

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα: «Επιστήμη και Τεχνολογία
Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

Κινητική μελέτη απενεργοποίησης της
πηκτινομεθυλεστεράσης μέσω θερμικής επεξεργασίας και
αξιολόγηση ποιοτικών παραμέτρων σε χυμό μανταρινιού



Μητράκης Δ. Παναγιώτης

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα: «Επιστήμη και Τεχνολογία
Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

Κινητική μελέτη απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης
μέσω θερμικής επεξεργασίας και αξιολόγηση ποιοτικών
παραμέτρων σε χυμό μανταρινιού

Μητράκης Δ. Παναγιώτης

Επιβλέπων: Στοφόρος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ. Π. Α.

ΑΘΗΝΑ 2015

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

Κινητική μελέτη απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης
μέσω θερμικής επεξεργασίας και αξιολόγηση ποιοτικών
παραμέτρων σε χυμό μανταρινιού

Μητράκης Δ. Παναγιώτης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων:

Στοφόρος Ν. Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μέλη:

Γιαννιώτης Σ. Καθηγητής Γ. Π. Α.

Μαντάλα Ι. Επίκουρος Καθηγήτρια Γ. Π. Α.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Στοφόρο Νικόλαο για την επιστημονική καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης και ειδικά κατά την συγγραφή της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Μαντάλα Ιωάννα και τον Καθηγητή κ. Γιαννιώτη Σταύρο για τις υποδείξεις τους, καθώς και την παραχώρηση του απαραίτητου εξοπλισμού για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τη διδάκτορα Γεωργιάδου Μαρία για την συμπαράσταση και καθοδήγηση κατά την πειραματική διαδικασία, αλλά και τη διδάκτορα Παξιμαδά Παρασκευή καθώς και το διδάκτορα Δήμου Αντρέα για τη βοήθεια και συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η θερμική απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης (PME) σε χυμό μανταρινιού (*Citrus reticulata*). Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στην ενεργότητα του ενζύμου, πριν και μετά από διάφορες θερμικές επεξεργασίες (50°C, 55°C, 60°C & 70°C). Τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκαν σε 4 κινητικά μοντέλα (πρώτης τάξης, νιοστής τάξης, Weibull και μερικής μετατροπής). Με εξαίρεση το μοντέλο πρώτης τάξης, τα υπόλοιπα μοντέλα είχαν ικανοποιητική προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα, με το νιοστής τάξης και το Weibull να δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του ενζύμου εκφράστηκε με την εξίσωση του Arrhenius. Οι τιμές για την ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) της απενεργοποίησης της PME που προέκυψαν στην πλειονότητα των δοκιμασμένων μοντέλων ήταν μεγαλύτερες από 300 kJ/mol. Στη συνέχεια, παρήχθησαν και εξετάστηκαν προϊόντα από τις εξής διεργασίες: ένα θερμικά επεξεργασμένο δείγμα χυμού στους 65°C για 19 min (LTLT), ένα δείγμα στους 75°C για 1 min (HTST), ένα δείγμα που να συνάδει με τα βιομηχανικά πρότυπα (90°C για 1 min) και ένα δείγμα που δεν είχε υποστεί καμία επεξεργασία (μάρτυρας). Στα προϊόντα αυτά μετρήσαμε ποιοτικούς δείκτες όπως χρώμα, θολερότητα και συγκέντρωση ασκορβικού οξέος. Το L (φωτεινότητα) ήταν χαμηλότερο στο δείγμα των 90°C από αυτό των υπολοίπων δειγμάτων. Το a (απόχρωση κόκκινου-πράσινου) βρέθηκε υψηλότερο στα LTLT και μάρτυρα από εκείνο στα δείγματα HTST και 90°C-1 min. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα καταλήξαμε για τα b (απόχρωση κίτρινου-μπλε) και C (χρωματική πυκνότητα). Το h (συνολική χροιά) βρέθηκε μεγαλύτερο στα δείγματα των HTST και 90°C-1 min από το αντίστοιχο σε LTLT και μάρτυρα. Όσον αφορά στη θολερότητα, εκεί προσδιορίστηκαν η διαπερατότητα και η σκέδαση του φωτός από τα δείγματα χυμού. Όσο μεγαλύτερη ήταν η εναπομείνασα ενεργότητα τόσο μεγαλύτερο ύψος είχε η διαύγαση που ξεκινούσε από την επιφάνεια των δειγμάτων χυμού. Έτσι, στο ίδιο χρονικό διάστημα (9 ημέρες), ο μάρτυρας παρουσίασε την μεγαλύτερη διαύγαση, τη μεγαλύτερη διαπερατότητα και συνεπώς τη μικρότερη σκέδαση ενώ το δείγμα των 90°C-1 min τη μικρότερη διαύγαση, τη μικρότερη διαπερατότητα και τη μεγαλύτερη σκέδαση. Τέλος, όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, αυτή βρέθηκε ελαφρώς μειωμένη στα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα σε σχέση με το δείγμα φρέσκου χυμού και όσο αυξανόταν η θερμοκρασία τόσο αυτή μειωνόταν.

Abstract

In the present study, the thermal inactivation of pectin methylesterase (PME) in mandarin (*Citrus reticulata*) juice was examined. Measurements were carried out on the enzyme activity, before and after various heat treatments (50°C, 55°C, 60°C & 70°C). The experimental data were adjusted to 4 movement patterns (first order, nth order, Weibull and partial conversion). Apart from the first-order model, the rest of the models displayed a satisfactory fit to the experimental data, with the nth order and the Weibull model presenting the best results. The effect of temperature on the enzyme inactivation was expressed with the Arrhenius equation. The values for the activation energy (E_a) of the PME inactivation we received, in the majority of models tested, were greater than 300 kJ/mol. Subsequently, several juice samples were produced and tested, based on the following processes: a thermally treated juice sample at 65°C for 19 min (LTLT), a sample at 75°C for 1 min (HTST), a sample that was consistent with the industry standards (90°C for 1 min) and a sample which had not undergone any treatment (control). The L value (Lightness) was lower in the sample of 90°C than all the other samples. The a value (red-green opponent co-ordinates) value was higher in LTLT and control than the HTST samples and 90°C-1 min. Respective conclusions were drawn for b (yellow-blue opponent co-ordinates) and C (saturation or Chroma). The h value (overall hue) was found higher in the samples of HTST and 90°C-1 min in comparison with LTLT and control. Regarding the turbidity, the transmittance and back scattering of light from the juice samples were evaluated. The higher the residual activity of the enzyme was, the greater the height of clarification expanding from the surface of the juice samples was observed. Thus, comparing samples for the same time interval (9 days) of measurements, the control sample showed the most pronounced clarification, the highest transmission and hence, the lesser scattering, while the sample of 90°C -1 min showed the lesser clarification, the lowest transmission and the highest scattering. Finally, the vitamin C content in the heat-treated samples was found slightly reduced relatively to fresh juice sample, following a value decline in proportion to the temperature rise.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	4
1. Θεωρητικό μέρος	5
1.1. Γενικά – μορφολογικά χαρακτηριστικά εσπεριδοειδών	5
1.2. Καρπός εσπεριδοειδών.....	7
1.2.1 Σύσταση καρπού μανταρινιάς.....	7
1.2.2. Ασκορβικό οξύ.....	9
1.2.3. Χρώμα.....	11
1.3. Ποικιλία Encore	15
1.4 Χυμός εσπεριδοειδών.....	17
1.4.1. Σύσταση χυμού	17
1.4.2. Βιομηχανική επεξεργασία χυμού.....	18
1.4.3. Παστερίωση – περιγραφή και στόχοι	22
1.4.4. Θολερότητα χυμού.....	27
1.5. Πηκτινομεθυλεστεράση	29
1.5.1. Γενικά – μηχανισμός δράσης.....	29
1.5.2. Δραστικότητα πηκτινομεθυλεστεράσης	31
1.5.3. Θερμική απενεργοποίηση – ισοένζυμα.....	32
1.6. Κινητική απενεργοποίησης ενζύμων.....	38
1.6.1. Γενικά – κινητικές παράμετροι.....	38
1.6.2. Κινητικό μοντέλο νιοστής τάξης	40
1.6.3. Κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης.....	41

1.6.4. Κινητικό μοντέλο μερικής μετατροπής	42
1.6.5. Διφασικό κινητικό μοντέλο	42
1.6.6. Μοντέλο Weibull	43
1.6.7. Κινητικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της PME σε διάφορους χυμούς εσπεριδοειδών	43
2. Υλικά και μέθοδοι.....	48
2.1. Απενεργοποίηση πηκτινομεθυλεστεράσης και μέτρηση υπολειπόμενης δραστηριότητας.....	49
2.1.1. Προετοιμασία και θερμική επεξεργασία δειγμάτων	49
2.1.2. Μέθοδος μέτρησης ενεργότητας της πηκτινομεθυλεστεράσης	52
2.2. Σχέδιο πειράματος και στατιστική επεξεργασία δεδομένων κινητικής απενεργοποίησης	54
2.3. Προσδιορισμός θολερότητας χυμού.....	55
2.4. Μέτρηση χρώματος χυμού	57
2.5. Μέτρηση ασκορβικού οξέος	59
2.5.1. Αρχή της μεθόδου, υλικά και προετοιμασία διαλυμάτων	59
2.5.2. Τυποποίηση του διαλύματος χρωστικής.....	61
2.5.3. Ανάλυση των δειγμάτων χυμού και μαθηματικοί υπολογισμοί	62
3. Αποτελέσματα.....	64
3.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων κινητικής της θερμικής απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης	64
3.1.1. Ενεργότητα του ενζύμου, διόρθωση χρόνων και εφαρμογή κινητικού μοντέλου πρώτης τάξης.....	64
3.1.2. Εφαρμογή κινητικού μοντέλου νιοστής τάξης και εκτίμηση κινητικών παραμέτρων.....	74

3.1.3. Δοκιμή μοντέλου μερικής μετατροπής και Weibull	81
3.1.4. Σύγκριση μεταξύ των κινητικών μοντέλων	88
3.1.5. Ανάλυση σε 1 βήμα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης.....	94
3.1.6. Πρόβλεψη χρόνων, σχεδιασμός διεργασιών και επιλογή προϊόντων προς μέτρηση ποιοτικών χαρακτηριστικών	98
3.2. Ερμηνεία μετρήσεων χρωματικών παραμέτρων δειγμάτων χυμού	101
3.2.1. Εξέταση κατανομής και ομοιογένειας διασπορών	101
3.2.2. Μη παραμετρικές δοκιμές διακύμανσης και σύγκριση μεταξύ των προϊόντων	109
3.3. Διαπερατότητα και σκέδαση φωτός στα δείγματα χυμού	116
3.4. Μετρήσεις περιεκτικότητας ασκορβικού οξέος	121
4. Συζήτηση.....	124
5. Συμπεράσματα	127
Βιβλιογραφία	129

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με θερμική απενεργοποίηση πηκτινομεθυλεστεράσης (PME) σε χυμούς από μανταρίνι είναι σχετικά περιορισμένες, διότι αφ' ενός οι χυμοί πορτοκαλιού και γκρέιπφρουτ αποτελούν περισσότερο δημοφιλή αντικείμενα μελέτης, (προϊόντα με μεγάλη κατανάλωση όσον αφορά τους χυμούς εσπεριδοειδών) και αφ' ετέρου τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερο διογκώνεται η τάση για καινοτόμες και μη θερμικές μεθόδους κατεργασίας.

Η διαύγαση στους φυσικούς χυμούς είναι ένα από τα συνηθέστερα και μεγαλύτερα προβλήματα στη βιομηχανία επεξεργασίας φρουτοχυμών. Η απώλεια αυτή του θολώματος, το οποίο αποτελείται από πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους (όπως διάφορες πρωτεΐνες, ημικυτταρίνη, κυτταρίνη και πηκτίνη) προκαλείται από τη δράση του προαναφερθέντος ενζύμου μετά την εκχύμωση και την παραλαβή του χυμού από τον καρπό. Αυτή οφείλεται στην απομεθυλίωση της πηκτίνης από την PME, παρουσία δισθενών κατιόντων, και την καθίζηση των αδιάλυτων πηκτικών συμπλόκων που σχηματίζονται. Εκτός από την απώλεια θολότητας, η δράση της PME συνεπάγεται μείωση ιξώδους, διαχωρισμό φάσεων, υποβάθμιση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και μια γενικότερη ποιοτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η προσέγγιση του προβλήματος αυτού με μια κλασσική θερμική επεξεργασία, έτσι ώστε να διερευνηθεί η κινητική απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης και η αντοχή της σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους επεξεργασίας. Με βάση τα αποτελέσματα που θα προκύψουν, θα είμαστε σε θέση να σχεδιάσουμε μια σωστή διεργασία παστερίωσης ούτως ώστε και το προϊόν να είναι σταθερό και αμετάβλητο ποιοτικά κατά την αποθήκευσή του αλλά και να συνάδει με τις υψηλές απαιτήσεις των καταναλωτών, όσον αφορά σε εμφάνιση (θόλωμα, χρώμα) και διατροφική αξία (ασκορβικό οξύ).

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Γενικά – μορφολογικά χαρακτηριστικά εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια *Rutaceae*, η οποία ανήκει στη διαίρεση *Embryophyta*, *Siphonogana* ή *Spermatophyta*, στην υποδιαίρεση *Angiosperme*, στην κλάση *Dicotyledoneae*, στην υποκλάση *Archichlamydeae*, στην τάξη *Geraniales* και στην υποτάξη *Geraniineae*. Στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εσπεριδοειδών ανήκουν ο βλαστός, οι οφθαλμοί, τα αγκάθια, οι ρίζες, τα φύλλα, τα άνθη και ο καρπός. Τα καλλιεργούμενα εσπεριδοειδή είναι δένδρα μονόκορμα. Οι κύριοι βραχίονές τους συνήθως εκφύονται από τον κορμό σε ύψος 60-120 εκατοστά από το έδαφος. Ο κορμός τους είναι κυλινδρικός, εκτός σε μεγάλης ηλικίας δέντρα, όπου σχηματίζονται πάνω στον κορμό τους ράχες, πάνω από μεγάλες ρίζες συνήθως και κάτω από μεγάλους βραχίονες.

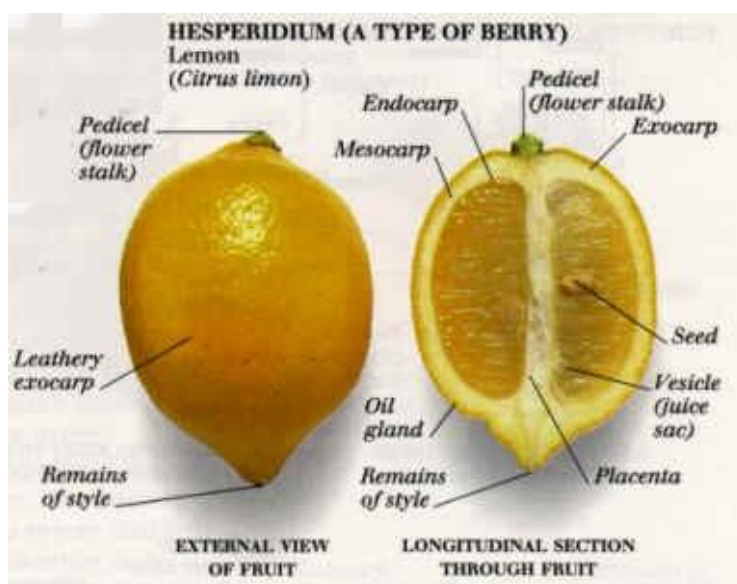
Η κόμη των περισσότερων καλλιεργούμενων ποικιλιών των εσπεριδοειδών είναι συνήθως σφαιρική. Οι πορτοκαλιές και τα γκρέιπφρουτ χαρακτηρίζονται από πυκνή βλάστηση, που αποτελείται από πάρα πολλούς μικρούς βλαστούς, ενώ οι λεμονιές από σχετικά πιο αραιή βλάστηση, που αποτελείται από λιγότερους και μεγαλύτερους βλαστούς.

Τα εσπεριδοειδή, στο σπορείο, φέρουν μια κύρια ρίζα. Η εμφάνιση δύο ή περισσότερων κύριων ριζών παρατηρείται συνήθως σε μεγαλύτερης ηλικίας φυτά και είναι αποτέλεσμα αποκοπής ή σπασίματος της αρχικής κύριας ρίζας κατά τη μεταφύτευση από το σπορείο.

Τα καλλιεργούμενα εσπεριδοειδή (εκτός της λεμονιάς) με την επίδραση υποτροπικού κλίματος, μεσογειακού τύπου, πέφτουν σε λήθαργο το χειμώνα, αλλά δε ρίχνουν τα φύλλα τους. Οι μασχαλιαίοι τους οφθαλμοί αρχίζουν να εκπύσσονται κατά τη διάρκεια των ζεστών περιόδων του Ιανουαρίου και Φεβρουαρίου, αλλά η νέα βλάστηση δεν αυξάνει με δραστηριότητα μέχρι τα τέλη Φεβρουαρίου ή Μαρτίου. Τα εσπεριδοειδή χαρακτηρίζονται από βλάστηση, που εμφανίζεται κατά κύματα, τουλάχιστον δύο το χρόνο, ένα την άνοιξη και ένα το καλοκαίρι. Η ανοιξιόατη όμως βλάστηση είναι εκείνη που παράγει τα πιο πολλά άνθη (Ποντίκης, 2003).

Η καλοκαιρινή βλάστηση χαρακτηρίζεται κυρίως από ανάπτυξη φυτοζωϊκών οργάνων δηλαδή βλαστών, φύλλων και οφθαλμών. Από τον κανόνα αυτό εξαιρούνται η κιτριά, η λεμονιά και η λιμεττία, που χαρακτηρίζονται από μία τάση συνεχούς βλαστήσεως και καρποφορίας. Οι ανθοφόροι βλαστοί υπερισχύουν στα ώριμα δένδρα και οι φυλλοφόροι στα νεαρά δένδρα.

Ο καρπός των εσπεριδοειδών, είναι ένα είδος ράγας που ονομάζεται εσπερίδιο. Ανατομικά σε αυτό, διακρίνουμε το περικάρπιο (φλοιός) και το ενδοκάρπιο (σάρκα) (Εικόνα 1). Το περικάρπιο αποτελείται από το εξωκάρπιο ή flavedo, ονομασία που προέρχεται από τη λατινική λέξη flavus που σημαίνει κίτρινος, και το μεσοκάρπιο ή albedo που στα λατινικά σημαίνει λευκός. Το εξωκάρπιο αποτελείται από την επιδερμίδα και τα παρακείμενα, συμπαγή στρώματα και από παρεγχυματικά κύτταρα, όπου βρίσκονται οι χλωροπλάστες και οι ελαιοφόροι αδένες του καρπού. Οι χλωροπλάστες κατά την ωρίμανση, μετατρέπονται σε χρωμοπλάστες, η χλωροφύλλη αποδομείται και εμφανίζονται έτσι οι διάφορες χρωστικές ουσίες, κυρίως καροτινοειδή, που δίνουν το χαρακτηριστικό χρώμα στους ιστούς και το χυμό των καρπών των εσπεριδοειδών. Το μεσοκάρπιο βρίσκεται μεταξύ εξωκαρπίου και ενδοκαρπίου και η υφή του είναι παρόμοια με την υφή του σπογγώδους παρεγχύματος του φύλλου (Ποντίκης, 2003).



Εικόνα 1. Ανατομία εσπεριδίου. Μεταξύ άλλων διακρίνονται το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο, η σάρκα και οι θύλακες που περιέχουν το χυμό.

1.2. Καρπός εσπεριδοειδών

1.2.1. Σύσταση καρπού μανταρινιάς

Περιεκτικότητα σε νερό: Η περιεκτικότητα σε νερό των καρπών της μανταρινιάς ποικίλει από 70 έως 92%, ανάλογα βέβαια με τη διαθέσιμη υγρασία του περιβάλλοντος και τις συνθήκες βλαστήσεως των δέντρων. Ένα μεγάλο μέρος του νερού των καρπών βρίσκεται στους φλοιούς των μανταρινιών.

Περιεκτικότητα σε οργανικά οξέα: Το κύριο οξύ των καρπών της μανταρινιάς είναι το κιτρικό οξύ, το οποίο απαντά κυρίως στη σάρκα του καρπού. Αντίθετα, στο φλοιό του καρπού απαντώνται κυρίως το μηλικό, μηλονικό και οξαλικό οξύ, από τα οποία το πρώτο βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η οξύτητα του χυμού σχετίζεται άμεσα με την συνολική συγκέντρωση του κιτρικού και μηλικού οξέος, μέρος των οποίων βρίσκεται υπό τη μορφή αλάτων. Η οξύτητα των μανταρινιών μειώνεται κατά την ωρίμανσή τους.

Περιεκτικότητα σε άμυλο: Το άμυλο απαντά κυρίως σε νεαρούς καρπούς, ενώ κατά την ωρίμανση τους οι καρποί και ιδιαίτερα οι φλοιοί τους, φέρουν μόνο ίχνη αμύλου.

Περιεκτικότητα σε αμινοξέα: Τα ελεύθερα αμινοξέα αποτελούν ένα σημαντικό κλάσμα των διαλυτών στερεών, που εντοπίζονται κυρίως στο χυμό των μανταρινιών. Η περιεκτικότητα του χυμού σε άζωτο εξαρτάται από την ποικιλία, το βαθμό ωρίμανσης και τις συνθήκες καλλιέργειας. Άλλες αζωτούχες ενώσεις που απαντώνται, περιλαμβάνουν αμίνες, νουκλεοτίδια, νουκλεϊνικά οξέα, ένζυμα και πρωτεΐνες.

Περιεκτικότητα σε βιταμίνες: Τα μανταρίνια, όπως και τα υπόλοιπα εσπεριδοειδή, αποτελούν μια ιδιαίτερα σημαντική πηγή ασκορβικού οξέος, το οποίο μειώνεται με την ωρίμανσή τους, ενώ το 75% της ποσότητάς του βρίσκεται στο φλοιό και ειδικότερα στο εξωκάρπιο. Η βιταμίνη Α, υπάρχει υπό τη μορφή της προβιταμίνης σε μεγάλη ποσότητα στα μανταρίνια, ενώ άλλες βιταμίνες που απαντούν στο φλοιό των μανταρινιών είναι η βιοτίνη, η νιασίνη, το παντοθενικό οξύ, η πυριδοξίνη, η ριβοφλαβίνη και η θειαμίνη (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Διατροφική αξία μανταρινιού (Wikipedia, 2015)

Mandarin oranges, raw		
Nutritional value per 100 g (3.5 oz)		
Energy	223 kJ (53 kcal)	
Carbohydrates	13.34 g	
Sugars	10.58 g	
Dietary fiber	1.8 g	
Fat	0.31 g	
Protein	0.81 g	
Vitamins		
Vitamin A equiv.	34 µg	(4%)
beta-carotene	155 µg	(1%)
Thiamine (B ₁)	0.058 mg	(5%)
Riboflavin (B ₂)	0.036 mg	(3%)
Niacin (B ₃)	0.376 mg	(3%)
Pantothenic acid (B ₅)	0.216 mg	(4%)
Vitamin B ₆	0.078 mg	(6%)
Folate (B ₉)	16 µg	(4%)
Choline	10.2 mg	(2%)
Vitamin C	26.7 mg	(32%)
Vitamin E	0.2 mg	(1%)
Trace minerals		
Calcium	37 mg	(4%)
Iron	0.15 mg	(1%)
Magnesium	12 mg	(3%)
Manganese	0.039 mg	(2%)
Phosphorus	20 mg	(3%)
Potassium	166 mg	(4%)
Sodium	2 mg	(0%)
Zinc	0.07 mg	(1%)

Περιεκτικότητα σε σάκχαρα: Τα σάκχαρα σε αντίθεση με τα οξέα, αυξάνουν κατά την ωρίμανση των καρπών. Τα σάκχαρα αποτελούν περισσότερο από το 70% των ολικών διαλυτών στερεών και περιλαμβάνουν κυρίως D-γλυκόζη, D-φρουκτόζη και σακχαρόζη σε αναλογία περίπου 1:1:2.

Περιεκτικότητα σε καροτενοειδή: Οι καροτίνες και οι ξανθοφύλλες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των κίτρινων, πορτοκαλί και κόκκινων χρωστικών και απαντούν κυρίως στο φλοιό των μανταρινιών. Τέλος, σημαντικά συστατικά των μανταρινιών, είναι τα αιθέρια έλαια, οι πηκτίνες και τα άλατα Ca, K και Na κιτρικού οξέος (Ποντίκης, 1993).

1.2.2. Ασκορβικό οξύ

Η κύρια συνεισφορά των εσπεριδοειδών στην ανθρώπινη διατροφή είναι αναμφίβολα το απόθεμά τους σε βιταμίνες, ειδικά σε ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C). Η καθημερινή πρόσληψη 5 mg βιταμίνης C είναι αρκετή για να εμποδίσει συμπτώματα σκορβούτου σε ένα ενήλικο άτομο (Mapson, 1967). Εκτιμάται πως απαιτούνται 30–60 mg για την κάλυψη των ημερήσιων διατροφικών αναγκών ενός ενήλικα, ποσότητα που συνήθως καλύπτεται από ένα μόλις πορτοκάλι. Το περιεχόμενο σε βιταμίνη C ενός χυμού ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών εσπεριδοειδών σημαντικά. Τα πορτοκάλια γενικά περιέχουν 40-70 mg βιταμίνης C ανά 100 mL χυμού, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στα λεμόνια, στα μανταρίνια και στα γκρέιπφρουτ κυμαίνεται στα 20-50 mg. Το ασκορβικό οξύ είναι συνήθως υψηλό σε ανώριμα πορτοκάλια και γκρέιπφρουτ. Όσο οι καρποί ωριμάζουν και μεγαλώνουν σε μέγεθος η συγκέντρωση του ασκορβικού μειώνεται. Ο φλοιός είναι πλούσιος σε βιταμίνη C. Η συγκέντρωση του ασκορβικού στο χυμό του πορτοκαλιού είναι το 1/5 αυτής στο flavedo και το 1/3 αυτής στο albedo (Atkins *et al.*, 1945). Στο γκρέιπφρουτ η συγκέντρωση της βιταμίνης C στο χυμό αποτελεί το 1/7 της αντίστοιχης στο flavedo και το 1/5 εκείνης στο albedo. Συνοπτικά, η συγκέντρωση της βιταμίνης C στο χυμό πορτοκαλιού αντιστοιχεί στο 25% της συνολικής συγκέντρωσης στον καρπό, ενώ η συγκέντρωση στο χυμό από γκρέιπφρουτ, αποτελεί μόλις το 17% της συνολικής περιεκτικότητας.

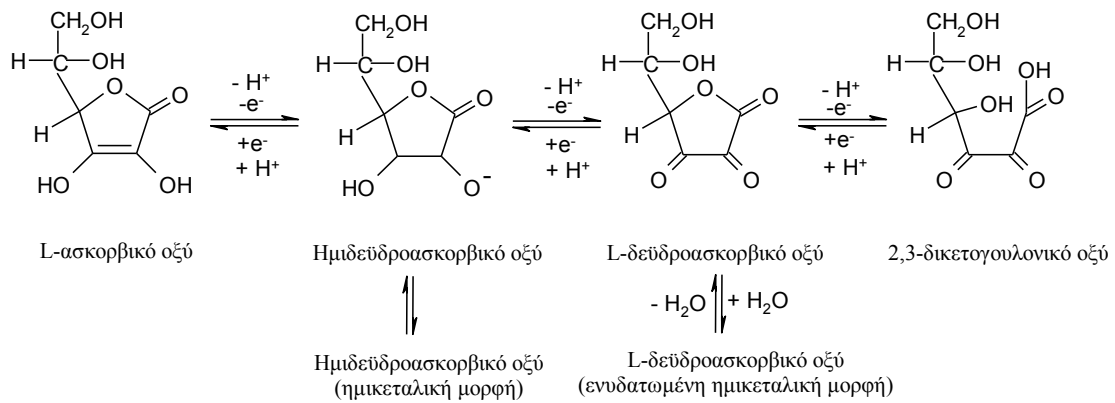
Ένα σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την ποιότητα του χυμού είναι η απώλεια της βιταμίνης C (L-ασκορβικό οξύ) κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας (Lima *et al.*, 1999· Manso *et al.*, 2001· Rojas and Gerschenson, 1997b) ή της αποθήκευσης (Lee and Chen, 1998· Lee and Coates, 1999b). Η διάσπαση του ασκορβικού οξέος κατά την αποθήκευση του χυμού λαμβάνει χώρα ακολουθώντας δύο διαδοχικά ή παράλληλα μονοπάτια (αερόβιο και αναερόβιο), με ρυθμούς που εξαρτώνται από τις συνθήκες αποθήκευσης, την συσκευασία και τη μέθοδο επεξεργασίας κατά την παραγωγή του χυμού (Gregory, 1996· Kenawi *et al.*, 1994· Kennedy *et al.*, 1992· Sadler *et al.*, 1997· Tawfik and Huyghebaert, 1998).

Η υποβάθμιση του ασκορβικού οξέος μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο μέσω του αερόβιου όσο και μέσω του αναερόβιου μονοπατιού (Huelin, 1953· Johnson *et al.*, 1995) και εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες όπως, οξυγόνο, θερμότητα, φως

(Robertson and Samaniego, 1986), θερμοκρασία και χρόνο αποθήκευσης, (Fellers, 1988· Gordon and Samaniego-Esguerra, 1990). Η διάσπαση του ασκορβικού οξέος, λόγω οξειδωσης, πραγματοποιείται κυρίως κατά την επεξεργασία των χυμών (Huelin, 1953), ενώ η αναερόβια υποβάθμισή του συμβαίνει κατά κύριο λόγο, στη διάρκεια αποθήκευσης (Johnson *et al.*, 1995· Lee and Nagy, 1988a· Solomon *et al.*, 1995) και παρατηρείται, ειδικά σε παστεριωμένους χυμούς.

Η αερόβια διάσπαση του ασκορβικού οξέος περιλαμβάνει αρχικά την οξειδωσή του σε δεϋδροασκορβικό οξύ (DHAA), το οποίο στη συνέχεια υδρολύεται σε 2,3-δικετογουλονικό οξύ (απώλεια βιταμινικής δράσης), και την μετέπειτα οξειδωση, αφυδάτωση και πολυμερισμό για το σχηματισμό μιας σειράς προϊόντων χωρίς διατροφική αξία. Οι αντιδράσεις αυτές της οξειδωσης και της αφυδάτωσης μοιάζουν πολύ με τις αντίστοιχες των σακχάρων που οδηγούν σε πλήθος άκορεστων προϊόντων και πολυμερών. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν στον ρυθμό και τον μηχανισμό διάσπασης, καθώς και την φύση των προϊόντων διάσπασης του ασκορβικού οξέος, είναι το pH, η συγκέντρωση του οξυγόνου και η παρουσία ιχών μετάλλων που δρουν καταλυτικά (Deshpande *et al.*, 1996, Gregory, 1996).

Η οξειδωση του ασκορβικού οξέος λαμβάνει χώρα είτε σε δύο στάδια μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου, είτε σε μια μόνο αντίδραση, κατά την οποία μεταφέρονται δύο ηλεκτρόνια χωρίς την δυνατότητα ανίχνευσης του ενδιάμεσου ημιδεϋδροασκορβικού οξέος. Κατά την οξειδωση σε δύο στάδια, το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου για το σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας του ημιδεϋδροασκορβικού οξέος. Η απώλεια ενός επιπλέον ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό του δεϋδροασκορβικού οξέος, το οποίο είναι ιδιαίτερα ασταθές λόγω της ευαισθησίας του λακτονικού δακτυλίου στην υδρόλυση. Η υδρόλυση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή δημιουργία του 2,3-δικετογουλονικού οξέος (Σχήμα 1) και είναι υπεύθυνη για την απώλεια της δράσης της βιταμίνης C. Ο ρυθμός της υδρόλυσης αυξάνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή την απουσία του οξυγόνου.



Σχήμα 1. Οξείδωση L-ασκορβικού οξέος σε 2 διαδοχικά στάδια μεταφοράς ηλεκτρονίου

Η αναερόβια διάσπαση του ασκορβικού οξέος δεν παίζει ιδιαίτερα σημαντικά ρόλο στην απώλεια της βιταμινικής δράσης στα περισσότερα τρόφιμα. Το αναερόβιο μονοπάτι είναι πιο σημαντικό για κονσερβοποιημένα τρόφιμα, όπως λαχανικά, ντομάτες και χυμοί φρούτων, ύστερα από την κατανάλωση του υπολειπόμενου οξυγόνου. Ακόμα όμως και σε αυτά τα προϊόντα, η απώλεια του ασκορβικού οξέος με αναερόβιο τρόπο πραγματοποιείται πολύ αργά.

1.2.3. Χρώμα

Το χρώμα είναι ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά της ποιότητας στα τρόφιμα. Αν και δεν αντικατοπτρίζει κατ' ανάγκη θρεπτική, γευστική, ή λειτουργική αξία, αποτελεί ένα από τα κριτήρια ενός προϊόντος, ως αποδεκτού από τους καταναλωτές. Μερικές φορές, αντί κάποιας χημικής ανάλυσης, η μέτρηση χρώματος μπορεί να χρησιμοποιείται εάν υπάρχει κάποιος συσχετισμός μεταξύ της χρώματος και της παρουσίας κάποιου συστατικού στο τρόφιμο, μιας και η μέτρηση του χρώματος είναι απλούστερη και ταχύτερη διαδικασία από ό,τι η χημική ανάλυση. Για παράδειγμα, το περιεχόμενο σε καροτενοειδή στην κολοκύθα μπορεί να προσδιοριστεί από τη μέτρηση χρώματος, χωρίς την εκτέλεση χημικής ανάλυσης, καθώς υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της ολικής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή και του χρώματος (Francis, 1962). Το έντονο χρώμα των χυμών από εσπεριδοειδή οφείλεται κατά κύριο λόγο σε χημικές ενώσεις που ονομάζονται καροτενοειδή. Το χρώμα στους χυμούς είναι σημαντική ποιοτική παράμετρος και θα πρέπει να είναι

από φωτεινό κίτρινο έως πορτοκαλί και κόκκινο, και να μην είναι χλωμό. Το γεγονός ότι το USDA θεωρεί τις αξιολογήσεις στη γεύση εξίσου σημαντικές με τις αξιολογήσεις στο χρώμα του χυμού πορτοκαλιού, δείχνει τη βαρύτητα της παραμέτρου αυτής.

Είναι επιθυμητό να παρακολουθούνται οι αλλαγές στο χρώμα ενός προϊόντος κατά την ωρίμανση, αποθήκευση και επεξεργασία. Το χρώμα χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της ωριμότητας των φρούτων. Το χρώμα στα πατατάκια σε μεγάλο βαθμό καθορίζεται από την περιεκτικότητα σε αναγωγικά σάκχαρα, τις συνθήκες αποθήκευσης των πατατών, και την μετέπειτα επεξεργασία τους. Στο αλεύρι, το χρώμα αντανakλά το ποσοστό του σε πίτυρο. Επιπλέον, το φρεσκοαλεσμένο άλευρο είναι κίτρινο λόγω της παρουσία ξανθοφυλλών (Sahin and Sumnu, 2006).

Το χρώμα είναι ένα αντιληπτό φαινόμενο που εξαρτάται από τον παρατηρητή και τις συνθήκες υπό τις οποίες το αυτό παρατηρείται. Είναι ένα χαρακτηριστικό του φωτός, το οποίο είναι μετρήσιμο σε όρους έντασης και μήκους κύματος. Το χρώμα κάποιου υλικού γίνεται ορατό μόνο όταν το φως από ένα φωτεινό αντικείμενο μία πηγή φωτός, φωτίζει ή χτυπά την επιφάνεια του αντικειμένου.

Φως ορίζεται ως η αξιολογούμενη οπτικώς, ακτινοβολούσα ενέργεια που έχει μια συχνότητα από περίπου $3,9 \times 10^{14}$ Hz έως $7,9 \times 10^{14}$ Hz στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Όταν το φως αλληλεπιδρά με την ύλη, μόνο ορισμένα μήκη κύματος εντός της ορατής περιοχής του φάσματος μπορεί να μεταδίδονται ή να ανακλώνται. Οι προκύπτουσες ακτινοβολίες στα διαφορετικά μήκη κύματος γίνονται αντιληπτές από το ανθρώπινο μάτι ως διαφορετικά χρώματα, και μερικά μήκη κύματος είναι οπτικά πιο έντονα από κάποια άλλα. Μήκη κύματος που δεν απορροφούνται, αλλά αντανakλώνται ή διαδίδονται μέσω ενός αντικειμένου είναι ορατά στους παρατηρητές. Για παράδειγμα, ένα μπλε αντικείμενο αντανakλά το μπλε φάσμα φωτός, αλλά απορροφά το κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο, πράσινο, και ιώδες. Έτσι, αν όλη η φωτεινή ενέργεια στην ορατή περιοχή ανακλάται από μια αδιαφανή επιφάνεια, το αντικείμενο φαίνεται λευκό. Αν απορροφάται σχεδόν πλήρως, το αντικείμενο φαίνεται μαύρο. Το χρώμα ενός αντικειμένου μετριέται και αναπαριστάται από φασματοφωτομετρικές καμπύλες, οι οποίες είναι γραφικές παραστάσεις τμημάτων

του προσπίπτοντος φωτός (που αντικατοπτρίζεται ή μεταδίδεται) ως συνάρτηση του μήκους κύματος σε όλο το ορατό φάσμα (Sahin and Sumnu, 2006).

