

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ  
ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΑ  
ΤΡΟΦΙΜΑ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ  
ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ Ν. ΨΩΜΑΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

Επιβλέπων καθηγητής: Σέρκο Χαρουτουιάν

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ  
ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΑ  
ΤΡΟΦΙΜΑ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ  
ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ Ν. ΨΩΜΑΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Επιβλέπων:	Χαρουτουιάν Σέρκο,	Καθηγητής Γ.Π.Α.
Μέλη:	Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης,	Καθηγητής Γ.Π.Α.
	Σκανδάμης Παναγιώτης	Επίκουρος καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης	Καθηγητής Γ.Π.Α.
Χαρουτουιάν Σέρκο,	Καθηγητής Γ.Π.Α.
Γεωργίου Κωνσταντίνος	Καθηγητής Γ.Π.Α.
Γιαλούρης Κωνσταντίνος	Αναπληρωτής καθηγητής Γ.Π.Α.
Κυρανούδης Χρήστος	Αναπληρωτής καθηγητής Ε.Μ.Π.
Σκανδάμης Παναγιώτης	Επίκουρος καθηγητής Γ.Π.Α.
Πανάγου Ευστάθιος	Επίκουρος καθηγητής Γ.Π.Α.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει παραχθεί σε παγκόσμιο επίπεδο ένας τεράστιος όγκος μικροβιολογικών δεδομένων που σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων. Τα δεδομένα αυτά περιλαμβάνονται κατά κύριο λόγο σε εργασίες που έχουν δημοσιευτεί σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και αρκετές από αυτές έχουν αναρτηθεί στο διαδίκτυο, με αποτέλεσμα οι ενδιαφερόμενοι να έχουν εύκολη πρόσβαση σε αυτές μέσω των φιλικών στο χρήστη διαδικτυακών εργαλείων. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι τα δεδομένα που περιλαμβάνονται στις εργασίες αυτές είτε δεν είναι εξ' ολοκλήρου διαθέσιμα ή δεν παρουσιάζονται με οπτικά εύληπτο τρόπο. Επιπλέον, υψηλής ποιότητας χρήσιμα επιστημονικά δεδομένα συχνά δεν συγκεντρώνουν τον απαιτούμενο όγκο που προϋποθέτει η δημοσίευσή τους σε επιστημονικά περιοδικά. Η ανάγκη λοιπόν για τη συστηματοποίηση όλων των πειραματικών μικροβιολογικών δεδομένων για την έγκαιρη πρόβλεψη των πιθανών κινδύνων υποβάθμισης της μικροβιολογικής ποιότητας των τροφίμων ή/και της ασφάλειάς τους, σε σχέση με τις διαδικασίες παραγωγής και αποθήκευσής τους, αποτέλεσαν σημαντικό κίνητρο για την ανάπτυξη μιας βάσης δεδομένων που θα περιέχει-συνδυάζει τις πληροφορίες αυτές. Έτσι, στα πλαίσια εκπόνησης της διατριβής αναπτύχθηκε η βάση δεδομένων LabBase, η οποία εμπεριέχει δεδομένα της απόκρισης των μικροοργανισμών των τροφίμων στις διαφορετικές φυσικοχημικές και περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι χρήστες του λογισμικού αυτού έχουν πρόσβαση σε στοιχεία που επιτρέπουν τη(v): (i) σύγκριση της απόκρισης των μικροοργανισμών μεταξύ διαφορετικών ειδών τροφίμων, (ii) ανάπτυξη σεναρίων για την ανθεκτικότητα νέων τροφίμων, και (iii) εκτίμηση πιθανών κινδύνων υποβάθμισης της μικροβιολογικής ποιότητας κατά την παραγωγή των τροφίμων.

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν δύο επιπλέον λογισμικά για την πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, τα οποία εντάσσονται στον τομέα της πρόβλεψης της μικροβιολογικής αλλοίωσης των τροφίμων. Από αυτά, το λογισμικό UGPM αφορά στην προσομοίωση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα υπό δυναμικές και στατικές συνθήκες θερμοκρασίας. Κίνητρο για την ανάπτυξή του αποτέλεσε το γεγονός ότι τα υφιστάμενα έως τώρα λογισμικά είτε διατίθενται μόνο για εμπορική χρήση ή ενσωματώνουν στον κώδικα τα μικροβιακά μοντέλα, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν στο χρήστη να εισάγει νέα μοντέλα. Επιπρόσθετα, τα ενσωματωμένα μοντέλα βασίζονται είτε σε εργαστηριακά δεδομένα ή προέρχονται

από περιορισμένους συνδυασμούς τροφίμων και μικροοργανισμών. Ο μηχανισμός λειτουργίας του λογισμικού UGPM βασίζεται στο διαφορικό μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994) σε συνδυασμό με το δευτεροταγές μοντέλο τετραγωνικής ρίζας των Ratkowsky et al (1984). Η χρήση του λογισμικού που αναπτύχθηκε επιτρέπει αφενός την πρόβλεψη της δυναμικής των πληθυσμών υπό μεταβαλλόμενες και στατικές συνθήκες θερμοκρασίας, αφετέρου δε την προσομοίωση της αύξησης των μικροοργανισμών σε συνθήκες αποθήκευσης και διακίνησης των τροφίμων. Έτσι, το λογισμικό αυτό αναμένεται να αποτελέσει ένα ιδιαίτερο χρήσιμο –και εύχρηστο– εργαλείο ακόμα και για μη εξειδικευμένους χρήστες.

Το τρίτο λογισμικό που αναπτύχθηκε (GroPIN) σχετίζεται με την πρόβλεψη τόσο της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης, όσο και με αυτήν της ανάπτυξης/αδρανοποίησης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα υπό στατικές συνθήκες. Κίνητρο για την ανάπτυξή του αποτέλεσε το γεγονός ότι είναι εξαιρετικά περιορισμένα τα υφιστάμενα αντίστοιχα λογισμικά και κανένα τους δεν έχει τις δυνατότητες πρόβλεψης που παρέχει το νέο λογισμικό GroPIN. Ο βασικός μηχανισμός του νέου λογισμικού βασίζεται στην επίλυση του μοντέλου πρόβλεψης της πιθανότητας ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης των μικροοργανισμών των τροφίμων καθώς και στο διαφορικό μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994). Επιπλέον περιλαμβάνει τη δυνατότητα επίλυσης μοντέλων επιφανειών απόκρισης. Η χρήση του λογισμικού αυτού επιτρέπει την αξιολόγηση του πιθανού κινδύνου από την αύξηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Τα μικροβιακά μοντέλα που περιλαμβάνονται στο λογισμικό δείχνουν ποιοι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να αναπτυχθούν σε ένα προϊόν και εάν αναπτυχθούν, με τι ταχύτητα θα λάβει χώρα η ανάπτυξή τους.

Ο ανάπτυξη των τριών λογισμικών συνιστά ένα πακέτο μικροβιολογικού λογισμικού το οποίο συνδυαστικά μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο από τη βιομηχανία τροφίμων όσο και από ερευνητικά εργαστήρια για: (i) την πρόβλεψη της επίδρασης των νέων συντηρητικών/αντιμικροβιακών στη μικροβιακή ανάπτυξη, (ii) την πρόβλεψη της μικροβιακής σταθερότητας νέων προϊόντων που προέρχονται από κλασσικά προϊόντα κατόπιν αλλαγής της σύστασής τους, (iii) το σχεδιασμό νέων πειραμάτων, αφού θα είναι δυνατή η εκ των προτέρων εκτίμηση των προσδοκώμενων αποτελεσμάτων αλλά και της πορείας η οποία πρόκειται να ακολουθηθεί. (iv) το σχεδιασμό νέων τροφίμων, με βάση τη χρήση των πληροφοριών από τη βάση δεδομένων (σχετικά με παραπλήσια προϊόντα) σε συνδυασμό με την εκτίμηση των κινδύνων μικροβιακής μόλυνσης από τα λογισμικά μαθηματικής μοντελοποίησης.



Για τη διάδοση των δύο πρώτων λογισμικών έχουν ήδη αναπτυχθεί και αναρτηθεί αντίστοιχες ιστοσελίδες (<http://www.aua.gr/psomas>, και <http://www.aua.gr/psomas/LabBase>) μέσω των οποίων κάθε ενδιαφερόμενος μπορεί χωρίς χρέωση να τα αντιγράψει στο σκληρό δίσκο του υπολογιστή του. Το λογισμικό GroPIN είναι επίσης διαθέσιμο χωρίς χρέωση κατόπιν αίτησης του ενδιαφερομένου στην ομάδα υλοποίησης ([apsomas@aua.gr](mailto:apsomas@aua.gr), [pskan@aua.gr](mailto:pskan@aua.gr)).

Επιστημονική περιοχή: Ποσοτική Μικροβιολογία.

Λέξεις κλειδιά:

Πρωτοταγές μοντέλο, δευτεροταγές μοντέλο, τριτοταγές μοντέλο, βάση δεδομένων της απόκρισης των μικροοργανισμών, λογισμικό, μικροβιολογία πρόρρησης, ποσοτική μικροβιολογία, ασφάλεια των τροφίμων, δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας, πρόβλεψη της μικροβιακής αύξησης, πρόβλεψη της μικροβιακής αδρανοποίησης, επιφάνεια απόκρισης, ανάπτυξη/μη ανάπτυξη, LabBase, UGPM, GroPIN.

# **DEVELOPMENT OF NOVEL PREDICTIVE MODELLING SOFTWARE APPLICATIONS AND DATABASES FOR THE PREDICTION OF GROWTH INITIATION AND MICROBIAL POPULATION DYNAMICS IN RESPONSE TO INTRINSIC AND EXTRINSIC FACTORS IN FOOD ECOSYSTEMS**

## **ABSTRACT**

Over the past two decades, an enormous volume of microbiological data has been produced worldwide and it is readily available mainly via papers which have been published in international journals. The deployment of international databases and search engines for searching and accessing relevant papers in academic journals, archives or other collections have contributed decisively to the rapid spread of such information. However, the data included in these reports are not fully available, or not always with a meaningful visual way. On the other hand, the effective use of published knowledge requires high academic background and the ability of searching for the appropriate sources of information. On the other hand, scientific data of high quality is not included into scientific journals, due to their low quantity. Therefore, the motivation for LabBase database development was the need for systematization of experimental microbiological data and anticipating the potential risks of the foods microbial quality/safety deterioration during their production or storage. LabBase database incorporates compiled data used to predict the growth, survival and death of microbial populations in foods, depending on the intrinsic food properties and the environmental factors. The use of this software allows: (i) The comparison of the microbial responses between the different types of foods, (ii) the design of new food products, and (iii) the assessment of the potential risks of the degradation of the foods microbial quality during manufacturing.

Growth models are fundamental tools in predictive microbiology, especially for Ready-to-Eat foods, since they may assess the exposure of consumers to the doses (levels) of pathogenic bacteria at the time of consumption. Several predictive modeling software have been developed in order to provide predictions of microbial responses in foods by controlling environmental and physicochemical factors and/or food additives. Although, most of these programs are locked and the modification of their models or the addition of new models is not feasible or requires authorization. Furthermore, the embedded models are based mainly on data from laboratory media

or from limited combinations of foods and microorganisms. Therefore, the motivation for UGPM tertiary model development was the need for a readily available and user-friendly software, encompassing various food-microorganism-specific growth models. software encompassing various food-microorganism-specific growth models. The simulation of microbial growth is obtained via the primary model of Baranyi, using momentary growth rates estimates in response to temperature, obtained by square root secondary models. It is capable of providing predictions for the population dynamics of the selected microorganisms-food combinations under static and dynamic temperature conditions. UGPM software is a valuable decision support tool for the Food Industry, by assisting in the management of foods based on their actual shelf-life and microbial safety, thereby limiting the deterministic “best-by” practice for the determination of shelf-life. The latter is commonly based solely on empirical observations and has high uncertainty. This in turn, may result in the rejection of large quantities of unspoiled or safe foods, or even in the distribution of spoiled and unsafe foods, due to ignorance of the effect of temperature abuse on the microbial spoilage and safety of products.

While several food microbial predictive software have been developed in order to provide microbial growth-inactivation kinetics, only a few predictive tools can comprehensively explore various kinds of microbial growth/no growth conditions, and none can explore both growth/no growth conditions and growth-inactivation kinetics under static conditions, simultaneously. GroPIN software constitutes a tertiary simulation model, providing predictions related to the above basic described functions, including the development of ordinary and time-to  $x$  log response surface models. GroPIN software includes a microbial models database, where each equation constitutes a datum, instead of being integrated in the programming language. GroPIN provides information concerning growth/no growth boundary conditions and the kinetics of microorganisms in the case of growth. This software contributes decisively to the efficient and safe production and distribution of processed foods.

The combination of the individual software described above, constitutes a software package, which can be exploited by the Food Industry and the Research Laboratories in order: (i) To predict the effect of the new preservatives and antimicrobial compounds on microbial growth. (ii) To predict the microbial stability of the new products derived from traditional foods, after changing their composition. (iii) The design of new experiments, since it will be possible to assess the expected

results and the experimental procedures which are going to be implemented. (iv) The design of new food products based on the information derived from database (related to similar products) in conjunction with assessing the risk of microbial contamination, derived from the tertiary models. UGPM and LabBase software applications are available free of charge via the corresponding websites (<http://www.aua.gr/psomas>, and <http://www.aua.gr/psomas/LabBase>), while GroPIN software is available upon request ([apsomas@aua.gr](mailto:apsomas@aua.gr), [pskan@aua.gr](mailto:pskan@aua.gr)).

Scientific area: Quantative microbiology

Keywords:

Primary model, secondary model, tertiary model, food microbial responses database, software, predictive microbiology, quantative microbiology, food safety, dynamic temperature conditions, microbial growth prediction, microbial inactivation prediction, response surface, growth/no growth, LabBase, UGPM, GroPIN.

*“Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Γενικό Τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών  
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα”*

*Νόμος 5343/32, άρθρο 202 §2*

*Στη σύζυγό μου Λία, και*

*στις κόρες μου Σταματίνα και Παναγιώτα*

## ΓΝΩΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά απευθύνω θερμά ευχαριστήρια στον καθηγητή Σέρκο Χαρουτουγιάν για την τιμή που μου έκανε να με επιλέξει ώστε να πραγματοποιήσω τη διδακτορική μου διατριβή υπό την καθοδήγησή του. Τον ευχαριστώ θερμά τόσο για τη συμβολή του στην επιλογή του θέματος της διδακτορικής διατριβής όσο και για την παροχή της επιστημονικής του καθοδήγησης, του προσωπικού του ενδιαφέροντος και της εμπιστοσύνης του που μου επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

Θερμά ευχαριστήρια θέλω να απευθύνω τόσο στον επίκουρο καθηγητή Παναγιώτη Σκανδάμη ο οποίος με ανεξάντλητη υπομονή με καθοδήγησε και με δίδαξε ταυτόχρονα ώστε να υλοποιηθούν με επιτυχία οι στόχοι της διατριβής, όσο και στον καθηγητή Γεώργιο - Ιωάννη Νυχά για την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Κωνσταντίνο Γεωργίου, καθηγητή του Γ.Π.Α., Χρήστο Κυρανούδη, αναπληρωτή καθηγητή του Ε.Μ.Π., Κωνσταντίνο Γιαλούρη, αναπληρωτή καθηγητή του Γ.Π.Α. και Ευστάθιο Πανάγου, επίκουρο καθηγητή του Γ.Π.Α. για τη συνεργασία τους και την προθυμία τους συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή. Τέλος, ευχαριστώ πολύ τη διδάκτορα του εργαστηρίου Γενικής Χημείας Σοφία Κουλοχέρη, για τη βοήθειά της καθώς και για τις συμβουλές που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	<b>1</b>
<b>Μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης της απόκρισης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα</b>	<b>1</b>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Αναπαραγωγή και θάνατος ενός μικροβιακού πληθυσμού σύμφωνα με το μοντέλο των Jones & Walker (1993)	3
1.2. Ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης	4
1.2.1. Συναρτήσεις και μοντέλα	4
1.2.2. Ρυθμός και ειδικός ρυθμός	5
1.2.3. Χρόνος διπλασιασμού και χρόνος γενεάς	6
1.2.4. Ενδογενείς παράγοντες και παράγοντες ελέγχου	7
1.2.5. Όσο καλύτερη είναι η προσαρμογή τόσο καλύτερο είναι το μοντέλο;	9
1.2.6. Έμμεσες μετρήσεις της απόκρισης της αύξησης	11
1.3. Συστηματική των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης	12
1.3.1. Κινητικά μοντέλα και μοντέλα πιθανοτήτων	12
1.3.2. Εμπειρικά και μηχανιστικά μοντέλα	16
1.3.3. Πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή μοντέλα	17
1.3.3.1. Πρωτοταγή μοντέλα	17
1.3.3.1.1. Μοντέλα επιβίωσης	25
1.3.3.2. Δευτεροταγή μοντέλα	30
1.3.3.2.1. Ενδογενείς και εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών	30
1.3.3.2.2. Μοντελοποίηση των επιδράσεων των ενδογενών και εξωτερικών συνθηκών στη μικροβιακή ανάπτυξη	33
1.3.3.3. Τριτοταγή μοντέλα	45
1.3.3.3.1. Βάσεις δεδομένων	46
1.3.3.3.2. Λογισμικά πρόβλεψης	48
1.4. Εφαρμογές των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης	50
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>53</b>



	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	<b>70</b>
	<b>Ανάπτυξη και επικύρωση της βάσης δεδομένων LabBase για την απόκριση των μικροοργανισμών των τροφίμων στις διαφορετικές φυσικοχημικές και περιβαλλοντικές συνθήκες</b>	<b>70</b>
	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	70
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ	72
2.1	Οργάνωση των δεδομένων της μικροβιακής απόκρισης	73
2.2	LabBase Navigator: Η υποστηρικτική εφαρμογή της βάσης δεδομένων LabBase	76
2.3	Ανάπτυξη καινοτόμου μηχανισμού αποθήκευσης/επαναφοράς δεδομένων	79
2.3.1	Μελέτη περίπτωσης: Επαναφορά αποθηκευμένων συνόλων δεδομένων	81
2.4	Σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης	83
2.5	Περιορισμοί κατά τη σύγκριση των μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης	85
2.6	Επικύρωση της βάσης δεδομένων LabBase	87
2.7	Διαθεσιμότητα λογισμικού	87
2.8	Χρηστικότητα	89
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	90
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	<b>98</b>
	<b>Ανάπτυξη και επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου προσομοίωσης UGPM για την πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών των τροφίμων κάτω από δυναμικές και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας</b>	<b>98</b>
	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	98
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ	101
3.1	Μαθηματική θεώρηση του τριτοταγούς μοντέλου UGPM	101
3.2	Περιγραφή των λειτουργιών του λογισμικού	104
3.3	Η βάση δεδομένων των μικροβιακών μοντέλων	106
3.3.1	Διαχείριση της βάσης δεδομένων	109
3.4	Προσαρμογή του διαφορικού μοντέλου στο λογισμικό	112
3.5	Πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας	115

3.6	Μηχανισμός παρεμβολής των δεδομένων χρόνου-θερμοκρασίας	118
3.6.1	Μελέτη περίπτωσης 1: Πρόβλεψη της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων στην τυροσαλάτα “Τυροκαφετή”	120
3.7	Πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό στατικές συνθήκες θερμοκρασίας	122
3.7.1	Η έκδοση της στατικής προσομοίωσης αποτελεί υποπερίπτωση της αντίστοιχης δυναμικής	123
3.8	Συγκριτικές προβλέψεις μέχρι 4 διαφορετικές θερμοκρασίες	124
3.8.1	Μελέτη περίπτωσης 2: Συγκριτική πρόβλεψη της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων στην τυροσαλάτα “Τυροκαφετή”	124
3.9	Επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου “UGPM”	126
3.10	Διαθεσιμότητα λογισμικού	128
3.11	Χρηστικότητα	128
	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	130
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	133
	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	<b>137</b>
	<b>Ανάπτυξη και επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου GroPIN για την πρόβλεψη της πιθανότητας ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης και της κινητικής της ανάπτυξης/αδρανοποίησης των μικροοργανισμών των τροφίμων</b>	<b>137</b>
	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	137
	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ</b>	138
4.1	Η βάση δεδομένων των μικροβιακών μοντέλων	141
4.2	Περιγραφή των λειτουργιών του λογισμικού GroPIN	146
4.3	Εισαγωγή μικροβιακών μοντέλων στη βάση δεδομένων	147
4.3.1	Μελέτη περίπτωσης 1: Εισαγωγή ενός μη γραμμικού μοντέλου στη βάση δεδομένων	151
4.3.2	Μελέτη περίπτωσης 2: Εισαγωγή ενός γραμμικού μοντέλου στη βάση δεδομένων	155
4.4	Επιλογή ενός μικροβιακού μοντέλου	156
4.5	Διόρθωση και διαγραφή ενός μικροβιακού μοντέλου	159
4.5.1	Εισαγωγή βιβλιογραφικών δεδομένων αναφοράς ενός μικροβιακού μοντέλου	160

4.6	Πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού ενός μικροβιακού μοντέλου	161
4.6.1	Έλεγχος δεδομένων ενεργού μοντέλου	164
4.7	Μέθοδος επίλυσης του μοντέλου ανάπτυξης/μη ανάπτυξης	164
4.7.1	Μηχανισμός επίλυσης του μοντέλου ανάπτυξης/μη ανάπτυξης	166
4.7.2	Γραφική απεικόνιση της πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης	167
4.7.2.1	Μετατροπή της μεταβλητής του άξονα $y$ από $b_w$ σε $a_w$	169
4.7.2.2	Σύγκριση τριών μεσεπιφανειών ανάπτυξης/μη ανάπτυξης για δεδομένη μεταβλητή	170
4.8	Επίλυση κινητικών μοντέλων	171
4.8.1	Ανάπτυξη μοντέλων επιφάνειας απόκρισης	174
4.8.2	Μηχανισμός ανάπτυξης του Διαφορικού Μοντέλου των Baranyi & Roberts, 1994	175
4.9	Ανάπτυξη μοντέλων επιφάνειας απόκρισης	177
4.10	Μηχανισμός μοντέλων επιφάνειας απόκρισης	178
4.11	Ανάπτυξη μοντέλων επιφάνειας απόκρισης που εμπεριέχουν τον υπολογισμό του χρόνου για δεδομένη λογαριθμική αύξηση/μείωση	182
4.12	Επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου GroPIN	183
	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	187
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	190
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	193
	Δημοσιεύσεις	193
	Ιστοσελίδες διάδοσης λογισμικών	193
	Παρουσιάσεις σε συνέδρια	193

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### Μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης της απόκρισης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο διαρκώς αυξανόμενος αριθμός κρουσμάτων τροφικής δηλητηρίασης -σε παγκόσμιο επίπεδο- έχει αυξήσει την ανησυχία των καταναλωτών σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων (Maurice, 1994). Η δημόσια ανησυχία εντάθηκε περαιτέρω τη δεκαετία του 1980 εξαιτίας της εξάπλωσης της νόσου της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας (bovine spongiform encephalopathy, BSE) στα βοοειδή της Μεγάλης Βρετανίας, καθώς και των εκτεταμένων μολύνσεων των τροφίμων από το βακτήριο *Escherichia coli* O157:H7 στις ΗΠΑ (1992-1993), Σκωτία (1996) και Ιαπωνία (1996) (Sato et al., 2003). Τα γεγονότα αυτά, σε συνδυασμό με την πίεση που ασκούν οι καταναλωτές για πρόσβαση σε μεγαλύτερη ποικιλία λιγότερο επεξεργασμένων ή/και νωπών τροφίμων, δημιούργησαν την ανάγκη για παροχή εγγυήσεων στην ασφάλεια των τροφίμων η οποίες θα βασίζονται σε ταχείες και ακριβείς μεθόδους (McDonald & Sun, 1999).

Οι Roberts & Jarvis (1983) αμφισβήτησαν την αποτελεσματικότητα των συμβατικών μικροβιολογικών μεθόδων στην εκτίμηση της ασφάλειας των τροφίμων, θεωρώντας τις δαπανηρές που δεν παρέχουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό προτάθηκε μία νέα εναλλακτική μέθοδος, η οποία βασίζεται στην καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας των μικροοργανισμών και των αποκρίσεών τους σε κρίσιμους παράγοντες ελέγχου, όπως είναι η θερμοκρασία. Στα πλαίσια εφαρμογής της μεθόδου αυτής, συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε εργαστηριακά μέσα και υποβάλλονται σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ παράλληλα καταγράφονται οι αποκρίσεις τους. Αρχικά αναπτύχθηκαν βάσεις δεδομένων για την καταχώρηση των μετρήσεων και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν διαδικασίες παρεμβολής δεδομένων - αλληλεπίδρασης των βάσεων δεδομένων με τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης. Η νέα αυτή μεθοδολογία αναπτύχθηκε υπό τις εξής προϋποθέσεις:

(i) Οι αποκρίσεις των μικροοργανισμών στις διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες να είναι συνεπείς.

(ii) Η επανάληψη των μετρήσεων να οδηγεί στα ίδια αποτελέσματα (Ross & McMeekin, 1994).

Η μοντελοποίηση δεν είναι σε θέση να προβλέπει με αναμενόμενες μικροβιακές αποκρίσεις, όμως μπορεί να προβλέψει την επίδραση πολλαπλών μεταβλητών στην απόκριση των μικροοργανισμών χωρίς να χρειαστεί να διαπιστωθούν αυτές εργαστηριακά (Cole, 1991, Hedges, 1991). Με βάση τη λογική αυτή, οι εργαστηριακές δοκιμές θα μπορούσαν να αντικατασταθούν εξ' ολοκλήρου ή εν μέρει από μία μεθοδολογία η οποία περιγράφεται ως προρρητική μικροβιολογία τροφίμων (predictive food microbiology) (Whiting, 1997).

Η προρρητική μικροβιολογία αποτελεί ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο της μικροβιολογίας τροφίμων, το οποίο κατά τα τελευταία έτη έχει προσελκύσει ένα σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον (McDonald & Sun, 1999). Ενσωματώνει πολλά επιστημονικά αντικείμενα, όπως τα μαθηματικά, τη μηχανική, τη χημεία και τη μικροβιολογία, παρέχοντας προβλέψεις της μικροβιακής συμπεριφοράς για συγκεκριμένα τρόφιμα κάτω από δεδομένες συνθήκες (Zwietering et al., 1990, 1993, Whiting & Buchanan, 1994, Peleg, 1997, Schaffner & Labuza, 1997). Κατά τη τελευταία δεκαετία η βελτίωση της απόδοσης των προσωπικών υπολογιστών συνέβαλε καθοριστικά στην εξέλιξη του νέου αυτού επιστημονικού πεδίου. Εντούτοις, παρά την πρόοδο που σημείωσε, ο χαρακτήρας του παραμένει κυρίως ερευνητικός, ενώ αξιοποιείται λιγότερο από τη βιομηχανία τροφίμων. Ένα μεγάλο πρόβλημα εντοπίζεται στο γεγονός ότι τα επικυρωμένα μοντέλα προέρχονται κυρίως από καλλιέργειες συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε εργαστηριακά μέσα και υπό δεδομένες συνθήκες (McMeekin et al., 1987). Τα αντίστοιχα μοντέλα που προέρχονται από πραγματικά προϊόντα τροφίμων συνήθως παρουσιάζουν δυσκολίες στην ανάπτυξη προβλέψεων ακριβείας, με αποτέλεσμα -όπως έδειξε ο Gill (1982)- η διαφοροποίηση στις προβλέψεις να είναι αναπόφευκτη για τρόφιμα πολύπλοκης σύστασης, όπως το κρέας. Για το λόγο αυτό, οι Houtsma et al. (1996) συνιστούν την ανάπτυξη και επικύρωση μοντέλων που προέρχονται από δεδομένα συγκεκριμένων προϊόντων με βάση το κρέας (McDonald & Sun, 1999).

Στο πλαίσιο αυτό μαθηματικά μοντέλα που συνοψίζουν τις αποκρίσεις των μικροοργανισμών σε διάφορους φυσικοχημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες χρησιμοποιούνται για να παρέχουν αντικειμενικές εκτιμήσεις των κινδύνων που αφορούν σε τροφογενείς λοιμώξεις, τροφικές δηλητηριάσεις ή αλλοιώσεις σε ειδικές περιπτώσεις (Ross & McMeekin, 1995).

*1.1. Αναπαραγωγή και θάνατος ενός μικροβιακού πληθυσμού σύμφωνα με το μοντέλο των Jones & Walker (1993)*

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα τρόφιμα ως υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους. Όταν βρεθούν σε κατάλληλο υπόστρωμα και ιδανικές συνθήκες πολλαπλασιάζονται με μεγάλη ταχύτητα. Ο ρυθμός μεταβολής του μεγέθους ενός μικροβιακού πληθυσμού ελέγχεται τόσο από το ρυθμό της διαίρεσης των κυττάρων του, όσο και από το ρυθμό θανάτου τους σύμφωνα με τη γενική εξίσωση (Jones & Walker, 1993):

$$\frac{d}{dt} N = \frac{d}{dt} G - N \cdot \frac{d}{dt} M \quad (1.1)$$

όπου,

$N$  είναι το μέγεθος του πληθυσμού,

$t$ , είναι ο χρόνος

$\frac{d}{dt} G$  είναι ο ρυθμός γέννησης (διαίρεσης) κατ' άτομο, και

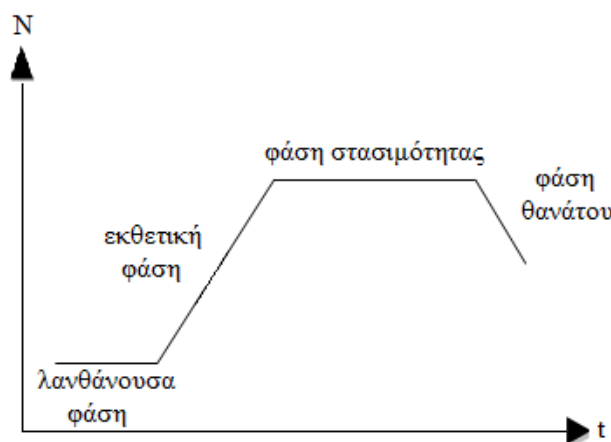
$\frac{d}{dt} M$  είναι ο ρυθμός θνησιμότητας κατ' άτομο.

Η **εξίσωση 1.1** περιγράφει την αναπαραγωγή και το θάνατο ενός μικροβιακού πληθυσμού. Όταν ένας μικροβιακός πληθυσμός τοποθετείται σε ένα τρόφιμο, τότε υποβάλλεται σε περίοδο προσαρμογής, η διάρκεια της οποίας εξαρτάται εν μέρει από το περιβάλλον. Εάν οι συνθήκες ανάπτυξης είναι οι βέλτιστες, τότε η περίοδος προσαρμογής του μπορεί να είναι σύντομη. Σε λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες ο πληθυσμός μπορεί να χρειαστεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστεί. Κατά την περίοδο προσαρμογής (λανθάνουσα φάση ή φάση καθυστέρησης, lag phase) το μέγεθος του πληθυσμού μπορεί να διατηρείται σταθερό. Ο μικροοργανισμός προσαρμόζει τη φυσιολογία και βιοχημεία του στο νέο του περιβάλλον, ενώ δύσκολα μπορεί να παρατηρηθεί κάποια μεταβολή στο μέγεθός του (Pirt, 1975). Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής και όταν οι συνθήκες είναι μη ευνοϊκές, είναι δυνατό να παρατηρηθεί μείωση στο μέγεθος του πληθυσμού η οποία αντιστοιχεί στον αρχικά αυξανόμενο ρυθμό θανάτου (Jones & Walker, 1993).

Η φάση αυτή ακολουθείται από μία περίοδο εκθετικής αύξησης του μεγέθους του πληθυσμού (εκθετική φάση), οπότε το σύνολο της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων κατευθύνεται στην αναπαραγωγή. Όλα τα συστατικά των κυττάρων

βρίσκονται σε σταθερές αναλογίες και τα κύτταρα θεωρούνται για πρακτικούς λόγους φυσιολογικά ταυτόσημα. Σε τακτικά χρονικά διαστήματα διπλασιάζεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών  $N$  (εκφράζεται με το λογάριθμο της πυκνότητας των κυττάρων), ενώ ο ρυθμός θανάτου του είναι χαμηλός (Jones & Walker, 1993).

Τόσο η διαρκής συσσώρευση των μεταβολιτών στο περιβάλλον ανάπτυξης των μικροοργανισμών όσο και η ελάττωση του θρεπτικού υλικού αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες που συντελούν στη βαθμιαία μείωση του ρυθμού αύξησης του αριθμού των κυττάρων, έως το μέγιστο μέγεθος που μπορεί να φθάσει ο πληθυσμός. Τότε ο μικροβιακός πληθυσμός εισέρχεται στη φάση της στασιμότητας, στην οποία η ανάπτυξη των κυττάρων εξισώνεται με το θάνατό τους. Στο στάδιο κατά το οποίο η συγκέντρωση των τοξινών που προέρχεται από τις μεταβολικές τους δραστηριότητες και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών φθάσουν σε βαθμό ώστε ο ρυθμός θανάτου των κυττάρων να είναι μεγαλύτερος από την ικανότητα του περιβάλλοντος να υποστηρίξει την κυτταρική τους διαίρεση (φάση θανάτου), τότε το μέγεθος της μικροβιακής πυκνότητας μειώνεται μέχρι το θάνατο της καλλιέργειας (**Εικόνα 1.1**) (Jones & Walker, 1993).



**Εικόνα 1.1** Σχηματική παράσταση των φάσεων ανάπτυξης ενός μικροβιακού πληθυσμού (Πηγή: McKellar & Lu, 2004)

## 1.2. Ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης

### 1.2.1. Μοντέλα και συναρτήσεις

Ο όρος μοντέλο έχει οριστεί σε πολλές εξαιρετικές ανασκοπήσεις περί της μαθηματικής μοντελοποίησης ή των μικροβιολογικών διεργασιών (πχ. Roels & Kossen, 1978). Ένα καθαρά εμπειρικό μοντέλο, όπως είναι η τετραγωνική επιφάνεια

απόκρισης για την περιβαλλοντική εξάρτηση μίας παραμέτρου ενός βακτηριακού πληθυσμού (Gibson et al., 1988) αποτελεί επίσης ένα μοντέλο, αλλά ο στόχος του δεν είναι τίποτε περισσότερο από μία ομαλή αναπαράσταση των πειραματικών δεδομένων. Αποτελεί μοντέλο με την έννοια που χρησιμοποιείται στην ανάλυση παλινδρόμησης της στατιστικής, όπου στόχος είναι η αριθμητική αναπαράσταση ορισμένων αποκρίσεων με έννοιες απλών συναρτήσεων όπως τα πολυώνυμα, χωρίς μηχανιστική εξήγηση.

Ωστόσο, ο όρος μαθηματικό μοντέλο είναι αυστηρότερος και αναφέρεται σε μια αλληλουχία βασικών υποθέσεων σχετικά με τις διεργασίες που μελετούνται. Μερικές από αυτές ενδεχομένως να εκφράζονται με έννοιες συναρτήσεων και διαφορικών εξισώσεων. Για το λόγο αυτό, από μία μηχανιστική εκδοχή, η συνάρτηση και το μοντέλο δεν αποτελούν ισοδύναμους όρους. Η συνάρτηση είναι μία μαθηματική σύνοψη η οποία καθιστά ευκολότερη την περιγραφή ενός συγκεκριμένου μοντέλου (Baranyi & Roberts, 1995). Για παράδειγμα, ο ορισμός του μοντέλου αύξησης Gompertz (Turner et al., 1976) βασίζεται στην υπόθεση ότι ο στιγμιαίος ειδικός ρυθμός αύξησης μίας ποσότητας  $\mu(t)$ , συνδέεται με το στιγμιαίο ποσό  $x(t)$  εκείνης της ποσότητας μέσω της εξίσωσης:

$$\mu(t) = c \cdot \ln \frac{x_{\max}}{x(t)} \quad (1.2)$$

όπου  $x_{\max}$  είναι η μέγιστη τιμή του  $x(t)$  και  $c$  είναι μία σταθερά του μοντέλου. Αυτό οδηγεί σε μία διαφορική εξίσωση η λύση της οποίας αποτελεί τη συνάρτηση Gompertz. Η συνάρτηση αυτή, η οποία ολοκληρώθηκε με έναν πρόσθετο όρο, προσαρμόστηκε από τους Gibson et al. (1988) στη λογαριθμική μορφή των συγκεντρώσεων των κυττάρων. Συνεπώς, η σιγμοειδής καμπύλη που προκύπτει πρέπει να καλείται συνάρτηση Gompertz, αλλά από μηχανιστικής άποψης δεν είναι σωστό να καλείται μοντέλο Gompertz. Παρόλα αυτά, στα εγχειρίδια της ανάλυσης παλινδρόμησης, ο όρος μοντέλο χρησιμοποιείται ευρύτατα για μία συνάρτηση μίας συγκεκριμένης μορφής, ανεξάρτητα από το πως προέκυψε η συνάρτηση αυτή (Baranyi & Roberts, 1995).

### 1.2.2. Ρυθμός και ειδικός ρυθμός

Έστω  $x(t)$  είναι μία χρονικά εξαρτώμενη μεταβλητή η οποία περιγράφει τη διακύμανση μίας συγκεκριμένης ποσότητας, όπως η βιομάζα ή η συγκέντρωση των



κυττάρων. Ο στιγμιαίος ρυθμός της διεργασίας εκφράζεται με την πρώτη παράγωγο της μεταβλητής  $x(t)$  δηλαδή  $\frac{d}{dt}x(t)$ .

Τότε ο ειδικός ρυθμός  $\mu(t)$  ορίζεται με την εξίσωση:

$$\mu(t) = \frac{d \frac{x(t)}{dt}}{x(t)} \quad (1.3)$$

Εάν  $x(t)$  είναι η συγκέντρωση των κυττάρων σε μία καλλιέργεια βακτηρίων, τότε ο ρυθμός αύξησης είναι η απόλυτη αύξηση στη συγκέντρωση των κυττάρων ανά μονάδα χρόνου, ενώ ο ειδικός ρυθμός αύξησης είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων ανά μονάδα χρόνου ανά κύτταρο. Ένας απλός υπολογισμός δείχνει ότι εάν η  $x(t)$  είναι θετική, τότε

$$\mu(t) = \frac{d}{dt} \ln x(t) \quad (1.4)$$

Για το λόγο αυτό, ο ειδικός ρυθμός αύξησης μετριέται με την κλίση της καμπύλης αύξησης στη γραφική απεικόνιση του φυσικού λογάριθμου του  $x(t)$  ως προς το χρόνο. Εάν αντί του φυσικού λογάριθμου χρησιμοποιηθεί ο λογάριθμος με βάση το 10 ( $\log_{10}$ ), τότε η μετρούμενη κλίση θα είναι  $\ln(10) \approx 2.3$  φορές μικρότερη από τον ειδικό ρυθμό αύξησης (Baranyi & Roberts, 1995).

### 1.2.3. Χρόνος διπλασιασμού και χρόνος γενεάς

Σύμφωνα με τους Baranyi & Roberts (1995), σε ένα προκαθορισμένο χρόνο,  $t_{fix}$ , έστω ότι η τιμή του  $\mu(t)$  είναι  $\mu(t_{fix}) = \mu_{fix}$ . Η εξίσωση του χρόνου διπλασιασμού

(doubling time)  $T_d = \frac{\ln 2}{\mu_{fix}} \approx \frac{0.69}{\mu_{fix}}$  σημαίνει ότι εάν ο  $\mu(t)$  παρέμενε ο ίδιος τότε στο

χρονικό διάστημα  $t_{fix} + T_d$  η συγκέντρωση των κυττάρων θα ήταν διπλάσια από εκείνη στο χρονικό διάστημα  $t_{fix}$ . Είναι σημαντικό να διατυπωθεί ότι σε ασύγχρονες καλλιέργειες ο χρόνος διπλασιασμού  $T_d$  δεν είναι ισοδύναμος με το μέσο χρόνο γενεάς (mean generation time). Στην πραγματικότητα, ο μέσος χρόνος γενεάς μπορεί να εκτιμηθεί καλύτερα ως  $1/\mu_{fix}$  παρά ως  $0.69/\mu_{fix}$ , εάν η διαίρεση των κυττάρων μπορεί να προσεγγιστεί με μία τυχαία διαδικασία γέννησης όπως η διαδικασία Poisson (Rubinow, 1984).

#### 1.2.4. Ενδογενείς παράγοντες και παράγοντες ελέγχου

Έστω ότι μία διεργασία βακτηρίων μοντελοποιείται από μία συνάρτηση  $x(t)=f(\mathbf{p},t)$ , όπου το διάνυσμα  $\mathbf{p}$  περιλαμβάνει τις παραμέτρους του μοντέλου. Αυτές οι παράμετροι εξαρτώνται από τα συγκεκριμένα βακτήρια που χρησιμοποιούνται και από τις συνθήκες του πειράματος (πιθανώς χρονικά εξαρτημένες), οι οποίες επηρεάζονται από τον ερευνητή. Σκόπιμος θεωρείται ο διαχωρισμός του διανύσματος  $\mathbf{p}$  σε  $\mathbf{p}_1$  και  $\mathbf{p}_2$ , όπου  $\mathbf{p}_1$  είναι ανεξάρτητο του ερευνητή και  $\mathbf{p}_2$  εξαρτημένο από αυτόν. Στην περίπτωση αυτή, τα στοιχεία που απαρτίζουν το διάνυσμα  $\mathbf{p}_1$  καλούνται ενδογενείς παράμετροι, ενώ εκείνα του  $\mathbf{p}_2$ , παράμετροι ελέγχου. Αυτή είναι συχνά η κατάσταση κατά την οποία το μοντέλο περιγράφεται από ένα σύστημα διαφορικών εξισώσεων, οι παράμετροι των οποίων αποτελούν ενδογενείς παραμέτρους, αλλά οι αρχικές τιμές οι οποίες πρέπει να δίνονται ώστε να προκύψει συγκεκριμένη λύση για τη διαφορική εξίσωση, εξαρτώνται κυρίως από τον ερευνητή (Baranyi & Roberts, 1995).

Για παράδειγμα ένα απλό μοντέλο το οποίο δεν περιέχει φάση καθυστέρησης σε κλειστή καλλιέργεια είναι:

$$\frac{d}{dt}x(t) = \mu_0 x(t) \quad (1.5)$$

$$x(0) = x_0$$

όπου  $x(t)$  είναι η χρονικά εξαρτώμενη βακτηριακή συγκέντρωση,  $x_0$  είναι η τιμή τη χρονική στιγμή  $t=0$ , και

$\mu_0$  είναι ο σταθερός ειδικός ρυθμός αύξησης.

Η λύση του ανωτέρω μοντέλου, το οποίο καλείται πρόβλημα αρχικής τιμής είναι:

$$x(t) = x_0 \cdot e^{\mu_0 t} \quad (1.6)$$

Σε αυτό το μοντέλο,

$$\mathbf{p}=(\mu_0, x_0),$$

όπου

$\mu_0$  είναι μία ενδογενής, και

$x_0$  είναι μία παράμετρος ελέγχου.

Είναι αρκετά εύκολο να μετασχηματιστεί η συνάρτηση του μοντέλου απαλείφοντας αυτόν τον καθαρό διαχωρισμό π.χ:

$$x(t) = (q_1 + q_2) \cdot e^{(q_1 - q_2)t}$$

όπου

$$q_1 = \frac{x_0 + \mu_0}{2} \quad (1.7)$$

και

$$q_2 = \frac{x_0 - \mu_0}{2} \quad (1.8)$$

Σε αυτή τη μορφή της συνάρτησης του μοντέλου, οι παράμετροι  $q_1$  και  $q_2$  δεν αποτελούν αποκλειστικά ενδογενείς παραμέτρους ή παραμέτρους ελέγχου. Συνεπώς, δε θα ήταν φρόνιμη η μοντελοποίηση των παραμέτρων  $q_1$  και  $q_2$  ως συνάρτηση της επίδρασης του περιβάλλοντος στην αύξηση των βακτηρίων επειδή και οι δύο παράμετροι εξαρτώνται από τον ερευνητή. Η συγκεκριμένη διαδικασία μοντελοποίησης είναι ορθή μόνο εάν υποθεθεί ότι η παράμετρος  $x_0$  είναι δεδομένη και ότι το μοντέλο χρησιμοποιείται για πρόβλεψη μόνο στη δεδομένη παράμετρο  $x_0$ . Ένα τέτοιο μοντέλο θα είχε περιορισμένη πρακτική σημασία. Παρόλα αυτά υπάρχουν περιπτώσεις όπου παρόμοιος προσωρινός μετασχηματισμός είναι χρήσιμος για άλλους λόγους, όπως η αριθμητική ευστάθεια ή η σχεδόν γραμμική συμπεριφορά (Ratkowsky, 1983). Είναι σημαντικό ωστόσο να ληφθεί υπόψη ότι οι διάφοροι μετασχηματισμοί αποσκοπούν σε υπολογιστικούς και όχι μηχανιστικούς λόγους (Baranyi & Roberts, 1995).

Ο μετασχηματισμός της συνάρτησης Gompertz αναλύθηκε από τον Garthright (1991) και Baranyi (1992a,b). Μία συνηθισμένη μορφή της συνάρτησης Gompertz είναι:

$$g(t) = a + c \cdot EXP\{-EXP[-b \cdot (t - m)]\} \quad (1.9)$$

όπου  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  είναι οι παράμετροι της συνάρτησης (Gibson et al., 1988, Buchanan & Phillips, 1990).

Η μέγιστη κλίση της καμπύλης είναι:

$$\mu_{\max} = \frac{b \cdot c}{e} \quad (1.10)$$

Εάν η συνάρτηση  $g(t)$  προσαρμοστεί στο φυσικό λογάριθμο της συγκέντρωσης των κυττάρων τότε η νέα παράμετρος,  $\mu_{\max}$ , θα αποτελέσει μία εκτίμηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης εκείνης της καλλιέργειας. Εάν δεχτούμε ότι το συγκεκριμένο περιβάλλον στο οποίο ένας ομοιογενής πληθυσμός είναι δυνατό να αυξηθεί, καθορίζει το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (Rubinow, 1984), τότε η παράμετρος  $\mu_{\max}$  αποτελεί μία ενδογενή παράμετρο του μοντέλου.

Η διαφορά μεταξύ της ανώτερης ασύμπτωτης και του επιπέδου εμβολιασμού το οποίο εκτιμάται από την παράμετρο  $c$ , εξαρτάται από τον ερευνητή που μπορεί να αποφασίσει ένα υψηλότερο ή χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού. Ως εκ τούτου, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης  $\mu_{\max}$  δεν αποτελεί ενδογενή παράμετρο αλλά ούτε είναι καθαρά μία παράμετρος ελέγχου επειδή προφανώς εξαρτάται από μερικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων. Για το λόγο αυτό ούτε η παράμετρος

$$b = \mu_{\max} \cdot \frac{e}{c} \quad (1.11)$$

αποτελεί μία ενδογενή παράμετρο επειδή αυτή πρέπει να εξαρτάται από την τιμή του εμβολίου. Συνεπώς, η περιβαλλοντική εξάρτηση της παραμέτρου  $b$  δεν θα έπρεπε να μοντελοποιηθεί εκτός από την περίπτωση που το επίπεδο εμβολιασμού είναι το ίδιο, προκαθορισμένο και σταθερό για τα πειράματα και τις καμπύλες αύξησης για τις οποίες δίνεται η πρόβλεψη.

Εντούτοις, η **μορφή 1.9** της συνάρτησης  $g(t)$  μπορεί να είναι χρήσιμη από υπολογιστική άποψη, και, ανάλογα με το σύνολο δεδομένων στο οποίο εφαρμόζεται, μπορεί να εμφανίζει ελαφρώς καλύτερα στατιστικά χαρακτηριστικά (όπως έχει εξηγηθεί από τον Baranyi, 1992a,b) από ότι ο μετασχηματισμός ο οποίος προτείνεται από τους Zwietering et al. (1990) και Garthright (1991). Δεν υπάρχει καμία αντίφαση με τη χρήση της μορφής  $(a,c,b,m)$  της συνάρτησης  $g(t)$  για την προσαρμογή της καμπύλης και στη συνέχεια της μοντελοποίησης της επίδρασης του περιβάλλοντος στην **παράμετρο 1.10**. Οι Baranyi et al., 1993 υπογραμμίζουν ότι η συνάρτηση Gompertz δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιείται για να προσαρμόζει το λογάριθμο της βακτηριακής συγκέντρωσης σε κάθε μορφή. Συνεπώς, σύμφωνα με τους Baranyi & Roberts (1995) είναι ατυχές ότι οι Gibson et al. (1988) και Buchanan et al. (1990) χαρακτηρίζουν την παράμετρο  $b$  “σχετικό ρυθμό αύξησης”.

#### *1.2.5. Όσο καλύτερη είναι η προσαρμογή τόσο καλύτερο είναι το μοντέλο;*

Σύμφωνα με τους Baranyi & Roberts (1995) η προσαρμογή μίας τετραγωνικής επιφάνειας απόκρισης στις εκτιμήσεις του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης ή σε έναν από τους μετασχηματισμούς του π.χ. λογαριθμικό ή τετραγωνικής ρίζας (McMeekin et al., 1993) είναι μία ξεκάθαρη και απλή λύση όσον αφορά στην απεικόνιση της περιβαλλοντικής εξάρτησης της μοντελοποιημένης παραμέτρου. Οι τετραγωνικές συναρτήσεις πολλών μεταβλητών αποτελούν φυσικές γενικεύσεις των

πολυωνύμων δεύτερης τάξης. Οι Buchanan & Philips (1990), κατά τη μέτρηση της περιβαλλοντικής εξάρτησης των κινητικών παραμέτρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, βασιζόμενοι σε ένα F-test, πρότειναν ότι ένα πολυώνυμο τρίτης τάξης με πολλές μεταβλητές παρείχε μία καλύτερη περιγραφή των δεδομένων τους. Η ιδέα έγινε δεκτή από τον Hudson (1993), ο οποίος κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η επιφάνεια τρίτης τάξης αποτελούσε καλύτερο μοντέλο για τα δεδομένα του από την τετραγωνική επιφάνεια. Πριν όμως χρησιμοποιηθούν οι πολυδιάστατες εκδοχές της τέταρτης τάξης ή και ακόμα υψηλότερων τάξεων πολυωνύμων, αξίζει να ερευνηθεί η βαρύτητα αυτής της προσέγγισης (Baranyi & Roberts, 1995).

Είναι γνωστό ότι, γενικά, όσο περισσότερες παραμέτρους περιλαμβάνει ένα μοντέλο τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή που μπορεί να παράγει. Το στατιστικό  $R^2$ , το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της προσαρμογής στο σύνολό της, προφανώς δε μπορεί από μόνο του να καταδειξει εάν ένα μοντέλο αποτελεί βελτίωση ή όχι. Ακόμα και το F-test, το οποίο λαμβάνει υπόψη του τον αριθμό των παραμέτρων του μοντέλου δεν αποτελεί ένα απόλυτο εργαλείο μέτρησης. Οι Baranyi & Roberts (1995), έδειξαν ότι παρά το γεγονός ότι οι επιφάνειες απόκρισης είναι χρήσιμες από ποσοτική άποψη, εντούτοις, κάθε συμπέρασμα σχετικά με το σχήμα της συνάρτησης (ποιοτικό χαρακτηριστικό), το οποίο αποτελεί έκφραση του πραγματικού μοντέλου θα έπρεπε να γίνει αποδεκτό με σοβαρές επιφυλάξεις, ειδικά για περιοχές για τις οποίες υπάρχουν σχετικά λίγα δεδομένα. Γενικά ισχύει ότι όσο πιά μεγάλη είναι η τάξη ενός πολυωνύμου, τόσο περισσότερους λόφους και κοιλάδες μπορεί να παράγει. Ένα πολυώνυμο μεγάλης τάξης είναι δυνατό να ακολουθήσει τα τυχαία, προς τα πάνω και προς τα κάτω, σφάλματα των μετρήσεων. Εντούτοις, στόχο αποτελεί περισσότερο η εξάλειψη αυτών των τυχαίων σφαλμάτων παρά η προσαρμογή τους. Από την άλλη μεριά, ο βαθμός του πολυωνύμου που χρησιμοποιείται στο μοντέλο, καθορίζει συγκεκριμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά της καμπύλης. Ένα πολυώνυμο πρώτης τάξης δεν παρουσιάζει ελάχιστο ή μέγιστο. Ένα πολυώνυμο δεύτερης τάξης είναι συμμετρικό γύρω από το μέγιστό του ή το ελάχιστό του. Το πολυώνυμο τρίτης τάξης έχει ένα σημείο καμπής κ.α. Μία πιθανή βελτίωση του μοντέλου αποτελεί ο καθορισμός μερικών αναμενόμενων ιδιοτήτων της συνάρτησης απόκρισης. Για παράδειγμα, η αναμενόμενη θέση των άκρων της συνάρτησης, η μονοτονία της, η κυρτότητά της κ.α. (Baranyi & Roberts, 1995).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μετασχηματισμού μίας μεταβλητής ενός μοντέλου είναι στο μοντέλο Arrhenius, όπου εισήχθει η παράμετρος:

$$T' = \frac{1}{T - T_0} \quad (1.12)$$

για τη θερμοκρασία  $T$ , με  $T_0 = -273^\circ\text{C}$ .

Επίσης, οι Gibson et al. (1994) μετασχημάτισαν τη μεταβλητή  $a_w$  μετρώντας την ενεργότητα του νερού με το υποκατάστατό της:

$$b_w = \sqrt{1 - a_w} \quad (1.13)$$

Αυτά τα παραδείγματα δείχνουν ότι αντί για πολύωνυμα με μεγάλες τάξεις, τα οποία παράγουν περισσότερους λόφους και κοιλάδες, είναι γενικά πιο συμφέρουσα η αναζήτηση κατάλληλων μετασχηματισμών τόσο για τις επεξηγηματικές όσο και για τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Καλύτερη προσαρμογή δεν σημαίνει απαραίτητα ένα καλύτερο μοντέλο, ειδικά με όρους ποσοτικών χαρακτηριστικών τα οποία διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στο επόμενο στάδιο της εφαρμογής του μοντέλου για πρόβλεψη (Baranyi & Roberts, 1995).

#### 1.2.6. Έμμεσες μετρήσεις της απόκρισης της αύξησης

Όπως αναφέρουν οι Baranyi & Roberts (1995), είναι λογικό να θεωρηθεί ότι η συγκέντρωση των κυττάρων  $x(t)$  είναι η βασική μεταβλητή σε μια καλλιέργεια βακτηρίων από την οποία ο στιγμιαίος ειδικός ρυθμός αύξησης  $\mu(t)$  μπορεί να υπολογιστεί ως παράγωγος του  $\ln x(t)$ . Για προφανείς τεχνικούς λόγους (αυτοματισμοί κ.α.), οι έμμεσες μετρήσεις τόσο του  $x(t)$  όσο και του  $\mu(t)$  αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία. Είναι σημαντικό να καθοριστεί η σχέση μεταξύ της επιθυμητής ποσότητας και αυτής που στην πραγματικότητα μετριέται. Ο ρόλος των συναρτήσεων βαθμονόμησης (calibration functions) είναι ουσιαστικά ισοδύναμος με τους μετασχηματισμούς που αναφέρθηκαν ανωτέρω (Baranyi & Roberts, 1995).

Οι μετρήσεις θολερότητας και αγωγιμότητας υποστηρίζεται ότι είναι σχεδόν γραμμικά ανάλογες στο  $x(t)$  (Meynell & Meynell, 1965, Jason, 1983). Αυτό σημαίνει ότι εάν η μετρούμενη ποσότητα είναι  $q$ , τότε  $q=f(x)$  όπου  $f$  είναι μία γραμμική συνάρτηση βαθμονόμησης:

$$f(x) = ax + b \quad (1.14)$$

Εάν  $b \neq 0$  τότε ούτε το  $q$  ούτε το  $\log q$  είναι γραμμικώς ανάλογα προς το  $\log x$ . Ως εκ τούτου, με μία αίσθηση αυστηρότητας, ο ρυθμός μεταβολής του  $q$  δε θα πρέπει να

χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του ειδικού ρυθμού αύξησης. Ούτε θα έπρεπε τα μοντέλα που περιγράφουν το  $x(t)$  να εφαρμοστούν απευθείας στο μοντέλο  $q(t)$ . Νέα συνάρτηση βαθμονόμησης ή άλλοι λόγοι θα έπρεπε να ληφθούν υπόψη για τη μοντελοποίηση του  $q(t)$  ή/και τη σύγκρισή του με το  $x(t)$  (Baranyi & Roberts, 1995).

### *1.3. Συστηματική των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης*

Τα μοντέλα πρόβλεψης της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών των τροφίμων αποτελούν μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν την ανάπτυξη, την επιβίωση ή την αδρανοποίησή τους σε περιβάλλον τροφίμων. Σύμφωνα με τους Baranyi & Roberts (1992) οι παράγοντες που προσδίδουν ακρίβεια και αυστηρότητα στην προρρητική μικροβιολογία τροφίμων (ή μικροβιολογία πρόβλεψης της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών των τροφίμων) είναι τόσο η ομοιογένεια στη χρήση των όρων όσο και η ταξινόμηση των μοντέλων πρόβλεψης σε κατηγορίες με συγκεκριμένες λειτουργίες. Παρά το γεγονός ότι στην προρρητική μικροβιολογία τροφίμων έχουν προταθεί πολλά και διαφορετικά σχήματα κατηγοριοποίησης των μικροβιακών μοντέλων, εντούτοις δεν έχει οριστεί ακόμα ένα απόλυτο σύστημα ταξινόμησής τους.

#### *1.3.1. Κινητικά μοντέλα και μοντέλα πιθανοτήτων*

Ο διαχωρισμός των μοντέλων σε κινητικά μοντέλα και σε μοντέλα πιθανοτήτων, αποτελεί μία αρχική κατηγοριοποίησή τους (McDonald & Sun, 1999). Η επιλογή της μίας ή της άλλης προσέγγισης και η αντίστοιχη εφαρμογή καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των μικροοργανισμών και τον αριθμό των μεταβλητών. Τα κινητικά μοντέλα προβλέπουν τόσο την πληθυσμιακή πυκνότητα όσο και το ρυθμό ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού (Buchanan, 1993a).

Τα κινητικά μοντέλα μπορούν να διαφέρουν ως προς την προσέγγισή τους. Μία προσέγγιση είναι η μοντελοποίηση του ρυθμού αύξησης ενός μικροοργανισμού, και η χρήση του μοντέλου για την ανάπτυξη προβλέψεων που βασίζονται στην εκθετική αύξηση του πληθυσμού του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Μία άλλη προσέγγιση είναι η δημιουργία συνάρτησης σιγμοειδούς καμπύλης που βασίζεται στα δεδομένα ανάπτυξης ενός μικροβιακού πληθυσμού και στη συνέχεια η μοντελοποίηση των επιδράσεων των διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η

θερμοκρασία, σε αυτή τη συνάρτηση. Η αξιολόγηση της σιγμοειδούς καμπύλης είναι δυνατό να επιτρέψει στους ερευνητές να κάνουν προβλέψεις σχετικά με τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Και στις δύο προσεγγίσεις η ανάπτυξη των μοντέλων βασίζεται στην προσεκτική καταγραφή των δεδομένων κατά τη διάρκεια της αύξησης της μικροβιακής βιομάζας, ενώ μελετάται η επίδραση των βασικών εξωτερικών και ενδογενών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία, η οξύτητα (pH) και η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ). Οι ερευνητές βασίζόμενοι στα μοντέλα αυτά είναι δυνατόν να κάνουν προβλέψεις σχετικά με τη φάση καθυστέρησης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, το χρόνο που απαιτείται για το διπλασιασμό του μικροβιακού πληθυσμού (generation time) ή τον εκθετικό ρυθμό αύξησης (Broughall et al., 1983, Zwietering et al., 1991, Dickson et al., 1992, Van Impe et al., 1995).

Σκοπός των κινητικών μοντέλων είναι η ερμηνεία του χρόνου για την απόκριση των μικροοργανισμών με όρους περιβαλλοντικών μεταβλητών όπως είναι η θερμοκρασία, το pH ή η ενεργότητα του νερού (Van Boekel, 1996). Άλλες μεταβλητές που μπορούν επίσης να περιλαμβάνονται είναι οι αέριες ατμόσφαιρες, το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh), η βιολογική δομή, η σχετική υγρασία, η περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τα κινητικά μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προβλέπουν τις μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς συναρτήσει του χρόνου ακόμη και στην περίπτωση που μεταβάλλεται μια μεταβλητή ελέγχου η οποία μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη (McDonald & Sun, 1999). Εντούτοις τα κινητικά μοντέλα μπορεί να είναι δύσκολο να αναπτυχθούν, καθώς για το σκοπό αυτό απαιτείται η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού μικροβιακών δεδομένων (Gibson et al., 1988, McClure et al., 1994a, Baranyi et al., 1995). Διαθέσιμες εργασίες ανασκόπησης περί κινητικών μοντέλων είναι των Baranyi & Roberts (1994, 1995), Skinner & Larkin, (1994) και Kovarova-Kovar & Egli (1998).

Μία άλλη κατηγορία μοντέλου περιλαμβάνει την πιθανότητα να συμβεί ένα συγκεκριμένο γεγονός υπό προκαθορισμένες συνθήκες. Η ικανότητα πρόβλεψης πιθανών συμβάντων στα τροφικά συστήματα έχει προφανή πλεονεκτήματα. Τα μοντέλα πιθανοτήτων, έχουν την τάση να εφαρμόζονται στην περίπτωση των σποριογόνων βακτηρίων. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η πιθανότητα επιβίωσης του *Clostridium botulinum* σε κονσέρβες παστού βοδινού (corned beef) (Buchanan, 1993a). Η βάση για την ανάπτυξη μοντέλων πιθανοτήτων είναι η σχέση



ανάμεσα στην αύξηση των μικροβιακών κυττάρων και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του περιβάλλοντος (Ross & McMeekin, 1995). Σύμφωνα με τον Roberts (1997), η γνώση της πιθανότητας ανάπτυξης των μικροοργανισμών μπορεί να βοηθήσει τον παραγωγό στη λήψη τεκμηριωμένων αποφάσεων σχετικά με τη σύνθεση, την επεξεργασία, τη συσκευασία και την αποθήκευση ενός προϊόντος. Τα μοντέλα πιθανοτήτων ενδείκνυται στις περιπτώσεις εκείνες όπου η παραγωγή τοξινών σε ένα τρόφιμο αποτελεί παράγοντα ανησυχίας. Εντούτοις παρέχουν μικρή πληροφόρηση σχετικά με το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Gibson & Hocking, 1997). Ένα πρόβλημα με τα μοντέλα πιθανοτήτων είναι ότι η πιθανότητα μεταβάλλεται με το χρόνο. Συνεπώς, τα μοντέλα πιθανοτήτων αποτελούν στην πραγματικότητα ένα συνδυασμό πιθανοτήτων και κινητικής, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει σύγχυση (McDonald & Sun, 1999).

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1920, η βιομηχανία κονσερβοποιημένων τροφίμων χρησιμοποίησε μοντέλα θερμικής καταστροφής για να εκτιμήσει τον κίνδυνο από την παραγωγή τοξινών του *Clostridium botulinum* (Brennan et al., 1990). Η θερμική επεξεργασία των κονσερβοποιημένων τροφίμων χαμηλής οξύτητας απαιτεί ένα κινητικό μοντέλο θερμικής αδρανοποίησης 1<sup>ης</sup> τάξης (12D) των σπορίων του *Clostridium botulinum* ή 121°C/15 psi για 15 min (Baker, 1993). Παρά το γεγονός ότι προϊόντα όπως οι κονσερβοποιημένες μερίδες κρέατος κανονικά υφίστανται μόνο ήπια θερμική επεξεργασία, εντούτοις, εμφανίζουν μικροβιακή σταθερότητα εξαιτίας της περιεκτικότητας τους σε νιτρώδη, αλάτι και άλλα συστατικά τα οποία παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των σπορίων του *Clostridium botulinum* ή το σχηματισμό τοξινών (Genigeorgis, 1986). Η χρήση των τιμών D (ο χρόνος σε min που χρειάζεται για να υποδεκαπλασιαστεί ο μικροβιακός πληθυσμός μέχρι την καταστροφή του 90% σε σταθερή θερμοκρασία) ως μεταβλητή απόκρισης, απλά περιγράφει τα αποτελέσματα της θερμικής επεξεργασίας. Έχει υποστηριχτεί ότι η έννοια της τιμής D δεν είναι επαρκής, ενώ θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στους διάφορους υπολογισμούς που χρησιμοποιούνται στη θερμική επεξεργασία των τροφίμων και η αναλογία των σπορίων τα οποία ανακάμπτουν μετά από επώαση. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα προϊόντα κρέατος χαμηλής οξύτητας τα οποία υφίστανται την ελάχιστη δυνατή θερμική επεξεργασία. Ένα μοντέλο που περιγράφει την ανάκαμψη των σπορίων σε συνάρτηση τόσο της έντασης της θερμικής επεξεργασίας όσο και των περιβαλλοντικών συνθηκών, παρουσιάστηκε από τους Mafart and Leguerinel (1997).

Οι Ross & McMeekin (1994) υποστήριξαν ότι ο παραδοσιακός διαχωρισμός των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης σε μοντέλα πιθανοτήτων και κινητικά μοντέλα είναι τεχνητός. Ενώ οι δύο τύποι μοντέλων αντιπροσωπεύουν τα αντίθετα άκρα ενός εύρους απαιτήσεων μοντελοποίησης, εντούτοις η έρευνα έχει σαν αποτέλεσμα τη σύγκλιση των άκρων αυτών, τα οποία τελικά ταυτίζονται. Πολλά μοντέλα μέχρι σήμερα έχουν επικεντρωθεί περισσότερο στις κινητικές αρχές παρά στην πιθανότητα να μοντελοποιηθούν οι επιδράσεις των ενδογενών και εξωτερικών μεταβλητών, ιδίως της θερμοκρασίας στη μικροβιακή αύξηση και ακόμα λιγότερο στην επιβίωση και στο θάνατο των μικροοργανισμών (McMeekin et al., 1997). Οι Ross & McMeekin (1995) ανέδειξαν κάποια προβλήματα στην προρρητική μικροβιολογία τροφίμων τα οποία έχουν πρακτική σημασία για την εφαρμογή των κινητικών μοντέλων. Για παράδειγμα, υπάρχουν δυσκολίες στη λήψη δεδομένων ακριβείας όσον αφορά στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, σε όλα τα στάδια της παραγωγής κρέατος και ειδικά κατά την ψύξη των σφαγίων (Gill et al., 1991a, b). Οι διακυμάνσεις στους χρόνους απόκρισης των μικροοργανισμών, όπως είναι η φάση καθυστέρησης, είναι δυνατόν επίσης να παρουσιάζει προβλήματα (McMeekin et al., 1989). Η εφαρμογή ενός κινητικού μοντέλου έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των ορίων εμπιστοσύνης που συνδέονται με τις προβλέψεις αφού η διακύμανση των μικροοργανισμών αυξάνεται καθώς αυξάνονται οι χρόνοι απόκρισης (McMeekin et al., 1997).

Εντούτοις, οι Ratkowsky et al. (1996), έδειξαν ότι εάν η πιθανότητα κατανομής του χρόνου απόκρισης είναι γνωστή τότε είναι δυνατό να προσδιοριστεί ταχύτερα η πιθανότητα ανάπτυξης ενός οργανισμού σε σχέση με μία πρόβλεψη απόκρισης. Για το λόγο αυτό τα κινητικά μοντέλα μπορούν να περιγράψουν με συνέπεια αποκρίσεις της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Υπό συγκεκριμένες όμως συνθήκες, ένα μοντέλο πιθανότητας μπορεί να είναι απαραίτητο. Κοντά σε συνθήκες οριακής ανάπτυξης ο ερευνητής που αναπτύσσει ένα κινητικό μοντέλο θα πρέπει να διερευνήσει την πιθανότητα του ρυθμού ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης (Ross & McMeekin, 1995). Οι Ratkowsky & Ross (1995) υπέθεσαν ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα κινητικό μοντέλο με βάση το οποίο θα αναπτυχθεί ένα μοντέλο πιθανοτήτων που θα περιγράφει τη μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης. Συνεπώς, προτάθηκε ένα μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης, το οποίο θα μπορούσε να καθορίζει την πιθανότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό την επίδραση πολλών παραγόντων όπως το pH, η θερμοκρασία, το αλάτι (NaCl) και το νιτρικό

νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ ). Χρησιμοποιήθηκε ένα κινητικό μοντέλο Belehradek με δεδομένα παρατήρησης που αφορούσαν στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Shigella flexneri* για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Από το μοντέλο εκείνο στάθηκε δυνατή η εκτίμηση των ορίων μεταξύ της ανάπτυξης και της μη ανάπτυξης σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο πιθανότητας. Η ενοποίηση των κινητικών και πιθανοτικών προσεγγίσεων μπορούν να ερμηνευτούν σαν ολοκλήρωση των κινητικών μοντέλων και των μοντέλων πιθανοτήτων στην προρρητική μικροβιολογία των τροφίμων και σαν ενοποίηση της μικροβιολογίας πρόρρησης με την έννοια των εμποδίων (Ratkowsky & Ross, 1995) έχοντας επωφελή αποτελέσματα. Τα προϊόντα θα μπορούσαν να μορφοποιηθούν έχοντας τις ελάχιστες δυνατές απαιτήσεις για διατήρηση ενώ ταυτόχρονα ικανοποιούν τις προτιμήσεις των καταναλωτών (Presser et al., 1998). Οι Houtsma et al. (1996) περιέγραψαν τις συνδυασμένες επιδράσεις της θερμοκρασίας, pH και γαλακτικού νατρίου στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria innocua* στο λουκάνικο στην επιτρεπτή περιοχή ανάπτυξής του έως την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του γαλακτικού νατρίου. Με αυτόν τον τρόπο κατέστη δυνατή η διάκριση μεταξύ της ανάπτυξης και της μη ανάπτυξης καθώς και η εκτίμηση του χρόνου εντός του οποίου θα μπορούσε να υπάρξει ανάπτυξη υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Houtsma et al., 1993, 1994).

### 1.3.2. Εμπειρικά και μηχανιστικά μοντέλα

Μία άλλη κατηγοριοποίηση των μοντέλων μπορεί να γίνει ανάλογα με τον τρόπο ανάπτυξής τους. Τα εμπειρικά μοντέλα, όπως είναι η συνάρτηση του Gompertz (Jeffries & Brian, 1984), χαρακτηρίζονται από πρακτική συνέπεια, περιγράφοντας τα δεδομένα κάτω από πειραματικές συνθήκες με τη μορφή μίας βολικής μαθηματικής εξίσωσης (Gibson & Roberts, 1987). Τα πιο κοινά εμπειρικά μοντέλα είναι οι πολυωνυμικές εξισώσεις. Τα πολυωνυμικά μοντέλα είναι εύκολα στη χρήση τους ενώ μπορούν να εφαρμοστούν σε μία διεργασία χωρίς να απαιτείται κάποια γνώση σχετικά με αυτήν (Whiting, 1995). Εντούτοις, τα πολυώνυμα συχνά δεν έχουν θεωρητική βάση ενώ μπορεί να έχουν και μη γραμμική μορφή. Τα πολυώνυμα αυτά είναι έγκυρα μόνο για το εύρος των μεταβλητών των σχετικών δεδομένων, ενώ περιλαμβάνουν πολλές παραμέτρους που δεν έχουν βιολογική σημασία. Για το λόγο αυτό τα πολυωνυμικά μοντέλα δε συνεισφέρουν καμία γνώση στους μηχανισμούς που διέπουν μία διεργασία (Draper, 1988, Delignette-Muller et al., 1995).

Η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τον κυτταρικό μεταβολισμό μπορούν να επιτρέψουν μελλοντικά την ανάπτυξη μηχανιστικών μοντέλων. Τέτοια μοντέλα θα χρησιμεύσουν σαν όχημα για τη δημιουργία προβλέψεων από υποθέσεις (Bazin & Prosser, 1992, Van Impe et al., 1992, 1993; Zwietering et al., 1993). Η ερμηνεία της μοντελοποιημένης απόκρισης με όρους γνωστών φαινομένων και διεργασιών μπορεί να είναι πιθανή (Krist et al., 1998). Οι Baranyi and Roberts (1994) έδειξαν ότι τα μοντέλα που απορρέουν από τη γνώση των μηχανισμών που διέπουν τις διεργασίες (mechanistically derived models), θα ήταν ευκολότερο να αναπτυχθούν περαιτέρω καθώς αυξάνεται η ποσότητα και η ποιότητα των πληροφοριών από τα συστήματα που αναλύονται. Εντούτοις, ακόμα δεν έχουν αναπτυχθεί ολοκληρωμένα μηχανιστικά μοντέλα (completely mechanistic models) που να ενσωματώνουν όλους τους ενδογενείς και εξωτερικούς παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη (Labuza & Fu, 1993, Ross et al., 1993).

Τα υφιστάμενα μοντέλα είναι είτε εμπειρικά είτε ημι-μηχανιστικά (πίνακας 1.1). Σύμφωνα με τους Baranyi et al. (1996) θεωρείται σκόπιμη η ανάπτυξη μηχανιστικών μοντέλων που να αντικατοπτρίζουν τις τρέχουσες γνώσεις της δυναμικής των μικροοργανισμών και να μπορούν να παράγουν ποιοτικά δεδομένα. Ωστόσο, με τη χρήση μικροβιολογικών τεχνικών ακριβείας, η ζήτηση για εμπειρικά μοντέλα ανάπτυξης μπορεί να περιοριστεί (Whiting, 1992).

### *1.3.3. Πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή μοντέλα*

Το επικρατέστερο σύστημα ταξινόμησης των μικροβιακών μοντέλων είναι το σύστημα των Whiting & Buchanan (1993) σύμφωνα με το οποίο οι περισσότεροι τύποι μοντέλων είναι δυνατό να ομαδοποιηθούν σε τρία επίπεδα σύμφωνα με συγκεκριμένα κριτήρια: Τα πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή μοντέλα (Πίνακας 1.1). Διαφορετικά σχήματα ταξινόμησης των μοντέλων παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (McDonald & Sun, 1999).

#### *1.3.3.1. Πρωτοταγή μοντέλα*

Τα πρωτοταγή μοντέλα περιγράφουν τη μεταβολή του αριθμού των μικροοργανισμών με το χρόνο κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες και συνθήκες καλλιέργειας. Η απόκριση μπορεί να μετρηθεί άμεσα με τον ολικό

αριθμό ζωντανών μικροοργανισμών (Total viable count, TVC), με το σχηματισμό τοξίνης, από το επίπεδο υποστρώματος ή από τα προϊόντα μεταβολισμού. Επίσης μπορεί να μετρηθεί με έμμεσο τρόπο από την απορρόφηση, την οπτική πυκνότητα ή από την αντίσταση. Τα δεδομένα που περιγράφουν τη μεταβολή του συνολικού αριθμού των ζωντανών μικροοργανισμών με το χρόνο, απεικονίζονται γραφικά σε καμπύλη ανάπτυξης με τη βοήθεια ενός πρωτοταγούς μοντέλου. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει πληροφορίες σχετικά με το μικροοργανισμό όπως ο χρόνος γενεάς, η διάρκεια της φάσης καθυστέρησης, ο εκθετικός ρυθμός αύξησης και η μέγιστη πυκνότητα του πληθυσμού (Whiting, 1995, Whiting & Buchanan, 1993, 1994).

**Πίνακας 1.1.** Ταξινόμηση μερικών μοντέλων πρόβλεψης (McDonald & Sun, 1999)<sup>a</sup>

Πρωτοταγή	Δευτεροταγή	Τριτοταγή
Συνάρτηση Gompertz <sup>1</sup>	Μοντέλο Belehradek (μοντέλο τετραγωνικής ρίζας) <sup>10</sup>	USDA Pathogen Modelling Program <sup>18</sup>
Τροποποιημένη εξίσωση Gompertz <sup>2</sup>	Μοντέλο Ratkowsky (μοντέλο τετραγωνικής ρίζας) <sup>11</sup>	Food MicroModel <sup>19</sup>
Λογιστικό μοντέλο <sup>3</sup> Μοντέλο Baranyi <sup>4</sup>	Μοντέλο Arrhenius <sup>12</sup> Τροποποιημένο μοντέλο Arrhenius (Davey ή Schoolfield) <sup>13</sup>	Pseudomonas Predictor <sup>20</sup> Έμπειρα συστήματα <sup>21</sup>
Μοντέλο monod 1 <sup>ης</sup> τάξης <sup>5</sup> Τροποποιημένο μοντέλο Monod <sup>6</sup>	Μοντέλα πιθανοτήτων <sup>14</sup>	
Τιμών D θερμικής αδρανοποίησης <sup>7</sup>	Τιμών z <sup>15</sup>	
Μοντέλο Whiting and Cygnarowicz <sup>8</sup>	Πολυωνυμικά μοντέλα ή μοντέλα επιφανειών απόκρισης <sup>16</sup>	
Γραμμικό μοντέλο τριών φάσεων <sup>9</sup>	Μοντέλο Williams–LandelFerry <sup>17</sup>	

<sup>a</sup>1. Jeffries & Brian (1984), Gibson & Roberts (1987), 2. Zwietering et al. (1990), 3. Jason (1983), Einarsson & Ericksson (1986), 4. Baranyi et al. (1993), 5. Monod (1949), 6. Houtsma et al. (1996), 7. Brennan et al. (1990), 8. Whiting & Cygnarowicz Provost (1992), 9. Buchanan et al. (1997), Garthright (1997), 10. Belehradek (1930), 11. Ratkowsky et al. (1982), 12. Arrhenius (1889), Labuza & Riboh (1982), 13. Davey (1989, 1993), Schoolfield et al. (1981), 14. Hauschild (1982), 15. Brennan et al. (1990), 16. Draper (1988), Gibson et al. (1988), 17. Williams et al. (1955), Schaffner (1995), 18. Buchanan (1991), 19. McClure et al. (1994b), 20. Neumeyer (1994), Neumeyer et al. (1997), 21. Zwietering et al. (1992), Voyer & McKellar (1993).

Για τα περισσότερα προϊόντα τροφίμων, η θερμοκρασία αποτελεί την κύρια μεταβλητή ελέγχου. Πολλά εμπειρικά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για την πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ως συνάρτηση του χρόνου για μία συγκεκριμένη θερμοκρασία.

Το μοντέλο του Monod (1949) εκφράζει το ρυθμό με τον οποίο αυξάνεται ο μικροβιακός πληθυσμός και είναι ανάλογος με τον αριθμό των κυττάρων, δηλαδή:

$$N = N_0 \cdot e^{kt} \quad (1.15)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

όπου  $N$  είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο  $t$ ,  $N_0$  είναι το αρχικό μικροβιακό φορτίο και  $K$  είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης. Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί στην πρόβλεψη της διάρκειας ζωής των κατεψυγμένων συσκευασμένων προϊόντων βόειου κρέατος (Zamora & Zaritzky, 1985), στην επίδραση των τροποποιημένων ατμοσφαιρών στην ανάπτυξη τόσο της αλλοιογόνου χλωρίδας όσο και του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στο ωμό κοτόπουλο (Wimptheimar et al., 1990) καθώς και στην επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην αερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στο άπαχο βόειο κρέας και στους λιπώδεις ιστούς (Grau & Vanderlinde, 1992). Εντούτοις, το μειονέκτημα αυτού του μοντέλου έγκειται στο γεγονός ότι ο χρόνος καθυστέρησης πρέπει να προσδιοριστεί από τα δεδομένα ενώ δε μπορεί εύκολα να καθοριστεί χρησιμοποιώντας παλινδρόμηση (Schmidt, 1992).

Εκτός από τη φάση υστέρησης και την ασυμπτωτική τιμή, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης της καμπύλης ανάπτυξης αποτελεί σημαντική παράμετρο. Μετράει την κλίση της καμπύλης ανάπτυξης όταν οι οργανισμοί αυξάνονται εκθετικά. Κανονικά, αυτή η παράμετρος εκτιμάται αποφασίζοντας ποιο μέρος της καμπύλης είναι κατά προσέγγιση γραμμικό ενώ στη συνέχεια λαμβάνει χώρα ο προσδιορισμός της κλίσης του με γραμμική παλινδρόμηση (Zwietering et al., 1994).

Για το σχηματισμό καμπυλών ανάπτυξης των μικροοργανισμών εφαρμόζονται και τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης. Η συνάρτηση του Gompertz:

$$y = A + C \cdot \exp\{-\exp[-B \cdot (t - M)]\} \quad (1.16)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στη μικροβιολογία τροφίμων από τους Gibson & Roberts (1987). Στη συνέχεια αυτοί πρότειναν τη χρήση της λογιστικής σιγμοειδούς συνάρτησης

$$y = A + \frac{C}{\{1 + \exp[-B \cdot (t - M)]\}} \quad (1.17)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

για να προβλέψουν τη μικροβιακή αύξηση. Ο όρος  $A$  είναι η υπολογιζόμενη ασύμπτωτη καθώς ο χρόνος τείνει στο  $0$ , ο αριθμητής  $C$  είναι η διαφορά μεταξύ της

ανώτατης και κατώτατης ασύμπτωτης, B είναι ο σχετικός ρυθμός ανάπτυξης στο M, και M είναι ο χρόνος στον οποίο ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης είναι μέγιστος.

Στην έρευνα των Gibson & Roberts (1987), συγκρίθηκε η συνάρτηση Gompertz με τη λογιστική σιγμοειδή συνάρτηση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρόμοια. Με την άποψη αυτή συμφωνούν και οι Wilcox et al. (1993). Η τροποποιημένη συνάρτηση Gompertz εμπεριέχει το χρόνο καθυστέρησης, τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και τη μέγιστη τιμή του μικροβιακού πληθυσμού (ασυμπτωτική).

$$y = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1.18)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

Η τροποποιημένη συνάρτηση Gompertz διαπιστώθηκε ότι ήταν στατιστικά επαρκής για να περιγράψει τα δεδομένα ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Lactobacillus plantarum*. Σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις θεωρήθηκε ότι ήταν το καλύτερο μοντέλο για την περιγραφή των δεδομένων ανάπτυξης τόσο με όρους στατιστικής ακρίβειας όσο και ευκολίας στη χρήση όταν συγκρίθηκε με άλλες σιγμοειδείς συναρτήσεις.

Η συνάρτηση Gompertz (εξισώσεις 1.16 & 1.18) αποτελεί την πιο διαδεδομένη σιγμοειδή καμπύλη στην προορητική μικροβιολογία τροφίμων εξαιτίας της απλότητας και αποτελεσματικότητάς της (Giannuzzi et al., 1998). Έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τις καμπύλες ανάπτυξης για πολλούς μικροοργανισμούς, όπου ανάμεσά τους περιλαμβάνονται τουλάχιστον 10 παθογόνοι. Παρόλο που η συνάρτηση Gompertz προσαρμόζει τα δεδομένα καλά, δεν προέρχεται από μηχανιστική θεώρηση. Η έλλειψη βιολογικής βάσης των χρησιμοποιούμενων παραμέτρων κάνει την ερμηνεία των παραμέτρων δύσκολη. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ώστε να αντικατασταθεί η εμπειρική φύση της με άλλα μοντέλα ανάπτυξης, τα οποία έχουν περισσότερο μηχανιστική βάση (Van Impe et al., 1992, Zwietering et al., 1994).

Οι Whiting & Cygnarowicz Provost (1992) πρότειναν ένα ποσοτικό μοντέλο με 4 παραμέτρους για την εκβλάστηση, την ανάπτυξη και την αδρανοποίηση του μικροοργανισμού *Clostridium botulinum* καθώς και για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Οι ρυθμοί ανάπτυξης του μοντέλου διαπιστώθηκε ότι ήταν κατά 16% μικρότεροι από εκείνους που προέρχονταν από τη συνάρτηση Gompertz. Οι Jones & Walker (1993) ανέπτυξαν μία εξίσωση (εξίσωση 1.1) για την πρόβλεψη της ανάπτυξης, επιβίωσης και θανάτου των μικροοργανισμών, η οποία βασιζόταν στο μικροοργανισμό *Yersinia enterocolitica* σε μεταβαλλόμενες

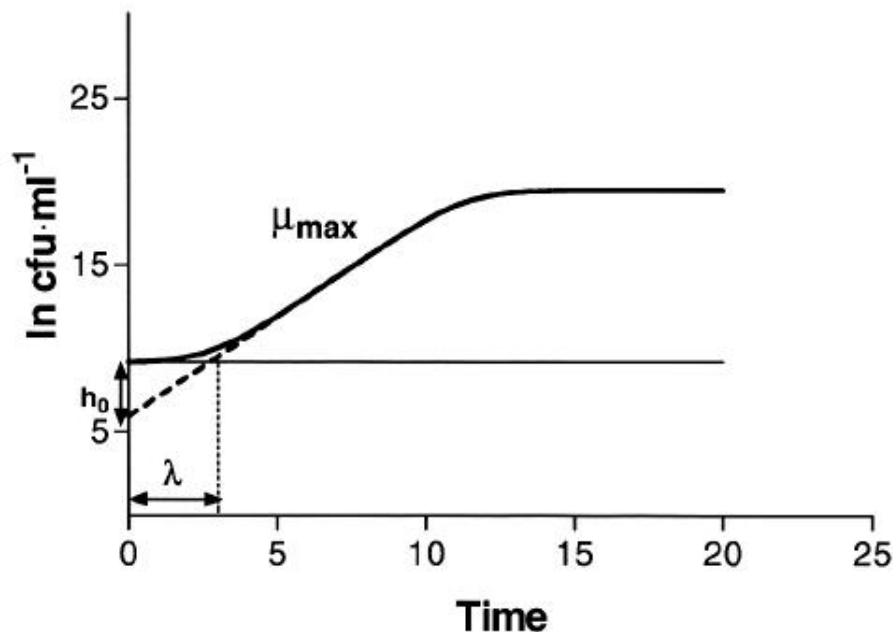
τιμές pH και συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε αντίθεση με τη συνάρτηση Gompertz, το μοντέλο των Jones & Walker (1993) έχει την ικανότητα να επεξεργάζεται δεδομένα ανάπτυξης, επιβίωσης και θανάτου, καθώς και να προσαρμόζει με ακρίβεια την ανάπτυξη και τη μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών με μικρότερα μέσα τετραγωνικά σφάλματα από τη συνάρτηση Gompertz. Οι Van Impe et al. (1992) πρότειναν μία δυναμική διαφορική εξίσωση πρώτης τάξης για την πρόβλεψη τόσο της μικροβιακής ανάπτυξης όσο και της αδρανοποίησης σε σχέση με το χρόνο και τη θερμοκρασία. Αυτό ήταν ένα από τα πρώτα μοντέλα που αναπτύχθηκε για την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης κάτω από δυναμικά μεταβαλλόμενες συνθήκες. Σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας, εντός του εύρους της ανάπτυξης, οι προβλέψεις του μοντέλου είναι ίδιες με αυτές της συνάρτησης Gompertz.

Οι Baranyi et al. (1993) πρότειναν ένα δυναμικό μοντέλο για την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης, σε συνδυασμό με μία συνάρτηση προσαρμογής  $A(t)$  η οποία εξαρτάται από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων των μικροοργανισμών:

$$y(t) = y_{\max} - \ln \left[ 1 + \left( e^{-y_{\max} - y_0} - 1 \right) e^{\mu_{\max} A_n(t)} \right] \quad (1.19)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

Το μοντέλο Baranyi & Roberts (1994) (**Εικόνα 1.2**) συνιστά τον κεντρικό μηχανισμό

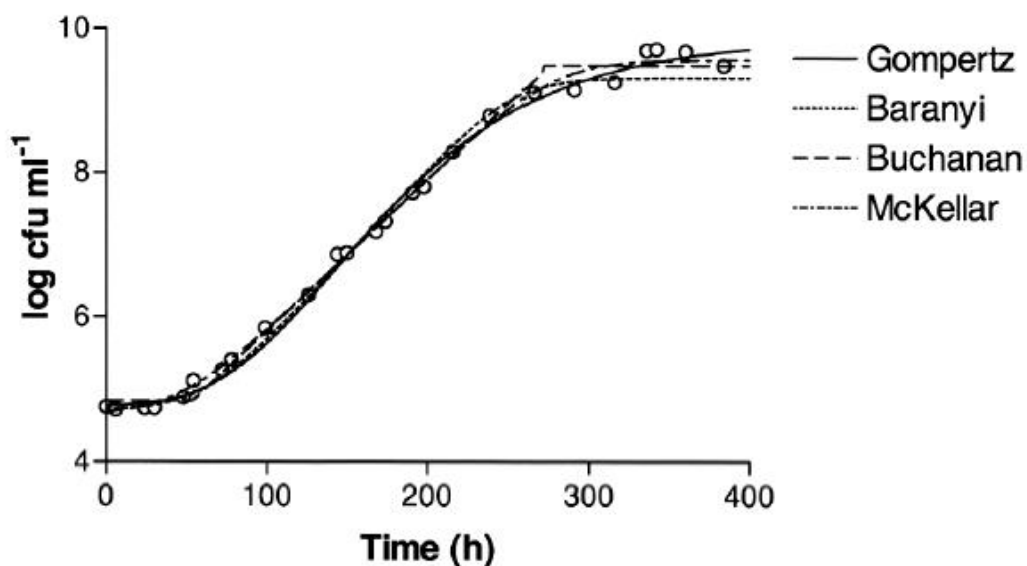


**Εικόνα 1.2** Απεικόνιση καμπύλης μικροβιακής ανάπτυξης που αναπτύχθηκε από το μοντέλο Baranyi & Roberts (1994). Ως  $\mu_{\max}$  ορίζεται ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $\text{h}^{-1}$ ),  $\lambda$  είναι η διάρκεια της φάσης καθυστέρησης και  $h_0$  η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων (Πηγή: McKellar & Lu, 2004).



των τριτοταγών μοντέλων πρόβλεψης που πραγματεύεται η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή. Τόσο το συγκεκριμένο μοντέλο όσο και οι διαφορετικές μορφές έκφρασής του περιγράφονται αναλυτικά στα επιμέρους κεφάλαια της διατριβής.

Οι συνθήκες που επικρατούν μετά τον εμβολιασμό μαζί με την τιμή της συνάρτησης προσαρμογής, αποτελούν παράγοντες που μπορούν να προβλέψουν τη διάρκεια της φάσης καθυστέρησης. Τόσο η φάση καθυστέρησης όσο και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης αποτελούν μία απλή μεταβολή στη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων. Οι εκτιμήσεις των παραμέτρων αυτών καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης χωρίς να χρειάζεται να μοντελοποιηθεί η περιβαλλοντική εξάρτηση της φάσης καθυστέρησης ξεχωριστά. Εάν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ακολουθεί τις περιβαλλοντικές διακυμάνσεις αμέσως μόλις αυτές συμβαίνουν, τότε το μοντέλο αυτό μπορεί να περιγράψει τη μικροβιακή ανάπτυξη όπου παράμετροι όπως το pH, η ενεργότητα του νερού και η θερμοκρασία μεταβάλλονται με το χρόνο (Pin & Baranyi, 1998). Πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει το μοντέλο του Baranyi σε συγκεκριμένες εφαρμογές μοντελοποίησης και ανακάλυψαν ότι σε σύγκριση με τη συνάρτηση Gompertz και άλλα μοντέλα, δίνει καλύτερα αποτελέσματα (McClure et al., 1993, Dalgaard, 1995, Sutherland et al., 1995, 1997) (Εικόνα 1.3).



