitoring of the shelf life of chilled chicken based products. Meat science, 96(3), 1219-1226.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC. (2007). Scombroid fish poisoning associated with tuna steaks--Louisiana and Tennessee, 2006. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 56(32), 817.

Chen, J. H., & Zall, R. R. (1987a). Refrigerated packaged orange juice can be monitored for freshness using polymer indicator label. Dairy and food sanitation.

Chen, J. H., & Zall, R. R. (1987b). Packaged milk, cream and cottage cheese can be monitored for freshness using polymer indicator labels. Dairy and food sanitation (USA).

Collette, B. B. (1983). Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO Fish. Synop., 125, vii+-137.

Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. International Journal of Food Microbiology, 26(3), 305-317.

Dalgaard, P., & Huss, H. H. (1997). Mathematical modelling used for evaluation and prediction of microbial fish spoilage. Seafood safety, processing and biotechnology, 73-89.

Dalgaard, P., & Emborg, J. (2008). Denmark and A. Kjùlby, ND Sùrensen and NZ Ballin, Danish Veterinary and Food Administration, Denmark. Improving Seafood Products for the Consumer, 292.

Davies, D. J., Vaccaro, A. R., Morris, S. M., Herzer, N., Schenning, A. P., & Bastiaansen, C. W. (2013). A Printable Optical Time-Temperature Integrator Based on Shape Memory in a Chiral Nematic Polymer Network. Advanced Functional Materials, 23(21), 2723-2727.

Dolan, K. D., Singh, R. P., & Wells, J. H. (1985). Evaluation of time-temperature related quality changes in ice cream during storage. Journal of Food Processing and Preservation, 9(4), 253-271.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 9(10), 2393.

El Deen, M. M. K. (2014). The Intelligent Colorimetric Timer Indicator Systems to develop label Packaging Industry in Egypt. International Design Journal, 4(2).

Ellouze, M., Pichaud, M., Bonaiti, C., Coroller, L., Couvert, O., Thuault, D., & Vaillant, R. (2008). Modelling pH evolution and lactic acid production in the growth medium of a lactic acid bacterium: application to set a biological TTI. International journal of food microbiology, 128(1), 101-107.

Ellouze, M., & Augustin, J. C. (2010). Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. International Journal of Food Microbiology, 138(1-2), 119-129.

Emborg, J., Dalgaard, P., & Ahrens, P. (2006). Morganella psychrotolerans sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(10), 2473-2479.

Falagas, M. E., Kavvadia, P. K., Mantadakis, E., Kofteridis, D. P., Bliziotis, I. A., Saloustros, E., Maraki, S., & Samonis, G. (2006). Morganella morganii infections in a general tertiary hospital. Infection, 34(6), 315.

FAO, (2018). FISHSTATJ (Release: 3.04.8). FAO regional capture fisheries statistics. FAO Fishery and Aquaculture Department. Statistics and Information Branch.

Feng, C., Teuber, S., & Gershwin, M. E. (2016). Histamine (scombroid) fish poisoning: a comprehensive review. Clinical reviews in allergy & immunology, 50(1), 64-69.

Fu, B., & Labuza, T. P. (1992). Considerations for the application of time-temperature integrators in food distribution. Journal of Food Distribution Research, 23(1), 9-17.

Galagan, Y., & Su, W. F. (2008). Fadable ink for time–temperature control of food freshness: Novel new time–temperature indicator. Food research international, 41(6), 653-657.

Garrett, A., & Brown, A. (2009). Yellowfin Tuna: A global and UK supply chain analysis. SEAFISH, March.

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

Giannakourou, M. C., & Taoukis, P. S. (2003a). Application of a TTI-based distribution management system for quality optimization of frozen vegetables at the consumer end. Journal of food science, 68(1), 201-209.

Giannakourou, M. C., & Taoukis, P. S. (2003b). Kinetic modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions. Food chemistry, 83(1), 33-41.

Giannakourou, M. C., Koutsoumanis, K., Nychas, G. J. E., & Taoukis, P. S. (2005). Field evaluation of the application of time temperature integrators for monitoring fish quality in the chill chain. International journal of food microbiology, 102(3), 323-336.

Giannoglou, M., Touli, A., Platakou, E., Tsironi, T., & 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 & Emerging Technologies, 26, 294-301.

Gogou, E., Katsaros, G., Derens, E., Alvarez, G., & Taoukis, P. S. (2015). Cold chain database development and application as a tool for the cold chain management and food quality evaluation. International Journal of Refrigeration, 52, 109-121.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. International journal of food microbiology, 33(1), 121-137.

Grisius, R., Wells, J. H., Barrett, E. L., & Singh, R. P. (1987). Correlation of time-temperature indicator response with microbial growth in pasteurized milk. Journal of Food Processing and Preservation, 11(4), 309-324.