Σημαντικές χρωστικές ουσίες που προσδίδουν χρώμα στα εσπεριδοειδή είναι οι χλωροφύλλες (πράσινο), τα καροτενοειδή (κίτρινο, πορτοκαλί και βαθύ πορτοκαλί), οι ανθοκυανίνες (βαθύ κόκκινο), και τα λυκοπένια (ροζ ή κόκκινο). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης, ειδικά κατά τα πρώτα στάδια, οι χλωροφύλλες κυριαρχούν στους φλοιούς όλων των εσπεριδοειδών. Η χλωροφύλλη στα εσπεριδοειδή αποτελείται κυρίως από δύο χρωστικές ουσίες: χλωροφύλλη-α ($C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$) και χλωροφύλλη-β ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) και η αναλογία μεταξύ τους είναι 2:1. Υπάρχει μια ταχεία σύνθεση καροτενοειδών στους χρωμοπλάστες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, που συνοδεύεται από ταυτόχρονη απώλεια της χλωροφύλλης. Κατά την πορεία της σύνθεσης αυτής οι χλωροπλάστες μετατρέπονται σε χρωμοπλάστες. Οι Lewis *et al.* (1964) ανέφεραν μια μείωση στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α από 4,1 σε 1,0 $\mu g/cm^2$ και της χλωροφύλλης-β από 1,2 σε 0,3 $\mu g/cm^2$ σε flavedo πορτοκαλιού Navel, 2 μήνες μετά την αλλαγή χρώματος. Τα καροτενοειδή είναι μακράς αλύσου ενώσεις (τετρατερπένια) και περιλαμβάνουν καροτένια, (α , β , κτλ.) και ξανθοφύλλες (λουτεΐνες, φλαβοξανθίνες, ζεαξανθίνη, κτλ.). Τα β -καροτένια των καροτενοειδών έχουν σημαντική θρεπτική αξία λόγω της δραστηριότητας βιταμίνης A που παρουσιάζουν. Οι ξανθοφύλλες είναι εστεροποιημένες με λιπαρά οξέα και συσσωρεύονται στα λιποσφαιρίδια των χρωμοπλαστών στο φλοιό (Eilati, 1970). Το συνολικό περιεχόμενο σε καροτενοειδή, χλωροφύλλες και λυκοπένιο ποικίλλει σημαντικά στο φλοιό και πολτό, μεταξύ των διαφόρων εσπεριδοειδών.

Με την ωρίμανση, τα ολικά καροτενοειδή αυξάνονται στο φλοιό, καθώς και στην πούλπα. Ο φλοιός των καρπών είναι ο ιστός με την υψηλότερη συγκέντρωση καροτενοειδών, και 50-75% των ολικών καροτενοειδών των πορτοκαλιών εντοπίζεται στο φλοιό (Curl and Bailey, 1956). Μια σημαντική συσχέτιση έχει βρεθεί μεταξύ χρώματος καρπών και συνολικού περιεχομένου σε καροτενοειδή (Ahmed *et al.*, 2002). Στον καρπό πρώιμων πορτοκαλιών Valencia, υπάρχει μια ποιοτική διαφορά μεταξύ των καροτενοειδών της πούλπας και της φλούδας, με τη δεύτερη να περιέχει περισσότερο βιολαξανθίνη (Curl and Bailey, 1956). Στα γκρέιπφρουτ, η ενεργή σύνθεση καροτενοειδών λαμβάνει χώρα πριν από τη μείωση της χλωροφύλλης (Yokoyama and White, 1967). Στη φλούδα του άσπερμου γκρέιπφρουτ Marsh, δεν υπάρχει περαιτέρω σύνθεση καροτενοειδών κατά τη διάρκεια της

ωρίμανσης, μετά την εξάλειψη της χλωροφύλλης, αλλά συμβαίνει μια σημαντική σύνθεση φυτοενίου. Στις ερυθρές ποικιλίες γκρέιπφρουτ, η σάρκα είναι κόκκινου χρώματος λόγω της υψηλής συγκέντρωσης λυκοπενίου. Στην ποικιλία Thompson, το λυκοπένιο βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα υπόλοιπα γκρέιπφρουτ, λόγος στον οποίο αποδίδεται το ροζ του χρώμα. Γενικά, τα επικρατέστερα καροτενοειδή του πολτού των έγχρωμων γκρέιπφρουτ είναι κυρίως το λυκοπένιο και το β-καροτένιο.

Σε ξηρά και δροσερά κλίματα όπως το Μεσογειακό, το χρώμα του χυμού σχηματίζεται ικανοποιητικά, ενώ σε θερμά και υγρά κλίματα όπως αυτό της Florida, το χρώμα του παρουσιάζει μικρότερη ένταση. Ο μόνος νόμιμος τρόπος ενίσχυσης χρώματος είναι η ανάμειξη του υπό εξέταση χυμού με κάποιον άλλο με δυνατότερο χρώμα (Perez-Lopez *et al.*, 2005). Στις ΗΠΑ, επιτρέπεται η προσθήκη μανταρινοχυμού σε πορτοκαλοχυμό πρώιμων ποικιλιών, μέχρι 10% περιεκτικότητα. Ο χυμός του μανταρινιού περιέχει περισσότερα καροτενοειδή, με αποτέλεσμα ένα εντονότερο χρώμα από τα υπόλοιπα εσπεριδοειδή.

Τα καροτενοειδή αν και γενικά ανθεκτικά στις αλλαγές του pH και τη θέρμανση, μετά από εκτεταμένη επεξεργασία φρούτων και λαχανικών μπορεί να γίνουν πιο επιρρεπή στην οξείδωση κατά την αποθήκευση, με αποτέλεσμα αλλοιώσεις του χρώματος (Park, 1987· Chen *et al.*, 1994· Biacs and Wissgott, 1997· Rodriguez-Amaya, 1997· Mortensen and Skibsted, 2000). Αυτή η οξείδωση μπορεί να οδηγήσει σε απευθείας διάσπαση των καροτενοειδών και σχηματισμό άχρωμων τελικών ενώσεων ή στο σχηματισμό *cis*-ισομερών λόγω θερμοϊσομερίωσης. Στα λαχανικά ειδικά, τα καροτενοειδή βρίσκονται κυρίως υπό τη μορφή των *trans*-ισομερών. Η *cis*-ισομέρεια έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος, καθώς τα συγκεκριμένα ισομερή έχουν διαφορετικές φασματικές ιδιότητες από τα αντίστοιχα *trans* ισομερή. Αυτές οι διαφορετικές ιδιότητες προσδίδουν μια φωτεινότερη χροιά και χαμηλότερη ένταση χρώματος στα προϊόντα (Simpson, 1985· Gross, 1991).

Οι συμβατικές μέθοδοι θερμικής επεξεργασίας συχνά οδηγούν σε επιζήμιες αλλαγές στην οργανοληπτική και θρεπτική ποιότητα των τροφίμων. Ο χυμός των εσπεριδοειδών οφείλει το χρώμα του κυρίως στα καροτενοειδή, (Lee *et al.*, 2001· Vikram *et al.*, 2005· Melendez-Martinez *et al.*, 2007) και το χρώμα σχετίζεται με τις διάφορες επεξεργασίες. Μια σχετικά μεγάλη απώλεια της τάξης του 36% σε

προβιταμίνη Α (β-καροτένιο, α-καροτένιο και β-κρυπτοξανθίνη) και καροτενοειδή, βρέθηκε σε χυμό πορτοκαλιού έπειτα από θερμική επεξεργασία στους 80°C για 2 min (Lessin *et al.*, 1997).

Κατά την διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης του χυμού, πραγματοποιείται σταδιακή μεταβολή του χρώματός του προς το πιο σκούρο, η οποία συνοδεύεται από μεταβολές στη γεύση και το άρωμα και αποτελεί σημαντικό παράγοντα ποιοτικής υποβάθμισης του (Graumlich *et al.*, 1986, Klim & Nagy, 1988, Roig *et al.*, 1999). Η αμαύρωση αυτή δεν αντιπροσωπεύει την μεταβολή συγκέντρωσης των χρωστικών συστατικών του χυμού, αλλά σχετίζεται άμεσα με την μεταβολή κάποιων ζωτικών συστατικών του. Ο βασικός μηχανισμός αλλοίωσης του χρώματος του χυμού (μη ενζυμικό μαύρισμα) δεν είναι πλήρως κατανοητός. Οι περισσότεροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το μαύρισμα οφείλεται κυρίως στις καρβονυλικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά την οξειδωτική ή την αναερόβια διάσπαση του ασκορβικού οξέος, παρουσία ή όχι αμινοξέων (Graumlich *et al.*, 1986, Manso *et al.*, 2001· Roig *et al.*, 1999· Trammell *et al.*, 1986). Μια από τις ενώσεις διάσπασης του ασκορβικού είναι η υδροξυ-μεθυλφουρφουράλη (Eskin, 1990· Solomon *et al.*, 1995), η οποία θεωρείται πρόδρομη ένωση των καφέ χρωστικών. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δριμύτητας της θερμικής επεξεργασίας των χυμών και λαμβάνεται υπόψη στον ποιοτικό έλεγχο (Lee and Nagy, 1988b).

Οι ανεπιθύμητες αλλαγές στο χρώμα των χυμών απορρέουν κυρίως από το σχηματισμό καφέ χρωστικών (μελανοϊδίνες) που αμβλύνουν το φυσικό χρωματισμό του χυμού, και λιγότερο από αλλαγές στις χρωστικές αυτές καθ' αυτές. Οι χρωστικές ουσίες του χυμού των εσπεριδοειδών είναι αρκετά θερμοανθεκτικές εν συγκρίσει με χρωστικές άλλων τροφίμων (Ringblom, 2004). Ο σχηματισμός των καφέ χρωστικών λαμβάνει χώρα μετά από εκτεταμένη θερμική επεξεργασία ή μακρά αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

1.3. Ποικιλία Encore

Η ποικιλία μανταρινιού Encore (*Citrus reticulata* Blanco), η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι ένα υβρίδιο που έχει προκύψει από τη διασταύρωση της ποικιλίας King (*Citrus nobilis*), που είναι εμπορικά ένα σημαντικό

είδος μανταρινιού, με τη Willowleaf μανταρινιά (*Citrus deliciosa*), μια ποικιλία της Μεσογείου. Η Encore ωριμάζει πολύ αργά, κατά τον Μάιο με Ιούνιο με την ποιότητα των καρπών να διατηρείται μέχρι τον Αύγουστο ή και τον Σεπτέμβριο. Η Encore αναπτύχθηκε στο Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια Citrus Research Center, στο Riverside, και παρουσιάστηκε στο κοινό το 1965 (Cameron *et al.*, 1965). Σαν δένδρο είναι μέτριας ζωηρότητας, ορθόκλαδη, χωρίς αγκάθια και με πολύ λεπτούς κλάδους. Τα φύλλα της μοιάζουν με τα φύλλα της King, αλλά έχουν στενότερο έλασμα και μισχοπτερύγια. Είναι παραγωγική ποικιλία και χαρακτηρίζεται από τάση παρενιαυτοφορίας. Αναπτύσσεται καλύτερα σε μέρη με άφθονο ηλιακό φως και καλά στραγγιζόμενα εδάφη.



Εικόνα 2. Μανταρινιά Encore

Ο καρπός της έχει μέσο μέγεθος και σχήμα πολύ πλακέ. Ο φλοιός είναι λεπτός και λείος, πορτοκαλοκίτρινος και αποσπάται εύκολα από τη σάρκα (Εικόνα 2). Έχει περίπου 11 καρπόφυλλα. Η σάρκα έχει βαθύ πορτοκαλί χρώμα, είναι συνεκτική, αλλά τρυφερή, πλούσια σε χυμό και γευστική. Είναι ποικιλία πολύσπερμη, μονοεμβρυονική (λευκές συνήθως κοτυληδόνες) και πολύ όψιμη. Διατηρείται πολύ

καλά πάνω στο δένδρο χωρίς να χάνει σε ποιότητα. Ενώ ανάμεσα στα εσπεριδοειδή τα μανταρίνια είναι από τα ανθεκτικότερα είδη στο κρύο, η Encore έχει μικρότερη ανοχή από τα υπόλοιπα μανταρίνια λόγω της όψιμης περιόδου ωρίμανσής της.

1.4. Χυμός εσπεριδοειδών

1.4.1. Σύσταση χυμού

Ο χυμός των εσπεριδοειδών προέρχεται από το υγρό που βγαίνει από τους θύλακες του καρπού ύστερα από πίεσή τους. Αποτελείται κυρίως από νερό, οργανικά οξέα, σάκχαρα, πηκτίνες και σε μικρότερη αναλογία από φυσικές χρωστικές (π.χ. καροτενοειδή), πρωτεΐνες, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, ένζυμα, λιπίδια, μεταλλικά στοιχεία (Πίνακας 2), βιταμίνες, λιμονοειδή, πτητικά αρωματικά συστατικά, φαινολικές ενώσεις, τέφρα και άλλα διαλυτά και αδιάλυτα στερεά (πούλπα). Δύο από τις πιο σημαντικές παραμέτρους κατά την παραγωγή του χυμού είναι τα συνολικά διαλυτά στερεά ($^{\circ}\text{Bx}$) και η αναλογία Brix προς οργανικά οξέα. Η αποδοχή του από το καταναλωτικό κοινό εξαρτάται άμεσα από την λεπτή ισορροπία που αποκαθίσταται μεταξύ των σακχάρων και των περιεχόμενων οξέων (Chen *et al.*, 1993· Hendrix and Redd, 1995).

Στην ποικιλία μανταρινιού Kinnow (King x Willowleaf) έχει αναλυθεί η φυσικοχημική σύνθεση, με στόχο την καταλληλότητα για επεξεργασία και αξιοποίηση αποβλήτων. Η ανάκτηση του χυμού, του φλοιού και των στερεών υπολειμμάτων ήταν 55.8%, 26.8%, and 17.4% αντίστοιχα (Pruthi *et al.*, 1984). Η σύνθεση του χυμού έχει αναφερθεί ως εξής: ολικά στερεά 11,15%, ολικά διαλυτά στερεά 10%, τιτλοδοτούμενη οξύτητα 1,15%, αναγωγικά σάκχαρα 3,2%, ολικά σάκχαρα 6,74%, πηκτίνη 0,29%, ασκορβικό οξύ 12,2 mg%, και β-καροτένιο 1,35 mg% (Sandhu and Bhatia, 1985).

Πίνακας 2. Ημερήσια επιτρεπόμενα όρια και περιεχόμενο σε θρεπτικά στοιχεία διαφόρων χυμών (Ladaniya, 2008).

Nutrient	Recommended dietary allowance essential in human nutrition (USRDA)	Recommended dietary allowance for average adult Indian (60 kg weight)	Orange juice	Tangerine juice	Grapefruit juice
Vit C	90 mg	40 mg	45–50 mg	30–31 mg	30–35 mg
Vit A	5000 IU (900 RAE)	600 µg retinal, β- carotene 2400	190– 400 IU	350–420 IU	Trace–21 IU
Vit D	200 IU	–	–	–	–
Vit E	15 mg	25 µg	100 µg	–	–
Thiamin (B1)	1.5 mg	1.4 mg	50–80 µg	50–80 µg	30–40 µg
Riboflavin	1.7 mg	1.6 mg	20–40 µg	20–40 µg	–
Niacin	20 mg	–	300–600 µg	200–250 µg	200 µg
Calcium	1 g	400–1000 mg	10–11 mg	–	9–10 mg
Iron	18 mg	28 mg	0.1–0.2 mg	–	–
Vit B6 (Pyridoxine)	2 mg	2.0 mg	47–66 µg	40–50 µg	18–20 µg
Folic acid	0.4 mg	100 µg	34 µg	21 µg	8 µg
Vit B12	5–6 µg	1 µg	–	–	–
Phosphorus	1 g	–	14–20 mg	16–18 mg	15–18 mg
Iodine	150 µg	–	0.25 µg	–	–
Magnesium	400 mg	–	8–12 mg	10–15 mg	8–10 mg
Zinc	15 mg	–	25–30 µg	–	–
Copper	2 mg	–	50–160 µg	–	–
Biotin	0.3 mg	–	–	–	–
Pantothenic acid	10 mg	–	130–150 µg	–	280–300 µg

1.4.2. Επεξεργασία χυμού

Οι καρποί μεταφέρονται με φορτηγά στις περιοχές παραλαβής. Αρχικά υπόκεινται σε προπλύσιμο για να απαλλαγθούν από ακαθαρσίες και κατάλοιπα ζιζανιοκτόνων στην επιφάνειά τους, πριν από την αφαίρεση κλάδων και φύλλων που βρίσκονται προσφύμενα σε αυτούς. Κατόπιν, ακολουθεί προδιαλογή με χειρωνακτικό έλεγχο, με σκοπό να απορριφθούν ακατάλληλοι καρποί. Οι μεν ποιοτικοί αποθηκεύονται, οι δε απορριφθέντες μεταφέρονται απευθείας σε μύλο άλεσης ζωοτροφών. Ακολουθεί μεταφορά από τον χώρο αποθήκευσης στον χώρο επεξεργασίας μέσω σωλήνων με νερό. Κατόπιν τοποθετούνται στα πλυντήρια όπου και πλένονται με χλωριωμένο νερό, βουρτσίζονται και ψεκάζονται με νερό υπό πίεση.

Τα πλυμένα πλέον φρούτα ταξινομούνται κατά μέγεθος το οποίο διευκολύνει την διαδικασία της εξαγωγής χυμού. Η ταξινόμηση των καρπών σε διαφορετικά μεγέθη γίνεται προκειμένου να τροφοδοτηθούν στους εκχυμωτές οι οποίοι έχουν ρυθμιστεί να χειρίζονται το ανάλογο μέγεθος (Γιαννιώτης, 2013).

Μετά το τελικό πλύσιμο και την επιθεώρηση, οι καρποί επιλέγονται μηχανικά βάση μεγέθους και διαχωρίζονται. Ομαδοποιημένοι πλέον στις ταινίες μεταφοράς, στέλνονται προς εκχύμωση σε κατάλληλο στοιχείο εξοπλισμού, ώστε να αποφέρουν μέγιστη απόδοση σε χυμό. Οι εκχυμωτές περιλαμβάνουν ένα αριθμό υποδοχών οι οποίοι μπορούν να δεχτούν διαφορετικά μεγέθη καρπών. Τα μηχανήματα εκχυμώσεως είναι διαφόρων τύπων. Ένας τύπος εφαρμόζει τεχνική ανάλογη με τον οικιακό λεμονοστύφτη, ένας άλλος τύπος εκχυμώνει ολόκληρα τα εσπεριδοειδή χωρίς να κοπούν, κόβοντας ένα κυλινδρικό τμήμα κατά μήκος του άξονα του καρπού και ένας τρίτος τύπος που, αφού οι καρποί κοπούν σε δύο μισά, τους συνθλίβει μεταξύ δύο αντίθετα περιστρεφόμενων κυλίνδρων (Γιαννιώτης, 2013). Το καθένα από τα προαναφερθέντα συστήματα έχει δυνατότητα επεξεργασίας περίπου 4 τόνων/ώρα. Οι εκχυμωτές πρέπει να επιτρέπουν μόνο σε ελάχιστη ποσότητα αιθέριου ελαίου της φλούδας να περάσει μέσα στον χυμό (Saravacos and Kostaropoulos, 2002).

Μετά την εκχύμωση, ο χυμός υπόκειται σε φινίρισμα ούτως ώστε να μειωθεί το περιεχόμενο σε πούλπα από το 50% που συνήθως ανέρχεται, στο 12%. Πρόκειται ουσιαστικά για μία μέθοδο μηχανικού διαχωρισμού που βασίζεται στο κοσκίνισμα. Αυτό πραγματοποιείται με πρέσες που φιλτράρουν το χυμό, πιέζοντας τον μέσα από ειδικά κόσκινα με ανοίγματα 1 και 0,5 mm. Σε περίπτωση που απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός του χυμού από στερεά, ακολουθεί φυγοκέντρωση. Το ρεύμα που περιέχει τα σωματίδια της πούλπας εισέρχεται στη διαδικασία ανάκτησης ή έκπλυσης.

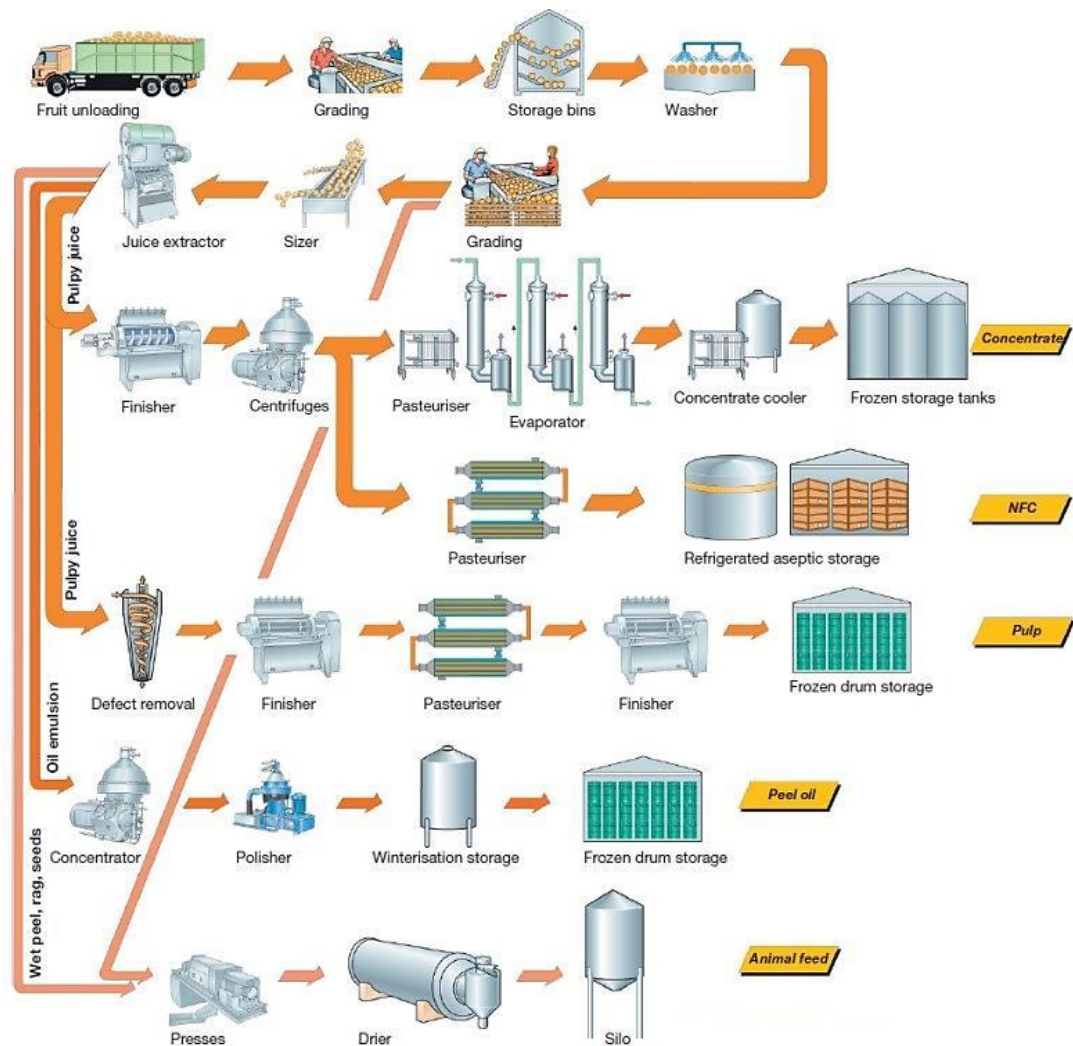
Οι φλοιοί, η πούλπα και τα σπέρματα που διαχωρίζονται από τον χυμό, αναμιγνύονται και πιέζονται με συνεχόμενη πίεση. Στη συνέχεια, αποξηραίνονται σε επίπεδο υγρασίας της τάξεως του 10%, (ή λιγότερο) με χρήση περιστροφικού ξηραντήρα αέρα. Μπορούν να εφαρμοστούν ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες ξήρανσης χωρίς να προκαλείται ιδιαίτερη υποβάθμιση στις θρεπτικές ουσίες τους. Το τελικό αποξηραμένο προϊόν χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή.

Κατά το φινίρισμα, διαχωρίζεται ένα μέρος του αιθέριου ελαίου το οποίο από το φλοιό έφθασε στο χυμό κατά την εκχύμωση. Το μεγαλύτερο μέρος του

εξαγόμενου ελαίου όμως, προκύπτει από την επεξεργασία των αποβαλλόμενων φλοιών οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ανάκτησή του, πριν να υποστούν ξήρανση. Το αιθέριο έλαιο ανακτάται με μηχανική πίεση, γαλακτοματοποίηση σε νερό και φυγοκέντρηση (Kimball, 1999) και πωλείται ως πολύτιμο υποπροϊόν.

Ο χυμός των εσπεριδοειδών πρέπει να παστεριωθεί πριν επεξεργασθεί περαιτέρω, με σκοπό να περιοριστεί η αλλοίωση από μικροοργανισμούς και να απενεργοποιηθούν τα πηκτινολυτικά ένζυμα. Οι στόχοι συνήθως κατά τη συγκεκριμένη θερμική επεξεργασία είναι η απενεργοποίηση των πηκτινεστερασών και ταυτόχρονα η μείωση της ποιοτικής υποβάθμισης (χρώμα, βιταμίνη C κτλ.) σε πολύ χαμηλό επίπεδο. Η HTST (high temperature short time ή υψηλής θερμοκρασίας και μικρού χρόνου) παστερίωση σε θερμοκρασίες 90-95°C για 15-30 δευτερόλεπτα μπορεί να εφαρμοσθεί με χρήση εναλλάκτη θερμότητας με πλάκες. Το μεγαλύτερο μέρος της θερμικής επεξεργασίας ουσιαστικά λαμβάνει χώρα κατά την ανταλλαγή θερμότητας, στο τμήμα ανάκτησης του εναλλάκτη, συντελώντας σημαντικά στην εξοικονόμηση ενέργειας. Αυτό οφείλεται στο ότι, ως θερμαντικό μέσο χρησιμοποιείται το ίδιο το θερμό προϊόν μετά την έξοδό του από τον αγωγό παραμονής και πριν τροφοδοτηθεί στο τμήμα ψύξης του εναλλάκτη θερμότητας (Γιαννιώτης, 2013). Έτσι επιτυγχάνεται προθέρμανση του κρύου απαστερίωτου προϊόντος και πρόψυξη του παστεριωμένου προϊόντος. Η παστερίωση χυμού που προορίζεται για εξάτμιση μπορεί να παραληφθεί, εάν ο χυμός επεξεργασθεί αμέσως μετά την εξαγωγή και γίνει χρήση ενός εξατμιστήρα τύπου T.A.S.T.E. (Thermally Accelerated Short-Time Evaporator).

Ο χυμός συμπυκνώνεται από τα 12 στα 65°Bx περίπου, σε πολυβάθμιο εξατμιστήρα κατερχόμενου λεπτού στρώματος. Συνήθως χρησιμοποιείται το σύστημα HTST (π.χ. T.A.S.T.E.) μιας και ο χυμός είναι θερμοευαίσθητος και ο χρόνος παραμονής θα πρέπει να είναι μικρός (Chen and Hernandez, 1997). Τα πολλαπλών βαθμίδων συστήματα μειώνουν αισθητά τις ανάγκες σε ατμό από την εξάτμιση. Ένα τετραβάθμιο σύστημα χρησιμοποιείται κυρίως σε χυμούς εσπεριδοειδών. Συνδυασμός του πολυβάθμιου εξατμιστήρα με ένα μηχανικό επανασυμπιεστή του ατμού, μπορεί να ελαττώσει περεταίρω τις απαιτήσεις σε ενέργεια (Maroulis and Saravacos, 2003).



Σχήμα 2. Διάγραμμα ροής για διαφορετικούς τύπους χυμών και τα παραπροϊόντα τους (Ringblom, 2004).

Στους εξατμιστήρες εξατμίζεται εκτός από το νερό και το μεγαλύτερο μέρος από τις πτητικές ουσίες που προσδίδουν γεύση στο χυμό, το οποίο όμως συλλέγεται και συμπυκνώνεται σε ειδικό σύστημα ανάκτησης αρώματος. Αυτές προστίθενται στο χυμό μετά τη συμπύκνωση ή και κατά την αραιώσή του πριν διατεθεί στο εμπόριο (Sarravacos and Kostaropoulos, 2002).

Για να διευκολυνθεί η συμπύκνωση του χυμού (μειωμένο ιξώδες), η πούλπα μπορεί να μειωθεί στο 3-5% χρησιμοποιώντας φυγοκεντρικούς διαχωριστές ή μεμβράνες φιλτραρίσματος. Επιπλέον, οι πικρές ενώσεις και η εκτεταμένη οξύτητα κάποιων πορτοκαλιών μπορεί να εξαλειφθούν μέσω ιοντοανταλλαγής, χρησιμοποιώντας ειδικές ρητίνες. Οι στήλες ανταλλαγής ιόντων προϋποθέτουν την χρήση καθαρού χυμού, ο οποίος προετοιμάζεται από φυγοκέντρωση ή φιλτράρισμα.

Ο χυμός συγκέντρωσης 65°Bx ψύχεται περίπου στους 0°C σε έναν αποξέομενο στρώματος εναλλάκτη θερμότητας. Το προϊόν συσκευάζεται ασηπτικά συνήθως σε βαρέλια 200 λίτρων. Ο ασηπτικά συσκευασμένος χυμός μπορεί να αποθηκευτεί σε συνθήκες ψύξης (0-2°C) για 6-12 μήνες. Επιπλέον μπορεί να αποθηκευτεί και σε δεξαμενές χωρητικότητας 400 τόνων, όπου και διατηρείται στους 0°C ή χαμηλότερα, μέχρι και για ένα χρόνο.

Εκτός από παραγωγή συμπυκνώματος, ο χυμός μπορεί να καταλήξει ως φυσικός χυμός (NFC, not from concentrate) (Σχήμα 2). Αυτός προέρχεται από τον χυμό που προκύπτει απευθείας από τους καρπούς και όχι από την επανασύσταση συμπυκνωμένου χυμού. Κατ' επέκταση, η μόνη θερμική επεξεργασία που υφίσταται αυτό το είδος χυμού είναι η παστερίωση. Φυσικά, τα προηγούμενα στάδια που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, απαέρωση και απελαίωση εφαρμόζονται ως μέρος κανόνων ορθής μεταποιητικής πρακτικής. Ο NFC χυμός μπορεί να διατηρηθεί αποθηκευμένος μέχρι ένα έτος, είτε κατεψυγμένος ή υπό ασηπτικές συνθήκες.

1.4.3. Παστερίωση - περιγραφή και στόχοι

Η παστερίωση είναι σχετικά ήπια θερμική επεξεργασία συνήθως κάτω από τους 100°C. Με την παστερίωση καταστρέφονται όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί π.χ. *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Salmonella*, *Listeria*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 και ορισμένα ένζυμα. Δεν καταστρέφονται όμως εντελώς οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, τα σπόρια και τα ένζυμα με αποτέλεσμα τα παστεριωμένα προϊόντα να αλλοιώνονται σε μικρό σχετικά χρονικό διάστημα ακόμη και αν εφαρμοστεί και άλλο μέτρο συντήρησης, όπως η ψύξη (Γιαννιώτης, 2013). Έτσι για παράδειγμα, ενώ το φρέσκο γάλα διατηρείται στο ψυγείο για περίπου 3-5 ημέρες, σε θερμοκρασία δωματίου διατηρείται μόνο για 1-2 ημέρες.

Η τεχνολογία της παστερίωσης έχει αποκτήσει ένα ανανεωμένο ενδιαφέρον στην τεχνολογία επεξεργασίας των εσπεριδοειδών, λόγω του συνεχούς αυξανόμενου κατελιημμένου μεριδίου στην αγορά των NFC χυμών. Αυτού του είδους οι χυμοί προτιμούνται συγκριτικά με τους ανασυσταμένους που προέρχονται από συμπύκνωμα λόγω της καταναλωτικής αντίληψης των υποβαθμισμένων, από την

εκτεταμένη θερμική επεξεργασία, ποιοτικών χαρακτηριστικών. Οι χυμοί των εσπεριδοειδών παστεριώνονται έτσι ώστε να απενεργοποιηθούν τα πηκτινολυτικά ένζυμα και οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί και κατ' επέκταση να ενισχυθεί η αποθηκευτική δυνατότητα. Ο σχεδιασμός της παστερίωσης του χυμού πορτοκαλιού βασίζεται στις παραμέτρους απενεργοποίησης της θερμοσταθερής ισομορφής της πηκτινομεθυλεστεράσης, η οποία είναι πιο ανθεκτική στη θέρμανση από τους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται σε φυτικά προϊόντα (Chen and Wu, 1998). Από τη μικροβιολογική σκοπιά της ασφάλειας, το όξινο περιβάλλον των χυμών σε συνδυασμό με προσεκτική παστερίωση δεν αφήνουν περιθώρια ανάπτυξης παθογόνων σε συνθήκες αποθήκευσης δωματίου (Silva and Gibbs, 2004).

Η διατήρηση της ποιότητας των χυμών που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου επιτυγχάνεται με το συνδυασμό θερμικής επεξεργασίας και χαμηλού pH. Η υψηλή οξύτητα ($\text{pH} \leq 4,5$) περιορίζει τους τύπους των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν. Παρ' όλα αυτά, κάποιοι έχουν εντοπισθεί και απομονωθεί σε χυμούς, κυρίως ζύμες, μύκητες και οξυανθεκτικά βακτήρια (McIntyre *et al.*, 1995). Οι μικροοργανισμοί αποτελούν το πιο σημαντικό αίτιο αλλοίωσης των χυμών των εσπεριδοειδών. Λόγω του όξινου περιβάλλοντος του χυμού δεν υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Αντίθετα, ζύμες, μύκητες, γαλακτικά και οξικά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν στο περιβάλλον του χυμού, προκαλώντας αλλοίωση και σχηματίζοντας ενώσεις που προσδίδουν δυσάρεστη γεύση.

Η παρουσία ζυμών στους χυμούς φρούτων μπορεί να προέρχεται από ελλιπή παστερίωση και από αποτυχημένη εφαρμογή πρακτικών υγιεινής. Η μόλυνση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό CO_2 και αιθανόλης. Επίσης κατά τη μόλυνση μπορεί να προκληθεί θόλωμα, κροκίδωση, συσσωμάτωση και σχηματισμός υμενίων. Αρκετά είδη παράγουν πηκτινεστεράσες που αποδομούν την πηκτίνη και επιφέρουν αλλοίωση με το σχηματισμό οργανικών οξέων και ακεταλδεΐδης, τα οποία συνεισφέρουν στο να έχει ο χυμός γεύση ζυμωμένου προϊόντος (ICMSF, 2005· Lawlor *et al.*, 2009). Οι *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces*, και *Rhodotorula* είναι τα γένη που ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την αλλοίωση των χυμών των εσπεριδοειδών. Τα συχνότερα είδη που απαντώνται στους προαναφερθέντες χυμούς είναι οι *Candida parapsilosis*, *C. stellata*, *Rhodotorula sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces sp.* και *Zygosaccharomyces rouxii* (TetraPak, 1998· Arias *et al.*,

2002). Μερικά από αυτά τα είδη είναι ευαίσθητα στην παστερίωση που εφαρμόζεται στους χυμούς (ICMSF, 2005). Η *Saccharomyces* σχετίζεται περισσότερο με την αλλοίωση των παστεριωμένων χυμών. Η *Zygosaccharomyces* είναι μια οσμώφιλη ζύμη και είδη αυτού του γένους μπορούν να επιβιώσουν την υψηλή οσμωτική πίεση και την χαμηλή ενεργότητα νερού των συμπυκνωμένων χυμών (Shaw *et al.*, 1993), και γενικά σχετίζεται με την αλλοίωση των συμπυκνωμάτων (TetraPak, 1998). Η δε παρουσία της *Rhodotorula* πιθανό να είναι ενδεικτική της πενιχρής μεταπαστεριωτικής υγιεινής.

Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν στο χυμό κατά το διάστημα που μεσολαβεί από την κοπή του εσπεριδίου έως την στιγμή συσκευασίας του (Pao & Davis, 2001). Συνήθως προέρχονται από εξωτερικούς παράγοντες, αφού ο καρπός πριν κοπεί είναι απαλλαγμένος από την παρουσία ζυμών. Οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί που διαθέτουν ιδιαίτερη ικανότητα προσαρμογής. Οι διάφορες μέθοδοι συντήρησης οδηγούν στην αδρανοποίηση των ζυμών, κι όχι στην καταστροφή τους, με αποτέλεσμα ζύμες που βρίσκονται στο χυμό να δρουν μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα. Επειδή η βέλτιστη συνθήκη για την ανάπτυξη των ζυμών είναι ένα ελαφρά όξινο περιβάλλον, χυμοί που είναι περισσότερο όξινοι απαιτούν πιο ήπιες συνθήκες επεξεργασίας, π.χ. χαμηλότερη θερμοκρασία παστερίωσης ή προσθήκη λιγότερων συντηρητικών.

Οι μύκητες που απαντώνται στους χυμούς είναι αερόβιοι, μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλό pH και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων. Σε αυτούς του μικροοργανισμούς απαντώνται τόσο ανθεκτικά όσο και ευαίσθητα στελέχη στη θέρμανση (Wareing and Davenport, 2005· Moss, 2008). Τα ανθεκτικά σχηματίζουν μυκηλιακά στρώματα στην επιφάνεια του χυμού, προσκολλώνται στις εσωτερικές ραφές της συσκευασίας, και δίνουν μια μπαγιάτικη γεύση στο προϊόν. Πολλές φορές παρατηρείται και απώλεια θολερότητας λόγω παραγωγής πηκτινεστερασών (ICMSF, 2005· Wareing and Davenport, 2005). Τα κυρίαρχα είδη που έχουν καταγραφεί στους φρουτοχυμούς είναι τα *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Botrytis* sp., και *Aureobasidium pullulans* (Lawlor *et al.*, 2009).