**Εικόνα 1.3** Σύγκριση των καμπυλών ανάπτυξης για το μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* στους 5°C. Το μοντέλο Baranyi παρείχε καλύτερες εκτιμήσεις σε σχέση με τη συνάρτηση Gompertz (Πηγή: McKellar & Lu, 2004).

Από τους Hills & Wright (1994) και Hills & Mackey (1995) αναπτύχθηκε μια γενική θεωρία για την κατανομή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε ετερογενή συστήματα. Η θεωρία αυτή περιγράφει τη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών συνδυάζοντας ένα κινητικό μοντέλο της δομής των κυττάρων με εξισώσεις αντιδράσεων διάχυσης. Εάν  $M$  είναι η ολική βιομάζα της μικροβιακής καλλιέργειας και  $N$  είναι ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στην καλλιέργεια, τότε σε στατική φάση ισχύει:

$$M(t) = M(0) \cdot e^{At} \quad (1.20)$$

$$N(t) = N(0) \cdot \frac{K_n \cdot e^{At} + A e^{-k_n t}}{A + K_n} \quad (1.21)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου  $A$  και  $k_n$  είναι οι σταθερές ταχύτητας που εξαρτώνται από όλους τους παράγοντες. Ο δεύτερος εκθετικός όρος της συνάρτησης  $N(t)$  παρέχει πληροφόρηση σχετικά με τη λανθάνουσα φάση. Οι χρόνοι της λανθάνουσας φάσης και διπλασιασμού δίνονται από τις εξισώσεις:

$$t_{LAG} = A^{-1} \cdot \log\left(1 + \frac{A}{K_n}\right) \quad (1.22)$$

$$\frac{t_{LAG}}{t_D} = (\ln 2)^{-1} \cdot \log\left(1 + \frac{A}{K_n}\right) \quad (1.23)$$

McKellar & Lu (2004)

Το παραπάνω μοντέλο μπορεί να γενικευτεί σε ομοιογενή συστήματα, όπως είναι οι επιφάνειες των τροφίμων. Οι εφαρμογές του μοντέλου Hills γενικά είναι περιορισμένες.

Οι Buchanan et al. (1997) πρότειναν ένα γραμμικό μοντέλο τριών φάσεων (Εικόνα 1.4). Το μοντέλο αυτό αποτελείται από τη λανθάνουσα φάση, την εκθετική φάση ανάπτυξης και την στατική φάση:

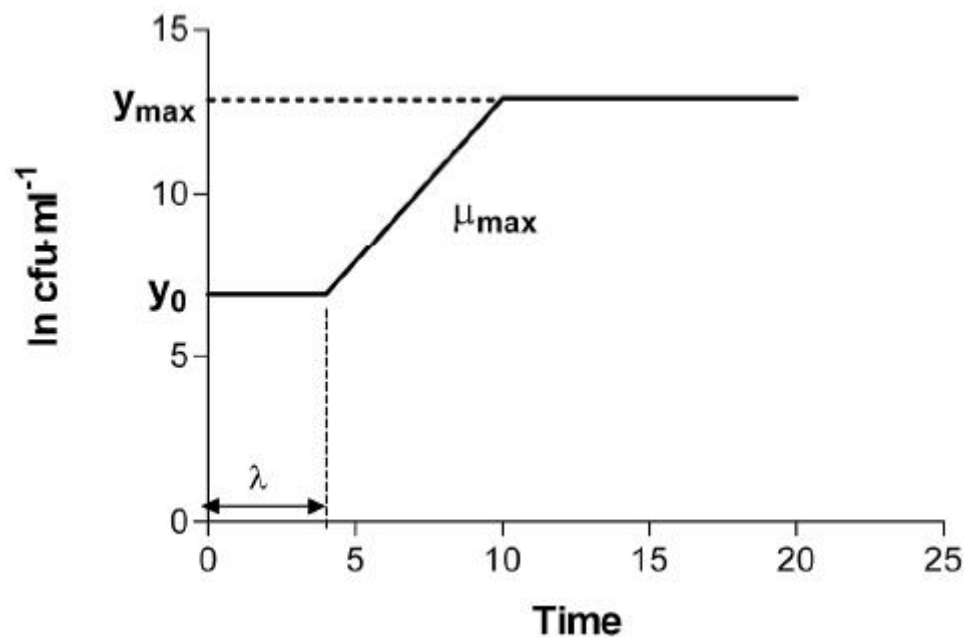
$$\begin{cases} N_t = N_0, t < t_{LAG} : \text{Λανθάνουσα φάση} \\ N_t = N_0 + \mu \cdot (t - t_{LAG}), T_{LAG} < t < T_{MAX} : \text{Εκθετική φάση ανάπτυξης} \\ N_t = N_{MAX}, t \geq t_{MAX} : \text{Στατική φάση} \end{cases} \quad (1.24)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου  $N_t$  είναι ο λογάριθμος της πυκνότητας του πληθυσμού σε χρόνο  $t$ ,  $N_0$  είναι ο λογάριθμος της αρχικής πυκνότητας του πληθυσμού,  $N_{MAX}$  είναι ο λογάριθμος της μέγιστης πυκνότητας του πληθυσμού που εξαρτάται από το περιβάλλον,  $t$  είναι ο χρόνος,  $t_{LAG}$  είναι ο χρόνος όταν ολοκληρωθεί η λανθάνουσα φάση (h),  $t_{MAX}$  είναι ο

χρόνος τη στιγμή που η πυκνότητα του πληθυσμού είναι η μέγιστη ( $h$ ), και  $\mu$  είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $\log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Οι όροι  $N_t$ ,  $N_0$  και  $N_{\max}$  εκφράζονται σε  $\log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Η εκδοχή τριών φάσεων χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση πειραματικών δεδομένων που αφορούσαν στο μικροοργανισμό *Escherichia coli* O157:H7. Επειδή για τη στατική φάση δεν υπάρχει ενδιαφέρον, η αρχική εκδοχή του μοντέλου τροποποιήθηκε για δύο φάσεις, τη λανθάνουσα και την εκθετική. Ο Oscar (1999) χρησιμοποίησε το τροποποιημένο μοντέλο δύο φάσεων για την προσαρμογή δεδομένων ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Salmonella typhimurium* σε ζωμό BHI, σε ψημένη κότα και σε τεμαχισμένο στήθος κότας. Ένα μοντέλο, επίσης, δύο φάσεων χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (Cornu et al., 1999).



**Εικόνα 1.4** Απεικόνιση καμπύλης ανάπτυξης που αναπτύχθηκε από το μοντέλο των Buchanan et al. (1997). Ως  $y_0$  ορίζεται ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού αριθμού των κυττάρων,  $y_{\max}$  είναι ο φυσικός λογάριθμος του μέγιστου αριθμού των κυττάρων,  $\mu_{\max}$  είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και  $\lambda$  είναι η διάρκεια της φάσης καθυστέρησης (Πηγή: McKellar & Lu, 2004).

Το μοντέλο McKellar αφορά σε ετερογενείς πληθυσμούς κυττάρων. Η ανάπτυξη ενός μικροβιακού πληθυσμού εκφράζεται με τη μορφή μίας συνάρτησης που περιγράφει δύο ξεχωριστούς πληθυσμούς κυττάρων (McKellar, 1997). Τα κύτταρα μπορούν να βρεθούν είτε σε κατάσταση ανάπτυξης ή σε κατάσταση μη ανάπτυξης. Αξιωματικά, τη χρονική στιγμή  $t=0$  ένα μικρό κλάσμα του συνολικού

πληθυσμού βρίσκεται σε κατάσταση ανάπτυξης. Τότε η ανάπτυξη λαμβάνει χώρα σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\frac{dG}{dt} = G \cdot \mu \cdot \left(1 - \frac{G}{N_{\max}}\right) \quad (1.25)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου G είναι ο αριθμός των αναπτυσσόμενων κυττάρων σε κατάσταση ανάπτυξης. Αυτό το μοντέλο δεν έχει χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση της μικροβιακής ανάπτυξης σε μεγάλη έκταση, εξαιτίας της ομοιότητάς του με το μοντέλο Baranyi. Σε αυτό το μοντέλο έχουν προσαρμοστεί δεδομένα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στους 5 και 35°C ενώ στη συνέχεια συγκρίθηκαν με τη συνάρτηση Gompertz (McKellar, 1997). Οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ήταν λίγο υψηλότερες και της φάσης καθυστέρησης ήταν χαμηλότερες από το μοντέλο Gompertz. Η ανάλυση Goodness-of-fit έδειξε ότι στο μοντέλο McKellar, τα δεδομένα προσαρμόζονται καλύτερα από ότι στο μοντέλο Gompertz (McKellar & Lu, 2004).

### 1.3.3.1.1. Μοντέλα επιβίωσης

Τα μοντέλα επιβίωσης που περιγράφουν την μικροβιακή θνησιμότητα σαν αποτέλεσμα της θέρμανσης. Χρησιμοποιούνται από το 1920, και αποτελούν μία από τις πρώτες μορφές της μικροβιολογίας πρόρρησης. Τα μοντέλα επιβίωσης διακρίνονται σε κλασσικά γραμμικά μοντέλα και σε μη γραμμικά μοντέλα.

Όσον αφορά στα κλασσικά γραμμικά μοντέλα, η αδρανοποίηση των μικροβιακών παραγόντων ακολουθεί την κινητική αντιδράσεων πρώτης τάξης κάτω από ισοθερμικές συνθήκες και περιγράφεται από την εξίσωση:

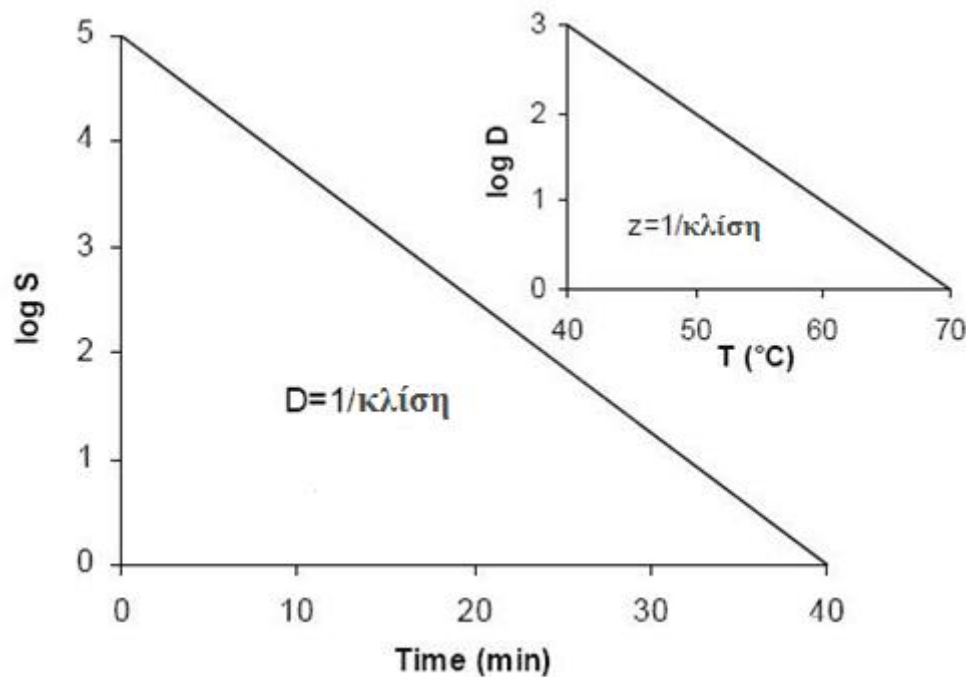
$$\frac{dS_t}{dt} = -k' \cdot S_t \quad (1.26)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου  $S_t$  είναι η αναλογία επιβίωσης  $\frac{N_t}{N_0}$  και  $k'$  είναι η σταθερά του ρυθμού της διεργασίας. Συνεπώς ο αριθμός των κυττάρων που επιβιώνουν μειώνεται εκθετικά:

$$S_t = e^{-k' \cdot t} \Rightarrow \log S_t = -k \cdot t \quad \text{όπου } k = \frac{k'}{\ln 10}. \text{ Η έκφραση D-value δηλαδή ο χρόνος}$$

που απαιτείται για μείωση κατά 1 λογάριθμο (1-log) είναι ίση με  $1/k$ , όπου  $k$  είναι η κλίση στο σχήμα της **εικόνας 1.5**.



**Εικόνα 1.5** Γεωμετρική περιγραφή των D και z- τιμών (Πηγή: McKellar & Lu, 2004).

Οι τιμές D είναι δυνατόν επίσης να εκφραστούν ως εξής:

$$D - value = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t} \quad (1.27)$$

McKellar & Lu (2004)

Όταν ο λογάριθμος των τιμών D (D-values) παριστάνεται γραφικά σα συνάρτηση των αντίστοιχων θερμοκρασιών, το αντίστροφο της κλίσης είναι ίσο με την τιμή z (z-value), η οποία αποτελεί την αύξηση της θερμοκρασίας που απαιτείται για τη μείωση της τιμής D κατά 1 λογάριθμο (**εικόνα 1.5**).

Όπως γίνεται αντιληπτό από την αντίδραση πρώτης τάξης, δεν είναι δυνατή η απόλυτη καταστροφή όλων των σπορίων του μικροοργανισμού *Clostridium botulinum* σε ένα δεδομένο όγκο προϊόντος. Ένα σπόριο θα υπάρχει πάντα άθικτο σε κάποια κονσέρβα αν εξεταστεί ικανοποιητικός αριθμός κονσερβών. Για το λόγο αυτό έχει υιοθετηθεί ότι μείωση κατά 12 λογάριθμους (12D) είναι ικανοποιητική για την προσέγγιση της “εμπορικής αποστείρωσης” ή για ένα αποδεκτό επίπεδο κινδύνου επιβίωσης του *Clostridium botulinum*. Συγκρίσιμες τυπικές τιμές της παραμέτρου D για άλλα παθογόνα δεν υπάρχουν, ωστόσο είναι γενικά αποδεκτό ότι μια μείωση κατά

4 ή 5 λογαρίθμους (4D ή 5D) θεωρείται ικανοποιητική ανάλογα με το προϊόν (McKellar & Lu, 2004).

Τα μη γραμμικά μοντέλα ανήκουν σε δύο κατηγορίες. Σε αυτά που παρουσιάζουν μια φάση προσαρμογής πριν την έναρξη της αδρανοποίησης και στη συνέχεια κύρτωση της καμπύλης (shoulder) καθώς και σε αυτά που εμφανίζουν ουρά (tail) στην τελική φάση της καμπύλης αδρανοποίησης.

Οι καμπύλες αδρανοποίησης που αποκλίνουν από την απλή εκθετική μορφή παρουσιάζουν συχνά μια φάση καθυστέρησης πριν από την εκθετική αδρανοποίηση. Ένα απλό γραμμικό μοντέλο που περιγράφει τη συμπεριφορά αυτή αναπτύχθηκε από τον Whiting (1993):

$$\log N = \begin{cases} \log N_0, 0 < t < t_L \\ \log N_0 - \left(\frac{1}{D}\right) \cdot (t - t_L), t > t_L \end{cases} \quad (1.28)$$

McKellar & Lu (2004)

Το πλεονέκτημα του συγκεκριμένου μοντέλου είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί η γραμμική παλινδρόμηση για την εκτίμηση των παραμέτρων του. Αυτό το απλό μοντέλο έχει εφαρμοστεί αποτελεσματικά για την περιγραφή της μη θερμικής αδρανοποίησης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε συνάρτηση των συγκεντρώσεων σε οργανικά οξέα και νιτρώδη (Buchanan & Golden, 1994), όπως και σε συνθήκες μειωμένου οξυγόνου (Buchanan & Golden, 1995). Συνήθως η φάση καθυστέρησης διαφοροποιείται πολύ σε μια καμπύλη αδρανοποίησης. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την ανάπτυξη δευτερογενών μοντέλων που περιγράφουν την επίδραση του περιβάλλοντος στη φάση καθυστέρησης. Συνεπώς, με τη χρήση του μοντέλου αυτού η επιβίωση εκφράζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για μια μείωση 4 λογαρίθμων (Buchanan & Golden, 1994, 1998):

$$T_{4D} = T_L + 4 \cdot D \quad (1.29)$$

McKellar & Lu (2004)

Εντούτοις, οι πολύπλοκες κινητικές αδρανοποίησης απαιτούν τη χρήση μη γραμμικών μοντέλων. Το εκθετικό μοντέλο αδρανοποίησης (power law) περιλαμβάνει κοίλη καμπύλη, η οποία στερείται φάσης καθυστέρησης αλλά φέρει πληθυσμό ουράς:

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{t^p}{D} \quad (1.30)$$

McKellar & Lu (2004)

Μία κοίλη καμπύλη σχηματίζεται όταν  $p < 1$ , ενώ μία καμπύλη κυρτού σχήματος αναπτύσσεται όταν  $p > 1$ . Το εκθετικό μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί στη μοντελοποίηση της καμπυλότητας σε καμπύλες επιβίωσης του μικροοργανισμού *Enterococcus faecium* (Ross et al., 1998) και της αλκαλικής φωσφατάσης (McKellar et al., 1994) στο γάλα.

Η εξίσωση 1.30 τροποποιήθηκε για να προσομοιώσει την επιβίωση του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* κατά τη θέρμανση σε αποβουτυρωμένο γάλα (Daughtry et al., 1997):

$$\log \frac{N}{N_0} = -kte^{-\lambda t} \quad (1.31)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου  $k$  είναι ο συντελεστής μείωσης και  $\lambda$  ο συντελεστής υποβάθμισης.

Μία λογιστική εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μοντελοποίηση της ανάπτυξης με σκοπό την τροποποίηση της απλής εκθετικής ανάπτυξης προκειμένου να λάβει υπόψη τον περιορισμό στο μέγεθος του μέγιστου πληθυσμού ως αποτέλεσμα της έλλειψης σε θρεπτικά συστατικά. Ομοίως, μία λογιστική εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την περιγραφή της περιορισμένης θανάτωσης ενός μικροοργανισμού εξαιτίας της επίδρασης κάποιου παράγοντα που προκαλεί στρες ή την καταστροφή στο κύτταρο (Pruitt & Kamau, 1993). Η λογιστική αυτή συνάρτηση καλείται εξίσωση Fermi και χρησιμοποιείται για την περιγραφή καμπυλών μείωσης που εμφανίζουν συμμετρία:

$$\log \frac{N}{N_0} = \log \left[ \frac{1 + e^{-bt_L}}{1 + e^{b(t-t_L)}} \right] \quad (1.32)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου  $N$  είναι ο πληθυσμός (cfu/ml) που επιβιώνει σε χρόνο  $t$ ,  $N_0$  είναι ο πληθυσμός που επιβιώνει σε χρόνο  $t=0$ ,  $b$  είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός θανάτου και  $t_L$  είναι η φάση καθυστέρησης πριν από την αδρανοποίηση.

Μία τροποποίηση της εξίσωσης Fermi περιλαμβάνει δύο όρους. Ο πρώτος περιλαμβάνει ένα τμήμα του πληθυσμού των μικροοργανισμών που είναι ευαίσθητος στη θέρμανση (πρωτογενής πληθυσμός), ενώ ο δεύτερος όρος περιλαμβάνει το πιο ανθεκτικό στη θέρμανση τμήμα του πληθυσμού (διφασικό μοντέλο, Whiting, 1993):

$$\log \frac{N}{N_0} = \log \left[ \frac{F(1 + e^{-b_1 t_L})}{(1 + e^{b_1(t-t_L)})} + \frac{(1-F)(1 + e^{-b_2 t_L})}{(1 + e^{b_2(t-t_L)})} \right] \quad (1.33)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου  $b_1$  και  $b_2$  είναι οι μέγιστοι ρυθμοί θανάτωσης για τον πρωτογενή και δευτερογενή πληθυσμό, αντίστοιχα. Οι τιμές  $D$  μπορούν να προσδιοριστούν ως  $2.3/b$  για κάθε πληθυσμό. Οι φάσεις προσαρμογής μπορεί να εκλείπουν σε κάποιες περιπτώσεις, οπότε ο όρος  $t_L$  λαμβάνει μηδενική τιμή. Στις περιπτώσεις που παρατηρείται μόνο ένας πληθυσμός, ο όρος  $F$  λαμβάνει τιμή ίση με τη μονάδα, οπότε η εξίσωση παίρνει την προηγούμενη μορφή της. Το διαφορικό λογιστικό μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί στη μοντελοποίηση της αδρανοποίησης σπορίων του μικροοργανισμού *Clostridium botulinum* (Juneja et al., 1995), και της μη θερμικής αδρανοποίησης των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* (Buchanan & Golden, 1994, 1995, 1998) και *Staphylococcus aureus* (Whiting et al., 1996).

Μία άλλη παραλλαγή της λογιστικής εξίσωσης (λογιστικό μοντέλο τεσσάρων παραμέτρων) έχει επίσης προταθεί από τους Cole et al. (1993):

$$y = a + \frac{\omega - a}{1 + e^{-\frac{4\sigma(\tau-x)}{\omega-a}}} \quad (1.34)$$

McKellar & Lu (2004)

όπου  $y = \log_{10} \text{cfu/ml}$ ,  $x = \log_{10}$  χρόνου,  $a$  είναι η ανώτατη ασύμπτωτη,  $\omega$  είναι η κατώτατη ασύμπτωτη,  $\tau$  είναι ο χρόνος στον οποίο παρατηρείται η μέγιστη κλίση της καμπύλης και  $\sigma$  είναι η μέγιστη κλίση. Το μοντέλο αυτό εφαρμόστηκε στη μελέτη επιβίωσης του μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica* σε pH και θερμοκρασίες συντήρησης κάτω από τις άριστες τιμές (Little et al., 1994), καθώς και στη θερμική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών *Salmonella typhimurium* (Duffy et al., 1995), *Clostridium botulinum* (Anderson et al., 1996), *Salmonella enteritidis* και *Escherichia coli* (Blackburn et al., 1997).

Η τροποποιημένη εξίσωση Gompertz (εξίσωση 1.35) (Linton et al., 1995) έχει χρησιμοποιηθεί για την προσαρμογή των μη γραμμικών καμπυλών επιβίωσης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε ρυθμιστικό διάλυμα (Linton et al., 1995) και σε προϊόν παιδικής διατροφής (Linton et al., 1996).

$$\log \frac{N}{N_0} = C \exp(-\exp(A + Bt)) - C \exp(-\exp(A)) \quad (1.35)$$

McKellar & Lu (2004)

Άλλο παράδειγμα εφαρμογής της ίδιας συνάρτησης αποτελούν μελέτες σχετικές με τη συνδυασμένη δράση εφαρμογής υψηλής πίεσης και ήπιας θέρμανσης στην αδρανοποίηση των μικροοργανισμών *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* σε γάλα και πουλερικά (Patterson & Kilpatrick, 1998).



### 1.3.3.2. Δευτεροταγή μοντέλα

Τα δευτεροταγή μοντέλα περιγράφουν την απόκριση μίας ή περισσότερων παραμέτρων ενός πρωτοταγούς μοντέλου, η οποία μεταβάλλεται σε σχέση με έναν ή περισσότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες ή παράγοντες καλλιέργειας (pH,  $a_w$ , T, Eh). Για παράδειγμα, έστω ότι έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella typhimurium* στο βόειο κρέας μεταξύ 15 και 40°C. Ο μικροοργανισμός αυτός θα μπορούσε να αναπτύσσεται σε κάποιες θερμοκρασίες εντός αυτού του εύρους. Από κάθε θερμοκρασία θα μπορούσε να υπολογιστεί ένας χρόνος διπλασιασμού του μικροβιακού πληθυσμού χρησιμοποιώντας ένα πρωτοταγές μοντέλο έτσι ώστε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών να περιγράφεται με μία μαθηματική εξίσωση. Η εξίσωση αυτή επιτρέπει στον τελικό χρήστη να προσδιορίσει το χρόνο διπλασιασμού που θα παρατηρηθεί σε μία δεδομένη θερμοκρασία T (Dickson et al., 1992, Whiting & Buchanan, 1993, 1994).

Η κινητική της μικροβιακής ανάπτυξης στα τρόφιμα επηρεάζεται τόσο από τους ανεξάρτητους εξωτερικούς και ενδογενείς παράγοντες όσο και από την αλληλεπίδρασή τους. Οι επιπτώσεις είναι δυνατό να προβλεφθούν με τη βοήθεια των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης.

#### 1.3.3.2.1. Ενδογενείς και εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών

Οι φυσικοχημικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που περιλαμβάνονται στα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης και επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών διακρίνονται σε ενδογενείς, οι οποίοι σχετίζονται με τις ιδιότητες του τροφίμου και εξωτερικούς, οι οποίοι σχετίζονται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Αμβροσιάδης, 2005). Για κάθε παράγοντα ορίζονται βέλτιστες, ελάχιστες και μέγιστες τιμές. Οι παράγοντες συνδυάζονται και αλληλεπιδρούν (McDonald & Sun, 1999).

Σύμφωνα με τους McDonald & Sun (1999) και Αμβροσιάδης (2005), οι σημαντικότεροι ενδογενείς παράγοντες είναι:

(i) Ο βαθμός της ενεργού οξύτητας (pH) του τροφίμου, ο οποίος αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι τιμές του pH

κυμαίνονται από 0-14 ενώ οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων βακτηρίων, αναπτύσσονται στην περιοχή από 6.6-7.5.

(ii) Η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ), η οποία αποτελεί δείκτη της ισχύος συγκράτησης του νερού από τα συστατικά του τροφίμου. Το εύρος των τιμών της κυμαίνεται από 0-1, ενώ σε γενικές γραμμές τα βακτήρια σπάνια αναπτύσσονται σε τιμές μικρότερες από 0.9, με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια να είναι πιο ευαίσθητα στην ελάττωση της  $a_w$  από τα θετικά κατά Gram.

(iii) Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh), το οποίο εκφράζει την ενέργεια που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους. Η ενέργεια αυτή παράγεται κατά τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, στις οποίες συμμετέχουν τα διάφορα συστατικά του τροφίμου. Ο λόγος των συνολικών οξειδωτικών (δέκτες  $e^-$ ) προς τα συνολικά αναγωγικά (δότες  $e^-$ ) καθορίζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του τροφίμου, Eh. Το Eh είναι ενδεικτικό της τάσης για λήψη ή απώλεια οξυγόνου από το τρόφιμο. Δεν είναι σταθερό σε όλη τη μάζα του τροφίμου αλλά μεταβάλλεται από την επιφάνεια προς το εσωτερικό του. Το εύρος του Eh, όπου αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί, είναι +300 έως -420mV.

(iv) Το οξυγόνο, το οποίο αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ανάλογα με την ανάγκη σε οξυγόνο οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε υποχρεωτικά αερόβιους μικροοργανισμούς (αναπτύσσονται παρουσία οξυγόνου, Eh θετικό), υποχρεωτικά αναερόβιους (αναπτύσσονται απουσία οξυγόνου, Eh αρνητικό), προαιρετικά αερόβιους ή αναερόβιους (αναπτύσσονται παρουσία ή απουσία οξυγόνου, Eh θετικό ή αρνητικό) και μικροαερόφιλους (αναπτύσσονται σε ελαττωμένη τάση οξυγόνου).

(v) Τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, τα οποία χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς ως πηγή ενέργειας για το μεταβολισμό τους. Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται νερό, πηγές άνθρακα (απλά σάκχαρα, αλκοόλες, αμινοξέα, σύνθετους υδατάνθρακες, λιπαρές ουσίες), πηγές αζώτου (αμινοξέα, νουκλεοτίδια και ανόργανες πηγές, όπως  $NH_3$ ), βιταμίνες και ανόργανα συστατικά (Fe, P, S, K, Mg, Cu, Ca, Zn, Co).

(vi) Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες, οι οποίοι θανατώνουν ή αναστέλλουν τη δράση των μικροοργανισμών. Μπορεί να αποτελούν φυσικά συστατικά των τροφίμων ή να προστίθενται κατά την επεξεργασία τους με στόχο την αύξηση του χρόνου διατήρησής τους. Στα φυσικά αντιμικροβιακά ανήκουν τα μπαχαρικά και τα αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών, ένζυμα και διάφορες ορμόνες. Ως πρόσθετες

αντιμικροβιακές ουσίες (αναστολείς) χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά (τετρακυκλίνη, πενικιλίνη κ.α.) και συντηρητικά (θειώδης ανυδρίτης, βενζοϊκό οξύ, σορβικό οξύ κ.α.).

(vii) Οι βιολογικές δομές των τροφίμων, οι οποίες αποτελούν τους φυσικούς τρόπους προστασίας τους από μικροοργανισμούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το κέλυφος του αυγού και οι φλοιοί των καρπών.

(viii) Η κατανομή της φυσικής μικροβιακής χλωρίδας και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών. Οι σχέσεις μεταξύ των μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο χαρακτηρίζονται ανταγωνιστικές, συμβιωτικές, ή μεταβιωτικές. Στην πρώτη περίπτωση επικρατεί ένα μόνο είδος, συνήθως παράγοντας ουσίες ή μεταβάλλοντας τις ιδιότητες του τροφίμου, έτσι ώστε να μη μπορούν να επιβιώσουν οι άλλοι μικροοργανισμοί. Στη δεύτερη περίπτωση τα διάφορα είδη συνυπάρχουν και συνήθως δρουν μαζί, ενώ στην τελευταία περίπτωση, ένας μικροοργανισμός δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για τη δράση κάποιου άλλου.

Άλλοι ενδογενείς παράγοντες είναι: Η παρουσία των φυσικών δομών, οι κολλοειδείς μορφές, η αναλογία επιφάνειας προς όγκο κ.ά.

Οι κυριότεροι εξωτερικοί παράγοντες είναι (McDonald & Sun, 1999, Αμβροσιάδης, 2005):

(i) Η θερμοκρασία. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών που μπορεί να ποικίλλει από  $-24$  έως  $+90^{\circ}\text{C}$ . Με την κατάλληλη θερμική επεξεργασία μπορεί να επιτευχθεί μερική καταστροφή των μικροοργανισμών ενός τροφίμου (με παστερίωση) ή θανάτωση όλων των μικροοργανισμών και των σπορίων τους (αποστείρωση). Οι μικροοργανισμοί ανάλογα με το εύρος των θερμοκρασιών στο οποίο αναπτύσσονται διακρίνονται σε ψυχρόφιλους (εύρος ανάπτυξης:  $-5$  έως  $+20^{\circ}\text{C}$ , άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης:  $-5$  έως  $+10^{\circ}\text{C}$ ), θερμοφίλους ( $+40$  έως  $+80^{\circ}\text{C}$ ,  $+55$  έως  $+60^{\circ}\text{C}$ ) και μεσόφιλους ( $+5$  έως  $+45^{\circ}\text{C}$ ,  $+25$  έως  $+45^{\circ}\text{C}$ ).

(ii) Η σχετική υγρασία, η οποία ορίζεται ως το ποσοστό κορεσμού (%) του περιβάλλοντος με υδρατμούς σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα κατά την αποθήκευση των τροφίμων. Εάν ένα τρόφιμο με χαμηλή ενεργότητα νερού βρεθεί σε περιβάλλον με υψηλή σχετική υγρασία, τότε θα απορροφήσει υγρασία, ενώ θα αποβάλλει υγρασία όταν η ενεργότητα του νερού είναι υψηλή και η σχετική υγρασία χαμηλή.

(iii) Η σύσταση και αναλογία ατμοσφαιρικών αερίων και αναλογία τους. Οι μεταβολές στη σύσταση του αέρα μπορούν να αποτρέψουν την αλλοίωση των τροφίμων εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών. Γι' αυτό στην τεχνολογία τροφίμων χρησιμοποιούνται ελεγχόμενες ή τροποποιημένες ατμόσφαιρες, τόσο για τους χώρους αποθήκευσης, όσο και στις συσκευασίες. Αυτές συνήθως αποτελούνται από μίγματα αερίων, κυρίως οξυγόνου (O<sub>2</sub>), αζώτου (N<sub>2</sub>), διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>), ενώ χρησιμοποιείται και το όζον (O<sub>3</sub>) ως βακτηριοκτόνο.

Άλλοι εξωτερικοί παράγοντες είναι: Η ένταση και το μήκος κύματος του φωτός, τα χαρακτηριστικά της συσκευασίας και οι αλληλεπιδράσεις, η αποθήκευση, η κατανομή κ.ά. (McDonald & Sun, 1999).

#### *1.3.3.2.2. Μοντελοποίηση των επιδράσεων των ενδογενών και εξωτερικών συνθηκών στη μικροβιακή ανάπτυξη*

Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό των μεταβλητών και τα είδη των εμπλεκόμενων μικροοργανισμών. Αυτά μπορεί να είναι κινητικά μοντέλα ή μοντέλα πιθανοτήτων. Ο Hauschild (1982) εκτίμησε την πιθανότητα εκβλάστησης ενός σπορίου και της παραγωγής τοξίνης σε αλλαντικά όπως σε συσκευασμένο μπέικον σε κενό αέρος. Οι επιδράσεις μεταβλητών όπως το αλάτι, τα νιτρώδη, τα φωσφορικά άλατα, η μορφοποίηση, οι τεχνικές επεξεργασίας και το pH έχουν επίσης μελετηθεί (Hauschild, 1982, Roberts and Gibson, 1986, Tompkin, 1986). Η πιθανότητα ανάπτυξης μπορεί να μοντελοποιηθεί με μία λογιστική συνάρτηση πιθανότητας και μία πολυωνυμική συνάρτηση (Cole et al., 1987):

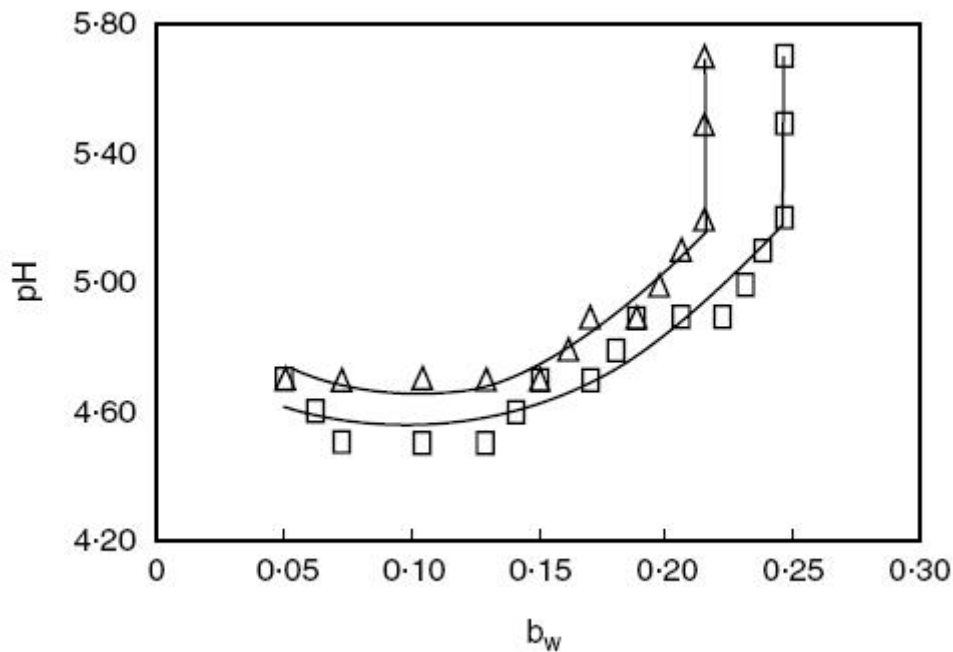
$$P = \frac{1}{1 + e^{-n}} \quad (1.36)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

όπου  $n$  είναι η συνάρτηση που περιγράφει τις επιπτώσεις των ανεξάρτητων μεταβλητών. Η **εξίσωση 1.36** προέρχεται από τη λογιστική συνάρτηση

$\text{logit}P = \frac{P}{1-P}$ , όπου  $P$  είναι η πιθανότητα του αποτελέσματος. Εάν  $\text{logit}P=n$ , τότε

προκύπτει η **εξίσωση 1.36 (Εικόνα 1.6)**. Αναλυτικές περιγραφές των μοντέλων πιθανοτήτων μπορούν να βρεθούν σε δημοσιεύσεις των Baker & Genigeorgis (1993), Dodds (1993) και Maas (1993).



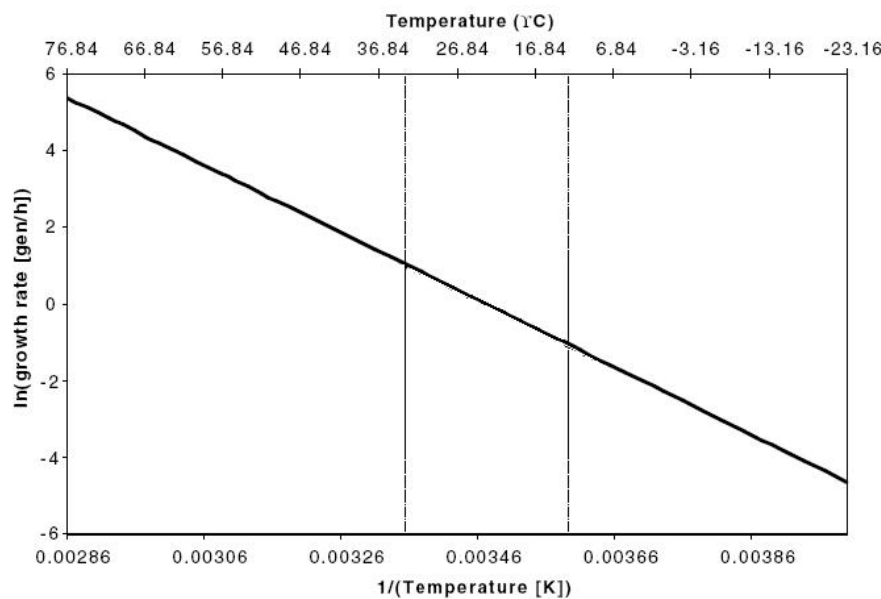
**Εικόνα 1.6** Πρόβλεψη των μεσεπιφανειών ανάπτυξης/μη ανάπτυξης για το μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta* στους 25°C, όταν η μετασχηματισμένη μεταβλητή της ενεργότητας του νερού αντιπροσωπεύεται στον άξονα x και η μεταβλητή του pH, στον άξονα y (Πηγή: Ross & Dalgaard, 2004).

Οι σύγχρονες προσεγγίσεις στη προρρητική μικροβιολογία τροφίμων έχουν επιχειρήσει να συνδέσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών με ρυθμιστικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία. Η συντριπτική πλειοψηφία των δευτεροταγών μοντέλων βασίζονται στην κινητική της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα να είναι το μοντέλο Arrhenius, το τροποποιημένο μοντέλο Arrhenius, τα μοντέλα τετραγωνικής ρίζας και τα πολυωνυμικά μοντέλα (Labuzza & Fu, 1993). Τα κινητικά μοντέλα για την πρόβλεψη του χρόνου διατήρησης γενικά βασίζονται στο φαινόμενο που επικρατεί και τείνει να μην εξειδικεύεται για ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Εντούτοις, οι πειραματικοί και περιβαλλοντικοί παράμετροι ενός μοντέλου είναι δυνατό να προσαρμόζονται σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Η πιο σημαντική από αυτές τις παραμέτρους θεωρείται ότι είναι η θερμοκρασία καθώς επηρεάζει τους ρυθμούς απόκρισης. Η προέλευση της εξίσωσης του Arrhenius είναι εμπειρική και βασίζεται σε θερμοδυναμικές θεωρήσεις (Labuzza & Riboh, 1982).

$$\text{Εξίσωση Arrhenius: } k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (1.37)$$

όπου  $k$  είναι ο ρυθμός ανάπτυξης,  $A$  είναι μία σταθερά που σχετίζεται με τον αριθμό των συγκρούσεων μεταξύ των αντιδρώντων ανά μονάδα χρόνου,  $E_A$  είναι η ενέργεια ενεργοποίησης,  $R$  είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων ( $8.314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) και  $T$  είναι η θερμοκρασία (K). Στην **εξίσωση 1.37** εάν οι τιμές του  $k$  καταγράφονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες και εάν το  $\ln k$  παριστάνεται γραφικά ως προς  $1/T$ , τότε σχηματίζεται ευθεία γραμμή με κλίση  $-E_A/R$  (**Εικόνα 1.7**) (Labuza & Riboh, 1982, Labuza et al., 1992).

Εντούτοις, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι πολύπλοκη ενώ οι προβλέψεις τιμών εκτός του παρατηρούμενου εύρους τιμών της θερμοκρασίας μπορούν να δείξουν μη γραμμικότητα. Για το λόγο αυτό η **εξίσωση 1.37** δε μπορεί να προσαρμόσει τα δεδομένα αρκετά χαμηλότερα από τις βέλτιστες ή υψηλότερα από τις ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης. Τα διαγράμματα της μικροβιακής ανάπτυξης κανονικά παρουσιάζουν ακρίβεια μόνο πάνω από ένα περιορισμένο θερμοκρασιακό εύρος (Labuza & Fu, 1993). Οι Fu et al. (1991) απεικόνισαν αυτή την ακρίβεια με διαγράμματα Arrhenius για το μικροοργανισμό *Pseudomonas fragi*. Διάφορες



(Πηγή: Ross & Dalgaard, 2004)

**Εικόνα 1.7**

$$k = k_o e^{\frac{-E_A}{RT}} \Rightarrow \ln K = \ln \left( k_o e^{\frac{-E_A}{RT}} \right) \Rightarrow \ln K = \ln k_o \cdot \left( \frac{-E_A}{RT} \right) \Rightarrow \ln K = \ln k_o \cdot \left( -\frac{E_A}{R} \right) \cdot \left( \frac{1}{T} \right) \Rightarrow$$

PLOT  $\ln K$  vs.  $\frac{1}{T}$

τροποποιήσεις της εξίσωσης 1.37 αποσκοπούσαν στην προσπάθεια βελτίωσης της προσαρμογής του μοντέλου σε ακραίες θερμοκρασίες. Οι Schoolfield et al. (1981) μετασχημάτισαν μία προηγούμενη εξίσωση (Sharpe & De Michele, 1977) σε ένα μη γραμμικό μοντέλο έξι παραμέτρων ως εξής:

$$\frac{1}{K} = \frac{\rho(25^\circ\text{C}) \frac{T}{298} \exp\left\{\frac{\Delta H_A^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298} - \frac{1}{T}\right)\right\}}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_L}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2L}} - \frac{1}{T}\right)\right] + \exp\left[\frac{\Delta H_H}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2H}} - \frac{1}{T}\right)\right]} \quad (1.38)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

όπου  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία,  $R$  η παγκόσμια σταθερά των αερίων,  $K$  η απόκριση (ρυθμός ανάπτυξης ή αντίστροφο του χρόνου διπλασιασμού),  $\rho(25^\circ\text{C})$  ένας συντελεστής κλίμακας, ίσος με το ρυθμό της απόκρισης στους  $25^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H_A^\ddagger$  είναι η ενέργεια ενεργοποίησης της κύριας αντίδρασης που καθορίζει το ρυθμό ανάπτυξης, ενώ  $\Delta H_L$  και  $\Delta H_H$  είναι οι ενέργειες ενεργοποίησης της μετουσίωσης του ενζύμου σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες, αντίστοιχα.  $T_{1/2L}$  και  $T_{1/2H}$  είναι η χαμηλότερη και η υψηλότερη αντίστοιχα θερμοκρασία, στις οποίες το ήμισυ του υπεύθυνου για το ρυθμό ανάπτυξης ενζύμου έχει μετουσιωθεί.

Η θερμοκρασία των περισσότερων τροφίμων, ιδίως των προϊόντων με βάση το κρέας, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη διασφάλιση της μικροβιακής ασφάλειας κατά την παραγωγή και διακίνησή τους. Για την πρόβλεψη του αριθμού των μικροοργανισμών ως συνάρτηση του χρόνου και της θερμοκρασίας είναι απαραίτητη η μοντελοποίηση του χρόνου καθυστέρησης, του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και της πυκνότητας του μικροβιακού πληθυσμού σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας. Οι Zwietering et al. (1991) σύγκριναν την καταλληλότητα και τη χρησιμότητα του μοντέλου του Schoolfield σε πέντε άλλα μοντέλα παρατηρώντας την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria plantarum* σε διάφορες θερμοκρασίες μεταξύ  $6$  και  $43^\circ\text{C}$ . Διαπιστώθηκε ότι το μοντέλο του Schoolfield περιέγραφε τα δεδομένα ικανοποιητικά. Εντούτοις, άλλα μοντέλα όπως το μοντέλο του Ratkowsky το οποίο θα περιγραφεί στη συνέχεια, παρουσίαζε στατιστική επάρκεια, μεγαλύτερη ευκολία στη χρήση του, ενώ περιελάμβανε λιγότερες παραμέτρους. Ο Davey (1989) χρησιμοποίησε ένα τροποποιημένο τύπο του μοντέλου Arrhenius ώστε να περιγράψει τις επιδράσεις της ενεργότητας του νερού και της θερμοκρασίας στους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} + C_3 a_w + C_4 a_w^2 \quad (1.39)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

όπου  $T$  είναι η απόλυτη θερμοκρασία (K),  $a_w$  είναι η ενεργότητα του νερού και  $C_0, C_1, C_2, C_3, C_4$  είναι οι συντελεστές προς εκτίμηση.

Η εξίσωση αυτή βρίσκει εφαρμογή σε προϊόντα όπου η ενεργότητα του νερού έχει περιοριστεί σε χαμηλά επίπεδα (Van Gerwen et al., 1998). Εντούτοις, όταν το εύρος της ενεργότητας του νερού δεν κυμαίνεται σε περιορισμένα επίπεδα, τότε οι δύο τελευταίοι όροι της εξίσωσης μπορούν να απαλειφθούν (McMeekin et al., 1992). Στην **εξίσωση 1.39** όλοι οι παράμετροι εμφανίζονται γραμμικά και έτσι η εκτίμηση μπορεί να γίνει με τη χρήση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Το μοντέλο εφαρμόστηκε σε δημοσιευμένα δεδομένα συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων που περιλαμβάνονται στις εργασίες των McMeekin et al. (1987) και Broughall et al. (1983). Μοντελοποιήθηκε επίσης η διάρκεια της φάσης καθυστέρησης της μικροβιακής ανάπτυξης, η οποία συμφωνούσε καλά με τα δημοσιευμένα αποτελέσματα (Davey, 1991). Τα τροποποιημένα μοντέλα Arrhenius τα οποία περιλαμβάνουν τα μοντέλα των Schoolfield και Davey, αναπτύχθηκαν ώστε να ξεπεραστούν τα προβλήματα και να ενισχυθεί το αρχικό μοντέλο Arrhenius όσον αφορά στην προσαρμογή των δεδομένων στα θερμοκρασιακά όρια ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Μερικοί συγγραφείς, ενώ περιγράφουν αυτά τα μοντέλα ως αποτελεσματικά, εντούτοις καταδεικνύουν την πολυπλοκότητά τους και την περιορισμένη ευελιξία τους (Buchanan, 1993a).

Το μοντέλο Belehradek, το οποίο δημοσιεύτηκε το 1926, παρέμενε σε αδράνεια (Belehradek, 1930, McMeekin et al., 1993, Ross, 1993) έως ότου οι Ratkowsky et al. (1982) πρότειναν την εφαρμογή του στη μικροβιολογία τροφίμων. Το μοντέλο αυτό είναι επίσης γνωστό ως μοντέλο τετραγωνικής ρίζας και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{\min}) \quad (1.40)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

όπου  $k$  είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης,  $b$  είναι η κλίση της γραμμής παλινδρόμησης κατά την απεικόνιση του  $k$  ως συνάρτηση της θερμοκρασίας,  $T$  είναι η θερμοκρασία πειραματισμού (σε °C ή K) και  $T_{\min}$  είναι η θεωρητικά ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η μικροβιακή ανάπτυξη και η οποία



προσδιορίζεται ως το σημείο τομής της γραμμής παλινδρόμησης με τον άξονα της θερμοκρασίας για την τιμή  $k=0$ .

Ο Ratkowsky έδειξε ότι η **εξίσωση 1.40** περιέγραφε ικανοποιητικά τη σχέση μεταξύ του ρυθμού της μικροβιακής ανάπτυξης και της θερμοκρασίας σε περισσότερα από 50 σύνολα δεδομένων (Ratkowsky et al.,1982). Οι Pooni & Mead (1984) δοκιμάζοντας την **εξίσωση 1.40** σε δεδομένα από 14 δημοσιευμένες εργασίες που αφορούσαν σε αλλοιώσεις πουλερικών και συγκρίνοντάς την με άλλα μοντέλα, διαπίστωσαν ότι ήταν η πλέον κατάλληλη για την πρόβλεψη της αλλοίωσης σε θερμοκρασίες από  $-2$  έως  $15^{\circ}\text{C}$ . Η παρακολούθηση της αλλοίωσης του κρέατος εξαιτίας της ανάπτυξης των μεσόφιλων μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ολοκληρωτών θερμοκρασίας οι οποίοι ήταν προγραμματισμένοι με σχετικές καμπύλες ανάπτυξης οι οποίες βασίζονταν σε τιμές ελάχιστης θερμοκρασίας μεσόφιλων μικροοργανισμών (Gill, 1985, Smith, 1985). Η εξίσωση αργότερα επεκτάθηκε ώστε να καλύψει ολόκληρο το εύρος των θερμοκρασιών όπου λαμβάνουν χώρα βιοκινητικές διεργασίες (Ratkowsky et al.,1982) και να συμπεριλάβει τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης σε θερμοκρασίες πάνω από την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης ( $T_{opt}$ ) (Ratkowsky et al.,1983). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη του νέου εμπειρικού μη γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης:

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{min}) \cdot \{1 - \exp[c \cdot (T - T_{max})]\} \quad (1.41)$$

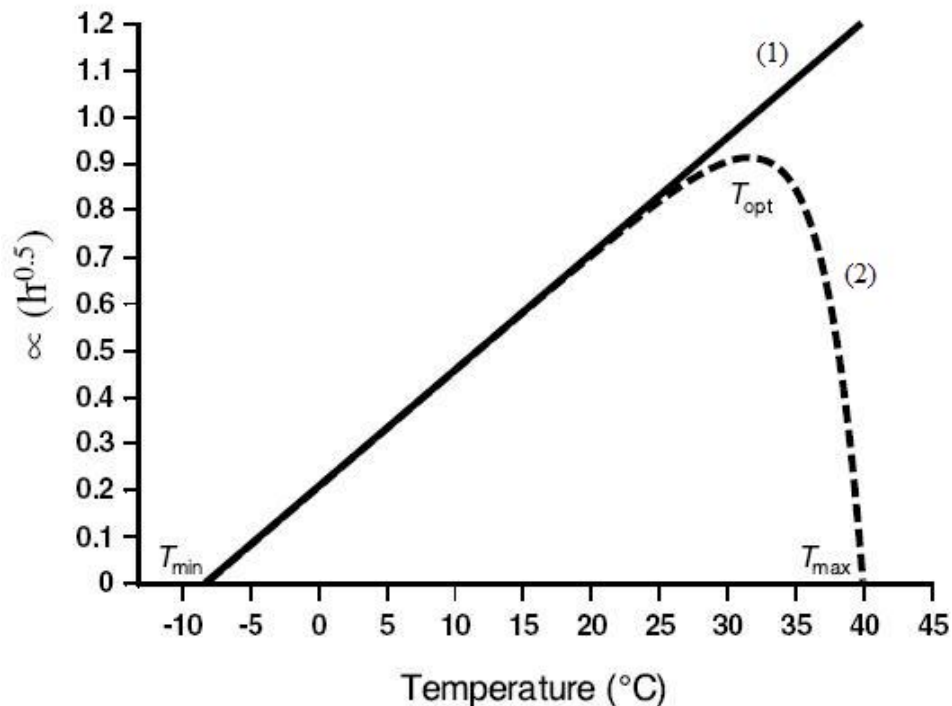
McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

όπου  $b$  είναι ο συντελεστής παλινδρόμησης του  $k$  ως προς  $T$  (K) για θερμοκρασίες  $T < T_{opt}$ ,  $c$  είναι μια πρόσθετη παράμετρος που επιτρέπει στο μοντέλο να προσαρμόσει τα δεδομένα της θερμοκρασίας πάνω από τη θερμοκρασία  $T_{opt}$ , και  $T_{max}$  είναι η ανώτατη θερμοκρασία όπου η γραμμή παλινδρόμησης τέμνει τον άξονα της θερμοκρασίας για τιμή  $k=0$ , όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της **εικόνας 1.8**.

Οι όροι  $T_{min}$  και  $T_{max}$  μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να κατατάξουν τους μικροοργανισμούς με πιο αντικειμενικό τρόπο όπως ψυχρόφιλους, μεσόφιλους ή θερμόφιλους (Ross, 1993).

Οι Ratkowsky et al. (1983) εφάρμοσαν με επιτυχία την **εξίσωση 1.41** σε δεδομένα από 29 βακτηριακά στελέχη. Άλλοι ερευνητές έχουν επίσης δείξει ότι η **εξίσωση 1.41** προβλέπει με επιτυχία τις επιπτώσεις των σταθερών θερμοκρασιών αποθήκευσης στους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Chandler & McMeekin, 1985a,b, Phillips & Griffiths, 1987). Οι επιπτώσεις των κυμαινόμενων θερμοκρασιών αποθήκευσης έχουν μελετηθεί από τους Blankenship et al. (1988), ο

οποίος ανέπτυξε ένα δυναμικό μοντέλο για την πρόβλεψη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Clostridium perfringens* σε μαγειρεμένο κρέας με τσίλι κατά τη διάρκεια της ψύξης.



**Εικόνα 1.8** Προσομοίωση της εξίσωσης 1.30 (ευθεία 1) και της εξίσωσης 1.31 (καμπύλη 2) όταν  $b=0.025 \text{ h}^{0.5}/^\circ\text{C}$ ,  $T_{\min}=-8^\circ\text{C}$ ,  $c=0.30^\circ\text{C}^{-1}$  και  $T_{\max}=40^\circ\text{C}$  (Πηγή: Ross & Dalgaard, 2004)

Η **εξίσωση 1.41** έχει υποστεί πολλές τροποποιήσεις. Οι McMeekin et al. (1987) πρόσθεσαν την παράμετρο  $a_w$ . Το μοντέλο που προέκυψε (**εξίσωση 1.42**) προέβλεψε με ακρίβεια τις επιπτώσεις της θερμοκρασίας και της ενεργότητας του νερού στο ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Staphylococcus xylosus* και *Halobacterium spp.* στα αποξηραμένα παστά ψάρια (McMeekin et al., 1987, Chandler & McMeekin, 1989a,b).

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \sqrt{(a_w - a_{w\min})} \quad (1.42)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

Εντούτοις, οι Chandler & McMeekin (1989a) έδειξαν ότι η **εξίσωση 1.42** δεν περιελάμβανε όρους εξωτερικού γινομένου, γεγονός που συνεπάγεται ότι οι παράμετροι δρουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο. Επιπρόσθετα, η **εξίσωση 1.42** θα μπορούσε να μοντελοποιήσει την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* δίχως την αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας και της ενεργότητας του νερού. Οι Adams et al. (1991) τροποποίησαν την **εξίσωση 1.42** για τις επιπτώσεις από το συνδυασμό του pH

και της θερμοκρασίας. Έδειξαν ότι ο ρυθμός ανάπτυξης υπό μεταβλητές συνθήκες θερμοκρασίας και pH μπορεί να προβλεφθεί χρησιμοποιώντας την τροποποιημένη εξίσωση, η οποία έδωσε καλές προσαρμογές για τρεις ορότυπους του μικροοργανισμού *Yersinia enterocolitica*.

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \sqrt{(pH - pH_{\min})} \quad (1.43)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

Οι McMeekin et al. (1992) πρότειναν ότι τα αποτελέσματα της θερμοκρασίας, της ενεργότητας του νερού και του pH θα μπορούσαν να περιγραφούν με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \sqrt{(a_w - a_{w\min})} \cdot \sqrt{(pH - pH_{\min})} \quad (1.44)$$

McDonald & Sun (1999), Ross & Dalgaard (2004)

Η ανωτέρω εξίσωση χρησιμοποιήθηκε μεταγενέστερα με επιτυχία για την πρόβλεψη του ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* από τους Wijtzes et al. (1993).

Η συσκευασία με τροποποιημένες ατμόσφαιρες χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλά προϊόντα νωπού κρέατος. Οι όροι του pH αντικαταστάθηκαν στην **εξίσωση 1.44** με αντίστοιχους που περιγράφουν το διαλυμένο διοξείδιο του άνθρακα σε συσκευασμένα τρόφιμα υπό συνθήκες τροποποιημένων ατμοσφαιρών. Η εξίσωση:

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \frac{(\%CO_{2\max} - \%CO_2)}{\%CO_{2\max}} \quad (1.45)$$

Ross & Dalgaard (2004)

προτάθηκε για τη μοντελοποίηση των επιπτώσεων των εμπλουτισμένων με CO<sub>2</sub> ατμοσφαιρών στο ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Photobacterium phosphoreum* στα ψάρια (Dalgaard, 1995, Dalgaard et al., 1997). Αργότερα το μοντέλο που περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \sqrt{(a_w - a_{w\min})} \cdot \sqrt{(CO_{2\max} - CO_2)} \cdot \sqrt{(NaL_{\max} - NaL)} \quad (1.46)$$

Ross & Dalgaard (2004)

χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση των εξισώσεων του CO<sub>2</sub> και του γαλακτικού νατρίου (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub>) στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών *Leptobacillus sake* και *Listeria monocytogenes*, σε σταθερό pH (Devlieghere et al., 1998, 2000 a,b).

Ένα πιο περιεκτικό μοντέλο τύπου τετραγωνικής ρίζας που περιλαμβάνει τις επιδράσεις της θερμοκρασίας, της ενεργότητας του νερού και του γαλακτικού οξέος προτάθηκε σε σειρά δημοσιεύσεων από τους Presser et al (1997), Ross (1993), Salter et al. (1998) και Tienungoon (1998):

$$\sqrt{k} = c \cdot (T - T_{\min}) \cdot (1 - \exp(d \cdot (T - T_{\max}))) \cdot \sqrt{(a_w - a_{w\min})} \cdot (1 - \exp(g \cdot (a_w - a_{w\max}))) \cdot \sqrt{1 - 10^{pH_{\min} - pH}} \cdot \sqrt{1 - 10^{pH - pH_{\max}}} \cdot \sqrt{1 - \frac{LAC}{U_{\min} \cdot (1 + 10^{pH - pK_a})}} \cdot \sqrt{1 - \frac{LAC}{D_{\min} \cdot (1 + 10^{pK_a - pH})}} \quad (1.47)$$

Ross & Dalgaard (2004)

Εφαρμόστηκε στους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*. Στην πιο σύνθετη μορφή του παρουσιάστηκε στην εργασία των Ross et al. (2003). Οι παράμετροι c, d και g είναι παραμέτροι προσαρμογής, LAC είναι η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, η οποία εκφράζεται σε mM,  $U_{\min}$  είναι η ελάχιστη συγκέντρωση (mM) του αδιάστατου γαλακτικού οξέος που εμποδίζει την ανάπτυξη όταν όλοι οι άλλοι παράγοντες είναι βέλτιστοι,  $D_{\min}$  είναι η ελάχιστη συγκέντρωση (mM) του διστάμενου γαλακτικού οξέος που εμποδίζει την ανάπτυξη όταν όλοι οι άλλοι παράγοντες είναι βέλτιστοι,  $pK_a$  είναι το pH για το οποίο οι συγκεντρώσεις του αδιάστατου και διστάμενου γαλακτικού οξέος είναι ίσες.

Πολλές συζητήσεις έχουν λάβει χώρα κατά τη σύγκριση του μοντέλου Arrhenius με τα μοντέλα τετραγωνικής ρίζας. Κάποιοι έχουν εκδηλώσει την προτίμησή τους στα μοντέλα τετραγωνικής ρίζας για την πρόβλεψη των επιπτώσεων της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Pooni and Mead, 1984, Standard et al., 1985, McMeekin et al., 1989, Ratkowsky et al., 1991). Οι Fu et al. (1991) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τόσο τα μοντέλα τετραγωνικής ρίζας όσο και το μοντέλο Arrhenius μπορούσαν να προσαρμόσουν τη φάση καθυστέρησης και το ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Pseudomonas fragi* σε σταθερή θερμοκρασία. Σε συγκριτική αξιολόγηση οκτώ συνόλων δεδομένων ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Clostridium botulinum* στη μαγειρεμένη γαλοπούλα, οι Adair et al. (1989) ανακάλυψαν ότι το μοντέλο Schoolfield αποτελούσε μία περισσότερο πραγματική περιγραφή των πειραματικών δεδομένων. Ωστόσο, άλλοι ερευνητές αμφισβήτησαν τη διαδικασία που χρησιμοποίησαν οι Adair et al. (1989), παρατηρώντας ότι το μοντέλο που εφαρμόστηκε δεν ήταν το κατάλληλο ενώ το μοντέλο τετραγωνικής ρίζας προσάρμοζε τα δεδομένα με μεγαλύτερη επιτυχία (McMeekin et al., 1989; Ross, 1993). Οι Baird Parker & Kilsby (1987) ανακάλυψαν ότι το μοντέλο Schoolfield ήταν καλύτερο από το μοντέλο τετραγωνικής ρίζας για την πρόβλεψη του μικροοργανισμού *Clostridium botulinum* σε συσκευασμένο κιμά υπό συνθήκες κενού αέρος, σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Ο Zwietering και οι συνεργάτες του, πρώτοι εισήγαγαν την έννοια της συνάρτησης  $\gamma$  (gamma concept) στην προορητική μικροβιολογία το 1992. Αργότερα, η συνάρτηση βελτιώθηκε από τους Wijtzes et al. (1998, 2001), Zwietering (1999) και Zwietering et al. (1996). Η συνάρτηση  $\gamma$  βασίζεται:

(i) Στις παρατηρήσεις ότι πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης δρουν ανεξάρτητα και η επίδραση κάθε μετρήσιμου παράγοντα στον ρυθμό ανάπτυξης μπορεί να παρασταθεί με ένα διακριτό όρο ο οποίος πολλαπλασιάζεται με όρους που εκφράζουν την επίδραση των άλλων παραγόντων που επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης, π.χ.

$$\mu = f(\text{θερμοκρασία}) \times f(a_w) \times f(\text{pH}) \times f(\text{οργανικά οξέα}) \times f(\text{άλλος παράγοντας}_1) \times f(\text{άλλος παράγοντας}_2) \times \dots \times f(\text{άλλος παράγοντας}_n)$$

(ii) Στο γεγονός ότι η επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης κάθε παράγοντα μπορεί να εκφραστεί με τη μορφή κλάσματος του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (π.χ. ο ρυθμός όταν ο περιβαλλοντικός παράγοντας βρίσκεται σε βέλτιστο επίπεδο).

Κάτω από ολοκληρωτικά βέλτιστες συνθήκες κάθε μικροοργανισμός παρουσιάζει ένα μέγιστο αναπαραγωγικό ρυθμό ανάπτυξης παρά την πιθανή επίδραση της παραλλακτικότητας του στελέχους. Καθώς κάθε περιβαλλοντικός παράγοντας γίνεται περιοριστικός, ο ρυθμός ανάπτυξης ελαττώνεται με αναμενόμενο τρόπο και η έκταση της αναστολής μπορεί να συσχετισθεί με το βέλτιστο ρυθμό ανάπτυξης. Ο συσχετισμός αυτός γίνεται υπολογίζοντας το σχετικό ρυθμό ανάπτυξης, στις υπό μελέτη συνθήκες και συγκρίνοντάς το με τον βέλτιστο. Συνεπώς, η αθροιστική επίδραση πολλών παραγόντων που ισοσταθμίζονται σε περιοριστικά επίπεδα, μπορεί να εκτιμηθεί από το προϊόν της αναστολής του ρυθμού ανάπτυξης εξαιτίας της επίδρασης κάθε παράγοντα σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\gamma = \frac{\mu_{\max}(T, a_w, \text{pH}, \dots)}{\mu_{\max \text{ opt}}} \quad (1.48)$$

Ross & Dalgaard (2004)

Η σχετική ανασταλτική επίδραση μιας συγκεκριμένης περιβαλλοντικής μεταβλητής περιγράφεται από ένα παράγοντα ανάπτυξης  $\gamma$  που αποτελεί ένα αδιάστατο μέγεθος, οι τιμές του οποίου κυμαίνονται από 0 έως 1. Οι περιβαλλοντικές συναρτήσεις εκφράζονται ως εξής:

$$\gamma(T) = \left( \frac{T - T_{\min}}{T_{\text{opt}} - T_{\min}} \right)^2 \quad (1.49)$$

$$\gamma(\text{pH}) = \frac{(\text{pH} - \text{pH}_{\min})(\text{pH}_{\max} - \text{pH})}{(\text{pH}_{\text{opt}} - \text{pH}_{\min})(\text{pH}_{\max} - \text{pH}_{\text{opt}})} \quad (1.50)$$

$$\gamma(a_w) = \frac{(a_w - a_{w,\min})}{(1 - a_{w,\min})} \quad (1.51)$$

Ross & Dalgaard (2004)

Η σχετική ανασταλτική επίδραση μπορεί να προσδιοριστεί από την "απόσταση" μεταξύ του βέλτιστου επιπέδου του παράγοντα και του ελάχιστου (ή του μέγιστου) επιπέδου όπου η ανάπτυξη αναστέλλεται εντελώς, όπως προκύπτει από κάποιο μοντέλο πρόβλεψης. Σε ένα μοντέλο  $\gamma$  προσέγγισης, ο αναφερόμενος ρυθμός ανάπτυξης είναι το  $\mu_{\max}$ . Τα αναφερόμενα επίπεδα της θερμοκρασίας, της ενεργότητας του νερού κ.α. είναι εκείνα στα οποία είναι βέλτιστος ο ρυθμός ανάπτυξης και συνήθως συμβολίζονται ως  $T_{\text{opt}}$ ,  $a_{w \text{ opt}}$ ,  $\text{pH}_{\text{opt}}$ , κ.α. Η συνδυασμένη επίδραση των διάφορων περιβαλλοντικών παραγόντων προσδιορίζεται τότε από τον πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων παραγόντων  $\gamma$ :

$$\mu_{\max} = \mu_{\max \text{ opt}} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(\text{pH}) \cdot \gamma(a_w) \quad (1.52)$$

Ross & Dalgaard (2004)

Η επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων όπως το  $\text{CO}_2$ , το γαλακτικό νάτριο και τα νιτρώδη, συμπεριλαμβάνονται στα μοντέλα τύπου τετραγωνικής ρίζας. Η απουσία αυτών των ανασταλτικών ουσιών αποτελεί βέλτιστη προϋπόθεση για την ανάπτυξη. Για το λόγο αυτό ο υπολογισμός των  $\gamma$  παραγόντων απαιτεί πληροφόρηση μόνο για την ελάχιστη συγκέντρωση της κάθε ουσίας που εμποδίζει την ανάπτυξη.

Τα μοντέλα θεμελιωδών παραμέτρων (Cardinal Parameter Models) εμφανίστηκαν το 1993 και αποτελούν σημαντική κατηγορία δευτεροταγών εμπειρικών μοντέλων (Augustin & Carlier, 2000a,b, Le Marc et al., 2002, Messins et al., 2002, Pouillot et al., 2003, Rosso, 1995, 1999, Rosso et al., 1993, 1995, Rosso & Robinson, 2001). Η αρχή της ανάπτυξής τους βασίζεται στη χρήση παραμέτρων που έχουν βιολογική ή μαθηματική σημασία. Οι αρχικές τιμές των παραμέτρων προσδιορίζονται αφού πρώτα προσαρμοστούν τα μοντέλα στα πειραματικά δεδομένα μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Τα μοντέλα θεμελιωδών παραμέτρων βασίζονται στην προϋπόθεση ότι η ανασταλτική επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι πολλαπλασιαστική. Αποτελούνται από

έναν διακριτό όρο για κάθε περιβαλλοντικό παράγοντα. Κάθε όρος εκφράζεται ως ο ρυθμός ανάπτυξης σε σχέση με εκείνον, όταν ο παράγοντας είναι βέλτιστος. Ο κάθε όρος κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0 και 1. Στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης όλοι οι όροι έχουν τιμή 1 και για το λόγο αυτό ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ισούται με το βέλτιστο ρυθμό ανάπτυξης ( $\mu_{opt}$ ) (εξίσωση 1.53).

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \cdot CM_2(T) \cdot CM_2(a_w) \cdot CM_1(pH) \cdot \prod_{i=1}^n \gamma(c_i) \cdot \prod_{j=1}^p \gamma(k_j) \quad (1.53)$$

Ross & Dalgaard (2004)

Οι εξισώσεις 1.53 έως 1.55 εκφράζουν ένα μοντέλο θεμελιωδών παραμέτρων που περιλαμβάνει την επίδραση της θερμοκρασίας (T), της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ), του pH, των ανασταλτικών ουσιών ( $c_i$ ) και των ποιοτικών παραγόντων ( $k_j$ ) στο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης  $\mu_{max}$  (Augustin & Carlier, 2000a).

$$CM_n = \left\{ \begin{array}{l} 0, X \leq X_{min} \\ \frac{(X - X_{max}) \cdot (X - X_{min})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \cdot \left[ (X_{opt} - X_{min})(X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \right] \cdot \left[ (n-1) \cdot X_{opt} + X_{min} - n \cdot X \right]}, X_{min} < X < X_{max} \\ 0, X \geq X_{max} \end{array} \right. \quad (1.54)$$

Ross & Dalgaard (2004)

$$\gamma(c_i) = \begin{cases} (1 - c_i / MIC_i)^2, & c_i < MIC_i \\ 0, & c_i \geq MIC_i \end{cases} \quad (1.55)$$

Ross & Dalgaard (2004)

όπου  $X_{min}$  και  $X_{max}$  είναι αντίστοιχα οι τιμές του  $X_i$  πάνω και κάτω από τις οποίες δεν πραγματοποιείται ανάπτυξη, ενώ  $X_{opt}$  είναι η τιμή στην οποία το  $\mu_{max}$  είναι ίσο με τη βέλτιστη τιμή  $\mu_{opt}$ . Η μεταβλητή  $[MIC]_i$  συνιστά την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των συστατικών που περιγράφηκαν ανωτέρω στην οποία δε λαμβάνει χώρα ανάπτυξη. Αυτό το μοντέλο θεμελιωδών παραμέτρων αναπτύχθηκε από βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούσαν στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Οι ανασταλτικές ουσίες περιλαμβάνουν αδιάστατο οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ, βενζοϊκό νάτριο, σορβικό κάλιο, αδιάστατο νιτρώδες νάτριο, glycerol monolaurin, βουτυλιωμένη υδροξυανυσόλη, βουτυλιωμένο υδροξυτουλουένιο, tert-βουτυλυδροκινόνη, CO<sub>2</sub>, καφεΐνη και φαινόλη. Οι ποιοτικοί

παράγοντες περιλαμβάνουν την επίδραση της ανταγωνιστικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών και της ανασταλτικής επίδρασης που οφείλεται σε συγκεκριμένους τύπους τροφίμων.

Άλλες κατηγορίες δευτεροταγών μοντέλων αποτελούν:

(i) Η μοντελοποίηση των διαδραστικών επιδράσεων της θερμοκρασίας, του pH και της συγκέντρωσης των αδιάστατων οργανικών οξέων [HA] στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (Le Marc et al., 2002).

(ii) Τα νευρωνικά δίκτυα (artificial neural networks), τα οποία είναι αλγόριθμοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτέλεση πολύπλοκων στατιστικών διαδικασιών για μοντελοποίηση μεταξύ ενός συνόλου μεταβλητών πρόβλεψης και μεταβλητών απόκρισης.

### 1.3.3.3. Τριτοταγή μοντέλα

Τα τριτοταγή μοντέλα περιλαμβάνουν δύο συνιστώσες. Τις βάσεις δεδομένων και τα λογισμικά πρόβλεψης. Η μελέτη του επιστημονικού αυτού αντικείμενου εμπίπτει τόσο στη Βιοπληροφορική όσο και στα Βιομαθηματικά. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των Η/Υ με έμφαση στη διαρκή εξέλιξη της υπολογιστικής ισχύος έκαναν δυνατή την εκτέλεση πολύπλοκων μαθηματικών υπολογισμών. Το γεγονός αυτό αξιοποιήθηκε από τη προρρητική μικροβιολογία ώστε να αναπτυχθούν τα λογισμικά πρόβλεψης που βασίζονται σε ένα ή σε περισσότερα πρωτοταγή και δευτεροταγή μοντέλα (McDonald & Sun, 1999). Οι πολύτιμες εφαρμογές της προρρητικής μικροβιολογίας θα ήταν πολύ δύσκολο να αναδειχτούν χωρίς τις μεγάλες ταχύτητες επεξεργασίας των σύγχρονων μικροεπεξεργαστών, επειδή η εκτέλεση των προσομοιώσεων θα ήταν εξαιρετικά χρονοβόρα. Τα τριτοταγή μοντέλα περιλαμβάνουν την εισαγωγή (input) των μοντέλων, την επεξεργασία τους (processing) και στη συνέχεια την εξαγωγή των αποτελεσμάτων (output) με τη μορφή γραφικών παραστάσεων. Χαρακτηριστικά τριτοταγή μοντέλα πρόβλεψης που έχουν ευρεία χρήση τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και στην παγκόσμια ερευνητική κοινότητα είναι τα : PMP (Pathogen Modeling Program) και FMM (Food MicroModel) (Tamplin et al., 2004).

Σύμφωνα με τους Tamplin et al. (2004), σε γενικές γραμμές η ανάπτυξη των λογισμικών που αφορούν σε μικροβιολογικά δεδομένα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια ανάπτυξης:



- (i) Πειραματικά δεδομένα σε πρωτογενή μορφή (raw data): Καταγράφονται συνήθως σε λογιστικά φύλλα από τον ερευνητή ο οποίος εκτελεί τα πειράματα.
- (ii) Βάση δεδομένων: Περιλαμβάνει σύνολα δεδομένων τα οποία κατηγοριοποιούνται και καταγράφονται με συστηματικό τρόπο. Η καταγραφή τους ακολουθεί μία προκαθορισμένη μορφή. Η ανάπτυξη μίας βάσης δεδομένων απαιτεί τόσο προγραμματιστικές δεξιότητες όσο και την κατανόηση των δεδομένων που θα περιλαμβάνονται σε αυτήν.
- (iii) Συνοδευτική εφαρμογή (application software – browser): Αποτελεί συνοδευτικό λογισμικό που περιλαμβάνει διαδικασίες αναζήτησης και εξαγωγής δεδομένων ενδιαφέροντος.
- (iv) Απλές προβλέψεις: Παράγονται από λογισμικά στα οποία συνήθως λαμβάνει χώρα παρεμβολή τιμών (interpolated values) με τη βοήθεια μαθηματικών εξισώσεων και εξαγωγή των αποτελεσμάτων με τη μορφή γραφικών παραστάσεων.
- (v) Σύνθετες προβλέψεις: Παράγονται από λογισμικά στα οποία περιλαμβάνονται δυναμικές συνθήκες, πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης, πιθανότητα ανάπτυξης, έμπειρα συστήματα, Bayesian μέθοδοι (βασίζονται στη πιθανοτική θεωρία κατηγοριοποίησης του κανόνα του Bayes). Προς το παρόν κανένα πακέτο λογισμικού δεν είναι διαθέσιμο σε αυτό το στάδιο.

#### *1.3.3.3.1. Βάσεις δεδομένων*

Στη βάση της προρρητικής μικροβιολογίας βρίσκονται τα πειραματικά δεδομένα (raw data) από την επεξεργασία των οποίων αναπτύσσονται τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η πρόσβαση σε αυτά τα δεδομένα έχει μεγάλη σημασία για την επικύρωση των μοντέλων, για την εκτίμηση της μικροβιακής ασφάλειας και για τη βελτίωση των τεχνικών μοντελοποίησης. Πρόσφατα λογισμικά όπως είναι η βάση δεδομένων της απόκριση των μικροοργανισμών των τροφίμων, ComBase (ComBase, 2007), έχει τη δυνατότητα συγκέντρωσης μεγάλου όγκου συνόλων δεδομένων με βάση τα οποία είναι δυνατή η επιτάχυνση της διαδικασίας ανάπτυξης και επικύρωσης νέων μοντέλων. Οι βάσεις δεδομένων παρέχουν αφενός τη δυνατότητα οργάνωσης μεγάλων ποσοτήτων δεδομένων, αφετέρου της αναζήτησης και ανάκλησης των επιθυμητών πληροφοριών (Tamplin et al., 2004).

Η αμοιβαία εξάρτηση μεταξύ μαθηματικών μοντέλων και βάσεων δεδομένων επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι τελικές δοκιμές των προβλέψεων βασίζονται σε δεδομένα που προέρχονται από παρατηρήσεις. Οι συγκρίσεις που αφορούν σε μεγάλες ποσότητες δεδομένων μπορούν να γίνουν εύκολα και αποτελεσματικά μόνο εάν η μορφή των καταχωρημένων δεδομένων είναι αυστηρά τυποποιημένη και εναρμονισμένη με τις αντίστοιχες μαθηματικές μεταβλητές. Η βάση δεδομένων αποτελεί μία μεγάλη συγκέντρωση στοιχείων, οργανωμένων ειδικά για ταχεία αναζήτηση και ανάκληση. Η υπολογιστική μορφή της μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πίνακας (table) που περιλαμβάνει γραμμές (rows) και στήλες (columns). Οι στήλες συνιστούν τα πεδία (fields) ενώ το σύνολο των πεδίων μίας γραμμής συνιστά μία εγγραφή (record). Κατά το στάδιο του ορισμού των πεδίων, ένα από αυτά (key) καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η ανάλυση των δεδομένων. Η τιμή ενός πεδίου είναι δυνατό να αναλυθεί περαιτέρω με τη διαίρεσή του σε περισσότερα πεδία. Η διαίρεση του πεδίου προσδίδει μεγαλύτερη λεπτομέρεια στην εγγραφή που εμπεριέχει τα πεδία αυτά. Ο αρχικός σχεδιασμός της βάσης δεδομένων προσδιορίζει την αναγκαιότητα των υποδιαίρέσεων των πεδίων. Το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη μίας βάσης δεδομένων είναι ο καθορισμός των πεδίων και της σύνταξής τους δηλαδή το είδος των τιμών που μπορεί να δέχεται ένα πεδίο. Τυπικά, αυτές οι τιμές μπορεί να είναι είτε αριθμητικές (ποσότητες) είτε αλφαριθμητικές (κατηγορίες, περιγραφές κ.ά.). Θεωρείται χρήσιμο, όπου είναι δυνατό, να ορίζεται μία λίστα τιμών από την οποία μπορεί ο χρήστης να επιλέξει την κατάλληλη τιμή. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η τυποποίηση των τιμών των πεδίων (Tamplin et al., 2004).

Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των τροφικών συστημάτων, η μικροβιολογία πρόρρησης αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο όπου οι καλά οργανωμένες βάσεις δεδομένων έχουν υψηλή ζήτηση. Μερικά από τα προβλήματα που μπορούν να επιλυθούν με τη βοήθεια των βάσεων δεδομένων μικροβιακής απόκρισης είναι:

- (i) Η αντιμετώπιση της ανακρίβειας των μετρήσεων η οποία μπορεί να αντισταθμιστεί από πολυάριθμες μετρήσεις που περιλαμβάνονται στις βάσεις δεδομένων.
- (ii) Η μεταβλητότητα των αποκρίσεων. Η ποσοτικοποίηση και μοντελοποίηση της μεταβλητότητας απαιτούν επαναληπτικές μετρήσεις οι οποίες όμως περιλαμβάνονται στις βάσεις δεδομένων.
- (iii) Η ανταλλαγή διεθνών δεδομένων. Αυτή δε μπορεί να επιτευχθεί χωρίς τη βοήθεια συμβατών μορφών βάσεων δεδομένων.

Συνεπώς, το πρώτο ερώτημα που τίθεται κατά την ανάπτυξη μίας βάσης δεδομένων αφορά στο τι θα καταχωρηθεί. Από αυτήν την άποψη η ανάπτυξή της είναι παρόμοια με εκείνη ενός μαθηματικού μοντέλου. Και στις δύο περιπτώσεις, κατά κάποιον τρόπο, εφαρμόζεται “η τέχνη της παράλειψης του περιττού”. Στις βάσεις δεδομένων δεν μπορούν να καταγραφούν όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες των μικροβιολογικών πειραμάτων. Μερικές απλουστεύσεις και κατηγοριοποιήσεις είναι αναπόφευκτες. Οι απλουστεύσεις αυτές μπορεί να γίνονται κατά τρόπο υποκειμενικό, εντούτοις είναι αναμφισβήτητα απαραίτητες. Έτσι και τα μαθηματικά μοντέλα αποτελούν αναγκαστικά απλουστευμένες περιγραφές των φυσικών διεργασιών για την κατανόηση και πρόβλεψη πολύπλοκων φαινομένων. Η κατανομή των πληροφοριών στα πεδία μιας βάσης δεδομένων είναι παράλληλη με την κατανομή των μαθηματικών μεταβλητών σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές και φυσικοχημικές ποσότητες. Η σχέση μεταξύ των πεδίων της βάσης δεδομένων με σκοπό τη γρήγορη επεξεργασία και αναζήτηση είναι παράλληλη με τις σχέσεις μεταξύ των μαθηματικών μεταβλητών για την εξαγωγή συμπερασμάτων και προβλέψεων με τη βοήθεια εξισώσεων (McDonald & Sun, 1999).

#### *1.3.3.3.2. Λογισμικά πρόβλεψης*

Ο μηχανισμός λειτουργίας των λογισμικών πρόβλεψης περιλαμβάνει τη συνεργασία πρωτοταγών και δευτεροταγών μοντέλων για τον προσδιορισμό της έκτασης και του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών (McDonald & Sun, 1999). Οι αποκρίσεις των μικροοργανισμών στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές και φυσικοχημικές συνθήκες καθώς και η σύγκρισή τους με αντίστοιχες αποκρίσεις άλλων ειδών μικροοργανισμών υπό ανάλογες συνθήκες μπορούν να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας μία βάση δεδομένων (McDonald & Sun, 1999). Οι τελικοί χρήστες αυτών των συστημάτων δεν απαιτείται να γνωρίζουν τεχνικές μοντελοποίησης ή να έχουν τη γνώση των πρωτοταγών και δευτεροταγών μοντέλων που εμπεριέχονται στα αντίστοιχα τριτοταγή, τα οποία καθιστούν την προρρητική μικροβιολογία ένα ισχυρό εργαλείο της έρευνας και της βιομηχανικής παραγωγής ((Buchanan, 1993b, Whiting & Buchanan, 1993, 1994, Whiting, 1995).

Παρά το πλήθος των μεταβλητών που επηρεάζουν τη μικροβιακή αύξηση στα τρόφιμα, τα μοντέλα βασίζονται πρωτίστως στους κύριους καθοριστικούς παράγοντες της μικροβιακής ανάπτυξης όπως είναι η θερμοκρασία, το pH και η ενεργότητα του

νερού, ενώ τα δεδομένα για την ανάπτυξη των μοντέλων προέρχονται από εργαστηριακά μέσα (McClure et al., 1994b). Η επικύρωση των μοντέλων για χρήση στα τρόφιμα επιτεύχθηκε συγκρίνοντας την πρόβλεψη της συμπεριφοράς κάθε μικροοργανισμού με τα αντίστοιχα δημοσιευμένα δεδομένα. Όπου η βιβλιογραφία ήταν ελλιπής, πειράματα διενεργήθηκαν ειδικά για την επικύρωση των μοντέλων (McClure et al., 1994b). Η επικύρωση ενός μοντέλου πρόβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο βασίζεται στα αριθμητικά δεδομένα του χρόνου που απαιτείται για το διπλασιασμό του πληθυσμού και του χρόνου που απαιτείται για μία συγκεκριμένη μεταβολή. Τα μοντέλα της φάσης καθυστέρησης έχουν δείξει ότι η εκτίμηση της καθυστέρησης είναι γενικά λιγότερο επαναλήψιμη από το χρόνο που απαιτείται για το διπλασιασμό του πληθυσμού (McClure et al., 1994b).

Δεν υπάρχει καμία εγγύηση ότι τα αριθμητικά δεδομένα των προβλέψεων θα ταιριάζουν με εκείνα που παρατηρήθηκαν στα τροφικά συστήματα κατά τις πειραματικές διεργασίες. Οι ερευνητές έχουν επισημάνει τις αδυναμίες που παρατηρούνται στις υφιστάμενες βάσεις πληροφοριών και την ανάγκη για πιο εκτεταμένη έρευνα και ανάπτυξη τριτοταγών μοντέλων πρόβλεψης. Ωστόσο η έρευνα έχει δείξει ότι οι προβλέψεις που πραγματοποιούνται με διάφορα τριτοταγή μοντέλα συμφωνούν ικανοποιητικά με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ή τα δεδομένα των πειραματικών διεργασιών. Οι McClure et al. (1997) διαπίστωσαν ότι οι προβλέψεις από το λογισμικό Food MicroModel<sup>1</sup> συγκρίθηκαν επιτυχώς με τα αποτελέσματα από τις επιδράσεις του άλατος (NaCl), του pH, της θερμοκρασίας αποθήκευσης και του νιτρικού νατρίου (NaNO<sub>3</sub>) στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*. Εντούτοις οι Dalgaard & Vigel Jorgensen (1998) διαπίστωσαν ότι οι προβλέψεις που έγιναν από τα λογισμικά Pathogen Modelling Program<sup>2</sup> και Food MicroModel έδωσαν πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και εκτεταμένες φάσεις καθυστέρησης στην πρόβλεψη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα θαλάσσιας προέλευσης. Το σφάλμα τελικά αποδόθηκε στην επίδραση άλλων παραμέτρων έναντι εκείνων που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη. Αυτό δείχνει ότι η χρησιμότητα και η ακρίβεια ενός μοντέλου πρόβλεψης εξαρτάται άμεσα από το προϊόν (McDonald & Sun, 1999).

<sup>1</sup> Το Food MicroModel-FMM (Leatherhead Food Research Association, UK, ήταν ένα εμπορικό λογισμικό πρόβλεψης με γραφικές παραστάσεις, παρόμοιες με αυτές του PMP (McClure et al., 1994b), το οποίο σταμάτησε να κυκλοφορεί με την αρχική του μορφή. Περιοριζόταν σε μικροβιολογικά υγρά θρεπτικά υποστρώματα και συγκεκριμένα μοντέλα τροφίμων για παθογόνα και αλλοιογόνα βακτήρια (Tamplin et al., 2004).

<sup>2</sup> Περιγράφεται περιληπτικά στο κεφάλαιο 2.

Μερικοί ερευνητές έχουν προτείνει τη χρήση υπολογιστικών νευρωνικών δικτύων για την προρρητική μικροβιολογία, εντούτοις η εργασία που έχει γίνει στον τομέα αυτό είναι εξαιρετικά περιορισμένη. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι η χρήση των υπολογιστικών νευρωνικών δικτύων έχει προταθεί πρόσφατα και δεν υπήρχε ικανοποιητικός χρόνος για την ανάπτυξή τους σε ευρεία κλίμακα (Najjar et al., 1997). Συγκρίνοντας τα νευρωνικά δίκτυα με προβλέψεις που έγιναν από εξισώσεις παλινδρόμησης για πειραματικά δεδομένα που αφορούσαν στην αναερόβια ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Shigella flexneri*, διαπιστώθηκε ότι τα νευρωνικά δίκτυα παρείχαν καλύτερη συμφωνία με τα δεδομένα (Hajmeer et al., 1997). Οι Geeraerd et al. (1998) μελέτησαν τις συνδυασμένες επιδράσεις της θερμοκρασίας, του pH και του ποσοστού άλατος στη βακτηριακή ανάπτυξη σε τρόφιμα που διατηρούνται σε απλή ψύξη και έδειξαν ότι τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα αποτελούσαν μία μη γραμμική τεχνική μοντελοποίησης χαμηλής πολυπλοκότητας, η οποία θα μπορούσε με ακρίβεια να περιγράψει τα πειραματικά δεδομένα στο πεδίο των δευτεροταγών μοντέλων. Αυτή η τεχνική μοντελοποίησης θα μπορούσε να καταστήσει δυνατή με μεγαλύτερη ακρίβεια την περιγραφή των ενδογενών και εξωτερικών μεταβλητών στα τρόφιμα που διατηρούνται σε απλή ψύξη όταν συγκρίνονται με πιο οικεία μικροβιολογικά μοντέλα.

#### 1.4. Εφαρμογές των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης

Η ταχεία ανάπτυξη των μικροβιακών μοντέλων και η ικανότητά τους να προβλέπουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, καθιστούν τη μοντελοποίηση ένα πολύτιμο ερευνητικό εργαλείο. Η χρήση των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης μπορεί να παρέχει ταχεία πληροφόρηση και για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να εκτιμηθεί η πραγματική αξία και η χρησιμότητά τους. Πρέπει να επισημανθεί ότι οι εφαρμογές τους δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τη μικροβιακή ανάλυση των δειγμάτων ή την τεχνική εμπειρία και την κρίση των εκπαιδευμένων μικροβιολόγων. Τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογών οι σημαντικότερες των οποίων εντοπίζονται στα αντικείμενα της διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων, της εκτίμησης της επικινδυνότητας, της βελτίωσης των υφιστάμενων τροφίμων, της ανάπτυξης νέων καθώς και της πρόβλεψης της μικροβιακής αλλοίωσής τους (Γουγούλη, 2006).

Τα τελευταία χρόνια, σημαντική είναι η πρόοδος που έχει επιτευχθεί όσον αφορά στην ανάπτυξη και χρήση των μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης στον τομέα της Ανάλυσης Επικινδυνότητας των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP) για την ποσοτικοποίηση και εκτίμηση των μικροβιακών κινδύνων που σχετίζονται με τα τρόφιμα (Notermans et al., 1994a,b). Σύμφωνα με τους McMeekin & Ross (2002) όσον αφορά στην ανάλυση επικινδυνότητας, τα μοντέλα ανάπτυξης/μη ανάπτυξης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δείξουν ποιος μικροοργανισμός θα αναπτυχθεί στο προϊόν και αν αναπτυχθεί, εάν θα αποτελεί πιθανό κίνδυνο. Όσον αφορά στον προσδιορισμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου, καθορίζοντας τις παραμέτρους της επεξεργασίας όπως είναι η θερμοκρασία, η ενεργότητα του νερού, το pH κ.α., είναι δυνατός ο προσδιορισμός των σταδίων στα οποία η ανάπτυξη ή ο θάνατος είναι πιθανά, καθώς και η διαπίστωση εάν ο έλεγχος των κρίσιμων σημείων μπορεί να επιτευχθεί ή όχι. Όσον αφορά στον καθορισμό των ορίων, τα σενάρια "what-if" μπορούν να πραγματοποιηθούν για διαφορετικά τυποποιημένα προϊόντα έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν οι τροποποιήσεις επιτρέπουν την εμφάνιση νέων κινδύνων ή μπορούν να αυξήσουν την επικινδυνότητα ενός υφιστάμενου κινδύνου. Τέλος, όσον αφορά στον προσδιορισμό τυχόν διορθωτικών ενεργειών, εάν για κάποιο λόγο γίνει κάποιο λάθος και χαθεί ο έλεγχος στα κρίσιμα σημεία ελέγχου τότε μπορεί η μεταβολή στο μικροβιακό πληθυσμό που σχετίζεται με την απόκλιση να προσδιορισθεί και να γίνουν οι κατάλληλες διορθωτικές κινήσεις (Γουγούλη, 2006).