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(2), 215-222.

Han, J. Y., Kim, M. J., Shim, S. D., & Lee, S. J. (2012). Application of fuzzy reasoning to prediction of beef sirloin quality using time temperature integrators (TTIs). Food Control, 24(1-2), 148-153.

Hardy, R., & Smith, J. G. (1976). The storage of mackerel (Scomber scombrus). Development of histamine and rancidity. Journal of the Science of Food and Agriculture, 27(7), 595-599.

Hill Jr, C. G., & Grieger-Block, R. A. (1980). Kinetic data: generation, interpretation, and use. Food Technology (USA).

Hungerford, J. M. (2010). Scombroid poisoning: a review. Toxicon, 56(2), 231-243.

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., & Tsukamoto, T. (2004). Photobacterium phosphoreum caused a histamine fish poisoning incident. International journal of food microbiology, 92(1), 79-87.

Kim, S. H., An, H., & Price, R. J. (1999). Histamine formation and bacterial spoilage of albacore harvested off the US Northwest coast. Journal of food science, 64(2), 340-343.

Kim, E., Choi, D. Y., Kim, H. C., Kim, K., & Lee, S. J. (2013). Calibrations between the variables of microbial TTI response and ground pork qualities. Meat science, 95(2), 362-367.

Kim, T. J., Choi, D. Y., Yoon, K. H., Kim, K., & Lee, S. J. (2013). Application of mixture rule to determine arrhenius activation energy of time temperature integrator using mixture of laccase from Pleurotus ostreatus and PEGylated laccase from Trametes versicolor. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 56(4), 419-425.

Kim, J. U., Ghafoor, K., Ahn, J., Shin, S., Lee, S. H., Shahbaz, H. M., Shin, S., Kim, S., & Park, J. (2016). Kinetic modeling and characterization of a diffusion-based time-temperature indicator (TTI) for monitoring microbial quality of non-pasteurized angelica juice. LWT-Food Science and Technology, 67, 143-150.

Koutsoumanis, K., Taoukis, P. S., & Nychas, G. J. E. (2005). Development of a safety monitoring and assurance system for chilled food products. International journal of food microbiology, 100(1-3), 253-260.

Koutsoumanis, K. P., & Gougouli, M. (2015). Use of time temperature integrators in food safety management. Trends in Food Science & Technology, 43(2), 236-244.

Kragt, A. J. J., Schenning, A. P. H. J., Broer, D. J., Bastiaansen, C. W. M., Nickmans, K., & Moirangthem, M. (2018). Photonic time-temperature sensor having an embossed interpenetrating network of cholesteric liquid crystalline polymers and a secondary polymer (Patent No. WO2018033595.)

Kramer, A., & Farquhar, J. W. (1976). Testing of time-temperature indicating and defrost devices [Quality of frozen food in storage]. Food Technology.

Leak, F. W., & Ronnow, P. (2003). Quality changes in Ground beef during distribution and storage, and determination of Time-Temperature-Indicator (TTI) charakteristic of ground beef University of Florida Institute of food and Agricultural Sciences Internet: www. vitsab. com. Stand: April.

López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J. J., Hernádez-Herrero, M., Roig-Sagués, A. X., & Mora-Ventura, M. T. (1996). Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (Thunnus thynnus). Journal of Food Protection, 59(2), 167-174.

Midgley T, 'Telltale means' U.S. Patent 1917048, 1933

Mikkola, V., Lähteenmäki, L., Hurme, E., Heiniö, R. L., Järvi-Kääriäinen, T., & Ahvenainen, R. (1997). Consumer attitudes towards oxygen absorbers in food packages. Espoo: Technical Research Centre of Finland.

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

Nei, D. (2014). Evaluation of non-bacterial factors contributing to histamine accumulation in fish fillets. Food control, 35(1), 142-145.

Ough, C. S. (1971). Measurement of histamine in California wines. Journal of agricultural and food chemistry, 19(2), 241-244.

Park, Y. H., Kim, D. S., Kim, S. S., & Kim, S. B. (1980). Changes in histamine content in the muscle of dark-fleshed fishes during storage and processing. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13(1), 15-22.

Park, H. R., Kim, K., & Lee, S. J. (2013). Adjustment of Arrhenius activation energy of laccase-based time–temperature integrator (TTI) using sodium azide. Food control, 32(2), 615-620.

Pennanen, K., Focas, C., Kumpusalo-Sanna, V., Keskitalo-Vuokko, K., Matullat, I., Ellouze, M., Pentikainen, S., Smolander, M., Korhonen, V., & Ollila, M. (2015). European consumers' perceptions of time–temperature indicators in food packaging. Packaging Technology and Science, 28(4), 303-323.