Μύκητες που έχουν απομονωθεί από χυμό πορτοκαλιού περιλαμβάνουν τους *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* sp. και *Penicillium* sp. Αυτοί

μπορούν να αναπτυχθούν στην επιφάνεια του παστεριωμένου χυμού, ιδιαίτερα όταν μέσα στο δοχείο συσκευασίας ο χώρος πάνω από το χυμό, περιέχει αρκετή ποσότητα οξυγόνου που ευνοεί την ανάπτυξή τους. Η παρουσία μυκήτων στους χυμούς οφείλεται κυρίως σε επιμόλυνση μετά την παστερίωση, ενώ είναι πιθανή και η επιβίωση θερμοανθεκτικών στελεχών κατά την παστερίωση (Chen *et al.*, 1993). Γενικά οι μύκητες είναι συνήθως ήσσονος σημασίας για τα επεξεργασμένα προϊόντα από εσπεριδοειδή, εξαιτίας του αργού ρυθμού ανάπτυξής τους, και μολονότι μπορούν να αναπτυχθούν σε όξινα υποστρώματα, απαιτούν άφθονο οξυγόνο και δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στη θέρμανση. Περιπτώσεις μολύνσεων από *Aureobasidium pullulans* και *Penicillium sp.* έχουν συμβεί περιστασιακά (Beuchat, 1982).

Τα πιο σημαντικά βακτήρια αλλοίωσης στους χυμούς εσπεριδοειδών είναι είδη του γένους *Leuconostoc* και *Lactobacillus*. Είδη των *Acetobacter* και *Gluconobacter* έχουν επίσης αναφερθεί ως υπεύθυνα για την αλλοίωση προϊόντων εσπεριδοειδών, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Οι *Lactobacillus* και *Leuconostoc* είναι οι 2 κατηγορίες γαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται συχνότερα από αλλοιωμένα φρούτα και παράγωγά τους (ICMSF, 2005). Απελευθερώνουν μέσα στο χυμό γαλακτικό οξύ, μαζί με μικρότερες ποσότητες οξικού, γλουκονικού, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Κάποια είδη όπως τα *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides*, και *L. dextranicum* γίνονται περισσότερο αντιληπτά, καθώς παράγουν διακετύλιο και ακετοΐνη ως τελικά μεταβολικά προϊόντα, σε αλλοιωμένους χυμούς εσπεριδοειδών, συνεισφέροντας στην παράταιρη γαλακτώδη ή βουτυρώδη γεύση (ICMSF, 2005· Steyn *et al.*, 2011· Lawlor *et al.*, 2009). Τα οξικά βακτήρια ανήκουν σε 3 γένη και πιο συγκεκριμένα τα *Acetobacter*, *Gluconobacter*, and *Gluconacetobacter*. Έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε σχετικά χαμηλό pH και χαμηλά επίπεδα θρεπτικών πηγών. Η δημιουργία ξινή γεύσης που συνήθως ομοιάζει με αυτή του ξυδιού, είναι αποτέλεσμα της παραγωγής οξικού οξέος από αυτό τον τύπο βακτηρίων (ICMSF, 2005· Worbo and Spistosser, 2004).

Από τα πάνω από 20 διαφορετικά είδη *Alicyclobacillus* που έχουν απομονωθεί από διαφορετικές πηγές, κάποια όπως τα *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *A. hesperidium*, *A. acidophilus*, *A. cyclohapanicus*, *A. fastidious* και *A. pomorum* εμπλέκονται σε συμβάντα αλλοιώσεων προϊόντων φρούτων και λαχανικών υψηλής οξύτητας (Goto *et al.*, 2007). Ο *Alicyclobacillus acidoterrestris* έχει αναδυθεί ως ένα

νέο αλλοιογόνο βακτήριο για τους εμπορικούς χυμούς, όπου μπορεί να επιβιώσει της παστερίωσης των 2 λεπτών στους 95°C και προκαλεί υποβάθμιση των προϊόντων με το σχηματισμό γουαϊακόλης και αλογονοφαινολικών (Steyn *et al.*, 2011· Witthuhn *et al.*, 2007). Η μόλυνση του *Alicyclobacillus* στους χυμούς φρούτων προκύπτει από πηγές όπως το χώμα, το νερό και οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας (Smit *et al.*, 2011). Η υποβάθμιση των χυμών από τον *Alicyclobacillus* είναι δύσκολο να ανιχνευθεί λόγω του ότι το βακτήριο δεν προξενεί ορατές αλλαγές όπως παραγωγή αερίου και πρώιμο φούσκωμα στις συσκευασίες (Silva and Gibbs, 2004· Durak *et al.*, 2010). Παράγει μια καπνώδη, φαρμακευτική και αντισηπτική οσμή που συνδέεται με τη γουαϊακόλη. Τα ενδοσπόρια του *Alicyclobacillus* έχουν τιμές D που κυμαίνονται στα 16 με 23 λεπτά, στους 90°C, μεγαλύτερες δηλαδή από αυτές που εφαρμόζονται κατά την παστερίωση των φρουτοχυμών στην βιομηχανία (Walker and Phillips, 2008).

Ο χυμός των φρούτων παραδοσιακά παστεριωνόταν στους 63-65°C για σχετικά μεγάλο χρόνο (D'Amico *et al.*, 2006). Αυτή η μέθοδος αντικαταστάθηκε σταδιακά από την παστερίωση σε υψηλή θερμοκρασία για σύντομο χρονικό διάστημα λόγω των ανεπιθύμητων μεταβολών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του χυμού. Η HTST παστερίωση συνήθως ελαχιστοποιεί τις ανεπιθύμητες δράσεις της ποιοτικής υποβάθμισης λόγω πολύ μικρότερης διάρκειας της θερμικής επεξεργασίας. Αυτός ο τύπος θερμικής επεξεργασίας είναι και ο πιο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος για τους φρουτοχυμούς. Για παράδειγμα, ο χυμός πορτοκαλιού θερμαίνεται στους 90 με 95°C για 15 με 30 s (Braddock, 1999) και ο χυμός μήλου στους 77 με 88°C για 25 με 30 s (Moyer and Aitken, 1980).

Η εμπορική παστερίωση σύμφωνα με τους Chen *et al.* (1993) είναι στους 90-95°C για 15-60 s. Οι υψηλές θερμοκρασίες δεν είναι απαραίτητες για τη θανάτωση μικροοργανισμών αλλά επειδή υπάρχουν στο χυμό περισσότερες από μία ανθεκτικές μορφές της PME (Baker and Cameron, 1999). Οι υψηλές θερμοκρασίες όμως επιφέρουν αμαύρωση και αλλοίωση της γεύσης (Chen *et al.*, 1993). Μια θερμική επεξεργασία στους 50-60°C κρίνεται ικανοποιητική για διατήρηση του θολώματος για διάστημα λίγων ημερών. Σύμφωνα με τους Vervoort *et al.* (2011) και τους Yeom *et al.* (2002), η καταστροφή των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και η απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης μπορεί να επιτευχθεί με θερμοκρασίες της τάξης των 90-98°C για 10-60 δευτερόλεπτα.

1.4.4. Θολερότητα χυμού

Οι χυμοί των εσπεριδοειδών συνήθως καταναλώνονται ως θολοί. Το θόλωμα είναι ένα λεπτό εναιώρημα σωματιδίων που δίνει στο χυμό των εσπεριδοειδών τα χαρακτηριστικά της θολερότητας, του χρώματος, τη γεύση, το άρωμα και της υφής (Mizrahi *et al.*, 1970 · Baker and Cameron, 1999). Το θόλωμα αποτελείται από πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, πηκτίνης, ημικυτταρίνης και κυτταρίνης (Sinclair, 1984). Τα σωματίδια του θολώματος είναι μεταξύ 0,4 και 5 μm σε διάμετρο (Klavons *et al.*, 1994) και ένα σταθερό θόλωμα αποτελείται συνήθως από σωματίδια με περίπου 2 μm διάμετρο (Mizrahi *et al.*, 1970). Ποσοτικές αναλύσεις σε θόλωμα χυμού από πορτοκάλι έδειξαν περίπου 52% πρωτεΐνη (Klavons *et al.*, 1991), 4,5% πηκτίνη (Klavons *et al.*, 1994), 25% λιπίδια, 2% ημικυτταρίνη, 1,5% κυτταρίνη, 5,7% άζωτο και 2% τέφρα (Crandall *et al.*, 1983). Η σταθερότητα του θολώματος του χυμού των εσπεριδοειδών σχετίζεται με το μοριακό βάρος της πηκτίνης (Hotchkiss *et al.*, 2002), το βαθμό μεθυλεστεροποίησής της (Hills *et al.*, 1949), και την ενδομοριακή κατανομή των μεθυλεστερομάδων στα μόρια πηκτίνης (Baker, 1979· Joye and Luzio, 2000· Willats *et al.*, 2001· Wicker *et al.*, 2003).

Η πούλπα συνεισφέρει αρκετά στην αδιαφανή εμφάνιση των χυμών. Αυτή αποτελείται κυρίως από διαρρηγμένα κυτταρικά τοιχώματα, τμήματα της σάρκας και ίνες. Τα αιωρούμενα σωματίδια της σχετίζονται στενά με την παρουσία θολώματος. Μια μερική καθίζηση αυτών παρατηρείται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αυτή δεν σχετίζεται με την απώλεια της θολερότητας. Δύο είδη πούλπας υπάρχουν στους χυμούς των εσπεριδοειδών. Η πρώτη ονομάζεται βυθιζόμενη και η δεύτερη επιπλέουσα. Η πρώτη απαρτίζεται από σωματίδια που καταβυθίζονται με το πέρασμα του χρόνου. Αυτή υπάρχει σε όλους τους χυμούς και αποτελεί σημαντικό μέρος του θολώματος. Σε φυσικούς χυμούς (single-strength), το ποσοστό της κυμαίνεται από 5 έως 12%. Η δεύτερη αποτελείται συνήθως από μεγαλύτερα σωματίδια, τα οποία εξέρχονται στην επιφάνεια του χυμού μετά από ανακίνησή του. Αυτό το είδος πούλπας συνήθως προστίθεται σε συμπυκνώματα ή ανασυσταμένους χυμούς, συνήθως σε περιεκτικότητα 5-30 g/L (Ringblom, 2004).

Ο προσδιορισμός της θολερότητας ενός χυμού γίνεται με τη χρήση κατάλληλου εξοπλισμού (θολοσίμετρο) όταν το υπό εξέταση δείγμα βρεθεί μπροστά

σε πηγή φωτός, όπου και μετράται η διαπερατότητα (transmission) και η σκέδαση (backscattering) του φωτός, ανάλογα με την κατάσταση του δείγματος. Έτσι, για παράδειγμα, όταν ένα δείγμα είναι τελείως διαυγές το φως το διαπερνάει εύκολα. Αυτό αντιστοιχεί σε μηδενική σκέδαση και πλήρη διαπερατότητα. Στον αντίποδα, αν ένα δείγμα είναι τελείως αδιαφανές, τότε όλη η ποσότητα του φωτός θα ανακλαστεί και η διαπερατότητα θα είναι μηδενική. Ένας χυμός ο οποίος έχει απολέσει το θόλωμά του, αναμενόμενο είναι να παρουσιάζει σε σημείο κοντά στην επιφάνεια μικρή ανάκλαση και μεγάλη περατότητα λόγω του σαφή σχηματισμού 2 φάσεων (διαφανής άνω φάση, ιζηματογενής κάτω φάση, Εικόνα 3). Το θόλωμα του χυμού θεωρείται οριστικά διαλυμένο ή αποσταθεροποιημένο όταν η περατότητα του φωτός φθάνει ή ξεπερνάει το 36% (Redd *et al.*, 1986). Τέλος, κατά τον Cheng (2002), διαπερατότητα μέχρι 24% θεωρείται επαρκής στην ύπαρξη θολώματος.



Εικόνα. 3. Αποσταθεροποίηση θολώματος και σχηματισμός φάσεων.

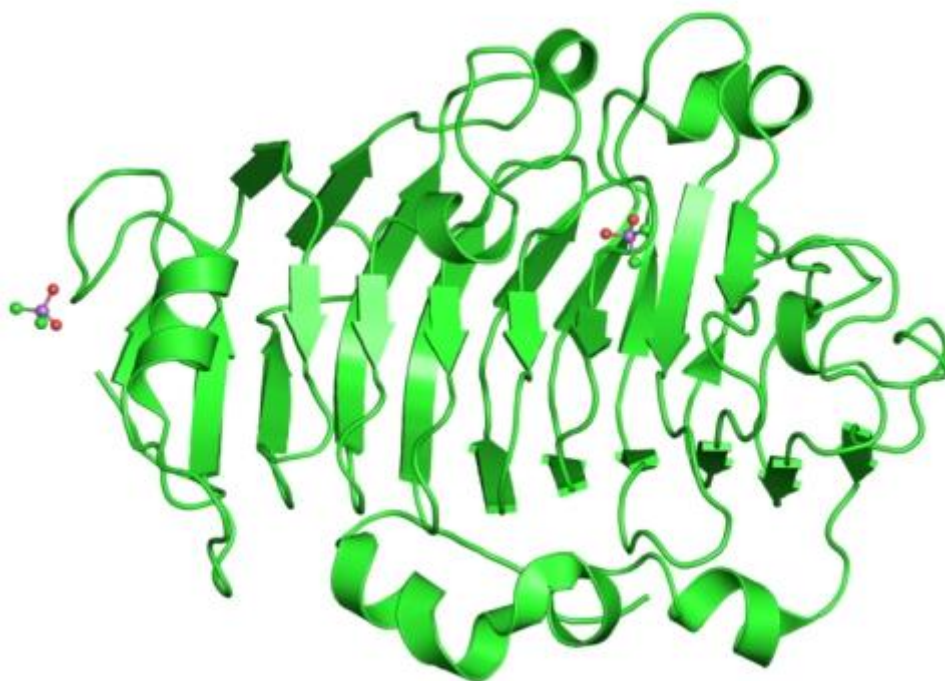
1.5. Πηκτινομεθυλεστεράση

1.5.1. Γενικά – μηχανισμός δράσης

Ο χυμός των εσπεριδοειδών δεν είναι διαυγής, αλλά παρουσιάζει θόλωμα, το οποίο σχετίζεται άμεσα με την ποιότητα και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Το θόλωμα του πορτοκαλοχυμού οφείλεται στα αιωρούμενα σε λεπτό διαμερισμό συστατικά του. Η απώλεια του θολώματος (cloud loss) του χυμού συνδέεται κυρίως με την δράση της πηκτινομεθυλεστεράσης (pectinmethylesterase, PME), η οποία ξεκινά να δρα κατά την εξαγωγή του, και υδρολύει τις μεθυλιωμένες καρβοξυλικές ομάδες του πολυγαλακτουρονικού οξέος των πηκτινών, παράγοντας μεθανόλη και πηκτίνη μικρότερου βαθμού εστεροποίησης (Cameron *et al.*, 1997, 1999· Irwe and Olsson, 1994). Με την παρουσία ιόντων ασβεστίου, η πηκτίνη που παράγεται καθιζάνει υπό τη μορφή αλάτων ασβεστίου των πηκτικών οξέων, έχοντας ως αποτέλεσμα την απώλεια θολότητας του χυμού και την ζελατινοποίηση του συμπυκνώματος. Η απώλεια αυτή του θολώματος επιδρά αρνητικά στην εμφάνιση του χυμού (διαχωρισμός φάσεων), μειώνει το ιξώδες του, αυξάνει την ευαισθησία του στην οξείδωση και τέλος, οδηγεί στην μείωση των γευστικών και αρωματικών συστατικών του χυμού, αφού οι περισσότερες οργανοληπτικές του ιδιότητες (άρωμα, υφή, χρώμα) αποδίδονται ως ένα βαθμό στην ύπαρξη αιωρήματος, συντελώντας έτσι στην ποιοτική υποβάθμιση του χυμού (Owusu-Yaw *et al.*, 1988· Van den Broeck, 2000).

Στην παραγωγή των χυμών η παρουσία των πηκτινολυτικών ενζύμων παίζει σημαντικό ρόλο στα εμπορικά τους ποιότητα. Οι πηκτινάσες καταλύουν την αποικοδόμηση των πηκτικών πολυμερών στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. Ο αποπολυμερισμός των πηκτινών γενικά συνδέεται με τη διαδικασία ωρίμανσης των καρπών (Wong, 1995). Η πηκτινεστεράση (ή πηκτινομεθυλεστεράση) είναι το πιο σημαντικό ένζυμο που σχετίζεται με τα εσπεριδοειδή, και περιέχει περίπου 12 ισοένζυμα που μπορούν να διακριθούν από τους τρόπους γονιδιακής έκφρασης και από τις φυσικές και βιοχημικές τους ιδιότητες (Pilnik and Voragen, 1993· Savary *et al.*, 2002).

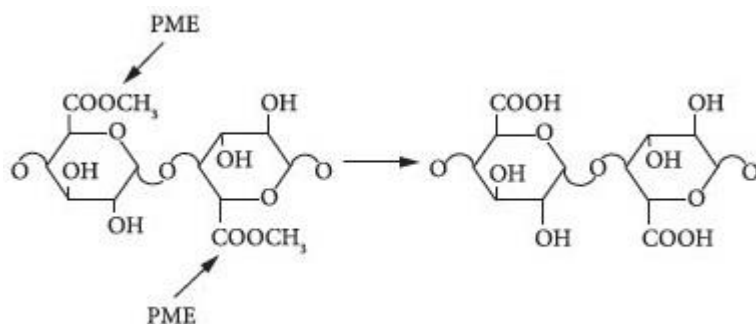
Η πηκτινομεθυλεστεράση συναντάται σε πολλά ανώτερα φυτά ή παράγεται από διάφορους μύκητες και βακτήρια. Η δράση της διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία και το μέρος του φυτού, το στάδιο ωρίμανσης και την εποχή. Η πηκτινομεθυλεστεράση βρίσκεται άφθονη στα εσπεριδοειδή και τις ντομάτες, είναι δεσμευμένη στο κυτταρικό τοίχωμα και εμφανίζεται ως σύμπλοκο με την πηκτίνη μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης. Το ένζυμο έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορες πηγές φρούτων και λαχανικών, συμπεριλαμβανομένων τομάτας (Lee and Macmillan, 1968), πορτοκαλιού (Versteeg *et al.*, 1978), παπάγια (Lourenco and Catutani, 1984· Fayyaz *et al.*, 1994), μήλου (Castaldo *et al.*, 1989), ακτινιδίου (Giovane *et al.*, 1990), πούλπα γκρέιπφρουτ (Seymour *et al.*, 1990) και μανταρινιού (Rillo *et al.*, 1992). Όσον αφορά σε άλλες φυτικές πηγές, εκχυλίστηκε και απομονώθηκε από πατάτα (Puri *et al.*, 1982) και από τους σπόρους του αναρριχώμενου φίκου (*Ficus pumila var. awkeotsang*) (Komae and Misaki, 1989· Komae *et al.*, 1990). Η πηκτινομεθυλεστεράση μικροβιακής προέλευσης βρίσκεται συχνά μαζί με πολυγαλακτουρονάση, γεγονός που κάνει δύσκολο τον διαχωρισμό της (McMillan and Sheman, 1974).



Εικόνα. 4. Τρισδιάστατη δομή φυτικής πηκτινομεθυλεστεράσης (PDBE).

Από μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη δομή της πηκτινομεθυλεστεράσης, έχειδειχθεί ότι το ένζυμο σχηματίζεται από ένα μονό, μικρής μοριακής μάζας πολυπεπίδιο, που μπορεί να παρουσιάζει κάποιο βαθμό γλυκοζυλίωσης ανάλογα με το φυτό απ' όπου προέρχεται (Εικόνα 4). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη β-έλικας, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία παράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών (Johansson *et al.*, 2002· Micheli, 2001).

Η πηκτινομεθυλεστεράση καταλύει την υδρόλυση των μεθυλεστερικών ομάδων της πηκτίνης, προκαλώντας το σχηματισμό αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλικών ομάδων και απελευθερώνοντας ιόντα H^+ και μεθανόλη (Σχήμα 3). Η δράση της PME μετατρέπει την υψηλού βαθμού εστεροποίησης πηκτίνη σε πηκτίνη χαμηλού βαθμού εστεροποίησης. Μόλις ένα κρίσιμο σημείο αποεστεροποίησης επιτευχθεί, δυσθενή κατιόντα, όπως ασβέστιο, μπορούν να συνδέσουν τα ελεύθερα οξέα γειτονικών μορίων, σχηματίζοντας αδιάλυτες πηκτικές ενώσεις ασβεστίου. Αυτές οι διασταυρούμενοι δεσμοί αυξάνουν το μοριακό βάρος της πηκτίνης και μειώνουν τη διαλυτότητά της, οδηγώντας έτσι σε κροκίδωση.



Σχήμα 3. Απομεθυλίωση πηκτίνης από την πηκτινεστεράση (Jayani *et al.*, 2005).

1.5.2. Δραστηκότητα πηκτινομεθυλεστεράσης

Η μονάδα δραστηκότητας της PME (PMEu ή Units) ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol καρβοξυλίων σε 1 mL διαλύματος για ένα λεπτό, και γενικά μετράται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που είχαν προτείνει οι Rouse και Atkins (1954), η οποία βασίζεται στην τιτλοδότηση καρβοξυλομάδων που παράγονται από την αντίδραση της PME κατά την υδρόλυση διαλύματος πηκτίνης

1% που περιέχει 0.1 M NaCl. Οι Rouse και Atkins (1954) ανέφεραν ενεργότητα PME σε χυμό λεμονιού ίση με 1,1 PME_U/mL. Σε χυμό πορτοκαλιού Navel που περιείχε 5% πούλπα, οι Ingallinera *et al.* (2005) ανέφεραν δραστικότητα πηκτινομεθυλεστεράσης ίση με 1,3 U/mL και 2-3 φορές υψηλότερη για στις ποικιλίες Moro, Tarocco και Sanguinello, με το ίδιο περιεχόμενο σε πούλπα. Εξ αυτών, ο χυμός της Tarocco έδειξε την υψηλότερη δραστικότητα (2,85 U/mL).

Οι τεχνολογίες εξαγωγής του χυμού επηρεάζουν τη σύνθεση και τη σταθερότητα του θολώματος του. Αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου συσχετίζεται με μεγαλύτερη ποσότητα φλοιού που ενσωματώνεται στο χυμό κατά την διάρκεια της εκχύμωσης (Amstalden and Montgomery, 1994). Οι Cameron *et al.* (1999) έδειξαν ότι η PME που εκχυλίστηκε από φλοιό πορτοκαλιού Valencia αποσταθεροποιεί το θόλωμα ταχύτερα από εκείνες που εξήχθησαν από φρεσκοστυμμένο χυμό. Επιπλέον, η ενεργότητα της PME σε χυμό που προήλθε από έντονες διαδικασίες εκχύμωσης αποσταθεροποιεί το θόλωμα γρηγορότερα από ότι σε ένα χυμό που εξάγεται με μια πιο ήπια διαδικασία. Σύμφωνα με τους Pilnik και Voragen (1993), η δραστικότητα της πηκτινομεθυλεστεράσης αναστέλλεται από υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, έτσι παρατηρείται αναγέννηση σε συμπυκνωμένους χυμούς μετά από ανασύστασή τους.

Η δραστικότητα της PME σε χυμό ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης των καρπών. Οι Amstalden και Montgomery (1994) βρήκαν υψηλότερη PME δραστικότητα σε χυμούς πορτοκαλιού Valencia σε σύγκριση με εκείνους από βραζιλιάνικες ποικιλίες (cv. Natal, Pera, και Pera Rio Coroa). Σε χυμό από πλήρως ωριμασμένους καρπούς, η δραστικότητα της PME στα σαγκουίνια είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή των υπόλοιπων πορτοκαλιών, ενώ αυτή σε χυμό γκρέιπφρουτ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη σε πορτοκαλοχυμό (Pilnik and Voragen, 1993).

1.5.3. Θερμική απενεργοποίηση - ισοένζυμα

Κατά την επεξεργασία μπορεί να προκληθεί μετουσίωση και μερική ή ολική αναντρίστρεπτη απενεργοποίηση των πηκτινολυτικών ενζύμων με αποτέλεσμα τη μειωμένη αποικοδόμηση της πηκτίνης. Τα περισσότερα ένζυμα παρουσιάζουν

βέλτιστη ενεργότητα σε θερμοκρασία 30-40°C περίπου, ενώ η μετουσίωσή τους ξεκινά σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 45°C. Κατά τη θερμική απενεργοποίηση τόσο οι μη ομοιοπολικοί όσο και οι ομοιοπολικοί δεσμοί των ενζύμων (σε θερμοκρασίες άνω των 70°C οι δεύτεροι) μεταβάλλονται προκαλώντας αναδιαμόρφωση της πρωτεϊνικής αλυσίδας και χημικές μεταβολές των ενζύμων, αντίστοιχα. Αν η μετουσίωση της πρωτεΐνης επηρεάσει την τρισδιάστατη δομή του ενεργού κέντρου του, τότε μπορεί να προκληθεί απενεργοποίηση του ενζύμου (Indrawati, 2000).

Η θερμική απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης διαφόρων φρούτων και λαχανικών έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών (Ly Nguyen *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c, 2003· Balogh *et al.*, 2004· Polydera *et al.*, 2004· Boulekou *et al.*, 2008· Castro *et al.*, 2006· Crelier *et al.*, 2001· Nienaber and Shellhammer, 2001· Stoforos *et al.*, 2002· Fachin *et al.*, 2002a· Riahi *et al.*, 2003· Guiavarch *et al.*, 2005). Από τη βιβλιογραφία προκύπτει πως ανάλογα με την πηγή προέλευσης και την ύπαρξη ή όχι διαφόρων μορφών του ενζύμου (ισοένζυμα) η PME παρουσιάζει διαφορετική ανθεκτικότητα και συμπεριφορά κατά τη θερμική επεξεργασία.

Σύμφωνα με τους Boulekou *et al.* (2008), οι οποίοι μελέτησαν την κινητική απενεργοποίησης της PME σε πούλπα ροδάκινου κατά τη θερμική επεξεργασία (45-70°C), το ένζυμο από τη συγκεκριμένη πηγή εμφανίστηκε περισσότερο ανθεκτικό στη θερμοκρασία σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ένζυμα που εκχυλίστηκαν από καρότο (Balogh *et al.*, 2004), φράουλα (Ly Nguyen *et al.*, 2002c), grapefruit (Guiavarch *et al.*, 2005) και πιπεριά (Castro *et al.*, 2006) και περισσότερο ευαίσθητη από την PME μπανάνας (Ly Nguyen *et al.*, 2003b). Οι Balogh *et al.* (2004) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην PME καρότου τόσο σε καθαρή μορφή όσο και στο ίδιο το τρόφιμο (χυμός και κομμάτια καρότου). Το πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι για να επιτευχθεί μείωση της ενεργότητας του ενζύμου σε κομμάτια καρότου κατά μία λογαριθμική μονάδα, απαιτήθηκε θερμική επεξεργασία στους 73°C για 18 min, ενώ μόνο 10 min στους 58°C ήταν αρκετά για την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος σε χυμό καρότου ή καθαρή μορφή.

Εκτεταμένες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί, από πολλούς ερευνητές που αφορούν στην ανθεκτικότητα της PME διαφόρων φρούτων και λαχανικών κατά τη

θερμική επεξεργασία. Οι πιο πρόσφατες αναφορές στην κινητική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης της PME συνοψίζονται στον Πίνακα 3. Σύμφωνα με αυτές, αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης της PME. Σε αρκετές περιπτώσεις η απενεργοποίηση της PME περιγράφηκε από κινητική 1^{ης} τάξης. Ωστόσο υπήρχαν και δεδομένα όπου δεν μπορούσαν να ερμηνευθούν και έπρεπε να γίνει χρήση άλλων κινητικών μοντέλων (εκτενής περιγραφή τους πραγματοποιείται παρακάτω).

Έχει διαπιστωθεί η παρουσία ισοενζύμων πηκτινестεράσης σε διάφορα φρούτα και λαχανικά. Ο αριθμός αυτών των ενζύμων εξαρτάται από την πηγή. Για παράδειγμα, στα εσπεριδοειδή έχουν βρεθεί 5-12 διαφορετικά ισοένζυμα. Οι διαφορετικές αυτές μορφές ενζύμου μπορεί να διαφέρουν στη μοριακή μάζα, στο ισοηλεκτρικό σημείο ή στο βαθμό γλυκοζυλίωσης. Ο διαφορετικός βαθμός γλυκοζυλίωσης μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα σχηματισμού συμπλόκου με την πηκτίνη, καθώς και την θερμοσταθερότητα των διαφόρων ενζυματικών μορφών. Τα ισοένζυμα μπορεί επίσης να παρουσιάζουν διαφορετικές κινητικές παραμέτρους, όσον αφορά την δραστηκότητά τους σε χαμηλές τιμές pH, στην ενεργοποίησή τους από κατιόντα, την δέσμευσή τους στα κυτταρικά τοιχώματα, την συγγένεια τους με το πηκτινικό υπόστρωμα κ.α.

Ο έλεγχος της δράσης της πηκτινομεθυλεστεράσης αποτελεί ένα κοινό αντικείμενο μελέτης, αφού επιδρά αρνητικά στην σταθερότητα των πηκτινικών ουσιών σε χυμούς φρούτων και συμπυκνώματα αυτών και τροποποιεί την υφή φρούτων και λαχανικών. Πράγματι, η μερικώς υδρολυμένη πηκτίνη μπορεί εύκολα να διασπαστεί από την πολυγαλακτουρονάση (πηκτινολυτικό ένζυμο που καταλύει την υδρολυτική διάσπαση των α-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών των πηκτινικών οξέων), έχοντας ως αποτέλεσμα την ραγδαία μείωση της συνοχής του φρούτου ή του λαχανικού. Ο έλεγχος της δραστηκότητας της πηκτινестεράσης *in situ* είναι πολύ σημαντικός γενικά για τη βιομηχανία τροφίμων λόγω της επίδρασής της στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Μεταξύ άλλων η ρύθμιση της δράσης της PME συνδέεται με την παραγωγή πηκτινών χαμηλού βαθμού εστεροποίησης από φλοιούς εσπεριδοειδών (Taylor, 1982), με το θόλωμα στους χυμούς αυτών (Nath and Ranganna, 1977), με την επίτευξη υψηλού ιξώδους σε χυμό και πουρέ τομάτας (Nath *et al.*, 1983), με τη βελτίωση της υφής και της σφριγηλότητας ορισμένων μεταποιημένων φρούτων και λαχανικών (Pilnik and Voragen, 1991· Stanley *et al.*,

1995) και με το χρώμα, τη χαλαρότητα και άλλες φυσικοχημικές παραμέτρους στις τηγανητές πατάτες (Chaves *et al.*, 1998· Aguilera-Carbó *et al.*, 1999).

Στα εσπεριδοειδή, και γενικά στα ανώτερα φυτά, οι πηκτινестεράσες απαντώνται σε πολλαπλές ισομορφές. Αυτά τα ισοένζυμα μπορούν να απομονωθούν, προσδιορισθούν και εντοπισθούν με ποικίλες μεθόδους όπως υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε συνδυασμό με Western Blot, χρήση αντισωμάτων κ.α. Οι ισομορφές αυτές μπορούν να δείξουν διαφορές στις κινητικές παραμέτρους τους, στην ενεργότητά τους σε χαμηλό pH, στη συνάφεια σε υποστρώματα πηκτικών ενώσεων, και στην επίδραση τους στη διαδικασία διαύγασης των χυμών. Τρεις διαφορετικές ισομορφές πηκτινестερασών απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από πορτοκάλια Navel (Versteeg *et al.*, 1980), ενώ έξι ισομορφές ταυτοποιήθηκαν σε κύτταρα ιστοκαλλιέργειας από πορτοκάλια Valencia (Cameron *et al.*, 1994). Οι Evans και McHale (1978) είχαν εντοπίσει δύο ισομορφές PME στα Washington Navel πορτοκάλια: μία εντοπίστηκε σχεδόν αποκλειστικά στην φλούδα, ενώ η άλλη βρέθηκε σε τμήματα που καλύπτουν τους ασκούς που περιέχουν το χυμό. Επτά ισοένζυμα απομονώθηκαν από εμπορική πηκτινестεράση που είχε εξαχθεί από φλοιό πορτοκαλιού Valencia (Hang *et al.*, 2000). Οι Cameron και Grohmann (1995) απομόνωσαν και χαρακτήρισαν τρεις ισομορφές PME σε πούλπα από κόκκινο γκρέιπφρουτ, ενώ δύο ισομορφές προσδιορίστηκαν από την πούλπα του γκρέιπφρουτ Marsh White (Seymour *et al.*, 1991). Οι McDonald *et al.* (1993) εντόπισαν επτά κλάσματα με PME δραστηριότητα στο λεμόνι και απομόνωσαν δύο κύριες πηκτινестεράσες: μία που βρισκόταν αποκλειστικά στο φλοιό και μία στο ενδοκάρπιο. Όσον αφορά τα άλλα είδη εσπεριδοειδών, τρεις ισοένζυμα προσδιορίστηκαν στο περγαμότο (Laratta *et al.*, 2008), ενώ δύο μορφές PME βρέθηκαν σε limes της δυτικής Ινδίας (Evans and McHale, 1978).

Πίνακας 3. Κινητικές παράμετροι της θερμικής απενεργοποίησης της PME προερχόμενης από διάφορα φρούτα και λαχανικά.

Πηγή	Σύστημα	Κινητικό μοντέλο	T (°C)	Τιμές z/Ea	Βιβλιογραφική Αναφορά
Μήλο	Citrate phosphate	1ης τάξης	45-55	z = 9.2°C	Denes et al., 2000
	pH 4.0				
Μπανάνα	Tris buffer	1ης τάξης	65-72.5	Ea = 379 kJ/mol z = 5.89°C	Ly Nguyen et al., 2002a
Καρότο	Tris buffer	Μερικής μετατροπής	48-60	Ea = 289 kJ/mol	Ly Nguyen et al., 2002b
	κομμάτια	1ης τάξης	66-74	z = 4.13°C	
Καρότο	Χυμός	1ης τάξης	50-60	z = 5.73°C	Balogh et al., 2004
	pH 6				
	Citrate	1ης τάξης	50-60	$z_{pH=5.5} = 6.05^{\circ}C$ $z_{pH=6.0} = 5.37^{\circ}C$	
Πορτοκάλι	Χυμός πορτοκάλι	Μερικής μετατροπής	50-80	Ea = 104 kJ/mol	Polydera et al., 2004
Ροδάκινο	Χυμός	1ης τάξης	45-70	Ea = 289 kJ/mol	Boulekou et al., 2008
Grapefruit	Tris buffer	Μερικής μετατροπής	56-62	Ea = 329 kJ/mol	Guiavarc'h et al., 2005
Πιπερία	Citrate buffer	Διφασικό	56-64	Ea _L = 372 kJ/mol	Castro et al., 2006
Φράουλα	Tris HCl	Μερικής μετατροπής	54-63	Ea = 206.7 kJ/mol	Ly Nguyen et al., 2002c
Χυμός πορτοκάλι-γάλα	Citrate	Διφασικό	65-80	Ea _L =532603kJ/mol Ea _S =605955kJ/mol	Sampedro et al., 2008
	pH 3.2-4.2				

Τα δεδομένα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι κάποιες ισομορφές της PME παρουσιάζουν σημαντική αντίσταση στη θερμική μεταχείριση. Αυτές οι θερμοσταθερές ισομορφές, έχουν ιδιαίτερη σημασία στην τεχνολογία επεξεργασίας των εσπεριδοειδών για τη σταθεροποίηση του χυμού και των διάφορων παραγώγων. Ωστόσο, διαφορετικά πρότυπα έχουν εφαρμοστεί ώστε να υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ θερμοασταθών και θερμοσταθερών ισομορφών της PME. Οι Cameron και Grohmann (1996) καθόρισαν επεξεργασία στους 80°C για 2 λεπτά για

την απενεργοποίηση της θερμοευαίσθητων ισοενζύμων, ενώ οι Snir *et al.* (1996), καθιέρωσαν μια θερμική επεξεργασία των 70°C για 5 min για τη διάκριση μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών μορφών. Οι Hang *et al.* (2000) έχουν αναφέρει επεξεργασία στους 90°C για 1 min για τον διαχωρισμό των 2 ισομορφών.

Το ποσοστό της ενεργότητας των ανθεκτικών ισοενζύμων που συνεισφέρει στο συνολικό ποσοστό ενεργότητας της PME, είναι περίπου 10% στο χυμό πορτοκαλιού Valencia και περίπου 5% σε χυμό πορτοκαλιού Navel (Carbonell *et al.*, 2006· Cameron and Grohmann, 1996). Σε κόκκινο και λευκό γκρέιπφρουτ, το ποσοστό ενεργότητας των θερμοανθεκτικών ισομορφών της συνολικής δραστηριότητας της PME, κυμαίνεται μεταξύ 5,7 και 12,4%, ανάλογα σχετικά με την περίοδο ωρίμανσης των καρπών (Snir *et al.*, 1996).