Η Εκτίμηση της Επικινδυνότητας Μικροβιακών Κινδύνων (Microbial Risk Assessment) αποτελεί ένα αναλυτικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των διαδικασιών παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής των τροφίμων όσον αφορά στην ασφάλεια τους και στη δημόσια υγεία (Γουγούλη, 2006). Οι περισσότερες μεθοδολογίες εκτίμησης επικινδυνότητας αποτελούνται από τέσσερα στάδια: Τον χαρακτηρισμό της πάθησης-αναγνώρισης του κινδύνου, τον προσδιορισμό της δόσης, τον προσδιορισμό της έκθεσης στον κίνδυνο, και την εκτίμηση της επικινδυνότητας (Foegeding, 1997). Τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης μπορούν να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των μικροοργανισμών στο τρόφιμο τη στιγμή της κατανάλωσής. Σε αυτό το στάδιο (προσδιορισμός της έκθεσης στον κίνδυνο) μπορεί να προβλεφθεί η μικροβιακή ανάπτυξη ακόμα και σε μεταβαλλόμενες συνθήκες (Koutsoumanis, 2001).

Οι απαιτήσεις των καταναλωτών τόσο για βελτίωση των υφιστάμενων τροφίμων όσο και για την ανάπτυξη νέων, οδήγησαν την βιομηχανική επεξεργασία

τους κοντά σε συνθήκες που ευνοούν τη μικροβιακή αλλοίωσή τους (Γουγούλη, 2006). Σύμφωνα με τον Cole (1993), η ικανότητα να κινούμαστε οριακά μεταξύ της ασφάλειας και της επικινδυνότητας με βεβαιότητα, αποτελεί ένα μέτρο που δείχνει όχι μόνο πόσο καλά ελέγχεται η επεξεργασία αλλά και πόσο καλά εξασφαλίζεται η γνώση για τη θέση των ορίων. Τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης βοηθούν στο να καθορισθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα όρια μεταξύ συνθηκών ασφάλειας και επικινδυνότητας, δίνοντας τη δυνατότητα στους σχεδιαστές τροφίμων να ερευνήσουν τις συνθήκες που το προϊόν και οι επεξεργασίες είναι σε θέση να επιτρέπουν την ανάπτυξη, επιβίωση ή θανάτωση του μικροοργανισμού που τους ενδιαφέρει (Γουγούλη, 2006).

Έχει αποδειχθεί ότι μόνο ένα κλάσμα από τη συνολική μικροχλωρίδα είναι υπεύθυνο για την αλλοίωση των τροφίμων, το οποίο αναφέρεται ως “ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί” (specific spoilage organisms) (Dalgaard, 1993). Η διάρκεια ζωής ενός συγκεκριμένου προϊόντος θα μπορούσε να υπολογιστεί ως ο χρόνος που απαιτείται από τους ειδικούς αλλοιογόνους οργανισμούς να πολλαπλασιαστούν από τον αρχικό τους πληθυσμό σε ένα επίπεδο στο οποίο παρατηρείται η αλλοίωση (επίπεδο αλλοίωσης). Η χρήση των μαθηματικών μοντέλων για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων (κυρίως της θερμοκρασίας) στην ανάπτυξη των βακτηρίων που ανήκουν ειδικούς αλλοιογόνους οργανισμούς μπορεί να οδηγήσει στην πρόβλεψη της διάρκειας ζωής των τροφίμων (Koutsoumanis & Nychas, 2000).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αμβροσιάδης, Ι., 2005. Εφαρμογή και έλεγχος του συστήματος HACCP, Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- Γουγούλη, Μ., 2006. Μελέτη και μαθηματική περιγραφή της ανάπτυξης/επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* σε μίγμα παγωτού σε στατικές και δυναμικές συνθήκες ψύξης-κατάψυξης. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Σχολή Γεωπονίας, Τομέας επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Adair, C., Kilsby, D.C., Whithall, P.T., 1989. Comparison of the Schoolfield (non linear Arrhenius) model and the square-root model for predicting bacterial growth in foods. *Food Microbiology* 6, 7–18.
- Adams, M.R., Little, C.L., Easter, M.C., 1991. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 65–71.
- Anderson, W. A., McClure, P. J., Baird-Parker, A. C., & Cole, M. B., 1996. The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213B at temperatures below 121.1°C. *Journal of Applied Bacteriology* 80, 283-290.
- Arrhenius, S., 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Sauren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 4, 226–248.
- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000a. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1706-1710.
- Augustin, J.- C., Carlier, V. 2000b. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology* 56, 53–70.
- Baird Parker, A.C., Kilsby, D.C., 1987. Principles of predictive microbiology. *Journal of Applied Bacteriology - Symposium Supplement* 63, 43S–49S.
- Baker, D.A., 1993. Probability models to assess the safety of foods with respect to *Clostridium botulinum*. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 156-161.
- Baker, D.A., Genigeorgis, C., 1993. Predictive modelling. In: *Clostridium botulinum Ecology and Control in Foods*, Marcel Dekker, New York, pp. 343–406.



- Baranyi, J., 1992a. Notes on reparameterization of bacterial growth curves. *Food Microbiology* 9, 169-174.
- Baranyi, J., 1992b. Notes on reparameterization of bacterial growth curves II. *Food Microbiology* 9, 265-267.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1992. A terminology for models in predictive microbiology - A reply to K.R. Davey. *Food Microbiology*. 9, 355-356.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26, 199-218.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. and McClure, P.J., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10, 43-59.
- Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T.A., Roberts, T.A., 1996. Effects of parameterisation on the performance of empirical models used in predictive microbiology. *Food Microbiology* 13, 83-91.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kalotia, A., Mackey, B.M., 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology* 27, 61-75.
- Bazin, M.J., Prosser, J.I., 1992. Modelling microbial ecosystems. *Journal of Applied Bacteriology - Symposium Supplement* 73, 89S-95S.
- Belehradek, J., 1930. Temperature coefficients in biology. *Biological Reviews and Biological Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 5, 30-60.
- Blackburn, C. D. W., Curtis, L. M., Humpheson, L., Billon, C., & McClure, P. J., 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology* 38, 31-44.
- Blankenship, L.C., Craven, S.E., Leffler, R.G., Custer, C., 1988. Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chilli during cooling. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1104-1108.
- Brennan, J.G., Butters, J.R., Cowell, N.D., 1990. Heat processing 2. In: *Food Engineering Operations*, Elsevier, UK, pp. 297-301.
- Broughall, J.M., Anslow, P.A., Kilsby, D.C., 1983. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: Development of mathematical models describing the effect of water activity. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 101-110.

- Buchanan, R.L., 1991. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *Journal of Food Safety* 11, 123–134.
- Buchanan, R.L., 1993a. Predictive food microbiology. *Trends in Food Science & Technology* 4, 6–11.
- Buchanan, R.L., 1993b. Developing and distributing user-friendly application software. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 251–255.
- Buchanan, R. L., Golden, M. H., 1994. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection*, 57, 567-570.
- Buchanan, R. L., Golden, M. H., 1995. Model for the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in a reduced oxygen environment. *Food Microbiology* 12, 203-212.
- Buchanan, R. L., Golden, M. H., 1998. Interactions between pH and mallic acid concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, 18, 37-48.
- Buchanan, R.L., Phillips, J.G., 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 53, 370-376.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C., 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14, 313–326.
- Chandler, R.E., McMeekin, T.A., 1985a. Temperature function integration and the prediction of the shelf-life of milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 40, 10–13.
- Chandler, R.E., McMeekin, T.A., 1985b. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurised, homogenised milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 40, 37–41.
- Chandler, R.E., McMeekin, T.A., 1989a. Modelling the growth response of *Staphylococcus xylosus* to changes in temperature and glycerol concentration /water activity. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 543–548.
- Chandler, R.E., McMeekin, T.A., 1989b. Combined effect of temperature and salt concentration /water activity on the growth rate of *Halobacterium spp.* *Journal of Applied Bacteriology* 67, 71–76.

- Cole, M.B., 1991. Opinion: Predictive modelling — yes it is! (A Reply to A. Hedges). *Letters in applied microbiology* 13, 218–219.
- Cole, M.B., Franklin, J.G., Keenan, M.H., 1987. Probability of growth of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in a model fruit drink system. *Food Microbiology* 4, 115–119.
- Cole, M.B., Davies, K.W., Munro, G., Holyoak, C.D. and Kilsby, D.C., 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 232-239.
- ComBase, 2007. A Combined Database for Predictive Microbiology. Institute of Food Research. <http://www.combase.cc/> (retrieved February, 2011).
- Cornu, M., Delignettemuller, M. L., Flandrois, J. P., 1999. Characterization of unexpected growth of *Escherichia coli* O157:H7 by modeling, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5322-5327.
- Dalgaard, P., 1993. Evaluation and prediction of microbial fish spoilage. PhD thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Dalgaard, P., 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 305–317.
- Dalgaard, P., Vigel Jorgensen, L., 1998. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 40, 105–115.
- Dalgaard, P., Mejlholm, O., Huss, H. H., 1997. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 38, 169–179.
- Daughtry, B.J., Davey, K.R., Thomas, C.J., Verbyla, A.P., 1997. Food processing: a new model for the thermal destruction of contaminating bacteria. *International Association for Engineering and Food, Proceedings of the 7th International Congress on Engineering and Food, Brighton, England, 13-17 April 1997, Vol. 1, pp. A113-A116.*
- Davey, K.R., 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 483–488.
- Davey, K.R., 1991. Applicability of the Davey linear Arrhenius predictive model to the lag phase of microbial growth. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 253–257.

- Davey, K.R., 1993. Linear–Arrhenius models for bacterial growth and death and vitamin denaturations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 12, 172–179.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., Flandrois, J.P., 1995. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. *International Journal of Food Microbiology* 27, 139–146.
- Devlieghere, F., Debeverea, J., van Impe, J., 1998. Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 43, 105–113.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Bernaert, H., Van Impe, J. F., Debever, J., 2000a. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology* 58, 93–106.
- Devlieghere, F., Lefevre, I., Magnin, A., Debever, J., 2000b. Growth of *Aeromonas hydrophila* in modified-atmosphere-packed cooked meat products. *Food Microbiology* 17, 185-196.
- Dickson, J.S., Siragusa, G.R., Wray, Jr. J.E., 1992. Predicting the growth of *Salmonella typhimurium* on beef by using the temperature function integration technique. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3482–3487.
- Dodds, K.L., 1993. An introduction to predictive microbiology and the development and use of probability models with *Clostridium botulinum*. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 139–143.
- Draper, N.R., 1988. Response surface designs. In: *Encyclopaedia of Statistical Sciences*, Wiley, New York, pp. 107–119.
- Duffy, G., Ellison, A., Anderson, W., Cole, M., & Stewart, G., 1995. Use of bioluminescence to model the thermal inactivation of *Salmonella typhimurium* in the presence of a competitive microflora. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3463-3465.
- Einarsson, H., Ericksson, S.G., 1986. Microbial growth models for prediction of shelf life of chilled meat. *Recent Advances and Developments in the Refrigeration of Meat by Chilling* International Institute of Refrigeration, Paris, France, pp. 397–402.

- Foegeding, P.M., 1997. Driving predictive modelling on a risk assessment path for enhanced food safety. *International Journal of Food Microbiology* 36, 87-95
- Fu, B., Taoukis, P.S., Labuza, T.P., 1991. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with time-temperature integrators. *Journal of Food Science* 56, 1209–1215.
- Garthright, W.E., 1991. Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiology* 8, 239-248.
- Garthright, W.E., 1997. The three-phase linear model of bacterial growth: a response. *Food Microbiology* 14, 193–195.
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Cenens, C., Van Impe, J.F., 1998. Application of artificial neural networks as a non-linear modular modelling technique to describe bacterial growth in chilled food products. *International Journal of Food Microbiology* 44, 49–68.
- Genigeorgis, C., 1986. Problems associated with perishable processed meats. *Food Technology* 40, 140–154.
- Giannuzzi, L., Pinotti, A., Zaritzky, N., 1998. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 101–110.
- Gibson, A.M., Hocking, A.D., 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology* 8, 353–358.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A., 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurised pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology* 62, 479–490.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A., 1988. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology* 6, 155-178.
- Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., Roberts, T. A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419-431.
- Gill, C.O., 1982. Microbial interaction with meats. In: Brown, M.H. (Ed.), *Meat Microbiology*, Applied Science Publishers, London, New York, pp. 225–264.
- Gill, C.O., 1985. Prevention of early spoilage of livers. *Proc. Eur. Mtg. Meat Research Workers Conf., Bristol* 30 (5), 14.

- Gill, C.O., Harrison, J.C.L., Phillips, D.M., 1991a. Use of temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. *Food Microbiology* 8, 83–94.
- Gill, C.O., Jones, S.D.M., Tong, A.K.W., 1991b. Application of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a process for spray chilling beef carcasses. *Journal of Food Protection* 54, 731–736.
- Grau, F.H., Vanderlinde, P.B., 1992. Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *Journal of Food Protection* 55, 4–7.
- Hajmeer, M.N., Basheer, I.A., Najjary, Y.M., 1997. Computational neural networks for predictive microbiology II. Application to microbial growth. *International Journal of Food Microbiology* 34, 51–66.
- Hauschild, A.H.W., 1982. Assessment of botulism hazards from cured meat products. *Food Technology* 36, 95–104.
- Hedges, A., 1991. Opinion: predictive modeling - or is it? *Letters in applied microbiology* 13, 217-219.
- Hills, B.P., Mackey, B.M., 1995. Multi-compartment kinetic models for injury, resuscitation, induced lag and growth in bacterial cell populations, *Food Microbiology* 12, 333-346.
- Hills, B.P., Wright, K.M., 1994. A new model for bacterial growth in heterogeneous systems, *Journal of Theoretical Biology* 168, 31.
- Houtsma, P.C., De Wit, J.C., Rombouts, F.M., 1993. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 20, 247–257.
- Houtsma, P.C., Kant-Muermans, M.L., Rombouts, F.M., Zwietering, M.H., 1996. Model for the combined effects of temperature, pH, and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and bologna-type sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1616–1622.
- Houtsma, P.C., Kusters, B.J.M., De Wit, J.C., Rombouts, F.M., Zwietering, M.H., 1994. Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. *International Journal of Food Microbiology* 24, 113–123.

- Hudson, J.A., 1993. Construction and comparison of response surface kinetic models for the *Yersinia enterocolitica* type strain and a food isolate under aerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 18, 201-209.
- Jason, A.C., 1983. A deterministic model for monophasic growth of batch cultures of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 513-536.
- Jeffries, C.J., Brian, P., 1984. A mathematical model of pollen tube penetration in apple styles. *Planta* 160, 52-58.
- Jones, J. E., Walker, S. J., 1993. Advances in modeling microbial growth. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 200-205.
- Juneja, V. K., Marmer, B. S., Phillips, J. G., & Miller, A. J., 1995. Influence of the intrinsic properties of food on thermal inactivation of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*: development of a predictive model. *Journal of Food Safety* 15, 349-364.
- Kovarova-Kovar, K., Egli, T., 1998. Growth kinetics of suspended microbial cell: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 646-665.
- Koutsoumanis K., 2001. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Applied and environmental microbiology* 67, 1821-1829.
- Koutsoumanis, K., Nychas, G. J.E., 2000. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology* 60, 171 - 184.
- Krist, K.A., Ross, T., McMeekin, T.A., 1998. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. *International Journal of Food Microbiology* 43, 195-203.
- Labuza, T.P., Riboh, D., 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology* 36, 66-74.
- Labuza, T.P., Fu, B., 1993. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 309-323.
- Labuza, T.P., Fu, B., Taoukis, P.S., 1992. Prediction of shelf life and safety of minimally processed CAP/MAP chilled foods: a review. *Journal of Food Protection* 55, 743-750.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature,

- pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, 219–237.
- Linton, R. H., Carter, W. H., Pierson, M. D., & Hackney, C. R., 1995. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 58, 946-954.
- Linton, R. H., Carter, W. H., Pierson, M. D., Hackney, C. R., & Eifert, J. D., 1996. Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. *Journal of Food Protection* 59, 16-23.
- Little, C. L., Adams, M. R., Anderson, W. A., & Cole, M. B., 1994. Application of a log-logistic model to describe the survival of *Yersinia enterocolitica* at sub-optima pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 22, 63-71.
- Maas, M.R., 1993. Development and use of probability models: The industry perspective. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 162–167.
- Mafart, P., Leguerinel, I., 1997. Modelling the heat stress and the recovery of bacterial spores. *International Journal of Food Microbiology* 37, 131–135.
- Maurice, J., 1994. The rise and rise of food poisoning. *New Scientist* 144, 28–33.
- McClure, P.J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T.M., Roberts, T.A., 1993. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* 19, 161–178.
- McClure, P.J., Blackburn, C. de W., Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, J.D., Ogden, I.D., Peck, K.M.W., Roberts, T.A., Sutherland, J.P., Walker, S.J., 1994b. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food MicroModel approach. *International Journal of Food Microbiology* 23, 265–275.
- McClure, P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J.P., Roberts, T.A., 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*: the effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and sodium nitrate. *International Journal of Food Microbiology* 34, 221–232.
- McDonald, K., Sun, D.-W., 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52, 1-27.



- McKellar, R.C., 1997. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics, *International Journal of Food Microbiology* 36, 179-186.
- McKellar, R. C., Lu, X., 2004. Primary models. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.) *Modeling Microbial Responses in Foods*, CRC Press, Boca Raton, Chapter 2, 21-62.
- McKellar, R. C., Modler, H. W., Couture, H., Hughes, A., Mayers, P., Gleeson, T., Ross, W. H. 1994. Predictive modeling of alkaline phosphatase inactivation in a high-temperature short time pasteurizer. *Journal of Food Protection* 57, 424-430.
- McMeekin, T.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78, 133-153.
- McMeekin, T.A., Ross, T., Olley, J., 1992. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 15, 13-32.
- McMeekin, T.A., Ratkowsky, D.A., Olley, J., Ross, T., 1989. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Root model for predicting bacterial growth in foods - A reply to C. Adair et al. *Food Microbiology* 6, 304-308.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1993. *Predictive Microbiology*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S., Ratkowsky, D.A., 1987. Model for combined effect of temperature and salt concentration /water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *Journal of Applied Bacteriology* 62, 543-550.
- McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeier, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M., Soontranon, S., 1997. Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases* 3, 541-549.
- Meynell, G.G., Meynell, E., 1965. *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Messins, W., Verluyten, J., Leroy, F., and De Vurst, L., 2002. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to

- temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology* 81, 41–52.
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology* 3, 371–394.
- Najjar, Y.M., Basheer, I.A., Hajmeer, M.N., 1997. Computational neural networks for predictive microbiology: I. Methodology. *International Journal of Food Microbiology* 34, 27–49.
- Neumeyer, K., 1994. Predicting spoilage. In: *Quality Quarterly Winter*, 1–3, Dairy Industry Quality Centre, NSW Australia.
- Neumeyer, K., Ross, T., McMeekin, T.A., 1997. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage *Pseudomonads*. *International Journal of Food Microbiology* 38, 45–54.
- Notermans, S., Zwietering, M.H. and Mead G.C. 1994a. The HACCP concept: identification of potentially hazardous micro-organisms. *Food Microbiology* 11, 203-214.
- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwietering, M.H. and Mead G.C. 1994b. The HACCP specification of criteria using quantitative risk assessment. *Food Microbiology* 11, 397-408.
- Oscar, T.P., Response surface models for effects of temperature and previous growth sodium chloride on growth kinetics of *Salmonella typhimurium* on cooked chicken breast, *Journal of Food Protection* 62, 1470-1474.
- Patterson, M. F., & Kilpatrick, D. J., 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection* 61, 432-436.
- Peleg, M., 1997. Modelling microbial populations with the original and modified versions of the continuous and discrete logistic equations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37, 471–490.
- Phillips, J.D., Griffiths, M.W., 1987. The relation between temperature and growth of bacteria in dairy products. *Food Microbiology* 4, 173–185.
- Pin, C., Baranyi, J., 1998. Predictive models as a means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 41, 59–72.

- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2355-2360.
- Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1998. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1773–1779.
- Pirt, S. J., 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell, London, UK.
- Pooni, G.S., Mead, G.C., 1984. Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf life of non-frozen poultry meat products. *Food Microbiology* 1, 67–78.
- Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M., Denis, J.- B., 2003. Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 81, 87–104.
- Pruitt, K. M., Kamau, D. N., 1993. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 221-231.
- Ratkowsky, D.A., 1983. *Nonlinear regression modeling*. Marcel Dekker, New York.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1995. Modeling the bacterial no growth interface. *Letters in Applied Microbiology* 20, 29–33.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A., 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* 149, 1–5.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A., Olley, J., 1991. Comparison of Arrhenius type and Belehradek models for prediction of bacterial growth in foods. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 452–459.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., Macario, N., Dommett, T.W., Kamperman, L., 1996. Choosing probability distributions for modeling generation time variability. *Journal of Applied Bacteriology* 80, 131–137.
- Roberts, T.A., 1997. Microbial growth and survival: developments in predictive modelling. *Food Technology* 51, 88–90.
- Roberts, T.A., Gibson, A.M., 1986. Chemical methods for controlling *Clostridium botulinum* in processed meats. *Food Technology* 40, 163–171.

- Roberts, T.A., Jarvis, B., 1983. Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. In: Food Microbiology: Advances and Prospects, Academic Press, New York, NY.
- Roels, J.A., Kossen, N.W.F., 1978. On the modelling of microbial metabolism. In: M.J. Bull (Ed.), Progress in Industrial Microbiology, 14. Elsevier, Amsterdam.
- Ross, T., 1993. Belehradek-type models. Journal of Industrial Microbiology 12, 180–189.
- Ross, T., Dalgaard, P., 2004. Secondary models. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.) Modeling Microbial Responses in Foods, CRC Press, Boca Raton, Chapter 3, 63-150.
- Ross, T., McMeekin, T.A., 1994. Predictive microbiology. International Journal of Food Microbiology 23, 241–264.
- Ross, T., McMeekin, T.A., 1995. Predictive microbiology and HACCP. In: Advances in Meat Research: HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing 10, Chapman and Hall, UK, pp. 330–357.
- Ross, T., Neumeier, K., Kamperman, N.L., McMeekin, T.A., 1993. In defence of predictive microbiology. Australian Microbiology 7, 103–107.
- Ross, W. H., Couture, H., Hughes, A., Mayers, P., Gleeson, T., McKellar, R. C., 1998. A non linear random coefficient model for the destruction of *Enterococcus faecium* in a high temperature short-time pasteurizer. Food Microbiology 15, 567-575.
- Rosso, L., 1995. Modélisation et Microbiologie Prévisionnelle: Élaboration d'un nouvel outil pour l'Agro-alimentaire, Université Claude Bernard, Lyon.
- Rosso, L., 1999. Models using cardinal values. Refrigeration Science & Technology Proc., EUR 18816, 48–55.
- Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. International Journal of Food Microbiology 63, 265–273.
- Rosso, L., Lobry, R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. Journal of Theoretical Biology 162, 447–463.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Applied and Environmental Microbiology 61, 610–616.

- Rubinow, S.I., 1984. Cell kinetics. In: L.A. Segel (editor), *Mathematical Models in Molecular and Cell Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Salter, M., Ross, T., McMeekin, T. A., 1998. Applicability of a model for non-pathogenic *Escherichia coli* for predicting the growth of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 85, 357-364.
- Sato, T., Shimizu, T., Watarai, M., Kobayashi, M., Kano, S., Hamabata, T., Takeda, Y., Yamasaki, S., 2003. Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2 – converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2 - converting phages, *Gene* 309, 35 – 48.
- Schaffner, D.W., 1995. The application of the WLF equation to predict lag time as a function of temperature for three psychrotrophic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 27, 107–115.
- Schaffner, D.W., Labuza, T.P., 1997. Predictive microbiology: where are we and where are we going? *Food Technology* 51, 95–99.
- Schmidt, S.K., 1992. Models for studying the population ecology of microorganisms in natural systems. In: *Modelling the Metabolic and Physiologic Activities of Microorganisms*, Wiley, New York, NY, pp. 31–59.
- Schoolfield, R.M., Sharpe, P.J.H., Magnuson, C.E., 1981. Non linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction rate theory. *Journal of Theoretical Biology* 88, 719–731.
- Sharpe, P.J.H., De Michele, D.W., 1977. Reaction kinetics and poikilotherm development. *Journal of Theoretical Biology* 64, 649–670.
- Skinner, G.E., Larkin, J.W., 1994. Mathematical modelling of bacterial growth: a review. *Journal of Food Safety* 14, 175–217.
- Smith, M.G., 1985. The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and implication for codes of practice in abattoirs. *Journal of Hygiene* 94, 289-300.
- Standard, C.J., Williams, A.P., Gibbs, P.A., 1985. Temperature growth relationships for psychrotrophic food spoilage bacteria. *Food Microbiology* 2, 155–162.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Braxton, D.S., 1995. Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:H7 the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 25, 29–49.

- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Braxton, D.S., Beaumont, A.L., 1997. Predictive modelling of *Escherichia coli* O157:H7: Inclusion of carbon dioxide as a fourth factor in a pre-existing model. *International Journal of Food Microbiology* 37, 113–120.
- Tamplin, M., Baranyi, J., Paoli, G. 2004. Software Programs to Increase the Utility of Predictive Microbiology Information. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.) *Modeling Microbial Responses in Foods*, CRC Press, Boca Raton, Chapter 3, 63-150.
- Tienungoon, S., 1998. Some aspects of the ecology of *Listeria monocytogenes* in salmonid aquaculture. Ph.D. thesis. University of Tasmania, Hobart, Australia.
- Tompkin, R.B., 1986. Microbiological safety of processed meat: new products and processes - new problems and solutions. *Food Technology* 40, 172–176.
- Turner, M.E., Bradley, E.L., Kirk, K.A. and Pruitt, K.M., 1976. A theory of growth. *Mathematical Biosciences* 29, 367-373.
- Van Boekel, M.A.J.S., 1996. Statistical aspects of kinetic modelling for food science problems. *Journal of Food Science* 61, 477–485.
- Van Gerwen, S.J.C., Zwietering, M.H., 1998. Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *Journal of Food Protection* 61, 1541–1549.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., Vandewalle, J., 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2901–2909.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Schellekens, M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *International Journal of Food Microbiology* 25, 227–249.
- Voyer, R., McKellar, R.C., 1993. MKES tools: a microbial kinetics expert system for developing and assessing food production systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 12, 256–262.
- Whiting, R.C., 1992. Letter to the editor. *Food Microbiology* 9, 173–174.
- Whiting, R.C., 1993. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 240-246.
- Whiting, R.C., 1995. Microbial modelling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 467–494.

- Whiting, R.C., 1997. Microbial database building: what have we learned? *Food Technology* 51, 82–87.
- Whiting, R.C., Cygnarowicz Provost, M., 1992. Model for quantifying bacterial growth. *Food Microbiology* 9, 269–277.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L., 1993. A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology* 10, 175–177.
- Whiting, R.C., Buchanan, L R., 1994. Microbial modelling. *Food Technology* 48, 113–120.
- Whiting, R.C., 1995. Microbial modelling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 467–494.
- Whiting, R. C., Sackitey, S., Calderone, S., Morely, K., & Phillips, J. G., 1996. Model for the survival of *Staphylococcus aureus* in nongrowth environments. *International Journal of Food Microbiology* 31, 231-243.
- Wilcox, F., Mercier, M., Hendrickx, M., Tobback, P., 1993. Modelling the influence of temperature and carbon dioxide upon the growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Food Microbiology* 10, 159–173.
- Williams, M.L., Landel, R.F., Ferry, J.D., 1955. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass forming liquids. *Journal of the American Chemical Society* 77, 3701–3707.
- Wimptheimar, L., Altman, N.S., Hotchkiss, J.H., 1990. Growths of *Listeria monocytogenes* Scott A serotype 4 and competitive spoilage organisms in raw chicken packaged under modified atmosphere and in air. *International Journal of Food Microbiology* 11, 205-214.
- Wijtzes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H., Roberts, T.A., 1993. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 18, 139–149.
- Wijtzes, T., van't Riet, K., Huis in't Veld, J.H., Zwietering,, M.H., 1998. A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. *International Journal of Food Microbiology* 42, 79–90.
- Wijtzes, T., Rombouts, F.M., Kant-Muermans, M.L.T., Van't Riet, K., Zwietering, M.H., 2001. Development and validation of a combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of *Lactobacillus curvatus*, *International Journal of Food Microbiology* 63, 57-64.

- Zamora, M.C., Zaritzky, N.E., 1985. Modelling of microbial growth in refrigerated packaged beef. *Journal of Food Science* 50, 1003- 1006.
- Zwietering, M., 1999. Microbial and engineering characteristic numbers for process evaluation. *Refrigeration Science and Technology Proc.*, EUR 18816, 272–279.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Notermans, S., 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the time of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55–70.
- Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Van'T Riet, K., 1993. Some aspects of modelling microbial quality of food. *Food Control* 4, 89–96.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van'T Riet, K., 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875–1881.
- Zwietering, M.H., Wiltzes, T., De Wit, J.C., Van'T Riet, K., 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection* 55, 973–979.
- Zwietering, M.H., De Koos, J.T., Hasenack, B.E., De Wit, J.C., Van'T Riet, K., 1991. Modelling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094– 1101.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Cuppers, H.G.A.M., Van'T Riet, K., 1994. Modelling of bacterial growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 204–213.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### **Ανάπτυξη και επικύρωση της βάσης δεδομένων LabBase για την απόκριση των μικροοργανισμών των τροφίμων στις διαφορετικές φυσικοχημικές και περιβαλλοντικές συνθήκες**

#### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει παραχθεί ένας τεράστιος όγκος μικροβιολογικών δεδομένων σε διεθνές επίπεδο, τα οποία είναι διαθέσιμα κυρίως μέσω δημοσιευμένων εργασιών σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά, ενώ σημαντικό μέρος τους υφίσταται σε αρχεία ή σε άλλες συλλογές. Η ανάπτυξη των διεθνών βιβλιογραφικών βάσεων δεδομένων και των διαδικτυακών μηχανών αναζήτησης έχουν συμβάλλει αποφασιστικά στην ταχεία διάδοση αυτών των πληροφοριών (Miller, 1993, McMeekin, 2007). Ωστόσο, τα δεδομένα τα οποία περιλαμβάνονται σε αυτές τις εργασίες δεν είναι πλήρως διαθέσιμα ή τουλάχιστον όχι πάντοτε με έναν κατανοητό οπτικό τρόπο (γραφικές παραστάσεις, συνοπτικοί πίνακες κ.ά.). Από την άλλη μεριά, η αποτελεσματική χρήση της δημοσιευμένης γνώσης απαιτεί υψηλό ακαδημαϊκό υπόβαθρο καθώς και τη δυνατότητα εντοπισμού των κατάλληλων πληροφοριών.

Οι βάσεις δεδομένων της απόκρισης των μικροοργανισμών των τροφίμων στους διαφορετικούς φυσικοχημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες περιλαμβάνουν επεξεργασμένα δεδομένα τα οποία προέρχονται από δημοσιευμένα και μη δημοσιευμένα σύνολα δεδομένων. Μέρος αυτών των επεξεργασμένων δεδομένων προέρχεται και από μαθηματικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για να προβλέπουν την αύξηση, επιβίωση και το θάνατο των μικροβιακών πληθυσμών ανάλογα με τις ενδογενείς ιδιότητες των τροφίμων αλλά και τους εξωγενείς παράγοντες (McMeekin et al., 2006, McMeekin, 2007, Baird-Parker, 1995). Χαρακτηριστικοί παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών στο περιβάλλον των τροφίμων είναι η υγρασία, η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ), το pH, η θερμοκρασία (T), η ατμόσφαιρα συσκευασίας και η ενδεχόμενη παρουσία συντηρητικών (Membré & Lambert, 2008).

Η βάση δεδομένων ComBase αποτελεί σε παγκόσμιο επίπεδο το μοναδικό έως τώρα λογισμικό που έχει αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό. Αυτή περιλαμβάνει

αποτελέσματα μόνο δημοσιευμένων εργασιών σχετικά με τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών σε τρόφιμα και εργαστηριακά μέσα (Baranyi & Tamplin, 2004). Το λογισμικό αυτό υποστηρίζεται από την πρωτοβουλία “ComBase consortium” η οποία αποτελεί προϊόν συνεργασίας των Βρετανικών Ινστιτούτων IFR (Institute of Food Research) και FSA (Food Standards Agency) με τα ερευνητικά κέντρα του USDA των ΗΠΑ (Agricultural Research Center και Eastern Regional Research Center), του Εθνικού Ερευνητικού Ινστιτούτου Τροφίμων της Ιαπωνίας (National Food Research Institute of Japan) και του Κέντρου Ασφάλειας Τροφίμων του Πανεπιστημίου της Τασμανίας (University of Tasmania Food Safety Center, FSC) (ComBase, 2007). Η ComBase η οποία είναι διαθέσιμη στο διαδίκτυο στην ιστοσελίδα <http://www.combase.cc/>, συντηρείται από το IFR. Πρόσφατα αναπτύχθηκε μία νέα διαδικτυακή βάση δεδομένων από τον Koseki (2009) η οποία βασίζεται στην ComBase και καλείται MRV - Microbial Responses Viewer (<http://cdnfri.dc.affrc.go.jp/>). Περιλαμβάνει δεδομένα τα οποία αφορούν στην ανάπτυξη/μη ανάπτυξη (Growth/NoGrowth) των μικροοργανισμών των τροφίμων.

Παρά τη μεγάλη συνεισφορά της βάσης δεδομένων ComBase σε ερευνητικό και παραγωγικό επίπεδο, αυτή παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι απευθύνεται σε επιστημονικό-ερευνητικό προσωπικό με αποτέλεσμα να απαιτείται συστηματική βελτίωσή της για να γίνει δυνατή η χρήση της από μη πιστοποιημένα άτομα. Τα δεδομένα τα οποία περιλαμβάνει βασίζονται ως επί το πλείστον σε αποτελέσματα από εργαστηριακά μέσα ενώ είναι περιορισμένα τα δεδομένα αλληλεπιδράσεων μεταξύ τροφίμων και μικροοργανισμών (ComBase, 2007). Επιπλέον, δεν περιλαμβάνει αδημοσίευτα βιομηχανικά ή εργαστηριακά δεδομένα τα οποία μπορεί να είναι πολύ χρήσιμα και υψηλής ποιότητας. Πρόσφατα οι Buche et al. (2011) πρότειναν μία μέθοδο η οποία επιτρέπει την εξαγωγή δεδομένων από αντίστοιχους πίνακες, οι οποίοι περιλαμβάνονται σε επιστημονικές δημοσιεύσεις στο διαδίκτυο, καθώς και τα σημαντικά συνοδευτικά τους σχόλια βάσει της οντολογίας. Εντούτοις η μέθοδος αυτή δεν αποτελεί βάση δεδομένων.

Η βάση δεδομένων LabBase που αναπτύχθηκε στα πλαίσια εκπόνησης της διατριβής αυτής έχει ως βασικό στόχο να καλύψει τα παραπάνω κενά που περιγράφηκαν για τη βάση δεδομένων ComBase. Επιπλέον, διαθέτει μία καινοτόμο υποστηρικτική εφαρμογή η οποία είναι ικανή να παρέχει πληροφόρηση σχετικά με τη δυναμική των μικροβιακών πληθυσμών υπό ποικίλες φυσικοχημικές και

περιβαλλοντικές συνθήκες για δεδομένους συνδυασμούς μικροοργανισμών-τροφίμων.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ

Το λογισμικό LabBase αποτελεί μία νέα βάση δεδομένων για την απόκριση των μικροοργανισμών των τροφίμων στους διαφορετικούς φυσικοχημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η ανάπτυξή της βασίζεται στο περιβάλλον Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007, ενώ περιλαμβάνει μία υποστηρικτική εφαρμογή (servicing application) με την οποία πραγματοποιείται η ανάλυση των δεδομένων της. Το λογισμικό Microsoft Excel<sup>®</sup> επιλέχθηκε επειδή είναι το ευρύτερα διαδεδομένο ανάμεσα στους επιστήμονες και τους αναλυτές δεδομένων (Baranyi & Tamplin, 2004). Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αποτελούν η φιλικότητα προς το χρήστη, η μεγάλη χωρητικότητα των δεδομένων και τα ενσωματωμένα εργαλεία διαχείρισής τους (Microsoft Office, 2011a). Η υποστηρικτική εφαρμογή που αναπτύχθηκε (LabBase Navigator) βασίστηκε στον κώδικα προγραμματισμού Visual Basic for Applications – VBA σύμφωνα με τις μεθόδους οι οποίες περιγράφονται στα εγχειρίδια προγραμματισμού των Petroutsos, E., (1998), και Walkenbach, J., (2004). Μέρος της εφαρμογής έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική ανάπτυξης εφαρμογών “Excel/Access Integration”. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε μία εξωτερική εφαρμογή σε περιβάλλον Microsoft Access<sup>®</sup> και ενσωματώθηκε αρμονικά στον κώδικα VBA (Alexander & Clark, 2007, Schmalz, 2005) ώστε να ενισχύσει τις δυνατότητές του.

Έχει διαπιστωθεί ότι οι εφαρμογές που αναπτύσσονται με Microsoft Access<sup>®</sup> έχουν: (i) Ταχύτερη πρόσβαση σε βάσεις δεδομένων (Baranyi & Tamplin, 2004), (ii) καλύτερη απόδοση στη συγκέντρωση και οργάνωση των δεδομένων (Microsoft Office, 2011a), και (iii) αυτοματοποιημένες τεχνικές διαχείρισης των δεδομένων κατά την ανάπτυξη γραφικών παραστάσεων (Microsoft Office, 2011b). Επίσης, τόσο το λογισμικό Microsoft Excel<sup>®</sup> όσο και το αντίστοιχο Microsoft Access<sup>®</sup> χρησιμοποιούν τον ίδιο μηχανισμό γραφικών απεικονίσεων (ίδιο ChartObject) (Robinson, 2008).

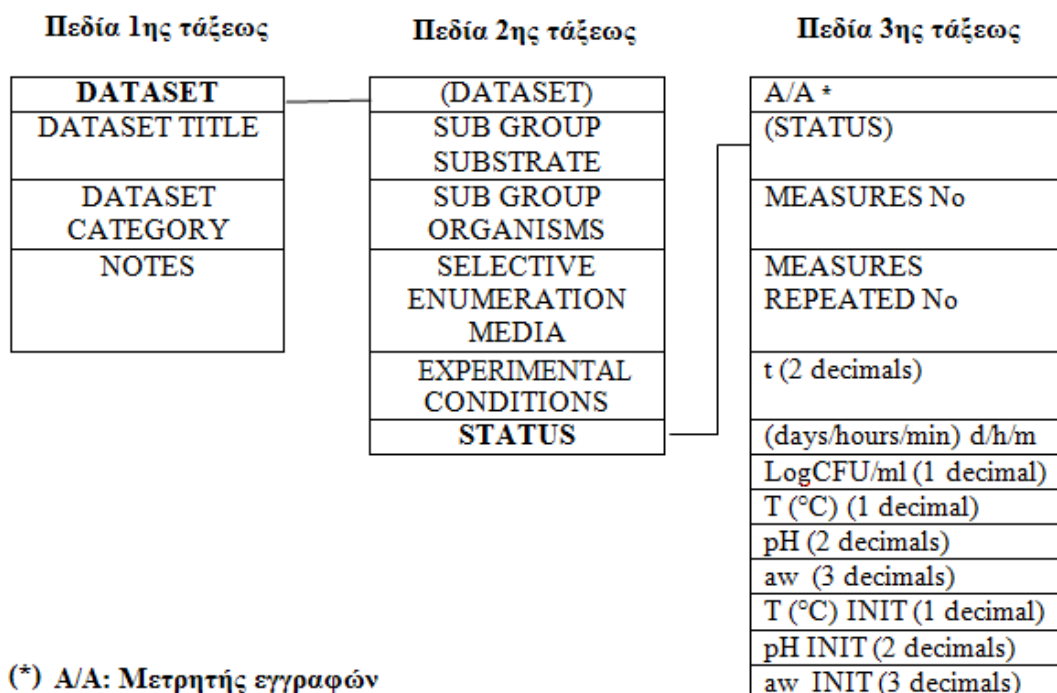
Η ανάπτυξη της υποστηρικτικής εφαρμογής, η οποία έγινε σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στα εγχειρίδια προγραμματισμού των Alexander & Clark, (2007) και Schmalz, (2005), είχε ως στόχο τη σύγκριση των διαφορετικών μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης καθώς και την εις βάθος ανάλυση των δεδομένων αξιοποιώντας αφενός τις υψηλής ποιότητας γραφικές δυνατότητες της Microsoft

Access<sup>®</sup>, αφετέρου την αυτόματη μετατροπή των καταχωρημένων δεδομένων σε αντίστοιχους πίνακες (Microsoft Office, 2011b). Η λεπτομερής επίδειξη της λειτουργίας του λογισμικού LabBase καθώς και άλλα τεχνικά χαρακτηριστικά είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα διάδοσής του (Psomas & Skandamis, 2011).

### *2.1. Οργάνωση των δεδομένων της μικροβιακής απόκρισης*

Τα αποθηκευμένα δεδομένα είναι οργανωμένα σε γραμμική μορφή και ομαδοποιημένα σε τρεις μεγάλες τάξεις πεδίων για κάθε εγγραφή μικροβιακής απόκρισης. Από τα πεδία αυτά, τα τρίτης τάξης εκφράζουν τις αναλυτικές μετρήσεις για κάθε συνθήκη ανάπτυξης περιλαμβάνοντας το χρόνο, τη μικροβιακή απόκριση, τα φυσικοχημικά και περιβαλλοντικά δεδομένα. Οι εγγραφές (records) οι οποίες περιλαμβάνουν τις ανεξάρτητες επαναλήψεις των μετρήσεων των μικροβιακών αποκρίσεων σε κάθε χρονικό διάστημα αποθηκεύονται σε κάθετη διάταξη συνιστώντας ένα σύνολο δεδομένων. Τα δεδομένα της αρχικής θερμοκρασίας (T), της οξύτητας (pH) και της ενεργότητας του νερού ( $a_w$ ) περιλαμβάνουν τις αντίστοιχες τιμές στην αρχή της περιόδου παρατήρησης. Τα δεδομένα της ενδογενούς θερμοκρασίας, οξύτητας και ενεργότητας του νερού χαρακτηρίζονται από μεταβαλλόμενες τιμές οι οποίες παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου εξαιτίας των βιοχημικών διεργασιών οι οποίες προκαλούνται από τους μικροοργανισμούς στο περιβάλλον τους, ενώ η μεταβολή τους εξαρτάται από τις συνθήκες της μικροβιακής ανάπτυξης (Baranyi & Tamplin, 2004). Προς το παρόν, τα ενδογενή δεδομένα εισάγονται στη βάση δεδομένων αλλά δεν συμμετέχουν στη διαδικασία επεξεργασίας-απομόνωσης των δεδομένων μέσω του μηχανισμού των ερωτημάτων (**Πίνακας 2.1**).

Τα πεδία δεύτερης τάξεως εκφράζουν τις συνθήκες οι οποίες επικρατούν σε κάθε πείραμα, ενώ τα πεδία πρώτης τάξεως εκφράζουν τα γενικά χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου συνόλου δεδομένων (**Εικόνα 2.1**).



**Εικόνα 2.1.** Οργάνωση των πεδίων της βάσης δεδομένων LabBase

Συντακτικά, αυτά τα πεδία περιλαμβάνουν τόσο αριθμητικές όσο και αλφαριθμητικές τιμές. Η γραμμογράφιση της βάσης δεδομένων του λογισμικού LabBase περιλαμβάνεται στον **Πίνακα 2.1**.

Τα αντιπροσωπευτικά δεδομένα τα οποία καταχωρήθηκαν στη βάση δεδομένων του λογισμικού LabBase με σκοπό τον έλεγχο της λειτουργίας του και την επικύρωσή του, οργανώθηκαν σε τέσσερα σύνολα δεδομένων:

**Πίνακας 2.1.** Γραμμογράφιση της βάσης δεδομένων LabBase

Fields:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
	A/A	DATASET	DATASET TITLE	DATASET CATEGORY	NOTES
n/a:	n	a	a	a	a
Description:	Records Counter	Datasets encoding	title	category	notes
e.g.:	1096	ds002	<i>L.</i> <i>monocytogene</i> <i>s</i> in response to pH/a <sub>w</sub> /T	Safety	

Fields:	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
	SUB GROUP SUBSTRATE	SUB GROUP ORGANISMS	SELECTIVE ENUMERATI ON MEDIA	EXPERIMENTA L CONDITIONS	STATUS
n/a:	a	a	a	a	a
Description:	substrate	organism	media	experimental condition	dataset subset
e.g.:	TSB	<i>Listeria</i> <i>monocytogene</i> s	No Media Information	pH4.5 a <sub>w</sub> 0.90 T=5°C	ds002q

Fields:	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
	MEASURES No	MEASURES REPEATED No	t	(days/hours/min)	LogCFU/ ml
n/a:	n	n	n	a	n
Description:	info about no of measurements		Time	d/h/m	response
e.g.:	1		18.00	d	5.6

Fields:	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)
	T (°C)	pH	aw	T (°C) INIT	pH INIT
n/a:	n	n	n	n	n
Description:	changing values due to the microbial activity (for future use)			initial values	
e.g.:	5.0	4.50	0.900	5.0	4.50

Fields:	(21)
	aw INIT
n/a:	n
Description:	Initial values
e.g.:	0.900

n: numerical value

a: alphanumerical value

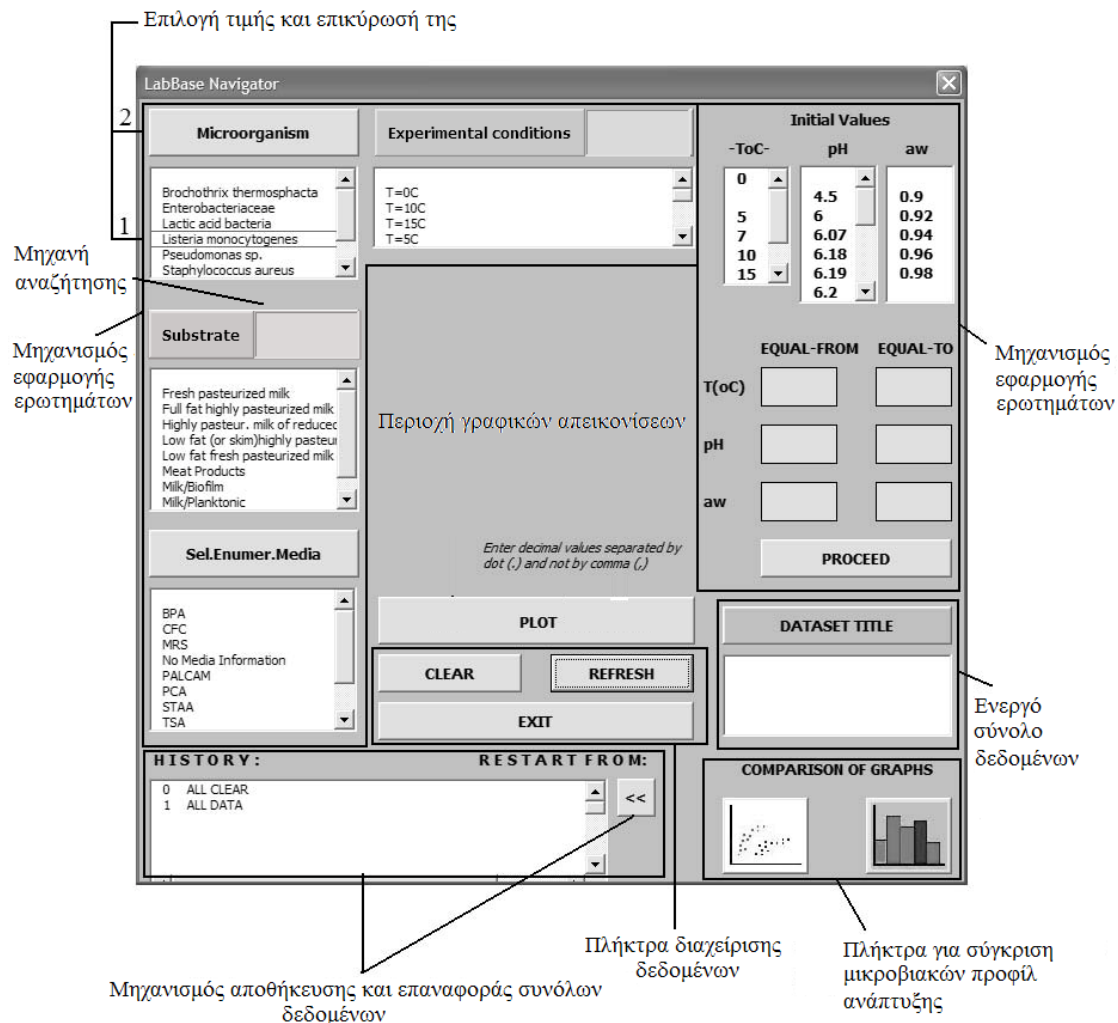
- (i) Spoilage of ham ( Skandamis & Nychas, 2000, Koutsoumanis et al., 2006, Mataragas et al., 2006a,b, Mataragas & Drosinos, 2007),
- (ii) *Listeria* in response to temperature, pH and water activity (Skandamis & Nychas, 2000, Geetaerd et al., 2005, Gounadaki et al., 2007, Janssen et al., 2007, Skandamis et al., 2007a,b, Stopforth et al., 2007),
- (iii) *Staphylococcus aureus* in milk ( Baranyi & Roberts, 1994, Baranyi et al., 1995, Bovill et al., 2000, Bovill and Baranyi, 2001, Xanthiakos et al., 2006),
- (iv) Biofilms of *Listeria monocytogenes* on food spoilage (Pan et al., 2006, Gram et al., 2007).

## 2.2. LabBase Navigator: Η υποστηρικτική εφαρμογή της βάσης δεδομένων LabBase

Η υποστηρικτική εφαρμογή της βάσης δεδομένων LabBase περιλαμβάνει την εκτέλεση μίας σειράς ερωτημάτων (queries) από το χρήστη προς το λογισμικό τα οποία έχουν ως τελικό αποτέλεσμα είτε τη γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού κάτω από δεδομένες συνθήκες ή τη συγκριτική γραφική απεικόνιση δύο ή και περισσότερων μικροβιακών προφίλ στο ίδιο γράφημα.

Οι διαθέσιμες επιλογές επεξεργασίας – απομόνωσης δεδομένων (**Εικόνα 2.2**) οι οποίες εκφράζουν τα αντίστοιχα πεδία της βάσης δεδομένων (**Πίνακας 2.1**) είναι:

- (i) SUB GROUP ORGANISMS: Περιλαμβάνονται τα είδη των μικροοργανισμών τα οποία έχουν καλλιεργηθεί κατά τις πειραματικές διεργασίες. Με την επιλογή αυτή είναι δυνατή η απομόνωση των δεδομένων (filtering procedure) τα οποία περιλαμβάνουν μόνο το συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμού το οποίο επιλέγει ο χρήστης.
- (ii) SUB GROUP SUBSTRATE: Περιλαμβάνεται το μέσο εντός του οποίου αναπτύσσεται ο κάθε μικροοργανισμός.
- (iii) SELECTIVE ENUMERATION MEDIA: Περιλαμβάνεται ο τύπος του υποστρώματος ο οποίος χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στο μέσο.
- (iv) EXPERIMENTAL CONDITIONS: Ενσωματώνει τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες από τις οποίες προέρχονται οι αναλυτικές μετρήσεις.



**Εικόνα 2.2.** Η υποστηρικτική εφαρμογή της βάσης δεδομένων LabBase

(v) Αρχικές τιμές θερμοκρασίας, pH και ενεργότητας του νερού ( $a_w$ ) (αριθμητικές τιμές): Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να ορίσει το εύρος κάθε παράγοντα, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η απομόνωση των δεδομένων της επιλογής του με μεγαλύτερη ακρίβεια.

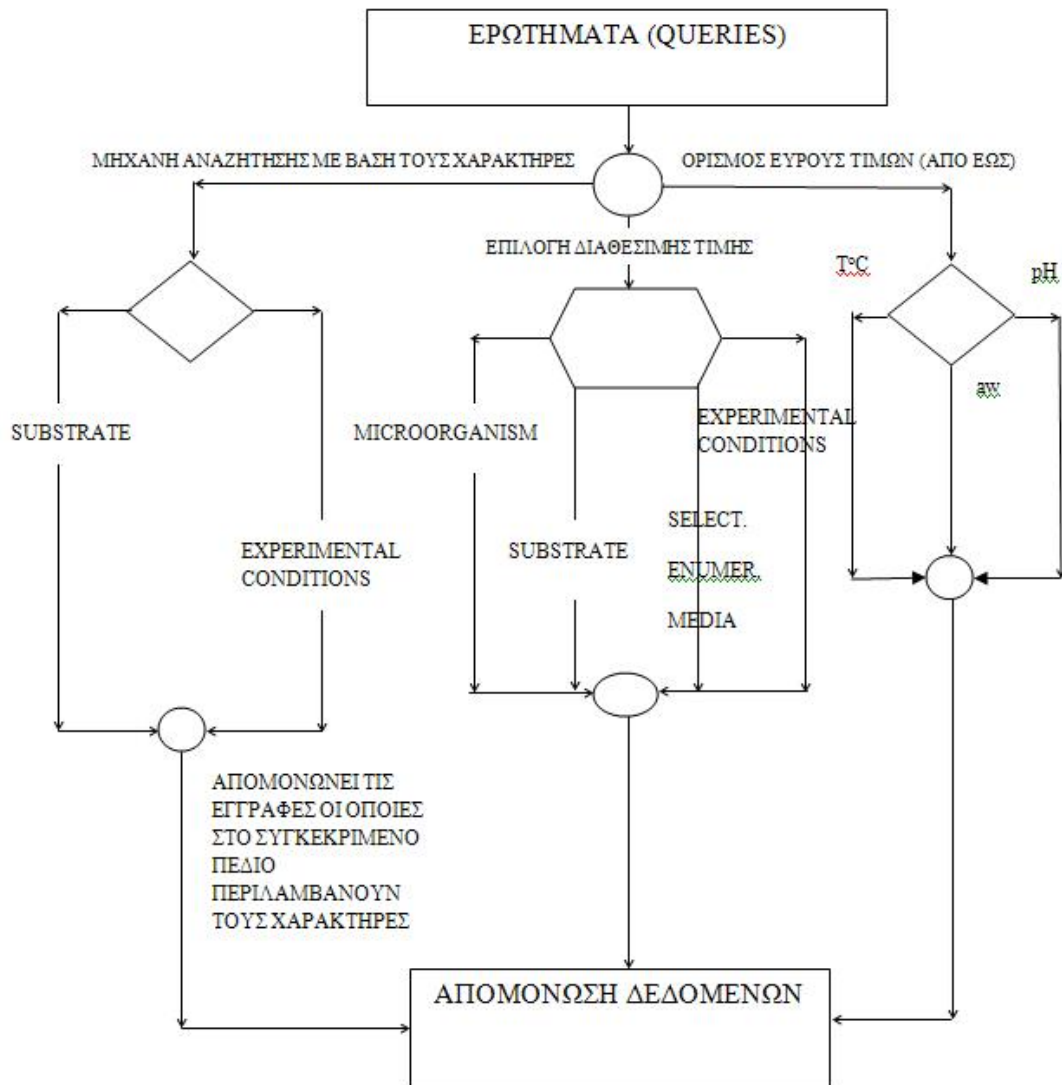
Τα κριτήρια αναζήτησης περιλαμβάνουν τρεις διαφορετικές μεθόδους (**Εικόνα 2.3**):

(i) Την επιλογή μίας δεδομένης τιμής ενός πεδίου και την επικύρωσή της με το πάτημα του αντίστοιχου πλήκτρου ελέγχου.

(ii) Την αναζήτηση -με κριτήριο αριθμητικούς ή αλφαριθμητικούς χαρακτήρες- από τα πεδία SUB GROUP SUBSTRATE ή EXPERIMENTAL CONDITIONS, και στη συνέχεια την επικύρωση του αιτήματος αναζήτησης μέσω του αντίστοιχου πλήκτρου ελέγχου.



(iii) Τον ορισμό του εύρους των αριθμητικών τιμών της αρχικής θερμοκρασίας, της οξύτητας και της ενεργότητας του νερού.



Εικόνα 2.3. Κριτήρια εκτέλεσης ερωτημάτων

Ο αυτόματος συντακτικός έλεγχος που εφαρμόζεται κατά την εισαγωγή των ερωτημάτων στα στοιχεία εισαγωγής δεδομένων (TextBox controls) διασφαλίζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων σε σχέση με την τιμή του pH (1-14) και της ενεργότητας του νερού (0-1), αφού τα επιτρεπτά εύρη τιμών έχουν οριστεί για τα αντίστοιχα αριθμητικά πεδία ώστε να ελέγχεται από το λογισμικό η ορθότητα των ερωτημάτων.

Η απεικόνιση των τιμών των πεδίων περιλαμβάνει τη μοναδική εμφάνιση κάθε επαναλαμβανόμενης τιμής, ενώ όλες οι τιμές εμφανίζονται ταξινομημένες. Εάν

ένα πεδίο της βάσης δεδομένων LabBase δεν είναι συμπληρωμένο, τότε η ένδειξη ύπαρξης μίας κενής τιμής (blank value), παρότι είναι δυνατό να απεικονισθεί δεν είναι όμως δυνατή η επιλογή της.

Σκοπός της παραπάνω απεικόνισης είναι η ενημέρωση του χρήστη ότι στο συγκεκριμένο πεδίο περιλαμβάνονται και μη συμπληρωμένες τιμές οι οποίες όμως αντιστοιχούν σε αναλυτικές μετρήσεις. Αντίστοιχα, στη βάση δεδομένων ComBase όταν το αποτέλεσμα μίας μέτρησης αναφέρεται με την ένδειξη N/D (not detected), συνάγεται ότι ένας αριθμός ο οποίος βρίσκεται εκτός του εύρους επεξεργασίας καταλαμβάνει τη θέση του πεδίου αυτού (Baranyi & Tamplin, 2004).

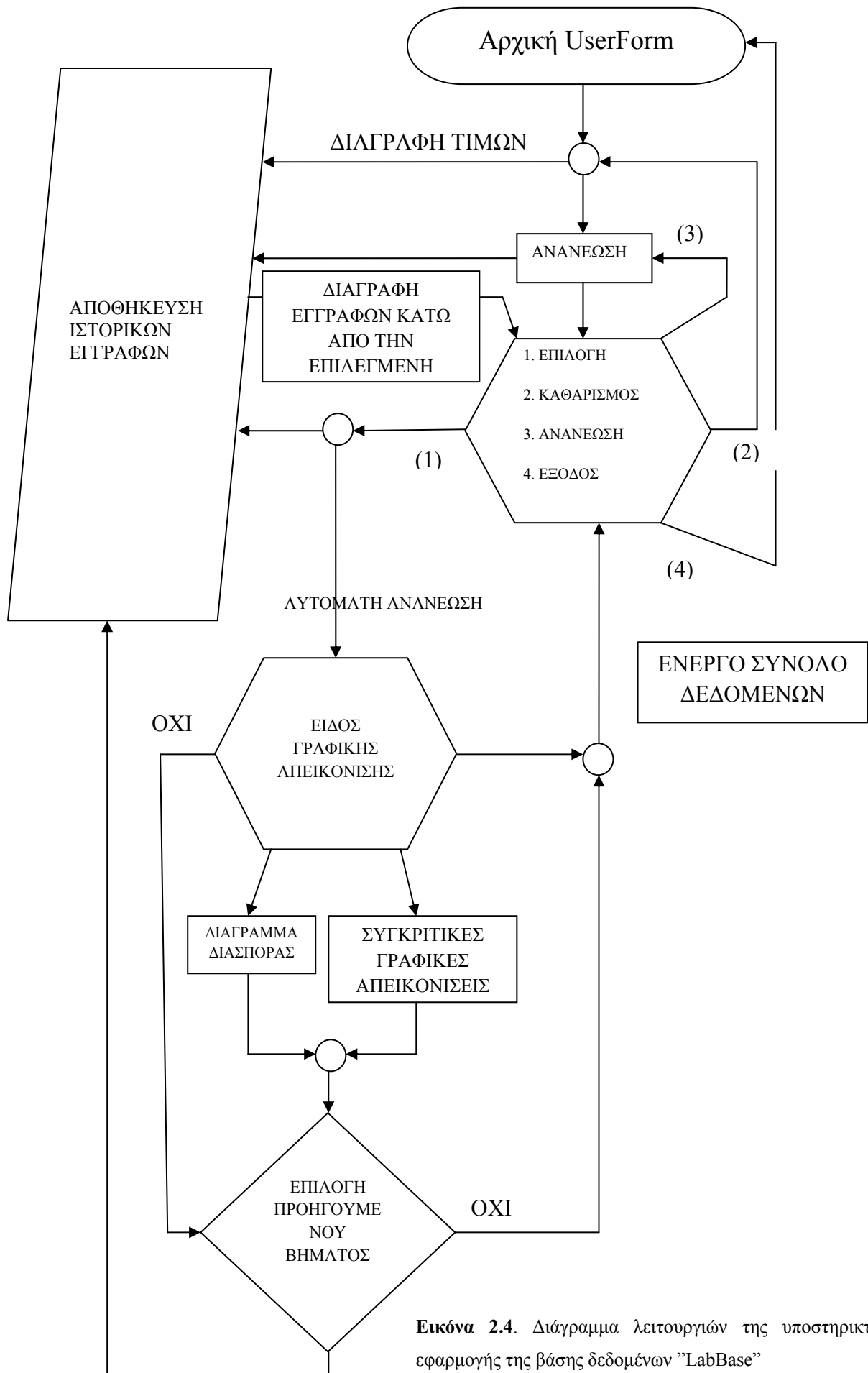
Στην περίπτωση που ο χρήστης θέσει ένα ερώτημα για ένα συγκεκριμένο πεδίο, το αποτέλεσμα είναι η απομόνωση των αντίστοιχων εγγραφών οι οποίες περιλαμβάνουν την επιλεγθείσα τιμή του αντίστοιχου πεδίου. Ως επακόλουθο, όλα τα απεικονιζόμενα δεδομένα αναπροσαρμόζονται.

Ο χρήστης έχει πλέον τη δυνατότητα είτε να θέσει ένα νέο ερώτημα στο αναθεωρημένο σύνολο δεδομένων ή να μετασχηματίσει εκείνο το σύνολο δεδομένων σε γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ως προς το χρόνο (LogCFU/ml vs. time). Επειδή ο χρόνος παριστάνεται γραφικά σε ημέρες, τα δεδομένα χρόνου τα οποία έχουν καταχωρηθεί σε άλλο σύστημα μονάδων, πχ. σε λεπτά της ώρας (min) ή ώρες (h) μετατρέπονται αυτόματα σε ημέρες (**Εικόνα 2.4**).

### *2.3. Ανάπτυξη καινοτόμου μηχανισμού αποθήκευσης/επαναφοράς δεδομένων*

Ο καινοτόμος μηχανισμός που αναπτύχθηκε παρέχει στο χρήστη τη δυνατότητα να επαναφέρει ένα αποθηκευμένο σύνολο δεδομένων, το οποίο αντιπροσωπεύει τις μικροβιακές συνθήκες αύξησης που επικρατούσαν σε ένα προηγούμενο στάδιο της διαδικασίας επεξεργασίας-απομόνωσης των δεδομένων. Για κάθε ερώτημα, το λογισμικό δημιουργεί μία χαρακτηριστική εγγραφή η οποία ονομάζεται “ιστορική εγγραφή (history record)” και περιγράφεται από τη δεδομένη τιμή του πεδίου (**Εικόνα 2.2**).

Οι νέες ιστορικές εγγραφές προστίθενται σειριακά στην αντίστοιχη περιοχή απεικόνισης μετά από κάθε νέο ερώτημα, ενώ ένας αύξων αριθμός εμφανίζεται μπροστά από κάθε εγγραφή.



Εικόνα 2.4. Διάγραμμα λειτουργιών της υποστηρικτικής εφαρμογής της βάσης δεδομένων "LabBase"

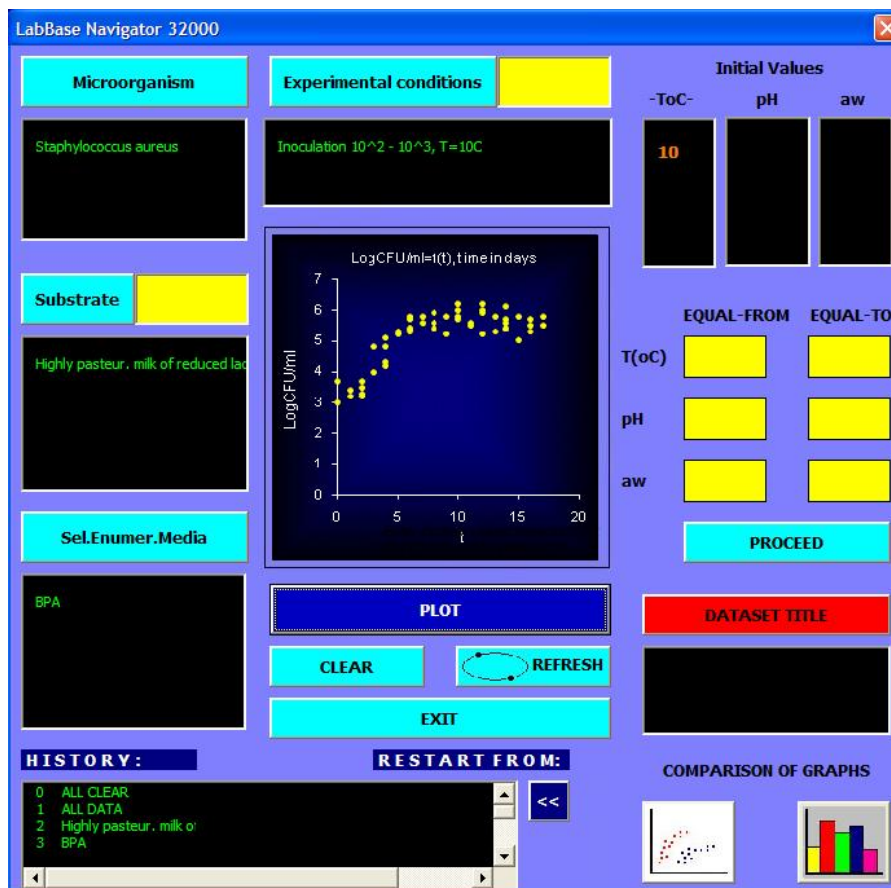
Το “0” εκφράζει τον καθαρισμό της περιοχής δεδομένων εργασίας (ClearContents). Ο αύξων αριθμός “1” εκφράζει τη μεταφορά των δεδομένων από την αντίστοιχη βάση στην περιοχή δεδομένων εργασίας. Ο αύξων αριθμός “2” εκφράζει την πρώτη εφαρμογή ερωτήματος κλπ. Κάθε ιστορική εγγραφή αντιστοιχεί σε ένα σύνολο δεδομένων το οποίο είναι αποθηκευμένο σε μία προσωρινή περιοχή αποθήκευσης δεδομένων του λογισμικού. Όταν ο χρήστης επιλέξει μία ιστορική εγγραφή, το αντίστοιχο σύνολο των αποθηκευμένων δεδομένων μεταφέρεται από την προσωρινή περιοχή αποθήκευσης του στην περιοχή δεδομένων εργασίας. Επιπλέον, όλες οι ιστορικές εγγραφές οι οποίες βρίσκονται κάτω από την επιλεγμένη διαγράφονται, ενώ ταυτόχρονα διαγράφονται και τα αντίστοιχα αποθηκευμένα σύνολα δεδομένων. Ένα λογικό διάγραμμα το οποίο απεικονίζει το μηχανισμό της αποθήκευσης/επαναφοράς δεδομένων και τη σχέση του με την υπόλοιπη υποστηρικτική εφαρμογή παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.4**.

### 2.3.1. Μελέτη περίπτωσης: Επαναφορά αποθηκευμένων συνόλων δεδομένων

Το σύνολο δεδομένων “*Staphylococcus aureus* in milk” χρησιμοποιήθηκε ως μελέτη περίπτωσης. Για παράδειγμα, εάν υποτεθεί ότι ο χρήστης θέτει ερώτημα επιλέγοντας ως τιμή υποστρώματος το “highly pasteurized milk of reduced lactose”, τότε απομονώνονται οι εγγραφές που εμπεριέχουν τη συγκεκριμένη τιμή, με αποτέλεσμα να αναθεωρηθούν τα δεδομένα των περιοχών απεικόνισης. Οι αναθεωρημένες τιμές που περιλαμβάνονται στην περιοχή απεικόνισης του μέσου επίβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι “BPA” και “TSA”, ενώ η τιμή η οποία εμφανίζεται στην περιοχή απεικόνισης των πειραματικών συνθηκών είναι “Inoculation  $10^2$ - $10^3$ , T=10°C”. Εάν ο χρήστης επιλέξει ως τιμή του μέσου επίβλεψης το “BPA”, τότε μετά από τη νέα αναθεώρηση των δεδομένων προκύπτουν μοναδικές τιμές για κάθε περιοχή απεικόνισης.

Ο χρήστης είναι δυνατόν να απεικονίσει γραφικά το προφίλ ανάπτυξης του μικροοργανισμού υπό τις δεδομένες συνθήκες. Παράλληλα, τα ερωτήματα που έχουν τεθεί έχουν δημιουργήσει τις εξής ιστορικές εγγραφές (**Εικόνα 2.5**):

0. ALL CLEAR
1. ALL DATA
2. Highly pasteurized milk of reduced lactose
3. BPA



**Εικόνα 2.5.** Γραφική απεικόνιση ενός συγκεκριμένου μικροβιακού προφίλ υπό τις δεδομένες συνθήκες οι οποίες περιγράφονται στις αντίστοιχες περιοχές απεικόνισης. Η γραφική απεικόνιση εμφανίζεται ενεργοποιώντας το πλήκτρο ελέγχου “PLOT”

Εάν ο χρήστης επιθυμεί να απεικονίσει γραφικά το μικροβιακό προφίλ ανάπτυξης με μέσο επίβλεψης το “TSA”, τότε αντί να αρχίσει τη διαδικασία από την αρχή -ώστε να φθάσει στο επιθυμητό αποτέλεσμα- είναι δυνατόν να επιλέξει την ιστορική εγγραφή “2” (Highly pasteurized milk of reduced lactose). Έτσι, θα είναι δυνατή η επαναφορά των δεδομένων που αντιστοιχούν στην εγγραφή αυτή από την περιοχή προσωρινής αποθήκευσης στην περιοχή δεδομένων εργασίας.

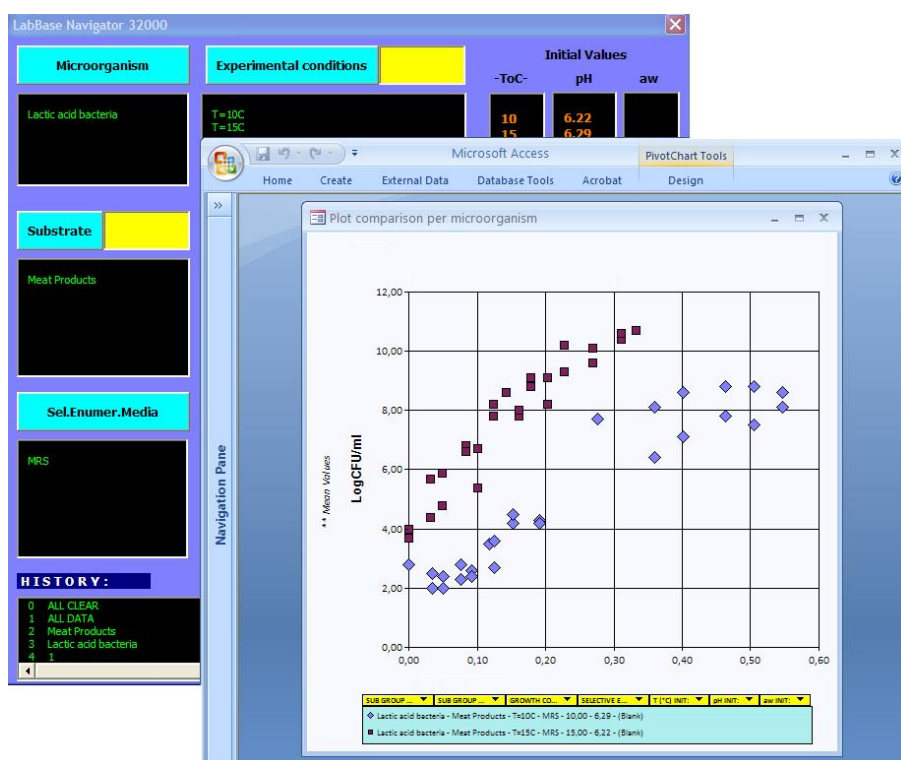
Τέλος, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει ως τιμή του μέσου επίβλεψης το “TSA” για να απεικονίσει γραφικά το αντίστοιχο μικροβιακό προφίλ ανάπτυξης.

Ο μηχανισμός αυτός είναι πολύ χρήσιμος αφού επιτρέπει στους χρήστες να τροποποιήσουν την αρχική τους διαδικασία αναζήτησης, αρχίζοντας από ένα ενδιάμεσο στάδιο και όχι από την αρχή (scratch), διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τη συνοχή της σκέψης τους.

## 2.4. Σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης

Εάν ο χρήστης επιθυμεί να απεικονίσει γραφικά περισσότερα από ένα μικροβιακά προφίλ ταυτόχρονα, δεν είναι δυνατή η εκτέλεση της ενέργειας αυτής μέσω της επιλογής “PLOT”. Αιτία της δυσκολίας αυτής αποτελεί το γεγονός ότι όλα τα απεικονιζόμενα προφίλ έχουν το ίδιο χρώμα, ενώ και τα σημεία που ορίζουν τις συντεταγμένες εμφανίζονται με το ίδιο σχήμα.

Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, αναπτύχθηκαν δύο επιπρόσθετα εργαλεία γραφικής απεικόνισης τα οποία περιλαμβάνονται στην υποστηρικτική εφαρμογή. Σκοπός της ανάπτυξης των εργαλείων αυτών είναι ο διαχωρισμός και κατ' επέκταση η σύγκριση των πολλαπλών προφίλ ανάπτυξης τα οποία εμπεριέχονται ταυτόχρονα στο ίδιο γράφημα. Από τα εργαλεία αυτά, το πρώτο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.6**, όπου απεικονίζονται οι συντεταγμένες των μικροβιακών προφίλ.

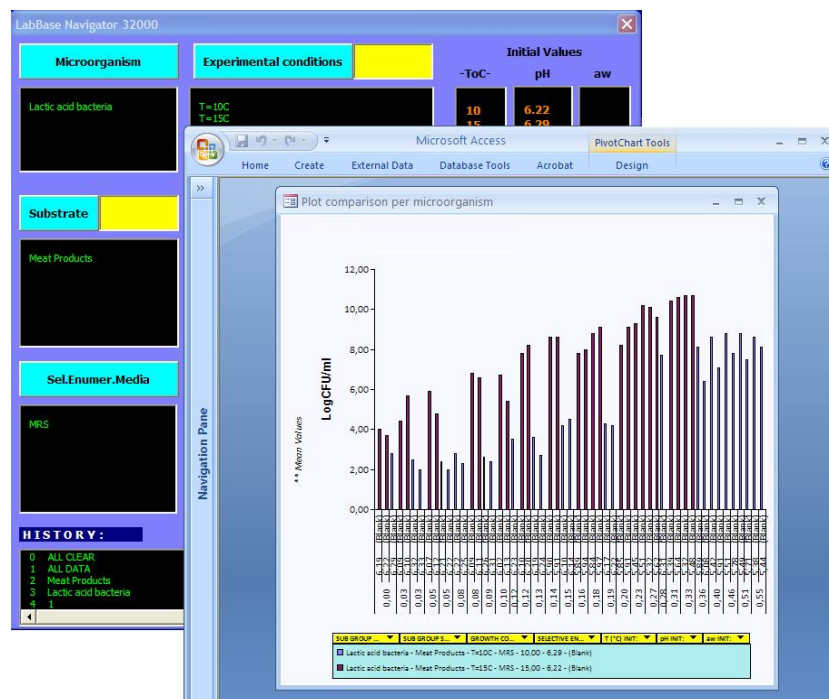


**Εικόνα 2.6.** Συγκριτικό διάγραμμα απεικόνισης των συντεταγμένων των μικροβιακών προφίλ. Συνθήκες ανάπτυξης:

- ◆ Lactic acid bacteria- Meat products- T=10°C- MRS- pH 6.29
- Lactic acid bacteria- Meat products- T=15°C- MRS- pH 6.22

Ο άξονας x αντιπροσωπεύει το χρόνο σε ημέρες και ο άξονας y το επίπεδο των μικροοργανισμών. Το δεύτερο εργαλείο γραφικής απεικόνισης περιλαμβάνει την απεικόνιση των δεδομένων σε μορφή ιστογράμματος (**Εικόνα 2.7**).

Στα δύο αυτά διαγράμματα τα διαφορετικά προφίλ ανάπτυξης των μικροοργανισμών απεικονίζονται με διακριτά χρώματα, τα οποία ορίζονται αυτόματα από το λογισμικό καθώς και με διακριτή στίξη των συντεταγμένων. Οι γραφικές αυτές παραστάσεις παράγονται από μία εξωτερική εφαρμογή που ονομάζεται labbaseaccs και έχει αναπτυχθεί με το λογισμικό Microsoft Access®, το οποίο έχει ενσωματωθεί αρμονικά στον κώδικα της υποστηρικτικής εφαρμογής. Η εξωτερική εφαρμογή έχει μεταφραστεί σε γλώσσα μηχανής (labbaseaccs.mde) ώστε να μην είναι δυνατή η αλλοίωση του σχεδιασμού της εφαρμογής από τους χρήστες. Η εφαρμογή labbaseaccs αποτελείται από δύο εργαλεία γραφικών απεικονίσεων τύπου PivotChart reports τα οποία έχουν προγραμματιστεί έτσι ώστε να απεικονίζουν τα μικροβιακά προφίλ ανάπτυξης με διαφορετικά χρώματα, προσφέροντας παράλληλα περισσότερες επιλογές για τη δυναμική επεξεργασία-απομόνωση δεδομένων (**Εικόνες 2.6 και 2.7**).



**Εικόνα 2.7.** Συγκριτικό ιστόγραμμα των μικροβιακών προφίλ.

Συνθήκες ανάπτυξης:

- Lactic acid bacteria- Meat products- T=10°C- MRS- pH 6.29
- Lactic acid bacteria- Meat products- T=15°C- MRS- pH 6.22

Όταν ο χρήστης επιλέξει μία από τις δύο συγκριτικές γραφικές παραστάσεις, τότε το σύνολο των δεδομένων το οποίο βρίσκεται εκείνη τη χρονική στιγμή στην περιοχή των δεδομένων εργασίας μεταφέρεται σε δύο πίνακες δεδομένων τύπου PivotTable reports (Microsoft Office, 2011b). Σε κάθε είδος γραφήματος αντιστοιχεί ένας πίνακας δεδομένων, ενώ κατά τη μεταφορά των δεδομένων η μονάδα χρόνου μετατρέπεται αυτόματα σε ημέρες. Όταν ο χρήστης εξέρχεται της εφαρμογής labbaseaccs.mde, οι αντίστοιχοι πίνακες δεδομένων αδειάζουν και το μέγεθος της εφαρμογής αναδιαμορφώνεται αυτόματα.

### 2.5. Περιορισμοί στη σύγκριση των μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης

Εάν ο χρήστης επιλέξει την τιμή “CFC” (πεδίο: SELECTIVE ENUMERATION MEDIA, σύνολο δεδομένων: Spoilage of ham) για να θέσει ένα ερώτημα, οι τιμές που προκύπτουν από την ενέργεια αυτή είναι:

SUB GROUP ORGANISM: Pseudomonas sp.,

SUB GROUP SUBSTRATE: Meat products.

Οι αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες είναι:

$T = 0^{\circ}\text{C}$ , όταν η τιμή του pH είναι: 6,28 (2.1)

$T = 5^{\circ}\text{C}$ , όταν η τιμή του pH είναι: 6,26 (2.2)

$T = 10^{\circ}\text{C}$ , όταν η τιμή του pH είναι: 6,29 (2.3)

$T = 15^{\circ}\text{C}$ , όταν η τιμή του pH είναι: 6,22 (2.4)

Η μονάδα χρόνου για τα μικροβιακά προφίλ ανάπτυξης των συνθηκών (1) και (2) είναι η ημέρα (d), ενώ η αντίστοιχη για τις συνθήκες (2.3) και (2.4) είναι η ώρα (h).

Η ανάπτυξη των τεσσάρων μικροβιακών προφίλ αύξησης στο ίδιο γράφημα δεν είναι ευδιάκριτη εξαιτίας του μεγάλου εύρους των τιμών χρόνου που διακρίνει τις διαφορετικές περιπτώσεις (2.1 έως 2.4). Η ανάπτυξη του λογισμικού έγινε κατά τέτοιο τρόπο ώστε να περιοριστούν οι διαφορετικές μονάδες χρόνου σε μία, μετατρέποντας τις αυτόματα σε ημέρες. Στην περίπτωση αυτή τα σημεία που ορίζουν τις συντεταγμένες των μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης (2.3) έως (2.4) εμφανίζονται

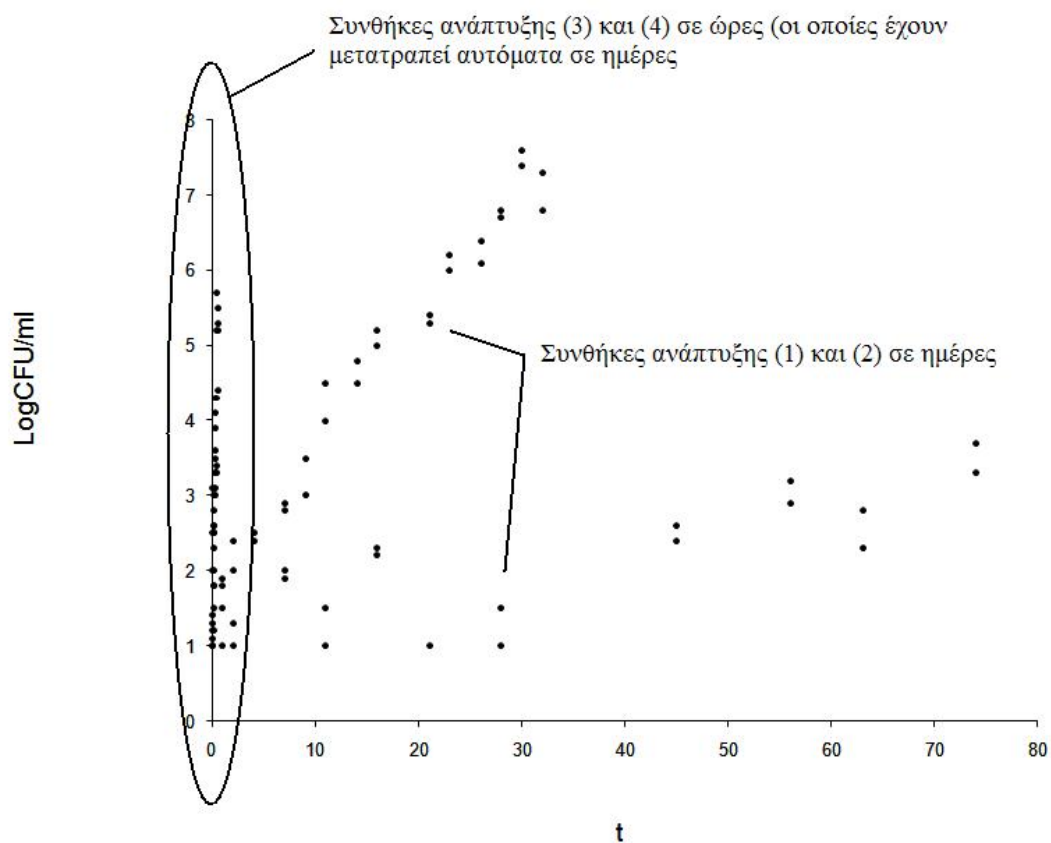


να είναι συγκεντρωμένα πιο κοντά στον άξονα  $y$ , ενώ δεν είναι δυνατή η διάκρισή τους (**Εικόνα 2.8**).

Αυτό συμβαίνει γιατί η μονάδα χρόνου η οποία αφορά τα σημεία που ορίζουν τις συντεταγμένες των μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης (**2.1**) και (**2.2**) είναι η ημέρα. Συνεπώς υπάρχει διαφορά τάξης μεγέθους μεταξύ των δεδομένων χρόνου, η οποία δεν επιτρέπει τη διακριτή απεικόνιση των δεδομένων στην ίδια κλίμακα. Οι πιθανές συγκρίσεις οι οποίες είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν μεταξύ των διαφορετικών μικροβιακών προφίλ είναι (**Εικόνα 2.8**):

(**2.1**) και (**2.2**), μονάδα χρόνου = ημέρα

(**2.3**) και (**2.4**), μονάδα χρόνου = ώρα



**Εικόνα 2.8.** Τα μικροβιακά προφίλ (1) και (2) δεν μπορούν να απεικονισθούν γραφικά μαζί με τα αντίστοιχα (3) και (4) εξαιτίας της διαφορετικής τάξης μεγέθους των τιμών χρόνου

## 2.6. Επικύρωση της βάσης δεδομένων LabBase

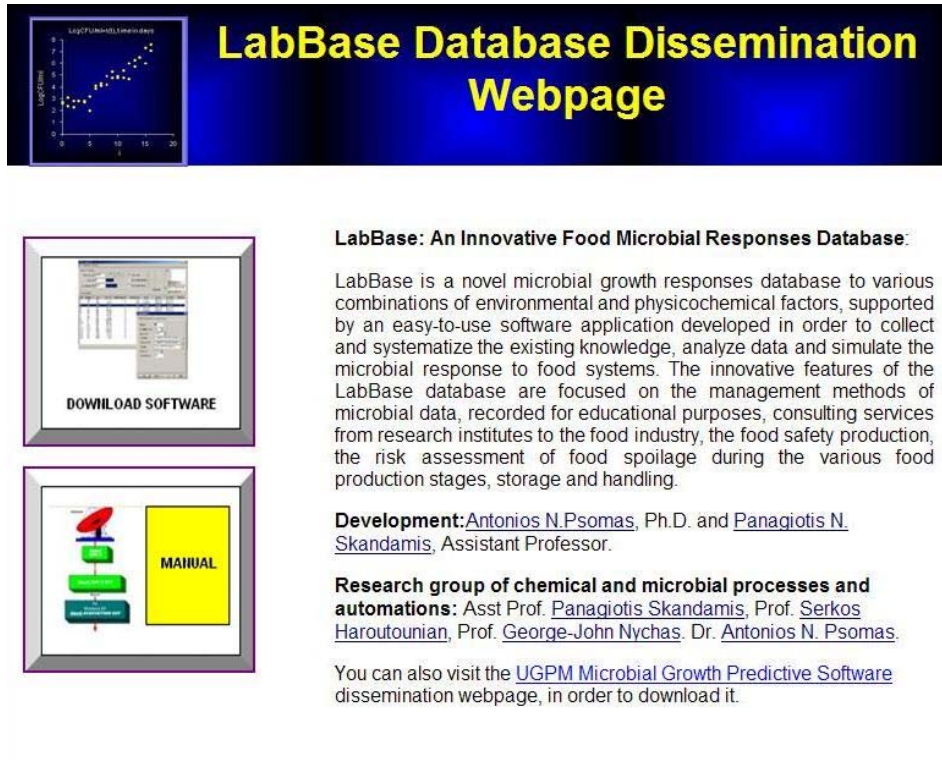
Τα σύνολα δεδομένων που περιλαμβάνονται στη βάση LabBase καταχωρήθηκαν αντίστοιχα στο λογισμικό Microsoft Excel<sup>®</sup>. Η παράλληλη επεξεργασία τους απέδειξε ότι τόσο η δημιουργία υποσυνόλων κατά την απομόνωση των δεδομένων όσο και οι γραφικές τους απεικονίσεις ήταν ίδια και στις δύο περιπτώσεις.

## 2.7. Διαθεσιμότητα λογισμικού

Η πρόσβαση των ενδιαφερομένων χρηστών στο λογισμικό που αναπτύχθηκε εξασφαλίζεται μέσω της ελεύθερης διάθεσής τους σε ιστοχώρο του ΓΠΑ (<http://www.aua.gr/psomas/LabBase>). Ο ιστοχώρος αυτός αποτελείται από τρεις ιστοσελίδες διάδοσης του λογισμικού LabBase, οι οποίες αναπτύχθηκαν με το λογισμικό ανάπτυξης ιστοσελίδων Adobe<sup>®</sup> Dreamweaver<sup>®</sup>CS4 (Adobe systems incorporated).

Η πρώτη ιστοσελίδα περιλαμβάνει ένα εισαγωγικό κείμενο με το οποίο παρέχεται στον επισκέπτη μια γενική πληροφόρηση σχετικά με το λογισμικό LabBase, ενώ περιλαμβάνονται και δύο πλήκτρα ελέγχου, τα “DOWNLOAD SOFTWARE” και “MANUAL” (**Εικόνα 2.9**). Από αυτά, το πλήκτρο “DOWNLOAD SOFTWARE” ανοίγει τη δεύτερη ιστοσελίδα διάδοσης, η οποία περιλαμβάνει το σύνδεσμο (link) για τη μεταφορά του λογισμικού LabBase από το χώρο του εξυπηρετητή (server) όπου φιλοξενείται, στο χώρο του δίσκου του H/Y του ενδιαφερόμενου σύμφωνα με τις υποδείξεις εγκατάστασης οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στην ιστοσελίδα αυτή (**Εικόνα 2.10**).

Το πλήκτρο “MANUAL” ανοίγει το εγχειρίδιο χειρισμού του λογισμικού LabBase, ενώ ο σύνδεσμος “Press here” που αναφέρεται στην πρόταση “Press here for software development references” εμφανίζει την τρίτη ιστοσελίδα διάδοσης (**Εικόνα 2.11**). Σε αυτήν περιλαμβάνονται οι αναφορές για την ανάπτυξη του λογισμικού.