Pulaski, E. J., & Deitz, G. W. (1940). Morgan's bacillus septicemia: report of a case and review of extent of pathogenicity of the organism. Journal of the American Medical Association, 115(11), 922-923.

Renier, J. J., & Morin, W. T. (1962). Time-temperature indicators. Intl. Inst. Refrig. Bull. Annex, 1, 425-435.

Rodriguez, N., & Zaritzky, N. E. (1983). Development of a Time-Temperature Integrator Indicator for Frozen Beef. Journal of Food Science, 48(5), 1526-1531.

Røhr, Å. K., Andersen, P. O., Salbu, B., Gudjonsson, E. F., Pettersen, M. N., & Aasland, C. S. (2017). U.S. Patent No. 9,612,162. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Shellhammer, T. H., & Singh, R. P. (1991). Monitoring chemical and microbial changes of cottage cheese using a full-history time-temperature indicator. Journal of food science, 56(2), 402-405.

Sherlock, M., Fu, B., Taoukis, P. S., & 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. (1992). Consumer perceptions of consumer type time-temperature indicators for use on refrigerated dairy foods. Dairy Food Environ. Sanit., 12, 559-565.

Singh, R. P., & Wells, J. H. (1985). Use of time-temperature indicators to monitor quality of frozen hamburger. Food technology (USA).

Stergiou, F. (2018). Effective management and control of the cold chain by application of Time Temperature Indicators (TTIs) in food packaging. Journal of Food and Clinical Nutrition, 1(1).

Taoukis, P. S., & Labuza, T. P. (1989). Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products. Journal of Food Science, 54(4), 783-788.

Taoukis, P., & Labuza, T. P. (1996). Summary: integrative concepts. Food chemistry, 3, 1013-1042.

Taoukis, P. S., Bili, M., & Giannakourou, M. (1997, November). Application of shelf life modelling of chilled salad products to a TTI based distribution and stock rotation system. In International Symposium on Applications of Modelling as InnovativeTechnique in the Agri-Food Chain. MODEL-IT 476 (pp. 131-140).

Taoukis, P. S., & Labuza, T. P. (1999). Chemical time-temperature integrators as quality monitors in the chill chain. Predictive microbiology applied to chilled food preservation, 16-18.

Taoukis, P. S., Koutsoumanis, K., & Nychas, G. J. E. (1999). 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(1), 21-31.

Taoukis, P. S. (2001). Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. Food process modelling, 512.
Taoukis, P. S., & Labuza, T. P. (2003). Time-temperature indicators (TTIs). Novel food packaging techniques, 103-126.

Taoukis, P., & Tsironi, T. (2016). Smart packaging for monitoring and managing food and beverage shelf life. In The Stability and Shelf Life of Food (Second Edition) (pp. 141-168).

Taylor, S. L., & Eitenmiller, R. R. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. CRC Critical Reviews in Toxicology, 17(2), 91-128.

Taylor, S. L., Stratton, J. E., & Nordlee, J. A. (1989). Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 27(4-5), 225-240.

Tinker, B. L., Slavin, J. W., Learson, R. J., & Ampola, V. G. (1985). Evaluation of automated time-temperature monitoring system in measuring the freshness of chilled fish. Science et Technique du Froid (France).

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., 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(4), 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, 112(2), 316-328.

Tsironi, T., Giannoglou, M., Platakou, E., & Taoukis, P. (2016). Evaluation of Time Temperature Integrators for shelf-life monitoring of frozen seafood under real cold chain conditions. Food Packaging and Shelf Life, 10, 46-53.

Tsironi, T., Ronnow, P., Giannoglou, M., & Taoukis, P. (2017). Developing suitable smart TTI labels to match specific monitoring requirements: The case of Vibrio spp. growth during transportation of oysters. Food Control, 73, 51-56.

Vaikousi, H., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Development of a microbial time/temperature indicator prototype for monitoring the microbiological quality of chilled foods. Applied and Environmental Microbiology, 74(10), 3242-3250.

Vaikousi, H., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2009). Applicability of a microbial time temperature indicator (TTI) for monitoring spoilage of modified atmosphere packed minced meat. International Journal of Food Microbiology, 133(3), 272-278.

Wan, X., & Knoll, M. (2016). A new type of TTI based on an electrochemical pseudo transistor. Journal of Food Engineering, 168, 79-83.

Wells, J. H., & Singh, R. P. (1988). Application of time-temperature indicators in monitoring changes in quality attributes of perishable and semiperishable foods. Journal of Food Science, 53(1), 148-152.

Wu, D., Hou, S., Chen, J., Sun, Y., Ye, X., Liu, D., Meng, R. & Wang, Y. (2015). Development and characterization of an enzymatic time-temperature indicator (TTI) based on Aspergillus niger lipase. LWT-Food Science and Technology, 60(2), 1100-1104.