Για χυμό από ισραηλινό πορτοκάλι, οι Rothschild *et al.* (1975) έδειξαν πως πλήρη απενεργοποίηση της PME, επέρχεται μετά από 45 s θερμικής επεξεργασίας στους 90°C, ενώ οι Sadler *et al.* (1992) μέτρησαν υπολειμματική δραστηριότητα πηκτινестεράσης ίση με 0,01% μετά από επεξεργασία στους 90°C για ένα λεπτό. Η ίδια διεργασία, επέφερε πλήρη απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης σε χυμό πορτοκαλιού Pera-Rio (do Amaral, 2005).

Δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε θερμικά σταθερές μορφές της PME που προήλθαν από Valencia πορτοκάλια έδειξαν ότι μετά από θέρμανση για 60 s στους 90°C το ένζυμο διατήρησε 55% της δραστηριότητας του και μια μικρή υπολειμματική δραστηριότητα παρέμεινε, ακόμα και μετά από 90 s. Μια επεξεργασία για 2 λεπτά σε αυτή τη θερμοκρασία κρίθηκε απαραίτητη για την πλήρη απενεργοποίηση του ενζύμου (Cameron and Grohmann, 1996). Τρία από τα επτά ισοένζυμα της PME που ταυτοποιήθηκαν από τους Hang *et al.* (2000) σε φλοιό του Valencia ήταν θερμοάντοχα και, μεταξύ αυτών, το πιο ανθεκτικό αδρανοποιήθηκε κατά 93% μετά από θερμική επεξεργασία στους 90°C για 1 min. Σε χυμό πορτοκαλιού Tarocco, 3 λεπτά θέρμανσης στους 85°C, μείωσε την δραστηριότητα της PME σε λιγότερο από 10% της αρχικής (Ingallinera *et al.*, 2005). Για χυμό μανταρινιού, η θέρμανση στους 91°C για 20 s μείωσε τη δραστηριότητα σε 0,05% της αρχικής (Carbonell *et al.*, 2006), ενώ οι Rillo *et al.* (1992) πέτυχαν πλήρη απενεργοποίηση της απομονωμένης PME μετά θερμική επεξεργασία στους 90°C για 1 λεπτό. Μία θερμοσταθερή PME που εξάχθηκε από πούλπα γκρέιπφρουτ παρουσίασε υψηλή ανθεκτικότητα, διατηρώντας

66,7% υπολειμματική ενεργότητα μετά από 2 λεπτά θέρμανσης σε υδατόλουτρο στους 80°C και 45,2% υπολειπόμενη ενεργότητα της μετά από θέρμανση 60 επαναλήψεων στους 95°C (Cameron and Grohmann, 1995). Οι McDonald *et al.* (1993) αναφέρουν πως μια ισομορφή της PME που εξάγεται από ενδοκάρπιο λεμονιού είχε βέλτιστη δραστηριότητα στους 70°C και μια ισομορφή από το φλοιό του λεμονιού είχε βέλτιστη δραστηριότητα στους 60°C. Αμφότερες οι ισομορφές αυτές, δεν παρουσίασαν δραστηριότητα πάνω από 88°C.

1.6. Κινητική απενεργοποίησης ενζύμων

1.6.1. Γενικά-κινητικές παράμετροι

Ο ρυθμός υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων είναι συνάρτηση ενδογενών (π.χ. συγκέντρωση ενεργών συστατικών, pH, a_w κλπ.) και εξωγενών (θερμοκρασία, πίεση, σχετική υγρασία, ακτινοβολία κλπ.) παραμέτρων. Γνώση του ρυθμού ποιοτικής υποβάθμισης ενός προϊόντος επιτρέπει το βέλτιστο σχεδιασμό των διεργασιών επεξεργασίας. Είναι πρακτικά αδύνατο να ποσοτικοποιηθεί η επίδραση της κάθε μιας από τις παραπάνω παραμέτρους στην τελική ποιότητα του προϊόντος. Εφαρμόζοντας τις βασικές αρχές της χημικής κινητικής, ο ρυθμός υποβάθμισης της ποιότητας Q μπορεί να εκφρασθεί σαν συνάρτηση αυτών:

$$\frac{dQ}{dt} = F(C_i, E_j) \quad (1)$$

όπου C_i είναι ενδογενείς παράμετροι και E_j περιβαλλοντικοί παράμετροι.

Ακόμη κι αν ήταν δυνατή η αναλυτική έκφραση του πλήρους συστήματος με βάση μετρούμενες αποκρίσεις όλων των σημαντικών παραμέτρων, η αναλυτική λύση δε θα ήταν εύκολο να επιτευχθεί, ενώ μια αριθμητική λύση δύσκολα θα ήταν χρήσιμη για πρακτικούς σκοπούς. Για τον προσδιορισμό της διατηρησιμότητας ενός τροφίμου,

είναι καταρχήν απαραίτητος ο προσδιορισμός των χημικών και βιολογικών αντιδράσεων που επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου. Στη συνέχεια, καθορίζονται εκείνες οι αντιδράσεις που επιδρούν περισσότερο στον ρυθμό υποβάθμισης της ποιότητας, και θεωρώντας σταθερή την επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων, αναπτύσσεται εξίσωση, η οποία εκφράζει την μεταβολή της συγκέντρωσης των αντιδρώντων συστατικών που σχετίζονται με την ποιότητα του τροφίμου, ως προς το χρόνο (Ταουκίς *et al.*, 1997). Έτσι, η απώλεια της ποιότητας του προϊόντος εκφράζεται συνήθως με βάση την απώλεια κάποια επιθυμητής ποιητικής παραμέτρου A (όπως για παράδειγμα απώλεια θρεπτικού συστατικού) ή την παραγωγή ανεπιθύμητου παράγοντα B (π.χ. ανάπτυξη ανεπιθύμητου μικροβιακού πληθυσμού ή προϊόντος βιολογικής ή χημικής αντίδρασης) ως:

$$r_A = \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A]^n \quad (2)$$

όπου A είναι μια μετρήσιμη χημική, φυσική, βιολογική ή οργανοληπτική παράμετρος, χαρακτηριστική για το υπό εξέταση προϊόν, k η σταθερά ρυθμού αντίδρασης και n η φαινόμενη τάξη αντίδρασης.

Η συνήθης πρακτική για την περιγραφή της επίδρασης ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων στη συνάρτηση ποιότητας είναι η ενσωμάτωση αυτή τη επίδρασης στη σταθερά k. Η θερμοκρασία είναι ο πλέον μελετηθείς εξωγενής παράγοντας. Η σχέση του Arrhenius χρησιμοποιείται ευρύτατα για να εκφράσει την επίδραση της θερμοκρασίας T(K), στη σταθερά ρυθμού αντίδρασης k. Χρησιμοποιώντας μια σταθερή θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (K), η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά k σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius μπορεί να γραφεί ως:

$$k_T = k_{T_{ref}} \cdot e^{-\frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} \quad (3)$$

όπου E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης της ποιοτικής υποβάθμισης (J/mol) και R η παγκόσμια σταθερά αερίων ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mole}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) (Lund, 1975).

Στην επεξεργασία τροφίμων είναι σύνηθες οι αντιδράσεις πρώτης τάξης να χαρακτηρίζονται από τις τιμές D και z (αρχή του θερμικού θανάτου). Στην περίπτωση των ενζύμων, ως χρόνος υποδεκαπλασιασμού (D-value) ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση της ενεργότητας τους κατά 90% σε σχέση με την αρχική ενεργότητα, σε δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας. Η σχέση μεταξύ του χρόνου D και της πιο γενικής σταθεράς του ρυθμούς απενεργοποίησης k δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \quad (4)$$

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση του D δίνεται από την τιμή z (εξ. 2.4). Η τιμή z ισοδυναμεί με την αύξηση της θερμοκρασίας που απαιτείται ώστε να επιτευχθεί δεκαδική μείωση του χρόνου D .

$$D_T = D_{T_{ref}} \cdot 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}} \quad (5)$$

Όπου, D_T ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού σε θερμοκρασία T και $D_{T_{ref}}$ ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού σε σταθερή θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} (Bigelow, 1921).

1.6.2. Κινητικό μοντέλο νιοστής τάξης

Γενικά η μείωση της ενζυμικής ενεργότητας A , ως συνάρτηση του χρόνου επεξεργασίας t , μπορεί να εκφραστεί από νιοστής τάξης κινητικό μοντέλο:

$$\frac{dA}{dt} = -k \cdot A^n \quad (6)$$

όπου k είναι η σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης και ο εκθέτης n αναπαριστά την τάξη της αντίδρασης. Για σταθερούς εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες η ολοκλήρωση της Εξίσωσης 6 μεταξύ των αρχικών και τελικών συνθηκών οδηγεί στην ακόλουθη έκφραση της ενζυμικής ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου:

$$A^{1-n} = A_0^{1-n} + (n - 1) \cdot k \cdot t \quad (7)$$

όπου A_0 είναι η αρχική ενεργότητα του ενζύμου (στο χρόνο μηδέν της διεργασίας). Το κινητικό μοντέλο νιοστής τάξης βρίσκει συχνά εφαρμογή σε περιπτώσεις όπου λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις μετατροπής ενζύμων από τη φυσική τους δομή σε μετουσιωμένη κατάσταση.

1.6.3. Κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης

Το γενικό νιοστής τάξης κινητικό μοντέλο μπορεί να απλοποιηθεί στην περίπτωση αντιδράσεων πρώτης τάξης (όταν $n=1$). Σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και πίεσης η μείωση της ενζυμικής ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$A = A_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (8)$$

όπου A είναι η ενεργότητα του ενζύμου σε χρόνο t , A_0 είναι η αρχική ενζυμική ενεργότητα, t είναι ο χρόνος επεξεργασίας και k η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης.

1.6.4. Κινητικό μοντέλο μερικής μετατροπής

Το μοντέλο μερικής μετατροπής αποτελεί μια ειδική περίπτωση του μοντέλου 1^{ης} τάξης. Το μοντέλο αυτό λαμβάνει υπόψη μια μη μηδενική εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα μετά από παρατεταμένη επεξεργασία και περιγράφεται από την Εξίσωση 9 (Van den Broeck et al., 1999a, 1999b).

$$A = A_f + (A_0 - A_f) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (9)$$

Όπου, A_f είναι η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζύμου μετά από παρατεταμένη επεξεργασία. Η τιμή της ενεργότητας αυτής ενδέχεται να εξαρτάται ή όχι από τις συνθήκες επεξεργασίας.

1.6.5. Διφασικό κινητικό μοντέλο

Ένζυμα τα οποία χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη δύο ισοενζύμων όπως για παράδειγμα η PME πορτοκαλιού (Versteeg *et al.*, 1980) μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο κλάσματα, το ένα περισσότερο ανθεκτικό από το άλλο. Θεωρώντας σταθερούς τους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες και υποθέτοντας ότι η απενεργοποίηση των δύο κλασμάτων του ενζύμου είναι πρώτης τάξης και ανεξάρτητη η μία από την άλλη, η απενεργοποίηση μπορεί να εκφραστεί από την Εξίσωση 10 (Chen and Wu, 1998· Van den Broeck *et al.*, 2000).

$$A = A_0 \cdot [\alpha \cdot e^{-k_s \cdot t} + (1 - \alpha) \cdot e^{-k_l \cdot t}] \quad (10)$$

Όπου α είναι το ποσοστό συνεισφοράς του ανθεκτικού ισοενζύμου στη συνολική ενεργότητα του ενζύμου, $(1-\alpha)$ είναι το αντίστοιχο ποσοστό του ευαίσθητου ενζύμου, και k_s και k_l οι σταθερές απενεργοποίησης της σταθερής και της ευαίσθητης ισομορφής του ενζύμου, αντίστοιχα.

1.6.6. Μοντέλο Weibull

Πρόκειται για μοντέλο (Peleg and Cole, 1998) που μπορεί να ερμηνεύσει ικανοποιητικά δεδομένα θανάτωσης μικροοργανισμών (Van Boekel, 2002) ή απενεργοποίησης ενζύμων (Lemos *et al.*, 1999· Elez-Martinez *et al.*, 2006) συναρτήσει του χρόνου, όταν δεν ακολουθούν γραμμική λογαριθμική εξίσωση στο σχετικό γράφημα (δεδομένα ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου):

$$\ln(A/A_0) = -\left(\frac{t}{a}\right)^\beta \quad (11)$$

όπου A η ενεργότητα του ενζύμου μετά από χρόνο t , A_0 η αρχική ενεργότητα, a είναι παράμετρος μεγέθους με μονάδες χρόνου (κατ' αντιστοιχία της τιμής D) και β είναι αδιάστατη παράμετρος που σχετίζεται με το σχήμα της καμπύλης απενεργοποίησης. Σε περιπτώσεις που το β είναι ίσο με 1, το Weibull μετατρέπεται στο μοντέλο 1^{ης} τάξης.

1.6.7. Κινητικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της PME σε διάφορους χυμούς εσπεριδοειδών

Τα διάφορα κινητικά μοντέλα περιγράφουν μαθηματικά την εξέλιξη μιας διεργασίας κατά το πέρασμα του χρόνου και στοχεύουν στην εξεύρεση ικανοποιητικών παραμέτρων με τις οποίες στη συνέχεια θα μπορεί να εκτιμηθεί η εξάρτηση του ρυθμού αντίδρασης από τη θερμοκρασία. Αυτά τα μοντέλα παρέχουν μηχανικά εργαλεία για την εκτίμηση, το σχεδιασμό και τη βελτιστοποίηση των θερμικών διεργασιών που χρησιμοποιούνται για τη βιοχημική και μικροβιακή σταθεροποίηση των προϊόντων. Γενικά, θεωρείται πως η θερμική απενεργοποίηση της PME σε χυμούς από εσπεριδοειδή μπορεί να περιγραφεί από ενός πρώτης τάξης μοντέλο (log-linear). Στη βιβλιογραφία όμως, έχουν καταγραφεί πολλά δεδομένα που δείχνουν την παρουσία αρκετών ισομορφών του ενζύμου στους συγκεκριμένους χυμούς, με διαφορετική θερμοανθεκτικότητα η καθεμιά. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην περίπτωση 2 ισοενζύμων η περιγραφή της απενεργοποίησης τους γίνεται με μια

τροποποιημένη έκφραση του μοντέλου πρώτης τάξης (διφασικό). Αμφότερα αυτά τα μοντέλα βρίσκουν εφαρμογή στη μελέτη της θερμική αντοχής της πηκτινομεθυλεστεράσης των χυμών των εσπεριδοειδών, με σκοπό τον υπολογισμό του χρόνου θερμικής αδρανοποίησης (D) και την εξάρτησή του από την θερμοκρασία (z), καθώς η γνώση αυτών των τιμών ορίζει απολύτως τη θερμική συμπεριφορά του υπό εξέταση ενζύμου.

Ο Πίνακας 4 δείχνει κάποιες τιμές D και z της απενεργοποίησης της πηκτινεστεράσης σε χυμούς εσπεριδοειδών. Μερικές από τις έρευνες που διεξήχθησαν αφορούν σε χυμούς ενώ κάποιες άλλες σε απομονωμένες ισομορφές του ενζύμου. Οι Versteeg *et al.* (1980) αναφέρουν μια τιμή D_{90} ίση με 1 min, για την αδρανοποίηση της PME σε χυμό πορτοκαλιού Navel. Αυτή έρχεται σε συμφωνία με της συνθήκες που είχαν τεθεί στην διεργασία που πρότειναν οι Eagerman και Rouse (1976). Οι τελευταίοι είχαν αναφέρει τιμή D_{90} ίση με 1 min και τιμές z μεταξύ 4,9 and 6,8°C για χυμό πορτοκαλιού των ποικιλιών Valencia, Hamlin, και Pineapple. Για χυμό από grapefruit το D στους 85,6°C βρέθηκε 1 min και το z ίσο με 5,5°C (Eagerman and Rouse, 1976). Η θερμική σταθερότητα της PME επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου και του περιεχόμενου του χυμού σε διαλυτά στερεά. Στην ίδια θερμοκρασία επεξεργασίας, υψηλότερες τιμές D παρατηρήθηκαν όταν η συγκέντρωση σε διαλυτά στερεά αυξανόταν στις διαφορετικές μετρήσεις (Marshall *et al.*, 1985).

Για μια αξιόπιστη εκτίμηση του z , πειράματα πρέπει να πραγματοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών. Για χυμό από κόκκινα πορτοκάλια Sanguinello, οι De Sio *et al.* (2001) ανέφεραν τιμή 9,2°C για το z στο θερμοκρασιακό εύρος 75–85°C. Όμως, λόγω της παρουσίας θερμοανθεκτικών ισομορφών της PME, οι συγγραφείς βρήκαν το $z = 16,4^\circ\text{C}$ για το εύρος 85–95°C.

Πίνακας 4. Κινητικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης.

Source	D_T (s)	z (°C)	Notes	References
Orange juice	$D_{55} = 295$ $D_{60} = 153$ $D_{65} = 79$ $D_{70} = 37$	17.5		Tajchakavit and Ramaswamy (1997 a, b)
Orange juice cv. Valencia	$D_{80} = 20$ $D_{90} = 11.3$	—		Kim et al. (1999)
Orange juice cv. Valencia	$D_{88.3} = 108$ $D_{90} = 60$	6.8		Eagerman and Rouse (1976)
Orange juice cv. Hamlin	$D_{87.8} = 60$	4.9		
Orange juice cv. Pineapple	$D_{87.8} = 60$	5.1		
Grapefruit juice cv. Duncan	$D_{85.68} = 60$	5.5		
Thermolabile PME fraction from orange juice cv. Valencia	$D_{75} = 204.8$ $D_{80} = 70.4$ $D_{85} = 22.1$ $D_{90} = 6.3$	9.5		Lee et al. (2003)
Thermostable PME fraction from orange juice cv. Valencia	$D_{75} = 14438$ $D_{80} = 1809$ $D_{85} = 270$ $D_{90} = 33$	5.7		
Thermolabile PME fraction	$D_{90} = 6.5$	17.6		Chen and Wu (1998)
Thermostable PME fraction	$D_{90} = 329$	11		
Thermolabile PME fraction from orange pulp cv. Valencia	$D_{60} = 137.88$ $D_{65} = 41.52$ $D_{70} = 15.97$ $D_{80} = 1.89$ $D_{85} = 0.65$ $D_{90} = 0.23$	10.8		Wicker and Temelli (1988)
Thermostable PME fraction from orange pulp cv. Valencia	$D_{60} > 174$ $D_{65} > 174$ $D_{70} > 174$ $D_{80} > 174$ $D_{85} = 173.25$ $D_{90} = 32.36$	6.5		

Πίνακας 4. Κινητικές παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης (συνέχεια).

Source	D_T (s)	z (°C)	Notes	References
Orange juice cv. Navel	$D_{90} = 0.09$	6.5	PME-I isozyme (pH 4.0)	Versteeg (1979)
	$D_{90} = 0.9$	11	PME-II isozyme (pH 4.0)	Versteeg et al. (1980)
	$D_{90} = 23$	6.5	PME-III isozyme (HMW-PME) (pH 4.0)	
Thermostable PME fraction from orange juice cv. Valencia	$D_{75} = 22.7$ $D_{80} = 3.5$ $D_{85} = 0.46$	5.9		Hou et al. (1997)
Concentrate orange juice cv. Valencia + PME added	$D_{90} = 15$	—	10°Brix	Marshall, Marcy, and Braddock (1985)
	$D_{90} = 13$		20°Brix	
	$D_{90} = 14$		30°Brix	
	$D_{90} = 19$		35°Brix	
Blood orange juice cv. Sanguinello	$D_{87.8} = 12.6$	16.4		De Sio et al. (2001)

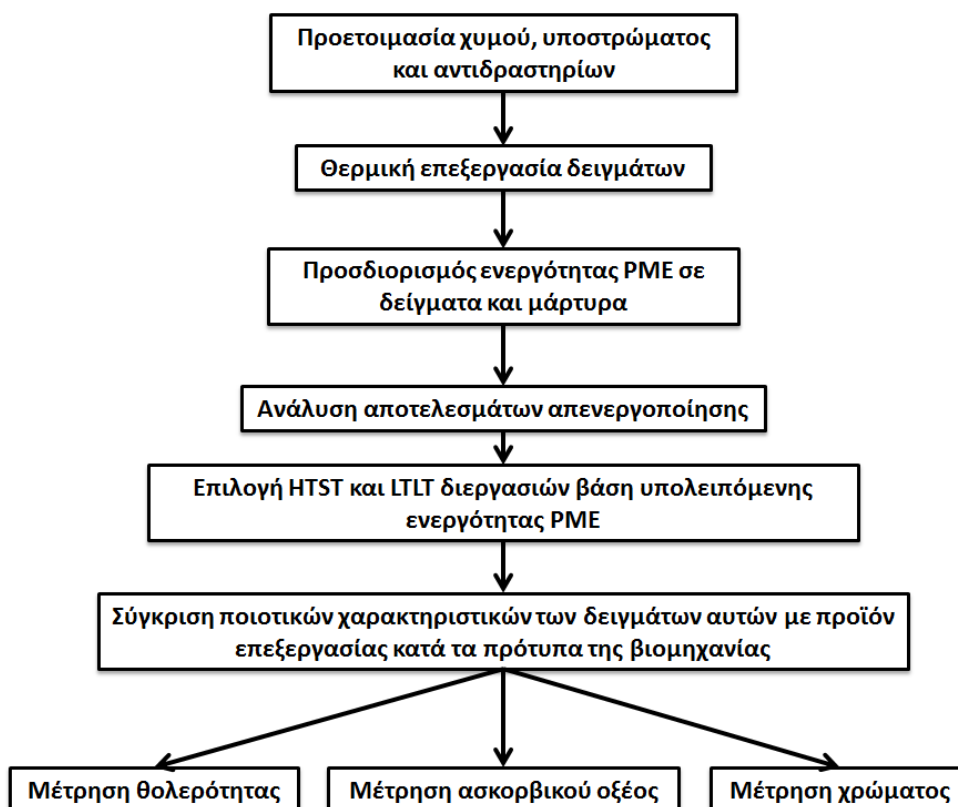
Σε μια επεξεργασία ενός τέτοιου χυμού σε βιομηχανική κλίμακα, η υψηλότερη τιμή z πρέπει να αξιοποιηθεί για την απενεργοποίηση της PME, χωρίς να μας απασχολεί αν το ένζυμο υπάρχει στο χυμό σε μία ή περισσότερες μορφές με ποικίλες θερμικές αντοχές. Οι Pflug και Odlaug (1978) εκτίμησαν ως παράγοντα ασφαλείας, μία 30% αύξηση του D and z που να αντισταθμίζει την αβεβαιότητα της μετάβασης από τα πειραματικά δεδομένα στην πρακτική εφαρμογή. Οι Kim *et al.* (1999), σε πιλοτικής κλίμακας πειράματα, μέτρησαν σε χυμό από πορτοκάλια Valencia την επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών στην απενεργοποίηση της PME. Ο χρόνος επεξεργασίας που απαιτούταν για να επιτευχθεί 90% μείωση της ενεργότητας της PME, βρέθηκε να είναι μεταξύ 33,3 s στους 80°C και 17,9 s στους 90°C. Οι Tribess και Tadini (2006), εφαρμόζοντας το διφασικό μοντέλο, περιέγραψαν την απενεργοποίηση της πηκτινεστεράσης σε χυμό πορτοκαλιού Pera ως συνάρτηση του pH και διάφορων συνδυασμών θερμοκρασίας - χρόνου. Τα δεδομένα τους, έδειξαν πως ο μεγαλύτερος ρυθμός απενεργοποίησης του ενζύμου ήταν στους 85–87,5°C και σε pH 3,6–3,7. Οι Rothschild *et al.* (1975) και οι Holland *et al.* (1976) ανέφεραν πως ο χυμός πορτοκαλιού δύναται να θεωρείται βιοχημικά σταθερός όταν η

υπολειπόμενη ενεργότητα της PME μετά από θερμική επεξεργασία, είναι χαμηλότερη από 10^{-4} PME_u/mL.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, η επιλογή χρόνων και θερμοκρασιών για τη σταθεροποίηση των χυμών από τη βιομηχανία επεξεργασίας εσπεριδοειδών, βρίσκεται στο εύρος των 90–98°C για περίπου 60 s για τους χυμούς πορτοκαλιού και μανταρινιού, στο εύρος των 85–90°C για 30–40 s για τους χυμούς grapefruit, και στο εύρος των 75–85°C για περίπου 30 s για τους χυμούς λεμονιού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πορεία των εργασιών και πρακτικών που ακολουθήθηκαν συνοψίζεται στο σχήμα που ακολουθεί:



Σχήμα 4. Διάγραμμα πορείας πειράματος.

2.1. Απενεργοποίηση πηκτινομεθυλεστεράσης και μέτρηση υπολειπόμενης δραστηριότητας

2.1.1. Προετοιμασία και θερμική επεξεργασία των δειγμάτων

Πρώτες ύλες και αντιδραστήρια

- Μανταρίνια ποικιλίας Encore
- Πηκτίνη μήλων Fluka Analytical, περίπου 75% βαθμού απεστεροποίησης
- Διάλυμα NaOH 0,2N (Fluka) για τη ρύθμιση του pH
- Διάλυμα HCL 0,01N (Carlo Erba Reagents) για τη ρύθμιση του pH
- NaCl (J. T. Baker)
- Απιονισμένο H₂O

Σκεύη και εργαλεία

- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Αυτόματη πιπέτα 100-1000 μ L LABMATE (HTL Lab Solutions)
- Γυάλινο θερμόμετρο
- Parafilm
- Θερμοανθεκτική, αδιάβροχη κόλλα πολυχλωροπρενίου γενικής χρήσης
- Ποτήρια ζέσεως των 100 mL
- Δοχείο ζέσεως των 800 mL
- Κόσκινο οπών 500 μ m

Συσκευές και εξοπλισμός

- Θερμοστοιχείο τύπου K
- Καταγραφικό θερμοκρασίας EL-USB-TC-LCD με δυνατότητα σύνδεσης σε ηλεκτρονικό υπολογιστή
- Υδατόλουτρο
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας, Sartorius B120S
- Οικιακός αποχυμωτής Moulinex
- Η/Υ με εγκατεστημένο το πρόγραμμα EasyLog USB
- Ψηφιακό χρονόμετρο

- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αυτόματος τιτλοδότης, TitroLine 7000 SI Analytics
- Διαθλασίμετρο, ABBE WYA-15

Για κάθε σετ μετρήσεων επαρκούσαν 40-50 mL χυμού, ποσότητα που ήταν εφικτή από την εκχύμωση ενός μανταρινιού. Ο καρπός πλύθηκε και κατόπιν τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια τα οποία τοποθετήθηκαν χωρίς να αφαιρεθεί ο φλοιός (όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, σημαντικό ποσοστό της PME εντοπίζεται στο albedo) εντός του αποχυμωτή, που με την εφαρμογή περιστρεφόμενων λεπίδων και σύνθλιψης, εξήγαγε το χυμό ο οποίος παραλήφθηκε σε ποτήρι ζέσεως. Ίνες, σπέρματα, καθώς και τα στερεά υπολείμματα του φλοιού δεν περνούσαν στο χυμό, λόγω του φίλτρου που διαθέτει ο αποχυμωτής. Στη συνέχεια, ο χυμός πέρασε από κόσκινο με σκοπό να μειωθεί το περιεχόμενο σε πούλπα και αδιάλυτα στερεά. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία αυτή, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των °Brix και του pH με τη βοήθεια διαθλασίμετρου και αυτόματου τιτλοδότη αντίστοιχα, ώστε να υπάρχει μια κοινή βάση αξιολόγησης μεταξύ των διαφορετικών σετ μετρήσεων. Έπειτα, με τη χρήση αυτόματης πιπέτας, γεμίζονταν με χυμό γυάλινες πιπέτες (κλεισμένες με κόλλα στο κάτω στόμιο), περίπου 2 mL δείγμα σε κάθε πιπέτα (μέχρι την χαραγή που φέρουν στο επάνω μέρος τους). Κατόπιν σφραγίζονταν και στο επάνω μέρος με parafilm, αφού προηγουμένως είχε τοποθετηθεί εντός μίας από αυτές, κατάλληλο θερμοστοιχείο συνδεδεμένο με καταγραφικό θερμοκρασίας (το οποίο προσέφερε αμεσότητα και ευκολία στην επίβλεψη της θερμοκρασίας στο εσωτερικό των γυάλινων πιπετών, Εικόνα 5), για την απαραίτητη επίβλεψη και επιβεβαίωση της σταθερότητάς της κατά την επεξεργασία των δειγμάτων.

Μέσα στο υδατόλουτρο τοποθετήθηκε γυάλινο θερμόμετρο ακριβείας για την παρατήρηση της θερμοκρασίας του νερού και για να μην υπάρχουν αποκλίσεις από την θερμοκρασία που είχαμε επιλέξει κάθε φορά. Για κάθε διαφορετική θερμική επεξεργασία, εμβαπτίζονταν ταυτόχρονα 5 γυάλινες πιπέτες μέσα στο υδατόλουτρο (αφότου το νερό είχε ανέλθει στην επιθυμητή κατά περίπτωση θερμοκρασία), με καθεμιά να αντιστοιχεί σε διαφορετικό χρόνο επεξεργασίας. Με τη χρήση χρονομέτρου, καταγράφηκε ο χρόνος από τη στιγμή που η θερμοκρασία στην ένδειξη του καταγραφικού είχε φτάσει αυτή που είχε επιλεγεί, μέχρι και τη στιγμή που το δείγμα με το μεγαλύτερο χρόνο παραμονής έπρεπε να βγει από το υδατόλουτρο και

να τοποθετηθεί σε δοχείο με νερό και θρυμματισμένο πάγο για τάχιση ψύξη. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που επιλέχθηκαν σε κάθε περίπτωση αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί. Για κάθε συνδυασμό χρόνου-θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν 4 μετρήσεις και οι αντίστοιχες μετρήσεις στην ενεργότητα των επεξεργασμένων (και μη) δειγμάτων.



Εικόνα 5. Θέρμανση δειγμάτων χυμού σε υδατόλουτρο.

Πίνακας 5. Συνδυασμοί θερμοκρασιών-χρόνων θερμικής επεξεργασίας

T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
50	2	60	1,5
	9		5
	17		12
	30		20
	60		30
55	2	70	0,083333
	15		0,333333
	30		1
	60		3
	90		5

Εφόσον τα δείγματα είχαν παραμείνει στον πάγο για επαρκή χρόνο, τόσο ώστε η θερμοκρασία τους να έχει κατέλθει στους 25°C τουλάχιστον, εξάγονταν από τις πιπέτες με σπάσιμο των άκρων τους και τοποθετούνταν σε γυάλινα τρυβλία. Τόσο στα επεξεργασμένα δείγματα όσο και σε χυμό που δεν έχει υποστεί επεξεργασία (μάρτυρας) διορθώθηκε το pH στο 7,5 με διάλυμα NaOH 0,2N (και HCL 0,01N σε περίπτωση που κατά τη ρύθμιση υπερβεί το 7,5). Αυτό έγινε πριν προστεθούν στο υπόστρωμα πηκτίνης, έτσι ώστε η μείωση του pH να οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στην ενζυμική αντίδραση της PME και όχι στην όξινη φύση του χυμού.

Τέλος, τα στοιχεία που αποθηκεύονταν στο καταγραφικό της θερμοκρασίας, μεταφέρονταν σε υπολογιστή, και με τη βοήθεια του προγράμματος EasyLog USB μετατρέπονταν σε θερμοκρασιακά προφίλ των δειγμάτων με αναλυτικά χρονικά βήματα (του 1 sec) και τις αντίστοιχες αυξομειώσεις θερμοκρασίας. Αυτά χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο ανάλυσης δεδομένων της απενεργοποίησης της PME, για την διόρθωση των αρχικά επιλεγμένων χρόνων μέσω της τιμής F που δίνει ακριβέστερους χρόνους κατεργασίας.

2.1.2. Μέθοδος μέτρησης ενεργότητας της πηκτινομεθυλεστεράσης

Η μέτρηση που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της δραστηρότητας της PME στο χυμό μανταρινιού είναι μια τροποποίηση της μεθόδου που εισήγαγαν οι Rouse και Atkins (1954). Η μέτρηση της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε με αυτόματο τιτλοδότη (TitroLine 7000, SI Analytics) και στηρίζεται στη μέτρηση παροχής διαλύματος NaOH 0,02N που απαιτείται ώστε να διατηρηθεί σταθερό το pH του χυμού και υποστρώματος πηκτίνης στο 7,5, το οποίο συνεχώς μειώνεται λόγω απελευθέρωσης πηκτινικών οξέων από τη δράση του ενζύμου. Για κάθε μέτρηση απαιτούνται 50 mL διαλύματος πηκτίνης και 2 mL χυμού. Το διάλυμα πηκτίνης το οποίο αποτελεί και το ενζυμικό υπόστρωμα, παρασκευάζεται από 1% w/v πηκτίνη και 0,3M NaCl σε απιονισμένο νερό (ο τελικός όγκος συνήθως ήταν 600 mL). Το υπόστρωμα τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα, όπου παρέμενε για 16-18 ώρες, στους 35-40°C υπό σταθερή και συνεχή ανακίνηση ώστε να διαλυθεί η πηκτίνη. Έπειτα ρυθμίζεται το pH στο 7,5 (Εικόνα 6) με διάλυμα NaOH 0,2N, και HCl 0,01N σε περίπτωση που υπερβεί το επιθυμητό σημείο.



Εικόνα. 6. Μέτρηση και ρύθμιση του pH του ενζυμικού υποστρώματος μέσω του αυτόματου τιτλοδότη.

Συνδυάζοντας το δείγμα και το υπόστρωμα, ο τιτλοδότης διοχετεύει για 10 min διάλυμα NaOH ενώ καταγράφει την ογκομετρική παροχή του διαλύματος κατά την τιτλοδότηση. Στην καταγραφή των δεδομένων, η κατανάλωση του NaOH λαμβάνεται υπόψη μετά την πρώτη πτώση του pH και την επακόλουθη ρύθμιση του στο 7,5, όπου ο ρυθμός κατανάλωσης πλέον παραμένει σταθερός. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας πραγματοποιείται συνεχής ανάδευση στο δοχείο που βρίσκονται υπόστρωμα και δείγμα, και η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 25°C.

Από την ογκομετρική παροχή που λαμβάνεται στο τέλος της μέτρησης ως ένδειξη, είναι δυνατό να υπολογιστεί η δραστητικότητα της PME του χυμού. Ως unit PME ορίζεται εκείνη η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol πηκτινικών οξέων ανά λεπτό. Εξουδετέρωση 1 μmol πηκτινικών οξέων απαιτεί 1 μmol NaOH. Έτσι η παροχή του διαλύματος καυστικού νατρίου εύκολα ανάγεται σε ενεργότητα ενζύμου. Αν Q (mL/min) είναι η παροχή NaOH του τιτλοδότη και το διάλυμα έχει συγκέντρωση 0,02M (20 $\mu\text{mol/mL}$), τότε η δραστητικότητα του ενζύμου στα 2 mL χυμού θα είναι:

$$A\left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{1}{2 mL} \cdot Q\left(\frac{mL}{min}\right) \cdot 20\left(\frac{\mu mol}{mL}\right) \quad (12)$$

Με τη δημιουργία γραφικής παράστασης της κατανάλωσης όγκου του διαλύματος τιτλοδότησης συναρτήσει του χρόνου, προκύπτει η εξίσωση της ευθείας, της οποίας η κλίση αποτελεί την παροχή Q στην παραπάνω εξίσωση.

2.2. Σχεδιασμός διεργασιών και στατιστική επεξεργασία δεδομένων απενεργοποίησης

Με βάση τα δεδομένα της κινητικής απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης, τη χρήση κατάλληλων μαθηματικών εξισώσεων και τη δημιουργία γραφημάτων, προσδιορίστηκε η τάξη απενεργοποίησης του ενζύμου καθώς και οι παράμετροι θερμικής απενεργοποίησης D και z . Εν συνέχεια, από τα δεδομένα χρόνου και θερμοκρασίας που ελήφθησαν από το καταγραφικό θερμοκρασίας, διορθώθηκαν οι αρχικοί χρόνοι που είχαν επιλεγεί ως χρόνοι επεξεργασίας, μέσω της τιμής F :

$$F_{T_{ref}}^z = \int_{t_a}^{t_b} 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} \cdot dt \quad (13)$$

Ακολούθως, οι διορθωμένοι χρόνοι εφαρμόστηκαν σε διάφορα μοντέλα και προέκυψαν οι αντίστοιχες κινητικές παράμετροι οι οποίες εκτιμήθηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση (JMP 8, SAS). Η δυνατότητα περιγραφής των πειραματικών δεδομένων από τα κινητικά μοντέλα που αναπτύχθηκαν, εκτιμήθηκε με στατιστικές παραμέτρους όπως ο συντελεστής συσχέτισης R^2 και το υπολειπόμενο σφάλμα SSE και με τη σύγκριση πειραματικών και προβλεπόμενων από τα αντίστοιχα μοντέλα τιμών.

Για την ακριβέστερη περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση της PME πραγματοποιήθηκε εφαρμογή δευτερογενούς κινητικού μοντέλου, στο οποίο είχε ενσωματωθεί το πρωτογενές που επιλέχθηκε. Ο προσδιορισμός των σταθερών του νέου μοντέλου που προέκυψε, πραγματοποιήθηκε με μη γραμμική παλινδρόμηση (JMP 8, SAS).