**LabBase: An Innovative Food Microbial Responses Database:**

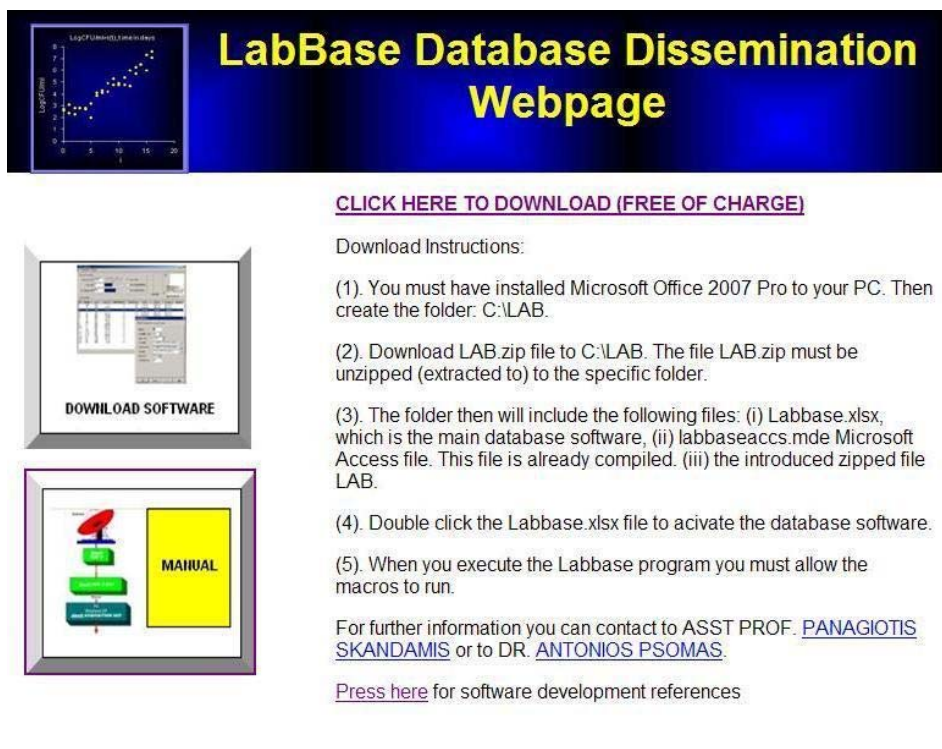
LabBase is a novel microbial growth responses database to various combinations of environmental and physicochemical factors, supported by an easy-to-use software application developed in order to collect and systematize the existing knowledge, analyze data and simulate the microbial response to food systems. The innovative features of the LabBase database are focused on the management methods of microbial data, recorded for educational purposes, consulting services from research institutes to the food industry, the food safety production, the risk assessment of food spoilage during the various food production stages, storage and handling.

**Development:** [Antonios N. Psomas](#), Ph.D. and [Panagiotis N. Skandamis](#), Assistant Professor.

**Research group of chemical and microbial processes and automations:** Asst Prof. [Panagiotis Skandamis](#), Prof. [Serkos Haroutounian](#), Prof. [George-John Nychas](#), Dr. [Antonios N. Psomas](#).

You can also visit the [UGPM Microbial Growth Predictive Software](#) dissemination webpage, in order to download it.

Εικόνα 2.9. Πρώτη ιστοσελίδα διάδοσης του λογισμικού LabBase



**CLICK HERE TO DOWNLOAD (FREE OF CHARGE)**

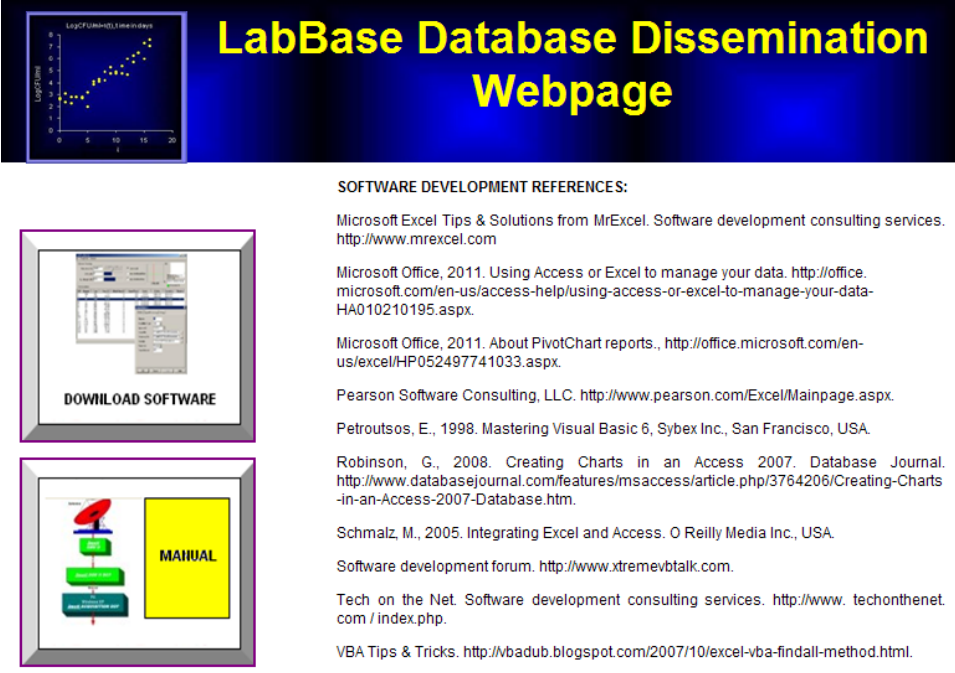
Download Instructions:

- (1). You must have installed Microsoft Office 2007 Pro to your PC. Then create the folder: C:\LAB.
- (2). Download LAB.zip file to C:\LAB. The file LAB.zip must be unzipped (extracted to) to the specific folder.
- (3). The folder then will include the following files: (i) Labbase.xlsx, which is the main database software, (ii) labbaseaccs.mde Microsoft Access file. This file is already compiled. (iii) the introduced zipped file LAB.
- (4). Double click the Labbase.xlsx file to activate the database software.
- (5). When you execute the Labbase program you must allow the macros to run.

For further information you can contact to ASST PROF. [PANAGIOTIS SKANDAMIS](#) or to DR. [ANTONIOS PSOMAS](#).

[Press here](#) for software development references

Εικόνα 2.10. Δεύτερη ιστοσελίδα διάδοσης του λογισμικού LabBase



**LabBase Database Dissemination Webpage**

**SOFTWARE DEVELOPMENT REFERENCES:**

Microsoft Excel Tips & Solutions from MrExcel. Software development consulting services. <http://www.mrexcel.com>

Microsoft Office, 2011. Using Access or Excel to manage your data. <http://office.microsoft.com/en-us/access-help/using-access-or-excel-to-manage-your-data-HA010210195.aspx>.

Microsoft Office, 2011. About PivotChart reports. <http://office.microsoft.com/en-us/excel/HP052497741033.aspx>.

Pearson Software Consulting, LLC. <http://www.pearson.com/Excel/Mainpage.aspx>.

Petroutsos, E., 1998. Mastering Visual Basic 6, Sybex Inc., San Francisco, USA.

Robinson, G., 2008. Creating Charts in an Access 2007. Database Journal. <http://www.databasejournal.com/features/msaccess/article.php/3764206/Creating-Charts-in-an-Access-2007-Database.htm>.

Schmalz, M., 2005. Integrating Excel and Access. O Reilly Media Inc., USA.

Software development forum. <http://www.xtremevbalk.com>.

Tech on the Net. Software development consulting services. <http://www.techonthenet.com/index.php>.

VBA Tips & Tricks. <http://vbadub.blogspot.com/2007/10/excel-vba-findall-method.html>.

Walkenbach, J., 2004. Excel 2003 Power Programming with VBA, Wiley Publishing Inc., Indianapolis, USA.

---

**Εικόνα 2.11.** Τρίτη ιστοσελίδα διάδοσης του λογισμικού LabBase

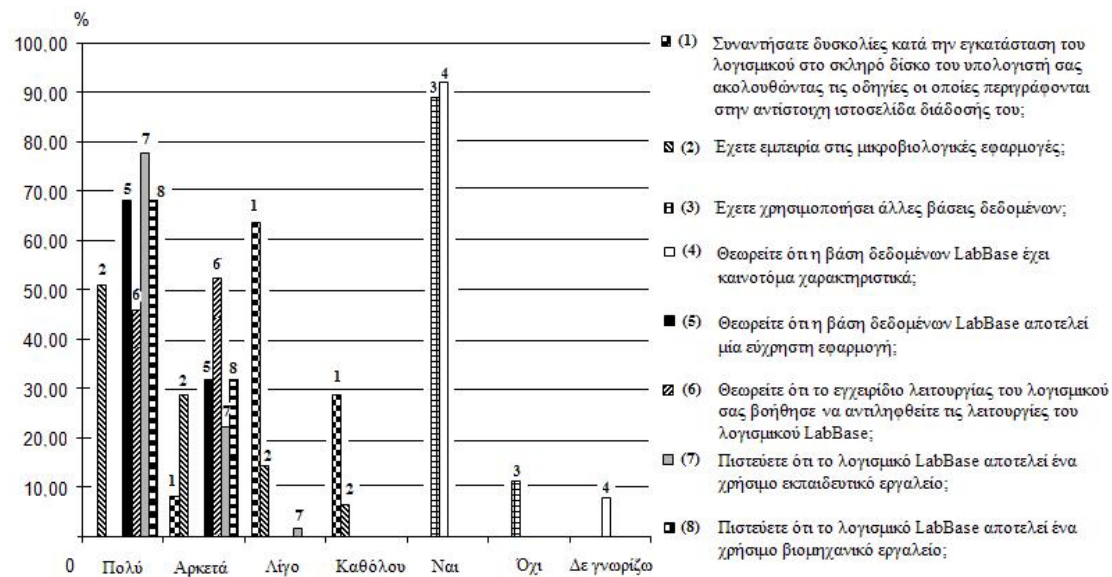
---

## 2.8. Χρηστικότητα

Η χρηστικότητα του νέου λογισμικού LabBase αξιολογήθηκε μέσω της διανομής ερωτηματολογίων σε 63 άτομα, τα οποία δεν είχαν καμία σχέση με το λογισμικό αυτό. Τα άτομα που επελέγησαν είναι εξειδικευμένα στη μικροβιολογία τροφίμων, ενώ κάποιοι από αυτούς απασχολούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να απαντήσουν σε οκτώ βασικά ερωτήματα σχετικά τη χρήση του λογισμικού LabBase και τις εμπειρίες που αποκόμισαν από τη χρήση του (**Εικόνα 2.12**).

Αναλυτικότερα, η διαδικασία της αξιολόγησης προέβλεπε τη μεταφορά του λογισμικού από την ιστοσελίδα διάδοσής του στο σκληρό δίσκο των Η/Υ τους, την εγκατάσταση και χρήση του, σύμφωνα με τις οδηγίες που περιλαμβάνονται στην ίδια ιστοσελίδα (**Εικόνα 2.10**). Οι ερωτήσεις και η ανάλυση των στατιστικών δεδομένων που προέκυψαν από τις απαντήσεις παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.12**.

## ΕΡΩΤΗΘΕΝΤΕΣ



**Εικόνα 2.12.** Αξιολόγηση των επιδόσεων και της αποδοχής του λογισμικού LabBase

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η μεγάλη πλειοψηφία των ερωτηθέντων διαπιστώνει ότι το λογισμικό έχει καινοτόμα χαρακτηριστικά (>90%). Επιπλέον, ένα μεγάλο μέρος των ερωτηθέντων (~80%) θεωρεί ότι το λογισμικό LabBase είναι ένα χρήσιμο εκπαιδευτικό εργαλείο, ενώ ένα ποσοστό το οποίο προσεγγίζει το 70% θεωρεί ότι αποτελεί ένα χρήσιμο και εύχρηστο βιομηχανικό εργαλείο. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δείχνουν μία θετική προοπτική για τη βιομηχανική χρήση του λογισμικού UGPM.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι βιομηχανίες τροφίμων διαθέτουν μια μεγάλη ποσότητα αδημοσίευτων δεδομένων σχετικά με την απόκριση των μικροοργανισμών των τροφίμων στους φυσικοχημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενώ αυτά δεν είναι καταχωρημένα σε κάποια βάση δεδομένων. Έως σήμερα η βάση δεδομένων ComBase αποτελούσε το μόνο διαθέσιμο λογισμικό που είναι σε θέση να εξυπηρετήσει την ανάγκη αυτή. Ένα βασικό της μειονέκτημα είναι η περιορισμένη δυνατότητα επέκτασής της σε προσωπικά ή μη δημοσιευμένα δεδομένα.

Το λογισμικό LabBase έχει αναπτυχθεί με σκοπό να καλύψει αυτό το κενό, αφού ο χρήστης της είναι σε θέση να την επεκτείνει εισάγοντας επιπλέον δεδομένα

από την καθημερινή του εργασία. Παράλληλα, η LabBase είναι φιλική (user-friendly) προς τον μη έμπειρο χρήστη (non expert user), διατηρώντας παράλληλα τον αυστηρά επιστημονικό της χαρακτήρα. Απευθύνεται κυρίως σε βιομηχανικούς χρήστες οι οποίοι δεν είναι απόλυτα εξοικειωμένοι με τις υπηρεσίες του διαδικτύου ή δεν είναι αρκετά έμπειροι ώστε να χρησιμοποιούν τη διεθνή βάση δεδομένων ComBase. Με το λογισμικό LabBase, οι χρήστες είναι δυνατό να αποθηκεύουν-επεξεργάζονται προσωπικά τους δεδομένα, να συγκρίνουν διαφορετικά τρόφιμα ή να εκτελούν σενάρια παραγωγής/διακίνησης τροφίμων. Επιπλέον, τους παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης των πιθανών επιπτώσεων από την ανάπτυξη των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στην ποιότητα και ασφάλεια των τελικών τους προϊόντων.

Η LabBase συνιστά από μόνη της μία αυτόνομη εφαρμογή (standalone software application) που περιλαμβάνει δεδομένα μετρήσεων της απόκρισης των μικροοργανισμών. Από τα στοιχεία αυτά παράγονται οι τόσο καμπύλες αύξησης-επιβίωσης όσο και αντίστοιχοι ρυθμοί αδρανοποίησής τους. Η διαχείριση των δεδομένων περιλαμβάνει την επεξεργασία-απομόνωση (data filtering) των μικροβιακών δεδομένων σύμφωνα με κάθε δυνατό συνδυασμό των ακόλουθων παραμέτρων: Μικροοργανισμός, υπόστρωμα, θρεπτικό μέσο, πειραματικές συνθήκες, θερμοκρασία, pH και ενεργότητα νερού. Τα εργαλεία επεξεργασίας-απομόνωσης των δεδομένων περιλαμβάνουν:

- (i) τη γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ( $\text{Log}_{10}\text{CFU/ml}$ ) ως προς το χρόνο (t),
- (ii) τη γραφική απεικόνιση δύο ή περισσότερων μικροβιακών προφίλ ανάπτυξης στον ίδιο γράφημα ώστε να είναι δυνατή η σύγκρισή τους, και
- (iii) επεξεργασμένα δεδομένα διαθέσιμα σε μορφή πίνακα δεδομένων.

Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των λογισμικών LabBase και ComBase εστιάζονται στα ακόλουθα σημεία:

- (i) Το λογισμικό LabBase συνιστά μία αυτόνομη εφαρμογή η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί από όλους τους χρήστες. Αντίθετα, το λογισμικό ComBase συνιστά μία διαδικτυακή εφαρμογή η οποία απευθύνεται αποκλειστικά σε εξειδικευμένο επιστημονικό-ερευνητικό προσωπικό.
- (ii) Η βάση δεδομένων του λογισμικού LabBase υποστηρίζει την εισαγωγή τόσο δημοσιευμένων όσο και αδημοσίευτων-προσωπικών δεδομένων. Η εφαρμογή έχει σχεδιαστεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μπορεί να προσαρμοστεί στις ανάγκες του

κάθε χρήστη παρέχοντάς του τη δυνατότητα να τη χρησιμοποιεί ως μια προσωπική βάση δεδομένων. Αντίθετα, η βάση δεδομένων ComBase περιλαμβάνει μόνο δημοσιευμένα δεδομένα, τα οποία είναι προσβάσιμα μόνο για επεξεργασία. Η ComBase δεν παρέχει τη δυνατότητα στους χρήστες να εισάγουν τα δικά τους δεδομένα.

(iii) Η δομή της βάσης δεδομένων LabBase βασίζεται σε τυπική γραμμική μορφή όπου οι εγγραφές διαιρούνται σε τρεις περιοχές δεδομένων. Η δομή της βάσης δεδομένων ComBase βασίζεται σε τυπική γραμμική μορφή η οποία περιλαμβάνει έναν κύριο και πολλούς διευκρινιστικούς πίνακες δεδομένων (Baranyi & Tamplin, 2004).

(iv) η βάση δεδομένων LabBase περιέχει την καινοτόμο συνοδευτική εφαρμογή, αντίστοιχη της οποίας δεν υπάρχει στην ComBase. Η εφαρμογή αυτή εμπεριέχει έναν καινοτόμο μηχανισμό ο οποίος έχει αναπτυχθεί με σκοπό να αποθηκεύει τα σύνολα δεδομένων που παράγονται από τη διαδικασία της επεξεργασίας και απομόνωσής τους μετά από αντίστοιχες εφαρμογές ερωτημάτων από το χρήστη προς το λογισμικό. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει ένα σύστημα εποπτείας και διαχείρισης των αποθηκευμένων συνόλων δεδομένων παρέχοντας στο χρήστη τη δυνατότητα επαναφοράς ενός αποθηκευμένου συνόλου δεδομένων ώστε να συνεχίσει την εκτέλεση των ερωτημάτων από εκείνο το σημείο. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη επειδή αντιμετωπίζει το πρόβλημα της ακύρωσης της συνολικής διαδικασίας ανάλυσης των δεδομένων από το χρήστη στην περίπτωση που αυτός έχει κάνει είτε κάποιο σφάλμα κατά τη διαδικασία της αναζήτησής του ή έχει επιλέξει ένα δρόμο αναζήτησης ο οποίος δεν τον οδήγησε στο επιθυμητό αποτέλεσμα.

Η ανάπτυξη του λογισμικού περιγράφεται αναλυτικά στην εργασία “LabBase: Development and validation of an innovative food microbial growth responses database”, η οποία δημοσιεύτηκε στο διεθνές περιοδικό *Computers and Electronics in Agriculture* (85) του εκδοτικού οίκου Elsevier, από τους Psomas et al. (2011) **(Εικόνα 2.13)**.





Contents lists available at ScienceDirect

## Computers and Electronics in Agriculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/compag](http://www.elsevier.com/locate/compag)

Original papers

## Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions

Antonios N. Psomas<sup>a,b</sup>, George-John Nychas<sup>a</sup>, Serkos A. Haroutounian<sup>b</sup>, Panagiotis N. Skandamis<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Food Science & Technology, Laboratory of Food Hygiene and Quality Control, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece<sup>b</sup> Department of Sciences, Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 October 2010

Received in revised form 3 January 2011

Accepted 24 January 2011

## Keywords:

Predictive microbiology

Food safety

Microbial growth prediction

Safety tertiary model

Dynamic temperature conditions

## ABSTRACT

The use of predictive modeling software may markedly contribute to the better understanding of the microbial behavior in foods. In this paper, the development and validation of a tertiary model, which provides predictions of microbial growth in foods under dynamic or static temperature conditions, is presented. In particular, the UGPM (Unified Growth Prediction Model) software applies the Baranyi and Roberts (1994) primary model, coupled to a secondary temperature model, in order to simulate growth of a given microorganism during storage of a specific food or food category. The software, intended to be used by both expert and non-expert users, may be a valuable decision support tool for the food industry, by assisting in the management of foods based on their actual shelf-life and microbial safety, thereby limiting the deterministic “best-by” practice for the determination of shelf-life. The latter is commonly based solely on empirical observations and has high uncertainty. This in turn, may result in the rejection of large quantities of unspoiled or safe foods, or even in the distribution of spoiled and unsafe foods, due to ignorance of the effect of temperature abuse on the microbial spoilage and safety of products.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Εικόνα 2.13.** Η εργασία στην οποία περιγράφεται η ανάπτυξη του λογισμικού “LabBase”, δημοσιεύτηκε στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό “Computers and Electronics in Agriculture”

Το λογισμικό LabBase αναμένεται να προσφέρει πολύτιμες υπηρεσίες όσον αφορά στην ασφάλεια των τροφίμων κατά τη διαδικασία της μεταποίησής τους. Η πληροφόρηση η οποία παρέχεται από τη βάση LabBase μπορεί να αξιοποιηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων για την εκτίμηση του δυνητικού κινδύνου της υποβάθμισης της μικροβιολογικής ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων κατά τη διάρκεια των σταδίων παρασκευής τους (Kang et al., 2000), της μικροβιακής σταθερότητας νέων προϊόντων, τα οποία προέρχονται από αντίστοιχα παραδοσιακά, με μεταβολή της σύστασης ή διαδικασίας παρασκευής τους, της επίδραση νέων συντηρητικών/αντιμικροβιακών στη μικροβιακή ανάπτυξη, και του χρόνου ζωής των προϊόντων στο ράφι, με βάση τη μικροβιακή τους σταθερότητα.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ<sup>1</sup>

- Alexander, M., Clark, G., 2007. Microsoft Excel and Access Integration with Office 2007. Wiley Publishing Inc. Indianapolis, Indiana.
- Baird-Parker, A. C., 1995. Development of industrial procedures to ensure the microbial safety of food. *Food Control* 6, 29-36.
- Baranyi, J., Roberts, T. A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Tamplin, M. L., 2004. A common database on microbial responses to food environments. *Journal of food protection* 67, 1967-1971.
- Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., Mackey B. M. 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology* 27, 61-75.
- Bovill, R., Bew, J., Cook, N., D'Agostino, M., Wilkinson, N., Baranyi, J. 2000. Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology* 59, 157-65.
- Bovill, R. A., Bew, J., Baranyi, J. 2001. Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature II. Rapidly changing temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 67, 131-137.
- Buche P., Couvert O., Dibia-Barthélemy J., Hignette G., Mettler E., Soler L., 2011. Flexible querying of Web data to simulate bacterial growth in food. *Food Microbiology* 28, 685-693.
- ComBase, 2007. A Combined Database for Predictive Microbiology. Institute of Food Research. <http://www.combase.cc/> (retrieved February, 2011).
- Geetaerd, A. H., Valdramidis, V. P., Van Impe, J. F. 2005. GIInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102, 95-105.

---

<sup>1</sup> Για την ανάπτυξη του λογισμικού εκτός από την αντίστοιχη σχετική βιβλιογραφία, προσαρμόστηκαν τμήματα κώδικα VBA από τις ακόλουθες συμβουλευτικές υπηρεσίες του διαδικτύου και ιστοσελίδες ανταλλαγής πληροφοριών και απόψεων:

Microsoft Excel Tips & Solutions from MrExcel. Software development consulting services.

<http://www.mrexcel.com>.

Pearson Software Consulting, LLC. <http://www.pearson.com/Excel/Mainpage.aspx>.

Software development forum. <http://www.xtremevbttalk.com>.

Tech on the Net. Software development consulting services. <http://www.techonthenet.com/index.php>.

VBA Tips & Tricks. <http://vbadub.blogspot.com/2007/10/excel-vba-findall-method.html>.

- Gounadaki, A., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H., Nychas, G.-J. E. 2007. Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami. *Journal of Food Protection* 70, 2313-2320.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Yin, N. Y., Gymoese, P., Vogel, B. F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18, 1165-1171.
- Janssen, M., Geeraerd, A. H., Cappuyens, A., Garcia-Gonzalez, L., Schockaert, G., Van Houteghem, N., Vereecken, K. M., Debevere, J., Devlieghere, F., Van Impe, J. F. 2007. Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *Listeria innocua* inactivation: Development of a predictive model and assessment of experimental variability. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1601-1611.
- Kang, S. H., Kodell, R. L., Chen, J. J., 2000. Incorporating model uncertainties along with data uncertainties in microbial risk assessment, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 68-72.
- Koseki, S., 2009. Microbial Responses Viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *International Journal of Food Microbiology* 134, 75-82.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., Nychas, G.-J. E. 2006. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 124-134.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Siana, P., Skandamis, P., Metaxopoulos, I. ( 2006a). Determination of the growth limits and kinetic behavior of *Listeria monocytogenes* in a sliced cooked cured meat product: Validation of the predictive growth model under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Protection* 69, 1312-1321.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. 2006b. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science* 71, 157-167.

- Mataragas, M., Drosinos, H. 2007. Shelf life establishment of a sliced, cooked, cured meat product based on quality and safety determinants, *Journal of Food Protection* 70, 1881-1889.
- McMeekin, T. A., 2007. Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries, *Meat Science* 77, 17-27.
- McMeekin, T. A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S., Zwietering, M. H., 2006. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology* 112, 181-194.
- Membré, J. M., Lambert, R. J. W., 2008. Application of predictive modeling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 128, 10-15.
- Microsoft Office, 2011a. Using Access or Excel to manage your data. <http://office.microsoft.com/en-us/access-help/using-access-or-excel-to-manage-your-data-HA010210195.aspx>. (Retrieved, May, 2011).
- Microsoft Office, 2011b. About PivotChart reports., <http://office.microsoft.com/en-us/excel/HP052497741033.aspx>. (retrieved, May, 2011).
- Miller, A. J., 1993. Data collection and capture systems for microbial modeling. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 12, 291-294.
- Petroutsos, E., 1998. *Mastering Visual Basic 6*, Sybex Inc., San Francisco, USA.
- Pan.Y, Breidt, F. Jr., Kathariou, S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7711-7717.
- Psomas, A., Skandamis, P., 2011. LabBase: An Innovative Food Microbial Responses Database, LabBase Database Dissemination Webpage, Agricultural University of Athens, <http://www.aua.gr/psomas/LabBase> (retrieved March, 2011).
- Robinson, G., 2008. Creating Charts in an Access 2007. Database Journal. <http://www.databasejournal.com/features/msaccess/article.php/3764206/Creating-Charts-in-an-Access-2007-Database.htm>.
- Skandamis, P. N., Nychas, G.-J. E. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1646-1653.

- Skandamis, P. N., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C., Sofos, J. N. 2007a. Modeling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/no growth interface of *Escherichia coli* O157:H7, International Group of Food Microbiology 120, 237-249.
- Skandamis, P. N., Brocklehurst, T. F., Panagou, E. Z., Nychas, G.-J. E. 2007b. Image analysis as a mean to model growth of *Escherichia coli* O157:H7 in gel cassettes. Journal of Applied Microbiology 103, 937-947.
- Schmalz, M. 2005. Integrating Excel and Access. O'Reilly Media Inc., USA.
- Stopforth, J. D., Yoon, Y., Kendall, P. A., Sofos, J. N. 2007. Modeling the effect of storage atmosphere on growth–no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, sodium lactate, sodium diacetate, and NaCl, Journal of Food Protection 70, 2329-2338.
- Walkenbach, J., 2004. Excel 2003 Power Programming with VBA, Wiley Publishing Inc., Indianapolis, USA.
- Xanthiakos, K., Simos, D., Angelidis, A. S., Nychas, G. J-E., Koutsoumanis, K. 2006. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized milk. Journal of Applied Microbiology 100, 1289-98.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Ανάπτυξη και επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου προσομοίωσης UGPM για την πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών των τροφίμων κάτω από δυναμικές και σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης της απόκρισης των μικροοργανισμών των τροφίμων αποτελούν θεμελιώδη εργαλεία της προρρητικής μικροβιολογίας, ειδικά για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Ready-to-Eat foods). Η συμβολή τους είναι πολύτιμη στην προστασία του καταναλωτικού κοινού όσον αφορά στην πρόληψη των τροφικών δηλητηριάσεων. Σύμφωνα με τους McMeekin et al. (2006), με τα μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης είναι δυνατή η εκτίμηση του βαθμού έκθεσης των καταναλωτών στα επίπεδα των παθογόνων μικροοργανισμών κατά το χρονικό διάστημα της κατανάλωσής τους. Μέρος των μαθηματικών μοντέλων συστηματοποιήθηκε σε τριτοταγή μοντέλα (λογισμικά πρόβλεψης) με σκοπό την ευκολότερη και ταχύτερη παροχή προβλέψεων τόσο προς τα ερευνητικά κέντρα όσο και τη βιομηχανία τροφίμων. Τα τριτοταγή μοντέλα περιλαμβάνουν πρωτοταγή και δευτεροταγή αντίστοιχα, οι παράμετροι των οποίων περιγράφουν περιβαλλοντικούς και φυσικοχημικούς παράγοντες καθώς και πρόσθετα τροφίμων (Baranyi & Tamplin, 2004).

Μερικά από τα πιο δημοφιλή τριτοταγή μοντέλα είναι:

(i) PMP (Pathogen Modeling Program). Το λογισμικό αυτό περιλαμβάνει μοντέλα που βασίζονται στην εφαρμογή της συνάρτησης Gompertz σε συνδυασμό με ανάλυση επιφάνειας απόκρισης. Αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας εκτεταμένα πειραματικά δεδομένα πάνω στη συμπεριφορά των μικροοργανισμών σε υγρά μέσα (Buchanan, 1991, 1993; Gibson & Hocking, 1997). Περιλαμβάνει περισσότερα από 40 μοντέλα παθογόνων μικροοργανισμών τα οποία αφορούν σε μοντέλα ανάπτυξης και αδρανοποίησης για διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης άλατος/ενεργότητας νερού ( $\text{NaCl}/a_w$ ) καθώς και ιδιαίτερων συνθηκών όπως τύποι και συγκεντρώσεις οργανικών οξέων, ατμόσφαιρες ή νιτρικά άλατα (Buchanan, 1993). Επίσης περιλαμβάνει την επίδραση των θερμοκρασιών ψύξης στην ανάπτυξη των *Clostridium botulinum* και *Clostridium perfringens* μετά το μαγείρεμα. Αναπτύχθηκε

από την Υπηρεσία Αγροτικής Έρευνας (Agricultural Research Service) του ερευνητικού κέντρου “Eastern Regional Research Center” του Υπουργείου Γεωργίας των Η.Π.Α (USDA, 2009a, 2009b).

(ii) Sym’Previous. Αποτελεί ένα εκτεταμένο σύστημα λήψης αποφάσεων Γαλλικής ανάπτυξης, το οποίο περιλαμβάνει αφενός μία βάση που περιλαμβάνει δεδομένα ανάπτυξης και αδρανοποίησης της απόκρισης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, αφετέρου μοντέλα πρόβλεψης της αύξησης και αδρανοποίησης των παθογόνων βακτηρίων και μερικών μικροοργανισμών αλλοίωσης (Lepoutq et al., 2005).

(iii) Food Spoilage Predictor. Αναπτύχθηκε από Αυστραλούς ερευνητές (Τμήμα Αγροτικής Επιστήμης, Πανεπιστήμιο της Τασμανία, Αυστραλία) με σκοπό την πρόβλεψη του ρυθμού της αλλοίωσης (εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών) σε ένα μεγάλο εύρος τροφίμων υψηλής πρωτεϊνικής περιεκτικότητας, διατηρημένων σε απλή ψύξη όπως το κρέας, τα ψάρια, τα πουλερικά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το λογισμικό επικοινωνεί με μικρού μεγέθους συσκευή μέτρησης χρόνου-θερμοκρασίας (data logger) η οποία το τροφοδοτεί με δεδομένα. Στο λογισμικό αυτό περιλαμβάνεται το μοντέλο *Pseudomonas predictor* των Neumeyer et al. (1997).

(iv) Seafood Spoilage Predictor (SSP). Το λογισμικό αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του Paw Dalgaard του Εθνικού Ινστιτούτου Τροφίμων του Πολυτεχνείου της Δανίας, με σκοπό να καταστήσει δυνατή την πρόβλεψη της διάρκειας συντήρησης σειράς τροφίμων θαλάσσιας προέλευσης. Περιλαμβάνει τόσο κινητικά όσο και εμπειρικά μοντέλα συγκεκριμένων μικροοργανισμών αλλοίωσης (Dalgaard et al., 2002). Το λογισμικό αυτό εξελίχθηκε στο Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) το οποίο λειτουργεί σε Microsoft.Net runtime environment (SSSP, 2009).

(v) Εργαλεία μοντελοποίησης της ComBase (ComBase modeling toolbox), τα οποία αναπτύχθηκαν από την ερευνητική ομάδα της ComBase του Ινστιτούτου Έρευνας Τροφίμων (Institute of Food Research–IFR) στο Norwich της Μεγάλης Βρετανίας. Η σειρά αυτή λογισμικών περιλαμβάνει το ComBase Predictor (το οποίο αποτελεί βελτιωμένη και εμπλουτισμένη διαδικτυακή έκδοση του αυτόνομου προγράμματος Growth Predictor), το Perfringens Predictor και το DMFit. Το λογισμικό ComBase predictor περιλαμβάνει ένα σύνολο από 23 μοντέλα ανάπτυξης και 6 μοντέλα θερμικού θανάτου για την πρόβλεψη της μικροβιακής απόκρισης σε περιβαλλοντικούς και φυσικοχημικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση άλατος, το pH κ.ά. (ComBase, 2007). Το λογισμικό

Perfringens Predictor αποτελεί μία εφαρμογή για την πρόβλεψη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Clostridium perfringens* κατά τη διάρκεια της ψύξης των κρεάτων μετά το μαγείρεμα (Le Marc et al., 2008). Το λογισμικό DMFit αποτελεί μία εφαρμογή με την οποία είναι δυνατό να παρασταθεί γραφικά ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης/θανάτου ενώ μπορεί να υπολογισθούν πολλά χρήσιμα δεδομένα όπως η φάση προσαρμογής, η αρχική και η μέγιστη συγκέντρωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών (ComBase, 2007).

(vi) Τριτοταγές μοντέλο για την πρόβλεψη της αύξησης/αδρανοποίησης της *Salmonella spp.* κάτω από δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας, pH και ενεργότητας του νερού ( $a_w$ ) (Pin et al., 2010).

Μέρος των λογισμικών αυτών είτε διατίθενται μόνο για εμπορική χρήση είτε ενσωματώνουν τα μικροβιακά μοντέλα στον κώδικα, μην επιτρέποντας στο χρήστη να εισάγει νέα μοντέλα δίχως εξουσιοδότηση από τον προγραμματιστή. Επιπλέον, τα ενσωματωμένα μοντέλα βασίζονται είτε σε εργαστηριακά δεδομένα είτε προέρχονται από περιορισμένους συνδυασμούς τροφίμων και μικροοργανισμών.

Οι ανωτέρω περιοριστικοί παράγοντες οδήγησαν στην ανάπτυξη του λογισμικού UGPM (Unified Growth Predictive Model) το οποίο αφορά σε ένα τριτοταγές μοντέλο πρόβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό δυναμικές και στατικές συνθήκες θερμοκρασίας με τη βοήθεια πρωτοταγών και δευτεροταγών μοντέλων (Psomas et al., 2011). Ο μηχανισμός λειτουργίας του τριτοταγούς μοντέλου UGPM βασίζεται στο πρωτοταγές μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994) σε συνδυασμό με το δευτεροταγές μοντέλο τετραγωνικής ρίζας των Ratkowsky et al. (1982). Το τριτοταγές μοντέλο προσομοίωσης περιλαμβάνει μία βάση δεδομένων η οποία περιλαμβάνει δημοσιευμένα μικροβιακά μοντέλα τα οποία αποτελούνται από 4 μόνο παραμέτρους ανά μοντέλο. Η βάση δεδομένων των μικροβιακών μοντέλων ενημερώνεται από το χρήστη ενώ η αρχική έκδοση του λογισμικού περιλαμβάνει μοντέλα τα οποία προέρχονται από εμπορικά προϊόντα. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά έρχονται σε αντίθεση με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά των λογισμικών τα οποία αναφέρθηκαν ανωτέρω. Το UGPM είναι ένα ιδιαίτερα εύχρηστο λογισμικό (user friendly) το οποίο απευθύνεται σε μη έμπειρους χρήστες (non expert users). Το λογισμικό UGPM διατίθεται δωρεάν στους ενδιαφερόμενους (Psomas & Skandamis, 2009).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ

Το λογισμικό UGPM αναπτύχθηκε με κώδικα VBA (Visual Basic for Applications) σε προγραμματιστικό περιβάλλον Microsoft Excel<sup>®</sup> 2007 και 2010 (Walkenbach, 2004, Petroustos, E., 1998). Παρέχει προβλέψεις για την απόκριση των μικροβιακών πληθυσμών των τροφίμων (παθογόνων ή αλλοιογόνων) υπό δυναμικές ή στατικές συνθήκες θερμοκρασίας. Στο λογισμικό είναι δυνατό να εισαχθούν δυναμικά δεδομένα θερμοκρασίας-χρόνου (t-T) με τη μορφή αρχείου Excel και να μετασχηματιστούν σε προβλέψεις πυκνότητας πληθυσμού των μικροοργανισμών είτε με τη μορφή αριθμητικών δεδομένων είτε με τη μορφή γραφικών παραστάσεων αντίστοιχα.

Το διαφορικό μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994) έχει προγραμματιστεί στο λογισμικό UGPM επειδή είναι εύκολο στη χρήση του, εφαρμόζεται υπό δυναμικές συνθήκες, έχει καλή προσαρμοστική ικανότητα ενώ οι περισσότεροι από τις παραμέτρους του (λανθάνουσα και εκθετική φάση ανάπτυξης) είναι βιολογικά ερμηνεύσιμες (Lebert & Lebert, 2006). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μοντελοποίηση της μικροβιακής ανάπτυξης μέσω του λογισμικού DMFit (ComBase, 2007) το οποίο επιτρέπει την εύκολη προσαρμογή των δεδομένων στις εξισώσεις του μοντέλου αυτού. Το ίδιο μοντέλο έχει προγραμματιστεί στο λογισμικό ComBase Predictor που μπορεί να προβλέψει τη μικροβιακή απόκριση σε δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας. Οι Fujikawa & Morozumi (2005) επίσης ανέπτυξαν ένα τριτοταγές μοντέλο το οποίο βασίζεται στο μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994). Το μοντέλο τους αφορά στην πρόβλεψη της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus* και της παραγωγής τοξίνης από το ίδιο βακτήριο σε αποστειρωμένο γάλα κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας. Ενδιαφέροντα σχόλια για τη χρήση του μοντέλου των Baranyi & Roberts (1994) έχουν επίσης αναφερθεί σε γράμμα προς την επιθεώρηση Applied and Environmental Microbiology, από τους Le Marc et al. (2007).

### 3.1. Μαθηματική θεώρηση του τριτοταγούς μοντέλου UGPM

Η προσομοίωση της μικροβιακής αύξησης βασίζεται στο πρωτοταγές μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994) το οποίο εκφράζεται με τη διαφορική εξίσωση 1<sup>ης</sup> τάξεως:



$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{q_0 e^{vt}}{1 + q_0 e^{vt}} \mu_{\max} \cdot u(x) \quad (3.1)$$

όπου  $u(x)$  είναι η συνάρτηση αναστολής της αύξησης,  $x(t)$  είναι η συγκέντρωση των μικροοργανισμών σε χρόνο  $t$  και  $\mu_{\max}$  είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού των κυττάρων. Η παράμετρος  $q_0$  αποτελεί μέτρο της αρχικής φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων συνοψίζοντας την ετοιμότητά τους να αρχίσουν να αυξάνονται σε ένα νέο περιβάλλον, ενώ είναι συγκεκριμένη για κάθε συνδυασμό τροφίμων και μικροοργανισμών. Προκύπτει από την εξίσωση:

$$q_0 = \frac{P_0}{K_p} \quad (3.2)$$

Ο αριθμητής του δεύτερου όρου της **εξίσωσης 3.2** αποτελεί την αρχική τιμή μίας κρίσιμης ουσίας η οποία είναι απαραίτητη για να αρχίσουν να αυξάνονται οι μικροοργανισμοί ενώ ο παρονομαστής εκφράζει τη σταθερά Michaelis – Menten. Η μεταβλητή  $P_0$  συνδέεται επίσης με την παράμετρο  $h_0$  η οποία αποτελεί ένα άλλο μέτρο της αρχικής φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων και ορίζεται από την εξίσωση:

$$h_0 = \ln\left(\frac{Q_0 + 1}{Q_0}\right) \quad (3.3)$$

Υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας, εφαρμόζεται το ακόλουθο σύστημα διαφορικών εξισώσεων (Baranyi & Roberts, 1994):

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu(T) \left( \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right) (1 - e^{y(t)-m}) \quad (3.4)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu(T) \quad (3.5)$$

με αρχικές συνθήκες: 
$$\begin{cases} y(0) = y \\ Q_0 = \ln q_0 \end{cases}$$

και  $Q(t) = \ln q(t)$

Η πρώτη διαφορική εξίσωση εκφράζει τη χρονική εξέλιξη του μικροβιακού φορτίου ενώ η δεύτερη εκφράζει τη μεταβολή στη φυσιολογική κατάσταση των βακτηρίων με το χρόνο (Lebert & Lebert, 2006).

Υπό στατικές συνθήκες, δηλαδή όταν οι παράμετροι του μοντέλου είναι ανεξάρτητοι του χρόνου, το διαφορικό μοντέλο εκφράζεται ως ο φυσικός λογάριθμος

της συγκέντρωσης των κυττάρων  $y(t)=\ln x(t)$  και περιγράφεται από την επιλυμένη μορφή της διαφορικής εξίσωσης **3.1**, δηλαδή:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m \cdot \mu_{\max} \cdot A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (3.6)$$

Όπου  $y_{\max}$  είναι ο φυσικός λογάριθμος της μέγιστης συγκέντρωσης του πληθυσμού των κυττάρων,  $y_0$  είναι ο φυσικός λογάριθμος της αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων ( $\ln x_0$ ), η παράμετρος καμπυλότητας  $m$  χαρακτηρίζει τη μετάβαση από την εκθετική στη στατική φάση ενώ  $A(t)$  είναι μία βαθμιαία χρονική καθυστέρηση η οποία καθορίζει τη φάση προσαρμογής (Baranyi & Roberts, 1994) και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$A(t) = t - \lambda + \frac{\ln(1 - e^{-\nu t} + e^{-\nu(t-\lambda)})}{\nu} \quad (3.7)$$

όπου  $t$  είναι ο χρόνος,  $\lambda$  είναι η φάση προσαρμογής του μικροοργανισμού δηλαδή το χρονικό διάστημα το οποίο παρήλθε πριν από την έναρξη της εκθετικής φάσης και  $\nu$  είναι ο ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος και αντίστοιχης παραγωγής μάζας από μία κρίσιμη ουσία. Η κρίσιμη ουσία όταν παραχθεί σε επαρκή επίπεδα, σηματοδοτεί την είσοδο των κυττάρων στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού (Skandamis et al., 1995).

Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού των κυττάρων ( $\mu_{\max}$ ) εκφράζεται ως η συνάρτηση της θερμοκρασίας σύμφωνα με το δευτεροταγές μοντέλο τετραγωνικής ρίζας των Ratkowsky et al. (1982):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b(T - T_{\min}) \quad (3.8)$$

όπου  $b$  είναι η κλίση της γραμμής παλινδρόμησης,  $T$  είναι η θερμοκρασία και  $T_{\min}$  είναι η θεωρητική ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στην οποία ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης προβλέπεται να είναι μηδέν ( $\mu_{\max}=0$ ). Εφαρμόζεται η **εξίσωση 3.8** η οποία περιλαμβάνει μία μόνο θεμελιώδη παράμετρο, την  $T_{\min}$  (Zwietering et al., 1991). Η εξίσωση αυτή αποτελεί την απλούστερη εκδοχή ενός δευτεροταγούς μοντέλου επειδή η περιοχή θερμοκρασιών στην οποία λαμβάνει χώρα η παρεμβολή τιμών (interpolation area) κυμαίνεται από 0-4°C έως 25°C αντίστοιχα. Μεγαλύτερες θερμοκρασίες όπως 30-37°C (δηλ. βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης για τους περισσότερους μικροοργανισμούς) ή ακόμα υψηλότερες (>45°C) θα μπορούσαν να παρουσιαστούν σπάνια και μόνο σε περίπτωση ατυχήματος στην ψυκτική αλυσίδα ή κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των τροφίμων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για το

λόγο αυτό η θεμελιώδης παράμετρος  $T_{\min}$  θεωρήθηκε ότι ικανοποιεί τις απαιτήσεις ενός δευτεροταγούς μοντέλου για την εφαρμογή της **εξίσωσης 3.8** στο λογισμικό UGPM. Η εξίσωση αυτή καθιστά τη χρήση του λογισμικού αυτού ιδανική για προβλέψεις οι οποίες αφορούν στα βιομηχανικώς παραγόμενα τρόφιμα τα οποία απαιτούν ψύξη ή είναι σταθερά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Παρόλα αυτά, σε λογισμικά τα οποία πρόκειται να αναπτυχθούν σε επόμενο χρόνο θα ήταν δυνατή η εφαρμογή και άλλων θεμελιωδών μοντέλων όπως των Rosso et al. (1995) τα οποία περιλαμβάνουν επιπρόσθετες θεμελιώδεις παραμέτρους όπως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ( $T_{\text{opt}}$ ) και η μέγιστη ( $T_{\text{max}}$ ) αντίστοιχα, ώστε να παρέχουν προβλέψεις για τη μικροβιακή αύξηση σε ολόκληρο το βιοκινητικό εύρος των θερμοκρασιών (Psomas et al., 2011).

Προβλέψεις με το μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994) σε δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας είναι διαθέσιμες στις ιστοσελίδες της “ComBase” ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)). Όσον αφορά στα δευτεροταγή μοντέλα, τα οποία υπολογίζουν το στιγμιαίο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αυτά βασίζονται σε δεδομένα τα οποία προέρχονται από ζυμούς (broth data) και συνεπώς οι προβλέψεις θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη με προσοχή και μάλλον σαν προσέγγιση του τρόπου ανάπτυξης των μικροβιακών πληθυσμών στα τρόφιμα.

### 3.2. Περιγραφή των λειτουργιών του λογισμικού

Το λογισμικό UGPM αναπτύχθηκε με τη μέθοδο της δένδροειδούς διάταξης (**Εικόνα 3.1**). Η αρχική UserForm (Initial UserForm) του λογισμικού (**Εικόνα 3.2**) περιλαμβάνει τα ακόλουθα πλήκτρα ελέγχου (CommandButtons) με τις αντίστοιχες λειτουργίες:

- (i) “Initial Level”: Επιλογή του αρχικού επιπέδου της μικροβιακής μόλυνσης από ένα στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας (ListBox control) το οποίο περιλαμβάνει εύρος τιμών από 0.0 έως 10.0 και στη συνέχεια εγγραφή της επιλεγμένης τιμής σε συγκεκριμένο πεδίο του ενεργού φύλλου δεδομένων “Sheet1”. Αυτή η τιμή η οποία περιγράφεται ως “LogCFU/ml” εκφράζει τη λογαριθμική (με βάση το 10) συγκέντρωση του μικροβιακού πληθυσμού ανά ml.
- (ii) “Model Selections”: Επιλογή ενός συγκεκριμένου μικροβιακού μοντέλου ανά τροφικό υπόστρωμα, το οποίο περιλαμβάνει έως 4 παραμέτρους, από τη βάση δεδομένων του λογισμικού UGPM. Το παραμετροποιημένο μοντέλο αντιστοιχεί σε

ένα συγκεκριμένο συνδυασμό μικροοργανισμών-τροφίμου, ενώ όλα τα μοντέλα τα οποία περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων είναι επικυρωμένα (validated) και προέρχονται από δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά (**Πίνακας 3.1**).

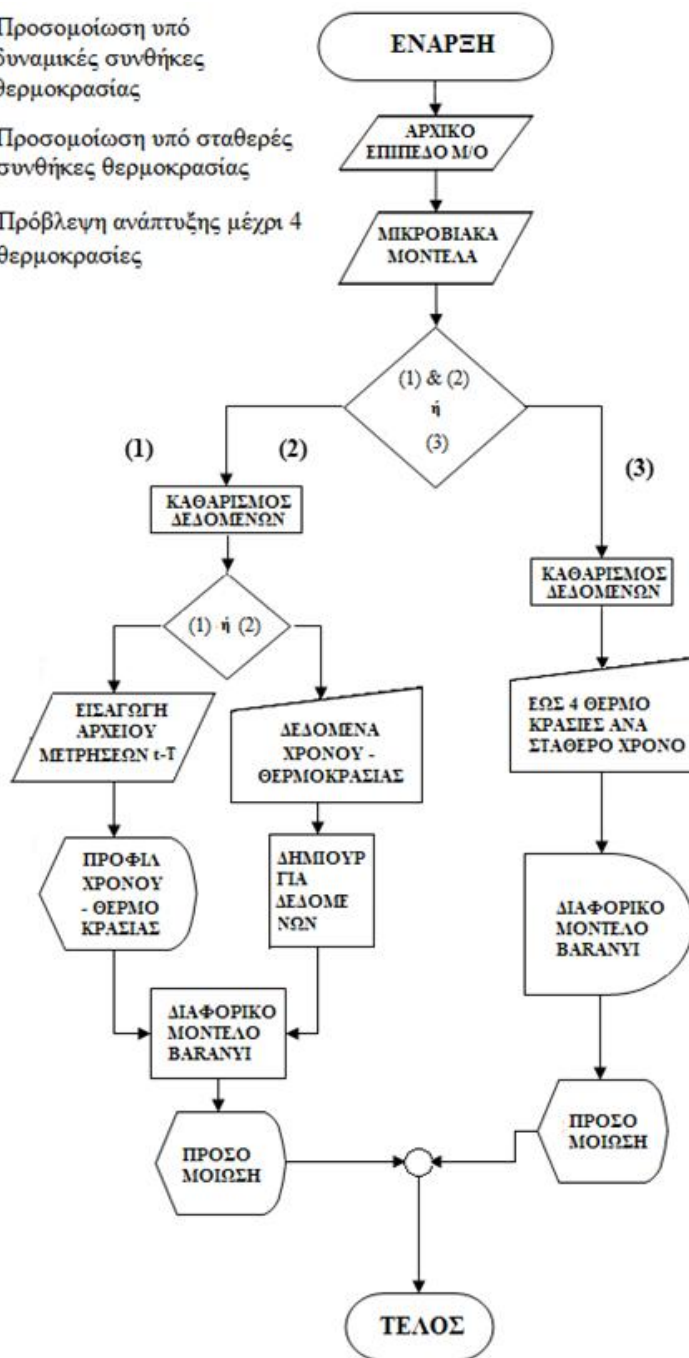
(iii) “Logger Data”: Επιλογή συγκεκριμένου αρχείου δυναμικών δεδομένων χρόνου - θερμοκρασίας (t-T) από λίστα αρχείων που είναι αποθηκευμένα σε συγκεκριμένη περιοχή του δίσκου του H/Y. Τα δεδομένα του επιλεγμένου αρχείου εισάγονται σε προκαθορισμένα για το σκοπό αυτό κελιά του ενεργού φύλλου δεδομένων. Μετά από την ολοκλήρωση της αριθμητικής προσομοίωσης η οποία λαμβάνει χώρα μετά από την εισαγωγή των δεδομένων του εξωτερικού αρχείου, τα δεδομένα χρόνου (σε ώρες) και θερμοκρασίας απεικονίζονται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας χρόνου-θερμοκρασίας της αρχικής UserForm.

(iii) “Constant T”: Αριθμητική και γραφική εκτέλεση της προσομοίωσης υπό στατικές συνθήκες θερμοκρασίας. Ο χρήστης μπορεί να ορίσει τη μέγιστη τιμή του χρόνου (σε ώρες) και την τιμή της θερμοκρασίας στα αντίστοιχα στοιχεία εισαγωγής δεδομένων της σχετικής UserForm. Στη συνέχεια, στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας χρόνου-θερμοκρασίας της αρχικής UserForm απεικονίζονται τα αριθμητικά δεδομένα που αναπτύχθηκαν με βήμα (step) 0.5 ωρών (h). Οι τιμές της θερμοκρασίας είναι σταθερές για τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο.

(iv) “Plot”: Γραφική απεικόνιση της μικροβιακής αύξησης για δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας με τη μορφή σιγμοειδούς καμπύλης η οποία βρίσκεται σε άμεση εξάρτηση με τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις (προφίλ χρόνου-θερμοκρασίας) σε τριπλό σύστημα αξόνων, απόκρισης-χρόνου-θερμοκρασίας.

(v) “GROWTH PREDICTION UP TO 4 TEMPERATURES”: Συγκριτική γραφική απεικόνιση της αύξησης του μικροοργανισμού που περιλαμβάνεται στο ενεργό μοντέλο, σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες. Αυτές ορίζονται από το χρήστη για μία μέγιστη τιμή χρόνου (σε ώρες). Η προσομοίωση αφορά στην παράλληλη γραφική απεικόνιση έως 4 σιγμοειδών καμπυλών που εκφράζουν την αύξηση του μικροοργανισμού στις ορισμένες από το χρήστη θερμοκρασίες. Τα πλήκτρα γενικών λειτουργιών περιλαμβάνουν:

- (1) Προσομοίωση υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας
- (2) Προσομοίωση υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας
- (3) Πρόβλεψη ανάπτυξης μέχρι 4 θερμοκρασίες



**Εικόνα 3.1.** Διάγραμμα το οποίο περιγράφει την ανάπτυξη του τριτοταγούς μοντέλου πρόβλεψης UGPM

(i) τον καθαρισμό των φύλλων δεδομένων του λογισμικού από τις αριθμητικές προσομοιώσεις (“Reset Data”),

(ii) τη δυνατότητα εισόδου του ενδιαφερόμενου εντός των φύλλων δεδομένων ώστε να ελέγξει τις αριθμητικές προσομοιώσεις ή να αντλήσει δεδομένα ενδιαφέροντος,

(iii) την έξοδο από το λογισμικό με ή χωρίς αποθήκευση των δεδομένων της τελευταίας προσομοίωσης η οποία εκτελέστηκε (“Exit (not Saving)” και “Save and Exit” αντίστοιχα),

(iv) τη δυνατότητα ανάγνωσης του εγχειρίδιου χειρισμού.

### 3.3. Η βάση δεδομένων των μικροβιακών μοντέλων

Η εσωτερική βάση δεδομένων του λογισμικού UGPM περιλαμβάνει δημοσιευμένα μικροβιακά μοντέλα τόσο για παθογόνους όσο και για αλλοιογόνους

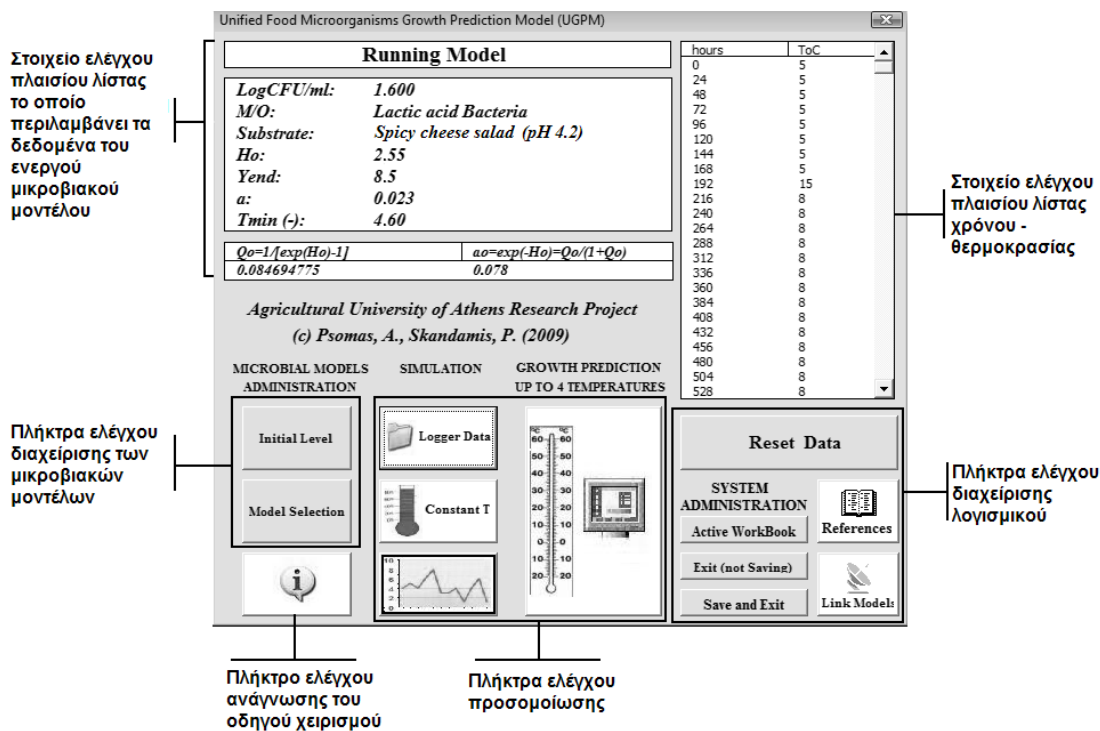
μικροοργανισμούς των τροφίμων. Οι τιμές των παραμέτρων των μοντέλων αυτών (Πίνακας 3.1) τροφοδοτούν τους συντελεστές των εξισώσεων όπως περιγράφονται από τους Baranyi et al. (1994) και Ratkowsky et al. (1982), οι οποίες συνιστούν τον κύριο μηχανισμό του λογισμικού, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη προσομοιώσεων της μικροβιακής ανάπτυξης σε δυναμικές ή στατικές συνθήκες θερμοκρασίας.

Τα μικροβιακά μοντέλα εισάγονται στη βάση δεδομένων του λογισμικού. Αποτελούνται από τα ακόλουθα πεδία, τα οποία χαρακτηρίζουν την απόκριση της μικροβιακής αύξησης σε ένα συγκεκριμένο είδος τροφίμου (Πίνακας 3.1): Μικροοργανισμός, υπόστρωμα, αρχική φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων ( $h_0$ , εξίσωση 3.3), ασυμπτωτική συγκέντρωση κυττάρων ( $Y_{end}$ ), μία ρυθμιστική τιμή  $\eta$  οποία εκφράζει την καταλληλότητα των κυττάρων να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον ( $0 < a < 1$ ), ελάχιστη θερμοκρασία ( $T_{min}$ ).

**Πίνακας 3.1.** Αντιπροσωπευτικά μοντέλα τύπου τετραγωνικής ρίζας για συγκεκριμένους συνδυασμούς τροφίμων-μικροοργανισμών, τα οποία περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του λογισμικού UGPM

Μικροοργανισμός	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	$h_0^a$	$Y_{end}^b$	$a^c$	$T_{min}^d$	Αναφορά
Γαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria)	Τυροσαλάτα (Cheese salad, pH 4.5)	2.37	8.5	0.019	-10.7	Manios et al. (2009)
	Τυροκαφετή (Spicy cheese salad, pH 4.2)	2.55	8.5	0.023	-4.60	Manios et al. (2009)
	Μαγειρεμένα αλλαντικά (Cooked cured meat products)	1.03	8.2	0.057	-6.72	Mataragas et al. (2006b)
	Μαγειρεμένο ζαμπόν (Cooked ham)	0.84	5.0	0.058	-1.03	Mataragas et al. (2006a)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Παραδοσιακή κρέμα γάλακτος	1.09 or 1.75	8.5	0.056	-6.23	Panagou & Nychas (2008)
	Μαλακό τυρί Φρέσκο γάλα	1.18 1.57	8.0 8.0	0.082 0.091	-1.64 -1.70	Fujikawa & Morozumi (2005)

<sup>a</sup>Παράμετρος  $\eta$  οποία αντιπροσωπεύει την αρχική φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, <sup>b</sup>Ασυμπτωτική συγκέντρωση των κυττάρων, <sup>c</sup>Αδιάστατος συντελεστής, <sup>d</sup>Θεωρητική ελάχιστη θερμοκρασία



**Εικόνα 3.2.** Περιγραφή της αρχικής UserForm του λογισμικού UGPM

Η εισαγωγή, διόρθωση και διαγραφή των μοντέλων αλλά και η εύρεση και επιλογή τους αντίστοιχα πραγματοποιείται από τη UserForm “View Models Header Data” η οποία περιλαμβάνει όλα τα πλήκτρα ελέγχου για την υλοποίηση των ανωτέρω διαδικασιών (**Εικόνα 3.3**).



**Εικόνα3.3.** Η UserForm “View Models Header Data” περιλαμβάνει όλες τις απαραίτητες λειτουργίες για τη διαχείριση των μικροβιακών μοντέλων της εσωτερικής βάσης δεδομένων του λογισμικού UGPM.

### 3.3.1. Διαχείριση της βάσης δεδομένων

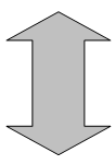
Η λειτουργία του λογισμικού η οποία αφορά στην εισαγωγή και τροποποίηση των μοντέλων περιορίζεται σε δύο συγκεκριμένες περιοχές του φύλλου δεδομένων “Sheet1”. Τα μικροβιακά μοντέλα είναι αποθηκευμένα στην κύρια περιοχή του φύλλου δεδομένων “Sheet1” η οποία επιτελεί ρόλο βάσης δεδομένων (database master area), έστω, “περιοχή Α” (**Εικόνα 3.4**). Όταν ένα μοντέλο επιλεγθεί ώστε να τροποποιηθεί, τότε αυτό αντιγράφεται από την “περιοχή Α” σε μία άλλη περιοχή του φύλλου δεδομένων “Sheet1” η οποία επιτελεί ρόλο προσωρινής περιοχής διαχείρισης της βάσης δεδομένων (database temporary area), έστω, “περιοχή Β”.

Εάν ο χρήστης επιλέξει να μεταβάλει τα δεδομένα ενός υπάρχοντος μοντέλου, τότε αφού αρχικά το αναζητήσει και το επιλέξει από τη βάση δεδομένων με τα διαθέσιμα εργαλεία που διαθέτει το λογισμικό για αυτήν τη διαδικασία, στη συνέχεια το επιλεγμένο μοντέλο (όλη η εγγραφή) αντιγράφεται από την “περιοχή Α” στην “περιοχή Β”. Μετά από τροποποίηση στα δεδομένα του μοντέλου με τα διαθέσιμα εργαλεία του λογισμικού, πραγματοποιείται αυτόματα διαγραφή του μοντέλου (όλη η εγγραφή) στην “περιοχή Α” ενώ το τροποποιημένο μοντέλο αντιγράφεται από την “περιοχή Β” στην πρώτη άδεια γραμμή της “περιοχής Α” αμέσως κάτω από το τελευταίο μοντέλο. Τελικά, η “περιοχή Α” (στην τελευταία γραμμή της οποίας περιλαμβάνεται το διορθωμένο μοντέλο) ταξινομείται αυτόματα με κριτήριο την ονομασία του μοντέλου, ενώ η “περιοχή Β” αδειάζει από τα δεδομένα. Αντίστοιχα πραγματοποιείται η καταχώρηση ενός νέου μοντέλου, όπου η εισαγωγή των δεδομένων του λαμβάνει χώρα απευθείας στην “περιοχή Β” ενώ στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε ανωτέρω.

Τα πλήκτρα ελέγχου της UserForm “View Models Header Data” και οι αντίστοιχες λειτουργίες διαχείρισης της μικροβιακής βάσης δεδομένων είναι (**Εικόνα 3.3**):

- (i) “Enter Microbial Model”: Εισαγωγή των τιμών ενός νέου μικροβιακού μοντέλου.
- (ii) “Update Model Data”: Τροποποίηση των τιμών ενός μικροβιακού μοντέλου.
- (iii) “Delete Model”: Διαγραφή του επιλεγμένου μοντέλου.





	A	B	C	D	E	F
1	INITIAL (STD) VALUES					
2	LogCFU/ml:	2,400	2,400			
3	M/O:	Lactic acid Bacteria	Lactic acid Bacteria			
4	Substrate:	Tyrokafteri	Tyrokafteri			
5	Ho:	2,55	2,55		Header Range: Row 10-500	
6	Yend:	8,5	8,5			
7	a:	0,023	0,023		D502=used row	
8	Tmin (-):	4,6	4,60			
9	KNOWN INITIAL VALUES/MO & SUBSTRATE LIBRARY (A11.D501)					
10	MICROORGANISMS	SUBSTRATE	Ho	Yend	a	Tmin
11	Lactic acid Bacteria	Tyrosalata	2,37	8,5	0,019	10,7
12	Lactic acid Bacteria	Tyrokafteri	2,55	8,5	0,023	4,6
13	Lactic acid Bacteria	Cooked cured meat prod	1,03	8,2	0,057	6,72
14	Listeria monocytogene	Mizithra	1,18	8	0,082	1,64
15	Listeria monocytogene	Cooked ham	0,84	5	0,058	1,03
16	Listeria monocytogene	Traditional milk cream	1,75	8,5	0,056	6,23
17	Listeria monocytogene	Traditional milk cream-av	1,09	8,5	0,056	6,23
18	Staphylococcus aureu	Fresh milk	1,57	8	0,091	-1,7

UserForms εισαγωγής  
και διόρθωσης  
μικροβιακών  
μοντέλων

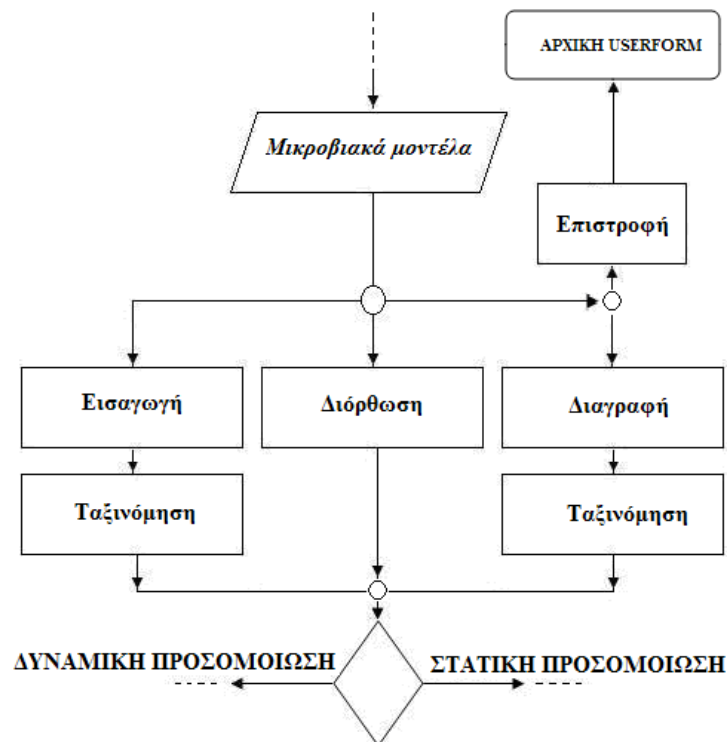
Sheet1:

Περιοχή δεδομένων  
ενεργού μοντέλου

Μόνιμη περιοχή  
αποθήκευσης  
δεδομένων των  
μικροβιακών  
μοντέλων

**Εικόνα 3.4.** Διασύνδεση των εργαλείων διαχείρισης των μικροβιακών μοντέλων με την περιοχή μόνιμης αποθήκευσής τους

- (iv) “Sort Models”: Ταξινόμηση των μικροβιακών μοντέλων.
- (v) “Select Model to Simulate”: Επιλογή ενός μοντέλου για έναρξη της προσομοίωσης (**Εικόνα 3.5**).



Εικόνα 3.5. Διαχείριση της βάσης δεδομένων των μικροβικών μοντέλων

Οι παράμετροι του επιλεγμένου μοντέλου μεταφέρονται σε συγκεκριμένα κελιά του φύλλου δεδομένων “Sheet1”, στην περιοχή των δεδομένων του ενεργού μοντέλου, αντικαθιστώντας τυχόν προηγούμενα δεδομένα (Εικόνα 3.2, 3.4).

Όταν τα δεδομένα ενός επιλεγμένου μικροβιακού μοντέλου μεταφέρονται στα αντίστοιχα κελιά της περιοχής του ενεργού μοντέλου, τότε λαμβάνει χώρα αυτόματος υπολογισμός των μεταβλητών  $Q_0^1$  και  $a_0^2$  (Εικόνα 3.2), σύμφωνα με τις εξισώσεις:

$$Q_0 = \frac{1}{e^{H_0} - 1} \quad (3.9)$$

**Απόδειξη 3.9:** Από την εξίσωση 3.3 προκύπτει ότι:

$$H_0 = \ln \frac{Q_0 + 1}{Q_0} \Rightarrow e^{H_0} = \frac{Q_0 + 1}{Q_0} \Rightarrow e^{H_0} \cdot Q_0 = Q_0 + 1 \Rightarrow Q_0(1 - e^{H_0}) = -1 \Rightarrow$$

$$Q_0 = -\frac{1}{1 - e^{H_0}} \Rightarrow Q_0 = \frac{1}{e^{H_0} - 1}$$

<sup>1</sup> ετοιμότητα των κυττάρων να αρχίσουν να αυξάνονται σε ένα νέο περιβάλλον.

<sup>2</sup> αναλογία των κυττάρων τα οποία αναπτύσσονται στο νέο περιβάλλον με τον ίδιο ρυθμό όπως στο προηγούμενο (Baranyi & Roberts, 1994, Baranyi et al., 1995).

$$a_0 = e^{-H_0} = \frac{Q_0}{1+Q_0} \quad (3.10)$$

**Απόδειξη 3.10:** Από την εξίσωση 3.3 προκύπτει ότι:

$$H_0 = \ln \frac{Q_0 + 1}{Q_0} \Rightarrow e^{H_0} = \frac{Q_0 + 1}{Q_0} \Rightarrow \frac{1}{e^{H_0}} = \frac{Q_0}{1+Q_0} \Rightarrow a_0 = e^{-H_0} = \frac{Q_0}{1+Q_0}$$

#### 3.4. Προσαρμογή του διαφορικού μοντέλου στο λογισμικό

Το διαφορικό μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994) το οποίο συνιστά τον κύριο μηχανισμό της προσομοίωσης της μικροβιακής αύξησης έχει προγραμματιστεί στο λογισμικό UGPM. Οι Baranyi et al. (1995) έδειξαν ότι η διαφορική εξίσωση 3.1 είναι έγκυρη κάτω από μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι Baranyi & Roberts (2000) υποστηρίζουν ότι η επιλυμένη μορφή του διαφορικού τους μοντέλου (εξίσωση 3.6) δεν είναι έγκυρη υπό μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες ενώ η προσομοίωση στον H/Y η οποία στηρίζεται σε αυτή την εξίσωση αποτελεί μόνο προσέγγιση της πρόβλεψης. Το μοντέλο ανάπτυξης σε δυναμικά μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα πρέπει να εφαρμοστεί σε διαφορική μορφή. Για το λόγο αυτό, προγραμματίστηκε το σύστημα διαφορικών εξισώσεων (εξισώσεις 3.4 και 3.5) στο λογισμικό UGPM με κατάλληλες προσαρμογές έτσι ώστε να αποφευχθούν πιθανά σφάλματα κατά την εκτέλεση του προγράμματος εξαιτίας της υπερχείλισης δεδομένων (overflow) (Baranyi & Roberts, 2000).

Δυναμικά δεδομένα χρόνου-θερμοκρασίας εισάγονται στις δύο πρώτες στήλες του φύλλου δεδομένων “Sheet2” το οποίο έχει ειδικά οριστεί για τους υπολογισμούς της προσομοίωσης (αριθμητική προσομοίωση). Οι εξισώσεις περιλαμβάνουν μεταβλητές και συντελεστές που λαμβάνουν τα δεδομένα τους:

- (i) Από τις παραμέτρους του ενεργού μικροβιακού μοντέλου.
- (ii) Από τα εισερχόμενα δυναμικά δεδομένα χρόνου-θερμοκρασίας ή τα στατικά δεδομένα.
- (iii) Από ανεξάρτητες εξισώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό μεταβλητών του διαφορικού συστήματος (εξισώσεις 3.9 και 3.10).

Οι εξισώσεις, ειδικά εκείνες οι οποίες περιλαμβάνουν πολλές μεταβλητές και εκθετικούς παράγοντες, είναι δυνατό να παράγουν δεδομένα με σφάλματα εξαιτίας της υπερχείλισης δεδομένων. Είναι δύσκολο να ελεγχθεί εάν τα αποτελέσματα μίας

διαφορικής εξίσωσης περιορίζονται εντός της αναμενόμενης τάξης μεγέθους, πόσο μάλλον εντός του αναμενόμενου εύρους τιμών.

Σύμφωνα με τους Baranyi & Roberts (2000), είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα των υπολογισμών δεν θα υπερβαίνουν την αναμενόμενη τάξη μεγέθους. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό στο λογισμικό UGPM, έλαβε χώρα μετασχηματισμός των εξισώσεων, οι οποίες αποτελούνται από πολλές μεταβλητές και εκθετικούς παράγοντες, σε εξισώσεις με περιορισμένο αριθμό μεταβλητών. Οι μεταβλητές κατανεμήθηκαν σε απλούστερες εξισώσεις ενώ οι ιδιότητες των μεταβλητών ορίστηκαν αυστηρά. Κατά συνέπεια, η τάξη μεγέθους των μερικών αποτελεσμάτων κάθε εξίσωσης τέθηκε υπό έλεγχο πριν από την εισαγωγή τους στην τελική εξίσωση.

Οι μεταβλητές οι οποίες ορίζουν το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του πληθυσμού των μικροοργανισμών  $\mu_{\max}$  καθώς και την κρίσιμη ουσία που πρέπει να παραχθεί από τα κύτταρα ώστε να εξέλθουν της φάσης προσαρμογής και να εισέλθουν σε εκθετική φάση ανάπτυξης  $Q(t)$ , λαμβάνουν τιμές από την εξίσωση που περιγράφει την εξάρτηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τη θερμοκρασία καθώς και της κρίσιμης ουσίας από το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.

Δηλαδή,

$$\mu_{\max} = \left\{ \alpha \cdot [T^{\circ}C - (-T_{\min})] \right\}^2 \ln(10) \quad (3.11)$$

και

$$Q(t) = Q(t)_{\text{previous value}} + \frac{|\mu \max_{\text{previous value}} + \mu \max_{\text{next value}}|}{2} \cdot (Time(d) - Time(d)_{\text{previous value}}) \quad (3.12)$$

όπου:

previous value /nextvalue: Η εξίσωση λαμβάνει την τιμή της συγκεκριμένης μεταβλητής από το αντίστοιχο πεδίο το οποίο ανήκει στην προηγούμενη (previous value) ή στην επόμενη γραμμή (next value) σε σχέση με αυτήν στην οποία λαμβάνει χώρα η εκτέλεση της εξίσωσης κάθε χρονική στιγμή. Ο δείκτης previous/next είναι

έναν χωρικό δείκτη ο οποίος χαρακτηρίζει μία συγκεκριμένη μεθοδολογία επίλυσης των διαφορικών εξισώσεων σε εφαρμογές πληροφορικής (Psomas et al., 2011).

Time (d): Ο χρόνος σε ημέρες.

Οι συνθήκες επίλυσης της διαφορικής εξίσωσης είναι οι εξής:

$$\begin{cases} \mu_{\max}(\text{previous value}) < \mu_{\max} < \mu_{\max}(\text{next value}) : \mu_{\max}(\text{previous value}), \mu_{\max}(\text{next value}) \in \mu_{\max} \text{ neighbourhood} \\ \text{Time}(d)_{(\text{previous value})} < \text{Time}(d) : \text{Time}(d)_{(\text{previous value})} \in \text{Time}(d) \text{ neighbourhood} \end{cases}$$

Η αρχική τιμή της συγκέντρωσης της κρίσιμης ουσίας υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$Q(t) = \ln(Q_0) \quad (3.13)$$

Η μεταβλητή του χρόνου (σε ημέρες) υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\text{Time}(d) = \frac{\text{Time}(h)}{24} \quad (3.14)$$

όπου  $\text{Time}(h)$  είναι η τιμή του χρόνου σε ώρες.

Η τελική συγκέντρωση (πυκνότητα πληθυσμού) των μικροοργανισμών είναι η μικρότερη τιμή μεταξύ της εξίσωσης υπολογισμού της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών και της απόλυτης τιμής της ασυμπτωτικής συγκέντρωσης των κυττάρων ( $|Y_{end}|$ ).

$$\text{LogCFU} / \text{ml} = \text{LogCFU} / \text{ml}_{(\text{previous value})} + \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \cdot (1 - 10^{-K}) \cdot M \cdot S \quad (3.15)$$

όπου,

$$K = |\text{LogCFU} / \text{ml} \cdot (\text{previous value}) - Y_{end}| \quad (3.15a)$$

$$M = \frac{\mu_{\max_{\text{next value}}} + \mu_{\max_{\text{previous value}}}}{2} \quad (3.15b)$$

$$S = \frac{\text{Time}(d) - \text{Time}(d)_{\text{previous value}}}{\ln(10)} \quad (3.15c)$$

Οι συνθήκες επίλυσης της διαφορικής εξίσωσης είναι οι εξής:

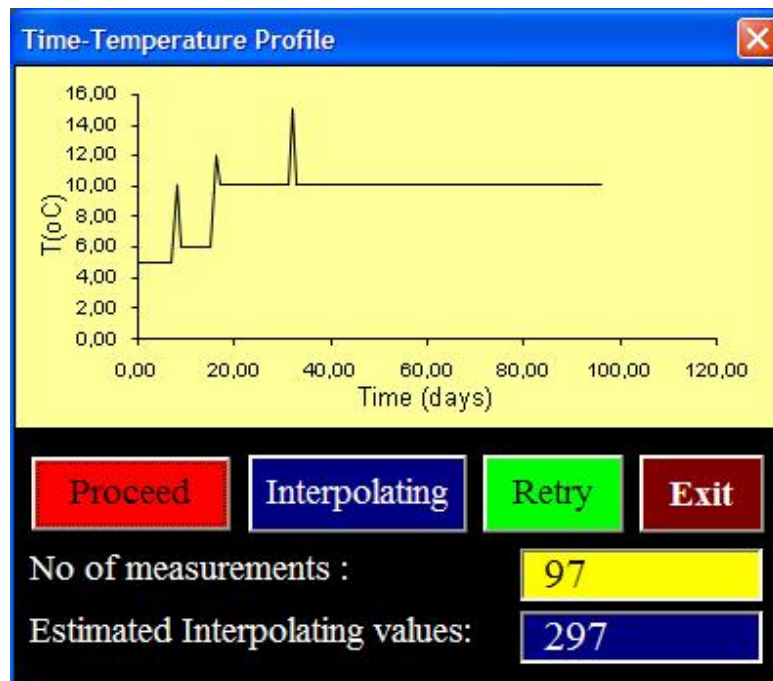
$$\begin{cases} \text{LogCFU} / \text{ml}_{(\text{previous value})} < \text{LogCFU} / \text{ml} : \text{LogCFU} / \text{ml}_{(\text{previous value})} \in \text{LogCFU} / \text{ml} \text{ neighbourhood} \\ \mu_{\text{max} (\text{previous value})} < \mu_{\text{max}} < \mu_{\text{max} (\text{next value})} : \mu_{\text{max} (\text{previous value})}, \mu_{\text{max} (\text{next value})} \in \mu_{\text{max}} \text{ neighbourhood} \end{cases}$$

### 3.5. Πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας

Τα αρχεία δυναμικών δεδομένων μορφής \*.xls τα οποία περιλαμβάνουν τους χρόνους λήψης των μετρήσεων (σε ώρες) με τις αντίστοιχες τιμές θερμοκρασίας είναι δυνατό να εισαχθούν στο λογισμικό από ένα φάκελο (Folder) ο οποίος ονομάζεται “MODEL FILES”. Αυτός περιλαμβάνει μόνο αρχεία μετρήσεων χρόνου - θερμοκρασίας (data logger files). Αφότου εισαχθούν τα δεδομένα του αρχείου στην πρώτη και δεύτερη στήλη του φύλλου δεδομένων “Sheet2” του λογισμικού, τότε εμφανίζεται αυτόματα η UserForm “Time-Temperature Profile” η οποία περιλαμβάνει ένα στοιχείο ελέγχου εικόνας (Image control) στο οποίο απεικονίζεται γραφικά το θερμοκρασιακό προφίλ του επιλεγμένου αρχείου. Το προφίλ αυτό αντιστοιχεί στη συνάρτηση  $T=f(t)$ , όπου  $T$  είναι η θερμοκρασία ( $^{\circ}\text{C}$ ) και  $t$  είναι ο χρόνος σε ημέρες.

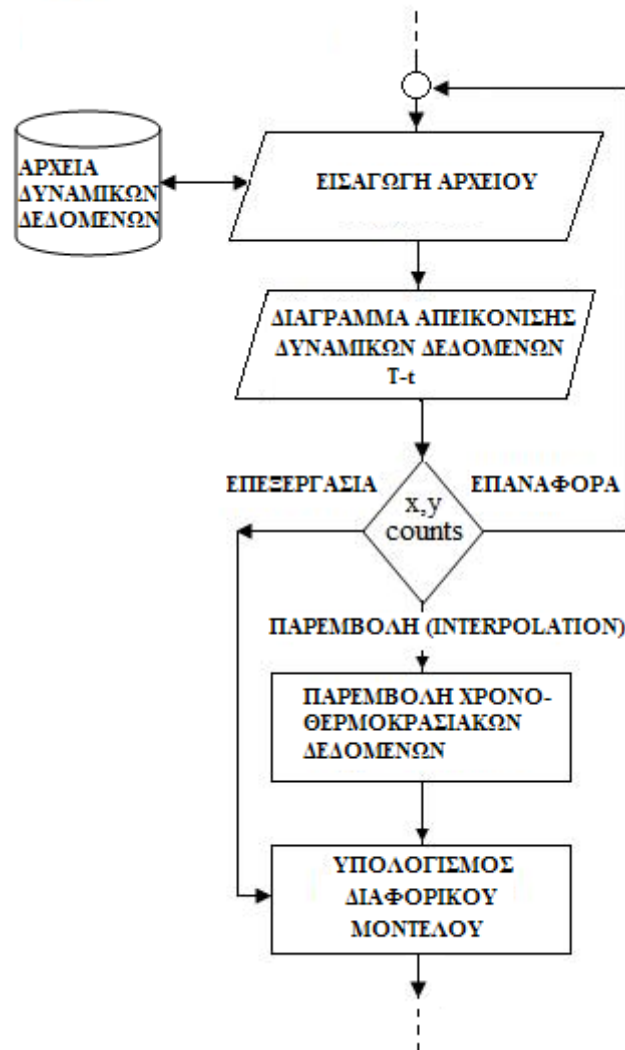
Στην ίδια UserForm περιλαμβάνεται η δυνατότητα επιλογής: (i) της διατήρησης των δεδομένων στη μορφή με την οποία εισήχθησαν, (ii) της παρεμβολής (interpolation) 200 επιπλέον δεδομένων χρόνου-θερμοκρασίας ( $t, T$ ) τα οποία προέρχονται από υπολογισμούς (data generation) με σκοπό να αυξηθεί το αρχικό πλήθος τους ώστε να καλυφθούν ομαλά τα κενά μεταξύ των μετρήσεων και να βελτιωθεί η ακρίβεια της προσομοίωσης. Στο χρήστη παρέχεται η δυνατότητα της πληροφόρησης του συνολικού αριθμού των μετρήσεων που περιλαμβάνονται στο αρχείο (στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας: “No of measurements”), ώστε αυτός να αποφασίσει εάν επιθυμεί να παρεμβάλλει νέα δεδομένα βελτιώνοντας την ακρίβεια της προσομοίωσης ή να αγνοήσει τη δυνατότητα της παρεμβολής νέων δεδομένων εάν κρίνει ότι ο αριθμός των μετρήσεων είναι ικανοποιητικά μεγάλος (στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας: “Estimated Interpolating values”). Οι διαδικασίες αυτές εκτελούνται με τα αντίστοιχα πλήκτρα ελέγχου “Interpolating” για παρεμβολή δεδομένων και “Proceed” για άμεση εκτέλεση της προσομοίωσης χωρίς παρεμβολή. Εάν ο χρήστης βλέποντας το θερμοκρασιακό προφίλ των δεδομένων του αρχείου που

επέλεξε διαπιστώσει ότι επιθυμεί να εισάγει ένα διαφορετικό αρχείο, τότε πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “Retry”, επιστρέφει στα περιεχόμενα αρχεία του φακέλου “MODEL FILES”. Με το πλήκτρο ελέγχου “Exit” ακυρώνεται η διαδικασία και πραγματοποιείται επιστροφή στην αρχική UserForm του λογισμικού (**Εικόνα 3.6**).



**Εικόνα 3.6.** Θερμοκρασιακό προφίλ των δυναμικών δεδομένων του επιλεγμένου αρχείου. Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να επιλέξει εάν θα εκτελέσει την προσομοίωση με τα δεδομένα του αρχείου ή εάν θα κάνει παρεμβολή δεδομένων.

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “Proceed ή Interpolating” πραγματοποιείται η αριθμητική προσομοίωση. Αρχικά, τα δεδομένα χρόνου-θερμοκρασίας εμφανίζονται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας δυναμικών ή στατικών δεδομένων της αρχικής UserForm. Ο χρόνος εκφράζεται σε ώρες και η θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η επίλυση των διαφορικών εξισώσεων των Baranyi & Roberts (1994), οι οποίες συνιστούν τον κύριο μηχανισμό του λογισμικού, στα φύλλα δεδομένων τα οποία είναι ορισμένα για το σκοπό αυτό (**Εικόνα 3.7**).



**Εικόνα 3.7.** Διάγραμμα της προσομοίωσης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας

Τα δεδομένα της προσομοίωσης αφορούν στις μεταβολές της πυκνότητας της μικροβιακής ανάπτυξης με το χρόνο και τη θερμοκρασία (**Εικόνα 3.8**). Με το πλήκτρο ελέγχου “Plot” εμφανίζεται η γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, υπό τις συνθήκες οι οποίες περιλαμβάνονται στο ενεργό μοντέλο, με τη μορφή σιγμοειδούς καμπύλης η οποία αναπτύσσεται σε εξάρτηση με τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις σε τριπλό σύστημα αξόνων απόκρισης-χρόνου-θερμοκρασίας. Ο άξονας του χρόνου (x) αποτελεί κοινό άξονα τόσο για το σύστημα αξόνων χρόνου (σε ημέρες) - συγκέντρωσης των μικροοργανισμών,  $\log_{10}\text{CFU/ml}$  ( $y_1$ ) όσο και για το σύστημα αξόνων χρόνου (σε ημέρες) – θερμοκρασίας ( $y_2$ ) (**Εικόνα 3.8**).



### 3.6. Μηχανισμός παρεμβολής των δεδομένων χρόνου-θερμοκρασίας

Εφαρμόζεται η μέθοδος της γραμμικής παρεμβολής στο δισδιάστατο πίνακα δεδομένων χρόνου-θερμοκρασίας.

Αρχή λειτουργίας: Σύμφωνα με τη μέθοδο της γραμμικής παρεμβολής (Billo, 2001), για μία μεταβλητή  $x$  η οποία έχει δεδομένες τιμές  $x_{\min}$  (ελάχιστη τιμή της μεταβλητής  $x$ ) και  $x_{\max}$  (αντίστοιχη μέγιστη τιμή), το βήμα κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η αύξηση της μεταβλητής  $x$  ορίζεται από τη συνάρτηση:

$$S(x) = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{i_c}, i \neq 0 \quad (3.16)$$

και  $x_{\max} > x_{\min}$

όπου  $i_c$  είναι μία μεταβλητή η οποία εκφράζει το μετρητή των παρεμβαλλόμενων τιμών, λαμβάνοντας τιμές από 0 έως 10000.

Τότε τα δεδομένα τα οποία παρεμβάλλονται μεταξύ των τιμών του κλειστού διαστήματος  $[x_{\min}, x_{\max}]$  για τη μονοδιάστατη μεταβλητή  $x$ , είναι:

$x_{\min}$

$$x_1 = x_{\min} + S(x)$$

$$x_2 = x_1 + S(x)$$

.

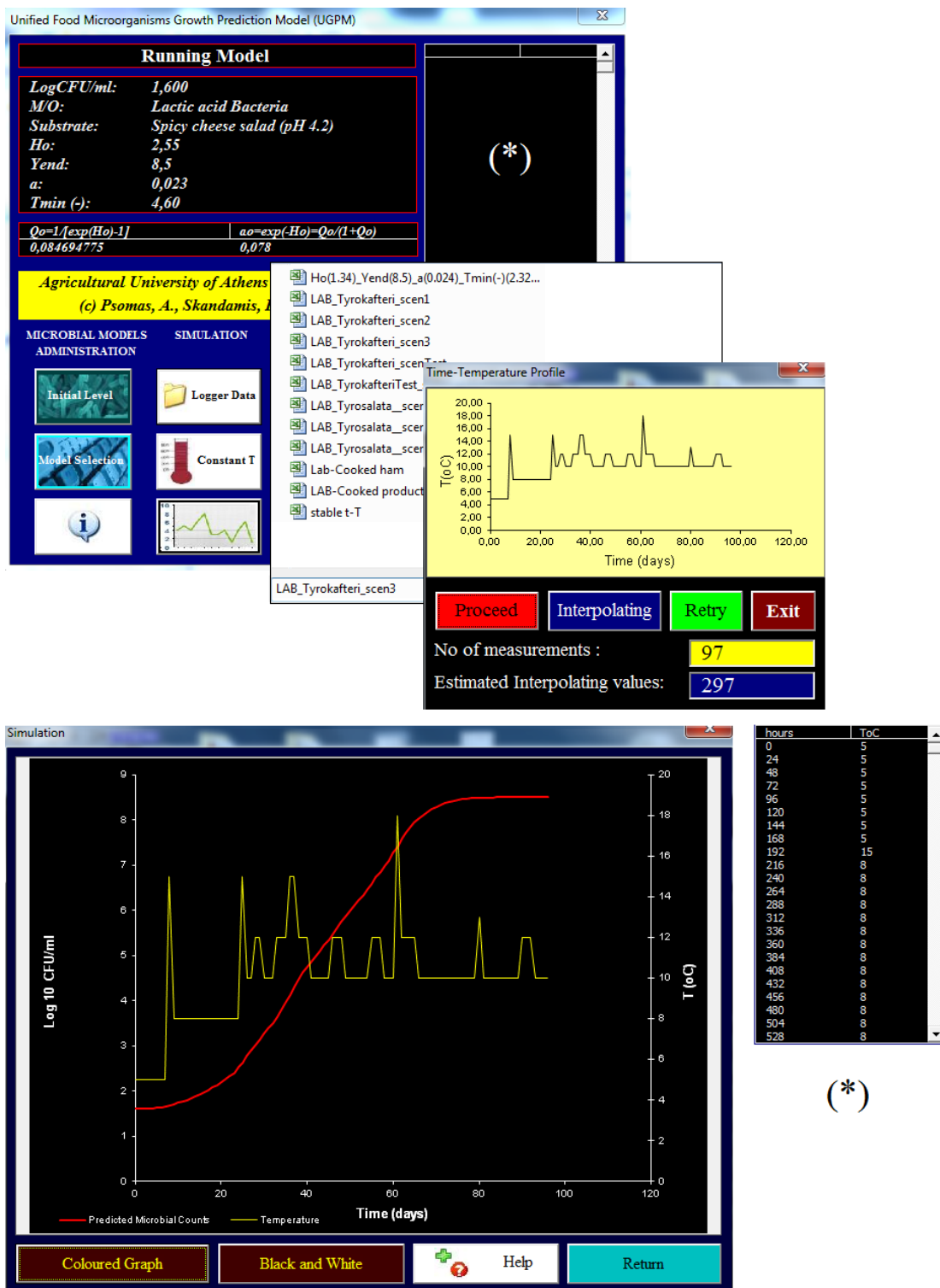
..

...

$$x_{\max} = (x_{\max} - 1) + S(x)$$

Εφαρμογή στο λογισμικό UGPM: Η **εξίσωση 3.16** εφαρμόζεται στον κώδικα του λογισμικού UGPM ως εξής:

$$step = \frac{Maxval - Minval}{200} \quad (3.17)$$



Εικόνα 3.8. Προσομοίωση υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας: Αντιπροσωπευτική καμπύλη ανάπτυξης για το μικροβιακό μοντέλο “Lactic acid bacteria in Spicy cheese salad (pH 4.2)

όπου  $Minval$  είναι η αρχική τιμή του χρόνου,  $Maxval$  είναι η αντίστοιχη μέγιστη τιμή και η σταθερή τιμή 200 εκφράζει τον αριθμό των παρεμβολών οι οποίες πρόκειται να πραγματοποιηθούν μεταξύ των δύο τιμών.