Yan, S., Huawei, C., Limin, Z., Fazheng, R., Luda, Z., & Hengtao, Z. (2008). Development and characterization of a new amylase type time–temperature indicator. Food control, 19(3), 315-319.

Yoon, S. H., Lee, C. H., Kim, D. Y., Kim, J. W., & Park, K. H. (1994). Time-Temperature Indicator using Phospholipid-Phospholipase System and Application to Storage of Frozen Pork. Journal of Food Science, 59(3), 490-493.

Zall, R., Chen, J., & Fields, S. C. (1986). Evaluation of automated time temperature monitoring system in measuring freshness of UHT milk. Dairy and food sanitation (USA).

Zhang, X., Sun, G., Xiao, X., Liu, Y., & Zheng, X. (2016). Application of microbial TTIs as smart label for food quality: response mechanism, application and research trends. Trends in Food Science & Technology, 51, 12-23.

Ευαγγελοπούλου, Α.Μ., (2017). Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών και μικροβιακών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών TTI και της διατηρησιμότητας προϊόντων καπνιστής πέστροφας με εφαρμογή στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας. Διπλωματική εργασία Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Καλλιούπη, Κ., (2016). Έξυπνη συσκευασία: Έρευνα και επιλογή συνδυασμού ενζύμου-υποστρώματος για την ανάπτυξη TTI με χρονοθερμοκρασιακή απόκριση κατάλληλη για τον έλεγχο ποιότητας και ασφάλειας στην ψυκτική αλυσίδα στρειδιών. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Λουκιανού, Μ., (2011). Μελέτη της κινητικής απόκρισης Χρονοθερμοκρασιακών Δεικτών TTI και εφαρμογή για τον έλεγχο ποιότητας ψυγμένων και κατεψυγμένων τροφίμων στην ψυκτική αλυσίδα. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Μεταξά, Η., (2009) Μελέτη νέων χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (TTI) για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας: Εφαρμογή σε προϊόντα κρέατος. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Παπαμιχαήλ, Ε., (2017). Έξυπνη συσκευασία για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας ιχθυηρών: Κινητική μελέτη απόκρισης Χρονοθερμοκρασιακών Ολοκληρωτών (TTI) και συσχέτιση με την ποιότητα και την παραγωγή ισταμίνης σε κέφαλο. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Περικλέους, Ν., (2016). Κινητική μελέτη και εφαρμογή έξυπνης συσκευασίας TTI στον έλεγχο και τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας καπνιστού σολομού. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Πλατάκου, Ε., (2010). Μελέτη φωτοχημικών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών (TTI) για τη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας: Εφαρμογή σε συσκευασία φιλέτων τιλάπιας. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Πολεμαρχάκη, Μ., (2015). Κινητική μελέτη έξυπνης συσκευασίας με εφαρμογή ενζυμικών και φωτοχημικών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών TTI για τον

έλεγχο της ψυκτικής αλυσίδας βόειου κιμά. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., (2009). Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών τροφίμων, Επιστήμη και Μηχανική Βιολογικών Συστημάτων και Προϊόντων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π.. Αθήνα. σελ. 66-80.

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

Τζιά Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., (2009). Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων:Συστατικά-Ιδιότητες-Ποιότητα-Μικροβιολογία-Ρεολογία-Συσκευασία. Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Αθήνα. σελ.9, 185 – 188.

Τζιά Κ., (2010). Σχεδιασμός Βιομηχανιών Τροφίμων – Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα. σελ. 84-91, 111-113.

Τούλη, Α., (2013). Έξυπνη συσκευασία: Μελέτη και εφαρμογή χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (TTI) στην ψυκτική αλυσίδα κατεψυγμένων θαλασσινών. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Τσατσαράγκου, Κ., (2010). Κινητική μελέτη απόκρισης ενζυμικών και φωτοχημικών χρονοθερμοκρασιακών ολοκληρωτών (TTI) για τον έλεγχο της αλυσίδας κατεψυγμένων τροφίμων. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Τσιρώνη Ν. Θ., (2010). Μελέτη μη θερμικών προκατεργασιών για την βελτίωση της διατηρησιμότητας ιχθυηρών, διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Σταματίου, Α., (2008). Εφαρμογή νέων χρονοθερμοκρασιακών δεικτών (TTI) στη διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας φιλέτων ψαριού συσκευασμένων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Διπλωματική εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Διαδικτυακοί Τόποι

- http://www.fao.org
- http://atuna.com
- http://www.iq-freshlabel.eu/402.0.html
- https://ndb.nal.usda.gov
- http://www.vitsab.com
- https://swfsc.noaa.gov
- https://www.arkive.org/
- http://www.keep-it.com/
- https://www.freshstrips.co/