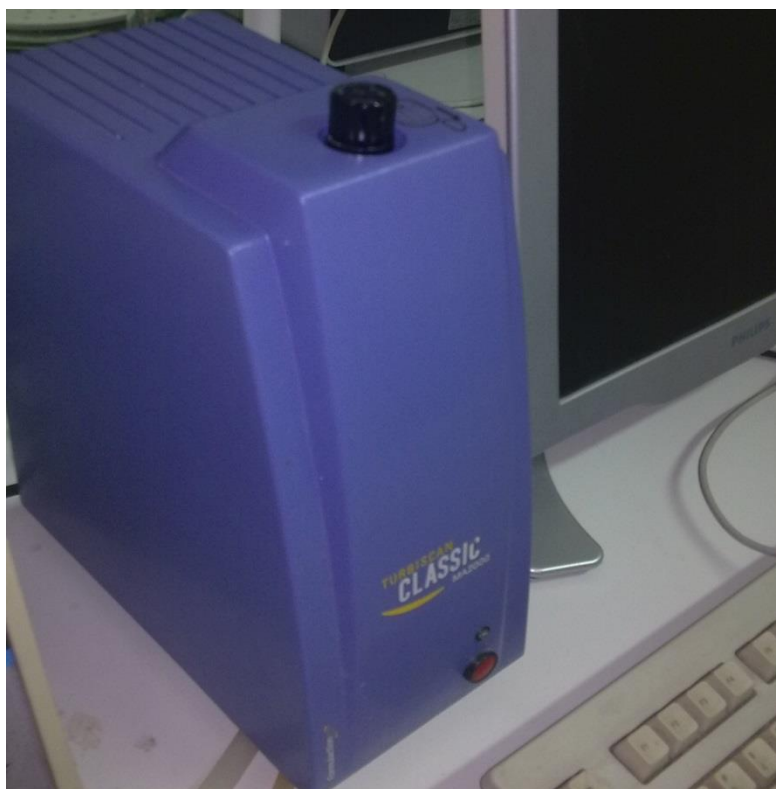
Αφού έγινε η αξιολόγηση του ταιριάσματος των πειραματικών δεδομένων στα μοντέλα που επιλέχθηκαν, έγινε μια πρόβλεψη ισοδύναμων χρόνων επεξεργασίας με τη χρήση κατάλληλων εξισώσεων, για θερμοκρασίες κατεργασίας στις οποίες προέκυπτε προϊόν προς ποιοτική αξιολόγηση και με στόχο συγκεκριμένα ποσοστά απενεργοποίησης της πηκτινестεράσης. Επιλέχθηκε ένα προϊόν παστερίωσης υψηλής θερμοκρασίας και σύντομου χρόνου (High Temperature-Short Time) και ένα προϊόν παστερίωσης χαμηλής θερμοκρασίας και μακρού χρόνου (Low Temperature – Long Time) (περισσότερες λεπτομέρειες στο Κεφάλαιο 3). Σε αυτά, σε μη παστεριωμένο δείγμα, καθώς και σε δείγμα του οποίου οι συνθήκες κατεργασίας ομοιάζουν με εκείνες της βιομηχανικής πρακτικής (90°C για 1 min), μετρήθηκαν διάφορες ποιοτικές παράμετροι και εν τέλει συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

2.3. Προσδιορισμός θολερότητας χυμού

Οκτώ mL περίπου από τα δείγματα που έχουν υποστεί παστερίωση καθώς και από το μάρτυρα, εναποτίθενται προσεκτικά με την αυτόματη πιπέτα σε ειδικούς γυάλινους σωλήνες με πάμα (όπως αυτός της Εικόνας 3), έτσι ώστε τα τοιχώματα πάνω από τη στάθμη του χυμού να παραμείνουν καθαρά. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 3 προϊόντα που αναφέρθηκαν στην ενότητα 2.2 (HTST, LTLT, προϊόν βιομηχανικής παστερίωσης). Έτσι, συνολικά 4 δείγματα μαζί με το μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν στον προσδιορισμό της θολερότητας. Στο κάθε ένα εξ αυτών πάρθηκαν 2 μετρήσεις, η πρώτη μία ημέρα μετά την επεξεργασία τους και η δεύτερη εννέα ημέρες αργότερα.

Ο προσδιορισμός της θολερότητας έγινε με τη χρήση κατάλληλου θολοσίμετρου (Turbiscan MA 2000) μέσω του υπολογισμού του ποσοστού

διαπερατότητας και σκέδασης του φωτός που εκπέμπουν οι λυχνίες που σαρώνουν το δείγμα. Αυτό έχει τη δυνατότητα να μετράει συγκεντρώσεις ως και 60%v/v και μέγεθος μορίων από 0,1 μm ως 1mm. Η κεφαλή που διαθέτει σκανάρει από πάνω προς τα κάτω. Μπορεί να παρακολουθήσει τη δράση των διάφορων συστατικών του προϊόντος (φύση 2 φάσεων, συγκέντρωση) με τον εντοπισμό φαινομένων αποσταθεροποίησης, όπως η μετανάστευση (καθίζηση, αποβουτύρωση) ή/και τις παραλλαγές στο μέγεθος των σωματιδίων (συνάθροιση, συνένωση), 20 έως 50 φορές ταχύτερα από την οπτική ανίχνευση. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρέχονται με τη μορφή γραφημάτων μέσω του προγράμματος Turbisoft 2.0 που επέτρεπε την περαιτέρω τροποποίησή τους.



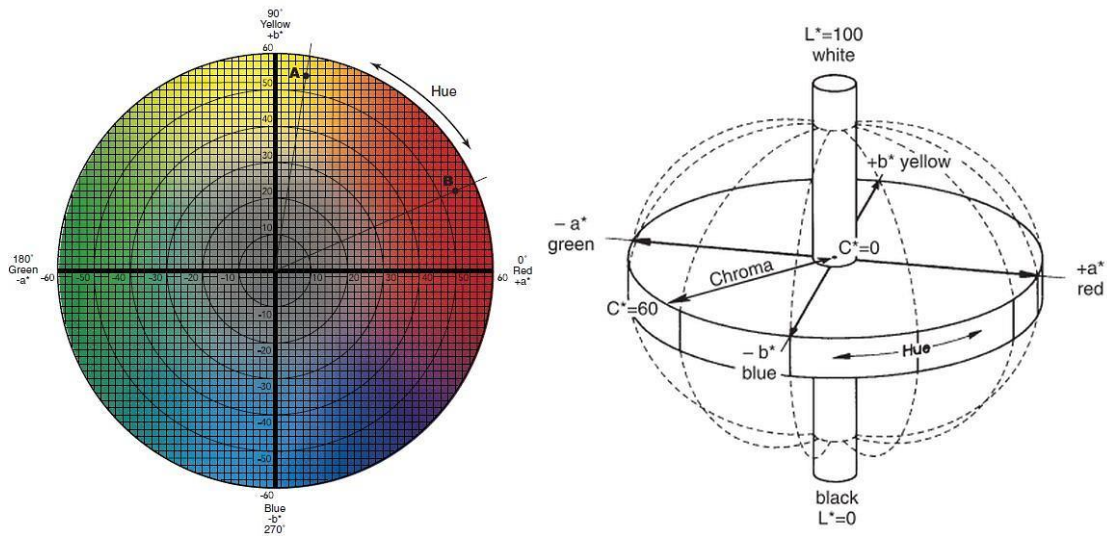
Εικόνα. 7. Θολοσίμετρο συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι όταν ένα υλικό βρεθεί μπροστά σε μία φωτεινή πηγή (με μήκος κύματος, 860 nm, κοντά στην υπέρυθρη ακτινοβολία), τότε ανάλογα με το αν είναι διαφανές, θολό ή αδιαφανές, το φως θα διαπεράσει το δείγμα ή θα σκεδαστεί αντίστοιχα. Καθώς η πηγή φωτός μετακινείται κατά μήκος του σωλήνα με το δείγμα, το όργανο μπορεί να μετρήσει τη διαπερατότητα και τη σκέδαση του φωτός που εξαρτάται από την κατάσταση που

βρίσκεται το σημείο εκείνο του δείγματος τη συγκεκριμένη στιγμή. Για παράδειγμα, αν το δείγμα είναι αποσταθεροποιημένο λόγω του φαινομένου της ιζηματογένεσης, στον πυθμένα του σωλήνα θα είναι αδιαφανές και άρα η διαπερατότητα χαμηλή και η σκέδαση υψηλή, στη μέση του σωλήνα περίπου είναι θολό και άρα η διαπερατότητα και η σκέδαση έχουν παρόμοιες τιμές, και τέλος, πλησίον της επιφάνειας του δείγματος το εναιώρημα είναι διαυγές και άρα η διαπερατότητα πολύ υψηλή ενώ η σκέδαση χαμηλότερη. Εάν υπάρχουν σωματίδια σε αιώρηση που καταβυθίζονται με πολύ αργό ρυθμό, τότε η διαπερατότητα μεταβάλλεται σε όλο το μήκος του δείγματος και τελικά δημιουργείται ένα αδιαφανές ίζημα όπου η διαπερατότητα είναι μικρή έως 0%, μια διαφανή άνω φάση και μία ενδιάμεση θολή που αντιστοιχεί στα σωματίδια που συνεχώς καταβυθίζονται.

2.4. Μέτρηση χρώματος χυμού

Το χρώμα του χυμού μανταρινιού μετρήθηκε με χρωματόμετρο Minolta CR-200 (Minolta Co., Osaka, Japan) με επιφάνεια μέτρησης διαμέτρου 8 mm. Πρότυπη άσπρη πλακέτα της Minolta (L: 96,98, a: -0,81, b: 3,19) χρησιμοποιήθηκε για την βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις συνθήκες της CIE (Commission International de L'Eclairage). Για την μέτρηση του χρώματος, 4 mL δείγματος χυμού τοποθετήθηκαν σε διαφανές, γυάλινο διαφανές τρυβλίο Petri, διαμέτρου 3,2 cm και όγκου 5 mL, και στη συνέχεια μετρήθηκε το χρώμα με την εφαρμογή του χρωματόμετρου στην επιφάνεια του τρυβλίου. Οι μετρήσεις έγιναν υπό σταθερό φωτισμό και σταθερή γωνία θέασης σε κάθε περίπτωση. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο στο control δείγμα, όσο και στα 3 θερμικά κατεργασμένα δείγματα που επιλέχθηκαν ως τελικά προϊόντα. Σε καθένα από αυτά, έγιναν 20 επαναληπτικές μετρήσεις.



Σχήμα 5. Συντεταγμένες L, a και b του χρώματος σε κλίμακα CIE (L, a, b) (Sahin and Summu, 2006).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν στην κλίμακα CIE (L, a, b). Οι τιμές a και b είναι οι ορθογώνιες συντεταγμένες του χρώματος (συντά ονομάζονται χρωματικότητα) πάνω στο επίπεδο διατομής του χρώματος, κάθετο στον άξονα μαύρου-άσπρου. Αν ένα δείγμα έχει μηδενική τιμή για τα a και b πρέπει να βρίσκεται πάνω στον άξονα μαύρου-άσπρου, να έχει δηλαδή κάποια απόχρωση του γκρι. Το a αποτελεί έκφραση της απόχρωσης πράσινου-κόκκινου και το b της απόχρωσης κίτρινου-μπλε. Πιο συγκεκριμένα, μία θετική τιμή για το a υποδεικνύει κόκκινο χρώμα (redness), ενώ μία αρνητική τιμή πράσινο χρώμα (greenness). Μία θετική τιμή για το b υποδεικνύει κίτρινο χρώμα (yellowness), ενώ μία αρνητική τιμή μπλε χρώμα (blueness). Το L εκφράζει την φωτεινότητα (λαμπρότητα) του χρώματος και οι τιμές του κυμαίνονται από 0 έως 100 (μαύρο στην τιμή 0 και λευκό στην τιμή 100).

Επίσης, μετρήθηκαν οι παράμετροι C και h. Η χρωματική πυκνότητα C (Chroma) προσδιορίζει τη συγκέντρωση, δηλαδή την ένταση ή την καθαρότητα του χρώματος ή διαφορετικά τη σχέση μεταξύ της έντασης και της φωτεινότητας της απόχρωσης που μελετάται και υπολογίζεται από τον τύπο $C = \sqrt{a^2 + b^2}$. Στο κέντρο της χρωματικής σφαίρας είναι ίση με 0 και αυξάνεται η τιμή της όσο απομακρύνεται από αυτό. Η χροιά h (hue angle) προσδιορίζει την απόχρωση βάση του κυρίαρχου χρώματος και μετρείται σε μοίρες. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5, στις 0° βρίσκεται το κόκκινο, στις 90° είναι το κίτρινο, στις 180° αντιστοιχεί το πράσινο και στις 270° το

μπλε χρώμα. Για τον υπολογισμό της παραμέτρου h διακρίνονται οι εξής περιπτώσεις (McGuire, 1992):

$$h = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \text{ όταν } a > 0 \text{ και } b \geq 0$$

$$h = 0^\circ \text{ όταν } a = 0 \text{ και } b = 0$$

$$h = 90^\circ \text{ όταν } a = 0 \text{ και } b > 0$$

$$h = 180^\circ + \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \text{ όταν } a < 0$$

$$h = 270^\circ \text{ όταν } a = 0 \text{ και } b < 0$$

$$h = 360^\circ + \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \text{ όταν } a > 0 \text{ και } b < 0.$$

Τέλος, οι μετρήσεις των χρωματικών παραμέτρων που καταγράφηκαν, μεταφέρθηκαν στο στατιστικό πρόγραμμα JMP για περαιτέρω στατιστική ανάλυση (κατανομή, διακύμανση κτλ.) και ασφαλή σύγκριση / κατάταξη των 4 δειγμάτων με βάση τα χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν (L , a , b , C , h).

2.5. Μέτρηση ασκορβικού οξέος

2.5.1. Αρχή της μεθόδου, υλικά και προετοιμασία διαλυμάτων

Αντιδραστήρια

- Οξικό οξύ, Sigma-Aldrich
- Ασκορβικό οξύ, Sigma-Aldrich
- Άλας νατρίου της 2,6-διχλωροινδοφαινόλης (DCIP), Fluka
- Μεταφωσφορικό οξύ, Sigma-Aldrich
- Υδρογονανθρακικό νάτριο, Sigma-Aldrich

Σκεύη και εργαλεία

- Γυάλινο δοχείο 200 mL
- Γυάλινο δοχείο 250 mL

- Γυάλινη φιάλη Duran 200 mL με πώμα
- Γυάλινη φιάλη σκούρου χρώματος με πώμα, 1 Lt
- 3 κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 50 mL
- 2 τεμάχια πτυχωτού διηθητικού χαρτιού
- Γυάλινο χωνί διαμέτρου 6-9 cm
- Γυάλινη πιπέτα ογκομέτρησης 10 mL

Σκεύη και εργαλεία

- Αυτόματος τιτλοδότης, TitroLine 7000 SI Analytics
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας, Sartorius B120S

Η αρχή της μεθόδου μέτρησης του ασκορβικού (AOAC International, 2007· Pegg and Landen, 2010) βασίζεται στην αναγωγή του από το DCIP που έχει το ρόλο της χρωστικής της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ τους. Στο τέλος της τιτλοδότησης κάποιου δείγματος που περιέχει ασκορβικό οξύ, με τη 2,6-διγλωροινδοφαινόλη, η περίσσεια της χρωστικής από την αντίδραση αποκτά ένα ροζ χρώμα. Ο τίτλος της χρωστικής μπορεί να προσδιορισθεί με ένα πρότυπο διάλυμα ασκορβικού οξέος. Αφού πραγματοποιηθεί ο προαναφερθείς προσδιορισμός, μπορούν να τιτλοδοτηθούν διαλύματα τροφίμων άγνωστης περιεκτικότητας σε ασκορβικό οξύ. Ως τελικό σημείο της ογκομέτρησης λαμβάνεται το σημείο όπου το ογκομετρούμενο διάλυμα αποκτά ένα ελαφρύ ρόδινο έως ανοικτό μπεζ χρώμα (χρώμα μίγματος δεϋδροασκορβικού και πρώτης περίσσειας DCIPH). Αξίζει να τονισθεί πως με τη μέθοδο τιτλοδότησης του ασκορβικού με ινδοφαινόλη, προσδιορίζουμε ουσιαστικά μόνο την περιεκτικότητα του τροφίμου σε L-ασκορβικό οξύ, και όχι του δεϋδροασκορβικού που είναι προϊόν οξειδωσης του ασκορβικού και παρουσιάζει επίσης βιταμινική δραστηριότητα.

Διάλυμα ασκορβικού οξέος γνωστής συγκέντρωσης (πρότυπο):

Πενήντα mg ασκορβικού οξέος ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL. Αραιώθηκαν μέχρι τελικό όγκο αυτόν της φιάλης με απεσταγμένο νερό, ακριβώς πριν από τη χρήση του διαλύματος στο μείγμα μεταφωσφορικού-οξικού οξέος (λεπτομέρειες για την παρασκευή του παρακάτω).

Διάλυμα ινδοφαινόλης/χρωστικής:

Σε 50 mL απεσταγμένου νερού εντός γυάλινου δοχείου 200 mL, διαλύθηκαν 42 mg υδρογονανθρακικού νατρίου και έπειτα προστέθηκαν 50mL 2,6-διχλωροινδοφαινόλης. Το διάλυμα αραιώθηκε μέχρι τελικού όγκου 200 mL. Στη συνέχεια πέρασε μέσα από χωνί στο οποίο είχε τοποθετηθεί πτυχωτό διηθητικό χαρτί, σε φιάλη σκούρου χρώματος, όγκου 1 Lt. Η φιάλη σφραγίστηκε με πώμα και διατηρήθηκε στο ψυγείο μέχρι τη χρήση της.

Μείγμα μεταφωσφορικού-οξικού οξέος:

Σε γυάλινο δοχείο των 250 mL που περιείχε 100 mL απεσταγμένου νερού, προστέθηκαν 20 mL οξικό οξύ. Στη συνέχεια προστέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση 7,5 g μεταφωσφορικού οξέος. Το διάλυμα αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό, έως ότου απέκτησε τελικό όγκο 250 mL. Κατόπιν, φιλτραρίστηκε μέσω πτυχωτού διηθητικού χαρτιού που είχε στερεωθεί σε χωνί σε γυάλινη φιάλη όγκου 250 mL, σφραγίστηκε με πώμα και διατηρήθηκε στο ψυγείο μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Προετοιμασία δειγμάτων χυμού:

Η διαδικασία για την προετοιμασία του χυμού, τα υλικά, ο εργαστηριακός εξοπλισμός, καθώς και η θερμική επεξεργασία που ακολουθήθηκε, περιγράφηκαν αναλυτικά στην ενότητα 2.1.1. Τα προϊόντα που επιλέχθηκαν για τη θερμική επεξεργασία αναφέρθηκαν στην ενότητα 2.2.

2.5.2. Τυποποίηση του διαλύματος χρωστικής

Με αυτόματη πιπέτα μεταφέρθηκαν 5 mL από το μεταφωσφορικού-οξικού σε κωνική φιάλη των 50 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL διαλύματος ασκορβικού στη φιάλη. Το όξινο περιβάλλον κατά την ογκομέτρηση, περιορίζει την οξειδωση του ασκορβικού οξέος από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, όπως επίσης εξασφαλίζει την εμφάνιση του ρόδινου χρώματος του διαλύματος με την πρώτη περίσσεια DCIP. Στην κωνική φιάλη τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο του αυτόματου τιτλοδότη και με ελεγχόμενη ροή προστέθηκε σε αυτήν διάλυμα ινδοφαινόλης μέχρι την αλλαγή του χρώματος του διαλύματος εντός της φιάλης από άχρωμο σε διακριτό ανοικτό ροζ. Το

τέλος της τιτλοδότησης σηματοδότησε η διατήρηση του χρώματος για χρόνο πάνω από 5 s. Η κατανάλωση της ινδοφαινόλης καταγράφηκε από τον αυτόματο τιτλοδότη. Η προαναφερθείσα διαδικασία επαναλήφθηκε εις τριπλούν και ως τελικό αποτέλεσμα λήφθηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Ακολούθως προετοιμάστηκε το τυφλό δείγμα (δεν περιείχε διάλυμα ασκορβικού οξέος). 7 mL μεταφωσφορικού-οξικού οξέος μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη 50 mL. Ποσότητα απεσταγμένου νερού όμοια με την ποσότητα ινδοφαινόλης που καταναλώθηκε προηγουμένως, προστέθηκε στη φιάλη. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση όπως στην περίπτωση της τυποποίησης του διαλύματος ασκορβικού. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε ούτως ώστε να διαπιστωθεί αν συμβαίνει κάποια χημική αντίδραση μεταξύ οξικού και ασκορβικού ή μεταφωσφορικού και ασκορβικού οξέος. Η μέτρηση έγινε τρεις φορές και λήφθηκε ο μέσος όρος ως αποτέλεσμα όπου χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω υπολογισμούς στην Εξίσωση 14.

2.5.3. Ανάλυση των δειγμάτων χυμού και μαθηματικοί υπολογισμοί

Σε κωνική φιάλη των 50 mL τοποθετήθηκαν 5 mL από το διάλυμα μεταφωσφορικού-οξικού και 2 mL από το χυμό μανταρινιού. Κατόπιν, τιτλοδοτήθηκε το μείγμα με το διάλυμα ινδοφαινόλης από τον αυτόματο τιτλοδότη μέχρι το μείγμα που περιείχε το χυμό να αποκτήσει ένα ανοικτό μπεζ χρώμα το οποίο παρέμενε το λιγότερο για 5 δευτερόλεπτα. Τα αποτελέσματα κατανάλωσης της ινδοφαινόλης καταγράφηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας του δείγματος του χυμού σε ασκορβικό οξύ. Τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν (μία για κάθε επιλεγμένο προϊόν χυμού), και σε καθεμιά από αυτές η διαδικασία τιτλοδότησης επαναλήφθηκε 3 φορές.

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που πήραμε από την τυποποίηση του διαλύματος ινδοφαινόλης, υπολογίσαμε τον τίτλο από την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Τίτλος} = F = \frac{\text{mg ασκορβικού οξέος που περιείχε το διάλυμα που τιτλοδοτήθηκε}}{[(M.O. \text{ ml χρωστικής στην τιτλοδότηση του γνωστού}) - (M.O. \text{ χρωστικής στην τιτλοδότηση του τυφλού})]} \quad (14)$$

Ο αριθμητής προκύπτει από τον τύπο: (mg ασκορβικού / 50 mL) · 2 mL.

Τέλος, αφού είχαμε καταγράψει τις απαραίτητες τιμές, ήμασταν σε θέση να προσδιορίσουμε την περιεκτικότητα των δειγμάτων χυμού σε ασκορβικό οξύ (mg ασκορβικού ανά mL που μετατρέψαμε σε mg ασκορβικού ανά 100 mL) με την παρακάτω εξίσωση:

$$mg \text{ ασκορβικού ανά mL} = (X - B) \cdot (F/E) \cdot (V/Y) \quad (15)$$

Όπου X τα mL ινδοφαινόλης που καταναλώθηκαν κατά την τιτλοδότηση του δείγματος, B ο μέσος όρος των καταναλώσεων ινδοφαινόλης σε mL κατά την τιτλοδότηση του τυφλού, F ο τίτλος (mg ασκορβικού που ισοδυναμούν σε 1 mL τυποποιημένου διαλύματος ινδοφαινόλης), E η ποσότητα δείγματος του χυμού που χρησιμοποιήθηκε σε mL (2 mL), V ο συνολικός όγκος του διαλύματος που τιτλοδοτήθηκε (7 mL) και Y ο όγκος του κλάσματος του δείγματος θα είχε τιτλοδοτηθεί σε περίπτωση αραίωσης (π.χ. αν η κατανάλωση ινδοφαινόλης στο διάλυμα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από το διάλυμα ασκορβικού γνωστής περιεκτικότητας) (7 mL).

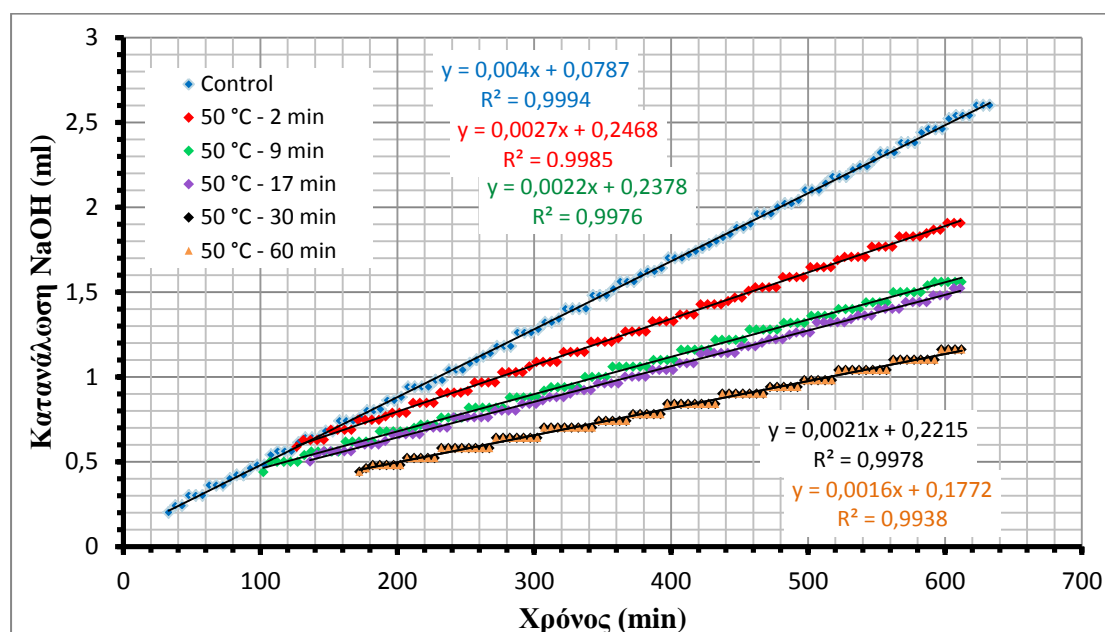
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ανάλυση αποτελεσμάτων κινητικής της θερμικής απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης

3.1.1. Ενεργότητα του ενζύμου, διόρθωση χρόνων και εφαρμογή κινητικού μοντέλου 1^{ης} τάξης

Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε pH και °Brix στο χυμό μανταρινιού πριν από κάθε σετ θερμικών επεξεργασιών, βρέθηκαν οι τιμές $4,0 \pm 0,2$ και $14,4 \pm 1,1$ αντίστοιχα.

Τα δεδομένα χρόνου και κατανάλωσης NaOH που λάβαμε από τον αυτόματο τιτλοδότη για το πείραμα των 50°C μετατράπηκαν σε γράφημα (Σχήμα 6) με τη χρήση του Microsoft Excel. Η κλίση των ευθειών (α, στην εξίσωση μορφής $y=ax+\beta$) είναι ίση με την παροχή Q του διαλύματος NaOH, για κάθε περίπτωση.



Σχήμα 6. Κατανάλωση διαλύματος NaOH συναρτήσει του χρόνου για διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας στους 50°C.

Ακολουθώντας όμοια διαδικασία για τα πειράματα των υπολοίπων θερμοκρασιών και αντικαθιστώντας τις τιμές που προκύπτουν από τις εξισώσεις των ευθειών στην Εξίσωση (12), προκύπτει ο κάτωθι πίνακας:

Πίνακας 6. Εναπομένουσα δραστηριότητα A της πηκτινестεράσης για διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους.

50°C						
t (min)	0	2	9	17	30	60
1η μέτρηση	2,4	1,62	1,32	1,26	0,96	0,96
2η μέτρηση	2,4	1,62	1,26	1,2	1,02	1,02
3η μέτρηση	2,34	1,5	1,24	1,14	0,96	0,96
4η μέτρηση	2,52	1,62	1,34	1,2	1,08	1,08
55°C						
t (min)	0	2	15	30	60	90
1η μέτρηση	2,88	1,38	1,26	1,08	1,02	0,78
2η μέτρηση	2,58	1,2	1,08	0,96	0,78	0,54
3η μέτρηση	2,28	1,14	0,96	0,84	0,72	0,48
4η μέτρηση	2,28	1,14	0,96	0,84	0,72	0,48
60°C						
t (min)	0	1,5	5	12	20	30
1η μέτρηση	2,1	0,66	0,6	0,54	0,48	0,42
2η μέτρηση	2,04	0,72	0,48	0,48	0,42	0,3
3η μέτρηση	1,98	0,6	0,48	0,42	0,3	0,3
4η μέτρηση	1,8	0,54	0,48	0,42	0,36	0,36
70°C						
t (min)	0	0,0833	0,333	1	3	5
1η μέτρηση	2,4	0,52	0,42	0,36	0,30	0,24
2η μέτρηση	1,98	0,48	0,36	0,3	0,24	0,18
3η μέτρηση	2,28	0,54	0,42	0,36	0,3	0,21
4η μέτρηση	2,7	0,54	0,42	0,36	0,34	0,3

Αυτοί είναι οι ονομαστικοί χρόνοι οι οποίοι ως αρχή έχουν τη στιγμή όπου η θερμοκρασία του δείγματος άγγιξε την επιθυμητή θερμοκρασία (holding time). Επειδή όμως ένα ποσοστό (μικρό στις χαμηλές θερμοκρασίες, σημαντικό στις υψηλότερες) του ενζύμου απενεργοποιείται στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή που το δείγμα εμβαπτίζεται στο υδατόλουτρο μέχρι την άνοδο της θερμοκρασίας στις τιμές που ορίσαμε, κρίθηκε αναγκαία μια διόρθωση των χρόνων με την εξίσωση της τιμής F.

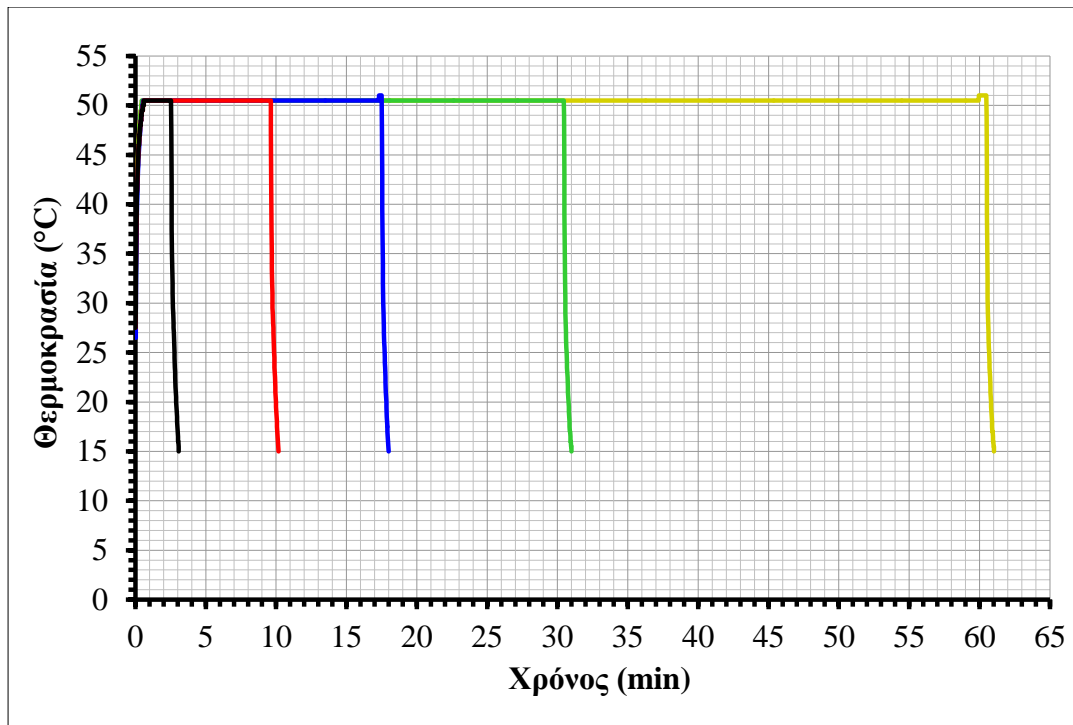
Οι θερμοκρασίες επίσης, βάση δεδομένων του καταγραφικού (Σχήματα 7-10) παρουσιάζουν κάποιες μικρές αποκλίσεις, οι οποίες έχουν επίδραση όμως στην τιμή F. Πιο συγκεκριμένα από τους μέσους όρους των θερμοκρασιών σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή, προκύπτουν οι πραγματικές θερμοκρασίες των πειραμάτων οι οποίες σε σχέση με τις τιμές του Πίνακα 5 είναι: 50,5°C αντί των 50°C, 55,5°C αντί των 55°C, 60,3°C αντί των 60°C και 70°C αντιστοίχως.

Από τους αρχικούς, αδιόρθωτους χρόνους δημιουργούμε ένα γράφημα για κάθε θερμοκρασία, όπου αναπαρίσταται ο λογάριθμος της ενεργότητας A συναρτήσει του χρόνου. Από την εξίσωση της γραφικής παράστασης προκύπτει ο χρόνος θερμικού υποδεκαπλασιασμού, που ισούται με $-1/a$, όπου a η κλίση της ευθείας. Κατ' επέκταση προκύπτουν 4 τιμές D_T (μία για κάθε πειραματική θερμοκρασία) τις οποίες τοποθετούμε σε γράφημα, σε συνάρτηση με τις θερμοκρασίες στις οποίες αντιστοιχούν. Στη συνέχεια από τα 4 σημεία αυτά, σχηματίζουμε την καμπύλη θερμικής απενεργοποίησης και από την κλίση της υπολογίζουμε την τιμή z ($-1/a$).

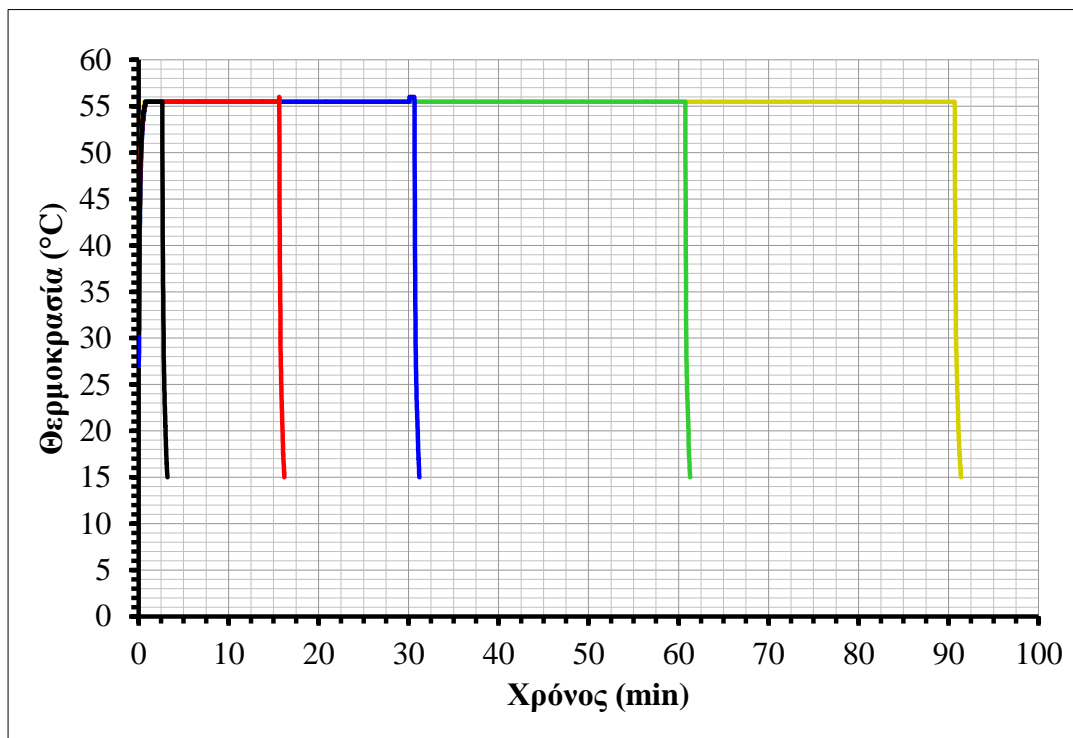
Στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα δεδομένα που κατέγραψε το καταγραφικό θερμοκρασίας για την πειραματική δοκιμή στους 70°C για 5 s (τα δεδομένα από τις υπόλοιπες πειραματικές δοκιμές παραλείπονται λόγω μεγάλης έκτασης περιεχομένου). Οι τιμές F_i (ισοδύναμοι χρόνοι που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για κάθε δεδομένη χρονική στιγμή της κατεργασίας) υπολογίζονται στο Excel από την Εξίσωση (13), άνευ ολοκληρώματος, όπου T_{ref} οι πραγματικές πειραματικές τιμές που αναφέρθηκαν προηγουμένως και T οι θερμοκρασίες σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή t_i ($i = 0,1,2,\dots,97$ sec). Παίρνοντας το ΣF_i υπολογίζουμε την τιμή F για το συγκεκριμένο συνδυασμό χρόνου και θερμοκρασίας (κατ' αυτόν τον τρόπο γίνεται η ολοκλήρωση των μεμονωμένων τιμών και προκύπτει η πλήρης Εξίσωση 13). Ακολουθούμε την ίδια μέθοδο για όλα τα πειράματά μας, και έτσι επιτυγχάνεται η διόρθωση των αρχικών χρόνων σε ακριβέστερες τιμές, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη την απενεργοποίηση του ενζύμου που λαμβάνει χώρα κατά την άνοδο της θερμοκρασίας στο επιθυμητό σημείο (αλλά και κατά την πτώση της).

Πίνακας 7. Πειραματικά δεδομένα θερμοστοιχείου και τμηματικές τιμές F (70°C για 5 s).