Για κάθε βήμα χρόνου, η αύξηση της θερμοκρασίας ( $T_{int}$ ) ορίζεται από την εξίσωση:

$$T_{int} = step \frac{T_f - T_i}{t_f - t_i}, \quad t_f > t_i \quad (3.18)$$

όπου  $i$  και  $f$  είναι οι αρχικές και τελικές τιμές για κάθε βήμα.

Για ένα προφίλ χρόνου-θερμοκρασίας με τις συντεταγμένες  $\{(0,5), (5,6), \dots, (40,5)\}$  το

βήμα της αύξησης του χρόνου είναι:  $\frac{40}{200} = 0.2$ .

Η τιμή της θερμοκρασίας για το πρώτο βήμα του χρόνου μπορεί να υπολογισθεί ως εξής:

$$\{(0.5), (5.6)\}: T_{int} = step \frac{T_f - T_i}{t_f - t_i} = 0,2t \cdot \frac{(6-5)^\circ C}{(5-0) \cdot t} \Rightarrow T_{int} = 0.04^\circ C \quad (3.19)$$

Το παρεμβαλλόμενο ζεύγος τιμών είναι:  $0,2t \rightarrow 5^\circ C + 0.04^\circ C = (0.2, 5.04)$

### 3.6.1. Μελέτη περίπτωσης: Πρόβλεψη της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων στην τυροσαλάτα “Τυροκαφετή”

Τα γαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria) αποτελούν τους εξειδικευμένους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς σε μία παραδοσιακή Ελληνική τυροσαλάτα η οποία ονομάζεται “Τυροκαφετή” (Manios et al., 2009). Η μελέτη περίπτωσης αφορά στην προσομοίωση της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σύμφωνα με το μοντέλο των Manios et al. (2009). Το αρχικό επίπεδο της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών ορίστηκε στα  $1.6 \log_{10} CFU/ml$  (πλήκτρο ελέγχου: Initial level).

Οι παράμετροι ανάπτυξης του επιλεγμένου μοντέλου είναι (πλήκτρο ελέγχου: Model Selection):

$$h_0 = 2.55$$

$$Y_{end} = 8.5$$

$$a = 0.023$$

$$T_{min} = -4.60$$

Μετά από την ενεργοποίηση του μοντέλου οι αλγεβρικές εξισώσεις υπολογισμού των αρχικών τιμών των μεταβλητών  $Q_0$  και  $a_0$  έδωσαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

$$Q_0=0.085$$

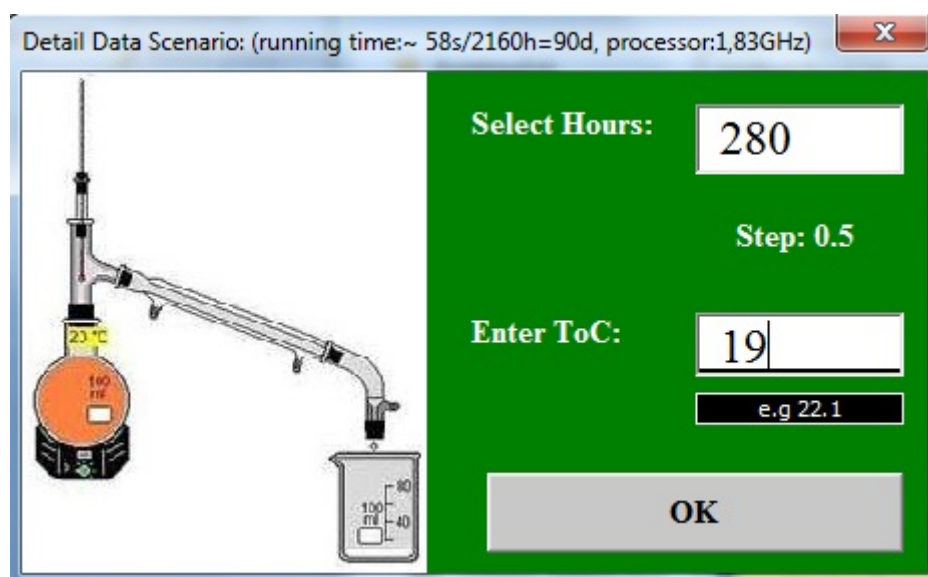
$$a_0=0.078$$

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “Logger Data” επιλέγεται το εξωτερικό αρχείο “GPF3.xls” που περιλαμβάνει δεδομένα μετρήσεων χρόνου (1<sup>η</sup> στήλη) και θερμοκρασίας (2<sup>η</sup> στήλη). Η επιλογή γίνεται από λίστα αρχείων που εμπεριέχονται σε συγκεκριμένη περιοχή του δίσκου του H/Y (C:\MDL\MODELFILES). Η επιλογή πραγματοποιείται με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “LoggerData”. Στη συνέχεια, εμφανίζονται τόσο το χρονοθερμοκρασιακό προφίλ του επιλεγμένου αρχείου όσο και άλλα πληροφοριακά στοιχεία τα οποία αφορούν τόσο στον αριθμό των πραγματικών μετρήσεων (97), όσο και στον αριθμό των μετρήσεων οι οποίες περιλαμβάνουν τις αντίστοιχες πραγματικές συν τις παρεμβαλλόμενες τιμές (297). Η επιλογή που έγινε αφορούσε στην εκτέλεση της προσομοίωσης με παρεμβαλλόμενες τιμές (πλήκτρο ελέγχου “interpolating”) ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα της γραφικής προσομοίωσης (smoothed curve). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις εξισώσεις παρεμβολής (εξισώσεις 3.17, 3.18, 3.19) αναπτύχθηκαν στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας χρόνου-θερμοκρασίας της αρχικής UserForm (Εικόνα 3.8). Η αριθμητική προσομοίωση αναπτύσσεται από τον κώδικα VBA στα φύλλα δεδομένων του περιβάλλοντος Excel που λειτουργεί στο υπόβαθρο του λογισμικού σε καθεστώς απόκρυψης. Η γραφική προσομοίωση μπορεί να απεικονισθεί είτε σε έγχρωμη είτε σε ασπρόμαυρη μορφή αντίστοιχα. Στην εικόνα 3.8 εμφανίζεται η γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων με τη μορφή σιγμοειδούς καμπύλης ανάπτυξης σε απόκριση με τα δεδομένα χρόνου θερμοκρασίας σε τριπλό σύστημα αξόνων απόκρισης-χρόνου-θερμοκρασίας. Παρέχει στο χρήστη πολύτιμη πληροφόρηση σχετικά με την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών στην ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων στη σαλάτα “Τυροκαφετή”. Αυτή η πληροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του επιπέδου αλλοίωσης στην Τυροκαφετή εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών σε συνθήκες αποθήκευσης και άρα για το χρόνο διατήρησης του προϊόντος.

### 3.7. Πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπό στατικές συνθήκες θερμοκρασίας

Ο χρήστης μπορεί να ορίσει τη μέγιστη τιμή του χρόνου (σε ώρες) και τη θερμοκρασία στα αντίστοιχα στοιχεία εισαγωγής δεδομένων της UserForm “Detail Data Scenario” έτσι ώστε να αναπτυχθούν τα δεδομένα της αριθμητικής προσομοίωσης για στατικές συνθήκες χρόνου-θερμοκρασίας. Οι τιμές του χρόνου (t) αυξάνονται (με βήμα 0.5) έως τη μέγιστη τιμή, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της θερμοκρασίας έχουν τη σταθερή τιμή που ορίστηκε από το χρήστη. Για μέγιστη τιμή χρόνου 2160 ωρών (90 ημέρες), η γραφική απεικόνιση των χρονοθερμοκρασιακών δεδομένων στο αντίστοιχο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας της αρχικής UserForm απαιτεί χρονικό διάστημα 1.05 λεπτών της ώρας όταν η συχνότητα λειτουργίας του μικροεπεξεργαστή του H/Y στον οποίο εκτελείται η προσομοίωση είναι 1.83GHz.

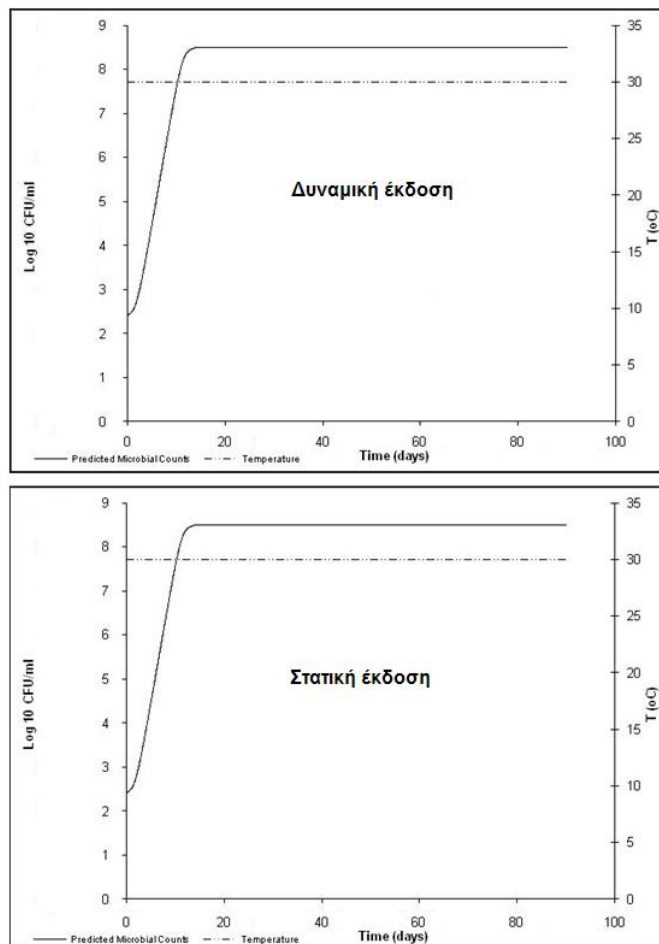
Κατά τρόπο ανάλογο όπως και στην προσομοίωση υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας, η γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών έχει τη μορφή σιγμοειδούς καμπύλης σε απόκριση με τα δεδομένα χρόνου θερμοκρασίας. Οι γραφικές παραστάσεις απεικονίζονται σε τριπλό σύστημα αξόνων απόκρισης-χρόνου-θερμοκρασίας, η θερμοκρασία όμως στην περίπτωση αυτή εμφανίζεται με ευθεία γραμμή, παράλληλη στον οριζόντιο άξονα, αφού είναι σταθερή (**Εικόνα 3.9**).



**Εικόνα 3.9.** UserForm εισαγωγής δεδομένων για την εκτέλεση της προσομοίωσης υπό στατικές συνθήκες θερμοκρασίας.

### 3.7.1. Η έκδοση της στατικής προσομοίωσης αποτελεί υποπερίπτωση της αντίστοιχης δυναμικής

Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση ότι η στατική έκδοση του λογισμικού UGPM αποτελεί ειδική περίπτωση της αντίστοιχης δυναμικής, σε ένα αρχείο Excel εισήχθησαν: (i) Στην πρώτη στήλη οι τιμές του χρόνου οι οποίες αυξάνονταν ομαλά από 0 έως 2160 ώρες (90 ημέρες) με βήμα 0.5 h. (ii) Στη δεύτερη στήλη, σταθερές τιμές θερμοκρασίας 30°C οι οποίες αντιστοιχούσαν στις τιμές της πρώτης στήλης. Το αρχείο αυτό ονομάστηκε A1 και τοποθετήθηκε στο φάκελο MODEL FILES. Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε το μοντέλο “lactic acid bacteria/Spicy cheese salad (pH 4.2) (Πίνακας 1). Κατόπιν εισήχθη το αρχείο



**Εικόνα 3.10.** Η προσομοίωση υπό στατικές συνθήκες αποτελεί υποπερίπτωση της προσομοίωσης υπό δυναμικές συνθήκες.

A1 στο λογισμικό μέσω της διαδικασίας της προσομοίωσης υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας. Στη συνέχεια συγκρίθηκε η γραφική προσομοίωση της πυκνότητας του πληθυσμού των μικροοργανισμών με την αντίστοιχη η οποία προέκυψε από την προσομοίωση υπό στατικές συνθήκες θερμοκρασίας. Οι δύο γραφικές παραστάσεις ήταν ακριβώς ίδιες επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η στατική προσομοίωση αποτελεί υποπερίπτωση της αντίστοιχης δυναμικής (Εικόνα 3.10). (3.20)

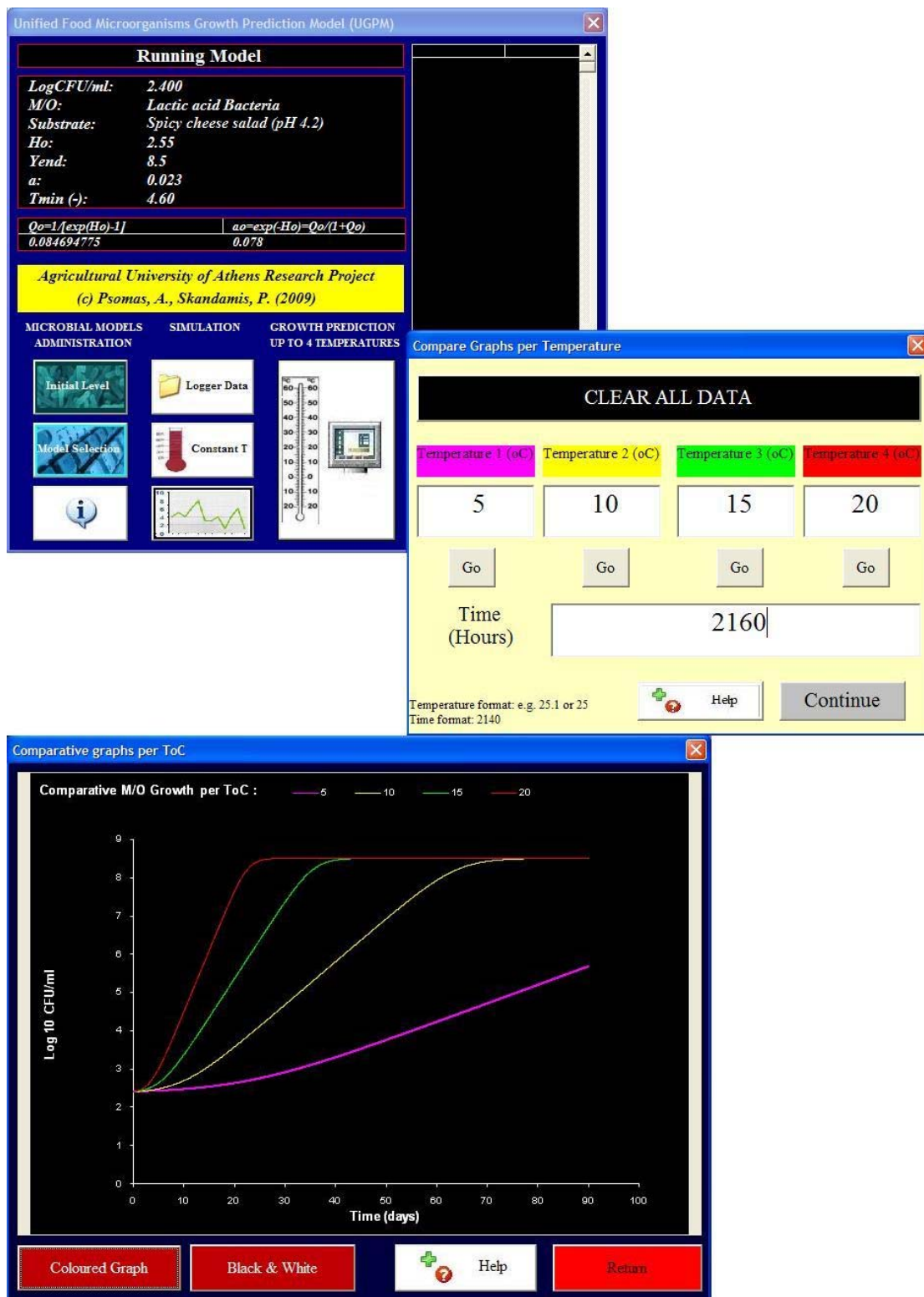
### 3.8. Συγκριτικές προβλέψεις μέχρι 4 διαφορετικές θερμοκρασίες

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “GROWTH PREDICTION UP TO 4 TEMPERATURES” της αρχικής UserForm του λογισμικού UGPM, εμφανίζεται η UserForm εισαγωγής δεδομένων “Compare Graphs per Temperature” όπου ο χρήστης είναι δυνατό να εισάγει μέχρι 4 διαφορετικές θερμοκρασίες για μία μέγιστη τιμή χρόνου αποθήκευσης (σε ώρες). Το αποτέλεσμα είναι η ταυτόχρονη γραφική απεικόνιση ( $\text{Log}_{10}\text{CFU/ml}$  vs. time [days]) μέχρι 4 σιγμοειδών καμπυλών ανάπτυξης των μικροοργανισμών οι οποίες εκφράζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις θερμοκρασίες αυτές σύμφωνα με τις συνθήκες που υπαγορεύονται από το ενεργό μοντέλο (Εικόνα 3.11).

#### 3.8.1. Μελέτη περίπτωσης 2: Συγκριτική πρόβλεψη της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων στην τυροσαλάτα “Τυροκαφετή”

Χαρακτηριστική μελέτη περίπτωσης αφορά η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων στην Τυροκαφετή όταν το αρχικό επίπεδο των μικροοργανισμών ( $\text{Log}_{10}\text{CFU/ml}$ ) ορίζεται στην τιμή 2.4. Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “GROWTH PREDICTION UP TO 4 TEMPERATURES”, εισάγονται μέχρι 4 διαφορετικές θερμοκρασίες για ένα συγκεκριμένο αριθμό ωρών ώστε να αναπτυχθεί γραφική προσομοίωση για την εκτίμηση των πιθανών κινδύνων κατά τις διαδικασίες διαχείρισης των τροφίμων στις θερμοκρασίες αυτές.

Για παράδειγμα, εισάγονται οι ακόλουθες τιμές θερμοκρασίας ( $^{\circ}\text{C}$ ): 5, 10, 15, 20 ενώ η μέγιστη τιμή του χρόνου είναι 2160 ώρες. Κάθε ζεύγος τιμών (5, 2160), (10, 2160), (15, 2160), (20, 2160) ενεργοποιείται ξεχωριστά πατώντας το αντίστοιχο πλήκτρο ελέγχου “GO”. Κάθε ζεύγος τιμών αντιπροσωπεύεται με τη μορφή σιγμοειδούς καμπύλης η οποία εκφράζει την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων σε 2160 ώρες στη συγκεκριμένη θερμοκρασία. Μέχρι 4 σιγμοειδείς καμπύλες μπορούν να απεικονιστούν σε έγχρωμη ή ασπρόμαυρη μορφή, στον ίδιο χώρο γραφήματος (Εικόνα 3.11).



**Εικόνα 3.11.** GROWTH PREDICTION UP TO 4 TEMPERATURES: Σύγκριση προβλέψεων για τις θερμοκρασίες ανάπτυξης του μικροοργανισμού: Lactic acid bacteria, 5, 10, 15 και 20°C για μέγιστη τιμή χρόνου 2160 ώρες όταν το ενεργό μοντέλο είναι το : Lactic acid bacteria in Spicy cheese salad, pH 4.2 ('Tyrokafteri').



### 3.9. Επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου “UGPM”

Η επικύρωση της ορθής λειτουργίας του λογισμικού “UGPM” έγινε σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση περιελάμβανε τον έλεγχο της λειτουργίας του λογισμικού και την αντιπαραβολή των παραγόμενων διαγραμμάτων με αντίστοιχα τα οποία εμπεριέχονται στις δημοσιευμένες εργασίες.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το διάγραμμα της εργασίας των Manios et al., 2009 με τίτλο “Field Validation of Predictive Models for the Growth of Lactic Acid Bacteria in Acidic Cheese-Based Greek Appetizers” (Fig. 6a). Με αφετηρία εκείνο το διάγραμμα, εκτιμήθηκε η τροχιά της καμπύλης ανάπτυξης στο διάγραμμα που αναπτύχθηκε από το λογισμικό “UGPM”. Από γνωστά σημεία του άξονα y, φέρονται ευθείες παράλληλες προς τον άξονα x. Τα σημεία στα οποία οι ευθείες αυτές τέμνουν τη σιγμοειδή καμπύλη προβάλλονται στον άξονα x. Στη συνέχεια εφαρμόζεται η ίδια διαδικασία στο διάγραμμα που προκύπτει από το λογισμικό “UGPM” και παρατηρείται ο βαθμός απόκλισης. Εάν η τάξη μεγέθους της απόκλισης είναι μικρή τότε θεωρείται ότι το διάγραμμα που προέκυψε με τα δεδομένα της εκτίμησης είναι σωστό. Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την απόκλιση είναι η εκτίμηση των σημείων επί χάρτου σύμφωνα με την ανωτέρω μεθοδολογία. Επειδή όμως η απόκλιση αυτή είναι πολύ μικρή, θεωρείται ότι δεν υπάρχει σφάλμα κατά τη διαδικασία. Οι προβλέψεις οι οποίες προκύπτουν από το λογισμικό “UGPM” προσεγγίζουν ικανοποιητικά τις αντίστοιχες προβλέψεις που προέρχονται από την ανάλυση των εικόνων της εργασίας (**Εικόνα 3.12**).

Η δεύτερη φάση περιελάμβανε την ανάρτηση του λογισμικού στο διαδίκτυο, τη συγγραφή άρθρου και την αποστολή του στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό “Computers and Electronics in Agriculture”. Οι κριτές μετέφεραν το λογισμικό από τη συγκεκριμένη διεύθυνση του διαδικτύου στον ηλεκτρονικό τους υπολογιστή και έκαναν ενδελεχή έλεγχο του λογισμικού πριν εγκρίνουν τη δημοσίευσή του. Χαρακτηριστική είναι η φράση ενός κριτή στα σχόλιά του προς τους συγγραφείς: “*I have downloaded the software ... I had some difficulties opening the data, until I followed the download instructions exactly*”. Η φράση αυτή καταδεικνύει ότι έχει πραγματοποιηθεί έλεγχος όχι μόνο του κειμένου της δημοσίευσης αλλά και του ίδιου του λογισμικού ώστε να ελεγχθεί η ακρίβεια των αναγραφόμενων στην εργασία.

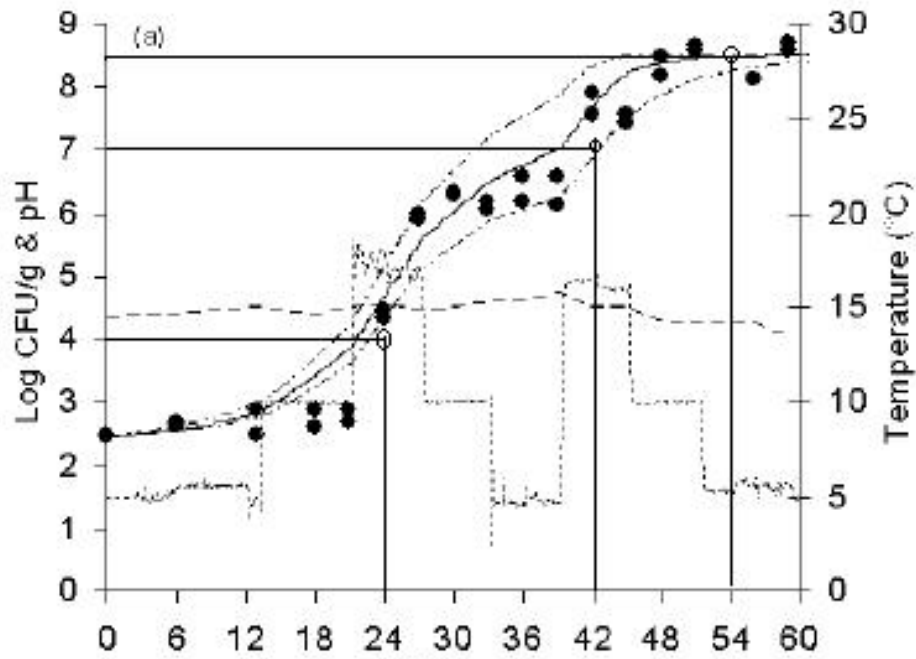
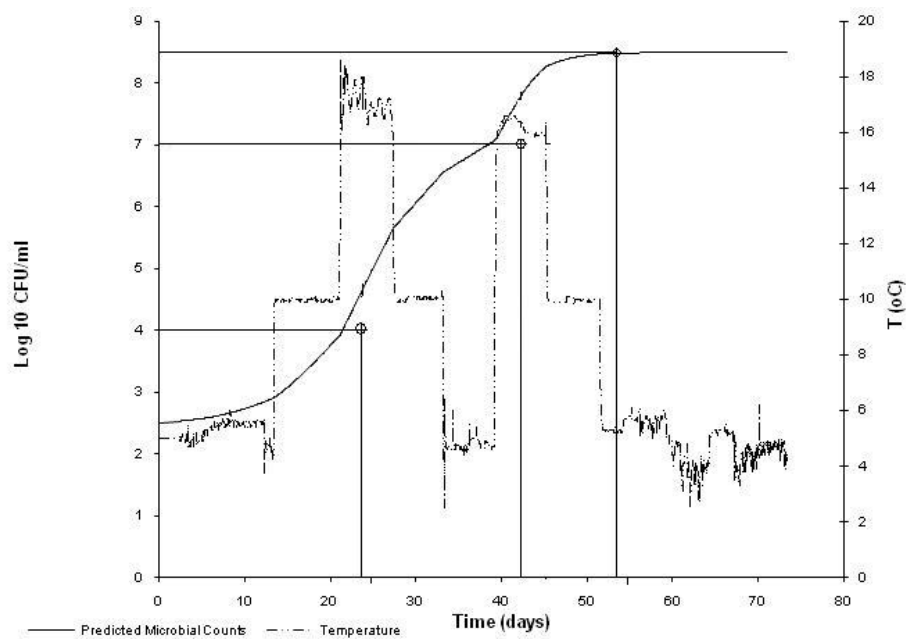


Fig.6a (Manios et al., 2009)



Διάγραμμα από το “UGPM” σε αντιστοιχία με Fig.6a (Manios et al., 2009)

**Εικόνα 3.12.** Επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου πρόβλεψης “UGPM” όσον αφορά στην αύξηση των γαλακτικών βακτηρίων στην τυροσαλάτα υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας. Συγκριτικός αποτελεσμάτων της σιγμοειδούς καμπύλης αύξησης του λογισμικού “UGPM” με αντίστοιχη καμπύλη που περιγράφεται στην εργασία των Manios et al., 2009.

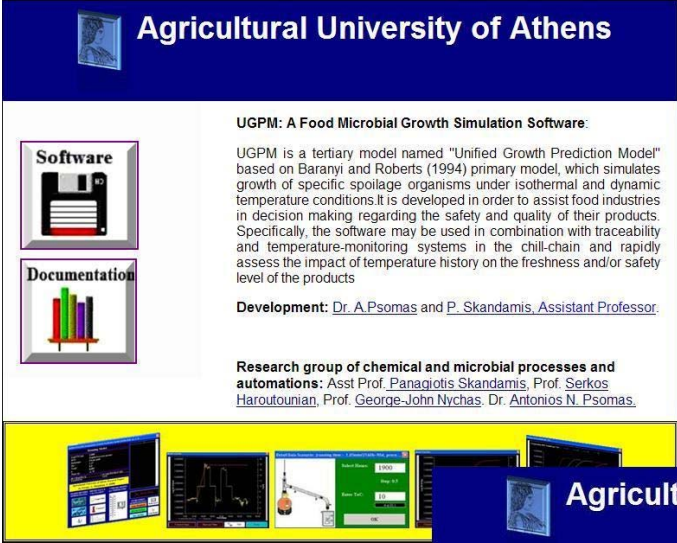
### 3.10. Διαθεσιμότητα λογισμικού

Ένας ιστοχώρος αναπτύχθηκε με σκοπό να παρέχει στους χρήστες ελεύθερη πρόσβαση στο λογισμικό. Ο ιστοχώρος αυτός αποτελείται από τρεις ιστοσελίδες διάδοσης του λογισμικού UGPM οι οποίες αναπτύχθηκαν με το λογισμικό ανάπτυξης ιστοσελίδων Adobe Dreamweaver<sup>®</sup> CS4. Η πρώτη ιστοσελίδα περιλαμβάνει ένα εισαγωγικό κείμενο με το οποίο παρέχεται γενική πληροφόρηση σχετικά με το λογισμικό UGPM σε όποιον επισκέπτεται τον ιστοχώρο. Ταυτόχρονα περιλαμβάνει και δύο πλήκτρα ελέγχου. Το πλήκτρο ελέγχου “Software” και το πλήκτρο ελέγχου “Documentation” (**Εικόνα 3.13a**). Το πλήκτρο ελέγχου “Software” ανοίγει τη δεύτερη ιστοσελίδα διάδοσης η οποία περιλαμβάνει το σύνδεσμο (link) για τη μεταφορά του λογισμικού UGPM από το χώρο του εξυπηρετητή (server) όπου φιλοξενείται, στο χώρο του δίσκου του Η/Υ του ενδιαφερόμενου, σύμφωνα με τις υποδείξεις εγκατάστασης οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στην ιστοσελίδα αυτή (**Εικόνα 3.13b**). Το πλήκτρο ελέγχου “Documentation” περιλαμβάνει το εγχειρίδιο χειρισμού του λογισμικού UGPM. Το εγχειρίδιο αυτό, το οποίο είναι ένα αρχείο παρουσίασης (.ppt) περιλαμβάνεται επίσης και στο ίδιο το λογισμικό (πλήκτρο ελέγχου “i” της αρχικής UserForm). Πατώντας το σύνδεσμο “here” στην πρόταση: “Press here for software development references” εμφανίζεται η τρίτη ιστοσελίδα διάδοσης (**Εικόνα 3.14**) η οποία περιλαμβάνει τις αναφορές για την ανάπτυξη του λογισμικού. Το λογισμικό διατίθεται δίχως χρέωση για κάθε ενδιαφερόμενο στη διεύθυνση: <http://www.aua.gr/psomas>.

### 3.11. Χρησιμότητα

Η σημασία του λογισμικού UGPM για εμπορική χρήση διαπιστώθηκε με τη διανομή ερωτηματολογίων σε 50 άτομα τα οποία εμπλέκονται με την έρευνα της μικροβιολογίας τροφίμων, αλλά και απασχολούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Αυτοί κλήθηκαν να απαντήσουν σε πέντε βασικές ερωτήσεις οι οποίες αφορούσαν στην εμπειρία τους ως προς τη χρήση του λογισμικού UGPM (**Εικόνα 3.15**). Αρχικά έπρεπε να μεταφέρουν το λογισμικό από την ιστοσελίδα διάδοσής του στο σκληρό δίσκο του Η/Υ τους και στη συνέχεια να το εγκαταστήσουν ακολουθώντας τις οδηγίες εγκατάστασης οι οποίες περιλαμβάνονται στην ίδια ιστοσελίδα (**Εικόνα 3.13b**). Η ιστοσελίδα παρέχει όλες τις αναγκαίες πληροφορίες για την εγκατάσταση

του λογισμικού καθώς και το εγχειρίδιο χειρισμού του. Κανένας από τους ερωτηθέντες δεν είχε εκπαιδευτεί στη χρήση του λογισμικού UGPM. Τόσο οι ερωτήσεις όσο και η ανάλυση των στατιστικών δεδομένων παρουσιάζονται στην **εικόνα 3.15**. Όπως προκύπτει από τη μελέτη των στατιστικών δεδομένων, το σύνολο των ερωτηθέντων διαπίστωσε ότι το λογισμικό αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εκπαιδευτικό εργαλείο.



**Agricultural University of Athens**

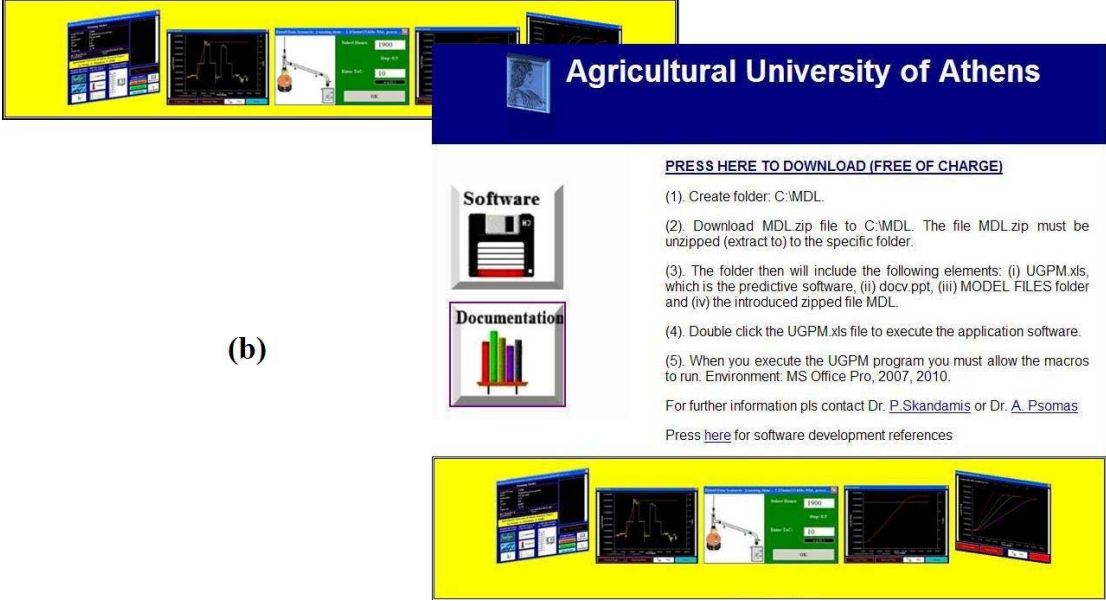
**UGPM: A Food Microbial Growth Simulation Software:**

UGPM is a tertiary model named "Unified Growth Prediction Model" based on Baranyi and Roberts (1994) primary model, which simulates growth of specific spoilage organisms under isothermal and dynamic temperature conditions. It is developed in order to assist food industries in decision making regarding the safety and quality of their products. Specifically, the software may be used in combination with traceability and temperature-monitoring systems in the chill-chain and rapidly assess the impact of temperature history on the freshness and/or safety level of the products.

**Development:** [Dr. A.Psomas](#) and [P. Skandamis](#), Assistant Professor.

**Research group of chemical and microbial processes and automations:** [Asst Prof. Panagiotis Skandamis](#), [Prof. Serkos Haroutounian](#), [Prof. George-John Nychas](#), [Dr. Antonios N. Psomas](#).

(a)



**Agricultural University of Athens**


**PRESS HERE TO DOWNLOAD (FREE OF CHARGE)**

- (1). Create folder: C:\MDL.
- (2). Download MDL.zip file to C:\MDL. The file MDL.zip must be unzipped (extract to) to the specific folder.
- (3). The folder then will include the following elements: (i) UGPM.xls, which is the predictive software, (ii) docv.ppt, (iii) MODEL FILES folder and (iv) the introduced zipped file MDL.
- (4). Double click the UGPM.xls file to execute the application software.
- (5). When you execute the UGPM program you must allow the macros to run. Environment: MS Office Pro, 2007, 2010.


For further information pls contact [Dr. P.Skandamis](#) or [Dr. A. Psomas](#)  
Press [here](#) for software development references

(b)


**Εικόνα 3.13.** Πρώτη (a) και δεύτερη (b) ιστοσελίδα διάδοσης του λογισμικού UGPM


Agricultural University of Athens

Software



Documentation



**SOFTWARE DEVELOPMENT REFERENCES:**


Microsoft Excel Tips & Solutions from MrExcel. Software development consulting services. <http://www.mrexcel.com>.

Pearson Software Consulting, LLC. <http://www.pearson.com/Excel/Mainpage.aspx>.

Software development forum. <http://www.xtremevbtalk.com>.

Tech on the Net. Software development consulting services. <http://www.techonthenet.com/index.php>.

Walkenbach, J., 2004. Excel 2003 Power Programming with VBA, Wiley Publishing Inc., Indianapolis, USA.

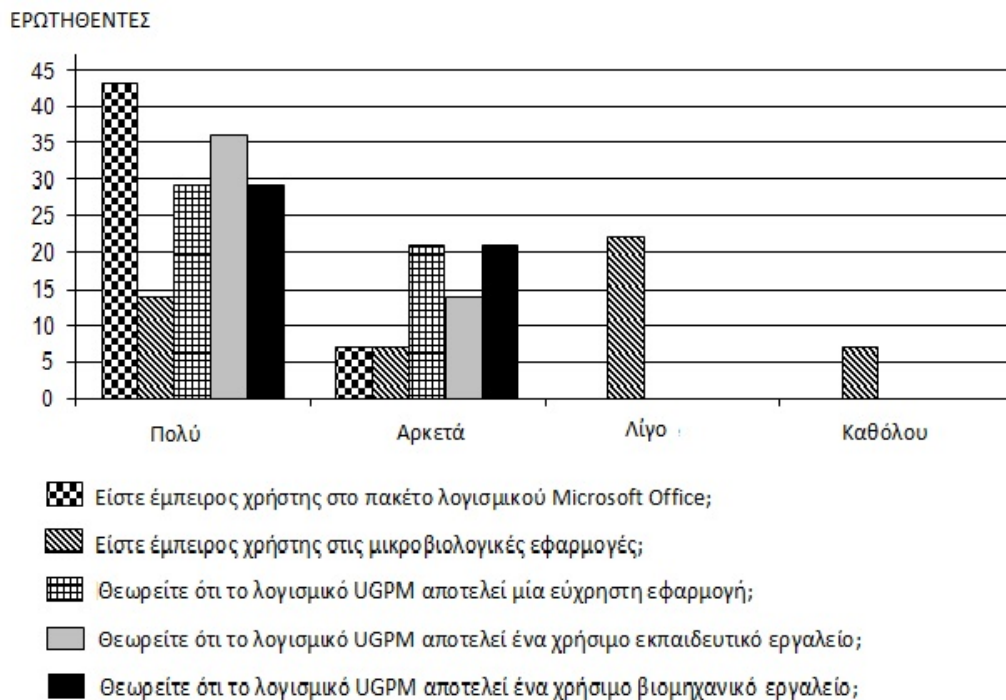


**Εικόνα 3.14.** Τρίτη ιστοσελίδα διάδοσης του λογισμικού UGPM

Οι περισσότεροι από τους ερωτηθέντες διαπίστωσαν ότι το λογισμικό αυτό αποτελεί πολύ χρήσιμη βιομηχανική εφαρμογή η οποία είναι εύκολη στη χρήση της. Το σύνολο των ερωτηθέντων είναι έμπειρο στη χρήση του πακέτου λογισμικού Microsoft Office, ενώ διαθέτει περιορισμένη εμπειρία στα μικροβιακά πακέτα λογισμικών. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δείχνουν μία θετική προοπτική στη βιομηχανική χρήση του λογισμικού UGPM.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το μεγάλο ενδιαφέρον της κοινής γνώμης σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων έχει οδηγήσει στη βελτίωση των αντίστοιχων μεθόδων διαχείρισης τους, ενώ τμήμα των μεθόδων αυτών αποτελεί και η μικροβιολογία πρόρρησης. Η ανάπτυξη αυτής της επιστημονικής περιοχής είναι στενά συνδεδεμένη με τα θεμελιώδη προβλήματα της βιομηχανίας τροφίμων όπως είναι οι επιστροφές προϊόντων, τα κρούσματα μικροβιακής αύξησης ιδίως κατά την αποθήκευση και οι μέθοδοι εκτίμησης κινδύνου.



**Εικόνα 3.15.** Αξιολόγηση των επιδόσεων και της αποδοχής του λογισμικού UGPM

Το λογισμικό UGPM συνιστά ένα τριτοταγές μοντέλο το οποίο συμβάλλει στην επίλυση των προβλημάτων αυτών. Αποτελεί ένα εξειδικευμένο βιομηχανικό λογισμικό το οποίο έχει σχεδιαστεί ώστε να είναι φιλικό προς το χρήστη αλλά χωρίς απώλεια του επιστημονικού του χαρακτήρα. Περιλαμβάνει δύο διαφορετικές εκδοχές. Η μία αφορά σε προβλέψεις της αύξησης των μικροοργανισμών υπό δυναμικές συνθήκες θερμοκρασίας και η άλλη υπό στατικές αντίστοιχα. Το λογισμικό περιλαμβάνει ένα σύνολο από ρουτίνες ελέγχου οι οποίες το προστατεύουν από αδέξιους χειρισμούς παρέχοντας έτσι έναν ασφαλή και αποτελεσματικό μηχανισμό στους βιομηχανικούς χρήστες για την προσομοίωση της μικροβιακής αύξησης σε συνάρτηση με τις θερμοκρασίες αποθήκευσης.

Η ανάπτυξη του λογισμικού περιγράφεται αναλυτικά στην εργασία “Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions”, η οποία δημοσιεύτηκε στο διεθνές περιοδικό Computers and Electronics in Agriculture (76) του εκδοτικού οίκου Elsevier, από τους Psomas et al. (2011) (**Εικόνα 3.16**).



Contents lists available at ScienceDirect

## Computers and Electronics in Agriculture

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/compag](http://www.elsevier.com/locate/compag)

Original papers

## Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions

Antonios N. Psomas<sup>a,b</sup>, George-John Nychas<sup>a</sup>, Serkos A. Haroutounian<sup>b</sup>, Panagiotis N. Skandamis<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Food Science & Technology, Laboratory of Food Hygiene and Quality Control, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece<sup>b</sup> Department of Sciences, Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 October 2010

Received in revised form 3 January 2011

Accepted 24 January 2011

## Keywords:

Predictive microbiology

Food safety

Microbial growth prediction

Safety tertiary model

Dynamic temperature conditions

## ABSTRACT

The use of predictive modeling software may markedly contribute to the better understanding of the microbial behavior in foods. In this paper, the development and validation of a tertiary model, which provides predictions of microbial growth in foods under dynamic or static temperature conditions, is presented. In particular, the UGPM (Unified Growth Prediction Model) software applies the Baranyi and Roberts (1994) primary model, coupled to a secondary temperature model, in order to simulate growth of a given microorganism during storage of a specific food or food category. The software, intended to be used by both expert and non-expert users, may be a valuable decision support tool for the food industry, by assisting in the management of foods based on their actual shelf-life and microbial safety, thereby limiting the deterministic “best-by” practice for the determination of shelf-life. The latter is commonly based solely on empirical observations and has high uncertainty. This in turn, may result in the rejection of large quantities of unspoiled or safe foods, or even in the distribution of spoiled and unsafe foods, due to ignorance of the effect of temperature abuse on the microbial spoilage and safety of products.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Εικόνα 3.16.** Η εργασία στην οποία περιγράφεται η ανάπτυξη του λογισμικού “UGPM”, δημοσιεύτηκε στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό “Computers and Electronics in Agriculture”

Εν κατακλείδι, το λογισμικό UGPM το οποίο υποστηρίζει την ενσωμάτωση μικροβιακών μοντέλων πρόβλεψης για παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, δύναται:

- (i) να εκτιμήσει τον κίνδυνο από τη μικροβιακή αύξηση σε μεγάλη ποικιλία προϊόντων τροφίμων, και
- (ii) να ενσωματωθεί στα συστήματα υποστήριξης αποφάσεων για τη διαχείρισή τους κατά τη διάρκεια της ψυκτικής αλυσίδας.

Πεποίθηση αποτελεί ότι το λογισμικό αυτό πρόκειται να αποτελέσει κοινό πεδίο μεταξύ της βιομηχανίας τροφίμων και της επιστημονικής έρευνας το οποίο θα συμβάλλει στη συνεργασία τους.



### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ<sup>3</sup>

- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 2000. Principles and application of predictive modelling of the effects of preservative factors on microorganisms. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiology Safety and Quality of Foods*, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD, pp. 342-358.
- Baranyi, J., Tamplin, M.L., 2004. ComBase: A Common Database on Microbial Responses to food environments. *Journal of Food Protection* 67, 1967-1971.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology* 27, 61–75.
- Billo, E. J., 2001. *Excel for Chemists*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Buchanan, R.L., 1991. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *Journal of Food Safety* 11, 123–134.
- Buchanan, R.L., 1993. Developing and distributing user-friendly application software. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 12, 251–255.
- ComBase, 2007. ComBase Predictor, ComBase Modelling Toolbox. Institute of Food Research. <http://www.combase.cc/toolbox.html> (retrieved December, 2011).
- Dalgaard, P., Buch, P., Silberg, S. 2002. Seafood Spoilage Predictor – development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology* 73, 343-349.
- Fujikawa, H., Morozumi, S., 2005. Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7920-7926.

---

<sup>3</sup>Για την ανάπτυξη του λογισμικού εκτός από την αντίστοιχη σχετική βιβλιογραφία, προσαρμόστηκαν τμήματα κώδικα VBA από τις ακόλουθες συμβουλευτικές υπηρεσίες του διαδικτύου και ιστοσελίδες ανταλλαγής πληροφοριών και απόψεων:

Microsoft Excel Tips & Solutions from MrExcel. Software development consulting services. <http://www.mrexcel.com>.

Pearson Software Consulting, LLC. <http://www.pearson.com/Excel/Mainpage.aspx>.

Software development forum. <http://www.xtremevbtalk.com>.

Tech on the Net. Software development consulting services. <http://www.techonthenet.com/index.php>.



- Gibson, A.M., Hocking, A.D., 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology* 8, 353–358.
- Gorris, L.G.M., 2005. Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control* 16, 801–809.
- Le Marc, Y., Baranyi, J., Fujikawa, H., 2007. Predictions under Isothermal and Dynamically Changing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2402-2403.
- Le Marc, Y., Plowman, J., Aldus, C.F., Munoz-Cuevas, M., Baranyi, J., Peck, M.W. 2008. Modelling the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of bulk meat. *International Journal of Food Microbiology* 128, 41-50.
- Le Marc, Y., Skandamis, P.N., Belessi, C.I.A., Merkouri, S.I., George, S.M., Gounadaki, A.S., Schvartzman, S., Jordan, K., Drosinos, E.H., Baranyi, J. 2010. Modeling the effect of abrupt acid and osmotic shifts within the growth region and across the growth boundaries on adaptation and growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6555-6563.
- Lebert, I., Lebert, A., 2006. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. *International Journal of Refrigeration* 29, 968-984.
- Leporq, B., Membré, J.M., Dervin, C., Buche, P., Guyonnet, J.P., 2005. The “Sym'Previus” software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *International Journal of Food Microbiology* 100, 231-237.
- Manios, S.G., Skiadaresis, A.G., Karavasilis, K., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N. 2009. Field validation of predictive models for the growth of lactic acid bacteria in acidic cheese-based Greek appetizers. *Journal of Food Protection* 72, 101-110.
- Marks, B.P., 2008. Status of microbial modeling in food process models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 137-143.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Siana, P., Skandamis, P.N., Metaxopoulos, I. 2006a. Determination of the growth limits and kinetic behaviour of *Listeria monocytogenes* in a sliced cooked cured meat product: validation of the predictive growth model under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Protection* 69, 1312-1321.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. 2006b. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its

- validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science* 71, 157-167.
- McMeekin, T.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78, 133–153.
- McMeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S., Zwietering, M.H. 2006. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology* 112, 181-194.
- Neumeyer, K., Ross, T., McMeekin, T.A., 1997. Development of *Pseudomonas* predictor. *Australian Journal of Dairy Technology* 52, 120–122.
- Panagou, E.Z., Nychas, G.J.E., 2008. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized vanilla cream after postprocessing contamination. *Journal of Food Protection* 71, 1828-1834.
- Petroutsos, E., 1998. *Mastering Visual Basic 6*, Sybex Inc., San Francisco, USA.
- Pin, C., Avendaño-Perez, G., Cosciani-Cunico, E., Gómez, N., Gounadaki, A.S., Nychas, G.-J., Skandamis, P., Barker, G., 2010. Modelling *Salmonella* concentration throughout the pork supply chain by considering growth and survival in fluctuating conditions of temperature, pH and aw. *International Journal of Food Microbiology* 145, S96-S102.
- Psomas, A., Skandamis, P., 2009. UGPM: A food microbial growth simulation software, UGPM Dissemination Webpage, Agricultural University of Athens, <http://users.uoa.gr/~apsomas>, <http://www.aua.gr/psomas> (retrieved December, 2011).
- Psomas, A. N., Nychas, G.-J., Haroutounian, S. A., Skandamis, P. N., 2011. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. *Computers and Electronics in Agriculture* 76, 119–129.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A., 1982. Relation between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149, 1-5.
- Ross, T., McMeekin, T.A., Baranyi, J. 2000. Predictive microbiology and food safety. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, New York, pp. 1699–1710.

- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P. 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 610-616.
- Skandamis, P. N., Brocklehurst, T. F., Panagou, E. Z., Nychas G.-J.E., 2007. Image analysis as a mean to model growth of *Escherichia coli* O157:H7 in gel cassettes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 937–947.
- SSSP, 2009. Seafood Spoilage and Safety Predictor software v. 3.1, National Food Institute (DTU Food), Technical University of Denmark, <http://sssp.dtuqua.dk> (retrieved January, 2012).
- Tiganitas, A., Zeaki, N., Gounadaki, A. S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and aw stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*. 134, 104-112.
- USDA, 2009a. Pathogen Modeling Program, Version 7.0., U.S. Dept. of Agriculture: A.R.S., Eastern Regional Research Center. <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550> (retrieved December, 2011).
- USDA, 2009b. Online Pathogen Modeling Program. U.S. Dept. of Agriculture: A.R.S., Eastern Regional Research Center. <http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx> (retrieved December, 2011).
- Walkenbach, J., 2004. Excel 2003 Power Programming with VBA, Wiley Publishing Inc., Indianapolis, Indiana.
- Whiting, R.C., 1995. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 467–494.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van't Riet, K. 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094-1101.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Ανάπτυξη και επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου GroPIN για την πρόβλεψη της πιθανότητας ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης και της κινητικής της ανάπτυξης/αδρανοποίησης των μικροοργανισμών των τροφίμων

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ενώ έχει αναπτυχθεί ένας σημαντικός αριθμός λογισμικών πρόβλεψης τόσο για την κινητική της μικροβιακής ανάπτυξης (microbial growth) όσο και της μικροβιακής αδρανοποίησης (inactivation kinetics), εντούτοις τα λογισμικά που έχουν αναπτυχθεί για την εκτίμηση τόσο του πιθανού κινδύνου ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης των παθογόνων (pathogens) και αλλοιογόνων (spoilage) μικροοργανισμών στα τρόφιμα, όσο και της ταχύτητας ανάπτυξής τους (σε περίπτωση που αυτά αναπτυχθούν), είναι εξαιρετικά περιορισμένα (Carrasco et al., 2012). Όπως αναφέρουν οι McMeekin et al., (2000, 2002) η έρευνα των συνθηκών ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης των μικροοργανισμών έχει αναγνωρισθεί ως σημαντική συνιστώσα της ασφάλειας των τροφίμων. Σύμφωνα με τον Koseki (2009), έχουν διερευνηθεί εκτενώς οι συνθήκες ανάπτυξης/μη ανάπτυξης για τα αντιπροσωπευτικά βακτήρια *Listeria monocytogenes* (Bolton & Frank, 1999, Koutsoumanis et al., 2004a, Koutsoumanis & Sofos, 2005, Ross et al., 2000, Tienungoon et al., 2000), *Escherichia coli* (McKellar & Lu, 2001, Presser et al., 1998, Salter et al., 2000, Skandamis et al., 2007) και *Salmonella spp.* (Koutsoumanis et al., 2004b, Lanciotti et al., 2001). Ο Koseki (2009) ανέπτυξε ένα λογισμικό (Microbial Responses Viewer - MRV) με το οποίο είναι δυνατή η εκτίμηση της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Το λογισμικό αυτό βασίζεται σε δεδομένα της διεθνούς διαδικτυακής βάσης δεδομένων ComBase (ComBase, 2007).

Από τη μελέτη των υφιστάμενων λογισμικών διαπιστώθηκε ότι κανένα από αυτά δεν ικανοποιεί ταυτόχρονα τη δυνατότητα προβλέψεων των συνθηκών ανάπτυξης/μη ανάπτυξης των μικροοργανισμών των τροφίμων και της κινητικής της αύξησης/αδρανοποίησής τους υπό στατικές συνθήκες. Η ανάγκη αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη του τριτοταγούς μοντέλου GroPIN το οποίο περιλαμβάνει μία βάση δεδομένων των μικροβιακών μοντέλων. Κάθε καταχωρημένο μοντέλο αποτελείται από την εξίσωση επίλυσής του η οποία αποτελεί δεδομένο, από το εύρος των τιμών

των μεταβλητών της αντίστοιχης εξίσωσης και από τους συντελεστές της. Για κάθε μικροοργανισμό που περιλαμβάνεται σε ένα συγκεκριμένο μοντέλο, οι προβλέψεις είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν: (i) Την πιθανότητα ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης του, (ii) την κινητική της αύξησης/αδρανοποίησής του, και (iii) την ανάπτυξη τρισδιάστατων μοντέλων επιφανειών απόκρισής του.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ

Το τριτοταγές μοντέλο πρόβλεψης GroPIN αναπτύχθηκε με κώδικα VBA σε προγραμματιστικό περιβάλλον Microsoft Excel® (εκδόσεις 2007, 2010) σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στα εγχειρίδια προγραμματισμού των Petroutsos, E., (1998), και Walkenbach, J., (2004). Η βασική του δομή περιλαμβάνει αφενός μία βάση δεδομένων που εμπεριέχει μικροβιακά μοντέλα πρόβλεψης της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης, ανάπτυξης και αδρανοποίησης των μικροοργανισμών των τροφίμων, αφετέρου την υποστηρικτική εφαρμογή (servicing application) της βάσης δεδομένων για την επίλυσή τους.

Τα μοντέλα πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης (GNG) τα οποία εμπεριέχονται στη βάση δεδομένων του τριτοταγούς μοντέλου GroPIN αποτελούν γραμμικές εξισώσεις. Τα γραμμικά μοντέλα βασίζονται σε πολυωνυμικές εξισώσεις 2<sup>ης</sup> τάξης, η γενική μορφή των οποίων, σύμφωνα με τον Bradley (2007), εκφράζεται ως εξής:

$$y_i = a_0 + \sum_{j=1}^q a_j x_j + \sum_{i=1}^q a_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \sum a_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4.1)$$

όπου  $y$  είναι η συνάρτηση απόκρισης η οποία επηρεάζεται από τις ανεξάρτητες μεταβλητές  $x_1, x_2, \dots, x_q$ , δηλαδή:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_q) + e \quad (4.2)$$

Ο όρος  $e$  εκφράζει το σφάλμα της απόκρισης  $y$  καθώς και κάθε άλλο παράγοντα διαφοροποίησης το οποίος δεν περιλαμβάνεται στη συνάρτηση απόκρισης  $f$ . Ο δείκτης  $i$  εκφράζει τον αριθμό των μεταβλητών και λαμβάνει τιμές από 1 έως  $N$ , ενώ

ο δείκτης  $j$  εκφράζει το επίπεδο της ανεξάρτητης μεταβλητής και λαμβάνει τιμές από 1 έως  $q$ . Ο δείκτης  $q$  εκφράζει τον αριθμό των ανεξάρτητων μεταβλητών, ενώ ισχύει:  $N > q$ . Ο συντελεστής  $a_j$  εκφράζει την αναμενόμενη μεταβολή στην απόκριση  $y$  ανά μονάδα αύξησης της μεταβλητής  $x$ , όταν οι υπόλοιπες μεταβλητές διατηρούνται σταθερές.

Η εξίσωση 2<sup>ης</sup> τάξης περιλαμβάνει όλους τους όρους της εξίσωσης 1<sup>ης</sup> τάξης:

$$y_i = a_0 + \sum_{j=1}^q a_j x_{ij} + \varepsilon_i \quad (4.3)$$

και επιπλέον τους όρους εκείνους οι οποίοι περιλαμβάνουν:

- (i) Τα γινόμενα των τετραγώνων των ανεξάρτητων μεταβλητών με τους αντίστοιχους συντελεστές τους, και
- (ii) τα γινόμενα των ανεξάρτητων μεταβλητών με τους αντίστοιχους συντελεστές τους τα οποία εκφράζουν τις αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών αυτών.

Η απλοποιημένη μορφή της **εξίσωσης 4.1** είναι:

$$P_n = a_0 + a_x \cdot x + a_{x^2} \cdot x^2 + a_y \cdot y + a_{y^2} \cdot y^2 + \dots + a_g \cdot g + a_{g^2} \cdot g^2 + a_{xy} \cdot x \cdot y + \dots + a_{xj} \cdot x \cdot j + a_{yj} \cdot y \cdot j \quad (4.4)$$

όπου  $n=[x,y,\dots,j]$  είναι οι μεταβλητές των πολυωνύμων και  $n \in [2,10]$ ,  $a_0$  είναι η διαφορά ύψους (intercept), και  $a_k / k=x, x^2, \dots$  είναι οι συντελεστές των αντίστοιχων μεταβλητών.

Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{\max}$  ή  $\langle \mu \rangle_{\max}$ ) αποτελεί έκφραση των φυσικοχημικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων κάθε μοντέλου και αποτελεί λύση της εξίσωσης:

$$\mu_{\max} = e^{P_n}, \quad n = [2,3,\dots,10] \quad (4.5)$$

Η διαδικασία επίλυσης ενός μοντέλου πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης περιλαμβάνει αρχικά τον ορισμό των μεταβλητών που θα αντιπροσωπεύονται στους άξονες  $x$  και  $y$ , ενώ στη συνέχεια τον ορισμό των τιμών των υπόλοιπων διαθέσιμων μεταβλητών, εντός του επιτρεπτού εύρους τους (range). Η επίλυση της πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης περιλαμβάνει

την επίλυση της εξίσωσης του γραμμικού μοντέλου (**εξίσωση 4.5**) και στη συνέχεια την εφαρμογή της λογιστικής παλινδρόμησης στην εξίσωση:

$$A = \frac{\mu_{\max}}{1 + \mu_{\max}} \quad (4.6)$$

με τη χρήση του λογισμικού Solver (Frontline Systems, Inc<sup>®</sup>), το οποίο αποτελεί add-in λογισμικό του Microsoft Excel<sup>®</sup> και έχει εισαχθεί αρμονικά στον κώδικα VBA.

Η λογιστική παλινδρόμηση εφαρμόζεται αφού αρχικά έχει οριστεί η τιμή της μεταβλητής της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης  $P=[0,1]$ /  $0$ =μη ανάπτυξη,  $1$ =ανάπτυξη, εντός των ορίων ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Η εύρεση των βέλτιστων τιμών προκύπτει από την **εξίσωση 4.6** κατόπιν μεταβολής των αντίστοιχων τιμών του άξονα  $y$ . Το αποτέλεσμα της προσομοίωσης είναι η γραφική απεικόνιση της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του ενεργού μοντέλου που καθορίζει το όριο μεταξύ της ανάπτυξης και της μη ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Στα κινητικά μοντέλα ανάπτυξης (GRT) και αδρανοποίησης (INA), υπό στατικές συνθήκες, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu_{\max}$  (ή  $K$  στην περίπτωση της αδρανοποίησης), αποτελεί έκφραση των φυσικοχημικών και περιβαλλοντικών παραγόντων του μικροβιακού μοντέλου (**εξίσωση 4.5**). Η διαδικασία επίλυσης ενός μοντέλου ανάπτυξης ή αδρανοποίησης περιλαμβάνει αρχικά τον ορισμό των τιμών των μεταβλητών του ενεργού μοντέλου εντός του εύρους των επιτρεπτών τιμών. Για την προσομοίωση της μικροβιακής ανάπτυξης ή αδρανοποίησης εφαρμόζεται η διαφορική εξίσωση 1<sup>ης</sup> τάξεως των Baranyi & Roberts (1994). Σύμφωνα με την **απόδειξη 3.20**, η επίλυση της διαφορικής **εξίσωσης 3.1** υπό στατικές συνθήκες αποτελεί υποπερίπτωση της αντίστοιχης επίλυσής της υπό δυναμικές συνθήκες (Psomas et al., 2011). Συνεπώς, εφαρμόζεται το σύστημα διαφορικών **εξισώσεων 3.4** και **3.5** που τροφοδοτείται από τις τιμές των παραμέτρων του ενεργού μοντέλου. Τα δεδομένα της αριθμητικής πρόβλεψης που παράγονται, εκφράζονται με σιγμοειδή καμπύλη αύξησης ή μείωσης του μικροοργανισμού.

Η ανάπτυξη τρισδιάστατων μοντέλων επιφανειών απόκρισης παριστάνεται από την εξίσωση:

$$E(y) = f(x_1, x_2) \quad (4.7)$$

όπου  $y$  είναι η συνάρτηση απόκρισης που επηρεάζεται από τις ανεξάρτητες μεταβλητές  $x_1, x_2$  και εκφράζεται από την εξίσωση:

$$y = f(x_1, x_2) + e \quad (4.8)$$

Το αποτέλεσμα της προσομοίωσης αυτής είναι η γραφική απεικόνιση των επιφανειών απόκρισης (Response Surface) στον τρισδιάστατο χώρο και των αντίστοιχων διαγραμμάτων ισοϋψών σε δισδιάστατο επίπεδο. Επιφάνεια απόκρισης ονομάζεται η τριών διαστάσεων γραφική αναπαράσταση μίας επιφάνειας η οποία σχηματίζεται μεταξύ δύο ανεξάρτητων μεταβλητών και μίας μεταβλητής απόκρισης. Όταν η απόκριση (**εξίσωση 4.8**) εκφράζεται με εξίσωση 1<sup>ης</sup> τάξης, τότε παριστάνεται με επίπεδη επιφάνεια στον τρισδιάστατο χώρο ενώ όταν εκφράζεται με εξίσωση  $\neq 1$ <sup>ης</sup> τάξης τότε παριστάνεται με μη επίπεδη επιφάνεια. Η **εξίσωση 4.1** αποτελεί συνήθως μία καλή εκτίμηση της πραγματικής επιφάνειας απόκρισης. Η ανάλυση της επιφάνειας απόκρισης θεωρείται ως “ ανέβασμα σε λόφο” όπου η κορυφή του λόφου αντιπροσωπεύει το σημείο με τη μέγιστη απόκριση ή “κατέβασμα σε κοιλάδα” όπου το σημείο του βέλτιστου είναι σημείο ελάχιστης απόκρισης. Στόχος της ανάλυσης των δεδομένων όπως προκύπτουν από την επιφάνεια απόκρισης είναι ο προσδιορισμός της περιοχής του πεδίου ορισμού των παραγόντων για την οποία ικανοποιούνται οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης.

Η επιφάνεια απόκρισης οπτικοποιείται με το διάγραμμα ισοϋψών (Contour Plots). Το διάγραμμα ισοϋψών αποτελεί προβολή της επιφάνειας στο επίπεδο των μεταβλητών  $x_1, x_2$ . Το διάγραμμα αυτό απεικονίζει καμπύλες που κάθε μία από αυτές αποτελεί προβολή της επιφάνειας απόκρισης σε ορισμένο ύψος ή με συγκεκριμένη τιμή. Οι καμπύλες βοηθούν στη μελέτη των επιπέδων των τιμών των  $x_1, x_2$  που επιφέρουν μεταβολές στο σχήμα ή στο ύψος της επιφάνειας απόκρισης (Bradley, 2007).

#### 4.1. Η βάση δεδομένων των μικροβιακών μοντέλων

Το φύλλο δεδομένων “NonLinear” του λογισμικού GroPIN συνιστά τη βάση δεδομένων των μικροβιακών μοντέλων. Κάθε αποθηκευμένο μικροβιακό μοντέλο στη βάση δεδομένων του λογισμικού GroPIN αποτελεί μία συγκεκριμένη εγγραφή η οποία αποτελείται από τα περιγραφικά πεδία, τα πεδία ενεργοποίησης των μηχανισμών επίλυσης και τα υπολογιστικά πεδία.

Τα περιγραφικά πεδία είναι (**Πίνακας 4.1**):

(i) Το πεδίο γενικής περιγραφής. Περιγράφονται: το είδος του μικροοργανισμού που έχει καλλιεργηθεί κατά τις πειραματικές διεργασίες, οι εξαρτημένες μεταβλητές του



μικροβιακού μοντέλου, ο αριθμός της εξίσωσης αναφοράς στη δημοσιευμένη εργασία και η φυσική περιγραφή της εξίσωσης αυτής.

(ii) Το υπόστρωμα.

(iii) Τα πεδία αναφοράς στη δημοσιευμένη εργασία.

Τα πεδία ενεργοποίησης περιλαμβάνουν συγκεκριμένες τιμές βάσει των οποίων ενεργοποιούνται διαφορετικοί μηχανισμοί επίλυσης για κάθε κατηγορία μοντέλου. Τα μοντέλα που εμπεριέχονται στη βάση δεδομένων του λογισμικού μπορεί να είναι είτε μοντέλα πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης (Growth/No growth models) ή κινητικά μοντέλα αύξησης (Growth models) ή κινητικά μοντέλα αδρανοποίησης (Inactivation models). Οι τιμές GNG και GRT οι οποίες περιλαμβάνονται στη στήλη “A” προσδιορίζουν τον τρόπο επίλυσης των μοντέλων. Τα μοντέλα που περιλαμβάνουν στο πεδίο “A” την τιμή “GNG”, επιλύονται ως μοντέλα πρόβλεψης της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης. Αντίθετα, τα μοντέλα που περιλαμβάνουν την τιμή “GRT” επιλύονται ως κινητικά μοντέλα. Εάν ένα μοντέλο είναι χαρακτηρισμένο ως κινητικό (GRT), τότε αυτό επιλύεται είτε ως μοντέλο ανάπτυξης όταν η τιμή του πεδίου “AH” είναι κενή ή ως μοντέλο αδρανοποίησης όταν στο πεδίο αυτό εμπεριέχεται η τιμή “INA” (**Πίνακας 4.1**).

Μία άλλη κατηγορία πεδίων ενεργοποίησης αποτελούν οι μορφές επίλυσης και απεικόνισης των εξισώσεων ([CO]). Οι αντίστοιχοι κωδικοί ενεργοποίησης είναι: (2) για Kinetic curve, (3) για Response Surface, (4) για Time to x log inactivation Surface, (5) για Kinetic curve & Response Surface, (7) για Response Surface & Time to x log inactivation Surface, και (8) για Kinetic curve & Time to x log inactivation Surface.

Τα υπολογιστικά πεδία περιλαμβάνουν (**Πίνακας 4.1**):

(i) Την εξίσωση επίλυσης του μοντέλου (πεδίο “CQ”). Οι εξισώσεις των μοντέλων αποτελούν δεδομένα που επιλύονται με ενιαίο τρόπο από το μηχανισμό επίλυσης. Συνεπώς, αίρεται ο περιορισμός στον αριθμό των διαφορετικών εξισώσεων οι οποίες είναι δυνατόν να συμπεριληφθούν στο λογισμικό, αφού αυτές εισάγονται στη βάση δεδομένων από το χρήστη με τη μορφή δεδομένων και όχι στον κώδικα από τον προγραμματιστή.

(ii) Τις μεταβλητές της εξίσωσης (2-10) με τις αντίστοιχες αριθμητικές τιμές τους ([E:AE] και [AJ:AG]),

(iii) Τους συντελεστές της αντίστοιχης εξίσωσης (μέχρι 20) ([BA:CN]),

(iv) Το μετασχηματισμό έκφρασης του μοντέλου ([CP]), η οποία μπορεί να είναι λογαριθμική, με τιμή “ $\ln\langle\mu\rangle_{\max}$ ”, αλγεβρική με τιμή “ $\langle\mu\rangle_{\max}$ ” ή τετραγωνικής ρίζας με τιμή “ $\text{Sqr}\langle\mu\rangle_{\max}$ ”.

(v) Τον αριθμό των μεταβλητών ([C]).

Τα μικροβιακά μοντέλα τα οποία περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του λογισμικού GroPIN προέρχονται μόνο από δημοσιευμένες εργασίες σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά. Κάθε μικροβιακό μοντέλο, εκτός από την αναφορά στη αντίστοιχη εργασία από την οποία προέρχεται (πεδία AF-AI), περιλαμβάνει και τον αριθμό ή την περιγραφή της αντίστοιχης εξίσωσης, όπως αυτή αναγράφεται στην εργασία αναφοράς (πεδίο B) (Πίνακας 4.1).

**Πίνακας 4.1.** Γραμμογράφηση της βάσης δεδομένων του λογισμικού GroPIN

A	B	C	D	E
1	2	3	4	5
<u>Model</u> Δυνατές τιμές: GNG GRT	<u>Microorganism</u> Είδος μ/ο και χαρακτηριστικό μοντέλου	<u>Var</u> Αριθμός μεταβλητών μοντέλου	<u>Substrate</u> Υπόστρωμα	<u>x</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού x με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)
F	G	H	I	J
6	7	8	9	10
<u>xfrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής x	<u>xto</u> Τελική τιμή μεταβλητής x	<u>y</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού x με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>yfrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής y	<u>yto</u> Τελική τιμή μεταβλητής y
K	L	M	N	O
11	12	13	14	15
<u>z</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού z με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>zfrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής z	<u>zto</u> Τελική τιμή μεταβλητής z	<u>d</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού d με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>dfrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής d

P	Q	R	S	T
16	17	18	19	20
<u>dto</u> Τελική τιμή μεταβλητής d	<u>e</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού e με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>Efrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής e	<u>eto</u> Τελική τιμή μεταβλητής e	<u>f</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού f με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)

U	V	W	X	Y
21	22	23	24	25
<u>ffrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής f	<u>fto</u> Τελική τιμή μεταβλητής f	<u>G</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού g με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>gfrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής g	<u>gto</u> Τελική τιμή μεταβλητής g

Z	AA	AB	AC	AD
26	27	28	29	30
<u>h</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού h με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>hfrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής h	<u>hto</u> Τελική τιμή μεταβλητής h	<u>i</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού i με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>ifrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής i

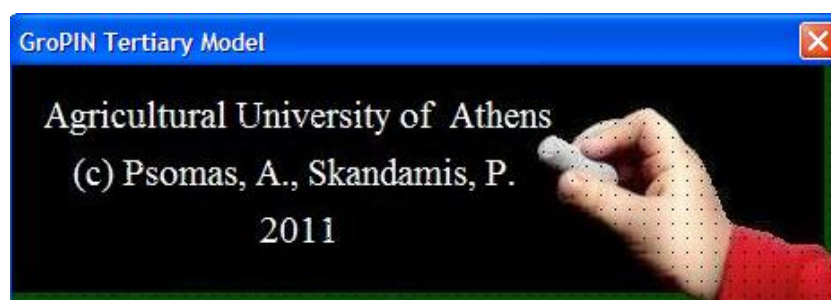
AE	AF	AG	AH	AI
31	32	33	34	35
<u>ito</u> Τελική τιμή μεταβλητής i	<u>Authors</u> Συγγραφείς και χρονολογία της εργασίας στην οποία περιγράφεται το μοντέλο	<u>Paper</u> Εργασία στην οποία περιγράφεται το μοντέλο	<u>Journal</u> Επιστημονικό περιοδικό στο οποίο έχει λάβει χώρα η δημοσίευση	<u>No</u> Αριθμός περιοδικού και σελίδες στις οποίες περιέχεται η εργασία

AJ	AK	AL	AM	(*)
36	37	38	39	
<u>i</u> Αντιστοιχία μεταβλητής λογισμικού j με πραγματική μεταβλητή (ετικέτα)	<u>jfrom</u> Αρχική τιμή μεταβλητής j	<u>jto</u> Τελική τιμή μεταβλητής j	<u>INACTIVE</u> Κωδικός αδρανοποίησης Δυνατές τιμές: INA, (Blanc value)	13 άδεια κελιά (από AN έως AZ)
BA	BB	BC	BD	BE
53	54	55	56	57
<u>Co1</u> Περιγραφή συντελεστή 1	<u>Co1val</u> Τιμή συντελεστή 1	<u>Co2</u> Περιγραφή συντελεστή 2	<u>Co2val</u> Τιμή συντελεστή 2	<u>Co3</u> Περιγραφή συντελεστή 3
BF	BG	BH	BI	BJ
58	59	60	61	62
<u>Co3val</u> Τιμή συντελεστή 3	<u>Co4</u> Περιγραφή συντελεστή 4	<u>Co4val</u> Τιμή συντελεστή 4	<u>Co5</u> Περιγραφή συντελεστή 5	<u>Co5val</u> Τιμή συντελεστή 5
BK	BL	BM	BN	BO
63	64	65	66	67
<u>Co6</u> Περιγραφή συντελεστή 6	<u>Co6val</u> Τιμή συντελεστή 6	<u>Co7</u> Περιγραφή συντελεστή 7	<u>Co7val</u> Τιμή συντελεστή 7	<u>Co8</u> Περιγραφή συντελεστή 8
BP	BQ	BR	BS	BT
68	69	70	71	72
<u>Co8val</u> Τιμή συντελεστή 8	<u>Co9</u> Περιγραφή συντελεστή 9	<u>Co9val</u> Τιμή συντελεστή 9	<u>Co10</u> Περιγραφή συντελεστή 10	<u>Co10val</u> Τιμή συντελεστή 10
BU	BV	BW	BX	BY
73	74	75	76	77
<u>Co11</u> Περιγραφή συντελεστή 11	<u>Co11val</u> Τιμή συντελεστή 11	<u>Co12</u> Περιγραφή συντελεστή 12	<u>Co12val</u> Τιμή συντελεστή 12	<u>Co13</u> Περιγραφή συντελεστή 13

BZ	CA	CB	CC	CD
78	79	80	81	82
<u>Co13val</u> Τιμή συντελεστή13	<u>Co14</u> Περιγραφή συντελεστή 14	<u>Co14val</u> Τιμή συντελεστή14	<u>Co15</u> Περιγραφή συντελεστή15	<u>Co15val</u> Τιμή συντελεστή15
CE	CF	CG	CH	CI
83	84	85	86	87
<u>Co16</u> Περιγραφή συντελεστή16	<u>Co16val</u> Τιμή συντελεστή16	<u>Co17</u> Περιγραφή συντελεστή17	<u>Co17val</u> Τιμή συντελεστή17	<u>Co18</u> Περιγραφή συντελεστή18
CJ	CK	CL	CM	CN
88	89	90	91	92
<u>Co18val</u> Τιμή συντελεστή18	<u>Co19</u> Περιγραφή συντελεστή 19	<u>Co19val</u> Τιμή συντελεστή19	<u>Co20</u> Περιγραφή συντελεστή 20	<u>Co20val</u> Τιμή συντελεστή20
CO	CP	CQ		
93	94	95		
<u>Activation</u> Μορφές επίλυσης	<u>mumax</u> μόνο για μοντέλα GRT Δυνατές τιμές: $\ln\langle\mu\rangle_{\max}$ $\langle\mu\rangle_{\max}$ $\text{sqr}\langle\mu\rangle_{\max}$	<u>Equation</u> Η εξίσωση η οποία εισάγεται στη βάση δεδομένων από το χρήστη		

#### 4.2. Περιγραφή των λειτουργιών του λογισμικού GroPIN

Όταν ενεργοποιηθεί η λειτουργία του λογισμικού GroPIN, εμφανίζεται αρχικά η εισαγωγική UserForm στην οποία παρουσιάζονται οι συντελεστές της ανάπτυξης του λογισμικού (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Εισαγωγική UserForm: Συντελεστές ανάπτυξης του λογισμικού

Μετά από την παρέλευση μικρού χρονικού διαστήματος απενεργοποιείται, καλώντας την αρχική UserForm του λογισμικού. Η αρχική UserForm του λογισμικού διαιρείται λειτουργικά σε τέσσερις περιοχές (**Εικόνα 4.2**).



**Εικόνα 4.2.** Αρχική UserForm του λογισμικού GroPIN

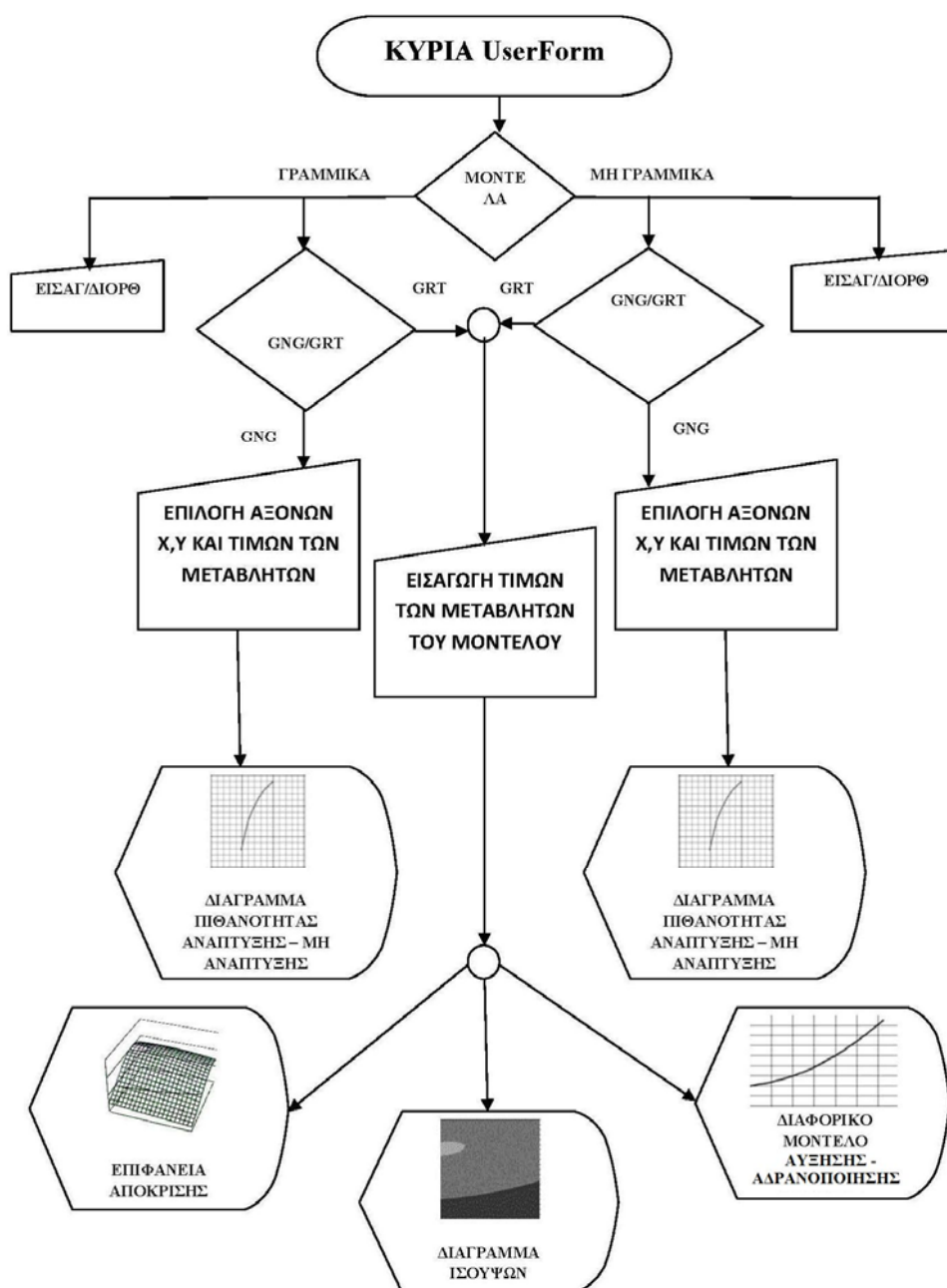
Η περιοχή “1” επιτρέπει την πρόσβαση του χρήστη στο αποκρυμμένο (hidden) περιβάλλον Microsoft Excel®. Η πράξη αυτή πραγματοποιείται με το πάτημα του “διακριτικού” πλήκτρου ελέγχου. Η περιοχή “2” περιλαμβάνει τα πλήκτρα ελέγχου με τα οποία πραγματοποιείται αρχικά η εισαγωγή (ENTRY) και η μεταβολή (UPDATE) ενός μικροβιακού μοντέλου. Με το πλήκτρο ελέγχου “SELECT” είναι δυνατή η επιλογή ενός μοντέλου. Το μοντέλο εκείνο ορίζεται ως ενεργό μοντέλο (active model). Με το πλήκτρο ελέγχου “SOLVE” επιλύεται το ενεργό μοντέλο. Ο τρόπος επίλυσης του εξαρτάται από την κατηγορία στην οποία ανήκει (**Εικόνα 4.3**). Στην περιοχή “3” εμφανίζεται το ενεργό μοντέλο μετά την επιλογή του, ενώ στην περιοχή “4” λαμβάνουν χώρα αφενός η διαδικασία καθαρισμού των δεδομένων της προσομοίωσης καθώς και η έξοδος από το λογισμικό (**Εικόνα 4.2**).

#### 4.3. Εισαγωγή μικροβιακών μοντέλων στη βάση δεδομένων

Υπάρχουν δύο μέθοδοι για την καταχώρηση των μικροβιακών μοντέλων στη βάση δεδομένων του λογισμικού GroPIN.

Η πρώτη μέθοδος αφορά στην καταχώρηση των μικροβιακών μοντέλων απευθείας στο φύλλο εργασίας “NonLinear” του περιβάλλοντος Microsoft Excel® του λογισμικού GroPIN. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για μαζική καταχώρησή τους. Η πρόσβαση στο γραμμικό περιβάλλον καταχώρησης λαμβάνει χώρα από την περιοχή “1” της αρχικής UserForm του λογισμικού (**Εικόνα 4.2**), ενώ η διαχείριση των



δεδομένων περιλαμβάνει την εφαρμογή όλων των ενσωματωμένων εργαλείων του Microsoft Excel® ( αντιγραφή, επικόλληση, αποθήκευση κ.ά. ). Η επιστροφή στην



**Εικόνα 4.3.** Επίλυση του ενεργού μοντέλου ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκει

αρχική UserForm του λογισμικού πραγματοποιείται από την επιλογή “RETURN” της προσαρμοσμένης γραμμής εργαλείων (Custom Toolbar).


Η δεύτερη μέθοδος περιλαμβάνει την καταχώρηση των μικροβιακών μοντέλων μέσω του πλήκτρου ελέγχου “ENTRY” της αρχικής UserForm. Τότε, ενεργοποιείται η UserForm “Linear & Non Linear Models Entry” στην οποία

λαμβάνει χώρα η καταχώρηση των δεδομένων του μοντέλου σε τρεις φάσεις, οι οποίες διαχωρίζονται από δύο χρωματικές περιοχές. Η πρώτη και η δεύτερη φάση περιλαμβάνουν την καταχώρηση των δεδομένων στα ενεργοποιημένα πεδία, στο αριστερό τμήμα της UserForm το οποίο έχει γκρι χρώμα. Η τρίτη φάση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των πεδίων στη μπλε περιοχή της UserForm. Η ενεργοποίηση των πεδίων τόσο στην γκρι όσο στη μπλε περιοχή γίνεται με το πάτημα του αντίστοιχου πλήκτρου ελέγχου αποδοχής “” αφού πρώτα λάβει χώρα συντακτικός έλεγχος των δεδομένων από το λογισμικό. Εάν διαπιστωθεί από το λογισμικό ότι τα δεδομένα των πεδίων έχουν καταχωρηθεί σύμφωνα με τις προδιαγραφές που έχουν οριστεί στον κώδικα ελέγχου, τότε λαμβάνει χώρα εισαγωγή των δεδομένων στη βάση με το πάτημα του αντίστοιχου πλήκτρου “”.

Αρχικά, εισάγεται ο μικροοργανισμός, ενώ στη συνέχεια εισάγεται το υπόστρωμα. Κατόπιν ορίζεται η κατηγορία του μοντέλου (“GNG” για μοντέλο πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης, “GRT” για μοντέλο αύξησης και “INA” για μοντέλο αδρανοποίησης). Εάν επιλεγεί η τιμή “GRT” ή “INA”, τότε ορίζεται ο μετασχηματισμός έκφρασης του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης  $\mu_{max}$ . Οι τρεις διαθέσιμες επιλογές είναι:  $\ln\langle\mu\rangle_{max}$ ,  $\langle\mu\rangle_{max}$  ή  $\sqrt{\langle\mu\rangle_{max}}$ . Εάν επιλεγεί η τιμή “GNG”, τότε δεν λαμβάνεται υπόψη καμία από τις παραπάνω τιμές κατά την εισαγωγή του μοντέλου.

Η μορφή της γραφικής απεικόνισης του μικροβιακού μοντέλου ορίζεται από το αναπτυσσόμενο μενού επιλογών. Οι δυνατές επιλογές είναι:



2. Kinetic curve: Το μοντέλο μπορεί να απεικονιστεί γραφικά με τη μορφή καμπύλης ανάπτυξης ή αδρανοποίησης ανάλογα με το χαρακτηρισμό του μοντέλου.
3. Response surface: Το μικροβιακό μοντέλο μπορεί να απεικονιστεί γραφικά με τη μορφή μοντέλου επιφάνειας απόκρισης.
4. Response surface (time to x log): Το μικροβιακό μοντέλο μπορεί να απεικονιστεί γραφικά με τη μορφή μοντέλου επιφάνειας απόκρισης στο οποίο όμως εμπεριέχεται ο υπολογισμός του χρόνου για δεδομένη λογαριθμική αύξηση/μείωση.
5. Kinetic curve & response surface.
7. Response surface & response surface (time to x log).
8. Kinetic curve & response surface (time to x log).



Στη συνέχεια, πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “”, πραγματοποιείται η μετάβαση στη δεύτερη φάση όπου γίνεται η εισαγωγή των μεταβλητών (variables) του μοντέλου. Η μετάβαση αυτή πραγματοποιείται μόνο όταν ο αυτόματος έλεγχος



διαπιστώσει ότι το μοντέλο το οποίο εισάγεται δεν είναι ήδη καταχωρημένο. Επίσης ελέγχεται εάν το στοιχείο εισαγωγής δεδομένων στο οποίο ορίζεται η ονομασία του μοντέλου και το υπόστρωμα είναι κενό, οπότε αίρεται η μετάβαση έως ότου συμπληρωθούν τα πεδία.

Αφού πραγματοποιηθεί η μετάβαση, συμπληρώνονται αρχικά, ανάλογα με το μοντέλο, από δύο έως δέκα μεταβλητές με τα αντίστοιχα εύρη των τιμών τους. Οι μεταβλητές με τη διάταξη {x, y, z, d, e, f, g, h, i και j} συμμετέχουν στην επίλυση των μοντέλων. Ο ορισμός των επιθυμητών μεταβλητών γίνεται πάντα σειριακά, ορίζοντας αρχικά την ετικέτα τους και στη συνέχεια το εύρος των τιμών τους. Οι στήλες που περιλαμβάνουν τα αντίστοιχα πεδία είναι οι “Define the variables” (ετικέτες) και “Range (From/To)”. Παράδειγμα: Η μεταβλητή x μπορεί να έχει την ετικέτα pH, με εύρος τιμών από 1 (From) έως 3 (To). Το λογισμικό αποκλείει τη μετάβαση στην τρίτη φάση (ενεργοποίηση των πεδίων της μπλε περιοχής) στις περιπτώσεις που (i) έχει ορισθεί το εύρος τιμών μόνο μίας μεταβλητής, και (ii) έχει εισαχθεί κάποια αλφαριθμητική ή κενή τιμή στα στοιχεία εισαγωγής δεδομένων τα οποία έχουν οριστεί ως αριθμητικά.

Η μετάβαση στην τρίτη φάση εισαγωγής των δεδομένων πραγματοποιείται με το πλήκτρο ελέγχου “”. Με το πλήκτρο ελέγχου “” λαμβάνει χώρα ακύρωση της εισαγωγής των δεδομένων του μοντέλου και επιστροφή στην πρώτη φάση. Κατά τη μετάβαση στην τρίτη φάση, ο αριθμός των μεταβλητών απεικονίζεται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας “Number of variables”. Στη φάση αυτή μπορούν να οριστούν μέχρι είκοσι συντελεστές με τις αντίστοιχες τιμές τους καθώς και η εξίσωση επίλυσης του μοντέλου στο στοιχείο εισαγωγής δεδομένων “write the equation (only UPPERCASE)”. Η εξίσωση ορίζεται πάντα με κεφαλαίους χαρακτήρες, αντικαθιστώντας τις ετικέτες των μεταβλητών με τις αντίστοιχες ειδικές μεταβλητές “Equation variables”, και τις ετικέτες των συντελεστών με τους αντίστοιχους ειδικούς συντελεστές. Η καταχώρηση της εξίσωσης κάθε μοντέλου στη βάση δεδομένων αποτελεί μέρος του καινοτόμου μηχανισμού του λογισμικού GroPIN.

Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “” πραγματοποιείται συντακτικός έλεγχος της τρίτης φάσης. Εάν δεν υπάρχει κάποιο σφάλμα κατά την εισαγωγή των δεδομένων, τα δεδομένα και των τριών φάσεων καταχώρησης μεταφέρονται σε συγκεκριμένα κελιά του φύλλου δεδομένων “Nonlinear” (**Πίνακας 4.1**), αφού ταξινομηθούν αρχικά κατά κατηγορία μοντέλου (GNG ή GRT) και στη συνέχεια κατά αύξουσα σειρά μικροοργανισμού. Με το πλήκτρο ελέγχου “”

πραγματοποιείται ακύρωση της εισαγωγής των δεδομένων του μοντέλου και επιστροφή στην αρχική UserForm.

Το περιβάλλον των λογισμικών αποτελεί διαφορετικό πεδίο έκφρασης των μαθηματικών εξισώσεων όσον αφορά τόσο στην κωδικοποίησή τους όσο και στην επίλυσή τους αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκε ένας καινοτόμος μηχανισμός διαχείρισης των εξισώσεων, η φιλοσοφία του οποίου στηρίζεται στις αρχές εισαγωγής και επίλυσής τους σε περιβάλλον Microsoft Excel<sup>®</sup>, αλλά είναι προσαρμοσμένος στις εξειδικευμένες λειτουργίες του λογισμικού GroPIN. Η καταχώρηση της εξίσωσης ενός μικροβιακού μοντέλου περιλαμβάνει αρχικά την κωδικοποίηση της με κριτήριο τις ειδικές μεταβλητές και τους ειδικούς συντελεστές οι οποίοι εμφανίζονται δίπλα από τις ετικέτες, ενώ στη συνέχεια την εισαγωγή της στο πεδίο “Write the equation (only UPPERCASE):” της UserForm “Linear & Non Linear Models entry:” με κεφαλαίους χαρακτήρες σε γραμμική μορφή. Η εξίσωση εισάγεται στο αντίστοιχο πεδίο της στήλης “CQ” του φύλλου δεδομένων “NonLinear”.

#### 4.3.1. Μελέτη περίπτωσης 1: Εισαγωγή ενός μη γραμμικού μοντέλου στη βάση δεδομένων

Έστω το μη γραμμικό μοντέλο πρόβλεψης της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Botrytis cinerea* στα σταφύλια (Judet-Correia et al., 2010) με δεδομένα:

Υπόστρωμα ανάπτυξης: PDA (Potato Dexture Agar)

Κατηγορία μοντέλου: Κινητικό μοντέλο ανάπτυξης

Μετασχηματισμός επίλυσης: Μοντέλο τετραγωνικής ρίζας

Εξίσωση μοντέλου:

$$\mu_{\max}^{0.5} = \left[ \frac{(T - T_{\max})(T - T_{\min})^2}{(T_{opt} - T_{\min})[(T_{opt} - T_{\min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{\max})(T_{opt} + T_{\min} - 2T)]} \right]^{0.5} \quad (4.9)$$

Μεταβλητές:

Θερμοκρασία (T)= 7-25°C

Συντελεστές:


$$T_{\min} = -1.39$$


$$T_{\text{opt}} = 21.4$$

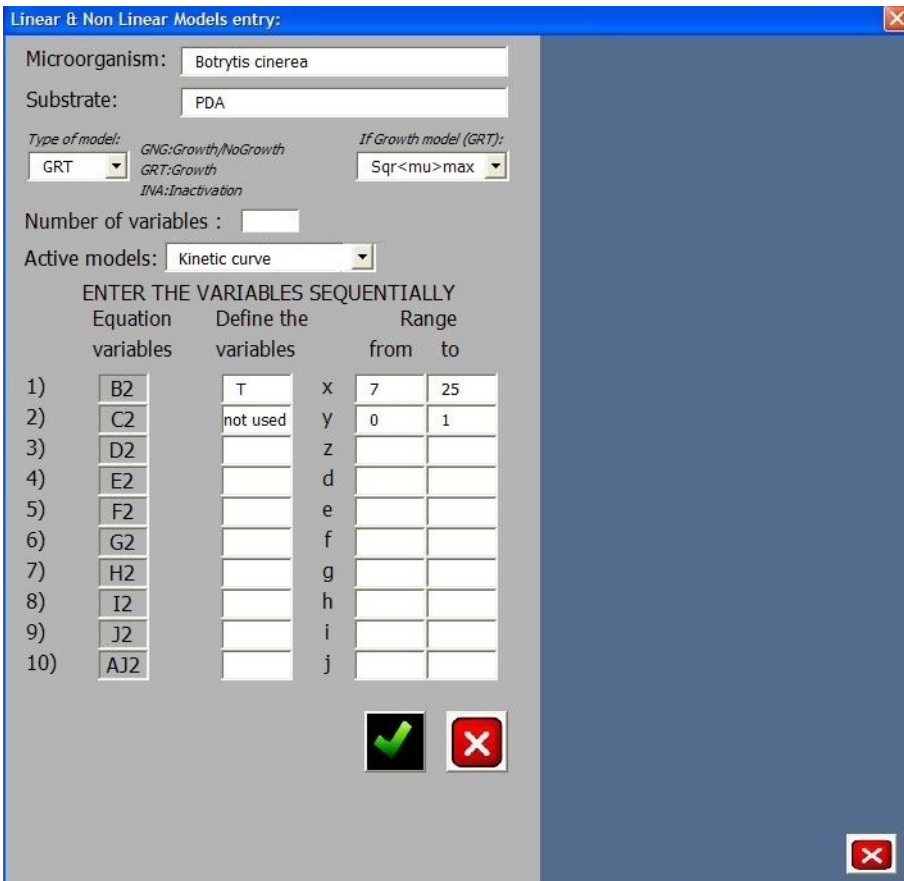
$$T_{\max} = 29.1$$

Η εισαγωγή του μοντέλου στη βάση δεδομένων του λογισμικού λαμβάνει χώρα πατώντας την επιλογή “ENTRY” της αρχικής UserForm. Τότε εμφανίζεται η UserForm εισαγωγής “Non Linear Models Entry”. Στο πρώτο στοιχείο εισαγωγής δεδομένων εισάγονται τα χαρακτηριστικά του μοντέλου. Στη συνέχεια ορίζεται το υπόστρωμα, το είδος του μοντέλου (GRT), η μορφή του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και η μορφή επίλυσης του μοντέλου (**Εικόνα 4.4**).

**Εικόνα 4.4.** Πρώτη φάση εισαγωγής του μοντέλου *Botrytis cinerea* στη βάση δεδομένων του λογισμικού GroPIN: Εισαγωγή των γενικών χαρακτηριστικών του μοντέλου

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “” είναι δυνατό να οριστούν οι μεταβλητές της εξίσωσης 4.9 με τα αντίστοιχα εύρη τιμών τους (Εικόνα 4.5). Το λογισμικό δέχεται από δύο έως δέκα μεταβλητές για καταχώρηση. Στην περίπτωση του συγκεκριμένου μοντέλου (με μία μεταβλητή) εισάγεται και μία δεύτερη η οποία αποτελεί μεταβλητή συστήματος (Sysvar) ενώ ορίζεται με την ετικέτα: “not used” (standard format) και δέχεται τιμές από 0 έως 1 έτσι ώστε να ικανοποιηθούν οι συνθήκες εισαγωγής του μοντέλου. Η εικονική αυτή μεταβλητή δεν συνεισφέρει στην επίλυση του μοντέλου αφού δεν ορίζεται κατά την εισαγωγή της εξίσωσης.

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “” επικυρώνεται η εισαγωγή των δεδομένων της πρώτης και δεύτερης φάσης, τα δεδομένα όμως δεν έχουν μεταφερθεί ακόμα στη βάση δεδομένων.



Linear & Non Linear Models entry:

Microorganism: Botrytis cinerea

Substrate: PDA

Type of model: GRT



If Growth model (GRT): Sqr<mu>max

Number of variables:

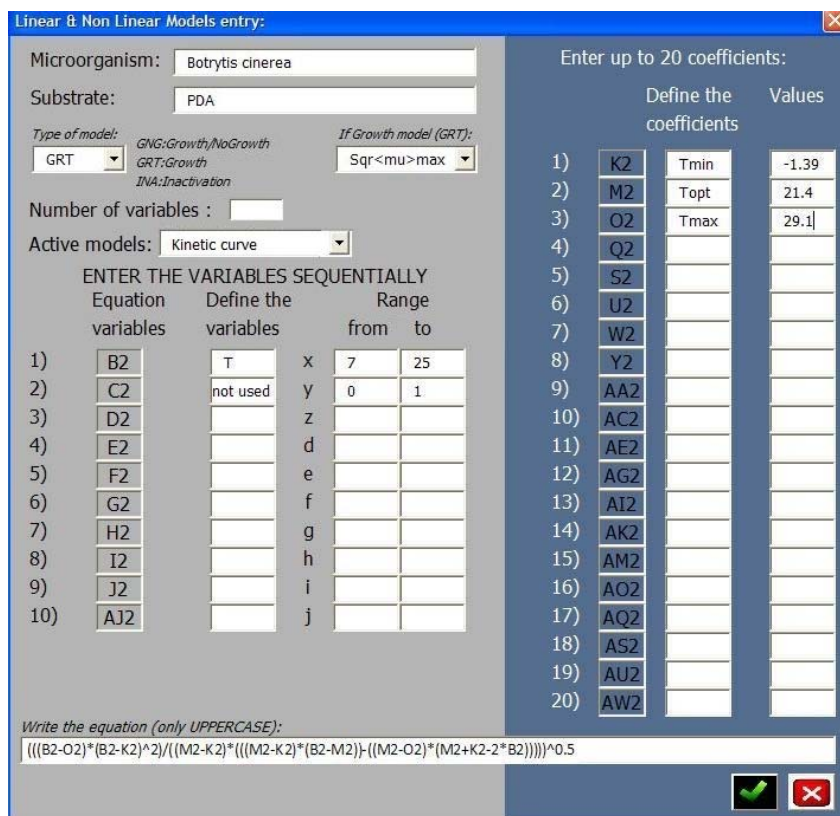
Active models: Kinetic curve

ENTER THE VARIABLES SEQUENTIALLY

	Equation variables	Define the variables		Range from	to
1)	B2	T	x	7	25
2)	C2	not used	y	0	1
3)	D2		z		
4)	E2		d		
5)	F2		e		
6)	G2		f		
7)	H2		g		
8)	I2		h		
9)	J2		i		
10)	AJ2		j		

**Εικόνα 4.5.** Δεύτερη φάση εισαγωγής του μοντέλου *Botrytis cinerea* στη βάση δεδομένων του λογισμικού GroPIN: Εισαγωγή των μεταβλητών της εξίσωσης του μικροβιακού μοντέλου



Εικόνα 4.6. Τρίτη φάση εισαγωγής του μοντέλου *Botrytis cinerea* στη βάση δεδομένων του λογισμικού GroPIN: Εισαγωγή των συντελεστών και της εξίσωσης του μοντέλου

Η τρίτη φάση εισαγωγής των δεδομένων του μοντέλου περιλαμβάνει την εισαγωγή των συντελεστών της **εξίσωσης 4.9** καθώς και την ίδια την **εξίσωση 4.9** αφού πρώτα έχει κωδικοποιηθεί σύμφωνα με τις ειδικές μεταβλητές (equation variables). Η κωδικοποιημένη εξίσωση η οποία εισάγεται στο στοιχείο εισαγωγής δεδομένων “write the equation (only UPPERCASE)” είναι:

$$\mu_{max}^{0.5} = \left[ \frac{(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]} \right]^{0.5}$$

B2-O2
(B2-K2)<sup>2</sup>

M2-K2
M2-K2
B2-M2
M2-O2
M2+K2-2\*B2

Κωδικοποίηση της εξίσωσης σύμφωνα με τις ειδικές μεταβλητές και του ειδικούς συντελεστές του λογισμικού GroPIN

(4.10)

$$\left( \frac{((B2-O2) \cdot (B2-K2)^2)}{((M2-K2) \cdot ((M2-K2) \cdot (B2-M2)) - ((M2-O2) \cdot (M2+K2 - 2 \cdot B2)))} \right)^{0.5} \quad (4.10)$$

#### 4.3.2. Μελέτη περίπτωσης 2: Εισαγωγή ενός γραμμικού μοντέλου στη βάση δεδομένων

Έστω το γραμμικό μοντέλο πρόβλεψης της επίδρασης της θερμοκρασίας, της οξύτητας (pH) και της ενεργότητας του νερού στην ανάπτυξη του ασκομύκητα *Monascus ruber*. Οι συνθήκες ανάπτυξης του ασκομύκητα οι οποίες περιγράφονται από το μοντέλο είναι (Panagou et al., 2003):

Υπόστρωμα ανάπτυξης: Malt extract agar

Κατηγορία μοντέλου: Κινητικό μοντέλο ανάπτυξης

Μετασηματισμός επίλυσης: Λογαριθμικό μοντέλο

$$\ln \mu_{\max} = a_0 + a_T \cdot T + a_{T^2} \cdot T^2 + a_{pH} \cdot pH + a_{pH^2} \cdot pH^2 + a_{bw} \cdot bw + a_{bw^2} \cdot bw^2 + a_{TpH} \cdot T \cdot pH + a_{Tbw} \cdot T \cdot bw + a_{pHbw} \cdot pH \cdot bw \quad (4.10)$$

Μεταβλητές:

$$\text{Θερμοκρασία (T)} = 20-40^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 3.5-5$$

$$\text{Ενεργότητα νερού (bw)} = 0.2073-0.2509$$

Συντελεστές:

$$a_0 = -10.031$$

$$a_x = 0.3249$$

$$a_x^2 = -0.0067$$

$$a_y = 1.04863$$

$$a_y^2 = -0.1282$$

$$a_{bw} = 56.4765$$

$$a_{bw}^2 = -156.33$$

$$a_{xy} = 0.01562$$

$$a_{xbw} = 0.35818$$

$$a_{ybw} = -2.9354$$

Η γραμμική **εξίσωση 4.10** κωδικοποιείται σύμφωνα με τις ειδικές μεταβλητές και τους ειδικούς συντελεστές ως εξής:

$$K_2 + (M_2 * B_2) + (O_2 * (B_2^2)) + (Q_2 * C_2) + (S_2 * (C_2^2)) + (U_2 * D_2) + (W_2 * (D_2^2)) + (Y_2 * B_2 * C_2) + (AA_2 * B_2 * D_2) + (AC_2 * C_2 * D_2) \quad (4.11)$$

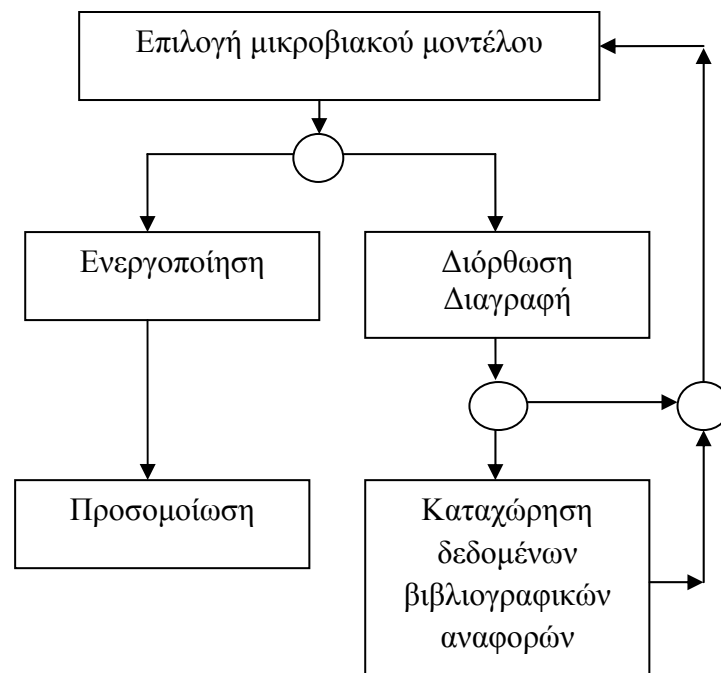
Η εισαγωγή του στη βάση δεδομένων ακολουθεί τη μορφή:

$$e^{\text{εξίσωση 4.11}} / (1 + e^{\text{εξίσωση 4.11}}) \quad (4.12)$$

και γίνεται σύμφωνα με τη διαδικασία η οποία περιγράφηκε στη σχετική παράγραφο.


#### 4.4. Επιλογή ενός μικροβιακού μοντέλου

Η διαδικασία επιλογής ενός μικροβιακού μοντέλου αποσκοπεί όχι μόνο στην ενεργοποίησή του (model activation) αλλά και στη διόρθωσή του ή τη διαγραφή του από την αντίστοιχη βάση δεδομένων (**Εικόνα 4.7**).

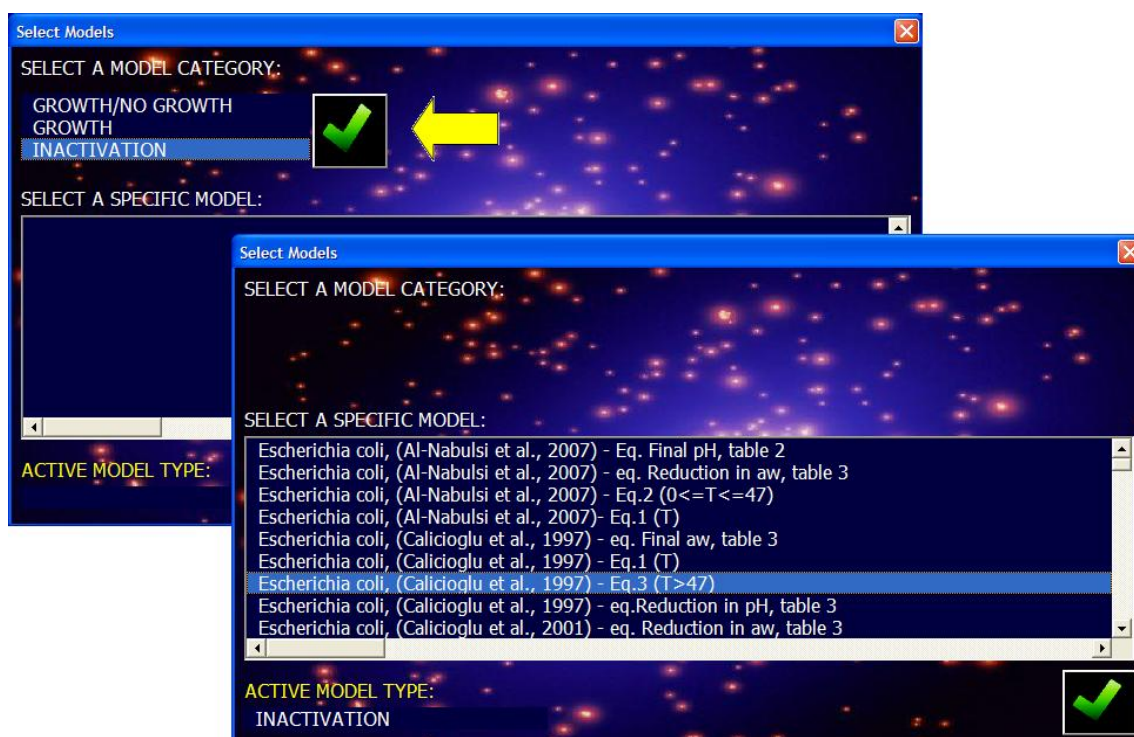


**Εικόνα 4.7.** Λειτουργίες επιλογής μικροβιακού μοντέλου




Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “SELECT” της αρχικής UserForm, εμφανίζεται η UserForm “Select Models” στην οποία εμφανίζονται οι κατηγορίες των μοντέλων που εμπεριέχονται στη βάση δεδομένων. Επιλέγοντας μία συγκεκριμένη κατηγορία και πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “” εμφανίζονται τα αντίστοιχα μικροβιακά μοντέλα ενώ ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα η απόκρυψη των κατηγοριών των μοντέλων και του αντίστοιχου πλήκτρου επιλογής τους (**Εικόνα 4.8**).

Το πεδίο “ACTIVE MODEL TYPE” περιλαμβάνει την κατηγορία του επιλεγμένου μοντέλου με τις τιμές: GROWTH/NO GROWTH, GROWTH, INACTIVATION.

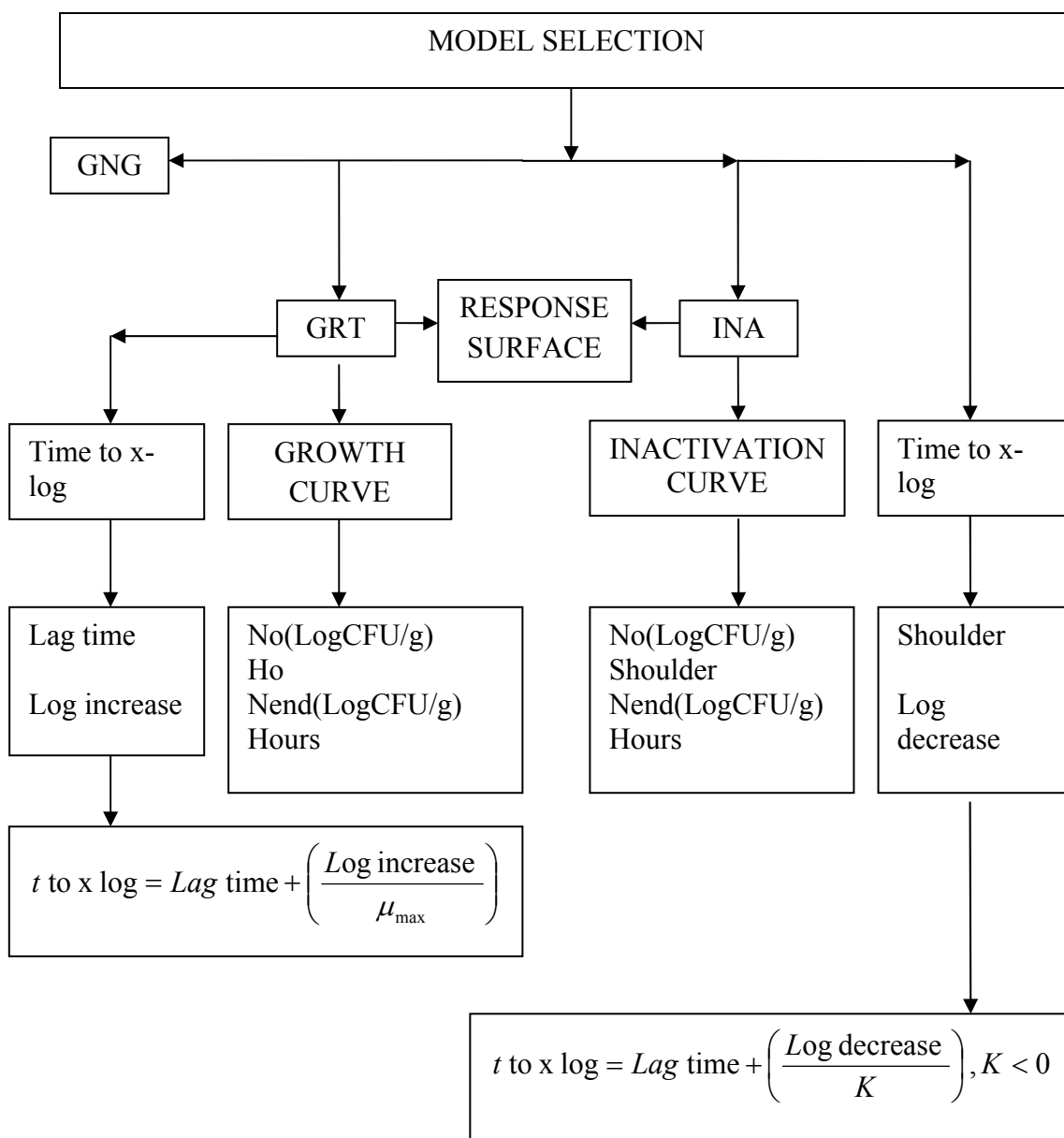


**Εικόνα 4.8.** Διαδικασία επιλογής μικροβιακού μοντέλου

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “”, το μοντέλο ενεργοποιείται ενώ το είδος του μικροοργανισμού εμφανίζεται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας “Active model” της αρχικής UserForm.

Ανάλογα με την κατηγορία του μοντέλου (GNG, GRT ή INA), το μοντέλο επιλέγεται με διαφορετικό τρόπο (**Εικόνα 4.9**).





**Εικόνα 4.9.** Η ενεργοποίηση ενός μοντέλου περιλαμβάνει και τον τρόπο επίλυσής του ανάλογα με την κατηγορία στην οποία ανήκει


Εάν το επιλεγμένο μοντέλο (Εικόνα 4.8) περιλαμβάνει τη μεταβλητή ενεργότητας νερού  $a_w$  ή  $b_w$ , τότε εμφανίζεται η UserForm επιλογής των μετασχηματισμών της ενεργότητας του νερού (Εικόνα 4.10).



$$bw = \sqrt{1 - aw} \quad (4.13)$$

$$aw = 1 - bw^2 \quad (4.14)$$

**Εικόνα 4.10.** UserForm μετασχηματισμού της μεταβλητής της ενεργότητας του νερού και αντίστοιχες εξισώσεις (Gibson et al., 1994). Η εξίσωση **4.13** επιτρέπει την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου (Mataragas et al., 2006).

Εάν επιλεγεί η καταχωρημένη μεταβλητή του μικροβιακού μοντέλου, τότε η τιμή της θα παραμείνει αναλλοίωτη αλλιώς θα υποστεί μετατροπή σύμφωνα με τις εξισώσεις **4.13** και **4.14**. Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “”, η κατηγορία του ενεργού μοντέλου εμφανίζεται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας “Type of model” της αρχικής UserForm. Οι δυνατές τιμές που μπορεί να πάρει αυτό το πεδίο είναι: Inactivation, Kinetic, Probability(G/NG).

#### 4.5. Διόρθωση και διαγραφή ενός μικροβιακού μοντέλου

Αφού πραγματοποιηθεί η επιλογή του μοντέλου από το χρήστη, τότε από την αρχική UserForm πραγματοποιείται διόρθωση, διαγραφή ή καταχώρηση των βιβλιογραφικών δεδομένων αναφοράς των μικροβιακών, πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “UPDATE”. Ενεργοποιείται τότε η UserForm “VIEW and UPDATE MODEL”, όπου εμφανίζονται οι τιμές των αντίστοιχων πεδίων του επιλεγμένου μικροβιακού μοντέλου. Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλει τις υπάρχουσες τιμές καταχωρώντας νέες στα αντίστοιχα στοιχεία εισαγωγής δεδομένων και πατώντας τα πλήκτρα ελέγχου “UPDATE”. Οι τροποποιήσεις γίνονται αποδεκτές από το λογισμικό μόνο εφόσον ο χρήστης, πριν πατήσει το πλήκτρο ελέγχου “ACCEPT CHANGES”, έχει συμπληρώσει ξανά το στοιχείο εισαγωγής δεδομένων “Microorganism”. Η συμπλήρωση του συγκεκριμένου πεδίου αποτελεί ένδειξη της επιβεβαίωσης των τροποποιήσεων. Ο χρήστης έχει επίσης τη δυνατότητα να διαγράψει ολόκληρο το μικροβιακό μοντέλο πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “DELETE RECORD” (**Εικόνα 4.11**).

#### 4.5.1. Εισαγωγή βιβλιογραφικών δεδομένων αναφοράς ενός μικροβιακού μοντέλου

Από την επιλογή της διόρθωσης των μικροβιακών μοντέλων λαμβάνει χώρα η καταχώρηση των δεδομένων τα οποία αφορούν στη βιβλιογραφική αναφορά ενός συγκεκριμένου μοντέλου. Εάν ένα καταχωρημένο μοντέλο προέρχεται από δημοσιευμένη εργασία, τότε ο χρήστης αρχικά εισάγει τους συγγραφείς στο πεδίο “AUTHORS”, κατόπιν τον τίτλο της δημοσίευσης στο πεδίο “PAPER”, στη συνέχεια το περιοδικό στο οποίο έχει γίνει η δημοσίευση (πεδίο “JOURNAL”). Τέλος ο χρήστης καταχωρεί το τεύχος (ή και τον τόμο) καθώς και τις σελίδες της δημοσίευσης (πεδίο “ISSUE/PAGE”). Σε κάθε μία από τις προηγούμενες περιπτώσεις ο χρήστης ενεργοποιεί το πλήκτρο ελέγχου “UPDATE” ώστε οι νέες καταχωρήσεις να εισαχθούν στη βάση δεδομένων. Απαραίτητη είναι η καταχώρηση ξανά του τίτλου του μοντέλου στο πεδίο “Microorganism” και η ενεργοποίηση του αντίστοιχου πλήκτρου ελέγχου “UPDATE”. Η μεταφορά των τροποποιήσεων στη βάση δεδομένων πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση του πλήκτρου ελέγχου “ACCEPT CHANGES” (Εικόνα 4.11).

The screenshot shows a software interface titled "VIEW and UPDATE MODEL". It contains several sections for data entry and control:

- Microorganism:** A text field containing "Escherichia coli, (Calicioglu et al., 1997) - eq. Final av" with an "UPDATE" button.
- Substrate:** A text field containing "Semidry beef summer sausage" with an "UPDATE" button.
- Type of model:** A dropdown menu set to "GRT-Growth".
- Growth/NoGrowth Models:** A section with dropdowns for "GRT" (set to "GNG") and "INA", and a "Number of variables" field set to "3".
- VAR:** A table with columns for "View", "Update", "View Range", and "Update Range". It lists variables B2 through AJ2 with their respective values and update buttons.
- View the equation:** A text field showing the equation  $D2^{*}(-10.1371)+11.0802$ .
- Update (UPPERCASE):** A text field with an "UPDATE" button.
- Authors:** A text field containing "Calicioglu, M., Faith, N. G., Buege, D." with an "UPDATE" button.
- Journal:** A text field containing "Journal of Food Protection" with an "UPDATE" button.
- PAPER:** A text field containing "Viability of Escherichia coli O157:H7" with an "UPDATE" button.
- ISSUE/PAGE:** A text field containing "60, 1158-1162" with an "UPDATE" button.
- COEFFICIENTS:** A table with columns for "View", "Update", "View", and "Update". It lists coefficients K2 through AW2 with their values and update buttons.
- Buttons:** "DELETED RECORD" and "ACCEPT CHANGES" buttons are located at the bottom right.

**Εικόνα 4.11.** UserForm διόρθωσης, διαγραφής και καταχώρησης βιβλιογραφικών δεδομένων αναφοράς ενός μικροβιακού μοντέλου

#### 4.6. Πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού ενός μικροβιακού μοντέλου

Βασική προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της διαδικασίας αυτής αποτελεί η επιλογή ενός μικροβιακού μοντέλου που ανήκει στην κατηγορία “GROWTH/NO GROWTH” (GNG). Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “SOLVE”, ενεργοποιείται η διαδικασία πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού που περιλαμβάνεται στο ενεργό μοντέλο.

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “SOLVE” εμφανίζεται η έκδοση της UserForm “Set the variables” (Εικόνα 4.12) που αφορά στη διαχείριση των μεταβλητών για τα μοντέλα πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης.

Οι πληροφορίες που παρέχει η UserForm στο χρήστη αφορούν στην απεικόνιση:

- (i) Των μεταβλητών της εξίσωσης με τα αντίστοιχα εύρη τιμών τους,
- (ii) των συντελεστών των μεταβλητών με τις τιμές τους,
- (iii) του συνολικού αριθμού των μεταβλητών, και
- (iv) του μικροοργανισμού του ενεργού μοντέλου.

Οι λειτουργίες της UserForm περιλαμβάνουν:

- (i) Τον ορισμό των μεταβλητών του μοντέλου που αντιπροσωπεύονται στους άξονες  $x$  και  $y$ ,
- (ii) τον ορισμό των υπόλοιπων μεταβλητών του μοντέλου,
- (iii) την απεικόνιση των χαρακτηριστικών του ενεργού μοντέλου, και
- (iv) την εκτέλεση της προσομοίωσης του ενεργού μοντέλου.

Αρχικά, με το αναπτυσσόμενο μενού επιλογών “ $x$ ”, επιλέγεται μία μεταβλητή από λίστα όλων των διαθέσιμων μεταβλητών του μοντέλου, οι τιμές της οποίας θα αντιπροσωπεύονται στον άξονα  $x$  του διαγράμματος της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Με το πλήκτρο ελέγχου “

Set the variables

T	x	10	35
pH	y	3,52	7,32
bw	z	0,07	0,249
	d		
	e		
	f		
	g		
	h		
	i		
	j		

x

y

Rest variables

3

Enter values:

T

pH

bw

Escherichia co

MODEL INFO

GROWTH NO GROWTH

**Εικόνα 4.12.** UserForm διαχείρισης μεταβλητών για την πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης μη ανάπτυξης του ενεργού μικροβιακού μοντέλου


$$\text{Variable x - axis : } \left\{ \begin{array}{l} [X_2] = Range_{from} \\ [X_x] = \frac{Range_{from} - Range_{to}}{75} + [X(x-1)], x \in (3,77) \end{array} \right\} \quad (4.15)$$


όπου:

Range<sub>from</sub> είναι η αρχική τιμή του εύρους της μεταβλητής,


Range<sub>to</sub> είναι η αντίστοιχη τελική τιμή.

Εάν X είναι η στήλη του ενεργού φύλλου δεδομένων που έχει οριστεί ώστε να λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των δεδομένων της **εξίσωσης 4.15**, τότε [X2] είναι η τιμή του αρχικού κελιού και x είναι ο αριθμός των κελιών της στήλης X.

Ταυτόχρονα, λαμβάνει χώρα αυτόματη απόκρυψη του πλήκτρου ελέγχου “” με σκοπό την προστασία της διαδικασίας από πιθανό σφάλμα χειρισμού εκ μέρους του χρήστη. Ο αριθμός των μεταβλητών ελαττώνεται κατά έναν, ενώ η αντίστοιχη μεταβλητή που είναι διαθέσιμη για να δεχθεί την εισαγωγή τιμής στην ενότητα της UserForm “Enter values”, απενεργοποιείται.


Στη συνέχεια, με το αναπτυσσόμενο μενού επιλογών “y”, επιλέγεται με την αντίστοιχη διαδικασία μία μεταβλητή, οι τιμές της οποίας θα αντιπροσωπεύονται στον άξονα y του γραφήματος. Το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “” δεξιά του “y” έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη των τιμών της αντίστοιχης μεταβλητής στα κελιά του ενεργού φύλλου δεδομένων που έχουν οριστεί για το σκοπό αυτό, έστω τα κελιά [Y2:Y77], σύμφωνα με την **εξίσωση 4.16**:

$$\text{Variable } y \text{ - axis} = \left( \frac{\text{Range}_{from} + \text{Range}_{to}}{2} \right)_{[Y2:Y77]} \quad (4.16)$$

Η αποδοχή της μεταβλητής έχει επίσης σαν αποτέλεσμα την ελάττωση του αριθμού των μεταβλητών κατά έναν ακόμη και την απενεργοποίηση της αντίστοιχης διαθέσιμης μεταβλητής στην ενότητα της UserForm “Enter values”. Έχει ληφθεί μέριμνα ώστε εάν στο αναπτυσσόμενο μενού επιλογών “y” επιλεγθεί η ίδια μεταβλητή με αυτήν του αναπτυσσόμενου μενού επιλογών “x”, τότε το αντίστοιχο πλήκτρο ελέγχου “” δεξιά του “y” να μην αποκρύπτεται, παρεμποδίζοντας την αποδοχή της.

Στη συνέχεια ορίζονται οι τιμές των υπόλοιπων διαθέσιμων μεταβλητών του μοντέλου στην ενότητα “Enter values” πάντοτε εντός των επιτρεπτών ορίων των τιμών τους, όπως αυτά εμφανίζονται στο αντίστοιχο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας της ενεργής UserForm. Ο αριθμός που απεικονίζεται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας “Rest variables” είναι αντιπροσωπευτικός των υπόλοιπων διαθέσιμων μεταβλητών μετά από τον ορισμό των μεταβλητών των αξόνων x και y. Σε περίπτωση που η τιμή μίας μεταβλητής ορίζεται εκτός του επιτρεπτού εύρους τιμών ή είναι κενή, τότε δεν γίνεται αποδεκτή από το λογισμικό όταν πατηθεί το πλήκτρο ελέγχου “GROWTH NO GROWTH”, ενώ εμφανίζεται το μήνυμα: “Out of range. Click on exit and retry”. Εάν δεν ικανοποιηθούν οι συνθήκες καταχώρησης, το

λογισμικό δεν επιτρέπει τη μετάβαση στην επόμενη UserForm. Εξαιρέση αποτελεί η τιμή “0”, η οποία δεν υπόκειται στους ελέγχους που διενεργεί το λογισμικό.

Με το πάτημα του πλήκτρου “”,πραγματοποιείται επιστροφή στην αρχική UserForm ενώ ταυτόχρονα διαγράφεται το ενεργό μοντέλο. Σε αυτή την περίπτωση η διαδικασία επιλογής μοντέλου πρέπει να ξεκινήσει από την αρχή.

#### 4.6.1. Έλεγχος δεδομένων ενεργού μοντέλου

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “MODEL INFO”, εμφανίζεται η UserForm “MODEL-ID:” με την οποία ο χρήστης μπορεί να ελέγξει όλα τα δεδομένα του ενεργού μικροβιακού μοντέλου τα οποία περιλαμβάνουν τα περιγραφικά του στοιχεία, τις μεταβλητές της εξίσωσης σε αντιστοιχία με τις ειδικές μεταβλητές, τους συντελεστές των μεταβλητών του ενεργού γραμμικού μοντέλου σε αντιστοιχία με τους ειδικούς συντελεστές, και την εξίσωση. Ο χρήστης δύναται να ελέγξει και να μεταφράσει την εξίσωση σύμφωνα με τις ειδικές μεταβλητές και τους ειδικούς συντελεστές. Μπορεί επίσης να ελέγξει ποιες επιλογές απεικόνισης είναι ενεργοποιημένες για το ενεργό μικροβιακό μοντέλο. Επιπλέον, με το πλήκτρο ελέγχου “IS THERE A PUBLISHED PAPER?” ο χρήστης είναι δυνατόν να ελέγξει εάν υπάρχει καταχωρημένη η εργασία στην οποία περιλαμβάνεται η συγκεκριμένη εξίσωση. Εάν δεν υπάρχει καταχωρημένη δημοσίευση, τότε εμφανίζεται στο κέντρο της οθόνης το μήνυμα “Data of our own”. Το μήνυμα κλείνει πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “OK”. Εάν υπάρχει καταχωρημένη δημοσίευση τότε εμφανίζεται η UserForm “VIEW PUBLISHED PAPER”, στην οποία περιλαμβάνονται οι συγγραφείς και η ημερομηνία δημοσίευσης, ο τίτλος της εργασίας, το περιοδικό όπου έχει δημοσιευτεί η εργασία, ο αριθμός του τεύχους και οι σελίδες που καταλαμβάνει η δημοσίευση στο περιοδικό (**Εικόνα 4.13**).

#### 4.7. Μέθοδος επίλυσης του μοντέλου ανάπτυξης/μη ανάπτυξης

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “GROWTH NO GROWTH” ενεργοποιείται η UserForm “Probabilistic model”. Το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς της καλύπτεται από το στοιχείο ελέγχου εικόνας (χώρος γραφήματος), ενώ περιμετρικά του αναπτύσσονται:




**Εικόνα 4.13.** UserForm απεικόνισης ενεργού μοντέλου και δημοσίευσής του

(i) Ο αριθμός των μεταβλητών του μοντέλου, η επιλογή του οποίου μπορεί να γίνει από ένα αναπτυσσόμενο μενού επιλογών που περιλαμβάνει τις τιμές από 0.1 έως 0.9. Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν την πιθανότητα ανάπτυξης/μη ανάπτυξης των μικροοργανισμών (10-90%).

(ii) Το πλήκτρο ελέγχου αποδοχής της τιμής της πιθανότητας “Set the probability” και επίλυσης του μοντέλου.

(iii) Το πλήκτρο ελέγχου “Convert bw to aw”. Με την επιλογή αυτή λαμβάνει χώρα ο μετασχηματισμός της μεταβλητής της ενεργότητας του νερού από bw σε aw αφού πρώτα έχει αναπτυχθεί η πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης και ενώ η μεταβλητή bw έχει οριστεί στον ένα από τους δύο άξονες .

(iv) Το πλήκτρο ελέγχου “Variables comparison”. Με την επιλογή αυτή μπορεί να γίνει σύγκριση μέχρι τριών μεσεπιφανειών ανάπτυξης/μη ανάπτυξης.

Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “”, πραγματοποιείται επιστροφή στην προηγούμενη UserForm (Set the variables) στην οποία διατηρούνται οι τιμές των μεταβλητών που έχουν οριστεί από το χρήστη στα πεδία των αξόνων “x” και “y”, ενώ οι τιμές των υπόλοιπων διαθέσιμων μεταβλητών είναι κενές. Επιπλέον, εμφανίζεται ξανά ο συνολικός αριθμός των μεταβλητών του επιλεγέντος μοντέλου.



#### 4.7.1. Μηχανισμός επίλυσης του μοντέλου ανάπτυξης/μη ανάπτυξης

Ο ορισμός της μεταβλητής της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του ενεργού μοντέλου, πραγματοποιείται αρχικά με επιλογή της τιμής της πιθανότητας  $P=[0.1-0.9]$  από το αναπτυσσόμενο μενού επιλογών και στη συνέχεια με την ενεργοποίηση του πλήκτρου ελέγχου “Set the probability”.

Ενεργοποίηση της εξίσωσης: Αρχικά λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση της εξίσωσης του ενεργού μικροβιακού μοντέλου. Αυτή περιλαμβάνει:

(i) Τη μεταφορά της στο δεύτερο κελί της στήλης του φύλλου δεδομένων του λογισμικού που έχει οριστεί ειδικά για την πρόβλεψη της πιθανότητας ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

(ii) Την ενσωμάτωση στην αρχή της, του μαθηματικού συμβόλου “=”. Τότε, η εξίσωση από απλό δεδομένο μετατρέπεται σε ενεργή εξίσωση του λογισμικού, οι μεταβλητές της οποίας (ειδικές μεταβλητές) λαμβάνουν τα δεδομένα τους από τα αντίστοιχα κελιά στα οποία έχουν ήδη αναπτυχθεί τόσο οι τιμές των αξόνων x,y (σύμφωνα με τις εξισώσεις 4.15, 4.16) όσο και οι τιμές των μεταβλητών οι οποίες έχουν οριστεί από το χρήστη.

Εφαρμογή της λογιστικής παλινδρόμησης: Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “Set the probability”, ενεργοποιείται η διαδικασία της λογιστικής παλινδρόμησης η οποία εφαρμόζεται με το λογισμικό Solver που έχει ενσωματωθεί αρμονικά στον κώδικα VBA. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη λειτουργία του είναι να έχει προηγηθεί η εγκατάσταση του αρχείου Solver.xlam στο υπολογιστικό σύστημα του χρήστη. Το λογισμικό GroPIN περιλαμβάνει έναν ειδικό μηχανισμό με τον οποίο ανιχνεύει την ύπαρξη του λογισμικού Solver στον H/Y που είναι εγκατεστημένο. Εάν το λογισμικό δεν είναι εγκατεστημένο, τότε η εγκατάστασή του ενεργοποιείται αυτόματα από τη βιβλιοθήκη των πρόσθετων του Microsoft Excel<sup>®</sup> με την έναρξη του λογισμικού GroPIN.

Έχει οριστεί ότι για κάθε μεταβολή της τιμής της εξίσωσης υπό την επίδραση της τιμής της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης, μεταβάλλεται η αντίστοιχη τιμή του άξονα y.

$$\frac{e^{\text{equation}}}{1 + e^{\text{equation}} (P)} \rightarrow \text{βέλτιστη τιμή άξονα y} \quad (4.17)$$

#### 4.7.2. Γραφική απεικόνιση της πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης

Η πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού, του οποίου οι συνθήκες περιγράφονται σε κάθε ενεργό μικροβιακό μοντέλο, παριστάνεται γραφικά αφού ολοκληρωθεί η αριθμητική προσομοίωση ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του πλήκτρου ελέγχου “Set the variables”.

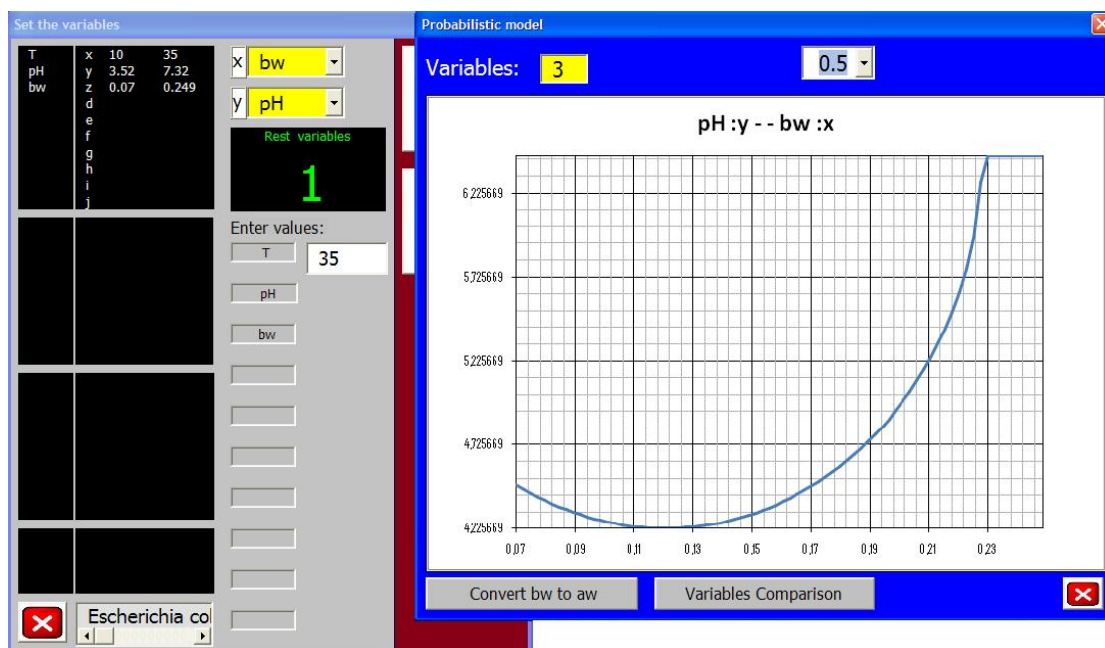
Ο τίτλος του γραφήματος (**Εικόνα 4.14**) έχει τη μορφή: {variable 1:y-variable 2:x}, εκφράζοντας την αντιστοιχία των μεταβλητών με τους άξονες y και x (πχ. Time:y - T:x). Οι τιμές “variable 1” και “variable 2” διαμορφώνονται κατά το στάδιο της επιλογής του ενεργού μοντέλου.

Η γραφική απεικόνιση της πρόβλεψης της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης εμφανίζεται στον κεντρικό χώρο της UserForm “Probabilistic model”. Ο χώρος αυτός αποτελεί ένα στοιχείο ελέγχου εικόνας και τροφοδοτείται με το γράφημα το οποίο εμπεριέχεται στο φύλλο δεδομένων όπου αναπτύσσεται η αριθμητική προσομοίωση. Η εμφάνιση του γραφήματος γίνεται κατόπιν της εντολής εκτέλεσης από το αντίστοιχο πλήκτρο ελέγχου. Ταυτόχρονα με την εμφάνιση του γραφήματος στη UserForm, σχηματίζεται το αντίστοιχο αρχείο εικόνας στην περιοχή του δίσκου όπου εκτελείται το λογισμικό με όνομα: solver.gif.

Οι διαστάσεις του γραφήματος προσαρμόζονται στη μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξης. Η προσαρμογή περιλαμβάνει αρχικά την εύρεση των μεγίστων και ελαχίστων τιμών των αξόνων x και y ενώ στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η αυτόματη προσαρμογή των αξόνων στις αντίστοιχες μέγιστες και ελάχιστες τιμές (**Εικόνα 4.14**).

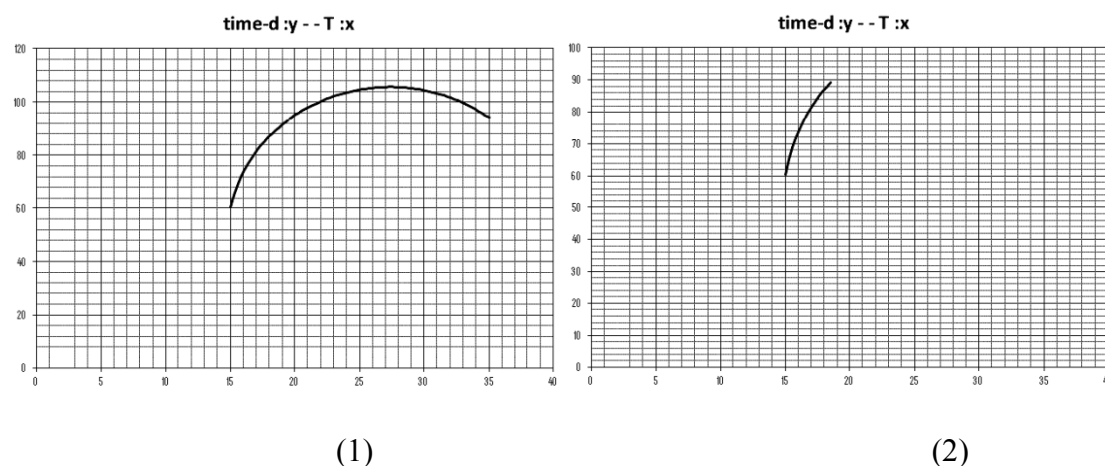
Μετά το πέρας της αριθμητικής προσομοίωσης, έχει ληφθεί μέριμνα ώστε να αποκλείονται οι παραχθείσες τιμές που δεν ανήκουν στο καθορισμένο εύρος τιμών της μεταβλητής του άξονα y, μετά από την τροποποίηση που έχουν υποστεί υπό τη δράση του λογισμικού Solver.

Η γενική μορφή του κώδικα (hardcode) που ελέγχει αυτή τη διαδικασία είναι: `If ActiveSheet.Range [2:77] > valmax or ActiveSheet.Range [2:77] < valmin then ActiveSheet.Range [2:77] = ""`, όπου οι μεταβλητές valmin και valmax εκφράζουν τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή της μεταβλητής που έχει επιλεγεί ώστε οι τιμές της να απεικονίζονται στον άξονα y, ενώ [2:77] είναι τα αντίστοιχα κελιά όπου περιλαμβάνονται οι τιμές.



**Εικόνα 4.14.** Πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Escherichia coli* (Model: *Escherichia coli*, (Skandamis et al., 2007)-(bw selection), 2nd experiment, TSB-G), του οποίου οι συνθήκες ανάπτυξης περιγράφονται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας της UserForm “Set the variables”. Η μεταβλητή bw αντιπροσωπεύεται στον άξονα x και το pH, στον άξονα y. Η θερμοκρασία έχει οριστεί στους 35°C.

Ο αποκλεισμός περιλαμβάνει τη διαγραφή των τιμών του άξονα y που έχουν αναπτυχθεί εκτός των προβλεπόμενων ορίων με τελικό αποτέλεσμα τη διαγραφή μέρους της καμπύλης (**Εικόνα 4.15**).



**Εικόνα 4.15.** (1) Καμπύλη ανάπτυξης/μη ανάπτυξης όταν οι τιμές της μεταβλητής οι οποίες αντιπροσωπεύονται στον άξονα y δεν υπόκεινται σε έλεγχο εάν βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων όπως αυτά έχουν καθοριστεί από το μοντέλο. (2) Καμπύλη ανάπτυξης/μη ανάπτυξης όταν οι τιμές της μεταβλητής η οποίες αντιπροσωπεύονται στο άξονα y βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων όπως αυτά έχουν καθοριστεί από το μοντέλο.

#### 4.7.2.1. Μετατροπή της μεταβλητής του άξονα y από $b_w$ σε $a_w$

Εάν η μία από τις δύο μεταβλητές, οι τιμές των οποίων αντιπροσωπεύονται στους άξονες x και y είναι η “bw”, τότε το λογισμικό παρέχει επίσης τη δυνατότητα στον χρήστη να μετασχηματίσει τη μεταβλητή αυτή σε “aw” (εξίσωση 4.14) και να την απεικονίσει γραφικά. Η νέα γραφική απεικόνιση λαμβάνει χώρα όταν πατηθεί το πλήκτρο ελέγχου “Convert bw to aw” ενώ ταυτόχρονα αποκρύπτεται το πλήκτρο ελέγχου “Variables comparison”. Ταυτόχρονα, με την εμφάνιση του γραφήματος, σχηματίζεται αρχείο εικόνας στην περιοχή του δίσκου όπου εκτελείται το λογισμικό με όνομα: solver.gif. Ο χρήστης επιστρέφει στην προηγούμενη UserForm πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “✖”. Εάν η επιλογή της μεταβλητής, οι τιμές της οποίας αντιπροσωπεύονται στον άξονα x ή y, είναι διάφορη της μεταβλητής “bw”, τότε δεν πραγματοποιείται καμία λειτουργία κατά το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “Convert bw to aw”.

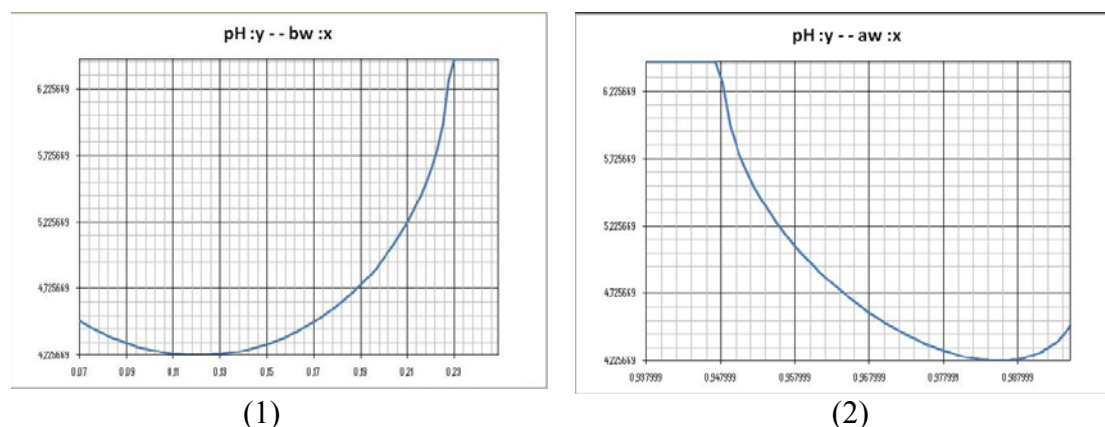
Εάν η μεταβλητή του άξονα x είναι η “bw”, τότε, σύμφωνα με την εξίσωση 4.14 ενεργοποιείται ο μηχανισμός (Εικόνα 4.16):  $\forall A : A \in [2,7]/A =$  ενεργό φύλλο δεδομένων, ισχύει:

$$[HY2] = 1 - [B2]^2$$

...

$$[HY77] = 1 - [B77]^2$$

Αντίστοιχος είναι ο μηχανισμός όταν η “bw” αποτελεί μεταβλητή του άξονα “y”.



**Εικόνα 4.16.** Μετατροπή της μεταβλητής του άξονα x από “bw” σε “aw”. Γραφικές απεικονίσεις της ανάπτυξης/μη ανάπτυξης για το μοντέλο: *Escherichia coli*, (Skandamis et al., 2007)-(bw selection), 2nd experiment, TSB-G, με άξονα x τη μεταβλητή “bw”, άξονα y το pH, ενώ η τιμή της μεταβλητής της θερμοκρασίας είναι 35 και της πιθανότητας ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης είναι 0,5.

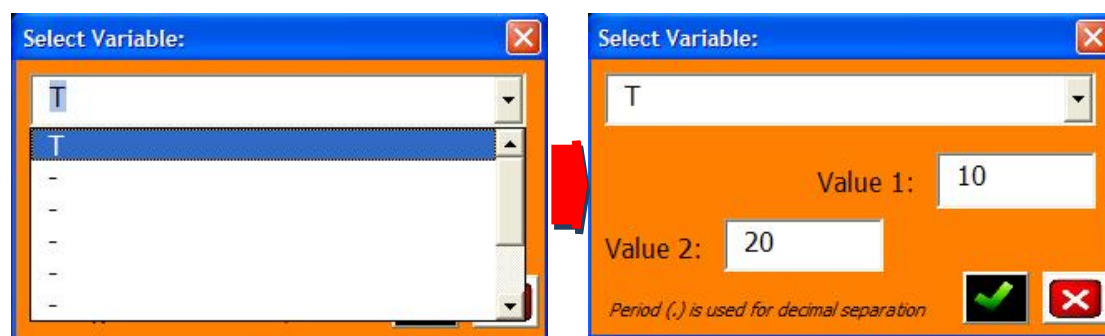
(1) Η καμπύλη ανάπτυξης/μη ανάπτυξης πριν από τη μετατροπή bw σε aw.

(2) Η καμπύλη ανάπτυξης/μη ανάπτυξης μετά από τη μετατροπή bw σε aw.

#### 4.7.2.2. Σύγκριση τριών μεσεπιφανειών ανάπτυξης/μη ανάπτυξης για δεδομένη μεταβλητή

Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει στη UserForm “Probabilistic model” μία νέα γραφική παράσταση στην οποία απεικονίζονται τόσο η αρχική όσο και δύο επιπλέον μεσεπιφάνειες, αφού πρώτα επιλέξει μία από τις διαθέσιμες μεταβλητές του μοντέλου ( $\neq$  των αξόνων  $x,y$ ), και στη συνέχεια ορίσει τις τιμές για κάθε μία από τις δύο μεσεπιφάνειες ώστε να πραγματοποιηθεί η σύγκριση.


Η σύγκριση πραγματοποιείται πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “Variables Comparison”, οπότε εμφανίζεται η UserForm “Select Variable:” στην οποία ο χρήστης μπορεί αρχικά να επιλέξει τη μεταβλητή για τη σύγκριση από τις διαθέσιμες μεταβλητές του αναπτυσσόμενου μενού επιλογών. Στη συνέχεια έχει τη δυνατότητα να ορίσει τις τιμές της για κάθε νέα πρόβλεψη μεσεπιφάνειας στα αντίστοιχα στοιχεία εισαγωγής δεδομένων (**Εικόνα 4.17**).

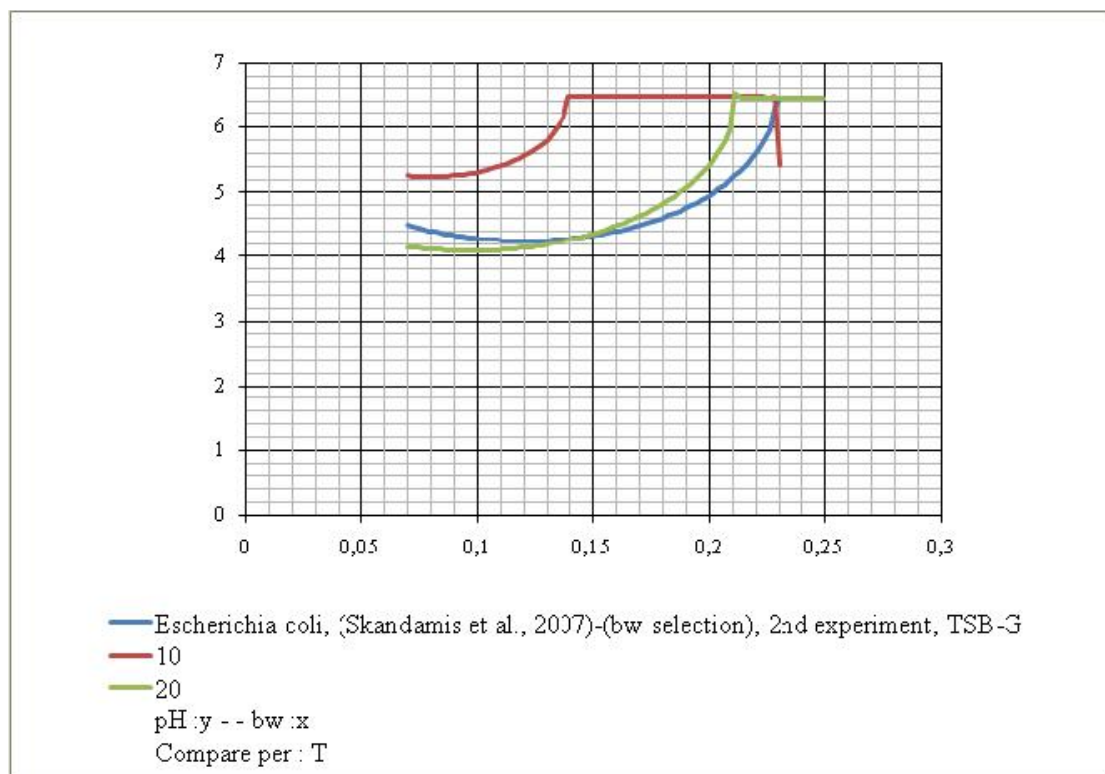


**Εικόνα 4.17.** Επιλογή μεταβλητής και ορισμός μέχρι δύο τιμών για τη μεταβλητή αυτή

Οι τιμές αυτές πρέπει να βρίσκονται εντός του επιτρεπτού εύρους τιμών της μεταβλητής που περιλαμβάνονται στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας της UserForm “Linear Models: Set the variables”. Εάν κάποια από τις δύο τιμές βρίσκεται εκτός ορίων, τότε το λογισμικό δεν επιτρέπει τη μετάβαση στην επόμενη φάση έως ότου οριστεί η τιμή εντός του επιτρεπτού εύρους. Στη συνέχεια το λογισμικό καλεί ένα νέο γράφημα το οποίο αντικαθιστά το προηγούμενο στη UserForm “Probabilistic model”. Κατά την ενεργοποίηση του πλήκτρου ελέγχου “Variables Comparison”, το πλήκτρο “Convert bw to aw” αποκρύπτεται.

Η αρχική καμπύλη έχει μπλε χρώμα και φέρει την ονομασία του ενεργού μοντέλου, που αναγράφεται στο υπόμνημα. Οι υπόλοιπες δύο καμπύλες έχουν χρώμα

κόκκινο και πράσινο, ενώ φέρουν την ονομασία της τιμής που τους δόθηκε από το χρήστη. Στο υπόμνημα αναφέρονται οι μεταβλητές των αξόνων  $x$  και  $y$ , ενώ στη συνέχεια αναφέρεται η μεταβλητή πάνω στην οποία βασίζεται η σύγκριση (**Εικόνα 4.18**). Ταυτόχρονα με την εμφάνιση της συγκριτικής γραφικής παράστασης, σχηματίζεται αρχείο εικόνας στην περιοχή του δίσκου όπου εκτελείται το λογισμικό με όνομα: solver2.gif. Μετά από την εμφάνιση του γραφήματος, το πλήκτρο ελέγχου “Variables Comparison” απενεργοποιείται. Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “” ο χρήστης μπορεί να αναπτύξει μία νέα προσομοίωση από την αρχή.



**Εικόνα 4.18.** Γραφική απεικόνιση της σύγκρισης τριών μεσεπιφανειών ανάπτυξης/μη ανάπτυξης με κριτήριο τη θερμοκρασία για το μοντέλο *Escherichia coli*, (Skandamis et al., 2007)-(bw selection), 2nd experiment, TSB-G. Η μεταβλητή “bw” αντιπροσωπεύεται στον άξονα  $x$ , το pH στον άξονα  $y$ , ενώ η τιμή της πιθανότητας ανάπτυξης/ μη ανάπτυξης είναι 0.5. Η αρχική πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας έχει τιμή θερμοκρασίας 35°C, ενώ οι νέες προβλέψεις περιλαμβάνουν τιμές θερμοκρασίας 10°C και 20°C.


#### 4.8. Επίλυση κινητικών μοντέλων

Εάν το ενεργό μοντέλο είναι χαρακτηρισμένο ως κινητικό μοντέλο (GRT ή INA), τότε η επίλυσή του περιλαμβάνει είτε την ανάπτυξη μοντέλων επιφάνειας

απόκρισης ή την ανάπτυξης καμπύλης αύξησης (μοντέλο αύξησης) ή καμπύλης αδρανοποίησης (μοντέλο αδρανοποίησης).

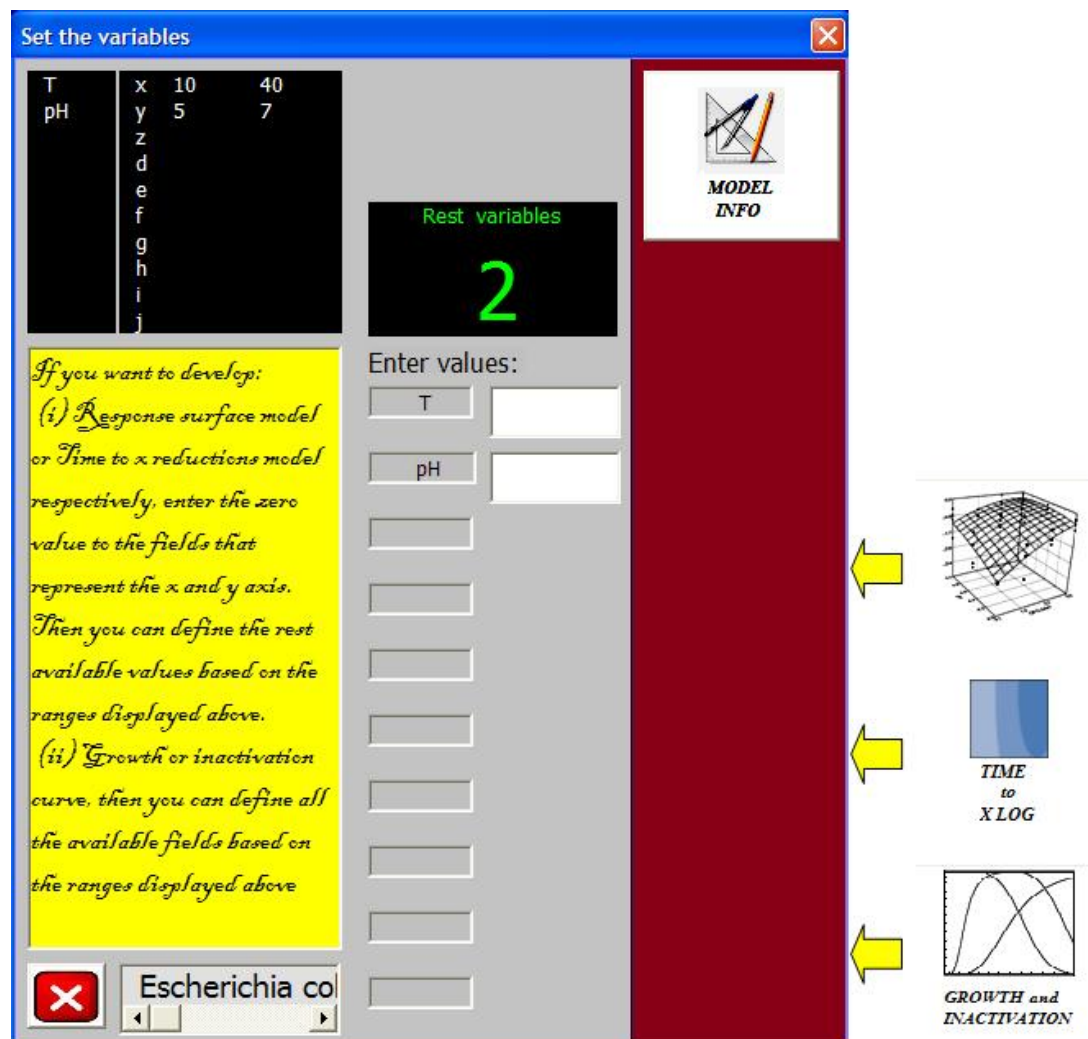
Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “SOLVE” της αρχικής UserForm, εμφανίζεται η έκδοση της UserForm με τίτλο “Set the variables” η οποία αφορά στα κινητικά μοντέλα. Στο αριστερό μέρος της UserForm εμφανίζονται οι μεταβλητές του ενεργού μοντέλου με τα αντίστοιχα εύρη τιμών τους ενώ στο στοιχείο ελέγχου πλαισίου λίστας “Rest variables” εμφανίζεται ο συνολικός αριθμός των μεταβλητών. Ταυτόχρονα, εμφανίζεται μήνυμα προς τον χρήστη (κίτρινος πίνακας), δίνοντάς του οδηγίες για τη συμπλήρωση των τιμών των μεταβλητών ανάλογα με τη μορφή επίλυσης του ενεργού μοντέλου. Σύμφωνα με το μήνυμα αυτό, εάν ο χρήστης πρόκειται να αναπτύξει μία από τις δύο μορφές μοντέλου επιφάνειας απόκρισης, τότε μπορεί να ορίσει τις μεταβλητές των αξόνων  $x$  και  $y$  με μηδενική τιμή, ενώ πρέπει να ορίσει τις τιμές ( $\neq 0$ ) για τις υπόλοιπες μεταβλητές. Εάν όμως ο χρήστης πρόκειται να αναπτύξει καμπύλη αύξησης ή αδρανοποίησης, θα πρέπει να ορίσει όλες τις διαθέσιμες τιμές της UserForm. Οι τιμές των διαθέσιμων μεταβλητών του ενεργού μοντέλου πρέπει να βρίσκονται πάντα εντός των επιτρεπτών ορίων ή να είναι μηδέν (το μηδέν είναι επιτρεπτή τιμή ανεξάρτητη από τα όρια των μεταβλητών). Σε περίπτωση που κάποια τιμή βρίσκεται εκτός ορίων ή είναι κενή, τότε δεν γίνεται αποδεκτή από το λογισμικό όταν πατηθούν τα πλήκτρα ελέγχου “RESPONSE SURFACE”, “TIME to X LOG” ή “GROWTH and INACTIVATION”, ενώ εμφανίζεται το μήνυμα: “Out of range. Click on exit and retry”. Σε αυτή την περίπτωση, το λογισμικό δεν επιτρέπει τη μετάβαση στις μορφές επίλυσης. Οι διαθέσιμες μορφές επίλυσης για κάθε μοντέλο έχουν προκαθοριστεί κατά το στάδιο εισαγωγής του μοντέλου στη βάση δεδομένων του λογισμικού.

Εάν ο χρήστης επιλέξει ένα κινητικό μοντέλο το οποίο έχει μία μόνο μεταβλητή και μία συμβατική μεταβλητή συστήματος για την ικανοποίηση των αναγκών επίλυσης (“not used”) τότε η μεταβλητή συστήματος ορίζει αυτόματα τη συμβατική τιμή “0” στο αντίστοιχο στοιχείο εισαγωγής δεδομένων. Το στοιχείο εισαγωγής δεδομένων σε αυτή την περίπτωση εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα και αποκλείει την πρόσβαση στο χρήστη.

Επιλέγοντας μία μορφή επίλυσης, ο κίτρινος πίνακας αποκρύπτεται, παραχωρώντας τη θέση του στα στοιχεία ελέγχου πλαισίου λίστας όπου εμφανίζονται οι συντελεστές της εξίσωσης. Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “”, πραγματοποιείται επιστροφή στην αρχική UserForm και ταυτόχρονη διαγραφή του



ενεργού μοντέλου (Εικόνα 4.19). Σε αυτή την περίπτωση η διαδικασία επιλογής του μοντέλου πρέπει να ξεκινήσει από την αρχή.



Εικόνα 4.19. UserForm διαχείρισης μεταβλητών για την επίλυση των κινητικών μοντέλων. Οι επιλογές επίλυσης εξαρτώνται από τον κωδικό της μορφής επίλυσης ο οποίος εμπεριέχεται στο αντίστοιχο πεδίο του ενεργού μοντέλου.

Η επιλογή ενός κινητικού μοντέλου από τη βάση δεδομένων έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της εξίσωσης στο δεύτερο κελί της στήλης του φύλλου δεδομένων του λογισμικού που έχει οριστεί ειδικά για την ανάπτυξη των κινητικών μοντέλων. Κατόπιν λαμβάνει χώρα ενσωμάτωση του μαθηματικού συμβόλου “=” στην αρχή της εξίσωσης. Η εξίσωση τότε ενεργοποιείται και οι μεταβλητές της (ειδικές μεταβλητές λογισμικού) λαμβάνουν τα δεδομένα τους από τα αντίστοιχα κελιά. Το αποτέλεσμα από την επίλυση της εξίσωσης ορίζει την τιμή του πεδίου  $\mu_{max}$  ( $\mu_{max}$ ), ενώ μετασχηματίζεται αυτόματα σε  $\ln \mu_{max}$  ( $\ln \mu_{max}$ ) και



$\text{Sq}r\langle\mu\rangle_{\max} (\sqrt{\mu_{\max}})$ . Από το σημείο αυτό η συνέχεια της επίλυσης εξαρτάται από την αρχικά ορισμένη μορφή έκφρασης του μοντέλου.

#### 4.8.1 Ανάπτυξη καμπύλης αύξησης ή αδρανοποίησης

Ένα ενεργό κινητικό μοντέλο μπορεί να είναι χαρακτηρισμένο είτε ως μοντέλο αύξησης ή ως μοντέλο αδρανοποίησης. Η βασική μορφή επίλυσης κάθε κινητικού μοντέλου περιλαμβάνει την καμπύλη αύξησης ή αδρανοποίησης αντίστοιχα η οποία αναπτύσσεται με βάση το διαφορικό μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994).

Εάν το ενεργό μοντέλο είναι χαρακτηρισμένο ως μοντέλο αύξησης (GRT), με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “GROWTH and INACTIVATION” της UserForm “Set the variables”, εμφανίζεται η UserForm “Growth curve:” στην οποία ο χρήστης μπορεί να εισάγει τις τιμές των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την απόκριση της μικροβιακής ανάπτυξης (**Εικόνα 4.20**). Οι παράμετροι αυτοί είναι:

(i)  $N_0(\text{LogCFU/g})$ , η οποία εκφράζει την αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών. Αποτελεί λογαριθμική έκφραση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με βάση το 10 ( $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ ).


(ii)  $Lag$ , η οποία εκφράζει τη φάση καθυστέρησης ή το χρόνο προσαρμογής των μικροοργανισμών πριν από την ανάπτυξή τους. Από τη φάση καθυστέρησης υπολογίζεται η αρχική φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων σύμφωνα με την εξίσωση:


$$h_0 = \lambda \cdot \mu_{\max} \quad (4.18)$$

όπου  $\lambda$  είναι η φάση καθυστέρησης  
και  $\mu_{\max}$  ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

(iii)  $N_{\text{end}}(\text{LogCFU/g})$ , η οποία εκφράζει την ασυμπτωτική συγκέντρωση των κυττάρων.

(iv)  $\text{Hours}$ , η οποία εκφράζει το χρόνο σε ώρες.

Οι τιμές των παραμέτρων υπόκεινται σε συντακτικό έλεγχο από το λογισμικό, που ενεργοποιείται με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “”. Εάν ο συντακτικός έλεγχος δεν αποδώσει κάποιο σφάλμα τότε εμφανίζεται η γραφική απεικόνιση της

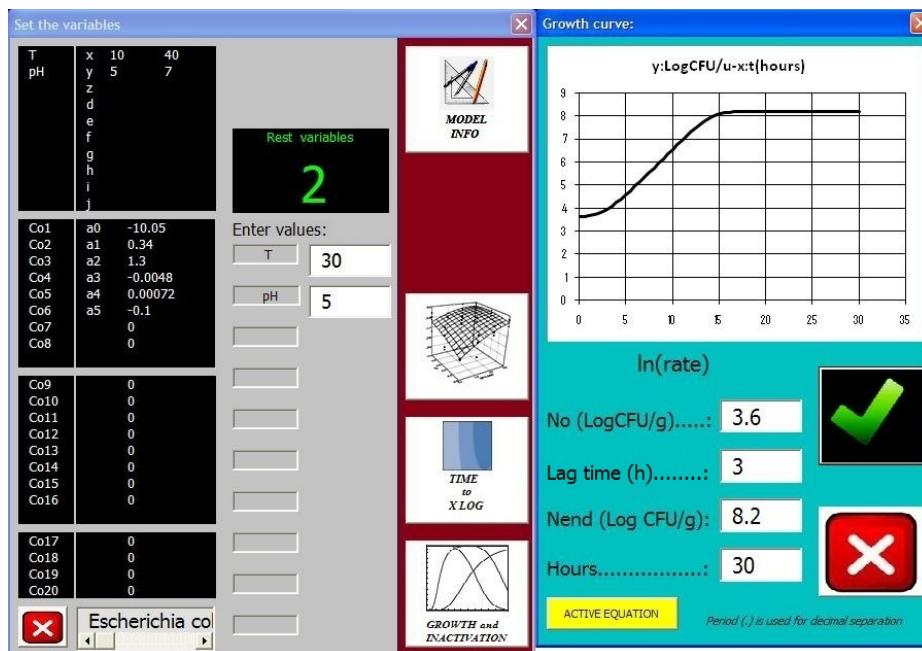
ανάπτυξης του μικροοργανισμού ως προς το χρόνο, με τη μορφή σιγμοειδούς καμπύλης αύξησης. Με το πλήκτρο ελέγχου “” πραγματοποιείται επιστροφή στην προηγούμενη UserForm η οποία συνεχίζει να διατηρεί τα δεδομένα που είχαν οριστεί την τελευταία φορά από το χρήστη. Κάτω από τη γραφική παράσταση εμφανίζεται η μορφή έκφρασης του ρυθμού ανάπτυξης του μοντέλου. Πατώντας το πλήκτρο ελέγχου “ACTIVE EQUATION”, εμφανίζονται τα δεδομένα του ενεργού μοντέλου (**Εικόνα 4.20**). Ταυτόχρονα με την εμφάνιση του διαγράμματος εμφανίζεται το αρχείο εικόνας “Growth.gif” στην περιοχή του δίσκου όπου εκτελείται το λογισμικό.

Εάν το ενεργό μοντέλο είναι χαρακτηρισμένο ως μοντέλο αδρανοποίησης (INA), με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “GROWTH and INACTIVATION” της UserForm “Set the variables”, εμφανίζεται η UserForm “Inactivation curve:” στην οποία ο χρήστης μπορεί να εισάγει τις τιμές των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την απόκριση της μικροβιακής αδρανοποίησης (**Εικόνα 4.21**). Οι παράμετροι αυτοί είναι:

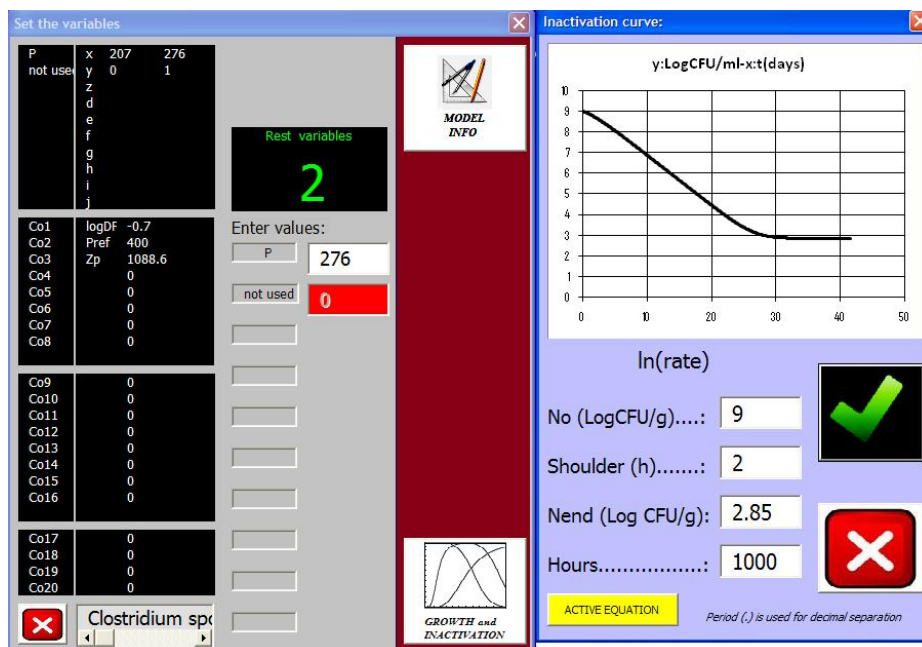
- (i)  $N_0(\text{LogCFU/g})$ , η οποία εκφράζει την αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών. Αποτελεί λογαριθμική έκφραση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με βάση το 10 ( $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ ).
- (ii) Shoulder, η οποία εκφράζει την κύρτωση εξαιτίας της απόκρισης υστέρησης (**εξίσωση 4.18**).
- (iii)  $N_{end}(\text{LogCFU/g})$ , η οποία εκφράζει την ασυμπτωτική συγκέντρωση των κυττάρων.
- (iv) Hours, η οποία εκφράζει το χρόνο σε ώρες.

#### 4.8.2. Μηχανισμός ανάπτυξης του Διαφορικού Μοντέλου των Baranyi & Roberts, 1994

Η διαφορική εξίσωση των Baranyi & Roberts (1994) συνιστά το μηχανισμό της προσομοίωσης της μικροβιακής αύξησης και για το λόγο αυτό η εξίσωση αυτή προσαρμόστηκε στον κώδικα του λογισμικού. Σύμφωνα με την **απόδειξη 3.20**, ενσωματώθηκαν οι εξισώσεις του διαφορικού συστήματος (**3.4** και **3.5**) στο λογισμικό.



**Εικόνα 4.20.** Ανάπτυξη καμπύλης αύξησης για το μικροοργανισμό *E. coli* στο μικροβιακό μοντέλο *Escherichia coli* in gel cassettes (Skandamis et al., 2007) όταν η θερμοκρασία έχει οριστεί στους 30°C και το pH, στο 5. Οι παράμετροι του Διαφορικού Μοντέλου των Baranyi & Roberts, 1994 εμφανίζονται στο δεξιό μέρος της εικόνας. Η μονάδα του χρόνου είναι σε ώρες. Ο ρυθμός εκφράζεται σε LogCFU/u, όπου u μπορεί να είναι g ή ml



**Εικόνα 4.21.** Ανάπτυξη καμπύλης αδρανοποίησης για το μικροοργανισμό *Clostridium sporogenes* στο μικροβιακό μοντέλο *Clostridium sporogenes* ATCC 7955,  $\log D_{pref}(P)$ , Eq.4, pressure model όταν η πίεση έχει οριστεί στα 276 MPa. Οι παράμετροι του Διαφορικού Μοντέλου των Baranyi & Roberts, 1994 εμφανίζονται στο δεξιό μέρος της εικόνας.

Οι μεταβλητές των εξισώσεων λαμβάνουν τις τιμές τους από:

- (i) Τις παραμέτρους του ενεργού μοντέλου που έχουν οριστεί από το χρήστη,
- (ii) την τιμή του μετασχηματισμένου μέγιστου ειδικού ρυθμού αναπτυξης ( $\mu_{\max}$ ) ή αδρανοποίησης ( $K$ ) που αποτελεί έκφραση των διαφορετικών φυσικοχημικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, και
- (iii) τις εξισώσεις που έχουν επιλυθεί σε προηγούμενο στάδιο κατά την εκτέλεση της προσομοίωσης (εξισώσεις 3.9, 3.10,  $q_0 = \ln Q_0$ ).

Κατά το στάδιο της ανάπτυξης του διαφορικού μοντέλου, είναι δύσκολο να ελεγχθεί εάν τα αποτελέσματα της διαφορικής εξίσωσης που περιλαμβάνει πλήθος μεταβλητών και εκθετικών παραγόντων, περιορίζονται στο αναμενόμενο εύρος τιμών ή αποκλίνουν κατά τάξεις μεγέθους. Για το λόγο αυτό, με κριτήριο την αποφυγή σφαλμάτων, ελήφθη μέριμνα ώστε να είναι βέβαιο ότι τα αποτελέσματα των υπολογισμών δε θα υπερβαίνουν την αναμενόμενη τάξη μεγέθους (Baranyi & Roberts, 2000). Έλαβε χώρα μετασχηματισμός των εξισώσεων που περιλαμβάνουν πολλές μεταβλητές και εκθετικούς παράγοντες, σε εξισώσεις με περιορισμένο αριθμό μεταβλητών. Μέρος των μεταβλητών υπολογίζεται ξεχωριστά σε απλούστερες εξισώσεις.

Η διαφορά του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τον αντίστοιχο της αδρανοποίησης έγκειται στο ενδιάμεσο πρόσημο της **εξίσωσης 3.15** που είναι αρνητικό, δηλαδή:


$$\text{LogCFU} / \text{ml} = \text{LogCFU} / \text{ml}_{(\text{previous value})} - \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \cdot (1 - 10^{-K}) \cdot M \cdot S \quad (4.19)$$


Ο μηχανισμός εφαρμογής του διαφορικού μοντέλου των Baranyi & Roberts (1994) αναλύθηκε εκτενώς κατά την ανάπτυξη του λογισμικού UGPM (Προσαρμογή του διαφορικού μοντέλου στο λογισμικό).

#### 4.9. Ανάπτυξη μοντέλων επιφάνειας απόκρισης

Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “RESPONSE SURFACE” της UserForm “Set the variables”, εμφανίζεται η UserForm “Response Surface and Contour Plot”, η οποία διακρίνεται από το χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα του υποβάθρου και περιλαμβάνει δύο γραφικές παραστάσεις σε κάθετη διάταξη. Την τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επιφάνειας απόκρισης (response surface) η

οποία οπτικοποιείται σε δισδιάστατο επίπεδο στο διάγραμμα των ισοϋψών καμπυλών (contour plots).

Ο χρήστης μπορεί να ορίσει τη μεταβλητή που θα αντιπροσωπεύεται στον άξονα x, επιλέγοντας μία από τις μεταβλητές του ενεργού μικροβιακού μοντέλου από το αναπτυσσόμενο μενού επιλογών “x-axis”. Με το πλήκτρο ελέγχου “

Στη συνέχεια, ο χρήστης μπορεί να ορίσει τη μεταβλητή που θα αντιπροσωπεύεται στον άξονα y, επιλέγοντας μία από τις μεταβλητές του ενεργού μικροβιακού μοντέλου από το αναπτυσσόμενο μενού επιλογών “y-axis”. Με το πλήκτρο ελέγχου “

Μετά από την αποδοχή της επιλεγμένης μεταβλητής για κάθε άξονα, το πλήκτρο ελέγχου αποκρύπτεται για λόγους ασφάλειας. Εάν επιλεγεί η ίδια μεταβλητή τόσο για τον άξονα x όσο και για τον άξονα y, το πλήκτρο ελέγχου του άξονα y δεν κάνει αποδεκτή την επιλογή, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να προχωρήσει η διαδικασία στο επόμενο στάδιο (If x=y then exit sub).

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την ταυτόχρονη γραφική απεικόνιση της επιφάνειας απόκρισης και του διαγράμματος ισοϋψών. Ταυτόχρονα, με την εμφάνιση των δύο διαγραμμάτων εμφανίζονται δύο αρχεία εικόνας στην περιοχή του δίσκου όπου εκτελείται το λογισμικό, τα αρχεία Response.gif και Contour.gif.

Στη UserForm “Set the variables”, απεικονίζεται η μορφή του ρυθμού απόκρισης που αντιστοιχεί στον άξονα z, η οποία μπορεί να έχει τις τιμές: “rate”, “ln(rate)” και “sqrt(rate)”. Ο χρήστης δύναται να ελέγξει τα δεδομένα του ενεργού μικροβιακού μοντέλου με την επιλογή “ACTIVE MODEL” (**Εικόνα 4.22**).

#### 4.10. Μηχανισμός μοντέλων επιφάνειας απόκρισης

Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “

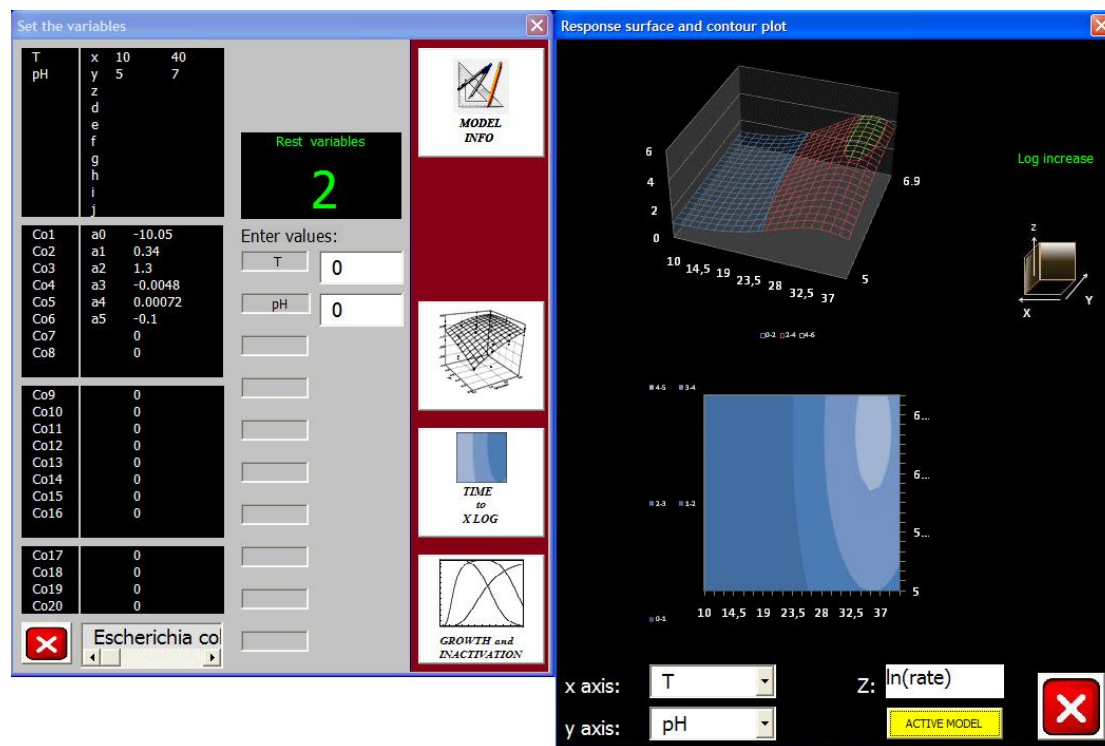
$$\text{Variable x - axis : } \left\{ \begin{array}{l} [A_2] = \text{Range}_{from} \\ [Ax] = \frac{\text{Range}_{from} - \text{Range}_{to}}{20} + [A(x-1)], x \in (2,22) \end{array} \right\} \quad (4.20)$$

όπου:


Rangefrom είναι η αρχική τιμή του εύρους της μεταβλητής,

Rangeto είναι η αντίστοιχη τελική τιμή.

Εάν “A” είναι η στήλη του ενεργού φύλλου δεδομένων η οποία έχει οριστεί ώστε να λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των δεδομένων της εξίσωσης 4.20, τότε [A2] είναι η τιμή του αρχικού κελιού και x είναι ο αριθμός των κελιών της στήλης A.



**Εικόνα 4.22.** Ανάπτυξη μοντέλου επιφάνειας απόκρισης και διαγράμματος ισοϋψών για το μικροοργανισμό *E. coli* στο μικροβιακό μοντέλο *Escherichia coli* in gel cassettes (Skandamis et al., 2007). Οι μεταβλητές των αξόνων x και y εμφανίζονται στο δεξιό μέρος της εικόνας.

Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “” του άξονα “y-axis”, ενεργοποιείται η εξίσωση παρεμβολής 4.21:

$$\text{Variable } y \text{ - axis : } \left\{ \begin{array}{l} [B_2] = \text{Range}_{from} \\ [By] = \frac{\text{Range}_{from} - \text{Range}_{to}}{20} + [B(y-1)], y \in (2,22) \end{array} \right\} \quad (4.21)$$

όπου:

Rangefrom είναι η αρχική τιμή του εύρους της μεταβλητής,

Rangeto είναι η αντίστοιχη τελική τιμή,

Εάν B είναι η στήλη του ενεργού φύλλου δεδομένων η οποία έχει οριστεί ώστε να λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη των δεδομένων της **εξίσωσης 4.21**, τότε [B2] είναι η τιμή του αρχικού κελιού και y είναι ο αριθμός των κελιών της στήλης B.

Στη συνέχεια ενεργοποιείται ο μηχανισμός συνδυασμού των δεδομένων των κελιών [A2]:[A22] και [B2]:[B22], σύμφωνα με την αρχή συνδυασμού των κελιών (**Εικόνα 4.23**):

	A	B
1	x	1
2	x	2
3	x	3
4	y	1
5	y	2
6	y	3
7	z	1
8	z	2
9	z	3
10	d	1
11	d	2
12	d	3

**Εικόνα 4.23.** Ανάπτυξη συνδυασμού των κελιών όταν [A1]:[A4]=(x,y,z,d) και [B1]:[B3]=(1,2,3).

Οι τιμές των αρχικών κελιών [B1]:[B3]=(1,2,3) αντιστοιχίζονται με κάθε τιμή των αρχικών κελιών [A1]:[A4]=(x,y,z,d) σχηματίζοντας έναν πίνακα 2x12.

Ο κώδικας που εφαρμόζεται σε αυτή τη διαδικασία έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη 441 κελιών, τα οποία προκύπτουν από το συνδυασμό των παρεμβλλόμενων τιμών των κελιών [A2]:[A22] x [B2]:[B22] αφαιρουμένων των 44 διπλών τιμών των κελιών που προκύπτουν από το συνδυασμό. Η στήλη C (άξονας z) περιλαμβάνει την τιμή του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ή αδρανοποίησης.

Στη συνέχεια, ο πίνακας 3x441 δεδομένων μετασχηματίζεται σε πίνακα 21x21 (Πίνακας 4.2), ο οποίος είναι ικανός να υποστηρίξει την επιφάνεια απόκρισης.

**Πίνακας 4.2.** Μετασχηματισμός των δεδομένων της συνάρτησης  $y=f(x_1, x_2)$  σε επιφάνεια απόκρισης  $E(y)=f(x_1, x_2)$

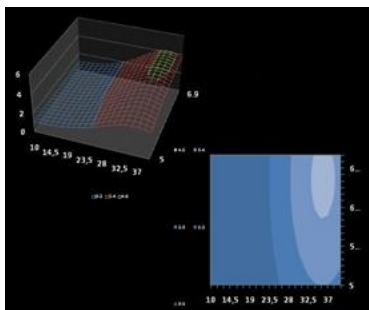
Πίνακας 3x442

	$x_1$	$x_2$	$y$
	A	B	C
1			
2	0,20736	3,5	7,7526918
3	0,20736	3,575	7,7082571
4	0,20736	3,65	7,6530306
5	0,20736	3,725	7,5872484
...	...	...	...
...	0,20954	3,5	7,5850324
...	0,20954	3,575	7,5379372
...	0,20954	3,65	7,4803373
...	0,20954	3,725	7,4124783
...	...	...	...