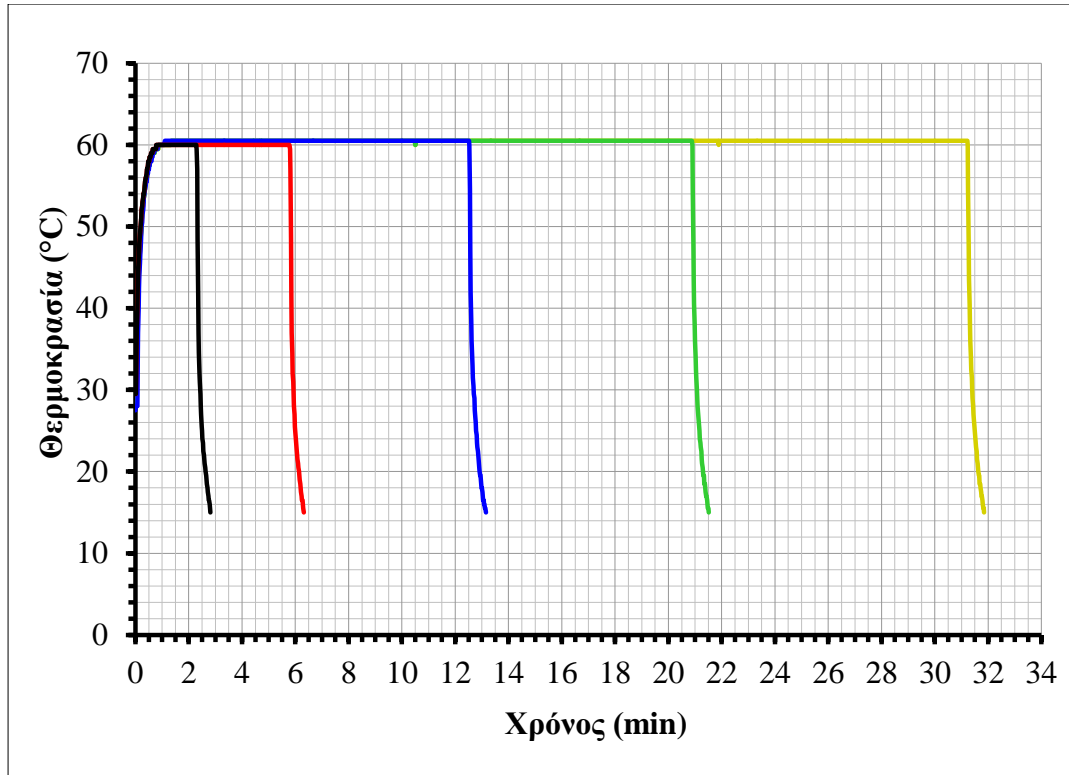
Time (sec)	Time (min)	Temperature (°C)	Fi	Time (sec)	Time (min)	Temperature (°C)	Fi
0	0	30,5	0,000951	49	0,8166667	69,5	0,915693223
1	0,016666667	34	0,001762	50	0,8333333	69,5	0,915693223
2	0,033333333	40,5	0,005537	51	0,85	69,5	0,915693223
3	0,05	43,5	0,009392	52	0,8666667	69,5	0,915693223
4	0,066666667	48,5	0,022659	53	0,8833333	69,5	0,915693223
5	0,083333333	51,5	0,038437	54	0,9	70	1
6	0,1	53,5	0,05467	55	0,9166667	70	1
7	0,116666667	55,5	0,077759	56	0,9333333	70	1
8	0,133333333	56,5	0,092736	57	0,95	70	1
9	0,15	58	0,120781	58	0,9666667	70	1
10	0,166666667	59	0,144046	59	0,9833333	70	1
11	0,183333333	60	0,171791	60	1	69,5	0,915693223
12	0,2	61	0,20488	61	1,0166667	67,5	0,643798559
13	0,216666667	62	0,244343	62	1,0333333	57,5	0,110598694
14	0,233333333	62,5	0,266839	63	1,05	51	0,035196542
15	0,25	63,5	0,318237	64	1,0666667	47	0,017398027
16	0,266666667	63,5	0,318237	65	1,0833333	44	0,010256519
17	0,283333333	64,5	0,379533	66	1,1	40,5	0,005536687
18	0,3	64,5	0,379533	67	1,1166667	37,5	0,003263999
19	0,316666667	65	0,414477	68	1,1333333	35,5	0,002294827
20	0,333333333	65,5	0,452637	69	1,15	33,5	0,00161343
21	0,35	65,5	0,452637	70	1,1666667	31,5	0,001134358
22	0,366666667	66	0,494311	71	1,1833333	30	0,000870964
23	0,383333333	66,5	0,539821	72	1,2	28,5	0,000668729
24	0,4	67	0,589522	73	1,2166667	27,5	0,000560725
25	0,416666667	67	0,589522	74	1,2333333	26,5	0,000470165
26	0,433333333	67,5	0,643799	75	1,25	25,5	0,00039423
27	0,45	67,5	0,643799	76	1,2666667	24,5	0,00033056
28	0,466666667	68	0,703072	77	1,2833333	23,5	0,000277172
29	0,483333333	68	0,703072	78	1,3	23	0,000253805
30	0,5	68	0,703072	79	1,3166667	22,5	0,000232407
31	0,516666667	68,5	0,767803	80	1,3333333	21,5	0,000194872
32	0,533333333	68,5	0,767803	81	1,35	21	0,000178443
33	0,55	68,5	0,767803	82	1,3666667	20,5	0,000163399
34	0,566666667	68,5	0,767803	83	1,3833333	20	0,000149624
35	0,583333333	69	0,838494	84	1,4	19,5	0,000137009
36	0,6	69	0,838494	85	1,4166667	19	0,000125458
37	0,616666667	69	0,838494	86	1,4333333	18,5	0,000114881
38	0,633333333	69	0,838494	87	1,45	18,5	0,000114881
39	0,65	69	0,838494	88	1,4666667	18	0,000105196
40	0,666666667	69	0,838494	89	1,4833333	17,5	9,63274E-05
41	0,683333333	69,5	0,915693	90	1,5	17	8,82064E-05
42	0,7	69,5	0,915693	91	1,5166667	17	8,82064E-05
43	0,716666667	69,5	0,915693	92	1,5333333	16,5	8,077E-05
44	0,733333333	69,5	0,915693	93	1,55	16,5	8,077E-05
45	0,75	69,5	0,915693	94	1,5666667	16	7,39605E-05
46	0,766666667	69,5	0,915693	95	1,5833333	15,5	6,77252E-05
47	0,783333333	69,5	0,915693	96	1,6	15,5	6,77252E-05
48	0,8	69,5	0,915693	97	1,6166667	15	6,20155E-05



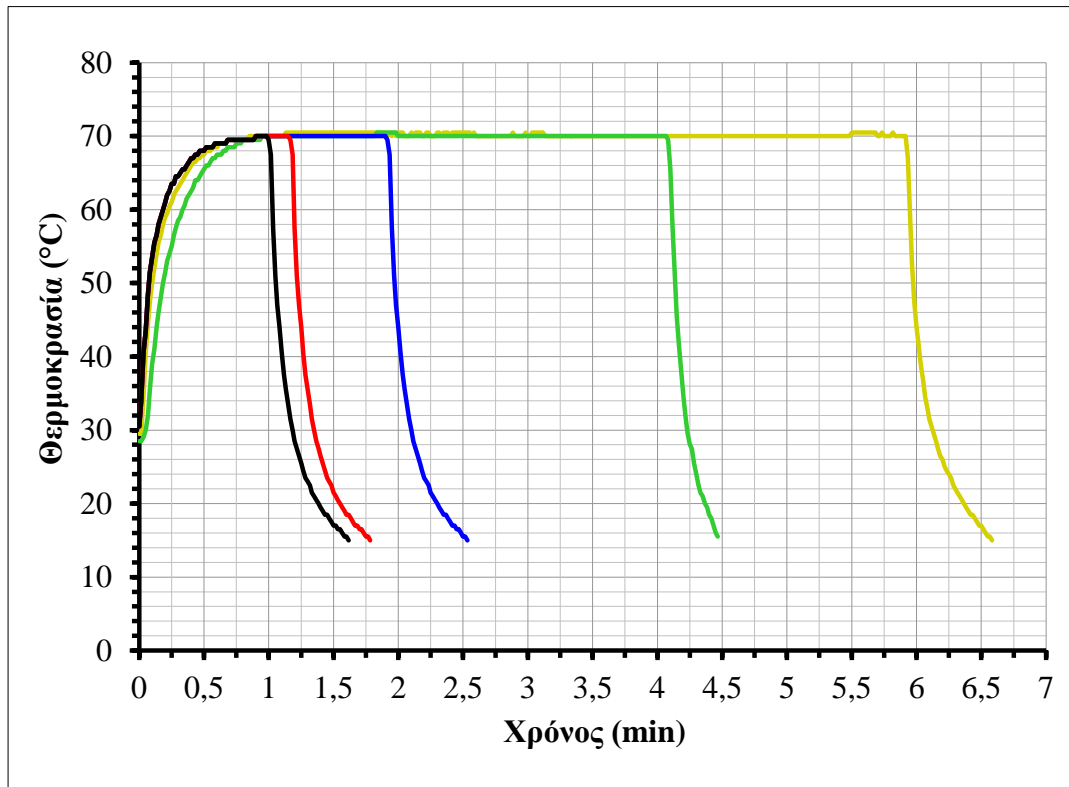
Σχήμα 7. Καταγεγραμμένες θερμοκρασίες θερμοστοιχείου συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα των 50,5°C από την εμβάπτιση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο μέχρι και την ψύξη τους.



Σχήμα 8. Καταγεγραμμένες θερμοκρασίες θερμοστοιχείου συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα των 55,5°C από την εμβάπτιση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο μέχρι και την ψύξη τους.

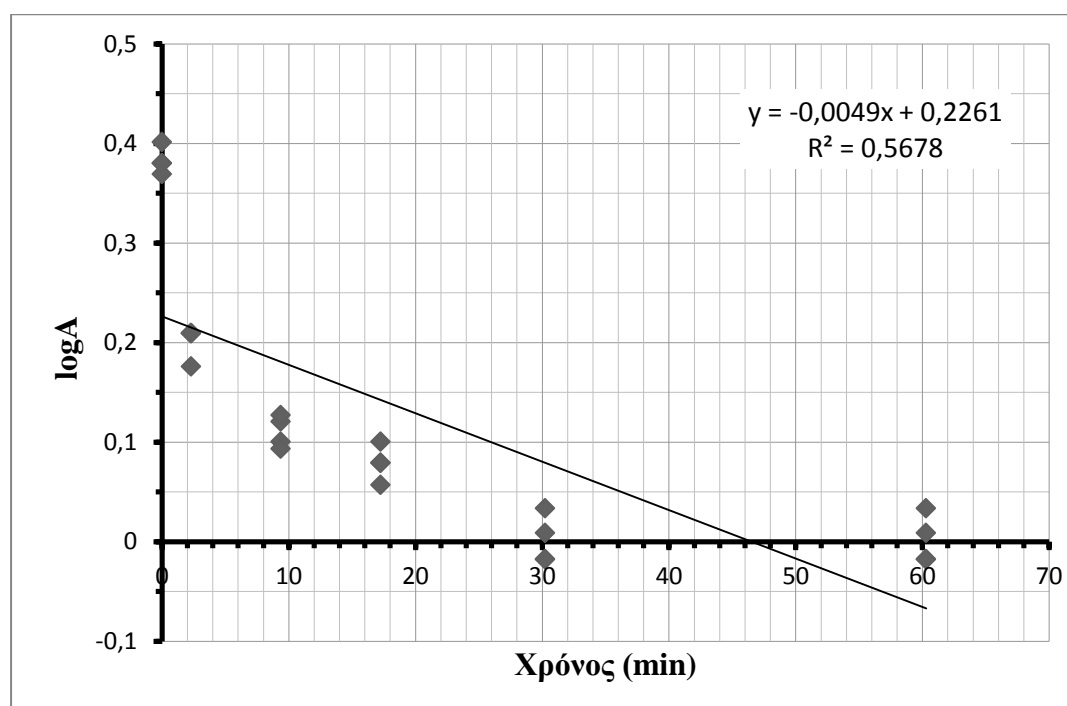


Σχήμα 9. Καταγεγραμμένες θερμοκρασίες θερμοστοιχείου συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα των 60,3°C από την εμφάνιση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο μέχρι και την ψύξη τους.

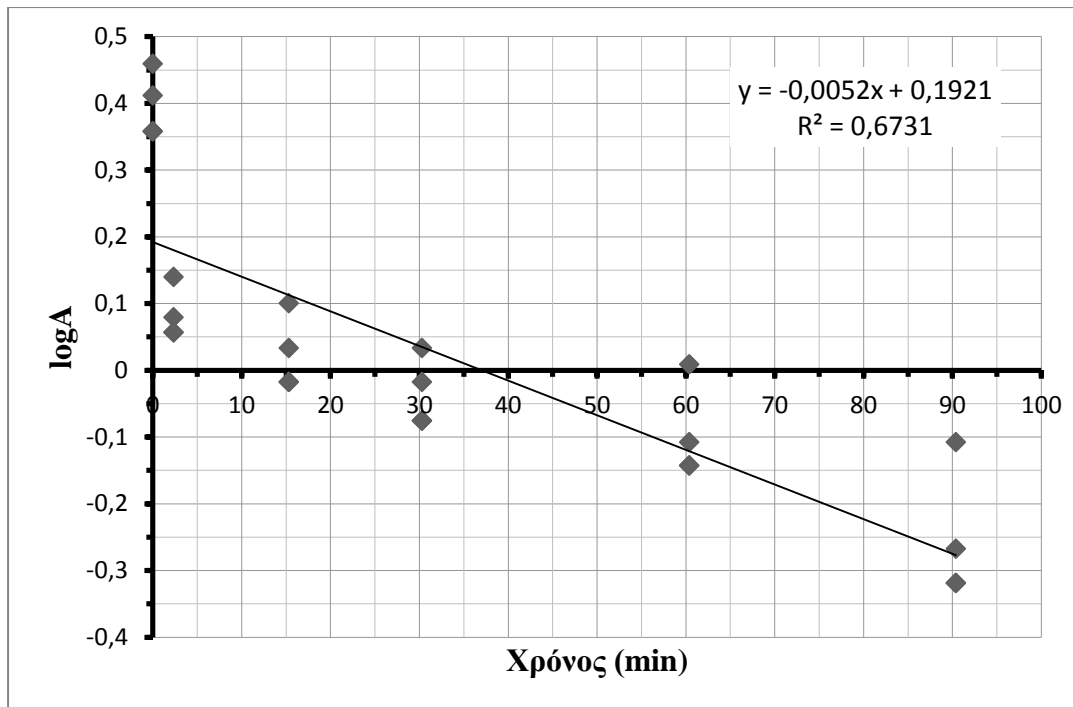


Σχήμα 10. Καταγεγραμμένες θερμοκρασίες θερμοστοιχείου συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα των 70°C από την εμφάνιση των δειγμάτων στο υδατόλουτρο μέχρι και την ψύξη τους.

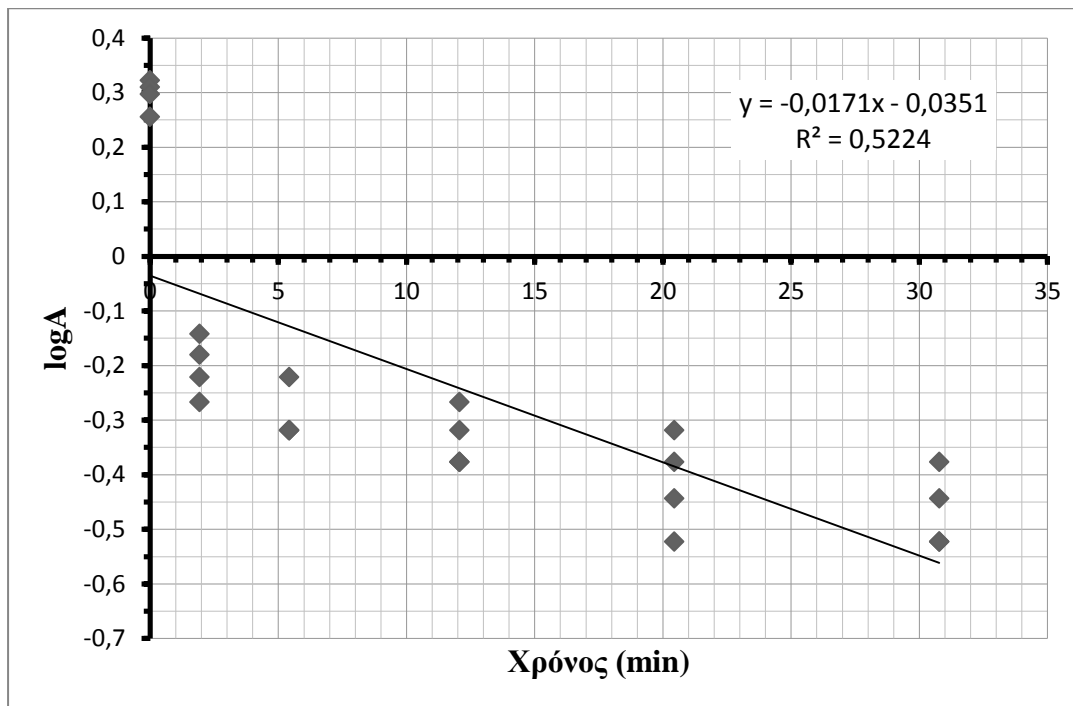
Τους ισοδύναμους χρόνους που λαμβάνουμε, χρησιμοποιούμε ως νέα δεδομένα στα γραφήματα $\log A$ συναρτήσει χρόνου και παίρνουμε καινούργιες τιμές D και κατ' αντιστοιχία μία διαφορετική τιμή z από την προηγούμενη. Αυτή την τιμή z χρησιμοποιούμε εκ νέου για την επόμενη διόρθωση των χρόνων με την τιμή F . Πραγματοποιήθηκαν όσες διορθώσεις χρειάστηκαν ώστε να μην μεταβάλλεται πλέον η τιμή z , αν και αξίζει να σημειωθεί ότι σημαντικές αριθμητικές αλλαγές επήλθαν μόνο κατά την πρώτη διόρθωση. Τα προαναφερθέντα διαγράμματα παρουσιάζονται ακολούθως (Σχήματα 11-14). Τα σημεία αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα μας σε διορθωμένους χρόνους και η ευθεία γραμμή είναι η γραμμή τάσης της καμπύλης. Τόσο από τις τιμές των συντελεστών συσχέτισης όσο και από τα ίδια τα σχήματα γίνεται αντιληπτό το ότι το μοντέλο πρώτης τάξης δεν προσαρμόζεται καλά στα δεδομένα.



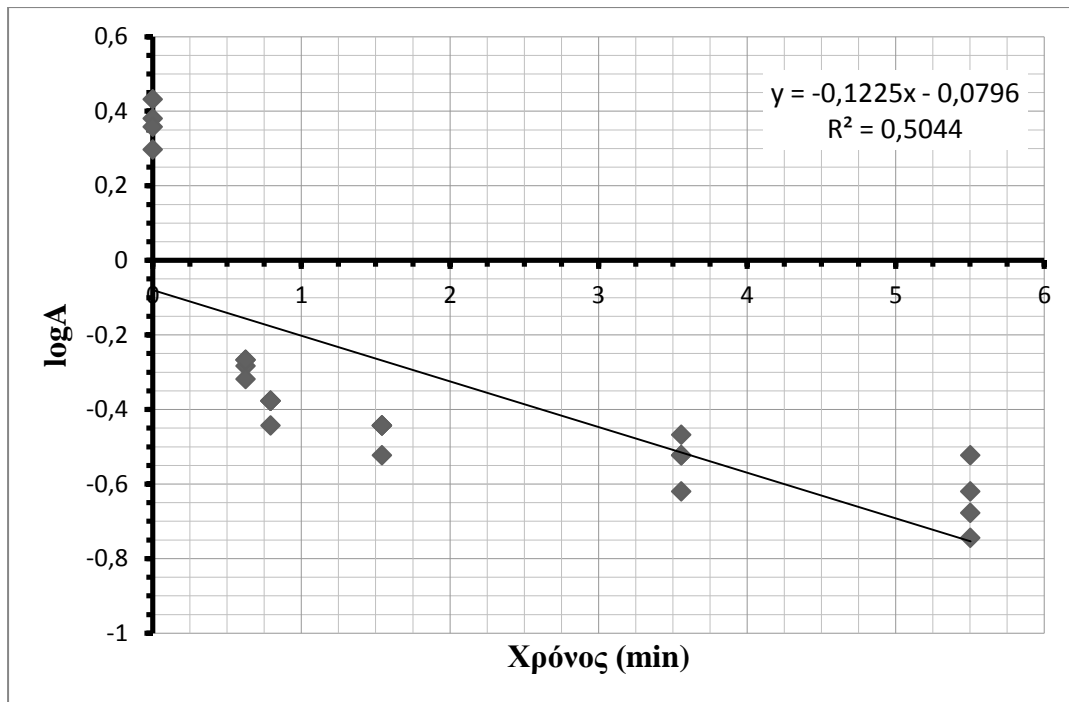
Σχήμα 11. Θερμική απενεργοποίηση της PME κατά την πειραματική διαδικασία των 50,5°C.



Σχήμα 12. Θερμική απενεργοποίηση της ΡΜΕ κατά την πειραματική διαδικασία των 55,5°C.



Σχήμα 13. Θερμική απενεργοποίηση της ΡΜΕ κατά την πειραματική διαδικασία των 60,3°C.



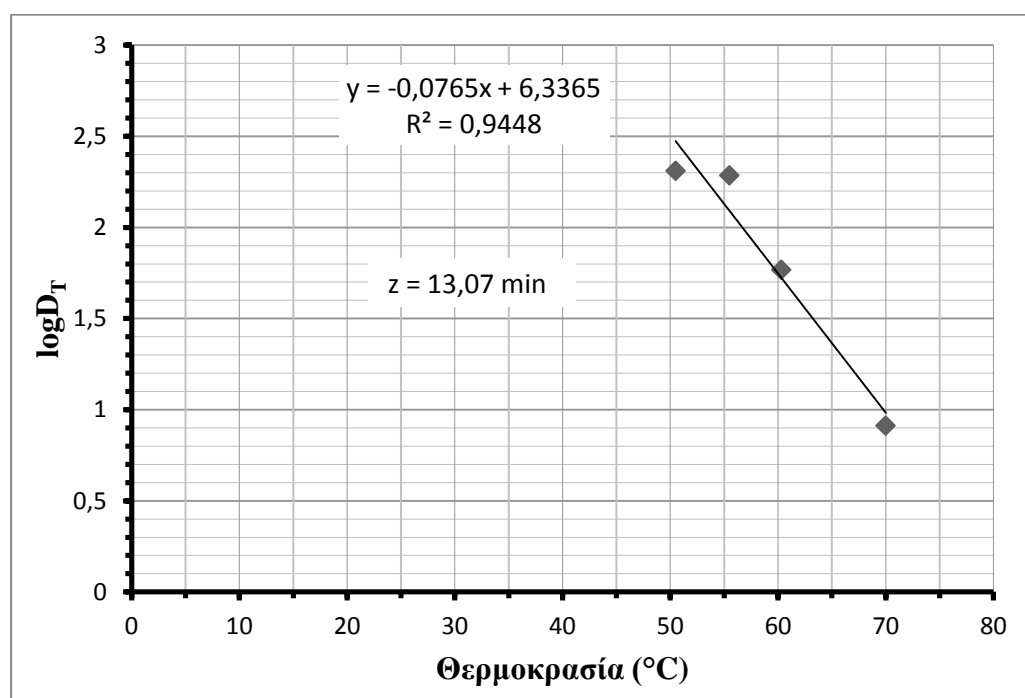
Σχήμα 14. Θερμική απενεργοποίηση της PME κατά την πειραματική διαδικασία των 70°C.

Στον Πίνακα 8, παρουσιάζονται συνοπτικά τόσο οι μέσες τιμές των θερμοκρασιών, όσο και οι αδιόρθωτοι (αρχικοί) χρόνοι, οι τελικοί διορθωμένοι χρόνοι, καθώς οι τελικοί χρόνοι θερμικού υποδεκαπλασιασμού. Εκεί παρατηρούμε πως οι διαφορές μεταξύ των χρόνων, κυρίως στο πείραμα των 70°C είναι σημαντικές. Λόγω των χρησιμοποιούμενων χρόνων, ειδικά στην περίπτωση της κατεργασίας στους 70°C (μικροί χρόνοι σε υψηλή θερμοκρασία, που σημαντικό μέρος τους αναλογεί στην άνοδο της θερμοκρασίας και επομένως μέρος της απενεργοποίησης της PME πραγματοποιείται «εκτός της διατήρησης» του δείγματος στην θερμοκρασία επεξεργασίας) η διόρθωση κρίθηκε ως απαραίτητη.

Στο Σχήμα 15 φαίνεται η ευθεία που προκύπτει από το λογάριθμο των χρόνων θερμικού υποδεκαπλασιασμού σε σχέση με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες τους. Η τιμή του z , που προκύπτει όπως ήδη αναφέρθηκε από την κλίση της ευθείας ($-1/\alpha$), προήλθε έπειτα από τις διορθώσεις των αρχικών χρόνων.

Πίνακας 8. Μη διορθωμένοι και διορθωμένοι χρόνοι, μέσες θερμοκρασίες κατεργασίας και τιμές D μετά από τις διορθώσεις.

T (°C)	t (min)	t (min)	D (min)	logD
50,5	2	2,288161	204,08	2,309804
	9	9,370887		
	17	17,2453		
	30	30,23645		
	60	60,28814		
55,5	2	2,337615	192,31	2,283997
	15	15,33457		
	30	30,31162		
	60	60,39313		
	90	90,38748		
60,3	1,5	1,92393	58,48	1,767004
	5	5,42393		
	12	12,07029		
	20	20,44717		
	30	30,78026		
70	0,083333	0,625681	8,16	0,911864
	0,333333	0,792348		
	1	1,542348		
	3	3,557569		
	5	5,503853		



Σχήμα 15. Γραφική παράσταση του $\log D_T$ συναρτήσει της θερμοκρασίας.

3.1.2. Εφαρμογή κινητικού μοντέλου νιοστής τάξης και εκτίμηση κινητικών παραμέτρων

Τόσο από την γενική εικόνα των γραφημάτων θερμικής απενεργοποίησης που παρατέθηκαν όσο και από τις τιμές των συντελεστών συσχέτισης R^2 , είναι έκδηλο ότι τα δεδομένα μας (υπολειπόμενες ενεργότητες) δεν προσαρμόζονται καλά στο μοντέλο 1^{ης} τάξης και επομένως η κινητική απενεργοποίησης της πηκτινεστεράσης δε μπορεί να ερμηνευθεί από αυτό. Ακολουθώντας δοκιμάσαμε το κινητικό μοντέλο νιοστής τάξης. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε και εδώ είναι ακριβώς ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα (3.1.1) με κάποιες διαφοροποιήσεις.

Σε σχέση με το μοντέλο πρώτης τάξης, εδώ θα πρέπει να εκτιμήσουμε τρεις άγνωστες παραμέτρους (A_0 , n και k , το k σε $(U/mL)^{1-n} \cdot \text{min}^{-1}$) με τη χρήση μη γραμμικής παλινδρόμησης. Για τον προσδιορισμό των παραπάνω παραμέτρων, αφού εισάγουμε στήλες με τους χρόνους (διορθωμένες τιμές από το πρώτης τάξης μοντέλο) και τις ενεργότητες A για κάθε θερμοκρασία στο πρόγραμμα, προσθέτουμε κάποιες τυχαίες αρχικές τιμές A_0 , n και k που θα χρησιμοποιηθούν από αυτό για πρώιμους (pre-run) υπολογισμούς, επιλέγουμε non-linear fit και το τρέχουμε. Η εξίσωση που ενσωματώσαμε στα δεδομένα της ενεργότητας προκύπτει από την Εξίσωση (7) και είναι η ακόλουθη:

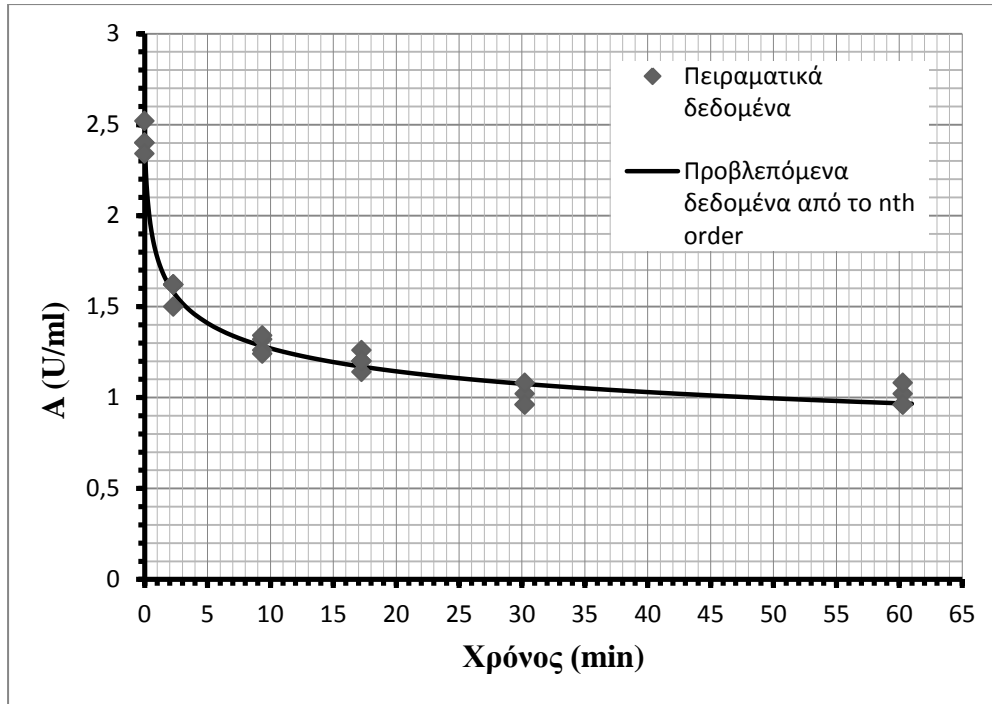
$$A = \sqrt[1-n]{A_0^{(1-n)} + \frac{k \cdot t}{1-n}} \quad (16)$$

Οι fitted predicted τιμές για την ενεργότητα (Πίνακας 9) είναι αυτές που υπολογίζει το πρόγραμμα για την ενεργότητα από την εξίσωση που εισάγαμε (Εξίσωση 16) βάσει των παραμέτρων (n , A_0 , k) που τελικώς εκτίμησε όπως αυτές φαίνονται στον Πίνακα 10. Όπως διαπιστώνουμε βρίσκονται αρκετά κοντά στις πραγματικές τιμές (αυτές που μετρήθηκαν πειραματικά, A , A_2 , A_3 και A_4) της ενεργότητας του ενζύμου. Στα Σχήματα 16 έως και 19 παρουσιάζονται οι εναπομείνουσες ενεργότητες συναρτήσει των διορθωμένων χρόνων (που πήραμε από το μοντέλο πρώτης τάξης, βλ. Πίνακα 8) και το πώς προσαρμόζονται στο μοντέλο

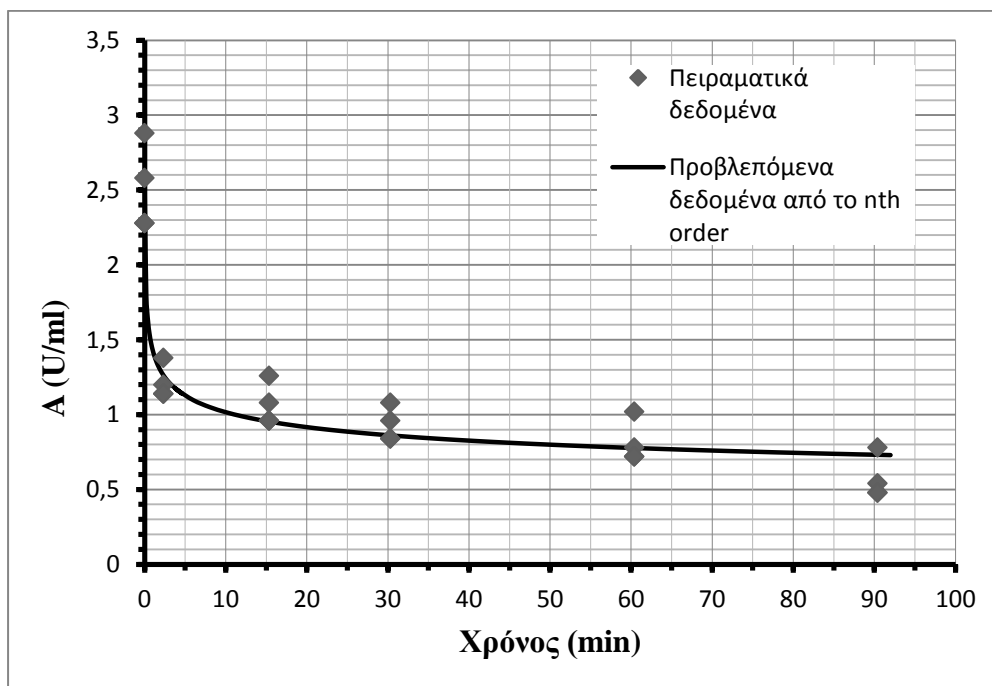
νοστής τάξης, οι οποίοι όμως ήταν δυνατό να διορθωθούν περαιτέρω με την τιμή F για το nth order μοντέλο πλέον.

Πίνακας 9. Καταχώρηση δεδομένων στο JMP. Οι τιμές των t και A αντιστοιχούν στα δεδομένα των 50,5°C, ενώ οι τιμές των t₂ - A₂, t₃ - A₃ και t₄ - A₄ σε αυτά των 55,5°C, 60,3° και 70°C αντίστοιχα.