Μετασχηματισμός πίνακα δεδομένων 3x442 σε πίνακα επιφάνειας απόκρισης 21x21

	A	B	C	D	E	F	...	V
1		3,5	3,575	3,65	3,725			
2	0,20736	7,7526918	7,7082571	7,6530306	7,5872484	...	...	...
3	0,20954	7,5850324	7,5379372	7,4803373	7,4124783	...	...	...
4	...	...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...	...
22	.....	...	...	...	...	...	...	...





#### 4.11. Ανάπτυξη μοντέλων επιφάνειας απόκρισης που εμπεριέχουν τον υπολογισμό του χρόνου για δεδομένη λογαριθμική αύξηση/μείωση

Το μικροβιακό μοντέλο μπορεί να απεικονιστεί με τη μορφή μοντέλου επιφάνειας απόκρισης στο οποίο όμως υπολογίζεται ο χρόνος για δεδομένη λογαριθμική αύξηση/μείωση. Με το πάτημα του πλήκτρου ελέγχου “TIME to XLOG” της UserForm “Set the variables”, εμφανίζεται η UserForm “Response Surface and Contour Plot”, η οποία διακρίνεται από το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα του υποβάθρου ώστε να διαχωρίζεται οπτικά από την προηγούμενη UserForm. Τόσο ο βασικός μηχανισμός ανάπτυξης των μοντέλων όσο και η διαδικασία της απεικόνισής τους είναι ίδια με εκείνη των συνήθων μοντέλων επιφανειών απόκρισης. Η διαφορά των μοντέλων αυτών από τα συνήθη, έγκειται στο μηχανισμό επίλυσης της εξίσωσης:

$$\text{Time to } x \text{ log (growth/inactivation)} = \text{lag time} + \frac{x}{(+)\text{ growth or }(-)\text{ inact. rate}} \quad (4.22)$$

όπου,

growth, εάν το ενεργό μοντέλο είναι μοντέλο αύξησης,

inactivation, εάν το ενεργό μοντέλο είναι μοντέλο αδρανοποίησης,

lag time, ο χρόνος καθυστέρησης σε ώρες για την ανάπτυξη ή την αδρανοποίηση αντίστοιχα,

x, ο βαθμός μείωσης (reduction) ή αύξησης (increase)

(+) growth rate, ο ρυθμός ανάπτυξης πχ  $\mu_{\max}$ , και

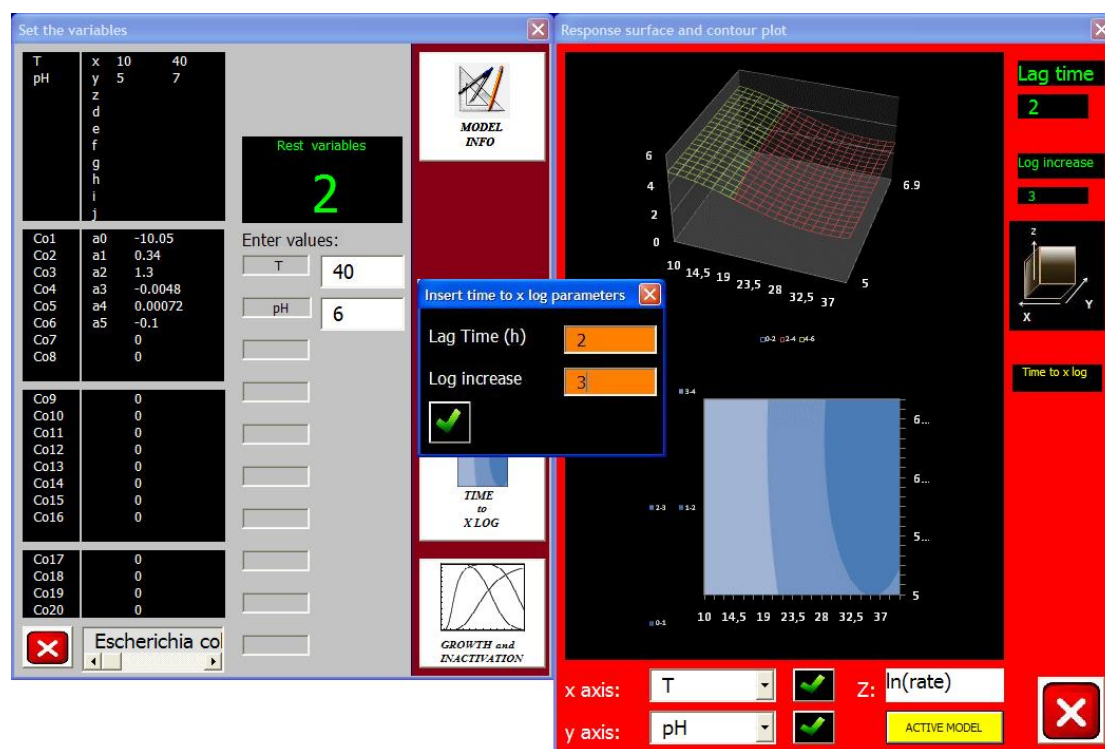
(-) inact. rate, ο ρυθμός αδρανοποίησης πχ K.

Ο μηχανισμός υποστηρίζεται από την UserForm “Insert time to x log parameters”, στην οποία ο χρήστης μπορεί να ορίσει το χρόνο καθυστέρησης (Lag Time, εάν είναι μοντέλο αύξησης ή Shoulder, εάν είναι μοντέλο αδρανοποίησης) και το βαθμό αύξησης ή μείωσης (x) (**Εικόνες 4.24, 4.9**).

#### 4.12. επικύρωση του τριτοταγούς μοντέλου GroPIN

##### Πρόβλεψη της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης:

Για την επικύρωση της ορθότητας των προβλέψεων της μεσεπιφάνειας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του τριτοταγούς μοντέλου GroPIN χρησιμοποιήθηκε η εργασία των Marín et al. (2008).

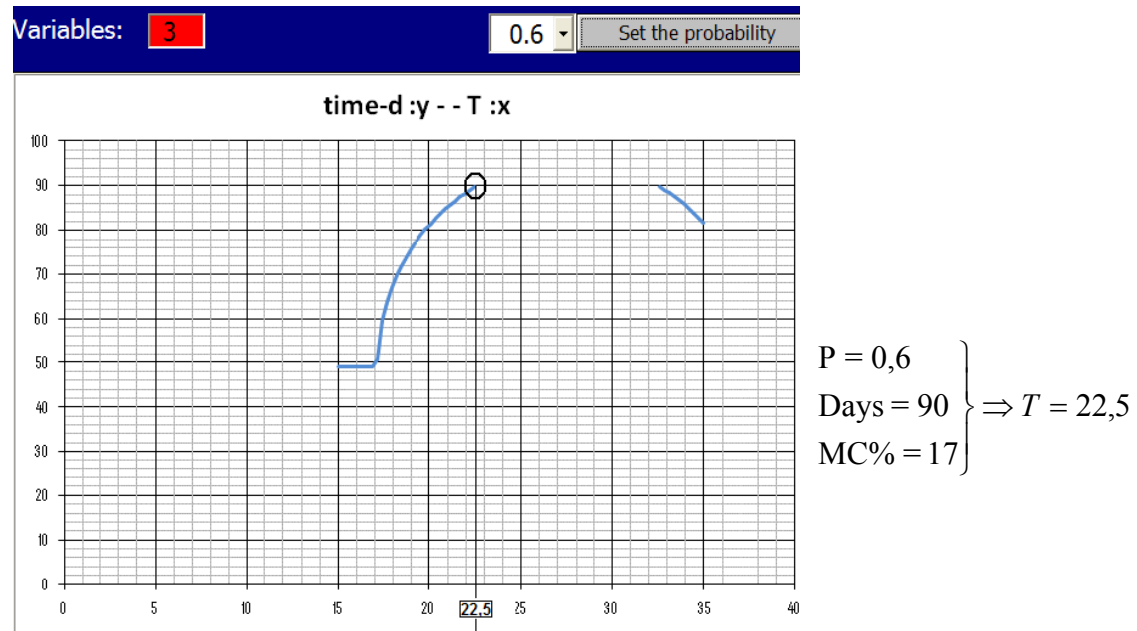


**Εικόνα 4.24.** Ανάπτυξη μοντέλου επιφάνειας απόκρισης και διαγράμματος ισοϋψών στα οποία εμπεριέχεται ο υπολογισμός του χρόνου για δεδομένη λογαριθμική αύξηση/μείωση, για το μικροοργανισμό *E. Coli*, στο μικροβιακό μοντέλο *Escherichia coli* in gel cassettes (Skandamis et al., 2007). Οι μεταβλητές των αξόνων x και y εμφανίζονται στο δεξιά μέρος της εικόνας. Στο κέντρο απεικονίζεται η UserForm “Insert time to x log parameters”, όπου ορίζονται τόσο η φάση καθυστέρησης της ανάπτυξης του μικροοργανισμού όσο και ο βαθμός της λογαριθμικής αύξησης

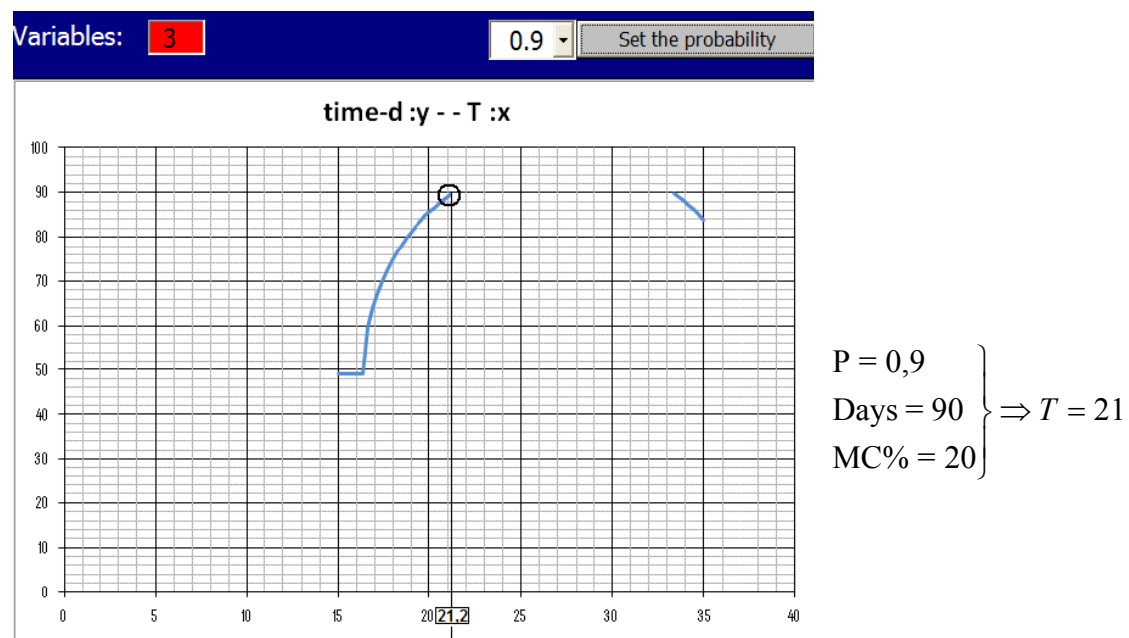
Στο μοντέλο “*Aspergillus carbonarius* (Marín et al., 2008), Modeling the growth/no growth interface, t in days” η μεταβλητή της θερμοκρασίας (T) αντιπροσωπεύεται στον άξονα x, η μεταβλητή του χρόνου σε ημέρες (t) αντιπροσωπεύεται στον άξονα y, η τιμή της μεταβλητή MC% λαμβάνει την τιμή 17 (%) και η τιμή της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης λαμβάνει την τιμή 0.6. Τότε προκύπτει η γραφική απεικόνιση της **εικόνας 4.25**.

Επίσης, όταν για το ίδιο μοντέλο, η μεταβλητή της θερμοκρασίας (T) αντιπροσωπεύεται στον άξονα x, ο χρόνος σε ημέρες (time-d) στον άξονα y, η

μεταβλητή MC% λαμβάνει την τιμή 20 (%) και η τιμή της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης λαμβάνει την τιμή 0.9, τότε προκύπτει η γραφική απεικόνιση της **εικόνας 4.26**.



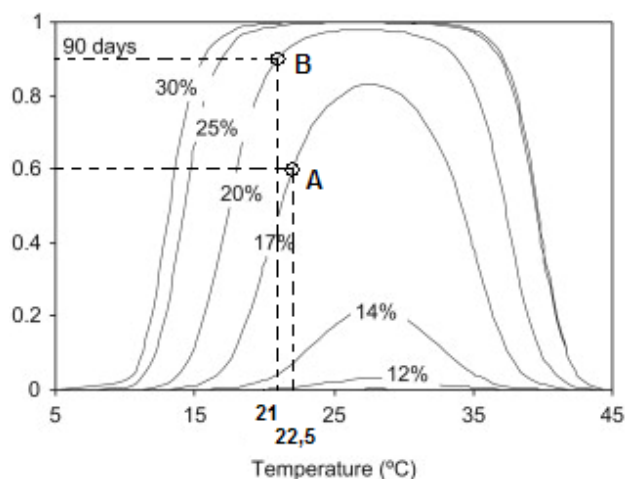
**Εικόνα 4.25.** Τριτοταγές μοντέλο “GnG”: *Aspergillus carbonarius* (Marín et al., 2008) Modeling the growth/no growth interface, t in days



**Εικόνα 4.26.** Τριτοταγές μοντέλο “GnG”: *Aspergillus carbonarius* (Marín et al., 2008) Modeling the growth/no growth interface, t in days

Αναλύοντας την 3η γραφική παράσταση της εικόνας 2 (**Εικόνα 4.27**) η οποία περιλαμβάνεται στην εργασία των Marín et al. (2008), διαπιστώνεται αρχικά ότι όταν

η τιμή της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης είναι 0.6 τότε οι συντεταγμένες των αξόνων x,y είναι (22.5, 90). Αντίστοιχα διαπιστώνεται ότι όταν η τιμή της πιθανότητας ανάπτυξης/μη ανάπτυξης είναι 0.9 τότε οι συντεταγμένες των αξόνων x,y είναι (21.2, 90). Οι τιμές των συντεταγμένων ταυτίζονται με τα αποτελέσματα του λογισμικού GroPIN.

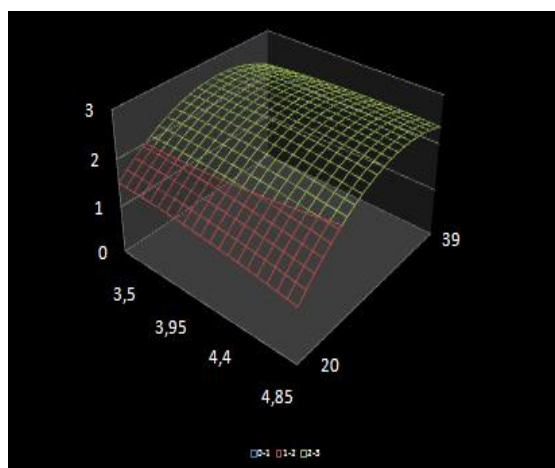


**Εικόνα 4.27.**

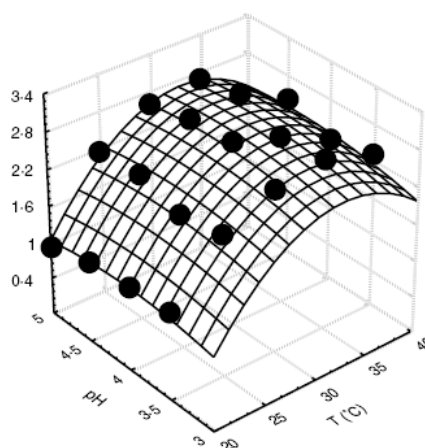
Ανάλυση της 3ης κατά σειρά γραφικής απεικόνισης της εικόνας 2 (Fig.2) η οποία περιλαμβάνεται στην εργασία των Marín et al. (2008).

#### Ανάπτυξη μοντέλου επιφάνειας απόκρισης:

Όταν κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης του μοντέλου επιφάνειας απόκρισης για το ενεργό μικροβιακό μοντέλο “*Monascus ruber*, (Panagou, 2003),  $\langle \mu \rangle_{\max}(T, pH, bw)$ , eq.2, polynomial” με εύρος θερμοκρασίας (άξονας y) από 20 έως 40°C, εύρος pH (άξονας x) από 3.5 έως 5 και η μεταβλητή bw ορίζεται με την τιμή 0.173, προκύπτει η τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επιφάνειας απόκρισης η οποία απεικονίζεται στην **εικόνα 4.28**.



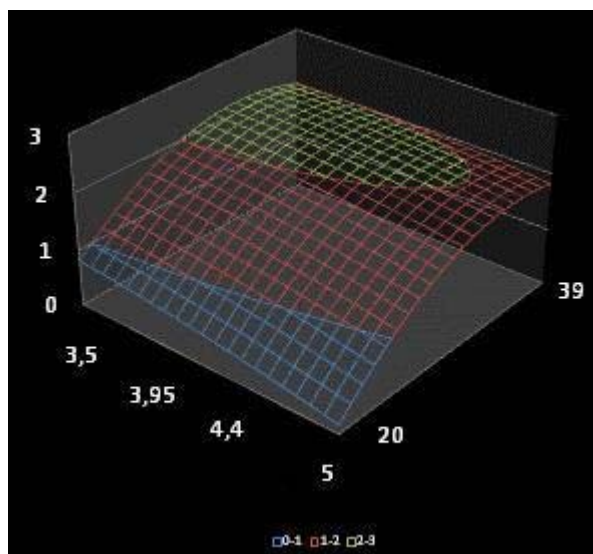
**Εικόνα 4.28.** Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επιφάνειας απόκρισης η οποία αναπτύσσεται από το λογισμικό GroPIN όταν  $bw=0.173$



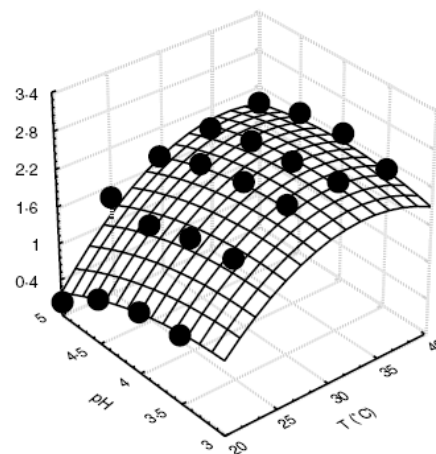
**Εικόνα 1a** (Fig.1) της εργασίας των Panagou, E. Z., Skandamis, P. N. & Nychas, G.-J.E. (2002)

Η κορυφή της καμπύλης του μοντέλου επιφάνειας απόκρισης που αναπτύσσεται από το λογισμικό GroPIN βρίσκεται στο ύψος της τιμής 2.8 του άξονα z το οποίο είναι αντίστοιχο με το ύψος του διαγράμματος της **εικόνας 1α** (Fig.1) της εργασίας των Panagou et al., 2002. Οι ακμές της πίσω πλευράς της επιφάνειας απόκρισης του λογισμικού GroPIN προσεγγίζουν τις αντίστοιχες της επιφάνειας απόκρισης της **εικόνας 1α** (η καμπυλότητα των δύο επιφανειών έχει διαφορετικό προσανατολισμό). Αντίστοιχα προσεγγίζουν οι ακμές της εμπρόσθιας πλευράς της επιφάνειας απόκρισης του λογισμικού GroPIN τις αντίστοιχες της επιφάνειας απόκρισης της **εικόνας 1α**.

Ομοίως, όταν η μεταβλητή bw ορίζεται με την τιμή 0.238 τότε η προκύπτει τρισδιάστατη γραφική παράσταση της επιφάνειας απόκρισης που απεικονίζεται στην **εικόνα 4.35**. Η αντιστοιχία των συντεταγμένων των ακμών αλλά και του ύψους της επιφάνειας μεταξύ των **εικόνων 4.34** και **1β** είναι εμφανής.



**Εικόνα 4.35.** Τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση της επιφάνειας απόκρισης η οποία αναπτύσσεται από το λογισμικό “GnG” όταν  $bw=0.238$



**Εικόνα 1β.** (Fig.1) της εργασίας των Panagou, E. Z., Skandamis, P. N. and Nychas, G.-J.E. (2002)

### Πρόβλεψη της αύξησης ή αδρανοποίησης των μικροοργανισμών υπό στατικές συνθήκες:

Η λειτουργία της ανάπτυξης των καμπυλών αύξησης βασίζεται στο διαφορικό μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994). Τα δεδομένα των κινητικών παραμέτρων που εισάγονται στο λογισμικό GroPIN, προέρχονται από εκτίμηση των διαγραμμάτων δημοσιευμένων εργασιών. Αφού προκύψει το διάγραμμα που εκφράζει την πρόβλεψη

της αύξησης του μικροοργανισμού του ενεργού μοντέλου από το λογισμικό GroPIN, τότε εκτιμάται η τροχιά της καμπύλης ανάπτυξης σύμφωνα με την εξής μεθοδολογία:

Έστω το διάγραμμα που χρησιμοποιείται για την επικύρωση προέρχεται από την εργασία των Skandamis et. al, 2007 με τίτλο “Image analysis as a mean to model growth of Escherichia coli O157:H7 in gel cassettes”. Στα διαγράμματα της εργασίας, από τα γνωστά σημεία του άξονα  $y$ , φέρονται ευθείες παράλληλες προς τον άξονα  $x$ . Τα σημεία στα οποία οι ευθείες αυτές τέμνουν τη σιγμοειδή καμπύλη προβάλλονται στον άξονα  $x$ . Στη συνέχεια εφαρμόζεται η ίδια διαδικασία στο διάγραμμα που προκύπτει από το λογισμικό GroPIN και παρατηρείται ο βαθμός απόκλισης. Εάν η τάξη μεγέθους του είναι μικρή τότε θεωρείται ότι το διάγραμμα που προέκυψε με τα δεδομένα της εκτίμησης είναι σωστό.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που διαμορφώνουν τις αποκλίσεις είναι:

(i) Το σφάλμα κατά την εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων μετά από ανάλυση του διαγράμματος της εργασίας, (ii) ο μικρός αριθμός συντεταγμένων που χρησιμοποιείται στα διαγράμματα της εργασίας, και (iii) ο μεγάλος αριθμός των συντεταγμένων (701) που χρησιμοποιείται στα διαγράμματα των προβλέψεων του λογισμικού GroPIN.

Παρά το γεγονός ότι οι προβλέψεις οι οποίες προκύπτουν από το λογισμικό GroPIN εμπεριέχουν μεγάλο ποσοστό σφάλματος, εντούτοις προσεγγίζουν ικανοποιητικά τις αντίστοιχες προβλέψεις που προέρχονται από την ανάλυση των εικόνων (**Εικόνα 4.36**).

Αντίστοιχη με τη διαδικασία επικύρωσης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών προβλέπεται και για την αδρανοποίηση.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Το τριτοταγές μοντέλο GroPIN αποτελεί ένα πρωτοποριακό βιομηχανικό εργαλείο το οποίο είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των πιθανών κινδύνων από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Η ανάλυση αυτή βασίζεται τόσο στα πολυωνυμικά (γραμμικά) όσο και στα μη γραμμικά μοντέλα που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του λογισμικού. Τα πολυωνυμικά μοντέλα περιγράφουν τη συμμετοχή και αλληλεπίδραση των περιβαλλοντικών και φυσικοχημικών παραγόντων στη μικροβιακή ανάπτυξη, ενώ τα μη γραμμικά

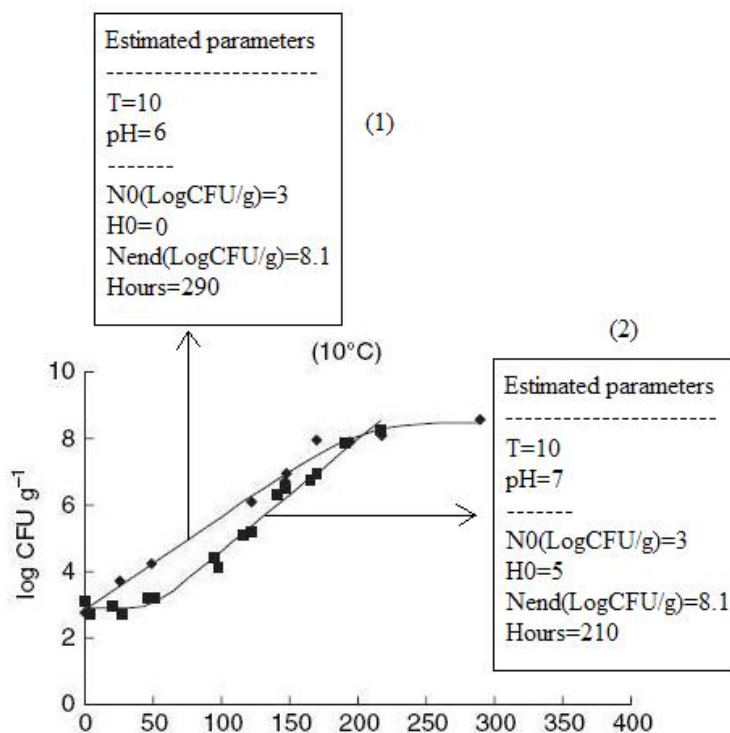
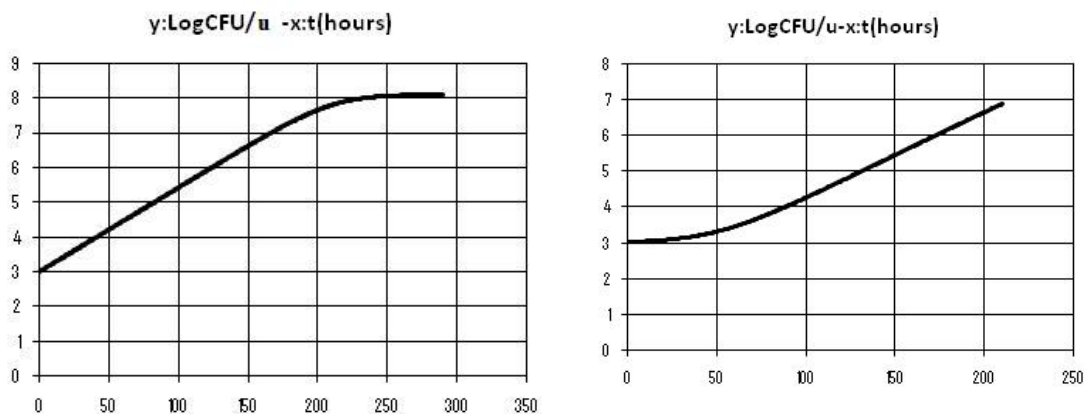


Fig. 1a, Skandamis et al., 2007



Διάγραμμα από το GroPIN σε αντιστοιχία με την καμπύλη 1 της Fig.1a

Διάγραμμα από το GroPIN σε αντιστοιχία με την καμπύλη 2 της Fig.1a

**Εικόνα 4.36.** Επικύρωση της αύξησης των μικροοργανισμών υπό στατικές συνθήκες του τριτοταγούς μοντέλου πρόβλεψης GroPIN. Συσχετισμός αποτελεσμάτων καμπύλης αύξησης του λογισμικού GroPIN με αντίστοιχη καμπύλη που περιγράφεται στην εργασία των Skandamis et al., 2007 (Ο χρόνος που ορίζεται στην καμπύλη της εργασίας είναι σε ώρες).

μοντέλα αποβλέπουν στον καθορισμό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Ο ρυθμός αυτός ελαττώνεται από κάθε μία από τις παραμέτρους οι οποίες αποκλίνουν από την άριστη κατάσταση (Ross & Dalgaard, 2004).

Από την επεξεργασία των μικροβιακών μοντέλων είναι δυνατή η πρόβλεψη των συνθηκών ανάπτυξης ή μη ανάπτυξης των μικροοργανισμών των τροφίμων με τη μορφή:

- (i) καμπύλης που περιγράφει την μεσεπιφάνεια ανάπτυξης/μη ανάπτυξής του,
- (ii) συμβατικού μοντέλου επιφάνειας απόκρισης και του αντίστοιχου διαγράμματος ισουψών το οποίο αποτελεί την προβολή του στο δισδιάστατο επίπεδο,
- (iii) μοντέλου επιφάνειας απόκρισης στο οποίο εμπεριέχεται ο υπολογισμός του χρόνου για δεδομένη λογαριθμική αύξηση/μείωση και του αντίστοιχου διαγράμματος ισουψών,
- (iv) σιγμοειδών καμπυλών αύξησης ή καμπυλών αδρανοποίησης σύμφωνα με το μοντέλο των Baranyi & Roberts (1994).

Το λογισμικό GroPIN έχει σχεδιαστεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι φιλικό προς το χρήστη. Περιλαμβάνει ένα σύνολο από διαδικασίες ελέγχου, οι οποίες προστατεύουν τόσο το λογισμικό από πιθανούς αδέξιους χειρισμούς του χρήστη, όσο και το χρήστη από την παραγωγή λανθασμένων αποτελεσμάτων εξαιτίας των αδέξιων χειρισμών του. Η καινοτομία του έγκειται στη μέθοδο της συστηματοποίησης και διαχείρισης των μικροβιακών μοντέλων καθώς και στο μηχανισμό της επίλυσής τους με ενιαίες και ταχείες μεθόδους.

Το λογισμικό GroPIN συνιστά ένα τριτοταγές μοντέλο το οποίο είναι σαφώς προσανατολισμένο στην ανάλυση του πιθανού κινδύνου από τη μικροβιακή ανάπτυξη στα τρόφιμα. Αναμένεται να συμβάλλει αποφασιστικά στην έγκαιρη πρόβλεψη των πιθανών κινδύνων υποβάθμισης της μικροβιολογικής ποιότητας των τροφίμων ή/και ασφάλειάς τους, σε σχέση με τις διαδικασίες παραγωγής και αποθήκευσής τους.



**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology* 27, 61–75.
- Bolton, L.F., Frank, J.F., 1999. Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. *Journal of Food Protection* 62, 601–609.
- Bradley, N., 2007. The Response Surface Methodology, Master of Science in Applied Mathematics and Computer Science Thesis, Dept. of Mathematical Sciences, Indiana University of South Bend.
- Carrasco, E., del Rosal, S., a, Racero, J.C., García-Gimeno R.M., 2012. A review on growth/no growth *Salmonella* models. *Food Research International* 47, 90-99.
- ComBase, 2007. A Combined Database for Predictive Microbiology, Institute of Food Research. <http://www.combase.cc/> (retrieved January, 2012).
- Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., Roberts, T. A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419-431.
- Judet-Correia, D., Bollaert, S., Duquenne A., Charpentier, C., Bensoussan, M., Dantigny, P., 2010. Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 142, 106-113.
- Koseki, S., 2009. Microbial Responses Viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *International Journal of Food Microbiology* 134, 75–82.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2004a. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a(w) when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology* 21, 415–422.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2004b. Modeling the boundaries of growth of *Salmonella typhimurium* in broth as a function of temperature, water activity, and pH. *Journal of Food Protection* 67, 53–59.

- Koutsoumanis, K. P., Sofos, J. N., 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a(w) limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 104, 83–91.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L., Guerzoni, M.E., 2001. Growth/nogrowth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food Microbiology* 18, 659–668.
- Marín S., Hodzić I., Ramos A.J., Sanchis V., 2008. Predicting the growth/no-growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts. *Food Microbiology* 25(5), 683-689.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Siana, P., Metaxopoulos, I., 2006. Determination of the Growth Limits and Kinetic Behavior of *Listeria monocytogenes* in a Sliced Cooked Cured Meat Product: Validation of the Predictive Growth Model under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Protection* 69, 1312-1321.
- McKellar, R.C., Lu, X., 2004. *Modeling Microbial Responses in Food*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- McMeekin, T.A., Presser, K., Ratkowsky, D., Ross, T., Salter, M., Tienungoon, S., 2000. Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *International Journal of Food Microbiology* 55, 93–98.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 73, 395–407.
- Montgomery, D.C., 2005. *Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs*, John Wiley and Sons Inc., New Jersey.
- Panagou, E. Z., Skandamis, P. N., Nychas, G-J. E., 2003. Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of Applied Microbiology* 94, 146–156.
- Petroutsos, E., 1998. *Mastering Visual Basic 6*, Sybex Inc., San Francisco, USA.
- Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1998. Modelling the growth limits (growth no-growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1773–1779.

- Psomas, A. N., Nychas, G.-J., Haroutounian, S. A., Skandamis, P. N., 2011. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. *Computers and Electronics in Agriculture* 76, 119-129.
- Quintavalla, S., Parolari, G., 1993. Effects of temperature, aw and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: a response surface methodology study. *International Journal of Food Microbiology* 19, 207–216.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S., 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231–245.
- Ross, T., Dalgaard, P., 2004. Secondary models. In McKellar, R.C. & Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Foods* (pp. 63-149). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Salter, M.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A., 2000. Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology* 61, 159–167.
- Skandamis, P. N., Brocklehurst, E. Z., Panagou, E. Z., Nychas, G.-J. E., 2007. Image analysis as a mean to model growth of *Escherichia coli* O157:H7 in gel cassettes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 937-947.
- Skandamis, P. N., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C., Sofos, J. N., 2007. Modeling the effect of inoculums size and acid adaptation on growth/no growth interface of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 120, 237-249.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4979–4987.
- Walkenbach, J., 2004. *Excel 2003 Power Programming with VBA*, Wiley Publishing Inc., Indianapolis, USA.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Δημοσιεύσεις

- Belessi, C-E. A., Gounadaki, A. S., Psomas, A. N., Skandamis, P. N., 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 145, S46–S52.
- Psomas, A. N., Nychas, G-J., Haroutounian, S. A., Skandamis, P. N., 2011. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. *Computers and Electronics in Agriculture* 76, 119-129.
- Psomas, A. N., Nychas, G-J., Haroutounian, S. A., Skandamis, P. N., 2012. LabBase: Development and validation of an innovative food microbial growth responses database. *Computers and Electronics in Agriculture* 85, 99–108.

### Ιστοσελίδες διάδοσης λογισμικών

- Psomas, A., Skandamis, P., 2011. LabBase: An Innovative Food Microbial Responses Database, LabBase Database Dissemination Webpage, Agricultural University of Athens, <http://www.aua.gr/psomas/LabBase>.
- Psomas, A., Skandamis, P., 2010. UGPM: a Food Microbial Growth Simulation Software, UGPM Dissemination Webpage. Agricultural University of Athens, <http://www.aua.gr/psomas>.

### Παρουσιάσεις σε συνέδρια

- Ψωμάς, Α. Ν., Νυχάς, Γ-Ι., Χαρουτουγιάν, Σ. Α., Σκανδάμης, Π.Ν., 2011. Ανάπτυξη λογισμικών για την παρακολούθηση της ποιότητας των τροφίμων με τη βοήθεια μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης. 21<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας: Η χημεία σε συνθήκες κρίσης και οι προτάσεις της για την Ανάπτυξη. 9-12 Δεκεμβρίου. Ένωση Ελλήνων Χημικών, Θεσσαλονίκη (Προφορική παρουσίαση).

- Μανιός, Σ.Γ., Κετσάτης, Σ.Α., Ψωμάς, Α., Σκανδάμης, Π.Ν., 2010. Ανάπτυξη και επικύρωση τριτογενούς μοντέλου πρόβλεψης του εμπορικού χρόνου ζωής όξινων ορεκτικών. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Διεπιστημονικής Εταιρείας Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων: «Σύγχρονες αντιλήψεις ασφάλειας και ποιότητας τροφίμων: η σύγκλιση των επιστημών». 4-6 Ιουνίου. Θεσσαλονίκη (Προφορική παρουσίαση).
- Μανιός, Σ.Γ., Κετσάτης, Σ.Α., Ψωμάς, Α., Σκανδάμης, Π.Ν., 2009. Σχεδιασμός τριτογενούς μοντέλου πρόβλεψης του χρόνου ζωής έτοιμων προς κατανάλωση ορεκτικών σε συνδυασμό με την μικροβιακή παραλλακτικότητα. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων. Ένωση Ελλήνων Χημικών και Ελληνική Ένωση Χημικών Μηχανικών. 15-17 Οκτωβρίου, Ρέθυμνο (Προφορική παρουσίαση).
- Manios, S.G., Ketsatis, S.A., Psomas, A., Nychas, G-J.E. and Skandamis, P.N., 2009. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of lactic acid bacteria in acid pourable appetizers. 6th International Conference on Predictive Microbiology in Foods, 8-12 September, Washington, DC., USA (oral presentation).



## Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions

Charalambia-Eirini A. Belessi, Antonia S. Gounadaki, Antonios N. Psomas, Panagiotis N. Skandamis\*

Laboratory of Food Quality Control and Hygiene, Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Athens, Greece, Iera Odos 75, 118 55, Athens, Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 March 2010

Received in revised form 1 October 2010

Accepted 18 October 2010

#### Keywords:

*Listeria monocytogenes*

Biofilms

Attached

Detached

Planktonic

Sanitizers

Acid adaptation

### ABSTRACT

The resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms formed under food processing conditions, against various sanitizing agents and disinfection procedures was evaluated in the present study. The first sanitation procedure included biofilm formation on stainless steel coupons (SS) placed in tryptic soy broth supplemented with 0.6% yeast extract (TSBYE) of various concentrations of NaCl (0.5, 7.5 and 9.5%) at different temperatures (5 and 20 °C). The biofilms formed were exposed to warm (60 °C) water for 20 min, or to peroxyacetic acid (2% PAA) for 1, 2, 3 and 6 min. Treatment with warm water caused no significant ( $P \geq 0.05$ ) reductions in the attached populations. Conversely, surviving bacteria on SS coupons decreased as the exposure time to 2% PAA increased and could not be detected by culture after 6 min of exposure. Biofilms formed at 20 °C were more resistant to PAA than biofilms formed at 5 °C. Salt concentration in the growth medium had no marked impact on the resistance to PAA. The second sanitation procedure included biofilm formation of nonadapted (NA) and acid-adapted (AA) cells in TSBYE of pH 5.0 and 7.0 (i.e., NA-5.0, NA-7.0 and AA-5.0, AA-7.0) at 4 °C. Coupons bearing attached cells of *L. monocytogenes* were periodically exposed to chlorine (0.465%  $\text{Cl}^-$ ), quaternary ammonium compound (1% QAC) and 2% PAA. The resistance of attached cells to QAC, PAA and  $\text{Cl}^-$  followed the order: AA-5.0 > NA-7.0  $\geq$  AA-7.0 > NA-5.0. The most effective sanitizer was QAC followed by PAA and  $\text{Cl}^-$ . The results can lead to the development of efficient sanitation strategies in order to eliminate *L. monocytogenes* from the processing environment. Furthermore, such results may explain the presence of *L. monocytogenes* after sanitation as a result of cell attachment history.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is widely distributed in nature, particularly in food processing environments, and is responsible for numerous outbreaks associated with ready to eat dairy products (Schlech, 1991; Waak et al., 2002; U.S. FDA/USDA/CDC, 2003). It has been isolated from soil, silage, and surface waters and has been found to survive in plant materials for up to 10–12 years (Wilks et al., 2006). The ability of the pathogen to survive at low temperatures, colonize surfaces in the form of biofilm-like structures, and resist various food-related stresses is crucial for its persistence in the processing environments (Rieu et al., 2008). Particularly, *L. monocytogenes* may adhere to and grow on processing surfaces, where food residues are accumulated (Gandhi and Chikindas, 2007; Poimenidou et al., 2009). This is a potential resistance mechanism to antimicrobial agents, biocides and heat (Bower and Daeschel, 1999; Cloete, 2003). Resistance of attached bacteria to biocides has been associated primarily with mechanical protection due to the synthesis of exopolysaccharides (EPS) and the surrounding nutrients, or with intrinsic physiological factors, such as the adaptation of biofilm cells

to stresses (e.g., acid, oxidative stress, starvation, etc.; Morton et al., 1998; Somers and Wong, 2004; Pan et al., 2006; Chaitiemwong et al., 2010).

Environmental factors such as pH, water activity, temperature and nutrient composition of the food soil can be important for the phenotypic transition of planktonic cells to sessile form (Shi and Zhu, 2009). They may also affect the susceptibility of sessile *L. monocytogenes* cells to disinfectants (Aarnisalo et al., 2007; Gram et al., 2007). When exposed to mild acid or osmotic stress conditions, such as pH 5.0 or NaCl 3–5%, bacteria have been found to develop resistance mechanisms to even more stressful conditions (Lou and Yousef, 1997; Stopforth et al., 2005). Naitali et al. (2009) studied the influence of the pH of the growth environment on the tolerance of suspended *L. monocytogenes* cells against disinfection and concluded that cells grown at pH 5.2 needed four times higher minimal bactericidal concentration (MBC) of a quaternary ammonium compound (QAC) and two times higher MBC of chlorine, than those grown at pH 7.2. Pan et al. (2006) tested a commercial hydrogen peroxide-based agent and found that it was ineffective in eliminating *L. monocytogenes* biofilms. However, exposure to this agent enhanced biofilm resistance to other commonly used disinfectants such as QAC (Shi and Zhu, 2009). On the other hand, Stopforth et al. (2002) concluded that acid-adapted (AA) or nonadapted (NA) *L. monocytogenes* cells attached on SS coupons and incubated in water decontamination run-off fluids

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 529 4684; fax: +30 210 529 4683.  
E-mail address: [pskan@aua.gr](mailto:pskan@aua.gr) (P.N. Skandamis).

behaved similarly to disinfectants. Detailed information on the adaptive responses of biofilms to sanitizers could be of marked importance for 'biotraceability' and specifically in relation to 'causality' (i.e., link between cause and effect; Barker et al., 2009). The combination of such data with rapid detection methods and mathematical models (Barker et al., 2009) may assist in linking the presence of *L. monocytogenes* at a certain stage of the food chain with the 'history' of cells and their physiological state. Indeed, the latter may be markedly affected by the survival or growth of cells in biofilms, subsequently exposed to sanitizing agents. For example, *L. monocytogenes* cells derived from cheese (AA cells,  $a_w$  0.96), or milk (NA cells,  $a_w$  0.99) may contaminate stainless steel surfaces of a refrigeration room (4–6 °C) or a maturation room (16–22 °C) and form biofilms. Furthermore, understanding the resistance of biofilms formed under various environmental conditions could also assist in assessment of the risk posed by insufficient sanitation practices. This is useful for the so-called "operational" biotraceability, which may be applied when an outbreak occurs, in order to identify the potential source(s) of *L. monocytogenes* contamination (Barker et al., 2009).

Considering the above, the aim of this study was to evaluate the efficiency of thermal and chemical sanitation on the survival of *L. monocytogenes* biofilms, formed on stainless steel surfaces under different osmotic and acidic environmental conditions, potentially occurring in dairy processing environments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strain and inoculum preparation

*L. monocytogenes* Scott A (serotype 4b, epidemic strain, human isolate), kindly provided by Dr. Eddy Smid (Agrotechnological Research Institute ATO-DLO, Wageningen, Netherlands) was used throughout the study. The strain was selected due to its clinical origin and the strong epidemiologic association of serotype 4b with human listeriosis (Kathariou, 2002; Lianou et al., 2006). Stock cultures were maintained in tryptic soy yeast extract broth (TSBYE, Biolife Italiana Srl, Milan, Italy) supplemented with 20% glycerol at –20 °C. For all inoculum types, cultures were activated by transferring 0.1 ml of the stock cultures into 10 ml TSBYE and incubating at 37 °C for 18–24 h. For preparation of the nonacid-adapted (NA) inoculum, aliquots (0.1 ml) of the activated culture were transferred into 10 ml tryptic soy broth without dextrose (pancreatic digest of casein 17 g/l, soy peptone 3 g/l, sodium chloride 5 g/l, dipotassium hydrogen phosphate 2.5 g/l) supplemented with 0.6% yeast extract (TSBYE-G) and incubated at 37 °C for 18 h. The acid-adapted (AA) inoculum was prepared by transferring 0.1 ml of the activated culture into 10 ml TSBYE-G supplemented with 1% glucose (TSBYE + G) (Buchanan and Edelson, 1996) and incubating for 18 h at 37 °C. The cells were then harvested by centrifugation (5000 × g for 15 min at 4 °C; Heraeus instruments, Megafuge 1.0 R) and washed twice with 10 ml of maximum recovery diluent (MRD; Biolife, Italy) to be further used as inoculum (10<sup>9</sup> CFU/ml).

### 2.2. Preparation of stainless steel surfaces

Stainless steel (SS) coupons (2 by 5 cm, type AISI-304, No. 2b finish, 0.1 cm thick, Halyvourgiki Inc., Athens, Greece) were used for the adherence of *L. monocytogenes* cells, due to the extensive use of stainless steel as the main material for the surface and equipment of the food industry (Boulangue-Petermann, 1996; Poimenidou et al., 2009). The coupons were initially soaked in acetone (3 h), to remove any manufacturing process debris and grease. Then, they were washed in commercial detergent solution, rinsed thoroughly with distilled water and air-dried (1 h). Before use, cleaned coupons were sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min.

### 2.3. Preparation of sanitizer and neutralizer solutions

Three chemical agents commonly used for sanitizing food contact surfaces were selected due to their differences in hydrophobicity and electrical charges, as well as in their mechanism of action on bacterial cells (Naitali et al., 2009). Dilutions of the concentrated chemical solutions were prepared according to manufacturer's recommendations with sterile distilled water on the day of the evaluation. Specifically, the chlorine solution (Cl<sup>-</sup>) was prepared with commercial household bleach (Klinex, Unilever Hellas, Greece; 4.3% sodium hypochlorite) and diluted in sterile distilled water at a concentration of 0.465% (pH 10.35 ± 0.25). The quaternary ammonium compound (QAC; Septanol 10, Ecochemical S.A, Greece) was prepared with sterile distilled water at a concentration of 1% (pH 7.8 ± 0.12). The peroxyacetic acid (PAA) solution was prepared with a commercial PAA sanitizer (P3-topactive@DES, Ecolab, Greece) and diluted in sterile distilled water to give a final concentration of 2% (pH 3.61 ± 0.20). The Dey–Engley (DE) neutralizing broth solution (Difco) was prepared by dissolving the powder in distilled water (pH 7.20 ± 0.30) before autoclaving at 121 °C for 15 min.

### 2.4. Experimental design

SS surfaces placed in TSBYE of different osmotic and acid conditions and stored at different temperatures (4–20 °C) were used to simulate the environmental conditions (i.e., physicochemical properties of foodstuffs) and sites, where bacterial cells may encounter in a food processing environment. To investigate the effect of the above environmental conditions on the biofilm formation and subsequent resistance of attached cells to sanitation treatments, two main studies were carried out (Fig. 1). Both studies were performed at least twice, and in each replicate study the samples were analyzed in duplicate ( $n = 4$ ).

#### 2.4.1. Experiment I: effect of NaCl and temperature on biofilm formation and resistance to warm water (60 °C) and PAA

This experiment aimed to evaluate the efficacy of warm water at 60 °C and PAA (2%) on the survival of *L. monocytogenes* biofilms formed on SS surfaces. Such surfaces could be of small utensils, such as knives or small removable machinery parts. Portions (40 ml) of sterile TSBYE supplemented with different NaCl concentrations (0.5, 7.5 and 9.5%) were aseptically transferred into sterile plastic centrifuge tubes in order to simulate the osmotic environment that bacteria may encounter in food processing (i.e., foods in brines or ripened products). Subsequently, individual sterile SS coupons were placed vertically in the centre of the tubes, so that the whole coupon was entirely covered with the media. Each tube was then inoculated with a 0.1 ml aliquot of appropriately diluted *L. monocytogenes* suspension in order to obtain an initial population of approx. 10<sup>8</sup> CFU/ml. Inoculated tubes were stored in high-precision (± 0.5 °C) incubation chambers (MIR-153, Sanyo Electric Co. Osaka, Japan) for 12 and 19 days at 20 and 5 °C, respectively. In an effort to simulate the environmental conditions that bacterial cells may encounter in a food processing environment, biofilm formation was evaluated at 5 and 20 °C, which may occur in different areas of a food processing plant. Prior to application of sanitation treatments, each SS coupon bearing attached cells was carefully removed from the growth medium with sterile forceps, gently tapping it against the side of the test tube to remove excess liquid droplets and then rinsed using a pipette with 15 ml of MRD solution per coupon side (Giaouris et al., 2005). This process aimed to remove any loosely attached cells.

For application of warm water sanitation, washed SS coupons were placed in sterile plastic tubes (Falcon) containing 40 ml of sterile distilled water, pre-warmed at 50 °C. Each tube was then immediately placed in a water-bath preset at 60 °C (SBS40, Stuart, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). After 20 min, each SS coupon was

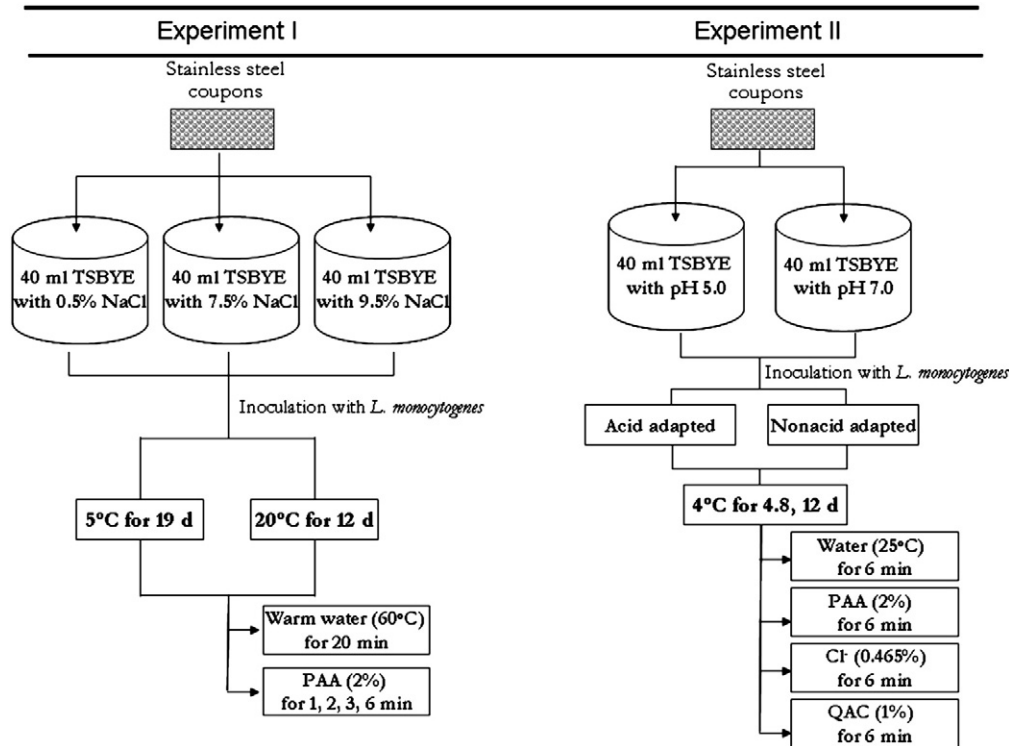


Fig. 1. Schematic representation of experimental design. Attached *L. monocytogenes* cells, formed on stainless steel coupons, in TSBYE of various NaCl concentrations (0.5, 7.5 and 9.5%), or pH 7.0 and 5.0 were subjected to warm water or chemical sanitation. Cl<sup>-</sup>: Chlorine; PAA: peroxyacetic acid solution; and QAC: quaternary ammonium compounds solution.

aseptically removed from the test tube, using sterile forceps, and placed in a plastic tube containing 40 ml of sterile distilled water and 10–12 sterile glass beads (diameter 5 mm) and immediately cooled in ice until detachment and quantification of the surviving population. To investigate the changes in temperature at the surface of the SS coupons, a thermocouple was placed in contact with an additional coupon using a rubber band so that this coupon received the same treatment as the test coupons. The temperature detected by the thermocouple was logged at 10-s intervals for 22 min using a PicoLog recorder PP222 (Pico Technology, Cambridgeshire, UK). In all cases, the temperature at the surface of the SS coupons increased to 57 °C within the first 2 min and by the 3 min, the temperature of all SS coupons was 58.5–60 °C.

For application of the chemical sanitation (PAA), washed SS coupons were placed in sterile plastic tubes containing 40 ml of 2% PAA and left for 1, 2, 3 and 6 min at 25 °C. At the end of each of the above time intervals, each SS coupon was aseptically removed from the test tube, using sterile forceps, and placed in a new plastic tube with 40 ml of DE neutralizer and 10–12 sterile glass beads (diameter 5 mm) for the detachment and quantification of the surviving population. SS coupons bearing attached *L. monocytogenes* cells receiving no treatment served as controls.

#### 2.4.2. Experiment II: effect of acid adaptation and pH on biofilm formation and resistance to chemical sanitizers

Three commonly applied sanitizers (Cl<sup>-</sup>, PAA and QAC) were assessed for their efficacy to reduce AA and NA *L. monocytogenes* biofilms formed on the surface of SS coupons at neutral or acid pH, at 4 °C (Fig. 1b). Specifically, portions (40 ml) of sterile TSBYE of pH 7.0, or acidified with 85% w/w lactic acid at pH 5.0 (concentration used <1% v/v, DL-Lactic acid, Sigma) were aseptically transferred into sterile plastic centrifuge tubes (see Section 2.4.1). Each tube was inoculated with a 0.1 ml of appropriately diluted AA or NA *L. monocytogenes* cells in order to obtain an initial population of approx. 10<sup>8</sup> CFU/ml. Inoculated tubes were stored in high-precision ( $\pm 0.5$  °C)

incubation chambers for up to 12 days at 4 °C. After 4, 8 and 12 days of incubation, two SS coupons were aseptically removed from the test tubes, using sterile forceps, and thoroughly rinsed with 30 ml of sterile MRD (Giaouris et al., 2005) as previously described, in order to remove any loosely attached cells.

For the application of the three sanitizers, washed SS coupons were aseptically transferred in sterile plastic tubes containing 40 ml of 2% PAA, 1% QAC or 0.465% Cl and left for 6 min. Then, each SS coupon was removed from the sanitizer solution and placed in a plastic tube containing 40 ml of sterile DE and 10–12 sterile glass beads (diameter 5 mm) for the detachment and quantification of the surviving population. SS coupons bearing attached *L. monocytogenes* cells receiving no treatment with sanitizer, or treated with sterile water (40 ml; 6 min at 25 °C) served as controls. Cleaning of coupons with detergent was omitted from the present study, since the scope of the experiment was to access the efficiency only of the sanitation methods alone.

#### 2.5. Enumeration of the attached and planktonic populations

Detachment of attached cells from the SS coupons was performed by the “bead vortexing method” (Giaouris et al., 2005), which has also been used in relevant studies (Stopforth et al., 2002). It is considered as the most suitable method for removal of attached bacteria (Lindsay and von Holy, 1997), even though 100% removal of attached cells cannot be guaranteed (Chorianopoulos et al., 2008; Poimenidou et al., 2009), without using potentially harmful for bacteria techniques, such as ultrasounds.

Briefly, each coupon was transferred to a new 50 ml sterile plastic tube containing 40 ml of either sterile distilled water or DE neutralizer and 10–12 sterile glass beads (diameter 5 mm) and subsequently vortexed for 2 min, at maximum intensity, in order to detach the cells from the coupon. Quantification of attached *L. monocytogenes* was performed by surface plating 0.1 ml aliquots of the appropriate ten-fold serial dilution onto duplicate tryptic soy agar (TSA; Biolife, Italy)



plates supplemented with 0.6% yeast extract (TSAYE) and incubation at 37 °C for 48 h. The suspended (planktonic) population of *L. monocytogenes* was determined by serially diluting the growth medium (TSBYE), surrounding the coupons, in MRD, plating 0.1 ml of the appropriate dilutions onto duplicate TSAYE plates and incubating at 37 °C for 48 h.

## 2.6. Statistical analysis

Data from plate counts (CFU per cm<sup>2</sup> for attached cells and CFU per ml for planktonic cells) of duplicate samples from the two independent experiments ( $n=4$ ) were transformed to log<sub>10</sub> values. The log<sub>10</sub> data were subjected to analysis of variance (ANOVA), using the general linear model procedure of the SPSS statistical package (SPSS 10.0.1 for Windows; SPSS INC., Chicago, Ill.). Tukey's multiple-range tests were used to compare means. All differences are reported at a significance level of 95% ( $\alpha=0.05$ ).

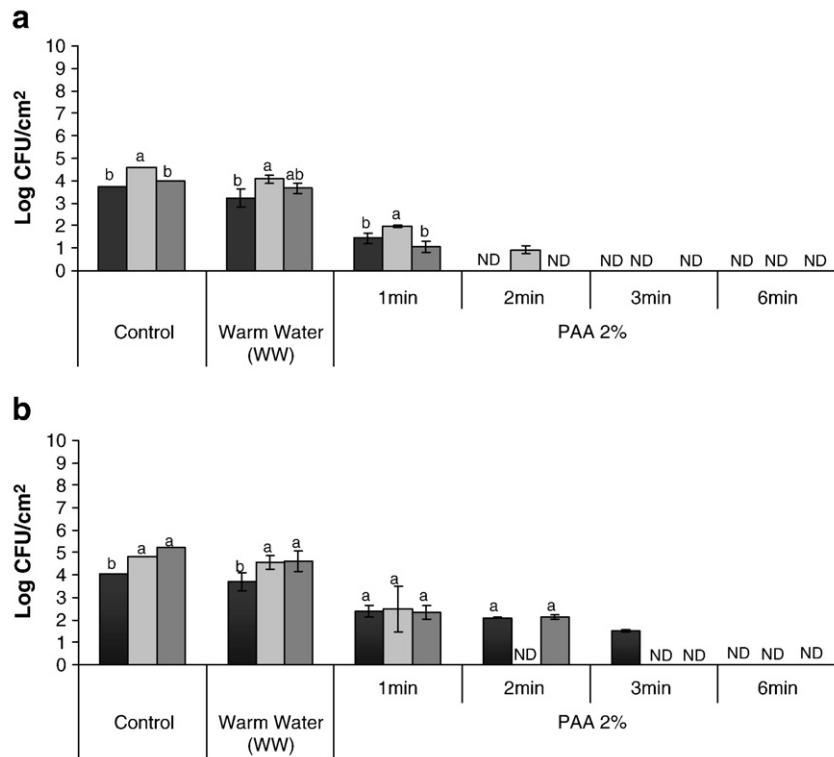
## 3. Results and discussion

Biofilm formation and resistance to sanitizers is affected by the material of the surface (e.g., stainless steel enhances microbial attachment compared to polyethylene and glass), the presence of food soil and the fact that imperfect surfaces serve as cavities which attract and embed microbial cells (Moltz and Martin 2005; Pan et al., 2006; Chaitiemwong et al., 2010). The physiology of cells, as influenced by the previous environment ('history') and the present ecological determinants (pH and water activity) may also affect their susceptibility to sanitizers (Stopforth et al., 2002, 2005; Somers and Wong, 2004; Gram et al., 2007; Naïtali et al., 2009). The results of the present study partially address the above issues.

### 3.1. Effect of NaCl and temperature on biofilm formation and resistance to warm water (60 °C) and PAA

The population of attached *L. monocytogenes* cells on SS surfaces ranged from 10<sup>4</sup> to 10<sup>5</sup> CFU/cm<sup>2</sup>, at all conditions tested (Fig. 2a and b). Planktonic cells remained at 10<sup>9</sup> CFU/ml for the whole duration of the experiments (data not shown). In accordance with previous studies, attachment of *L. monocytogenes* on SS coupons at 20 °C was higher than at 5 °C (Fig. 2; Poimenidou et al., 2009; Mai and Conner, 2007), probably due to the increased production of flagella at 20 °C. Flagella are commonly associated with cell attachment under static conditions (Vatanyoopaisarn et al., 2000; Chavant et al., 2002). Moreover, at 20 °C, significantly ( $P<0.05$ ) higher numbers of attached populations were recovered from SS coupons incubated in medium with 9.5% NaCl than in medium with 0.5% NaCl (Fig. 2b). The rate of bacterial attachment is known to increase with increasing ionic strength of the medium (e.g., by adding NaCl; Morisaki and Tabuchi, 2009; Uyen et al., 1988). Our results also indicate that this effect is more evident at high (20 °C) compared to low (5 °C) temperatures (Fig. 2).

Regardless of the environmental conditions used for bacterial attachment and biofilm formation, treatment of SS coupons with warm water (60 °C, 20 min) reduced the levels of attached cells by less than 1 log CFU/cm<sup>2</sup> ( $P\geq 0.05$ ; Fig. 2a and b; Taormina and Dorsa, 2007). Such results indicate that treatment of small SS utensils, such as knives, and blades with warm water cannot be considered an effective sanitation procedure, if its application is not preceded by further chemical sanitation. Although at present, the only prescribed procedure for sanitisation of small SS utensils is the immersion in flowing water at  $\geq 82$  °C for an undefined period (SCVMPH 2001), several studies have shown that the use of water at lower temperatures (60–72 °C) for longer times can produce equivalent inactivation of attached bacteria (i.e., >3-log reduction; Goulter et al., 2008; Eustace et al., 2007). Discrepancies between results of different



**Fig. 2.** Population of attached *L. monocytogenes* cells on stainless steel coupons placed in TSBYE of various NaCl concentrations; 0.5% (■), 7.5% (▒) and 9.5% (■), incubated; (a) at 5 °C for 19 days; and (b) at 20 °C for 12 days and left untreated (control) or exposed to warm water (60 °C) sanitation for 20 min, or 2% PAA for 1, 2, 3 and 6 min. *abc*: within different treatments, means sharing a common letter are not significantly different ( $P\geq 0.05$ ). ND: Counts below the detection limit (0.30 log cfu/cm<sup>2</sup>).

studies probably reflect variation in thermotolerance of microorganisms and strains used and the type of cells (attached or planktonic) used. Specifically, attached cells are more resistant to heat than planktonic cells (Frank and Koffi, 1990), whereas strain variation, previous growth conditions, exposure to sublethal stresses, such as heat and acid may further increase bacterial resistance to heat (Doyle et al., 2001; Sergelidis and Abraham, 2009).

Contrary to warm water, treatment of SS coupons with PAA (2%) significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the levels of attached cells and this reduction increased with exposure time (Fig. 2). Specifically, exposure of SS coupons to PAA (2%) for 1 min reduced the levels of attached *L. monocytogenes* by approx. 2 to 2.9 log CFU/cm<sup>2</sup> (Fig. 2). This reduction was slightly higher for SS coupons that had been previously incubated at 5 °C compared to 20 °C (Fig. 2). Treatment of the SS coupons for 2 min with PAA (2%) reduced the levels of attached cells below the detection limit (0.3 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup>) for samples previously incubated at 5 °C, whereas no significant changes in the levels of attached cells were observed for the SS coupons incubated at 20 °C (Fig. 2). Finally, as the time of SS coupons exposure to PAA (2%) increased to 6 min, the levels of attached cells reduced below the detection limit of the method, regardless of the incubation temperature and the NaCl concentration of the medium used for biofilm formation (Fig. 2). These results illustrate the strong bactericidal effect of PAA against *L. monocytogenes*. Similar reductions have been reported for mixed culture of *L. monocytogenes* and *Pseudomonas* sp. exposed to different sanitizers, including PAA (40, 80 mg/l; Fatemi and Frank, 1999) and for *L. monocytogenes* biofilms formed in the presence of meat soil and exposed to 2.600 ppm of dual peracid (PAA; peroxyacetic acid and peroxyoctanoic acid) sanitizer (Somers and Lee Wong, 2004). The antibacterial activity of PAA is associated with the generation of superoxide anions and a burst of free hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>), which can damage bacterial DNA and cause cell death (Clapp et al., 1994).

Previous studies have shown that temperature, food soiling and the age of the biofilm affect the bacterial resistance to sanitizers (Stopforth et al., 2002; Gram et al., 2007; Mai and Conner, 2007). We showed that *L. monocytogenes* biofilms formed at 20 °C were more resistant to PAA than biofilms formed at 5 °C, whereas salt concentration in the growth medium had no marked impact on the resistance to PAA (Fig. 2). The aforementioned data on the survival of *L. monocytogenes* on SS surfaces after treatment with warm water or chemical sanitizer address the magnitude of risk posed by a potential sanitation failure. Therefore, they may partially explain the persistence of *L. monocytogenes* in the food processing environment. Improper cleaning and sanitation of food contact equipment, due to insufficient contact time or limited accessibility of sanitizer to certain areas (Pan et al., 2006, Skandamis et al., 2009) may lead to accumulation of *L. monocytogenes* cells on the surfaces and consequently increase the difficulty of its entire removal (Shi and Zhu, 2009).

3.2. Effect of acid adaptation and pH on biofilm formation and resistance to various chemical sanitizers

The population of attached NA *L. monocytogenes* cells on SS surfaces ranged from 4.2 to 4.6 log CFU/cm<sup>2</sup> throughout incubation for 12 days at 4 °C, regardless the pH of the medium in which, the attachment took place (Fig. 3a and c). Similarly, the levels of attached AA cells were 3.6 and 4.6 log CFU/cm<sup>2</sup> on SS coupons incubated for 12 days in growth medium of pH 5.0 and 7.0, respectively (Fig. 3b and d). The planktonic populations of NA *L. monocytogenes* cells after 12 days of incubation in TSBYE of pH 5.0 and 7.0 reached the level of 8.4 and 9 log CFU/ml, respectively (Fig. 3a and c). The levels of planktonic AA cells on day 12 were 9.2 log CFU/ml in TSBYE of pH 7.0 (Fig. 3b) and constantly around 8 log CFU/ml in TSBYE of pH 5.0 (Fig. 3d). In accordance with previous

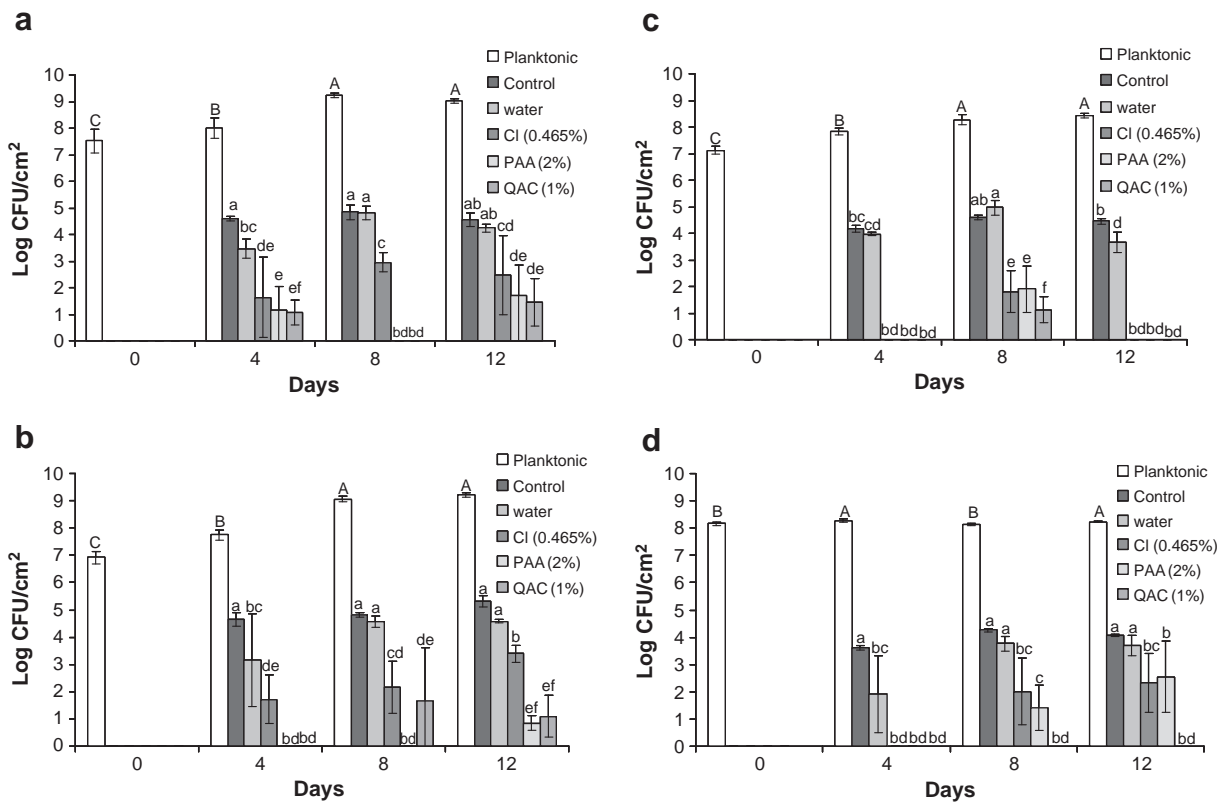


Fig. 3. Population of planktonic (□) and attached acid-adapted (b, d) or non-acidadapted (a, c) *L. monocytogenes* cells on stainless steel coupons placed in TSBYE at pH 7.0 (a, b) or pH 5.0 (c, d), incubated at 4 °C and left untreated (control), or treated with water, Cl<sup>-</sup> (0.465%), PAA (2%) and QAC (QUAT–1%) for 6 min. Means of planktonic cells sharing a common capital letter, or attached populations before or after treatments with sanitizers, sharing a common lowercase letter are not significantly different ( $P \geq 0.05$ ). bd: Counts below the detection limit (0.30 log cfu/cm<sup>2</sup>).

studies, the results indicate that acid adaptation did not affect the attachment of *L. monocytogenes* on SS coupons (Stopforth et al., 2002).

Regarding the resistance of the attached cells to sanitizers, no significant reduction ( $<1$  log CFU/cm<sup>2</sup>) in the levels of attached *L. monocytogenes* cells was observed after treatment of SS coupons with water, as compared to samples receiving no treatment (control) (Fig. 3). Conversely, treatment of SS coupons with chlorine (0.465%) reduced the levels of attached *L. monocytogenes* cells by 1–3 log CFU/cm<sup>2</sup>, regardless of prior acid adaptation or the pH of medium, in which attachment took place (Fig. 3). However, in agreement with previous reports, the resistance of attached cells to chlorine increased with the ‘age’ of the attached populations (Frank and Koffi, 1990). Specifically, on days 8 and 12, the majority of attached cells surviving chlorine sanitation were considerably higher or were almost unaffected by the treatment compared to day 4 (Fig. 3). It could be postulated that *L. monocytogenes* developed stress tolerance during biofilm formation for 12 days (Mai and Conner, 2007). It has also been established that attached cells have enhanced resistance to chlorine compared to free-living cells and this resistance is highly dependent on the concentration, exposure time and the age of the culture (Frank and Koffi, 1990; Fatemi and Frank, 1999). Another factor known to affect the resistance of attached cells to chlorine is the pH of the chlorine solution (Bremer et al., 2002; Naitali et al., 2009). It has been reported that chlorine solutions are most effective at pH  $<8.0$  (Bremer et al., 2002). Therefore, the reduced effectiveness of the chlorine against the attached cells, as found in this study, may be explained by the alkaline pH (10.3) of the solution used. Nevertheless, this study aimed to simulate a convenient and timeless practice of using commercial chlorine directly diluted in water without pH adjustment.

Treatment of SS coupons with PAA (2%) or QAC (1%) for 6 min reduced the levels of attached *L. monocytogenes* cells by 1.5–4.8 log CFU/cm<sup>2</sup> depending on the incubation period before exposure to sanitizers, the pH of medium during biofilm formation, the sanitizer and the acid adaptation of cells (Fig. 3). In general, QAC seemed to cause higher reductions of attached cells than PAA. The levels of *L. monocytogenes* attached cells after treatment with both sanitizers increased with incubation time of SS coupons at 4 °C (Fig. 3). On day 4, all types of attached cells, except for NA biofilms formed at pH 7.0, showed survivors below the detection limit of 0.3 log CFU/cm<sup>2</sup> after exposure to PAA and QAC. On day 8, only one of the latter two sanitizers caused reduction of *L. monocytogenes* below the detection limit. After 12 days of incubation, all types of biofilms, except for those formed by NA cells at pH 5.0, remained at the countable levels of 1–2.5 log CFU/cm<sup>2</sup> after exposure to any of the three sanitizers (Fig. 3).

NA biofilms formed at pH 7.0 were more resistant to PAA on days 4 and 12 than AA biofilms formed at the same pH (Fig. 3a and b). In contrast, AA biofilms developed on SS surfaces soiled with TSBYE of pH 5.0 were more resistant to subsequent treatment with 2% PAA than their NA counterparts (Fig. 3c and d). With regards to the effect of pH on subsequent resistance to PAA, NA biofilms formed at pH 7.0 were more resistant to PAA than NA biofilms formed on coupons at pH 5.0, in 4 and 12 days (Fig. 3a and c). Conversely, growth of AA attached cells at pH 5.0 made them more resistant to PAA than growth at pH 7.0 (Fig. 3b and d). Overall, in contrast to the findings of Stopforth et al. (2002), acid adaptation of the inocula used to form biofilms at an acidic medium (pH 5) significantly affected the resistance of biofilms to subsequent PAA (2%) treatment. One possible explanation is that under the acid (pH 5.0) and cold (4 °C) conditions of attachment and habitation of acid adapted cells, the acid resistance of *L. monocytogenes* could be maintained, e.g., due to function of proton pumps (Booth, 1985; Shabala et al., 2002; Samelis et al., 2004). Then, such a resistance might have induced cross-protection to the subsequent sanitation to PAA (pH 3.6; Tiganitas et al., 2009; Greenacre and Brocklehurst, 2006; Lou and Yousef, 1997).

Acid adaptation and incubation at pH 7.0 did not markedly affect the subsequent resistance of *L. monocytogenes* biofilms to 1% QAC, since

both AA and NA cells survived at similar levels after exposure to QAC on day 12 (Fig. 3a and b). Conversely, populations of NA or AA cells attached on SS coupons that had been soiled with medium of pH 5.0 were below the detection limit of 0.3 log CFU/cm<sup>2</sup>, after treatment of coupons with QAC on day 12 (Fig. 3c and d). These observations may be associated with the exposure of cells to a gradual pH reduction from 7.0 to 4.8, during growth in TSBYE + G (to obtain acid adapted cells) followed by transfer to neutral pH (7.0), or the opposite (i.e., culturing at neutral pH and shift to medium with pH 5.0). Indeed, these consecutive shifts in media of different pH may have posed a large energetic burden to the cells, in their effort to maintain their pH homeostasis, and this might have increased their sensitivity to sanitizers (Lou and Yousef, 1997; Stopforth et al., 2002; Tiganitas et al., 2009). Similarly, acid adapted cells inoculated on the surface of beef slices, which were then exposed to acidic marinates and consecutively subjected to drying were more sensitive than nonadapted cells (Calicioglu et al., 2002; 2003). Therefore, our results suggest that the resistance of biofilms to sanitizers is enhanced when the pH of sanitizer is closer to that of the environment in which the biofilm was developed. Such a conclusion may also be supported by the findings of studies assessing the acid resistance of biofilms formed in the presence of water (pH 6.8–7.0) or acid-diluted (pH 3.1–4.7) meat decontamination run off fluids. Samelis et al. (2004) concluded that the expression of high acid tolerance by acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 can be maintained or even enhanced in acid-diluted meat decontamination run-off fluids of pH  $>4.5$ , that could permit long-term survival at 10 °C. Thus, the selection of proper sanitizers should also be dependent on the intrinsic properties of the material soiling the surfaces. Furthermore, rotated use of acid and alkaline sanitizers would minimize the risk of development of resistant biofilms.

#### 4. Conclusions

Once biofilms are formed on food processing surfaces, they may be able to persist in the processing environment. Consequently, their resistance to sanitation may increase with time (Pan et al., 2006; Aarnisalo et al., 2007). Based on the findings of the present study, *L. monocytogenes* biofilms may survive for long against thermal treatment and sanitation, depending on the temperature, type, concentration and application time of disinfectants as well as the physiological state of cells (Naitali et al., 2009). Monitoring the results of cleaning and disinfection at a regular base is of utmost importance in order to modify the sanitation procedures towards a better outcome. Furthermore, since biofilm may partially explain the persistence of *L. monocytogenes* in the food processing environment (Mørsetrø and Langsrud, 2004), the combination of our data with other tools, such as rapid detection methods, typing, gene expression data by microarrays and mathematical models, may assist in biotraceability (Barker et al., 2009). This is feasible by linking the presence of *L. monocytogenes* in foods or on processing equipment at a certain food processing stage, with the ‘history’ of cells. The term ‘history’ among others, may also include the survival due to sanitation failure, or the increase in levels of attached cells on a food-soiled surface. Further research on the factors affecting the resistance of *L. monocytogenes* biofilms against sanitizers may assist in the development of new sanitation strategies, which will selectively target potentially ‘stress-hardened’ cells.

#### Acknowledgement

This work was funded by the European Union Integrated 6th Framework Programme under the project “BIOTRACER: Improved bio-traceability of unintended microorganisms and their substances in food and feed chains” (Proposal/Contract No.: 036272).

## References

- Aarnisalo, K., Lunden, J., Korkeala, H., Wirtanen, G., 2007. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 1041–1048.
- Barker, G.C., Gomez, N., Smid, J., 2009. An introduction to biotracing in food chain systems. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 220–226.
- Booth, I.R., 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49, 359–378.
- Boulangé-Petermann, L., 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. *Biofouling* 10, 275–300.
- Bower, C.K., Daeschel, M.A., 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 33–44.
- Bremer, P.J., Monk, I., Butler, R., 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Let. Appl. Microbiol.* 35, 321–325.
- Buchanan, R.L., Edelson, S.G., 1996. Culturing enterohemorrhagic *E. coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4009–4013.
- Calicioglu, M., Sofos, J.N., Kendall, P.A., 2003. Influence of marinades on survival during storage of acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* inoculated post-drying on beef jerky. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 283–292.
- Calicioglu, M., Sofos, J.N., Samelis, J., Kendall, P.A., Smith, G.C., 2002. Destruction of acid- and non-adapted *Listeria monocytogenes* during storage of beef jerky. *Food Microbiol.* 19, 545–559.
- Chaitiemwong, N., Hazeleger, W.C., Beumer, R.R., 2010. Survival of *Listeria monocytogenes* on a conveyor belt material with or without antimicrobial additives. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.021.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.-N., Hebraud, M., 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 728–737.
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E., 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1586–1596.
- Clapp, P.A., Davies, M.J., French, M.S., Gilbert, B.C., 1994. The bactericidal action of peroxides—an E.P.R. spin-trapping study. *Free Radic. Res.* 21, 147–167.
- Cloete, T.E., 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 51, 277–282.
- Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W., Scott, V.N., 2001. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 64 (3), 410–429.
- Eustace, I., Midgley, I., Giarrusso, C., Laurent, C., Jensen, I., Summer, J., 2007. An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 23–27.
- Fatemi, P., Frank, J.F., 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot.* 62 (7), 761–765.
- Frank, J.F., Koffi, R.A., 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53, 550–554.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 1–15.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., 2005. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J. Food Prot.* 68 (10), 2149–2154.
- Goulter, R.M., Dykes, G.A., Small, A., 2008. Decontamination of knives used in meat industry: effect of different water temperature and treatment time combinations on reduction of bacterial numbers on knife surfaces. *J. Food Prot.* 71 (7), 1338–1342.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y.Y., Gymoese, P., Vogel, B.F., 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18, 1165–1171.
- Greenacre, E.J., Brocklehurst, T.F., 2006. The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 62–65.
- Kathariou, S., 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.* 65, 1811–1829.
- Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J.N., 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *J. Food Prot.* 69, 2640–2647.
- Lindsay, D., von Holy, A., 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiol.* 14, 383–390.
- Lou, Y., Yousef, A.E., 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (4), 1252–1255.
- Mai, T.L., Conner, D.E., 2007. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 282–286.
- Moltz, A.G., Martin, S.E., 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *J. Food Prot.* 68 (1), 92–97.
- Morisaki, H., Tabuchi, H., 2009. Bacterial attachment over a wide range of ionic strengths. *Colloids Surf., B* 74 (1), 51–55.
- Morton, L.H.G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C., Surman, S.B., 1998. Consideration of some implications of biocides the resistance of biofilms. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 41, 247–259.
- Møretrø, T., Langsrud, S., 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1, 107–121.
- Naïtali, M., Dubois-Brissonnet, F., Cuvelier, G., Bellon-Fontaine, M.-N., 2009. Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of *Listeria monocytogenes*: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 101–107.
- Pan, Y., Breidt Jr., F., Kathariou, S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12), 7711–7717.
- Poimenidou, S., Belessi, C.A., Giaouris, E.D., Gounadaki, A.S., Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., 2009. *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (22), 7182–7188.
- Rieu, A., Lemaître, J.-P., Guzzo, J., Piveteau, P., 2008. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 76–82.
- Samelis, J., Kendall, P., Smith, G., Sofos, J.N., 2004. Acid tolerance of acid-adapted and nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 following habituation (10 °C) in fresh beef decontamination runoff fluids of different pH values. *J. Food Prot.* 67 (4), 638–645.
- Schlech, W.F., 1991. Listeriosis: epidemiology, virulence and the significance of contaminated foodstuffs—Lowbury lecture. *J. Hosp. Infect.* 19, 211–224.
- SCVMPH, 2001. European Commission document: opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health. The cleaning and disinfection of knives in the meat and poultry industry. Adopted on 20 to 21 June 2001. Available at: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out43\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out43_en.pdf). Accessed 10 July 2010.
- Sergelidis, D., Abraham, A., 2009. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control* 20, 1–10.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegmundfeldt, H., Jakobsen, M., McMeekin, T., 2002. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability revealed by a novel combination of fluorescence microscopy and microelectrode ion-selective techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1794–1802.
- Shi, X., Zhu, X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* xx, 1–7.
- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Ashton, L.V., Geornaras, I., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2009. *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiol.* 26, 12–119.
- Somers, E.B., Lee Wong, A.C., 2004. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *J. Food Prot.* 67 (10), 2218–2229.
- Stopforth, J.D., Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Smith, G.C., 2002. Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *J. Food Prot.* 65 (11), 1717–1727.
- Stopforth, J.D., Yoon, Y., Barmpalia, I.M., Samelis, J., Skandamis, P.N., Sofos, J.N., 2005. Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 309–319.
- Taormina, P.J., Dorsa, W.J., 2007. Evaluation of hot-water and sanitizer dip treatments of knives contaminated with bacteria and meat residue. *J. Food Prot.* 70 (3), 648–654.
- Tiganitas, A., Zeaki, N., Gounadaki, A.S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and  $a_w$  stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 104–112.
- U.S. FDA/USDA/CDC, 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Available from: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.
- Uyen, H.M., Van Der Mei, H.C., Weerkamp, A.H., Busscher, H.J., 1988. Comparison between the adhesion to solid substrata of *Streptococcus mitis* and that of polystyrene particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (3), 837–838.
- Waak, E., Tham, W., Danielsson-Tham, M.-L., 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (7), 3366–3370.
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D., Waites, W.M., 2000. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 860–863.
- Wilks, S.A., Michels, H.T., Keevil, C.W., 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 93–98.





## LabBase: Development and validation of an innovative food microbial growth responses database

Antonios N. Psomas<sup>a,b</sup>, George-John Nychas<sup>a</sup>, Serkos A. Haroutounian<sup>b</sup>, Panagiotis Skandamis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science & Technology, Laboratory of Food Hygiene and Quality Control, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

<sup>b</sup> Department of Sciences, Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 October 2011

Received in revised form 29 February 2012

Accepted 4 April 2012

#### Keywords:

Food microbial database

Tertiary model

Predictive microbiology

Microbial growth

Food safety

LabBase database

### ABSTRACT

The ability to monitor the results of research on food safety could help the food industry to design safe foods and to control reliably their stability during the stages of processing and distribution. However, due to the large volume of data and information that exists in the international literature, the specific (and necessary) knowledge for making decisions on the safety of certain foods is difficult to glean, or such a process is only possible with the help of experienced scientific staff. Therefore, a systematic recording of such research data in food databases is required, allowing the user to find quickly and easily the requested information (e.g. depending on the food product or the production conditions and distribution). The user would have the ability to compare different foods or to perform scenarios of food manufacturing and distribution. This paper introduces a novel food microbial growth responses database, called LabBase that satisfies the above requirements, supported by innovative application software, designed for scientific and industrial use.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Over the past two decades, an enormous volume of microbiological data has been produced worldwide and it is readily available mainly via papers which have been published in international journals. The deployment of international databases and search engines for searching and accessing relevant papers in academic journals, archives or other collections have contributed decisively to the rapid spread of such information (Miller, 1993; McMeekin, 2007). However, the data included in these reports are not fully available, or not always with a meaningful visual way (e.g. graph, summary table). On the other hand, the effective use of published knowledge requires high academic background and the ability of searching for the appropriate sources of information.

Databases of microbial responses in foods include compiled data, which originate from archived datasets, international literature and mathematical models, developed to predict the growth, survival and death of microbial populations in foods, depending on the intrinsic food properties and the extrinsic (environmental) factors (McMeekin et al., 2006; McMeekin, 2007; Baird-Parker, 1995). For example, key factors influencing the microbial behavior in food environments are humidity, water activity ( $a_w$ ), pH, temperature, packaging atmosphere and presence of preservatives (Membré and Lambert, 2008).

The most significant relevant example in this field is the international food microbial database “ComBase” which includes the results of published papers on the microbial responses in foods and laboratory media (Baranyi and Tamplin, 2004). It is maintained by the ComBase consortium, which is an association between the Institute of Food Research (IFR) and the Food Standards Agency, UK, the USDA Agricultural Research Center and its Eastern Regional Research Center, USA, the National Food Research Institute of Japan and the University of Tasmania Food Safety Center (FSC), Australia (ComBase, 2007). The Internet version of the ComBase, developed and hosted by Institute of Food Research-IFR, Norwich, U.K., is available on the website: <http://www.combase.cc/>. A ComBase-derived web-based database, called Microbial Responses Viewer – MRV (<http://cdfri.dc.affrc.go.jp/>), has been developed by Koseki (2009), consisting of microbial growth/no growth data. However, ComBase is addressed to scientific-research staff and systematic improvement is needed to make its use possible by unqualified personnel, while unpublished results are not included, which can be very useful and of high quality. Furthermore, the data included are based mainly on results produced from laboratory media (broths), while data on interactions between foods and microorganisms are limited (ComBase, 2007). Recently, Buche et al. (2011) have applied a method which allows data to be retrieved from data tables found in scientific documents on the Web and to be annotated thanks to the ontology. This method is based on the querying system, called MIEL++ allowing the end-user to query simultaneously and in a transparent way the local data and the semantic annotated Web data, thanks to the ontology.

\* Corresponding author. Tel./fax: +30 210 5294684.

E-mail address: [pskan@aua.gr](mailto:pskan@aua.gr) (P. Skandamis).

The aim of this work was to address the usefulness and the technological aspects of “LabBase database”, a new user – friendly food microbial responses database with innovative characteristics, which make it a competitive software tool that can be used by both expert and non-expert users in Food Microbiology. The LabBase database is supported by an innovative servicing application, capable of providing information on the microbial population dynamics of the selected microorganisms-food combinations under various physicochemical and environmental conditions, in both tabular and graphical way.

## 2. Materials and methods

Data recording was applied in Microsoft Excel® environment. This environment was selected because of its special features which makes it widespread among scientists and data analysts (Baranyi and Tamplin, 2004). The servicing application, called “LabBase Navigator”, was written in Visual Basic for Applications-VBA (Petroustos, 1998; Walkenbach, 2004). Moreover, a Microsoft Access® application was developed in order to support the graphical comparison of the selected microbial growth profiles (Alexander and Clark, 2007; Schmalz, 2005). It has been incorporated to the LabBase software in order to enhance its capabilities.

The data stored in the database are organized in linear format, and is grouped in three main field categories for each microbial response record: (i) The third order fields, expressing the analytical measurements for each growth condition, including the time, the microbial response, the physicochemical and environmental data. The independent replicate measurements of microbial responses at each time interval are stored vertically, associating all repetitions, i.e., of the same or independent experiments but for a given set of conditions, with the same observation time. The initial temperature ( $T$ ), pH and water activity ( $a_w$ ) data include the values recorded at the beginning of the observation (experimental) period. The endogenous temperature, pH and water activity data express the changing values during the experimental duration (e.g. during incubation or storage of foods), due to physicochemical changes occurring on the substrates where microorganism are habituated. These internal (intrinsic) changes depend on the microbial growth

conditions (Baranyi and Tamplin, 2004) and are the result of the impact of the microbial biochemical processes on their environment. Currently, such endogenous data are introduced into the database in tabular form (Table 1), but at the moment they cannot be visualized by the data filtering procedure via the queries mechanism. This might be the subject of a future software update, depending on the feedback by the users; (ii) Second order fields, expressing the conditions prevailing in each experiment; and (iii) first order fields, expressing the general features of a specific dataset (Fig. 1). Syntactically, these fields contain numerical or alphanumeric values. Based on the above classification, interpretation regions for numerical values were defined for the corresponding fields so that incoming data could be tested. LabBase database record format is presented in Table 1. The representative data introduced in the database in order to develop and validate the software, were organized in four datasets: (i) Spoilage of ham; (ii) behavior of *Listeria monocytogenes* in response to temperature, pH and water activity; (iii) growth of *Staphylococcus aureus* in milk; and (iv) biofilms of *L. monocytogenes*.

The servicing application includes powerful tools in order to provide the users with the ability to display a single microbial growth profile or a set of growth profiles in the same graph, by the sequential application of a series of queries. The available data filtering options are (Fig. 2): (i) “SUB GROUP ORGANISMS”, expressing the species of microorganisms, which are cultured in the experiments; (ii) “SUB GROUP SUBSTRATE”, expressing the medium in which the microorganisms grow; (iii) “SELECTIVE ENUMERATION MEDIA”, expressing the type of substrate used to monitor the microbial growth in the medium; and (iv) “EXPERIMENTAL CONDITIONS”, encompassing the specific experimental conditions applied to each dataset (i.e., an independent experiment). These conditions also serve as keywords, so that the user may retrieve the whole data set that corresponds to these records by a simple alphanumeric search (Fig. 2); and (v) Initial values for temperature, pH and water activity which are numerical values. The user can define the range for each factor. These fields allow the user to perform more detailed data retrieval, based on a single growth condition factor (e.g. the initial temperature), or even a combination of them.

**Table 1**  
LabBase database record format.

Fields n/a	(1) A/A n	(2) Dataset a	(3) Dataset title a	(4) Dataset category a	(5)Notes a
Description e.g.	Records counter 1096	Datasets encoding ds002	title <i>L. monocytogenes</i> in response to pH/ $a_w$ /T	category Safety	notes
Fields n/a	(6) Sub group substrate a	(7) Sub group organisms a	(8) Selective enumeration media a	(9) Experimental conditions a	(10) Status a
Description e.g.	Substrate TSB	Organism <i>Listeria monocytogenes</i>	Media No media information	Experimental condition pH 4.5 $a_w$ 0.90 T = 5 °C	Dataset subset ds002q
Fields n/a	(11) Measures No. n	(12) Measures repeated No. n	(13) t n	(14) (days/hours/min) a	(15) LogCFU/ml n
Description e.g.	Info about no of measurements 1	Time	d/h/m 18.00	response d	5.6
Fields n/a	(16) T (°C) n	(17) pH n	(18) $a_w$ n	(19) T (°C) INIT n	(20) pH INIT n
Description e.g.	Changing values due to the microbial activity (for future use) 5.0	Initial values 4.50	0.900	5.0	4.50
Fields n/a	(21) $a_w$ INIT n				
Description e.g.	Initial values 0.900				

n: numerical value.

a: alphanumeric value.

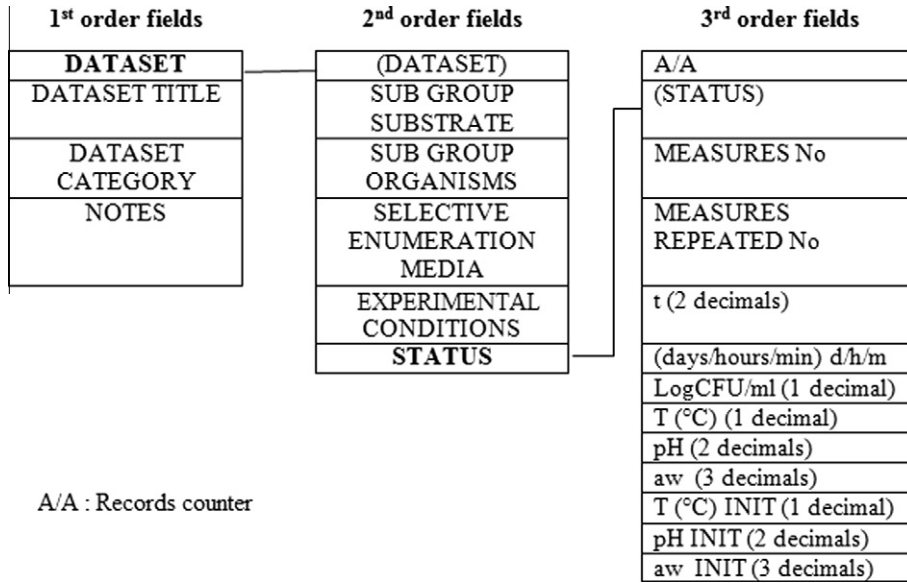


Fig. 1. LabBase database record organization and data classification.

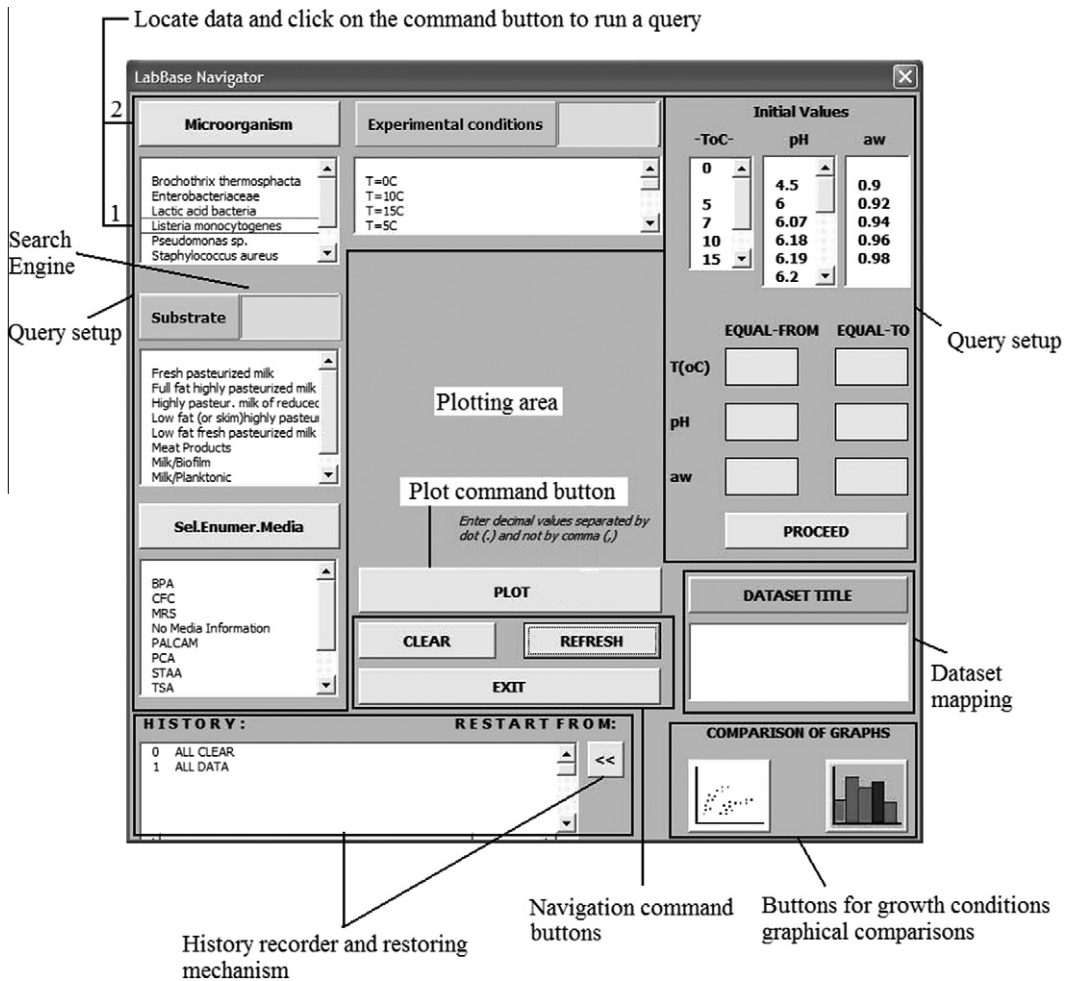


Fig. 2. The servicing application UserForm.

The imported values are checked by the software in order to reject those that exceed the allowed range. The syntax check ensures the reliability of the applied queries to the fields of interest, pre-

venting from possible problems such as the outraged pH and water activity values. During the display of field values in the UserForm of the LabBase servicing application, the recurrent values are

consolidated into a single value, while all the displayed values are sorted. If a field includes a blank value then it is displayed but it cannot be selected. In ComBase, if the result of a measurement is referenced as N/D (not detected), then a number outside the interpretation region of the field is used as a symbol (Baranyi and Tamplin, 2004). When the user applies a query to a specific field, the result is the filtering of the corresponding records. Then all the displayed data are automatically updated. The user may apply

a new data filtering to the updated information or display graphically a microbial growth profile.

A microbial growth profile is represented by a scatter plot, displayed in the plotting area of the LabBase servicing application. The time unit of the microbial growth graphical representation is the day (d). The other recorded time units, are converted automatically into days before data processing.

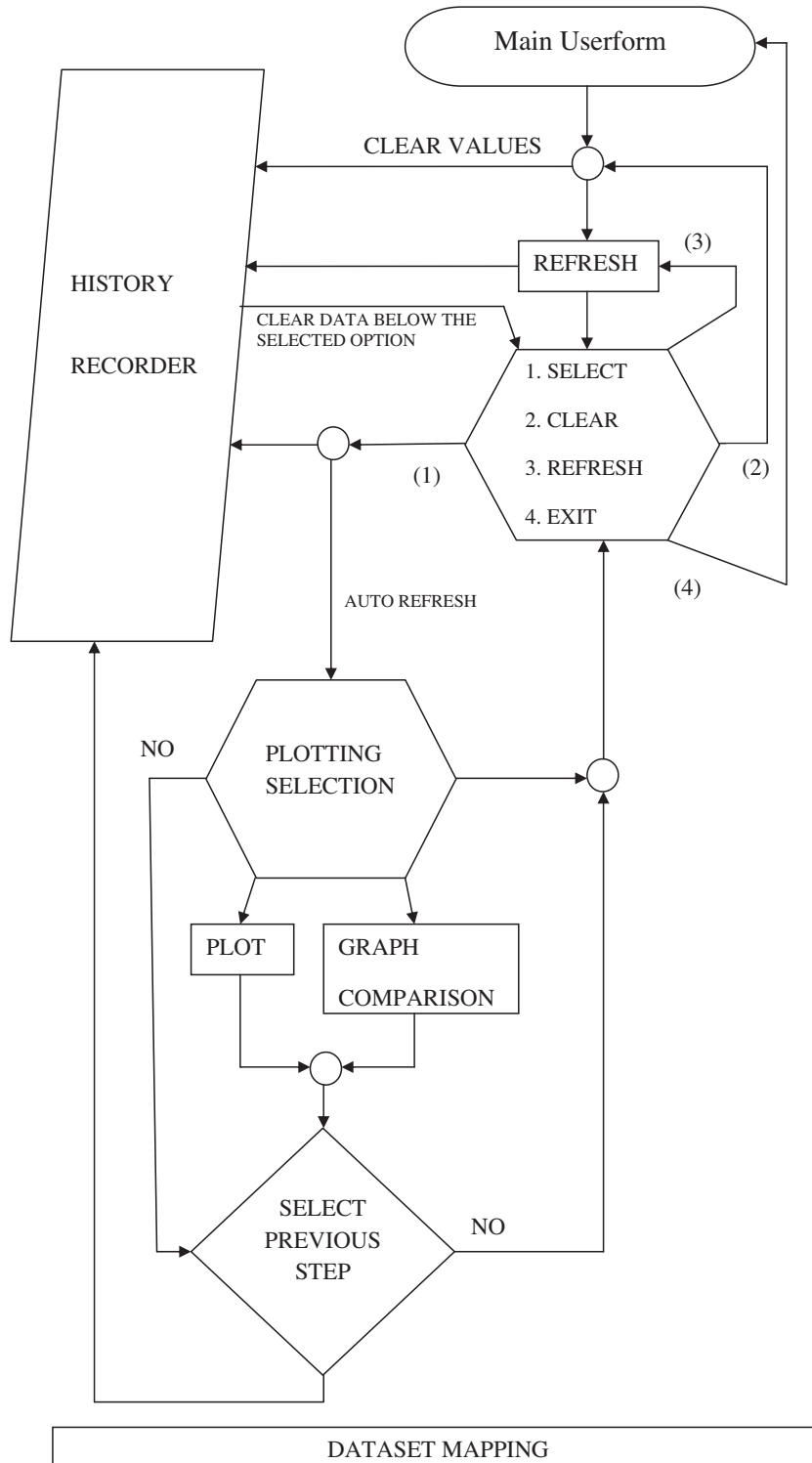


Fig. 3. The servicing application mechanism.



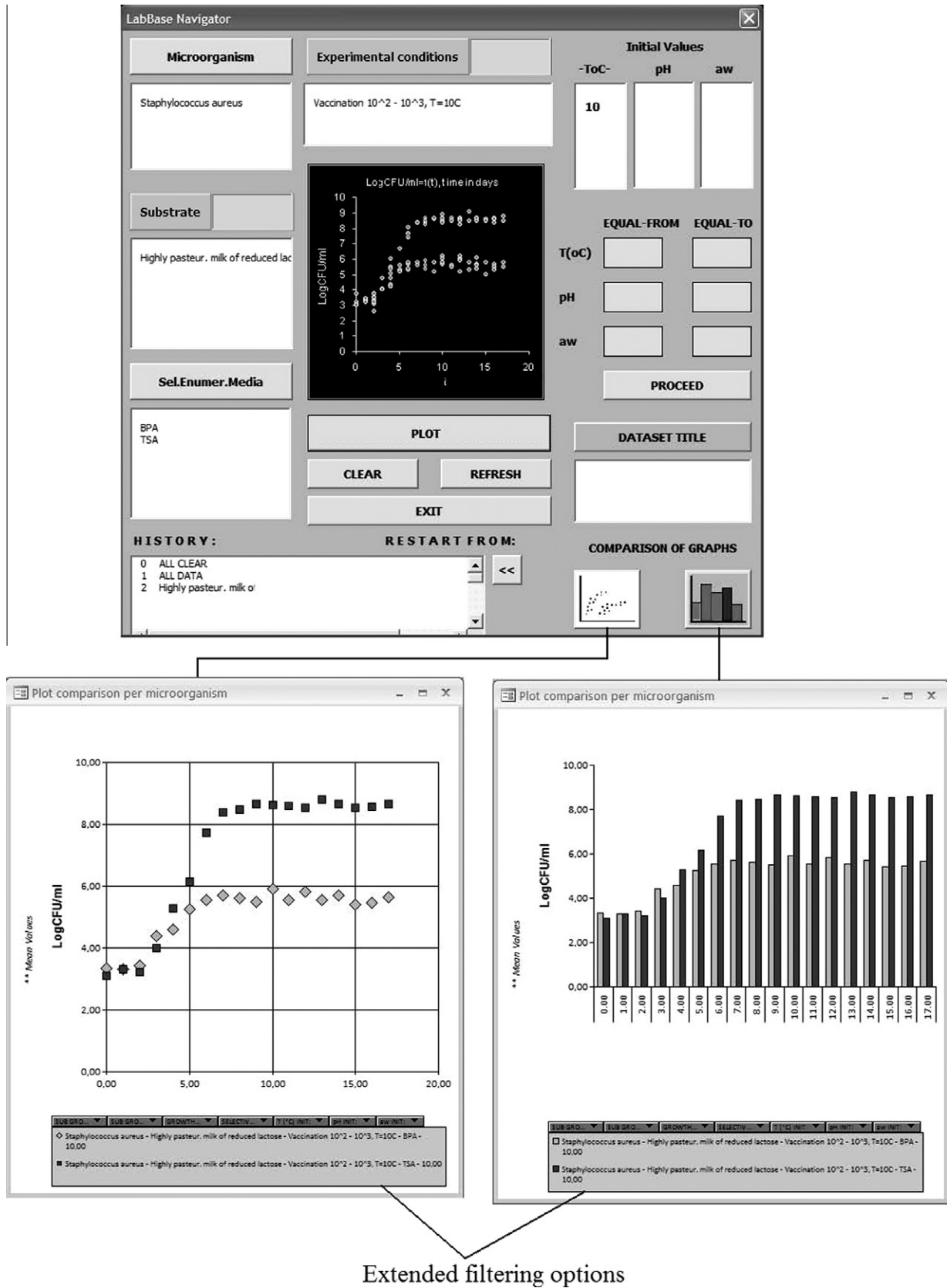


Fig. 4. Comparison options for displaying growth profiles in two different enumeration media, namely BPA and TSA of *Staphylococcus aureus* in highly pasteurized milk of reduced lactose at 10 °C when the special growth condition is inoculation level of  $10^2$ – $10^3$  CFU/ml. Scatter plot: BPA(◇) and for TSA(■). Histogram: BPA(□) and TSA(■).

### 2.1. An innovative mechanism: recording/restoring of data

An innovative mechanism of the servicing application provides the user with the ability to restore a set of records representing the microbial growth conditions recorded at an intermediate stage of the data analysis procedure. The user then can perform a new data filtering, starting from the restored records. For each applied query, the software creates a characteristic record which is called “history record” and it is described by the value of the field from which it has been derived (Fig. 2).

A new history record updates sequentially the corresponding display area after a data filtering while a serial number is displayed in the front of each record. The serial number “1” which is displayed in the front of a history record means that the data have been transferred from the database area to the working data area. The serial number “2” of the history record corresponds to the first applied query, etc. Each “history record” corresponds to a filtered dataset, which is saved in a specific data area, in order to be restored after a user request. When the user selects a “history record”, then the corresponding set of analytical records is transferred from the data area containing the saved records to the working data area. Moreover, all the values of the history display area below the selected one, are cleared. A flowchart describing the mechanism of the servicing application is presented in Fig. 3.

As a case study, the dataset “*S. aureus* in milk” was used. Let’s assume that the user initially, selects the substrate value “Highly pasteurized milk of reduce lactose”. The result values which are displayed in the enumeration media display area are: “BPA” and “TSA”, while the displayed value in the Growth Conditions display

area is: “Inoculation  $10^2 - 10^3$ ,  $T = 10^\circ\text{C}$ ”, respectively. Let’s assume now that the user selects the enumeration media value “BPA” in order to isolate the records including this value. Then, the user can plot the corresponding microbial growth profile. In the meantime, the applied queries have been recorded sequentially in the history display area with the following format: (0) ALL CLEAR; (1) ALL DATA; (2) Highly pasteurized milk of reduce lactose; (3) BPA.

If the user wants to plot the microbial growth profile when the enumeration media value is “TSA”, then instead of restarting the search procedure, the history record “2. Highly pasteurized milk of reduce lactose” can be restored by clicking “RESTART FROM”. Then, the servicing application data area is updated by the restored data. The user now can select the enumeration media value “TSA” in order to plot the corresponding microbial growth profile.

This mechanism is very useful because it allows the users to modify their initial search, starting from an intermediate stage and not from the beginning. Without this mechanism, the user should have to start from scratch.

### 2.2. Comparison between microbial growth profiles

In the case that the displayed microbial growth profiles is more than one, the distinction between them is not clear, since all the profiles have the same color and the data markers have the same shape. For that reason, the servicing application includes two more graphical tools for the separation and the comparison of the multiple microbial growth profiles which are displayed in the same graph. The first tool presents a scatter plot and the second a histogram. In these graphs, the microbial growth profiles are displayed

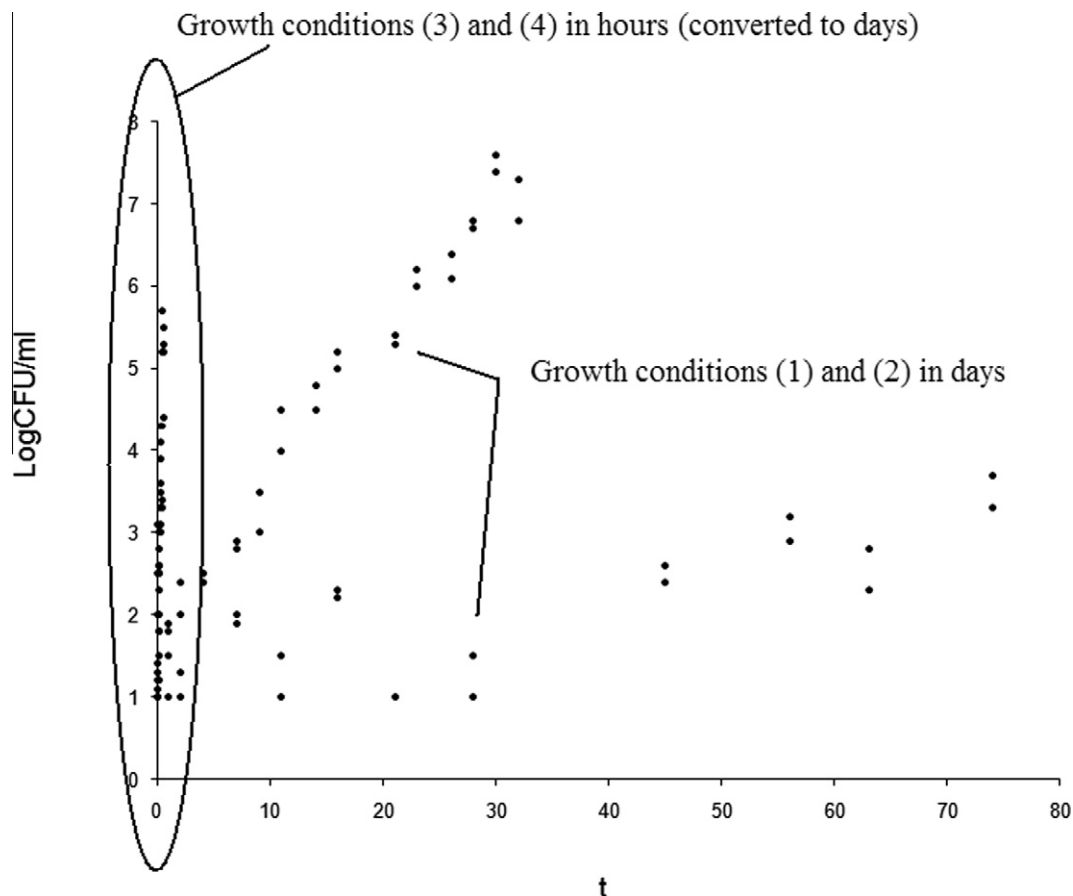


Fig. 5. The microbial growth profiles under the growth conditions (1) and (2) cannot be displayed graphically together with the corresponding profiles (3) and (4) in order to be compared, because of the high amplitude of the time values.

with discrete colors (and discrete data markers in the case of the scatter plot) (Fig. 4). These graphical representations are created by an external Microsoft Access® application, which is encom-

passed in the main software. It has been found that the applications developed with Microsoft Access®, when compared to the corresponding ones, developed with Microsoft Excel®, have: (i)

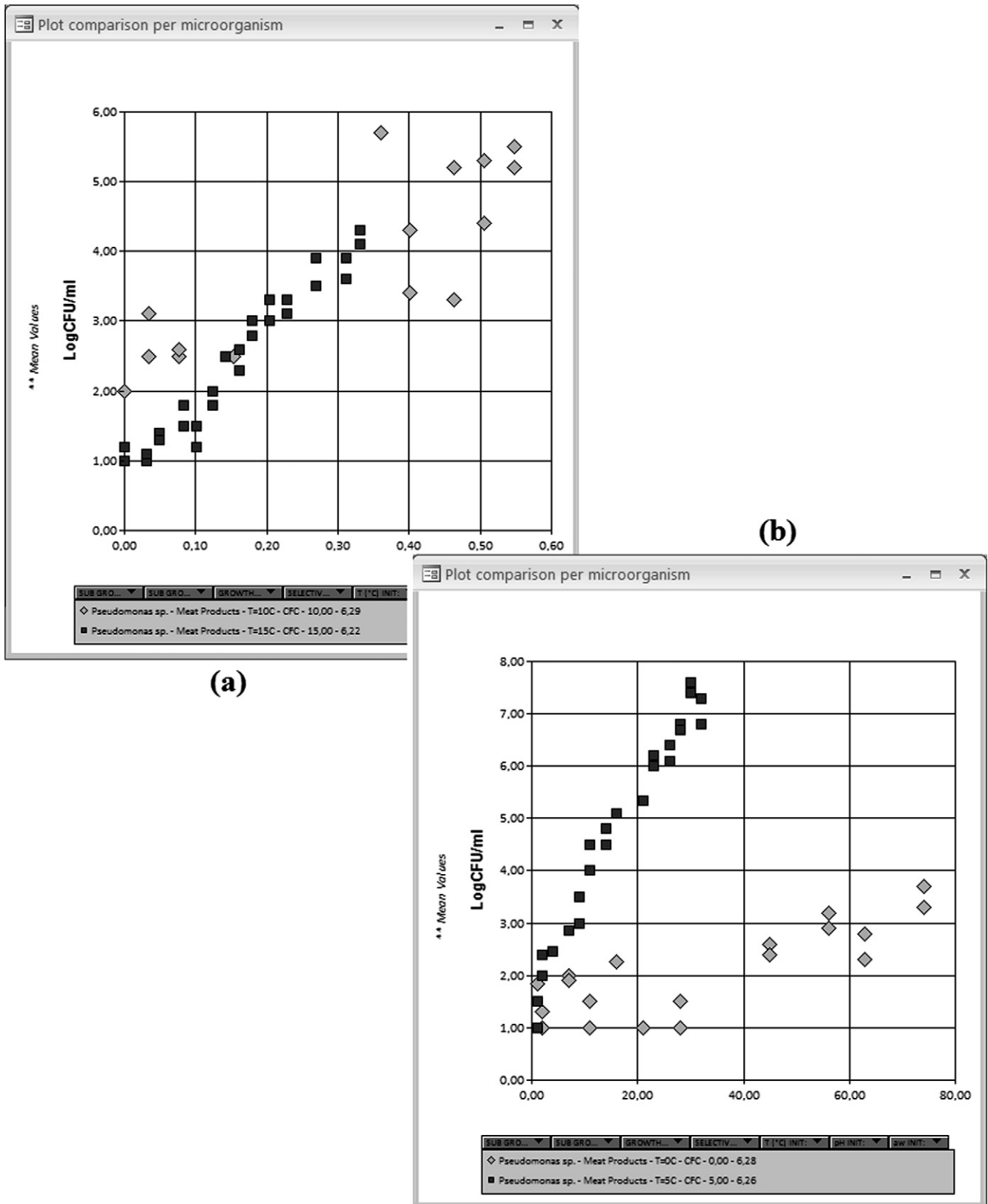


Fig. 6. Representative comparisons between growth profiles corresponding to the following growth conditions: (a) T = 10 °C pH = 6.29 (◇) and T = 15 °C pH = 6.22 (■); (b) T = 0 °C pH = 6.28 (◇) and T = 5 °C pH = 6.26 (■) when the microorganism is *Pseudomonas* sp., the substrate is meat products and the enumeration media is CFC.

more rapid access to databases (Baranyi and Tamplin, 2004); (ii) better efficiency in concentrating and consolidating of data (Microsoft Office, 2011a); and (iii) better efficiency in development of graphical representations. Although Microsoft Excel<sup>®</sup> and Microsoft Access<sup>®</sup> use the same Chart Object (the same graphical engine) (Robinson, 2008) in the area of the software development, Microsoft Access<sup>®</sup> provides more efficient programming tools and graphically displays complex queries (Microsoft Office, 2011a). For the above reasons, we applied a special methodology in VBA programming, called “Integrating Excel and Access” (Alexander and Clark, 2007; Schmalz, 2005). The Microsoft Access<sup>®</sup> application consists of two PivotChart reports which have been programmed in order to: (i) display separately the microbial growth profiles with different colors; and (ii) offer further options for dynamic data filtering in order to develop new graphical representations (Fig. 4). When the corresponding graphical options are activated, the filtered records are transferred from the working data area (Microsoft Excel<sup>®</sup> data sheets) to two temporary PivotTable reports (one for the scatter plot and one for the histogram respectively). The transferred time unit is automatically converted to days. The PivotTable reports constitute interactive, cross tabulated reports that summarize and analyze the database records (Microsoft Office, 2011b). When the user quits the Microsoft Access<sup>®</sup> application, the corresponding data tables are cleared of data and the application size is redefined automatically.

### 2.2.1. Microbial growth profiles comparison limitations

Let's assume that the user selects the value “CFC” (Field: Enumeration Media; corresponding dataset: Spoilage of ham) in order to apply a query. The displayed result values are: ‘Microorganism’ = *Pseudomonas* sp.; and ‘Substrate’ = ‘Meat products’. The conditions of microbial growth are:

$$\begin{cases} T = 0^{\circ}\text{C, when the value of pH is 6.28} & (1) \\ T = 5^{\circ}\text{C, when the value of pH is 6.26} & (2) \\ T = 10^{\circ}\text{C, when the value of pH is 6.29} & (3) \\ T = 15^{\circ}\text{C, when the value of pH is 6.22} & (4) \end{cases}$$

The time unit for the growth profiles of conditions (1) and (2) is the day (d) while for (3) and (4) is the hour (h) respectively.

The comparison between the four growth profiles which were developed in the same graph is not possible because of the high amplitude of the time values. The program has been developed to limit the number of the time units to one, by converting automatically the hours to days. In that case, the data markers of the growth profiles (3) and (4) appear to be concentrated closely to the y axis and cannot be distinguishable, while the data markers of the growth profiles (1) and (2) are distinct and comparable (Fig. 5). The possible comparisons which can be performed between growth profiles are (Fig. 6):

$$\begin{cases} (1) \text{ and } (2) : \text{Time unit} = \text{day} \\ (3) \text{ and } (4) : \text{Time unit} = \text{hour} \end{cases}$$

## 3. Availability

A website has been developed in order to provide the users with free access to the software. The latter and the user's manual can be downloaded, free of charge, from anyone who is interested, by visiting the address <http://www.aua.gr/psomas/LabBase>.

## 4. Results

The authors have ascertained that there is a large quantity of unpublished food microbial responses data available in food indus-

tries which are not introduced in any software specially designed for that purpose. To our knowledge, there is not any easy-to-use database software in order to be used by non expert users for their data storage. The ComBase database seems to be the only available software that could serve that scope, but it is addressed to scientific staff. LabBase software has been developed in order to fill this gap. It has been designed as a user-friendly data platform that may accommodate useful scientific data in a user-friendly manner but without any loss of its scientific character. It is addressed to the industrial users who are not familiar with the internet services or they are not expert enough in order to use the international database ComBase.

Currently, LabBase constitutes a standalone software application accommodating full growth and survival curves derived from viable count measurements. Data management includes the microbial data filtering according to any combination of microorganism, substrate, enumeration media, growth conditions, temperature, pH and water activity ranges of interest. The data analysis tools include: (i) A time vs. logCFU graphical representation (a microbial growth profile); (ii) a mechanism for two or more microbial growth profiles graphical comparison. This mechanism separates the microbial profiles and represents them in the same graph area; and (iii) filtered data, readily available in tabular format. The VBA code used for LabBase software development provides the user the ability to enter in the temporary data area, in Microsoft Excel<sup>®</sup> environment for further data processing.

The LabBase software may assist in food safety control in post-harvest operations. More specifically, the information provided by the LabBase database can be exploited by the food industry in order to estimate: (i) the potential risks of the deterioration in the microbiological quality and safety of food products during the manufacturing stages (Kang et al., 2000); (ii) the shelf life based on scientifically documented food microbial stability, in order to support the inventory management; (iii) the microbial stability of new products originating from traditional ones (with known stability) after changing their composition or their manufacturing procedure; and (iv) the impact of new preservatives/antimicrobials on microbial growth.

The main differences between LabBase and ComBase software are focused on the following general and structural points: (i) the LabBase database constitutes a standalone application which is addressed to non expert users. ComBase database is a web application which is addressed to scientific staff; (ii) both published and unpublished microbial data can be introduced into the LabBase database. The application is designed in such way that can be customized by the users, offering them the opportunity to use it as a personal database, without authorization. ComBase database includes only published data and is accessible only for retrieval but not for entering own data; (iii) the structure of the LabBase database is based on the division of the microbial records in three data areas in a simple linear format. The structure of the ComBase database is based on a typical and simple linear format containing one master and several definition tables (Baranyi and Tamplin, 2004).

The innovative feature of the servicing application constitutes a mechanism which has been developed in order to store the filtered datasets corresponding to executed queries. As described above, this mechanism includes a monitoring system of the recorded datasets providing the user the ability to restore a saved dataset in order to continue the queries execution from that step onward. This procedure is very useful because it resolves the issue of cancelling the entire filtering process when the user simply wants to modify an intermediate step of the last search and repeat it.

Excel/Access Integration programming technique has been applied for the comparison of the microbial growth profiles and further data analysis, exploiting the high performance graphical abilities of Microsoft Access<sup>®</sup>. Several other points of the computa-

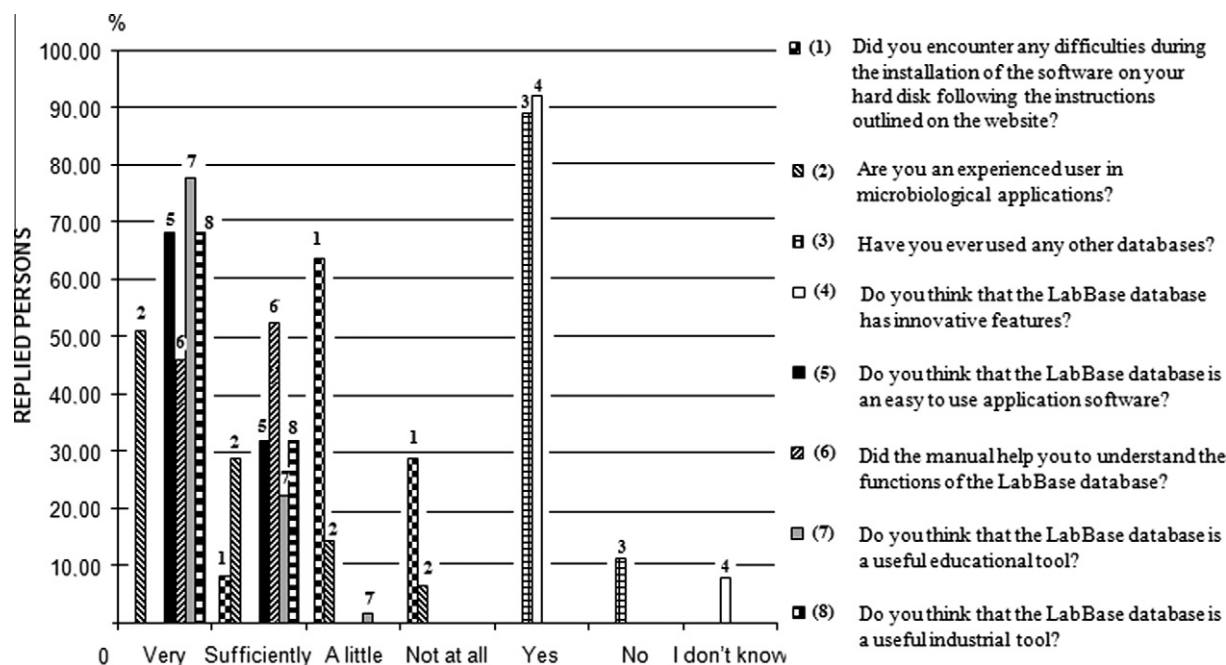


Fig. 7. Evaluation of the performance and acceptability of the LabBase database.

tional realization of the LabBase database were discussed in detail and relevant references to similar applications have been provided in the present paper. The exact demonstration of the LabBase database software and other technical issues can be found in LabBase database dissemination website (Psomas and Skandamis, 2011).

The applicability of the LabBase database for commercial use was ascertained with the distribution of questionnaires to 63 individuals worldwide, who are involved in food microbiology research and/or in the food industry. They were asked to answer eight basic questions concerning their experience in the use of software and their opinion about the LabBase database (Fig. 7). Initially, the respondents had to download the software from the corresponding webpage to their hard disk and to install it respectively by following the instructions which are available in the same webpage. The website provides all information needed for the installation of the software (operation's manual, guide for the compilation of the "labbaseaccs" application), whereas none the respondents received training. The distributed questions and the derived statistical analysis are shown in Fig. 7.

The statistical analysis revealed that the majority of the respondents (92%) recognized the fact that the software has innovative features. This recognition was made by the respondents who are experienced in the use of databases (88.9%). We believe that these innovative characteristics such as: (i) the mechanism of recording and restoring of the applied queries, developed especially in order to help user to redefine his options easily and (ii) the mechanism of Excel/Access integration developed in order to achieve a fast and complex graphical analysis of data, differentiate our software from other similar databases, making LabBase, a software tool of a high degree of flexibility, which can be used by non expert users. Most respondents considered that the LabBase database was a very useful educational tool (77.8%) while the 68.3% of the replied persons judged that it was a very useful industrial tool. The 79.7% of the respondents have some experience in food microbiological applications (very: 50.8%; sufficiently: 28.6%) while all the respondents consider that the software constitute an easy - to - use application.

Most of the respondents encountered some difficulties during the installation of the software to their hard disk (63.5%). This is due to the compilation of the Microsoft Access® application that

has to be done. However, there is enough information available on the software's website for the necessary actions. The user's manual which is posted on the software's webpage is sufficiently good, as it has been judged by the respondents (very: 46%; sufficiently: 52.4%). The results of the statistical analysis show a positive perspective concerning the acceptance of the LabBase database. Further dissemination of this software is needed in order to be highlighted its usefulness.

## 5. Discussion

In the future, the LabBase database will be enriched with new data concerning different microorganisms in different environments, derived from both experiments and the international literature. In that phase, users will be able to compare both LabBase and ComBase databases and discover the advantages and disadvantages of the LabBase database against the ComBase database, respectively.

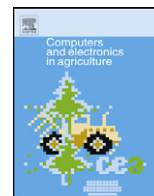
We aspire to establish the LabBase database as a common software platform between the decentralized food industries which have limited expertise or knowledge in the field of search and exploitation of the appropriate information from international databases such as ComBase database. Each plant could concentrate and systemize its archived data which are of great scientific value, although not published. The future upgrade of the LabBase database concerns on the development of a web application, based on the same platform, in order to support data exchange between the scattered food industries and research laboratories.

## References

- Alexander, M., Clark, G., 2007. Microsoft Excel and Access Integration with Office 2007. Wiley Publishing Inc., Indianapolis, Indiana.
- Baird-Parker, A.C., 1995. Development of industrial procedures to ensure the microbial safety of food. *Food Control* 6, 29–36.
- Baranyi, J., Tamplin, M.L., 2004. A common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection* 67, 1967–1971.
- Buche, P., Couvert, O., Dibia-Barthélemy, J., Hignette, G., Mettler, E., Soler, L., 2011. Flexible querying of Web data to simulate bacterial growth in food. *Food Microbiology* 28, 685–693.

- ComBase, 2007. A Combined Database for Predictive Microbiology, Institute of Food Research. <http://www.combase.cc/> (retrieved February, 2011).
- Kang, S.H., Kodell, R.L., Chen, J.J., 2000. Incorporating model uncertainties along with data uncertainties in microbial risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32, 68–72.
- Koseki, S., 2009. Microbial Responses Viewer (MRV): a new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *International Journal of Food Microbiology* 134, 75–82.
- McMeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S., Zwietering, M.H., 2006. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology* 112, 181–194.
- McMeekin, T.A., 2007. Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Science* 77, 17–27.
- Membré, J.M., Lambert, R.J.W., 2008. Application of predictive modeling techniques in industry: from food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 128, 10–15.
- Microsoft Office, 2011a. Using Access or Excel to manage your data. <http://office.microsoft.com/en-us/access-help/using-access-or-excel-to-manage-your-data-HA010210195.aspx>. (retrieved, May, 2011).
- Microsoft Office, 2011b. About PivotChart reports., <http://office.microsoft.com/en-us/excel/HP052497741033.aspx>. (retrieved, May, 2011).
- Miller, A.J., 1993. Data collection and capture systems for microbial modeling. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 12, 291–294.
- Petroutsos, E., 1998. *Mastering Visual Basic 6*. Sybex Inc., San Francisco, USA.
- Psomas, A., Skandamis, P., 2011. LabBase: An Innovative Food Microbial Responses Database, LabBase Database Dissemination Webpage, Agricultural University of Athens, <http://www.aua.gr/psomas/LabBase> (retrieved March, 2011).
- Robinson, G., 2008. Creating Charts in an Access 2007. *Database Journal*. <http://www.databasejournal.com/features/msaccess/article.php/3764206/Creating-Charts-in-an-Access-2007-Database.htm>.
- Schmalz, M., 2005. *Integrating Excel and Access*. O'Reilly Media Inc., USA.
- Walkenbach, J., 2004. *Excel 2003 Power Programming with VBA*. Wiley Publishing Inc., Indianapolis, USA.





## Original papers

## Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions

Antonios N. Psomas<sup>a,b</sup>, George-John Nychas<sup>a</sup>, Serkos A. Haroutounian<sup>b</sup>, Panagiotis N. Skandamis<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science & Technology, Laboratory of Food Hygiene and Quality Control, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

<sup>b</sup> Department of Sciences, Laboratory of Chemistry, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 October 2010

Received in revised form 3 January 2011

Accepted 24 January 2011

## Keywords:

Predictive microbiology

Food safety

Microbial growth prediction

Safety tertiary model

Dynamic temperature conditions

## ABSTRACT

The use of predictive modeling software may markedly contribute to the better understanding of the microbial behavior in foods. In this paper, the development and validation of a tertiary model, which provides predictions of microbial growth in foods under dynamic or static temperature conditions, is presented. In particular, the UGPM (Unified Growth Prediction Model) software applies the Baranyi and Roberts (1994) primary model, coupled to a secondary temperature model, in order to simulate growth of a given microorganism during storage of a specific food or food category. The software, intended to be used by both expert and non-expert users, may be a valuable decision support tool for the food industry, by assisting in the management of foods based on their actual shelf-life and microbial safety, thereby limiting the deterministic “best-by” practice for the determination of shelf-life. The latter is commonly based solely on empirical observations and has high uncertainty. This in turn, may result in the rejection of large quantities of unspoiled or safe foods, or even in the distribution of spoiled and unsafe foods, due to ignorance of the effect of temperature abuse on the microbial spoilage and safety of products.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The application of predictive models has markedly assisted in modern food safety management (Gorris, 2005). Such models constitute mathematical tools, which are based on the product characteristics and the conditions occurring during processing or storage of foods, in order to accurately predict their microbial quality and safety. In this context, the ability to simulate the complex world of microbes constitutes a valuable methodology, which combines information from different scientific areas, such as chemistry, mathematics, biology, computer programming and statistics. Predictive microbiology can quantify the response of microorganisms in foods with the help of the various mathematical models. These models are mathematical expressions describing the inactivation or increase of microbial populations in foods as a function of the relevant intrinsic or extrinsic variables generally on a macroscopic scale (Marks, 2008). The mathematical models should also take into account the physiological state of microorganisms, which depends on the species and the ‘history’ of exposure of microbial cells to various stresses during processing and distribution of foods (Tiganitis et al., 2009; Le Marc et al., 2010).

The models are classified into three categories: (i) the primary models, which are used to describe the changes of the microbial population density as a function of time using a limited number of kinetic parameters (e.g., lag time, growth or inactivation rate and maximum population density); (ii) the secondary models expressing the effect of environmental variables (e.g., temperature, NaCl, pH, etc.) on the kinetic parameters estimated by the primary models (McMeekin et al., 2006; Ross et al., 2000; Whiting, 1995); (iii) the tertiary models, which are computer tools that integrate the primary and secondary models into user-friendly units. The wider use of models in the food industry and research depends on the availability of user-friendly software, which encompass predictive models and allow different users to retrieve information from them in a rapid and convenient way (McMeekin and Ross, 2002; McMeekin et al., 2006).

Growth models are fundamental tools in predictive microbiology, especially for ready-to-eat (RTE) foods, since they may assess the exposure of consumers to the doses (levels) of pathogenic bacteria at the time of consumption (McMeekin et al., 2006). Several predictive modeling software have been developed in order to provide predictions of microbial responses in foods by controlling environmental and physicochemical factors and/or food additives (Baranyi and Tamplin, 2004). The most popular ones are: (i) the stand-alone Pathogen Modeling Program (PMP v.7.0) and the Online Pathogen Modeling Program (Online PMP) developed by the Eastern Regional Research Center, Agricultural Research

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 5294684; fax: +30 210 5294684.

E-mail address: [pskan@aua.gr](mailto:pskan@aua.gr) (P.N. Skandamis).

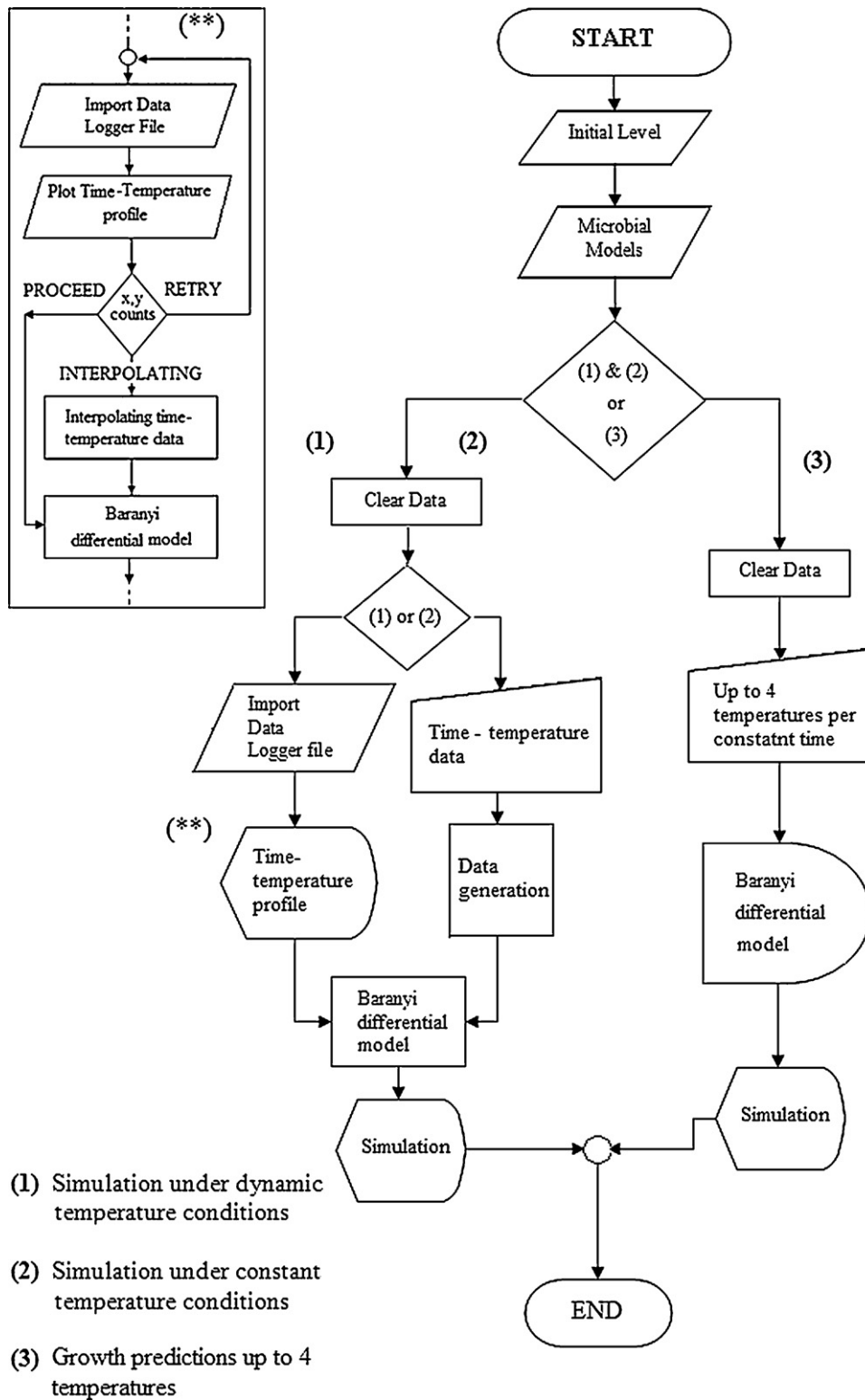


Fig. 1. Flowchart describing the UGPM software application layout.

Service, U.S. Department of Agriculture (USDA, 2009a,b); (ii) the Sym'Previous (Leporq et al., 2005); (iv) the Microbial Responses Viewer (Koseki, 2009); (v) the Pseudomonas predictor (Neumeyer et al., 1997); (vi) the Seafood Spoilage Predictor (Dalgaard et al., 2002); (vii) the ComBase Predictor which is a modified, augmented and improved web-version of the free of charge Growth Predictor stand-alone program (2003) (ComBase, 2007); (viii) the Perfrigens

Predictor (Le Marc et al., 2008) which can be accessed through the modeling toolbox of Combase; (ix) the software for predicting growth/inactivation of *Salmonella* under dynamic conditions of temperature, pH and  $a_w$  (Pin et al., in press). Most of these programs are locked and the modification of their models or the addition of new models is not feasible or requires authorization. Furthermore, the embedded models are based mainly on data from laboratory



**Table 1**  
Representative square-root type models for specific food–microorganism combinations, included in the UGPM microbial database.

Microorganism	Substrate	$h_0^a$	$Y_{end}^b$	$\alpha^c$	$T_{min}^d$	Reference
Lactic acid bacteria	Cheese salad I 'Tyrosalata'	2.37	8.5	0.019	−10.7	Manios et al. (2009)
	Cheese salad II 'Tyrokafteri'	2.55	8.5	0.023	−4.60	Manios et al. (2009)
	Cooked cured meat products	1.03	8.2	0.057	−6.72	Mataragas et al. (2006b)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cooked ham	0.84	5.0	0.058	−1.03	Mataragas et al. (2006a)
	Traditional milk cream	1.09 or 1.75	8.5	0.056	−6.23	Panagou and Nychas (2008)
	Soft cheese	1.18	8.0	0.082	−1.64	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fresh milk	1.57	8.0	0.091	−1.70	Fujikawa and Morozumi (2005)

<sup>a</sup> Parameter representing the initial physiological state of cells.

<sup>b</sup> Asymptotic cell concentration.

<sup>c</sup> Dimensionless coefficient.

<sup>d</sup> Theoretical minimum temperature.

media or from limited combinations of foods and microorganisms. Conversely, the program developed in this study is publicly available and its models are exclusively based on data from commercially available products.

Therefore, the main objective of the present study was to evaluate the predictive value of a tertiary model, in the form of readily available and user-friendly software encompassing various food–microorganism-specific growth models. The simulation of microbial growth is obtained *via* the primary model of Baranyi, using momentary growth rates estimates in response to temperature, obtained by square root secondary models. The tertiary model is based on an updatable database of validated and published predictive models including only 5 parameters *per* model. It is capable of providing predictions for the population dynamics of the selected microorganisms–food combinations under static and dynamic temperature conditions. Dynamic temperature profiles (e.g., during chill-chain) may be uploaded as an Excel file in the form of time–temperature sheets and translated into predictions of microbial population density, both numerically and graphically. The software constitutes a good example of how predictive models may be by the industry as user-friendly applications and tools assisting in efficient and science-based management of the safety and quality of their products.

## 2. Software development

The software, called UGPM (Unified Growth Prediction Model), was developed with Visual Basic for Applications (VBA) in Microsoft Excel<sup>®</sup> environment (Microsoft Office 2003 Pro). The Baranyi model constitutes a common field between the UGPM software application and the “ComBase Predictor”, i.e., the on-line application, which can also predict the bacterial responses to dynamic temperature conditions. ComBase Predictor (available at <http://www.combase.cc/toolbox.html>) supports a set of twenty three growth models and six thermal death models for predicting the microbial response to key environmental factors such as temperature, pH, salt concentration etc. (ComBase, 2007).

### 2.1. The differential equation model

The adjustment model of Baranyi and Roberts (1994), combined with the growth model of Richard (Baranyi and Roberts, 2000) has been introduced in the UGPM software in order to simulate the microbial growth. The model of Baranyi and Roberts (1994) has been selected due to the following reasons: (i) it is easy to be applied; (ii) it is applicable under dynamic environmental conditions and; (iii) the model parameters are biologically interpretable (Lebert and Lebert, 2006).

The model is based on the following first order equation:

$$\frac{dx(t)/dt}{x(t)} = \frac{q_0 e^{vt}}{1 + q_0 e^{vt}} \mu_{max} \cdot u(x) \quad (1)$$

where  $q_0 = P_0/K_p$ ,  $P_0$  is the initial value of a critical substance needed for the bacteria to initiate growth,  $K_p$  is the Michaelis–Menten constant,  $x(t)$  is the microbial concentration at the time  $t$ ,  $u(x)$  is the inhibition function and  $q_0$  is a measure of the initial physiological state of the cells summarizing the readiness of cells to initiate growth in a new environment. This is specific for each combination of food and microorganism, or for the ‘history’ (i.e., sequence of exposure to various stresses, or just the previous environment) of the same microorganism. The parameter  $q_0$  is also related to the parameter  $h_0$ , which is another measure of the initial physiological state of cells and is given by the equation:

$$h_0 = \ln \left( \frac{q_0 + 1}{q_0} \right) \quad (2)$$

Under constant temperatures, the following explicit solution of Eq. (1) can be used:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m \cdot \mu_{max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{max} - y_0)}} \right) \quad (3)$$

where  $t$  is the time,  $y_0$  is the natural logarithm of the inoculum ( $\ln x_0$ ),  $x_0$  is the initial cell number,  $m$  characterizes the curvature before the stationary phase,  $y(t) = \ln x(t)$  and  $\mu_{max}$  is the maximum specific growth rate. The  $\mu_{max}$  parameter can be described as a function of temperature according to square-root secondary model:

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \quad (4)$$

where  $b$  is a constant,  $T$  (°C) the temperature and  $T_{min}$  is the notational minimum temperature for growth of the microorganisms, estimated by extrapolation of the regression line to  $\mu_{max} = 0$ . We chose the shortest version of the square root equation, with only one cardinal parameter ( $T_{min}$ ; Zwietering et al., 1991), as the simplest option for secondary model, because the interpolation area of the current models is expected to range from refrigeration (0–4 °C) to room temperatures (25 °C). Higher temperatures, such as 30–37 °C (i.e., optimum temperatures for most microorganisms), or even higher (>45 °C) would only rarely (and accidentally) occur in the chill-chain or during ambient storage of foods at room temperature. Therefore,  $T_{min}$  was considered sufficient cardinal value for the secondary models of the present application, which is intended for use by the industry producing foods that require refrigeration or are stable at room temperature. Nonetheless, in future generic applications, other cardinal models such as that of Rosso et al. (1995), including  $T_{opt}$  and  $T_{max}$  for optimum and maximum temperature allowing growth, respectively, may also be applied in order to obtain predictions for microbial growth within the whole biokinetic range of temperatures. This would also allow direct use of literature cardinal values.

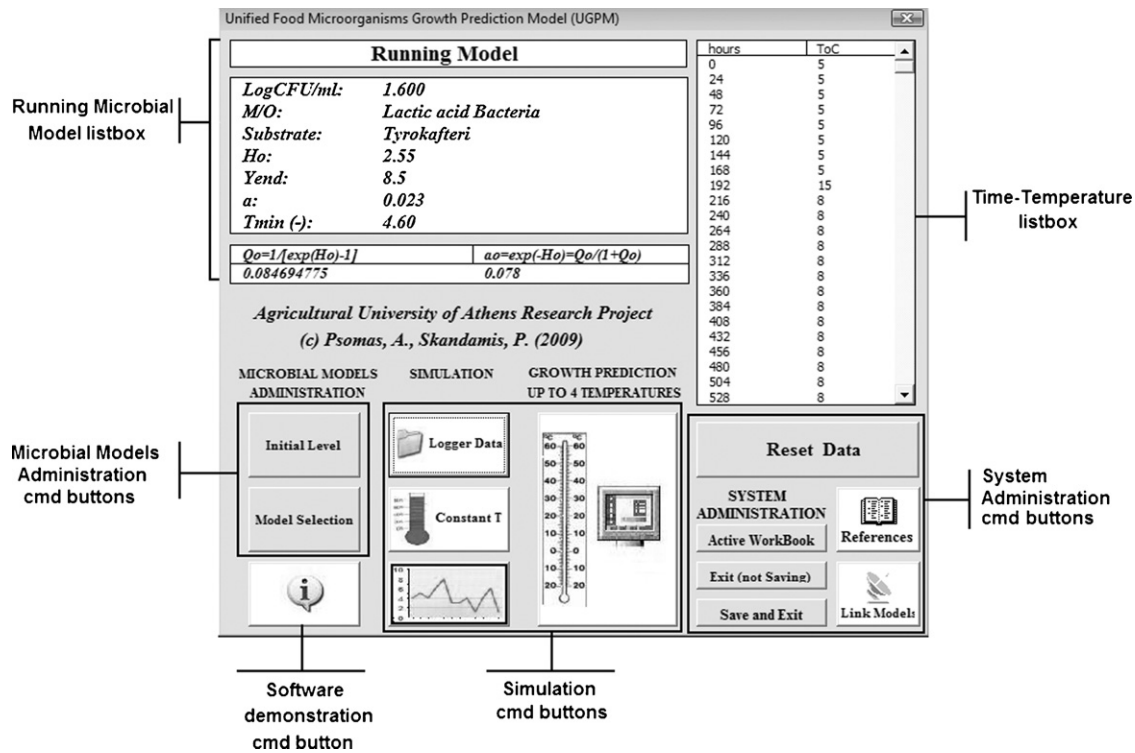


Fig. 2. Description of the Main UserForm.

$A(t)$  is a reparameterised time variable (Baranyi and Roberts, 1994) expressed by the equation:

$$A(t) = t - \lambda + \frac{\ln(1 - e^{-vt} + e^{-v(t-\lambda)})}{v} \quad (5)$$

where  $\lambda$  is the lag phase of the microorganism, that is the time lapsed before the beginning of exponential growth.

Under dynamic temperature conditions, the following system of differential equations is used (Baranyi and Roberts, 1994):

$$\frac{dy(t)}{dt} = \mu(T) \left( \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \right) (1 - e^{y(t)-m}) \quad (6)$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu(T) \quad (7)$$

$$\begin{cases} y(0) = y \\ Q_0 = \ln q_0 \\ Q(t) = \ln q(t) \end{cases}$$

The first differential equation describes the time evolution of the microbial load and the second equation represents the change in the physiological state of the bacteria with time (Lebert and Lebert, 2006). Predictions by this model in dynamic environments are also readily available on the “ComBase” web site ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)) and can be compared to static environments. However, the secondary models providing the momentary  $\mu_{\max}$  estimates are based on broth data and predictions should be treated with caution and rather as approximations of how microbial growth occurs in foods.

## 2.2. The description of the software application's layout

The software has been developed with a decision-tree-based technique (Fig. 1). The following command buttons are available in the start-up UserForm with the respective functions: (i) “Initial Level”: a value expressing the initial microbial contamination level can be selected from a ListBox control and then be loaded in a specific area of the active worksheet (Sheet 1). This

value, expressed in “log CFU/ml”, is the logarithmic-with base 10-concentration of the microbial population per ml (values range from 0.0 to 10.0); (ii) “Model Selections”: a record, expressing a microbial model per food substrate, can be selected from a database which is embedded into the software. Each model corresponds to a specific microorganism-food combination, whereas all models are validated and published in the literature. The user may further evaluate these models by comparing their predictions with independent observations of microbial growth in the foods included in the database, or in foods of similar composition, or in foods belonging to a broad category (e.g., meat products, emulsified salads, etc.; Table 1); (iii) “Logger Data”: a data logger file can be selected and introduced in a specific range of the background spreadsheet. The introduced dynamic data of time and temperature, with time expressed in hours is displayed immediately in the main UserForm's time-temperature ListBox control after the completion of the numerical simulation, which is performed automatically in the background spreadsheet (Fig. 2); (iv) “Constant T”: a value of maximum time (in hours) and a value of temperature can be entered in the corresponding fields of the UserForm. Then, the main UserForm's time-temperature ListBox control displays the generated time data, which is increased with a step of 0.5 h, while the temperature remains constant for the specified time period. The resulting time-temperature dataset is displayed immediately in the main UserForm's time-temperature ListBox control after the completion of the numerical simulation which has been performed automatically in the background spreadsheet; (v) “Plot”: a simulation of microbial growth for the selected time-temperature profile is graphically represented; (vi) “Reset Data”: the data displayed into the main UserForm's time-temperature ListBox control and the corresponding numerical simulation is erased (Fig. 2).

Another function of the software is the “Growth prediction up to 4 temperatures”, where up to four temperatures of incubation and a maximum time value (in hours), can be entered in the corresponding fields of the UserForm. By clicking on the “Plot” command

MICROORGANISMS	SUBSTRATE	Ho	Yend	a	Tmin
Lactic acid Bacteria	Tyrosalata	2.37	8.5	0.019	10.7
Lactic acid Bacteria	Tyrokafteri	2.55	8.5	0.023	4.6
Lactic acid Bacteria	Cooked cured meat pro	1.03	8.2	0.057	6.72
Listeria monocytogenes	Mizithra	1.18	8	0.082	1.64
Listeria monocytogenes	Cooked ham	0.84	5	0.058	1.03

Fig. 3. Output showing the Microbial Models Administration UserForm and its modification methods.

button (Fig. 2), the corresponding growth curves per temperature are illustrated in the same graph to allow comparisons of the growth curves of the same microorganism at four temperatures.

The general functions include: (i) a command button called “Active workbook”, for the software maintenance and (ii) two command buttons to quit the software with or without saving changes. Three more functions provide additional information about references and links to other predictive modeling software associated with inactivation or growth of microorganisms in foods (Fig. 2).

### 2.3. The microbial models database

The internal database of the UGPM software includes published validated food microbial models, both for pathogenic and spoilage microorganisms. The coefficients of the differential equations described in this paper, constituting the supporting mechanism of the software, use the values of the parameters of these models as registered in the database, in order to provide predictions of the microbial growth in dynamic or static temperature conditions (Table 1).

The microbial models are introduced to the software as records of a database. They are composed of the following fields, which characterize the microbial growth response in a given food (Table 1): microorganism, substrate, initial physiological state of cells ( $h_0$ ; Eq. (2)), the asymptotic cell concentration ( $Y_{end}$ ), an adjustment value expressing the suitability of the cells to the actual environment ( $0 < \alpha < 1$ ) and the minimum temperature ( $T_{min}$ ). A UserForm has been designed to provide all necessary information and functions to the users, including the introduction of a new model record or the modification of an existing record using the update, delete and sort command buttons, respectively, (Fig. 3).

#### 2.3.1. Updating the database of predictive models

The subroutines concerning the introduction and the modification of the models refer to a designated range of the background Excel spreadsheet (Sheet 1). The microbial models are stored in a particular range of the “Sheet 1” (let’s call it “range A”). When a model of interest has to be modified, the selected model record is copied to another range of the “Sheet 1” (let’s call it “range B”). After the modification, an automatic deletion of the corresponding row in the “range A” is executed and the modified record is copied back to the last empty row of the “range A”. Finally, the “range A” is sorted automatically and the “range B” is cleared from the data which is participating in the modifying actions.

By clicking on the command buttons: (i) “Enter Microbial Model”, the values of a new microbial model can be entered and sorted automatically; (ii) “Update Model Data”, the values of the selected model can be updated; (iii) “Delete Model”, the selected microbial model record can be erased and the model records are sorted automatically; (iv) “Sort Models”, the microbial models can be sorted; (v) “Select Model to Simulate”, the selected microbial

model data is updating the active model data area overwriting the previous values. The updated values interact with the main UserForm’s running model ListBox control and the data is displayed (Fig. 2).

When a specific microbial model is updating the active model data area, two variables displayed in the main UserForm, are calculated automatically. The initial values of  $Q_0$  and  $\alpha_0$ , which are also defined as follows:

$$Q_0 = \frac{1}{e^{H_0} - 1} \quad (\text{see also Eq. (2)}) \quad (8)$$

$$\alpha_0 = e^{-H_0} = \frac{Q_0}{1 + Q_0} \quad (9)$$

where  $\alpha_0$  is the proportion of cells that grow in the new environment at the same rate as in the previous environment (Baranyi and Roberts, 1994, 2000; Baranyi et al., 1995) (Fig. 2).

### 2.4. Adaptation of the Baranyi model equations to the software

The differential equations of the Baranyi model constitute the mechanism of the simulation of microbial growth and thus, were programmed into the software. Baranyi et al. (1995) demonstrated that the differential equation (1) is valid under fluctuating environmental conditions. Baranyi and Roberts (2000) contend that the explicit version of the model will not be valid under these conditions and that the model should be simulated approximately on a computer. The growth model in dynamically changing environments should be derived in their differential version. For this reason, Eqs. (6) and (7) were programmed in the UGPM software application after necessary reparameterizations in order to avoid errors due to overflow (Baranyi and Roberts, 2000). Dynamic time–temperature data has been loaded in the first two columns of a worksheet, which is specially defined for the simulation calculations (Sheet 2). The imported data area defines the horizontal boundaries within which, the calculations are executed. The equations include variables and parameters which receive their values from: (i) the parameters of the activated (selected from the database) microbial model; (ii) the introduced dynamic time–temperature data or the generated static time–temperature data; (iii) other equations used to calculate intermediate variables. The equations, especially those containing many variables and exponential factors, can produce results that are incorrect due to overflow. It is difficult to check if the results of a complicated differential equation are limited to the range of expected magnitude. Therefore, in order to avoid overflow it must be ensured that the results of the calculations will never be larger than the corresponding magnitude (Baranyi and Roberts, 2000). To address this problem, we transformed the equations which consist of many variables and exponential factors into equations with limited variables. Part of the variables, are calculated separately in simpler equations and the attributes for each variable are strictly defined. Conse-

quently, their magnitude is checked before their introduction to the transformed equations.

The variables of the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) and the concentration of the limiting substrate over time ( $Q(t)$ ), obtain values from the equation describing the dependency of  $\mu_{\max}$  on temperature and of  $q(t)$  on  $\mu_{\max}$ , as follows:

$$\mu_{\max} = \{\alpha \cdot [T^{\circ}\text{C} - (-T_{\min})]\}^2 \ln(10) \quad (10)$$

$$Q(t) = Q(t)_{\text{previous value}} + \frac{|\mu_{\max, \text{previous value}} + \mu_{\max, \text{next value}}|}{2} \cdot (\text{Time}(d) - \text{Time}(d)_{\text{previous value}}) \quad (11)$$

where previous/next, means that the equation is taking the value from the corresponding field belonging to the previous or the next row,  $\text{Time}(d)$ , is the time (in days).

Conditions:

$$\begin{cases} \mu_{\max}(\text{previous value}) < \mu_{\max} < \mu_{\max}(\text{next value}) : \\ \mu_{\max}(\text{previous value}), \mu_{\max}(\text{next value}) \in \mu_{\max} \text{ neighbourhood} \\ \text{Time}(d)(\text{previous value}) < \text{Time}(d) : \\ \text{Time}(d)(\text{previous value}) \in \text{Time}(d) \text{ neighbourhood} \end{cases}$$

The initial value of the concentration of limiting substrate is calculated by the equation:

$$Q(t) = \ln(Q_0) \quad (12)$$

The time variable (in days) is calculated by the equation:

$$\text{Time}(d) = \frac{\text{Time}(h)}{24} \quad (13)$$

where  $\text{Time}(h)$  is the time value in hours.

The final concentration (population density) of the microorganisms is the minimum value between the equation calculating the concentration of the microorganisms and the absolute value of the asymptotic cell concentration  $|Y_{\text{end}}|$ . The microbial concentration is expressed by the equation:

$$\log \text{CFU/ml} = \log \text{CFU/ml}_{(\text{previous value})} + \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \cdot (1 - 10^{-K}) \cdot M \cdot S \quad (14)$$

where

$$K = |\log \text{CFU/ml} \cdot (\text{previous value}) - Y_{\text{end}}| \quad (15a)$$

$$M = \frac{\mu_{\max, \text{next value}} + \mu_{\max, \text{previous value}}}{2} \quad (15b)$$

$$S = \frac{\text{Time}(d) - \text{Time}(d)_{\text{previous value}}}{\ln(10)} \quad (15c)$$

Conditions:

$$\begin{cases} \log \text{CFU/ml}(\text{previous value}) < \log \text{CFU/ml} : \\ \log \text{CFU/ml}(\text{previous value}) \in \log \text{CFU/ml} \text{ neighbourhood} \\ \mu_{\max}(\text{previous value}) < \mu_{\max} < \mu_{\max}(\text{next value}) : \\ \mu_{\max}(\text{previous value}), \mu_{\max}(\text{next value}) \in \mu_{\max} \text{ neighbourhood} \end{cases}$$

### 3. Prediction under dynamic temperature conditions

Excel files including the time (in hours) and the corresponding temperature value can be introduced in the software from a folder containing only the saved data logger files. Once the file is loaded, the program activates a mechanism in order to display the graphical profile of the selected file before the dynamic prediction (simulation) of the microbial response. A function  $T=f(t)$  corresponds to that profile, where “ $T$ ” is the temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and “ $t$ ”

is the time (in days). This mechanism affords an image control displaying the time–temperature profile of the selected file and information about the maximum number of measurements and the interpolated values. If the number of measurements is large, then a simulation of the selected microbial model runs with sufficient accuracy in the simulation, otherwise this accuracy can be achieved by data interpolation. By clicking on the command button “Interpolate”, 200 new data points ( $t, T$ ) enrich the measurements of the file, by smoothly covering the gaps between them. Then, the time–temperature dataset is displayed into the main UserForm’s time–temperature ListBox control. Time is expressed in hours and temperature in celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ). The automatic solution of the differential equations which serve as the calculation mechanism of the software is generating a numerical simulation of the equations in the corresponding background Excel worksheet. The simulation predicts the changes in microbial population density over time in response to the selected time–temperature profile (Fig. 4). It is displayed graphically by clicking on the “Plot” command button. In particular, the microbial growth is expressed by the graphical representation of  $\log_{10}$  CFU/ml vs. time in days. The axis of time ( $x$ ) is common for  $\log_{10}$  CFU/ml and temperature. The outcome is a sigmoidal-like curve expressing the growth of a selected food microbial model in a dynamic or static environment (Fig. 4).

#### 3.1. Procedure for interpolation of time–temperature data

The following equation performs linear interpolation by calculating the interpolation step value:

$$\text{step} = \frac{\text{Maxval} - \text{Minval}}{200} \quad (16)$$

where  $\text{Minval}$  is the initial time value,  $\text{Maxval}$  is the maximum time value and the constant number 200 is the rate of change between the two values.

For each time step, the increment of the temperature ( $T_{\text{int}}$ ) is defined by the equation:

$$T_{\text{int}} = \text{step} \frac{T_f - T_i}{t_f - t_i}, \quad t_f > t_i \quad (17)$$

where  $i$  and  $f$  are the initial and final values for each step.

For a time–temperature profile with the coordinates:  $\{(0, 5), (5, 6), \dots, (40, 5)\}$ , the step of time increment is:  $40/200=0.2$ . The temperature variation for the first step of the time value (0.2) can be calculated as follows:

$$\{(0, 5), (5, 6)\} : T_{\text{int}} = \text{step} \frac{T_f - T_i}{t_f - t_i} = 0.2t$$

$$\cdot \frac{(6 - 5)^{\circ}\text{C}}{(5 - 0)t} \Rightarrow T_{\text{int}} = 0.04^{\circ}\text{C}$$

The interpolated data point is:  $0.2t \rightarrow 5^{\circ}\text{C} + 0.04^{\circ}\text{C} = (0.2, 5.04)$ .

#### 3.2. Case study: prediction of lactic acid bacteria growth in cheese salad (*Tyrokafteri*).

As a case study, the model of lactic acid bacteria, which are the specific spoilage organisms in a traditional Greek cheese salad called *‘Tyrokafteri’* (Manios et al., 2009), was used (Table 1). The initial microbial contamination level was set to  $1.6 \log_{10}$  CFU/g (command button: initial level). The growth parameters of the selected model were (command button: Model Selection):  $h_0$  2.55;  $Y_{\text{end}}$  8.5;  $\alpha$  0.023;  $T_{\min}$   $-4.60$ . When the model was activated, the algebraic equations for the calculation of the initial  $Q_0$  and  $\alpha_0$  gave the following results automatically (Fig. 4):  $Q_0 = 0.085$ ;  $\alpha_0 = 0.078$ .

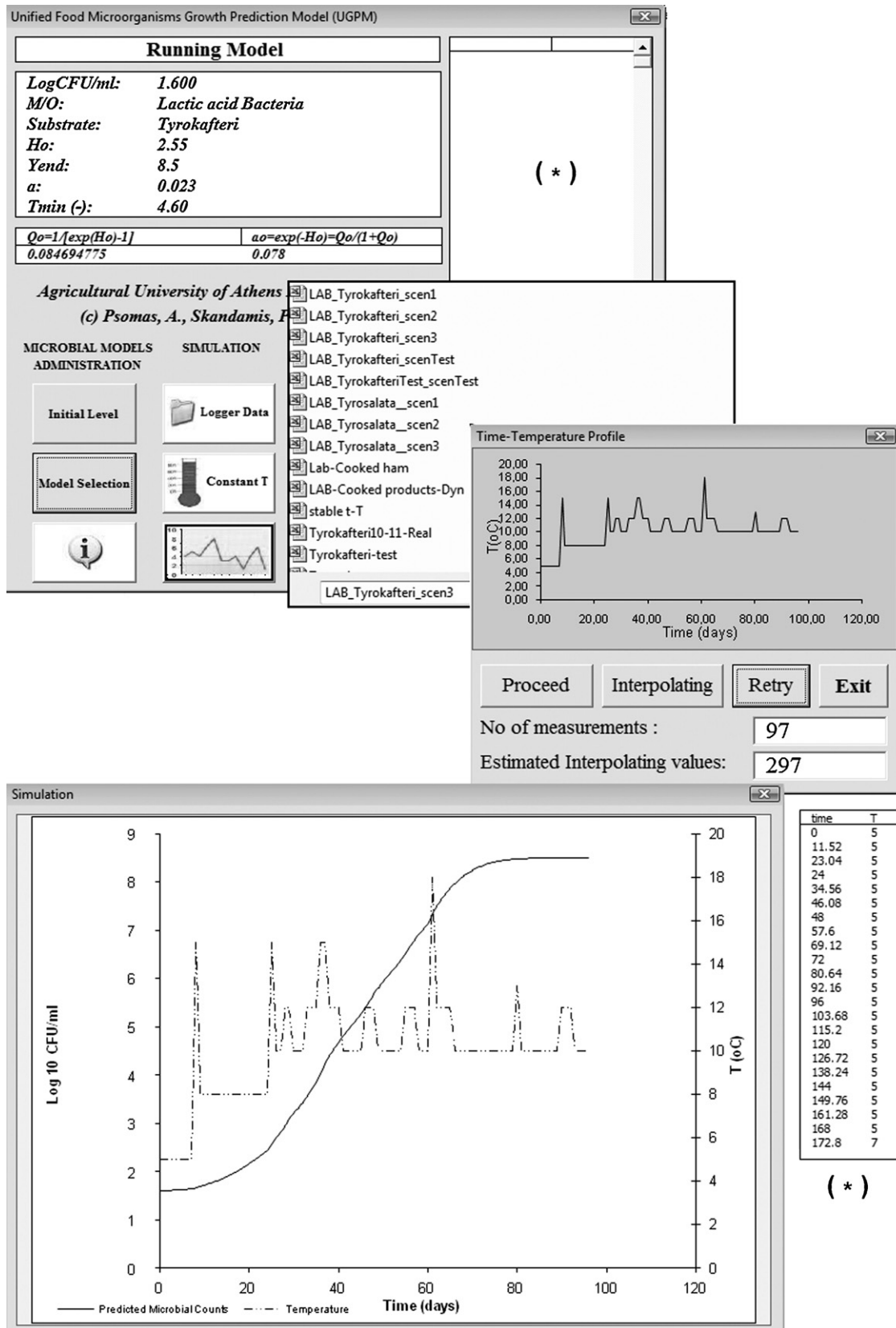


Fig. 4. Simulation under dynamic temperature conditions: representative growth curve of lactic acid bacteria in cheese salad (“Tyrokafteri”).

3.2.1. Importing data and application output

An Excel file (LAB.Tyrokafteri\_scen3), which includes the data of time in hours (first column) and temperature (second column), was selected from a list of files, saved in a specific disk folder

(C:\MDL\MODEL FILES), by clicking on the “Logger Data” command button. Then, the profile of the selected file appeared in an image control on the UserForm, which also included the number of measurements (97) and the interpolated values (297). The “inter-



polating” option was selected and the generated data was displayed into the time–temperature ListBox control of the main UserForm (Fig. 4). A numerical simulation was developed by the VB code into the corresponding background Excel worksheet.

The graphical simulation can be displayed either in color or in grayscale mode (e.g., for publications), respectively. The simulation is a graphical representation, which includes both a sigmoidal curve expressing the lactic acid bacteria growth and the corresponding time–temperature profile. This simulation provides the user with valuable information about the influence of the environment (fluctuating temperatures) to the growth of lactic acid bacteria, in the cheese salad (*Tyrokafteri*; Fig. 4). Such information can be further used to predict the effect of storage conditions on the spoilage level and hence, on the shelf-life of this product.

#### 4. Prediction for a constant temperature

A time value (in hours) and a single temperature are entered in the corresponding fields of the UserForm in order to generate a time–temperature data set for constant temperature. The time ( $t$ ) values are increasing (at a step of 0.5) up to the maximum value, while the temperature ( $T$ ) remains constant. For 2160 h (=90 days), the main UserForm’s time–temperature ListBox control requires 1.05 min approximately to display the generated data, when the microprocessor rate is 1.83 GHz. Similarly to the output of predictions under dynamic temperature conditions, the model simulation results in a graph with two curves: a sigmoidal curve expressing the microbial growth as a function of time (in days) and a parallel line to horizontal axis expressing the constant temperature.

##### 4.1. Case study: the static version is a case of the dynamic version

In order to confirm the hypothesis that the static version of the UGPM software application was developed as a special case of the dynamic version, initially, we created an Excel file in which, the first column includes the time values which increase smoothly from 0 to 2160 h (=90 days) at a step of 0.5 h. The second column includes a constant temperature value of 30 °C that corresponds to each of the time values of the first column. Afterwards, we activated the “*lactic acid bacteria/cheese sala*”d *Tyrokafteri*” model (Table 1) and we loaded the Excel file into the dynamic version of the UGPM software application in order to obtain a numerical simulation of changes in microbial population density over time. Then, we compared the simulation graph with the corresponding graph of the static version. We noticed that the two simulation graphs were exactly the same, given the above hypothesis (Fig. 5).

#### 5. Comparative predictions for up to 4 temperatures

Up to four temperature values and a single value for the maximum incubation or storage time (in hours) can be entered into the corresponding fields of the UserForm illustrated in Fig. 6. This option provides a simultaneous graphical representation ( $\log_{10}$  CFU/ml vs. time [in days]) for up to four sigmoidal growth curves, which are temperature dependent, expressing the microbial growth of a specific microorganism per substrate at 4 constant temperatures (Fig. 6). As a case study, the model of lactic acid bacteria in the aforementioned cheese salad (*Tyrokafteri*) was used (Table 1), setting the level of initial microbial contamination to 2.4.

##### 5.1. Importing data and application output

By pressing the “Growth Predictions up to 4 Temperatures” command button, up to four temperatures of interest for a specific number of hours, can be entered manually into the UserForm in

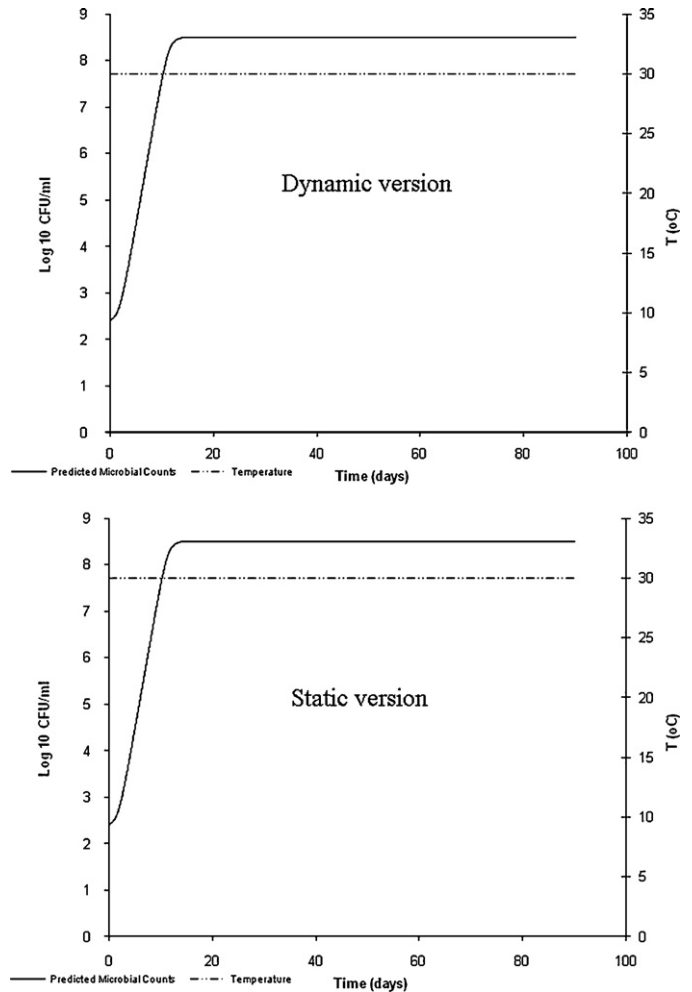


Fig. 5. Comparison of predictions between the dynamic and the static version of the UGPM software application for stable  $t$ – $T$  conditions. Model: lactic acid bacteria/in cheese salad (*Tyrokafteri*).

order to be provided a simulation for the evaluation of the possible risks concerning the food management procedures in the corresponding temperatures. As an example, we entered the following values of temperature (°C): 5, 10, 15 and 20 and the value of time 2160 h (corresponding to 90 days). Each pair of values (5, 2160), (10, 2160), (15, 2160) and (20, 2160) is activated separately by pressing the corresponding “GO” command button. Each pair of values is displayed as a sigmoidal curve expressing the growth of lactic acid bacteria in 2160 h depending of the given temperature. Up to four sigmoidal curves can be displayed, in color mode or in grayscale, respectively, in the same graphical display (Fig. 6).

#### 6. Availability

A website has been developed (Psomas and Skandamis, 2010) in order to provide the users with free access to the software. The latter can be demonstrated with a PowerPoint presentation and it can be downloaded, free of charge, from anyone who is interested, by visiting the internet addresses: <http://users.uoa.gr/~apsomas>; <http://www.aua.gr/psomas>.

#### 7. Results and discussion

The increased awareness of food safety and the application of food safety management systems have increased the interest in predictive modeling. The development of this area is also markedly

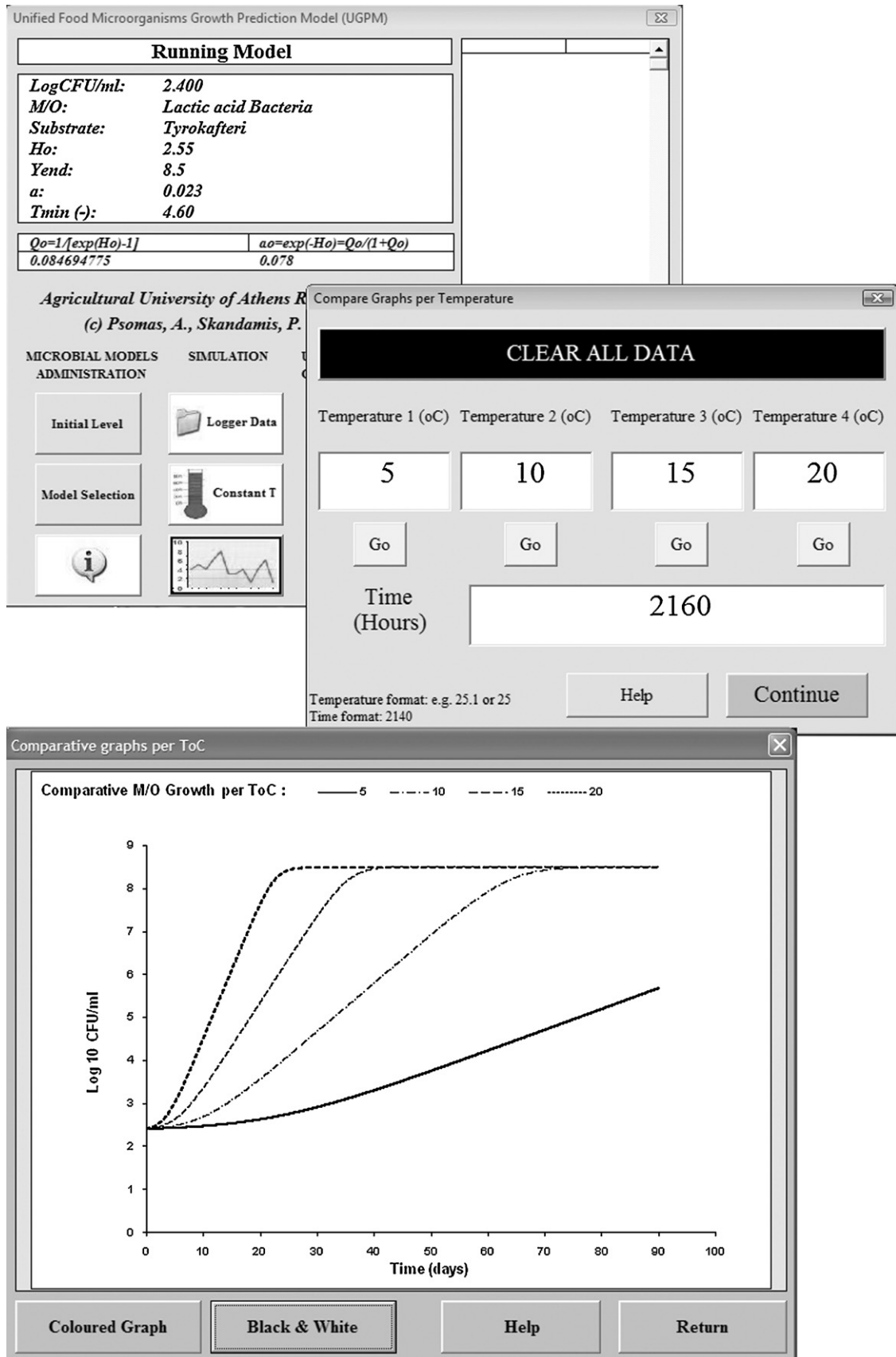


Fig. 6. Comparison between the predictions of lactic acid bacteria growth multiple temperatures and specifically at 5, 10, 15 and 20 °C. Active model: lactic acid bacteria in cheese salad ("Tyrokafteri").

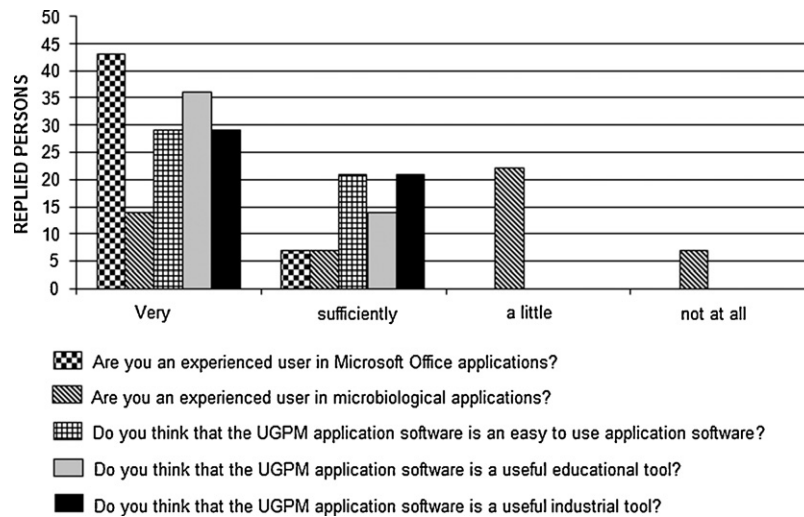


Fig. 7. Evaluation of the performance and acceptability of UGPM software.

associated with the emergence of fundamental problems in the food industry, such as recalls, outbreaks and risk analysis practices. The UGPM software application constitutes a tertiary model which aims to assist in these issues. It has been designed in a user-friendly form, but without any loss of its scientific character. It constitutes an integrated set of routines and subroutines which protect the program from operations caused by unskilled users, providing a safe and effective mechanism for the simulation of microbial growth in response to storage temperature. Several points of the computational realization of the tertiary model were discussed in detail and relevant references to similar applications have been provided in the present paper.

The applicability of the UGPM software for commercial use was ascertained with the distribution of questionnaires to 50 individuals worldwide, who are involved in food microbiology research and/or in the food industry. They were asked to answer five basic questions concerning their experience in the use of software and their opinion about the UGPM software (Fig. 7). Initially, the respondents had to download the software from its webpage and install it on their computer, following the instructions available in the same webpage. The website provides all information needed for both the installation of the software as well as operation manual, whereas none the respondents received training. Both questions which were distributed with the questionnaire and the statistical analysis of the responses are shown in Fig. 7. The figure revealed that the majority of the respondents considered the software a very useful educational tool. Most respondents considered also that it was a very useful industrial application while the same percentage judged that it was easy to use. The majority of the respondents have experience in Microsoft Office software package, while they have limited experience in microbiological software packages. The results of the statistical analysis show a positive perspective concerning the commercial acceptance of the UGPM software application. Further dissemination of this software is needed to highlight its usefulness render it more popular.

In conclusion, the UGPM software, which incorporates a set of predictive models for various pathogenic and spoilage microorganisms together with algorithms for their growth prediction, is capable of estimating the risk of microbial growth in a variety of food products, also assisting in decision support systems for management of products during chill-chain. We hope that this software will constitute a common field between food industry and scientific research, and will assist in their collaboration. We are currently extending the software towards an integrated tertiary

model, including also growth/no growth (i.e., probability) models and generic models for predicting inactivation or growth in response to various intrinsic and extrinsic properties of foods. Such tools are expected to markedly assist in the reliable determination of the shelf-life of foods under the constraints of safety.

## References

- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277–294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 2000. Principles and application of predictive modelling of the effects of preservative factors on microorganisms. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiology Safety and Quality of Foods*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, pp. 342–358.
- Baranyi, J., Tamplin, M.L., 2004. ComBase: a common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection* 67, 1967–1971.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology* 27, 61–75.
- ComBase, 2007. ComBase Predictor, ComBase Modelling Toolbox. Institute of Food Research, <http://www.combase.cc/toolbox.html> (retrieved March, 2010).
- Dalgaard, P., Buch, P., Silberg, S., 2002. Seafood spoilage predictor—development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology* 73, 343–349.
- Fujikawa, H., Morozumi, S., 2005. Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7920–7926.
- Gorris, L.G.M., 2005. Food safety objective: an integral part of food chain management. *Food Control* 16, 801–809.
- Koseki, S., 2009. Microbial responses viewer (MRV): a new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *International Journal of Food Microbiology* 134, 75–82.
- Le Marc, Y., Plowman, J., Aldus, C.F., Munoz-Cuevas, M., Baranyi, J., Peck, M.W., 2008. Modelling the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of bulk meat. *International Journal of Food Microbiology* 128, 41–50.
- Le Marc, Y., Skandamis, P.N., Belessi, C.I.A., Merkouri, S.I., George, S.M., Gounadaki, A.S., Schvartzman, S., Jordan, K., Drosinos, E.H., Baranyi, J., 2010. Modeling the effect of abrupt acid and osmotic shifts within the growth region and across the growth boundaries on adaptation and growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6555–6563.
- Lebert, I., Lebert, A., 2006. Quantitative prediction of microbial behaviour during food processing using an integrated modelling approach: a review. *International Journal of Refrigeration* 29, 968–984.
- Leporq, B., Membré, J.M., Dervin, C., Buche, P., Guyonnet, J.P., 2005. The “Sym’Previus” software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *International Journal of Food Microbiology* 100, 231–237.
- Manios, S.G., Skiadreas, A.G., Karavasilis, K., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2009. Field validation of predictive models for the growth of lactic acid bacteria in acidic cheese-based Greek appetizers. *Journal of Food Protection* 72, 101–110.
- Marks, B.P., 2008. Status of microbial modeling in food process models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 137–143.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Siana, P., Skandamis, P.N., Metaxopoulos, I., 2006a. Determination of the growth limits and kinetic behaviour of *Listeria monocytogenes* in a sliced cooked cured meat product: validation of the predictive growth model under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Protection* 69, 1312–1321.



- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I., 2006b. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science* 71, 157–167.
- McMeekin, T.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78, 133–153.
- McMeekin, T.A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S., Zwietering, M.H., 2006. Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology* 112, 181–194.
- Neumeyer, K., Ross, T., McMeekin, T.A., 1997. Development of *Pseudomonas* predictor. *Australian Journal of Dairy Technology* 52, 120–122.
- Panagou, E.Z., Nychas, G.J.E., 2008. Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized vanilla cream after postprocessing contamination. *Journal of Food Protection* 71, 1828–1834.
- Pin, C., Avendaño-Perez, G., Cosciani-Cunico, E., Gómez, N., Gounadaki, A.S., Nychas, G.-J., Skandamis, P., Barker, G., in press. Modelling *Salmonella* concentration throughout the pork supply chain by considering growth and survival in fluctuating conditions of temperature, pH and  $a_w$ . *International Journal of Food Microbiology*.
- Psomas, A., Skandamis, P., 2010. UGPM: a Food Microbial Growth Simulation Software, UGPM Dissemination Webpage. Agricultural University of Athens, <http://users.uoa.gr/~apsomas>; <http://www.aua.gr/psomas> (retrieved December, 2010).
- Ross, T., McMeekin, T.A., Baranyi, J., 2000. Predictive microbiology and food safety. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, New York, pp. 1699–1710.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 610–616.
- Tiganitas, A., Zeaki, N., Gounadaki, A.S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and  $a_w$  stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 134, 104–112.
- USDA, 2009a. Pathogen Modeling Program, Version 7.0. U.S. Dept. of Agriculture: A.R.S., Eastern Regional Research Center, <http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550> (retrieved March, 2010).
- USDA, 2009b. Online Pathogen Modeling Program. U.S. Dept. of Agriculture: A.R.S., Eastern Regional Research Center, <http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx> (retrieved March, 2010).
- Whiting, R.C., 1995. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 467–494.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van't Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094–1101.