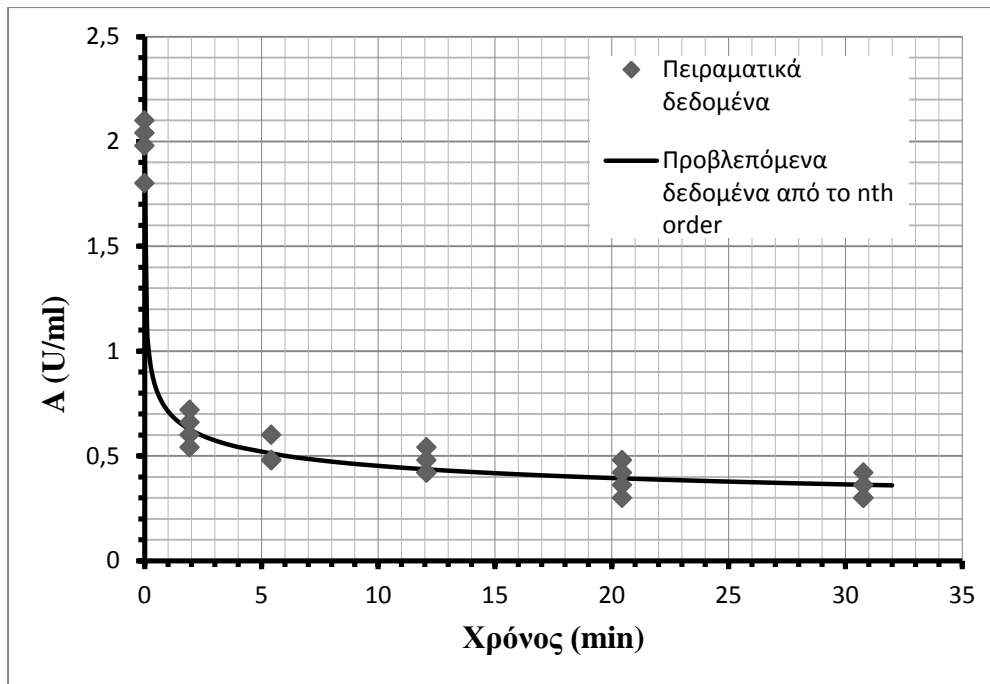
t	A	predicted	Fitted predicted	t 2	A 2	predicted 2	Fitted predicted 2
0	2,4	0,5517553	2,41503336	0	2,88	0,5	2,50476763
2,17669493	1,62	0,59272923	1,59028029	2,20703801	1,38	0,36076009	1,27179467
9,259319779	1,32	0,72991388	1,28509465	15,2057048	1,26	0,23783928	0,95452803
17,14644203	1,26	0,88898994	1,1711151	30,2045836	1,08	0,20163367	0,86160597
30,1483076	0,96	1,16389032	1,0751851	60,2796369	1,02	0,17020832	0,77714174
60,20720193	0,96	1,84917425	0,96791202	90,2839684	0,78	0,15403039	0,73164156
0	2,4	0,5517553	2,41503336	0	2,58	0,5	2,50476763
2,17669493	1,62	0,59272923	1,59028029	2,20703801	1,2	0,36076009	1,27179467
9,259319779	1,26	0,72991388	1,28509465	15,2057048	1,08	0,23783928	0,95452803
17,14644203	1,2	0,88898994	1,1711151	30,2045836	0,96	0,20163367	0,86160597
30,1483076	1,02	1,16389032	1,0751851	60,2796369	0,78	0,17020832	0,77714174
60,20720193	1,02	1,84917425	0,96791202	90,2839684	0,54	0,15403039	0,73164156
0	2,34	0,5517553	2,41503336	0	2,28	0,5	2,50476763
2,17669493	1,5	0,59272923	1,59028029	2,20703801	1,14	0,36076009	1,27179467
9,259319779	1,24	0,72991388	1,28509465	15,2057048	0,96	0,23783928	0,95452803
17,14644203	1,14	0,88898994	1,1711151	30,2045836	0,84	0,20163367	0,86160597
30,1483076	0,96	1,16389032	1,0751851	60,2796369	0,72	0,17020832	0,77714174
60,20720193	0,96	1,84917425	0,96791202	90,2839684	0,48	0,15403039	0,73164156
0	2,52	0,5517553	2,41503336	0	2,28	0,5	2,50476763
2,17669493	1,62	0,59272923	1,59028029	2,20703801	1,14	0,36076009	1,27179467
9,259319779	1,34	0,72991388	1,28509465	15,2057048	0,96	0,23783928	0,95452803
17,14644203	1,2	0,88898994	1,1711151	30,2045836	0,84	0,20163367	0,86160597
30,1483076	1,08	1,16389032	1,0751851	60,2796369	0,72	0,17020832	0,77714174
60,20720193	1,08	1,84917425	0,96791202	90,2839684	0,48	0,15403039	0,73164156
t 3	A 3	predicted 3	Fitted predicted 3	t 4	A 4	predicted 4	Fitted predicted 4
0	2,1	0,5	1,9799966	0	2,4	0,5	2,34000648
1,8068193	0,66	0,37377703	0,63463963	0,51079737	0,52	0,44301816	0,48514882
5,3068193	0,6	0,30246386	0,51301084	0,67746404	0,42	0,43014519	0,44552366
11,9421565	0,54	0,25177115	0,43700217	1,42746404	0,36	0,38863632	0,3556474
20,3155854	0,48	0,22193978	0,39341045	3,44710031	0,3	0,33108925	0,27231934
30,6487932	0,42	0,20091833	0,36267702	5,40162812	0,24	0,30130503	0,23766795
0	2,04	0,5	1,9799966	0	1,98	0,5	2,34000648
1,8068193	0,72	0,37377703	0,63463963	0,51079737	0,48	0,44301816	0,48514882
5,3068193	0,48	0,30246386	0,51301084	0,67746404	0,36	0,43014519	0,44552366
11,9421565	0,48	0,25177115	0,43700217	1,42746404	0,3	0,38863632	0,3556474
20,3155854	0,42	0,22193978	0,39341045	3,44710031	0,24	0,33108925	0,27231934
30,6487932	0,3	0,20091833	0,36267702	5,40162812	0,18	0,30130503	0,23766795
0	1,98	0,5	1,9799966	0	2,28	0,5	2,34000648
1,8068193	0,6	0,37377703	0,63463963	0,51079737	0,54	0,44301816	0,48514882
5,3068193	0,48	0,30246386	0,51301084	0,67746404	0,42	0,43014519	0,44552366
11,9421565	0,42	0,25177115	0,43700217	1,42746404	0,36	0,38863632	0,3556474
20,3155854	0,3	0,22193978	0,39341045	3,44710031	0,3	0,33108925	0,27231934
30,6487932	0,3	0,20091833	0,36267702	5,40162812	0,21	0,30130503	0,23766795
0	1,8	0,5	1,9799966	0	2,7	0,5	2,34000648
1,8068193	0,54	0,37377703	0,63463963	0,51079737	0,54	0,44301816	0,48514882
5,3068193	0,48	0,30246386	0,51301084	0,67746404	0,42	0,43014519	0,44552366
11,9421565	0,42	0,25177115	0,43700217	1,42746404	0,36	0,38863632	0,3556474
20,3155854	0,36	0,22193978	0,39341045	3,44710031	0,34	0,33108925	0,27231934
30,6487932	0,36	0,20091833	0,36267702	5,40162812	0,3	0,30130503	0,23766795



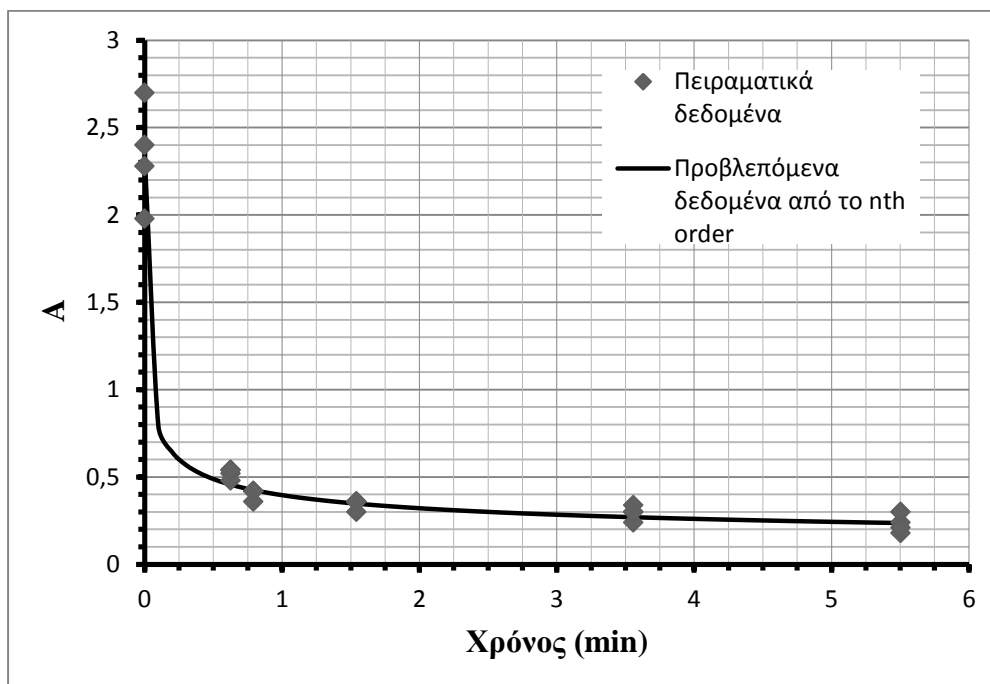
Σχήμα 16. Υπολειπόμενη ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου στους 50°,5C για το μοντέλο νιοστής τάξης.



Σχήμα 17. Υπολειπόμενη ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου στους 55°,5C για το μοντέλο νιοστής τάξης.



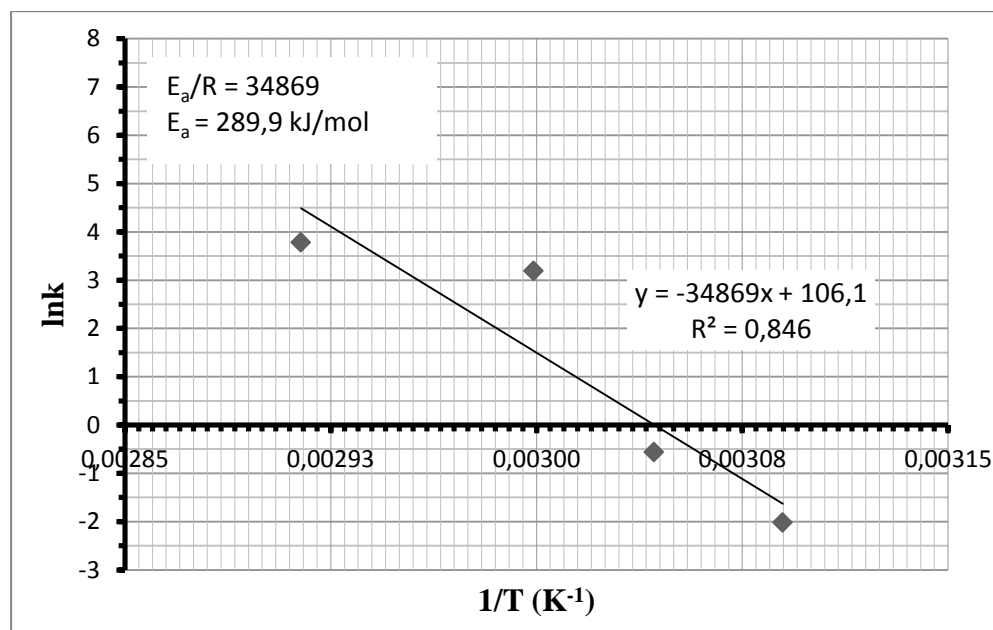
Σχήμα 18. Υπολειπόμενη ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου στους 60°,3C για το μοντέλο νιοστής τάξης.



Σχήμα 19. Υπολειπόμενη ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου στους 70°C για το μοντέλο νιοστής τάξης.

Στη συνέχεια, δημιουργούμε διάγραμμα με τις τιμές του k που εκτιμήθηκαν από το JMP, όπου παρουσιάζονται αυτές σε συνάρτηση με τις θερμοκρασίες. Από την

κλίση της ευθείας προκύπτει ο λόγος $-E_a/R$ και κατ' επέκταση η τιμή της E_a που βρέθηκε ίση με 289,9 kJ/mol.



Σχήμα 20. Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για το μοντέλο νιοστής τάξης, πριν τη διόρθωση των χρόνων με την τιμή F αυτού του μοντέλου.

Έχοντας υπολογίσει τις άγνωστες παραμέτρους, χρησιμοποιήσαμε την τιμή F για το μοντέλο νιοστής τάξης (Taoukis and Labuza, 1989), έτσι ώστε να διορθώσουμε τους χρόνους με βάση αυτό. Ο χρόνος $F_{T_{ref}}$ είναι ο ισοδύναμος χρόνος σε μια επιλεγμένη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} που επιφέρει το ίδιο αποτέλεσμα με την υπό εξέταση επεξεργασία, κατά την οποία η θερμοκρασία των δειγμάτων δεν ήταν σταθερή.

$$F_{T_{ref}}^{E_a} = \int_{t_a}^{t_b} 10^{\left(\frac{E_a}{\ln(10) \cdot Rg} \cdot \frac{(T - T_{ref})}{T \cdot T_{ref}}\right)} \cdot dt \quad (17)$$

Με την διαδικασία που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, πραγματοποιήσαμε συνεχείς διορθώσεις στους χρόνους. Κάθε φορά χρησιμοποιήθηκαν οι τελευταίοι χρόνοι για την εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου και οι δοκιμές έπαψαν όταν ο λόγος E_a/R δε μεταβαλλόταν σημαντικά.

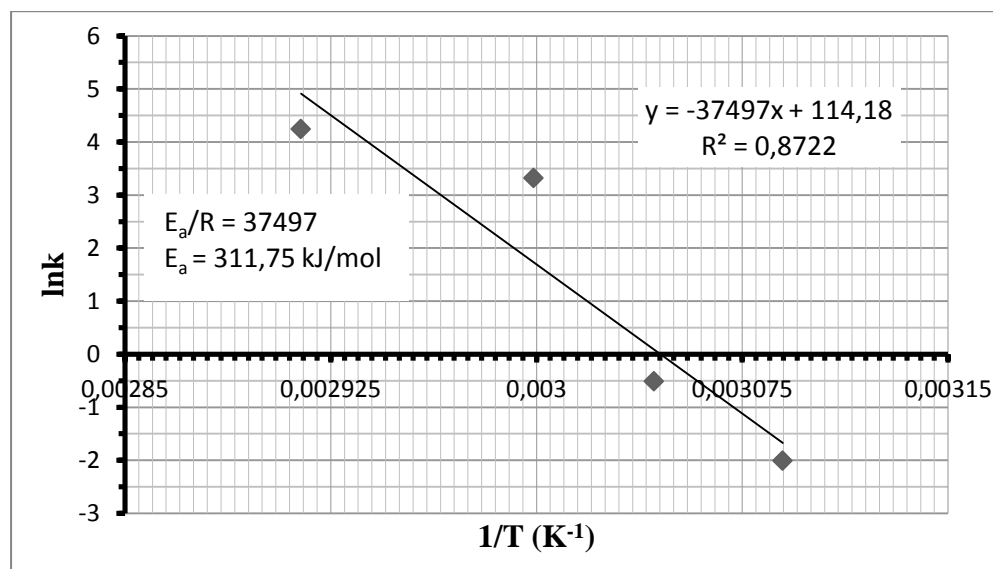
Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι παράμετροι που εκτίμησε το JMP μετά την τελευταία διόρθωση στους χρόνους. Όπως φαίνεται εκεί (όπου DFE οι βαθμοί ελευθερίας του μοντέλου που προκύπτουν αν από το πλήθος των μετρήσεων αφαιρεθεί ο αριθμός των παραμέτρων του μοντέλου) και πιο συγκεκριμένα από τις τιμές των διαφόρων σφαλμάτων (SSE το άθροισμα των τετραγώνων των σφαλμάτων, MSE ο μέσος όρος των τετραγώνων των σφαλμάτων και RMSE η τυπική απόκλιση) οι οποίες πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερες, αλλά και από το συντελεστή συσχέτισης (R^2), το μοντέλο νιοστής τάξης ανταποκρίνεται καλά στην προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων. Η αδυναμία υπολογισμού των διαστημάτων εμπιστοσύνης στην περίπτωση των 70°C από το συγκεκριμένο μοντέλο πιθανόν να οφείλεται στη διαφορά μεταξύ των επαναλήψεων για την τιμή της αρχικής ενεργότητας A_0 και ενώ αυτό είναι κάτι αναμενόμενο όσον αφορά τα πειραματικά δεδομένα (διαφορετικοί καρποί, διαφορετικές αρχικές ενεργότητες), στο μοντέλο νιοστής τάξης αποτελεί παράμετρο προς εκτίμηση με αποτέλεσμα να έχει σημαντική επίδραση στους υπολογισμούς του JMP.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μη γραμμικής παλινδρόμησης. Οι εκτιμώμενες παράμετροι που απεικονίζονται εδώ, έχουν προκύψει από διορθωμένους χρόνους της τιμής F που αντιστοιχεί στο νιοστής τάξης μοντέλο.

50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,090331	21	0,0043015	0,065586	0,984362	0,6977606	21	0,0332267	0,182282	0,929338
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
n	7,556971	0,48568671	6,652348	8,712479	n	7,693524	1,38850038	5,644929	12,50539
A0	2,415033	0,03279075	2,346847	2,483223	A0	2,504768	0,09114089	2,315138	2,694362
k	0,134538	0,01164324	0,110824	0,15999	k	0,600138	0,22710534	0,316749	1,829883
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,121554	21	0,0057883	0,076081	0,98468	0,30122	21	0,0143438	0,119766	0,977778
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
n	6,054159	0,8756677	4,698016	8,84195	n	4,298043	1,01322912	.	9,272886
A0	1,979997	0,03804044	1,900887	2,059106	A0	2,340006	0,05988282	2,215474	2,464539
k	27,75936	22,330076	7,762544	334,1625	k	69,7553	88,8570809	.	.

Στο Σχήμα 21 βλέπουμε το αντίστοιχο γράφημα με αυτό του Σχήματος 20 αλλά με την παράμετρο k που προέκυψε από τους διορθωμένους χρόνους του nth order μοντέλου (Πίνακας 11). Παρατηρούμε ότι η τιμή του R^2 βελτιώθηκε σε σχέση

με την προηγούμενη, ενώ η τιμή της E_a μετά τις διορθώσεις (311,75 kJ/mol) βρίσκεται αρκετά κοντά σε αυτή που προέκυψε από τους μη διορθωμένους χρόνους.



Σχήμα 21. Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για το μοντέλο νιοστής τάξης, μετά από τη διόρθωση των χρόνων με την τιμή F του μοντέλου αυτού.

Πίνακας 11. Διορθωμένοι χρόνοι, καταγεγραμμένες θερμοκρασίες και εκτιμώμενες σταθερές ρυθμού απενεργοποίησης μετά από τις διορθώσεις με την τιμή F του μοντέλου νιοστής τάξης. Οι θερμοκρασίες και οι $\ln k$ χρησιμοποιήθηκαν στο Σχήμα 21.

T (°C)	1/T (K ⁻¹)	t (min)	k ((U/mL) ¹⁻ⁿ · min ⁻¹)	lnk
50,5	0,00309	2,176695	0,134538	-2,00591
		9,25932		
		17,14644		
		30,14831		
		60,2072		
55,5	0,003043	2,207038	0,600138	-0,5106
		15,2057		
		30,20458		
		60,27964		
60,3	0,002999	1,806819	27,75935	3,323573
		5,306819		
		11,94216		
		20,31559		
70	0,002914	30,64879	69,7553	4,244993
		0,510797		
		0,677464		
		1,427464		
		3,4471		
		5,401628		

3.1.3. Δοκιμή μοντέλου μερικής μετατροπής και Weibull

Έχοντας υπολογίσει αυστηρότερους χρόνους από ένα μοντέλο το οποίο ανταποκρίνεται καλύτερα στην προσαρμογή των δεδομένων μας από το αντίστοιχο της πρώτης τάξης, δοκιμάσαμε ακόμη 2 μοντέλα κινητικής απενεργοποίησης: αυτό της μερικής μετατροπής (fractional) και το Weibull. Περαιτέρω διορθώσεις βάση αυτών των 2 στους χρόνους δεν είναι εφικτές, καθώς δε δίνονται κατάλληλες εξισώσεις για την τιμή F στην βιβλιογραφία. Η εφαρμογή του διφασικού μοντέλου (biphasic) δεν κρίθηκε ασφαλής καθώς δεν πραγματοποιήθηκε πείραμα που να επιβεβαιώνει την ύπαρξη 2 (ή περισσότερων) ισοενζύμων με διαφορετική θερμοανθεκτικότητα και επιπλέον η χρήση του, σε αντίθεση με το μερικής μετατροπής, προϋποθέτει την πλήρη σχεδόν απενεργοποίηση όλων των ισοτύπων, μετά από αρκετό χρόνο επεξεργασίας.

Αρχικά, με μία μη γραμμική παλινδρόμηση στα δεδομένα που έχουμε περάσει στο JMP, υπολογίζουμε τις παραμέτρους του μοντέλου μερικής μετατροπής, οι οποίες είναι το A_0 , το A_f και το k (min^{-1}). Η εξίσωση που ενσωματώσαμε στα δεδομένα εναπομένουσας ενεργότητας προκύπτει από την Εξίσωση (9) και έχει ως εξής:

$$A = \frac{A_0 - A_f}{e^{k \cdot t}} + A_f \quad (18)$$

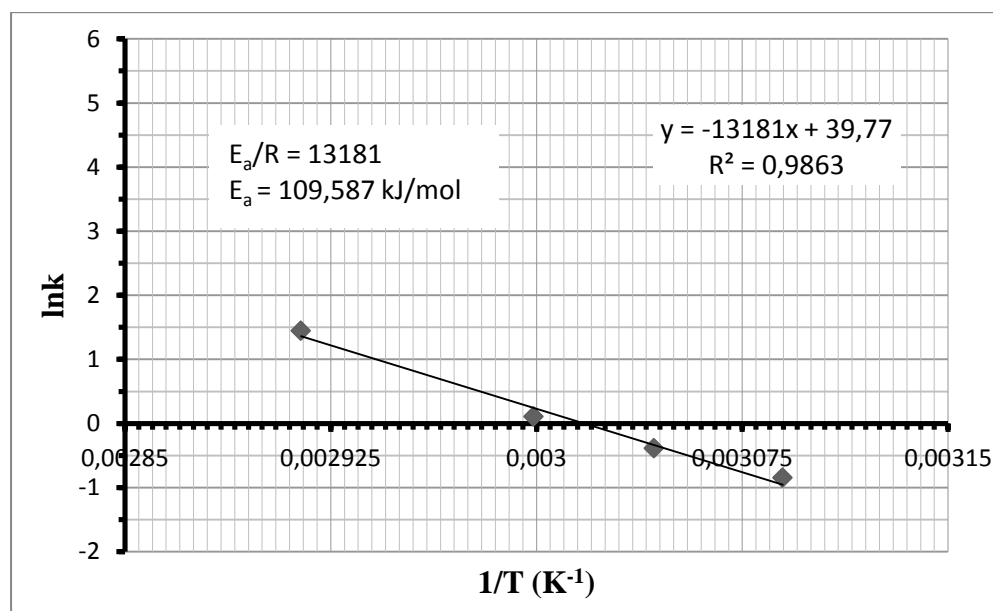
Πίνακας 12. Καταχώρηση δεδομένων στο JMP. Οι τιμές των t και A αντιστοιχούν στα δεδομένα των 50,5°C, ενώ οι τιμές των t₂ - A₂, t₃ - A₃ και t₄ - A₄ σε αυτά των 55,5°C, 60,3° και 70°C αντίστοιχα.

t	A	predicted	Fitted predicted	t 2	A 2	predicted 2	Fitted predicted 2
0	2,4	2	2,40514964	0	2,88	2	2,50495684
2,17669493	1,62	0,3000319	1,62249989	2,20703801	1,38	0,30002741	1,21522571
9,259319779	1,32	0,3	1,13762676	15,2057048	1,26	0,3	0,84374551
17,14644203	1,26	0,3	1,11380464	30,2045836	1,08	0,3	0,84369066
30,1483076	0,96	0,3	1,11296117	60,2796369	1,02	0,3	0,84369066
60,20720193	0,96	0,3	1,11295791	90,2839684	0,78	0,3	0,84369066
0	2,4	2	2,40514964	0	2,58	2	2,50495684
2,17669493	1,62	0,3000319	1,62249989	2,20703801	1,2	0,30002741	1,21522571
9,259319779	1,26	0,3	1,13762676	15,2057048	1,08	0,3	0,84374551
17,14644203	1,2	0,3	1,11380464	30,2045836	0,96	0,3	0,84369066
30,1483076	1,02	0,3	1,11296117	60,2796369	0,78	0,3	0,84369066
60,20720193	1,02	0,3	1,11295791	90,2839684	0,54	0,3	0,84369066
0	2,34	2	2,40514964	0	2,28	2	2,50495684
2,17669493	1,5	0,3000319	1,62249989	2,20703801	1,14	0,30002741	1,21522571
9,259319779	1,24	0,3	1,13762676	15,2057048	0,96	0,3	0,84374551
17,14644203	1,14	0,3	1,11380464	30,2045836	0,84	0,3	0,84369066
30,1483076	0,96	0,3	1,11296117	60,2796369	0,72	0,3	0,84369066
60,20720193	0,96	0,3	1,11295791	90,2839684	0,48	0,3	0,84369066
0	2,52	2	2,40514964	0	2,28	2	2,50495684
2,17669493	1,62	0,3000319	1,62249989	2,20703801	1,14	0,30002741	1,21522571
9,259319779	1,34	0,3	1,13762676	15,2057048	0,96	0,3	0,84374551
17,14644203	1,2	0,3	1,11380464	30,2045836	0,84	0,3	0,84369066
30,1483076	1,08	0,3	1,11296117	60,2796369	0,72	0,3	0,84369066
60,20720193	1,08	0,3	1,11295791	90,2839684	0,48	0,3	0,84369066
t 3	A 3	predicted 3	Fitted predicted 3	t 4	A 4	predicted 4	Fitted predicted 4
0	2,1	2	1,97956679	0	2,4	2	2,33976905
1,8068193	0,66	0,30020276	0,63487079	0,51079737	0,52	0,43221068	0,52342122
5,3068193	0,6	0,3	0,42963092	0,67746404	0,42	0,35745852	0,40430131
11,9421565	0,54	0,3	0,42531233	1,42746404	0,36	0,30135129	0,29321202
20,3155854	0,48	0,3	0,42530958	3,44710031	0,3	0,30000006	0,28839865
30,6487932	0,42	0,3	0,42530958	5,40162812	0,24	0,3	0,28839774
0	2,04	2	1,97956679	0	1,98	2	2,33976905
1,8068193	0,72	0,30020276	0,63487079	0,51079737	0,48	0,43221068	0,52342122
5,3068193	0,48	0,3	0,42963092	0,67746404	0,36	0,35745852	0,40430131
11,9421565	0,48	0,3	0,42531233	1,42746404	0,3	0,30135129	0,29321202
20,3155854	0,42	0,3	0,42530958	3,44710031	0,24	0,30000006	0,28839865
30,6487932	0,3	0,3	0,42530958	5,40162812	0,18	0,3	0,28839774
0	1,98	2	1,97956679	0	2,28	2	2,33976905
1,8068193	0,6	0,30020276	0,63487079	0,51079737	0,54	0,43221068	0,52342122
5,3068193	0,48	0,3	0,42963092	0,67746404	0,42	0,35745852	0,40430131
11,9421565	0,42	0,3	0,42531233	1,42746404	0,36	0,30135129	0,29321202
20,3155854	0,3	0,3	0,42530958	3,44710031	0,3	0,30000006	0,28839865
30,6487932	0,3	0,3	0,42530958	5,40162812	0,21	0,3	0,28839774
0	1,8	2	1,97956679	0	2,7	2	2,33976905
1,8068193	0,54	0,30020276	0,63487079	0,51079737	0,54	0,43221068	0,52342122
5,3068193	0,48	0,3	0,42963092	0,67746404	0,42	0,35745852	0,40430131
11,9421565	0,42	0,3	0,42531233	1,42746404	0,36	0,30135129	0,29321202
20,3155854	0,36	0,3	0,42530958	3,44710031	0,34	0,30000006	0,28839865
30,6487932	0,36	0,3	0,42530958	5,40162812	0,3	0,3	0,28839774

Ακολουθούν τα αποτελέσματα που δίνει το JMP για τις παραμέτρους του μοντέλου μερικής μετατροπής, οι συντελεστές συσχέτισης καθώς και τα διάφορα σφάλματα, σε καθεμιά από τις πειραματικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 13. Αποτελέσματα μη γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου μερικής μετατροπής. Οι παράμετροι που απεικονίζονται εδώ έχουν προκύψει από τους τελικούς διορθωμένους χρόνους του Πίνακα 10.

50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²	SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
0,282144	21	0,0134354	0,115911	0,951154	1,0382782	21	0,0494418	0,222355	0,894854
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
A0	2,40515	0,05787215	2,281276	2,527747	A0	2,504957	0,11117758	2,273719	2,736176
Af	1,112958	0,03021817	1,047226	1,176663	Af	0,843691	0,05560023	0,727998	0,959328
k	0,427521	0,0591692	0,293052	0,589856	k	0,678598	0,14859704	0,438466	1,206786
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²	SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
0,180018	21	0,0085723	0,092587	0,977312	0,3106245	21	0,0147916	0,121621	0,977084
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
A0	1,979567	0,04629286	1,883249	2,075877	A0	2,339769	0,06080348	2,213303	2,466235
Af	0,42531	0,02347399	0,376062	0,474226	Af	0,288398	0,03528825	0,213953	0,361415
k	1,108986	0,13578638	0,874187	1,520078	k	4,241561	0,53382867	3,369651	6,007276



Σχήμα 22. Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για το μοντέλο μερικής μετατροπής.

Έπειτα, δοκιμάσαμε προσαρμογή των δεδομένων μας στην κατανομή Weibull. Οι παράμετροι που πρέπει να υπολογιστούν είναι οι A_0 , α (min) και β . Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε προκύπτει από την Εξίσωση 11 αν επιλύσουμε ως προς A :

$$A = A_0 \cdot e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (19)$$

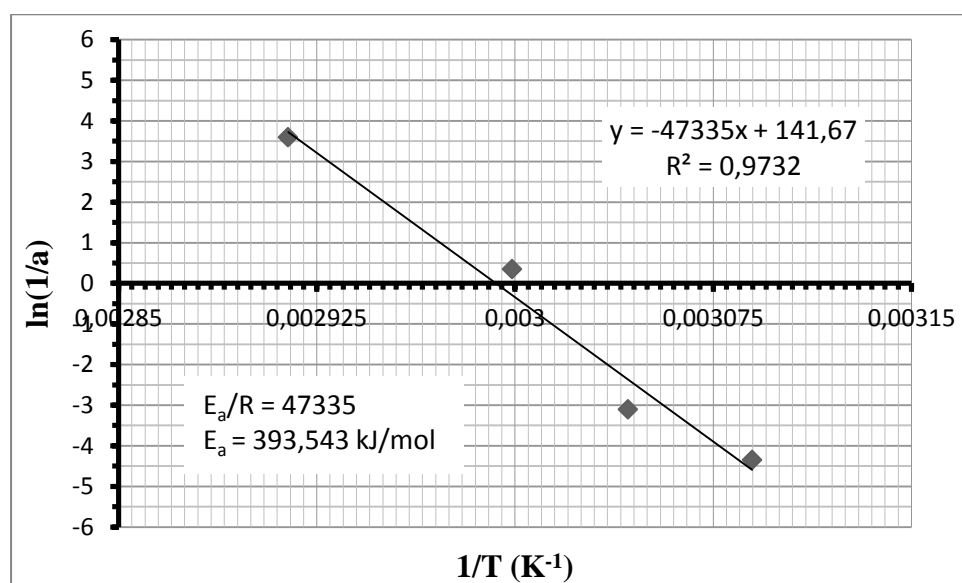
Στον Πίνακα 14 φαίνονται όπως και στην περίπτωση του μοντέλου της νιοστής τάξης τα δεδομένα χρόνου και ενεργότητας όπως καταχωρήθηκαν στο στατιστικό πρόγραμμα JMP. Ακολουθούν συνοπτικά τα αποτελέσματα της μη γραμμικής παλινδρόμησης για την κατανομή Weibull (Πίνακας 15). Όπως φαίνεται από αυτά (SSE, R^2 κτλ.), το συγκεκριμένο κινητικό μοντέλο ανταποκρίνεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα μας.

Πίνακας 14. Καταχώρηση δεδομένων στο JMP. Οι τιμές των t και A αντιστοιχούν στα δεδομένα των 50,5°C, ενώ οι τιμές των t₂ - A₂, t₃ - A₃ και t₄ - A₄ σε αυτά των 55,5°C, 60,3° και 70°C αντίστοιχα.

t	A	predicted	Fitted predicted	t2	A2	predicted 2	Fitted predicted 2
0	2,4	2	2,41749345	0	2,88	2	2,50197229
2,17669493	1,62	1,22928276	1,55925065	2,20703801	1,38	1,22679525	1,28148833
9,259319779	1,32	0,94334748	1,31037906	15,2057048	1,26	0,83619185	0,98183482
17,14644203	1,26	0,80985886	1,19336642	30,2045836	1,08	0,68504572	0,872216
30,1483076	0,96	0,68545636	1,08179721	60,2796369	1,02	0,53522258	0,76257703
60,20720193	0,96	0,53547709	0,94131349	90,2839684	0,78	0,45162157	0,69950513
0	2,4	2	2,41749345	0	2,58	2	2,50197229
2,17669493	1,62	1,22928276	1,55925065	2,20703801	1,2	1,22679525	1,28148833
9,259319779	1,26	0,94334748	1,31037906	15,2057048	1,08	0,83619185	0,98183482
17,14644203	1,2	0,80985886	1,19336642	30,2045836	0,96	0,68504572	0,872216
30,1483076	1,02	0,68545636	1,08179721	60,2796369	0,78	0,53522258	0,76257703
60,20720193	1,02	0,53547709	0,94131349	90,2839684	0,54	0,45162157	0,69950513
0	2,34	2	2,41749345	0	2,28	2	2,50197229
2,17669493	1,5	1,22928276	1,55925065	2,20703801	1,14	1,22679525	1,28148833
9,259319779	1,24	0,94334748	1,31037906	15,2057048	0,96	0,83619185	0,98183482
17,14644203	1,14	0,80985886	1,19336642	30,2045836	0,84	0,68504572	0,872216
30,1483076	0,96	0,68545636	1,08179721	60,2796369	0,72	0,53522258	0,76257703
60,20720193	0,96	0,53547709	0,94131349	90,2839684	0,48	0,45162157	0,69950513
0	2,52	2	2,41749345	0	2,28	2	2,50197229
2,17669493	1,62	1,22928276	1,55925065	2,20703801	1,14	1,22679525	1,28148833
9,259319779	1,34	0,94334748	1,31037906	15,2057048	0,96	0,83619185	0,98183482
17,14644203	1,2	0,80985886	1,19336642	30,2045836	0,84	0,68504572	0,872216
30,1483076	1,08	0,68545636	1,08179721	60,2796369	0,72	0,53522258	0,76257703
60,20720193	1,08	0,53547709	0,94131349	90,2839684	0,48	0,45162157	0,69950513
t3	A3	predicted 3	Fitted predicted 3	t4	A4	predicted 4	Fitted predicted 4
0	2,1	2	1,97995772	0	2,4	2	2,34006953
1,8068193	0,66	1,26222862	0,63047683	0,51079737	0,52	1,45947117	0,47927123
5,3068193	0,6	1,05892048	0,52072234	0,67746404	0,42	1,41937911	0,44585498
11,9421565	0,54	0,88875947	0,44160878	1,42746404	0,36	1,30251424	0,36250036
20,3155854	0,48	0,77253143	0,39213342	3,44710031	0,3	1,14391287	0,27440108
30,6487932	0,42	0,68183154	0,35539112	5,40162812	0,24	1,0553399	0,23442174
0	2,04	2	1,97995772	0	1,98	2	2,34006953
1,8068193	0,72	1,26222862	0,63047683	0,51079737	0,48	1,45947117	0,47927123
5,3068193	0,48	1,05892048	0,52072234	0,67746404	0,36	1,41937911	0,44585498
11,9421565	0,48	0,88875947	0,44160878	1,42746404	0,3	1,30251424	0,36250036
20,3155854	0,42	0,77253143	0,39213342	3,44710031	0,24	1,14391287	0,27440108
30,6487932	0,3	0,68183154	0,35539112	5,40162812	0,18	1,0553399	0,23442174
0	1,98	2	1,97995772	0	2,28	2	2,34006953
1,8068193	0,6	1,26222862	0,63047683	0,51079737	0,54	1,45947117	0,47927123
5,3068193	0,48	1,05892048	0,52072234	0,67746404	0,42	1,41937911	0,44585498
11,9421565	0,42	0,88875947	0,44160878	1,42746404	0,36	1,30251424	0,36250036
20,3155854	0,3	0,77253143	0,39213342	3,44710031	0,3	1,14391287	0,27440108
30,6487932	0,3	0,68183154	0,35539112	5,40162812	0,21	1,0553399	0,23442174
0	1,8	2	1,97995772	0	2,7	2	2,34006953
1,8068193	0,54	1,26222862	0,63047683	0,51079737	0,54	1,45947117	0,47927123
5,3068193	0,48	1,05892048	0,52072234	0,67746404	0,42	1,41937911	0,44585498
11,9421565	0,42	0,88875947	0,44160878	1,42746404	0,36	1,30251424	0,36250036
20,3155854	0,36	0,77253143	0,39213342	3,44710031	0,34	1,14391287	0,27440108
30,6487932	0,36	0,68183154	0,35539112	5,40162812	0,3	1,0553399	0,23442174

Πίνακας 15. Αποτελέσματα μη γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των παραμέτρων της κατανομής Weibull. Οι παράμετροι που απεικονίζονται εδώ έχουν προκύψει από τους τελικούς διορθωμένους χρόνους του Πίνακα 10.

Weibull									
50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²	SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
0,107159	21	0,0051028	0,071434	0,981448	0,643323	21	0,0306344	0,175027	0,934851
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
α	77,57439	12,2439803	57,77408	113,1266	α	22,33618	7,26176656	10,57574	45,87263
β	0,230685	0,01927637	0,191858	0,271478	β	0,173634	0,03499432	0,102729	0,250584
A0	2,417493	0,03569278	2,343442	2,491578	A0	2,501972	0,08749851	2,319581	2,684281
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²	SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
0,120099	21	0,005719	0,075624	0,984863	0,303424	21	0,0144488	0,120203	0,977616
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
α	0,705779	0,33796321	0,158113	1,510802	α	0,027528	0,03206865	.	0,127807
β	0,143444	0,02488298	0,092098	0,195605	β	0,157837	0,04677346	.	0,260997
A0	1,979958	0,03781172	1,901322	2,058594	A0	2,34007	0,06010136	2,215086	2,465054



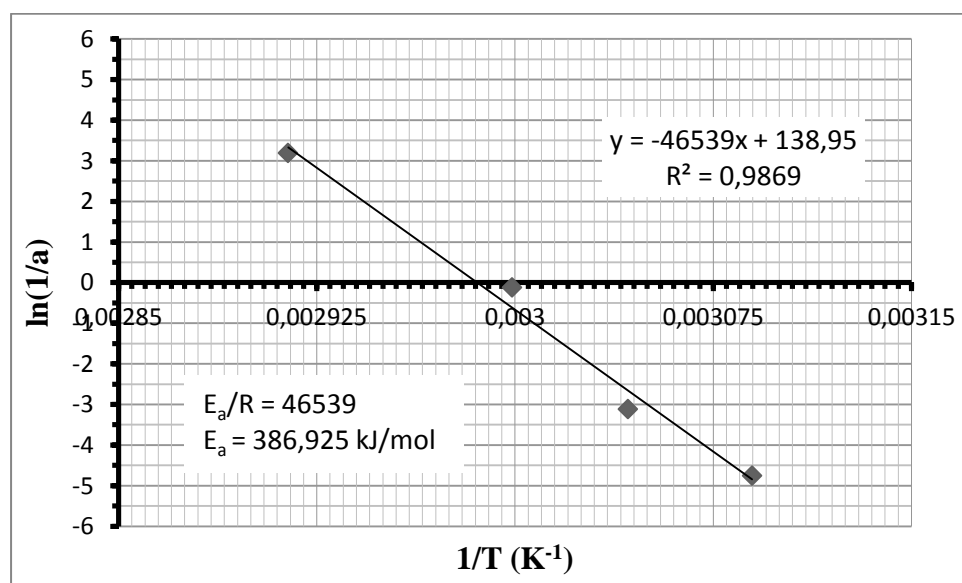
Σχήμα 23. Εξάρτηση της παραμέτρου μεγέθους από τη θερμοκρασία για το μοντέλο Weibull.

Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως η παράμετρος β φαίνεται να έχει παραπλήσιες τιμές για κάθε θερμοκρασία, γεγονός που δείχνει ότι δεν είναι εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία και εν τέλει να μην αποτελεί παράμετρο στο μοντέλο μας. Έτσι, δοκιμάσαμε να πάρουμε το μέσο όρο από τις τέσσερις τιμές του β (ίσο με 0,176400122), ο οποίος βρίσκεται εντός των ορίων των διαστημάτων εμπιστοσύνης

σε κάθε περίπτωση. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι τιμές που εκτιμά το πρόγραμμα για τη Weibull με σταθερό β :

Πίνακας 16. Αποτελέσματα μη γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των παραμέτρων της κατανομής Weibull με προσαρμοσμένο β .

50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²	SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
0,151021	22	0,0068646	0,082853	0,973855	0,643512	22	0,0292505	0,171028	0,934832
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
α	115,5985	21,2840342	80,07017	171,1679	α	22,43054	6,9484363	12,07546	43,87426
A0	2,43919	0,04043999	2,355705	2,522806	A0	2,500542	0,08385412	2,326914	2,674581
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²	SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
0,130051	22	0,0059114	0,076886	0,983609	0,305639	22	0,0138927	0,117867	0,977452
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
α	1,125803	0,1884818	0,795042	1,599802	α	0,041064	0,00981418	0,024683	0,066977
A0	1,975046	0,03825704	1,895623	2,054493	A0	2,338906	0,05885811	2,216813	2,461014

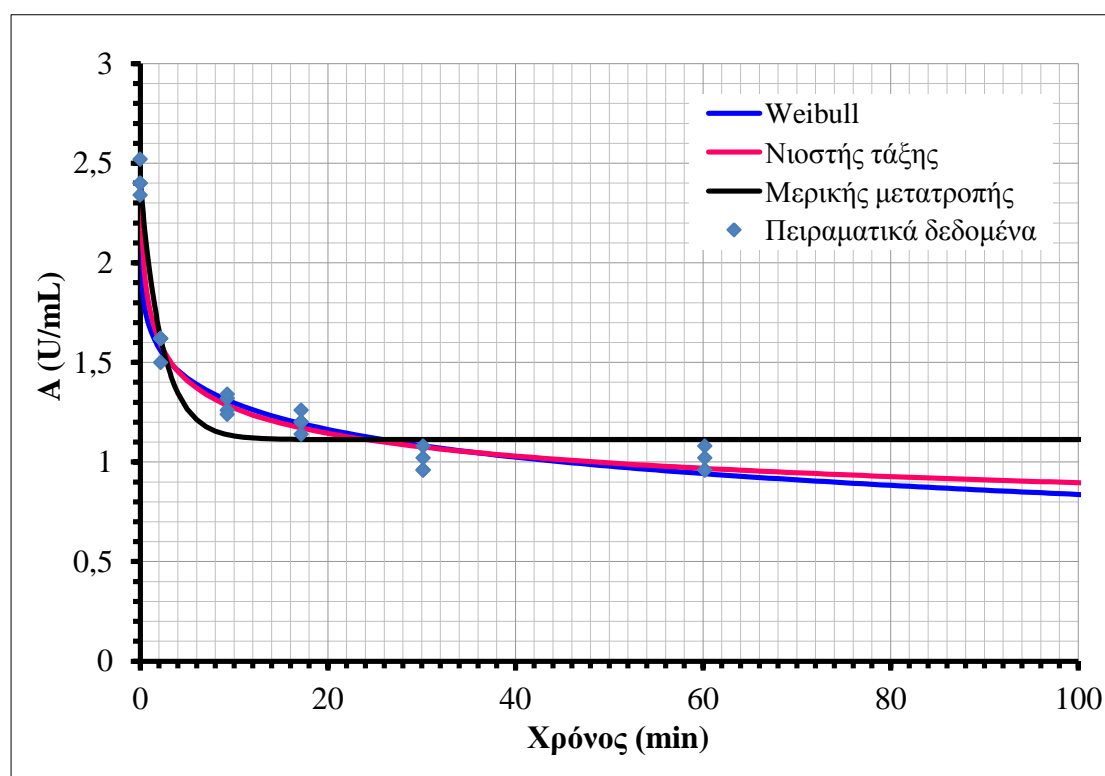


Σχήμα 24. Εξάρτηση της παραμέτρου μεγέθους από τη θερμοκρασία, σε Weibull με σταθερό β .

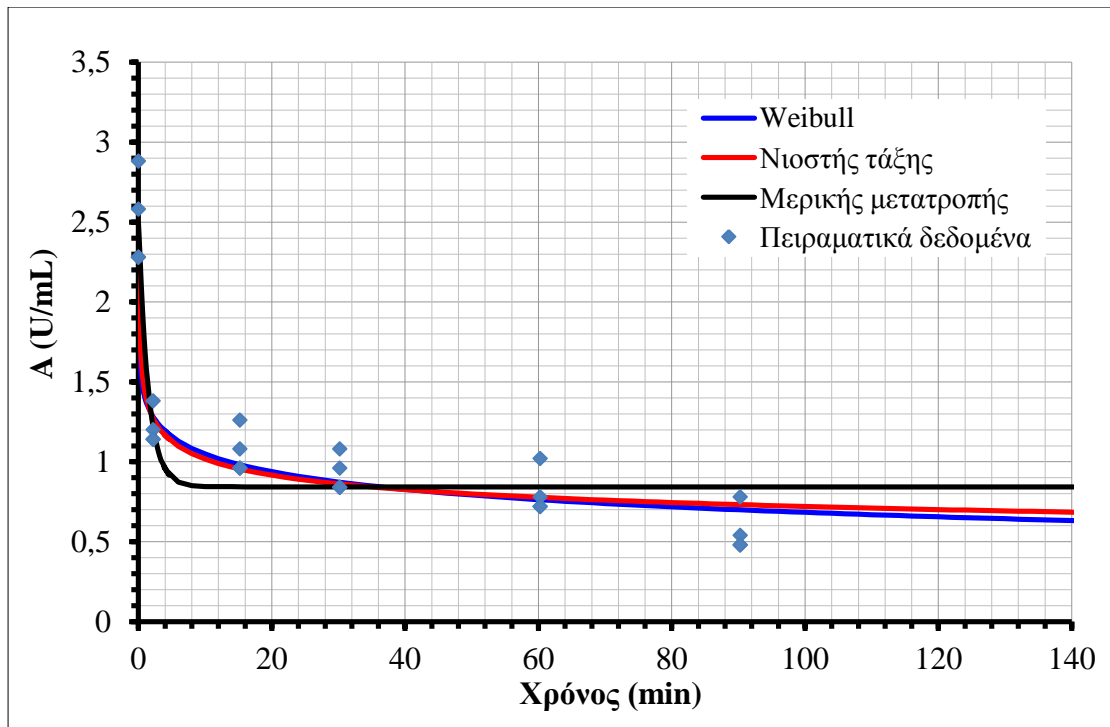
Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, τόσο οι τιμές R^2 για τα δεδομένα σε κάθε θερμοκρασία (Πίνακας 16), όσο η ενέργεια ενεργοποίησης (Σχήμα 23) είναι πλησίον των αντίστοιχων τιμών που παίρνουμε από την κατανομή Weibull των 3 παραμέτρων (Πίνακας 15 και Σχήμα 22, αντιστοίχως). Επί τούτου, και οι 2 παραλλαγές που δοκιμάσαμε για το Weibull κρίνονται ως επαρκείς και αξιόπιστες για να προσαρμόσουμε πάνω τους τα πειραματικά δεδομένα μας.

3.1.4. Σύγκριση μεταξύ των κινητικών μοντέλων

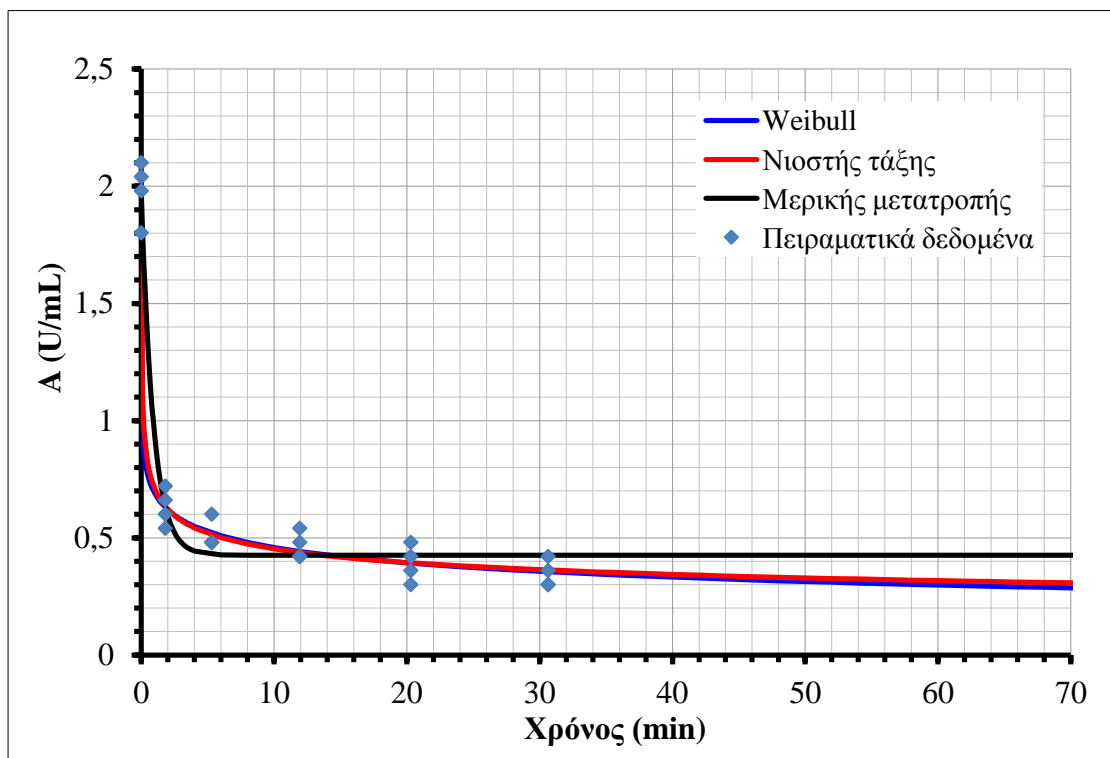
Αφού προσαρμόσαμε τα δεδομένα μας και στα 3 μοντέλα με ικανοποιητικά αποτελέσματα, δημιουργήσαμε γραφήματα (Σχήματα 25-28) όπου μπορούμε να δούμε την τάση που ακολουθούν τα προβλεπόμενα δεδομένα ενεργότητας σε σχέση με τα πραγματικά (πειραματικά) δεδομένα στις 4 θερμοκρασίες, για χρόνους επεξεργασίας μεγαλύτερους από αυτούς που δοκιμάστηκαν πειραματικώς.



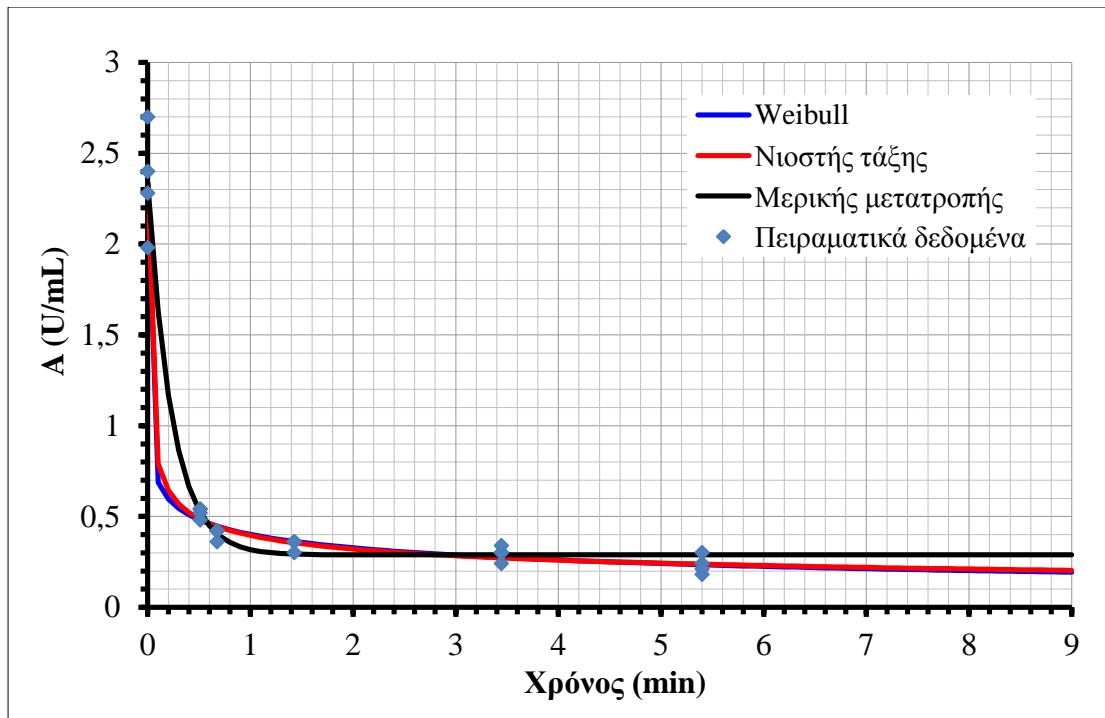
Σχήμα 25. Σύγκριση των προβλεπόμενων τιμών όλων των δοκιμασμένων κινητικών μοντέλων με τα πειραματικά και τάση που ακολουθούν σε μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας στους 50,5°C.



Σχήμα 26. Σύγκριση των προβλεπόμενων τιμών όλων των δοκιμασμένων κινητικών μοντέλων με τα πειραματικά και τάση που ακολουθούν σε μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας στους $55,5^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 27. Σύγκριση των προβλεπόμενων τιμών όλων των δοκιμασμένων κινητικών μοντέλων με τα πειραματικά και τάση που ακολουθούν σε μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας στους $60,3^{\circ}\text{C}$.



Σχήμα 28. Σύγκριση των προβλεπόμενων τιμών όλων των δοκιμασμένων κινητικών μοντέλων με τα πειραματικά και τάση που ακολουθούν σε μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας στους 70°C.

Παρατηρώντας τα ανωτέρω γραφήματα συμπεραίνουμε ότι, όσον αφορά στη γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων, και τα 3 μοντέλα ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στην προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων μας. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση της κατανομής Weibull σε προσαρμογή δεδομένων απενεργοποίησης ενζύμων με θερμική διεργασία δεν απαντάται συχνά. Σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιείται στην περιγραφή δεδομένων κινητικής απενεργοποίησης μικροοργανισμών (Rodrigo *et al.*, 2000· Carreño *et al.*, 2011· Torres *et al.*, 2015) και απενεργοποίησης ενζύμων (Rodrigo *et al.*, 2003· Giner *et al.*, 2005· Elez-Martinez *et al.*, 2007) με μη θερμικές μεθόδους.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 18, οι μικρότερες τιμές του συντελεστή συσχέτισης (R^2) σε όλες τις περιπτώσεις εντοπίζονται στο μοντέλο μερικής μετατροπής (fractional), με τις ελάχιστες τιμές να παρατηρούνται στις περιπτώσεις των 50,5°C και 55,5°C. Οι μεγαλύτερες τιμές για το συντελεστή συσχέτισης παρατηρούνται σε 2 περιπτώσεις (50,5 και 70°C) στο νιοστής τάξης μοντέλο και στις υπόλοιπες 2 (55,5 και 60,3°C) στην κατανομή Weibull. Αντιστοίχως, οι μικρότερες τιμές για το υπολειπόμενο σφάλμα (SSE) μοιράζονται μεταξύ Weibull και νιοστής τάξης. Όσον αφορά τις μεγαλύτερες τιμές σφάλματος, αυτές εντοπίζονται στο

μοντέλο μερικές μετατροπής. Στην περίπτωση της παραλλαγής του Weibull με 2 παραμέτρους, οι τιμές για R^2 και SSE βρίσκονται πολύ κοντά σε αυτές του μοντέλου με τις 3 παραμέτρους. Επιπροσθέτως, το πόσο ιδανικά προσαρμόζονται τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στα δεδομένα μας, μπορούσε να κριθεί και με την αξιολόγηση του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (MSE). Αυτό αποτελεί ένα μέτρο ακριβείας που υπολογίζεται από τον τετραγωνισμό του ξεχωριστού σφάλματος της κάθε τιμής στα δεδομένα, και στη συνέχεια από την εύρεση της μέσης τιμής του αθροίσματος αυτών των τετραγώνων. Συνεπώς, από τις μικρότερες τιμές των σφαλμάτων αλλά και τα μεγαλύτερα R^2 βλέπουμε πως σε όλες τις διαφορετικές θερμοκρασίες τα μοντέλα νιοστής τάξης και Weibull είναι περισσότερο πρόσφορα για την ερμηνεία των δεδομένων υπολειπόμενης ενεργότητας της ηκτινομεθυλεστεράσης.

Πίνακας 17. Σύνοψη στατιστικών παραμέτρων που σχετίζονται με την ερμηνεία της κινητικής απενεργοποίησης της PME από τα μοντέλα που τέθηκαν σε δοκιμή.

Nth order									
50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,090331	21	0,0043015	0,065586	0,984362	0,697761	21	0,0332267	0,182282	0,929338
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,121554	21	0,0057883	0,076081	0,98468	0,30122	21	0,0143438	0,119766	0,977778
Fractional									
50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,282144	21	0,0134354	0,115911	0,951154	1,038278	21	0,0494418	0,222355	0,894854
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,180018	21	0,0085723	0,092587	0,977312	0,310625	21	0,0147916	0,121621	0,977084
Weibull									
50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,107159	21	0,0051028	0,071434	0,981448	0,643323	21	0,0306344	0,175027	0,934851
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,120099	21	0,005719	0,075624	0,984863	0,303424	21	0,0144488	0,120203	0,977616
Weibull with fixed β									
50,5 °C					55,5 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,151021	22	0,0068646	0,082853	0,973855	0,643512	22	0,0292505	0,171028	0,934832
60,3 °C					70 °C				
SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2	SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
0,130051	22	0,0059114	0,076886	0,983609	0,305639	22	0,0138927	0,117867	0,977452

Πίνακας 18. Υπολειπόμενες δραστηκότητες A που υπολογίστηκαν από τα διάφορα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν (με βάση τις εκτιμηθείσες παραμέτρους τους) και οι αντίστοιχες που μετρήθηκαν πειραματικά, σε παράθεση.

50,5 °C					55,5 °C				
Experimental	Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β	Experimental	Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β
2,4	2,4174935	2,4150334	2,40514964	2,43918991	2,1	1,97995772	1,9799966	1,97956679	1,97504551
1,62	1,5592507	1,5902803	1,62249989	1,48503236	0,66	0,63047683	0,63463963	0,63487079	0,6660175
1,32	1,3103791	1,2850947	1,13762676	1,2853708	0,6	0,52072234	0,51301084	0,42963092	0,53047836
1,26	1,1933664	1,171151	1,11380464	1,19421969	0,54	0,44160878	0,43700217	0,42531233	0,43336367
0,96	1,0817972	1,0751851	1,11296117	1,10820147	0,48	0,39213342	0,39341045	0,42530958	0,37336071
0,96	0,9413135	0,967912	1,11295791	1,00036344	0,42	0,35539112	0,36267702	0,42530958	0,32938364
2,4	2,4174935	2,4150334	2,40514964	2,43918991	2,04	1,97995772	1,9799966	1,97956679	1,97504551
1,62	1,5592507	1,5902803	1,62249989	1,48503236	0,72	0,63047683	0,63463963	0,63487079	0,6660175
1,26	1,3103791	1,2850947	1,13762676	1,2853708	0,48	0,52072234	0,51301084	0,42963092	0,53047836
1,2	1,1933664	1,171151	1,11380464	1,19421969	0,48	0,44160878	0,43700217	0,42531233	0,43336367
1,02	1,0817972	1,0751851	1,11296117	1,10820147	0,42	0,39213342	0,39341045	0,42530958	0,37336071
1,02	0,9413135	0,967912	1,11295791	1,00036344	0,3	0,35539112	0,36267702	0,42530958	0,32938364
2,34	2,4174935	2,4150334	2,40514964	2,43918991	1,98	1,97995772	1,9799966	1,97956679	1,97504551
1,5	1,5592507	1,5902803	1,62249989	1,48503236	0,6	0,63047683	0,63463963	0,63487079	0,6660175
1,24	1,3103791	1,2850947	1,13762676	1,2853708	0,48	0,52072234	0,51301084	0,42963092	0,53047836
1,14	1,1933664	1,171151	1,11380464	1,19421969	0,42	0,44160878	0,43700217	0,42531233	0,43336367
0,96	1,0817972	1,0751851	1,11296117	1,10820147	0,3	0,39213342	0,39341045	0,42530958	0,37336071
0,96	0,9413135	0,967912	1,11295791	1,00036344	0,3	0,35539112	0,36267702	0,42530958	0,32938364
2,52	2,4174935	2,4150334	2,40514964	2,43918991	1,8	1,97995772	1,9799966	1,97956679	1,97504551
1,62	1,5592507	1,5902803	1,62249989	1,48503236	0,54	0,63047683	0,63463963	0,63487079	0,6660175
1,34	1,3103791	1,2850947	1,13762676	1,2853708	0,48	0,52072234	0,51301084	0,42963092	0,53047836
1,2	1,1933664	1,171151	1,11380464	1,19421969	0,42	0,44160878	0,43700217	0,42531233	0,43336367
1,08	1,0817972	1,0751851	1,11296117	1,10820147	0,36	0,39213342	0,39341045	0,42530958	0,37336071
1,08	0,9413135	0,967912	1,11295791	1,00036344	0,36	0,35539112	0,36267702	0,42530958	0,32938364
60,3 °C					70 °C				
Experimental	Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β	Experimental	Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β
2,88	2,5019723	2,5047676	2,50495684	2,50054222	2,4	2,34006953	2,34000648	2,33976905	2,3389059
1,38	1,2814883	1,2717947	1,21522571	1,2868719	0,52	0,47927123	0,48514882	0,52342122	0,49149455
1,26	0,9818348	0,954528	0,84374551	0,98293243	0,42	0,44585498	0,44552366	0,40430131	0,45385423
1,08	0,872216	0,861606	0,84369066	0,87163374	0,36	0,36250036	0,3556474	0,29321202	0,36046545
1,02	0,762577	0,7771417	0,84369066	0,76032819	0,3	0,27440108	0,27231934	0,28839865	0,26315208
0,78	0,6995051	0,7316416	0,84369066	0,69632672	0,24	0,23442174	0,23766795	0,28839774	0,21977155
2,58	2,5019723	2,5047676	2,50495684	2,50054222	1,98	2,34006953	2,34000648	2,33976905	2,3389059
1,2	1,2814883	1,2717947	1,21522571	1,2868719	0,48	0,47927123	0,48514882	0,52342122	0,49149455
1,08	0,9818348	0,954528	0,84374551	0,98293243	0,36	0,44585498	0,44552366	0,40430131	0,45385423
0,96	0,872216	0,861606	0,84369066	0,87163374	0,3	0,36250036	0,3556474	0,29321202	0,36046545
0,78	0,762577	0,7771417	0,84369066	0,76032819	0,24	0,27440108	0,27231934	0,28839865	0,26315208
0,54	0,6995051	0,7316416	0,84369066	0,69632672	0,18	0,23442174	0,23766795	0,28839774	0,21977155
2,28	2,5019723	2,5047676	2,50495684	2,50054222	2,28	2,34006953	2,34000648	2,33976905	2,3389059
1,14	1,2814883	1,2717947	1,21522571	1,2868719	0,54	0,47927123	0,48514882	0,52342122	0,49149455
0,96	0,9818348	0,954528	0,84374551	0,98293243	0,42	0,44585498	0,44552366	0,40430131	0,45385423
0,84	0,872216	0,861606	0,84369066	0,87163374	0,36	0,36250036	0,3556474	0,29321202	0,36046545
0,72	0,762577	0,7771417	0,84369066	0,76032819	0,3	0,27440108	0,27231934	0,28839865	0,26315208
0,48	0,6995051	0,7316416	0,84369066	0,69632672	0,21	0,23442174	0,23766795	0,28839774	0,21977155
2,28	2,5019723	2,5047676	2,50495684	2,50054222	2,7	2,34006953	2,34000648	2,33976905	2,3389059
1,14	1,2814883	1,2717947	1,21522571	1,2868719	0,54	0,47927123	0,48514882	0,52342122	0,49149455
0,96	0,9818348	0,954528	0,84374551	0,98293243	0,42	0,44585498	0,44552366	0,40430131	0,45385423
0,84	0,872216	0,861606	0,84369066	0,87163374	0,36	0,36250036	0,3556474	0,29321202	0,36046545
0,72	0,762577	0,7771417	0,84369066	0,76032819	0,34	0,27440108	0,27231934	0,28839865	0,26315208
0,48	0,6995051	0,7316416	0,84369066	0,69632672	0,3	0,23442174	0,23766795	0,28839774	0,21977155

Πίνακας 19. Αποκλίσεις των υπολογισμένων από τα μοντέλα τιμών, από τις αντίστοιχες πειραματικές.

50,5 °C				55,5 °C			
Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β	Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β
0,73%	0,63%	0,21%	1,63%	5,72%	5,71%	5,73%	5,95%
3,75%	1,83%	0,15%	8,33%	4,47%	3,84%	3,81%	0,91%
0,73%	2,64%	13,82%	2,62%	13,21%	14,50%	28,39%	11,59%
5,29%	7,05%	11,60%	5,22%	18,22%	19,07%	21,24%	19,75%
12,69%	12,00%	15,93%	15,44%	18,31%	18,04%	11,39%	22,22%
1,95%	0,82%	15,93%	4,20%	15,38%	13,65%	1,26%	21,58%
0,73%	0,63%	0,21%	1,63%	2,94%	2,94%	2,96%	3,18%
3,75%	1,83%	0,15%	8,33%	12,43%	11,86%	11,82%	7,50%
4,00%	1,99%	9,71%	2,01%	8,48%	6,88%	10,49%	10,52%
0,55%	2,40%	7,18%	0,48%	8,00%	8,96%	11,39%	9,72%
6,06%	5,41%	9,11%	8,65%	6,63%	6,33%	1,26%	11,10%
7,71%	5,11%	9,11%	1,93%	18,46%	20,89%	41,77%	9,79%
3,31%	3,21%	2,78%	4,24%	0,00%	0,00%	0,02%	0,25%
3,95%	6,02%	8,17%	1,00%	5,08%	5,77%	5,81%	11,00%
5,68%	3,64%	8,26%	3,66%	8,48%	6,88%	10,49%	10,52%
4,68%	2,73%	2,30%	4,76%	5,14%	4,05%	1,26%	3,18%
12,69%	12,00%	15,93%	15,44%	30,71%	31,14%	41,77%	24,45%
1,95%	0,82%	15,93%	4,20%	18,46%	20,89%	41,77%	9,79%
4,07%	4,17%	4,56%	3,21%	10,00%	10,00%	9,98%	9,72%
3,75%	1,83%	0,15%	8,33%	16,75%	17,53%	17,57%	23,34%
2,21%	4,10%	15,10%	4,08%	8,48%	6,88%	10,49%	10,52%
0,55%	2,40%	7,18%	0,48%	5,14%	4,05%	1,26%	3,18%
0,17%	0,45%	3,05%	2,61%	8,93%	9,28%	18,14%	3,71%
12,84%	10,38%	3,05%	7,37%	1,28%	0,74%	18,14%	8,50%
60,3 °C				70 °C			
Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β	Weibull	Nth order	Fractional	Weibull fixed β
13,13%	13,03%	13,02%	13,18%	2,50%	2,50%	2,51%	2,55%
7,14%	7,84%	11,94%	6,75%	7,83%	6,70%	0,66%	5,48%
22,08%	24,24%	33,04%	21,99%	6,16%	6,08%	3,74%	8,06%
19,24%	20,22%	21,88%	19,29%	0,69%	1,21%	18,55%	0,13%
25,24%	23,81%	17,29%	25,46%	8,53%	9,23%	3,87%	12,28%
10,32%	6,20%	8,17%	10,73%	2,32%	0,97%	20,17%	8,43%
3,02%	2,92%	2,91%	3,08%	18,19%	18,18%	18,17%	18,13%
6,79%	5,98%	1,27%	7,24%	0,15%	1,07%	9,05%	2,39%
9,09%	11,62%	21,88%	8,99%	23,85%	23,76%	12,31%	26,07%
9,14%	10,25%	12,12%	9,20%	20,83%	18,55%	2,26%	20,16%
2,23%	0,37%	8,17%	2,52%	14,33%	13,47%	20,17%	9,65%
29,54%	35,49%	56,24%	28,95%	30,23%	32,04%	60,22%	22,10%
9,74%	9,86%	9,87%	9,67%	2,63%	2,63%	2,62%	2,58%
12,41%	11,56%	6,60%	12,88%	11,25%	10,16%	3,07%	8,98%
2,27%	0,57%	12,11%	2,39%	6,16%	6,08%	3,74%	8,06%
3,84%	2,57%	0,44%	3,77%	0,69%	1,21%	18,55%	0,13%
5,91%	7,94%	17,18%	5,60%	8,53%	9,23%	3,87%	12,28%
45,73%	52,43%	75,77%	45,07%	11,63%	13,18%	37,33%	4,65%
9,74%	9,86%	9,87%	9,67%	13,33%	13,33%	13,34%	13,37%
12,41%	11,56%	6,60%	12,88%	11,25%	10,16%	3,07%	8,98%
2,27%	0,57%	12,11%	2,39%	6,16%	6,08%	3,74%	8,06%
3,84%	2,57%	0,44%	3,77%	0,69%	1,21%	18,55%	0,13%
5,91%	7,94%	17,18%	5,60%	19,29%	19,91%	15,18%	22,60%
45,73%	52,43%	75,77%	45,07%	21,86%	20,78%	3,87%	26,74%

Στους παραπάνω πίνακες δίνονται συγκεντρωτικά και οι υπολογισμένες από το JMP τιμές για τις υπολειπόμενες ενεργότητες, στην περίπτωση του κάθε κινητικού μοντέλου. Σύμφωνα με τις αποκλίσεις τους από τις πειραματικές τιμές, στην περίπτωση των 50,5°C το μοντέλο μερικής μετατροπής είναι αυτό με τις περισσότερες εκτιμώμενες τιμές με τη μικρότερη απόκλιση (πράσινο χρώμα), ακολουθούμενο από αυτό της νιοστής τάξης. Στην περίπτωση των 55,5°C τα μοντέλα νιοστής τάξης και Weibull με 2 παραμέτρους (σταθερό β) είναι αυτά με τις περισσότερες εκτιμώμενες τιμές με τη μικρότερη απόκλιση. Όσον αφορά στο πείραμα των 60,3°C, εκεί τις περισσότερες τιμές με τη μικρότερη απόκλιση τις έχει η κατανομή Weibull των 2 παραμέτρων, και ακολουθεί το μοντέλο μερικής μετατροπής. Στη δε επεξεργασία των 70°C, οι περισσότερες τιμές με την πιο μικρή απόκλιση εντοπίζονται στο μοντέλο μερικής μετατροπής και ακολούθως στη Weibull των 2 παραμέτρων. Αξίζει όμως να σημειωθεί πως σε όλες τις επεξεργασίες, το μερικής μετατροπής ήταν αυτό που είχε τις περισσότερες τιμές με τη μεγαλύτερη απόκλιση (κόκκινο χρώμα), και μάλιστα με μεγάλη διαφορά τόσο από τις αντίστοιχες πειραματικές όσο και από τις προβλεπόμενες των υπολοίπων μοντέλων γενικότερα. Αυτές οι ακραίες αποκλίσεις είναι που δίνουν στο fractional μοντέλο χειρότερο R^2 εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα.

3.1.5. Ανάλυση σε 1 βήμα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης

Μετά τη δοκιμή που πραγματοποιήσαμε με τα προαναφερθέντα μοντέλα για να διαπιστώσουμε πόσο ιδανικά αποκρίνονται στα μετρούμενα δεδομένα εναπομείνουσας ενεργότητας της πηκτινομεθυλεστεράσης, θα πρέπει να εξετάσουμε την συνολική επίδραση του σημαντικότερου εξωγενούς παράγοντα στην επεξεργασία που πραγματοποιήσαμε, αυτόν της θερμοκρασίας. Από τον μαθηματικό τύπο του Arrhenius (Εξίσωση 3), μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μια παραπλήσια έκφρασή του για να περιγράψουμε την επίδραση της θερμοκρασίας T στην παράμετρο a της κατανομής Weibull:

$$\alpha_T = \alpha_{T_{ref}} \cdot e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{T_{ref}-T}{T_{ref} \cdot T} \right)} \quad (20)$$

Αντικαθιστώντας την παραπάνω εξίσωση στην Εξίσωση (11) έχουμε:

$$\ln(A/A_0) = -\left(\frac{t}{\alpha_{T_{ref}} \cdot e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{T_{ref}-T}{T_{ref} \cdot T} \right)}} \right)^\beta \quad (21)$$

Όπου T_{ref} θεωρούμε θερμοκρασία 65°C. Η εξίσωση αυτή χρησιμοποιήθηκε στο JMP (Πίνακας 21) κατά την ενσωμάτωση του δευτερογενούς μοντέλου (Arrhenius) στο πρωτογενές (Weibull), στο σύνολο των πειραματικών δεδομένων (ενεργότητες A κι από τις 4 θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν).

Πίνακας 20. Αποτελέσματα μη γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των παραμέτρων του συνδυαστικού μοντέλου Arrhenius-Weibull.

SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
1,270011814	93	0,013656	0,116859	0,97067
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
α	0,2489	0,04463537	0,167904	0,344967
E _a /R	46118,8	1815,65862	42810,73	50126,18
β	0,16966	0,0096393	0,15064	0,188936

Η τιμή του E_a/R που παίρνουμε από τη γραμμική παλινδρόμηση του συνδυαστικού μοντέλου είναι ίση με 46118,8. Επομένως η ενέργεια ενεργοποίησης θα είναι ίση με 383,431 kJ/mol. Σύμφωνα με τις τιμές της E_a που υπολογίσαμε στα μεμονωμένα μοντέλα προηγουμένως, βλέπουμε πως η τιμή από το συνδυαστικό βρίσκεται πολύ κοντά στις αντίστοιχες της κατανομής Weibull (τόσο με σταθερό β, όσο και των 3 παραμέτρων). Αμελητέα διαφορά επίσης παρουσιάζει η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R²) σε σχέση με αυτή του Σχήματος 23.

Πίνακας 21. Δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στο JMP για την εκτίμηση των παραμέτρων του συνδυαστικού μοντέλου. Οι fitted predicted τιμές είναι αυτές που προκύπτουν μετά τη λύση της παραπάνω εξίσωσης.

T (K)	ln(A/A ₀)	t (min)	Fitted predicted	T (K)	ln(A/A ₀)	t (min)	Fitted predicted
323,65	0	0	0	333,45	0	0	0
323,65	-0,39304	2,176695	-0,5123506	333,45	-1,15745	1,806819	-1,0102152
323,65	-0,59784	9,25932	-0,6550041	333,45	-1,25276	5,306819	-1,2128286
323,65	-0,644	17,146	-0,7271822	333,45	-1,35812	11,94216	-1,3917481
323,65	-0,91629	30,14831	-0,8002471	333,45	-1,47591	20,31559	-1,5230293
323,65	-0,91629	60,2072	-0,8998838	333,45	-1,60944	30,64879	-1,6330752
323,65	0	0	0	333,45	0	0	0
323,65	-0,39304	2,176695	-0,5123506	333,45	-1,04145	1,806819	-1,0102152
323,65	-0,64436	9,25932	-0,6550041	333,45	-1,44692	5,306819	-1,2128286
323,65	-0,69315	17,14644	-0,7271822	333,45	-1,44692	11,94216	-1,3917481
323,65	-0,85567	30,14831	-0,8002471	333,45	-1,58045	20,31559	-1,5230293
323,65	-0,85567	60,2072	-0,8998838	333,45	-1,91692	30,64879	-1,6330752
323,65	0	0	0	333,45	0	0	0
323,65	-0,44469	2,176695	-0,5123506	333,45	-1,19392	1,806819	-1,0102152
323,65	-0,63504	9,25932	-0,6550041	333,45	-1,41707	5,306819	-1,2128286
323,65	-0,71912	17,14644	-0,7271822	333,45	-1,5506	11,94216	-1,3917481
323,65	-0,89097	30,14831	-0,8002471	333,45	-1,88707	20,31559	-1,5230293
323,65	-0,89097	60,2072	-0,8998838	333,45	-1,88707	30,64879	-1,6330752
323,65	0	0	0	333,45	0	0	0
323,65	-0,44183	2,176695	-0,5123506	333,45	-1,20397	1,806819	-1,0102152
323,65	-0,63159	9,25932	-0,6550041	333,45	-1,32176	5,306819	-1,2128286
323,65	-0,74194	17,14644	-0,7271822	333,45	-1,45529	11,94216	-1,3917481
323,65	-0,8473	30,14831	-0,8002471	333,45	-1,60944	20,31559	-1,5230293
323,65	-0,8473	60,2072	-0,8998838	333,45	-1,60944	30,64879	-1,6330752
328,65	0	0	0	343,15	0	0	0
328,65	-0,73571	2,207038	-0,7418562	343,15	-1,5294	0,510797	-1,5826815
328,65	-0,82668	15,2057	-1,0292602	343,15	-1,74297	0,677464	-1,6603505
328,65	-0,98083	30,20458	-1,1563625	343,15	-1,89712	1,427464	-1,8841434
328,65	-1,03799	60,27964	-1,3001921	343,15	-2,07944	3,4471	-2,1881318
328,65	-1,30625	90,28397	-1,3924257	343,15	-2,30259	5,401628	-2,3613942
328,65	0	0	0	343,15	0	0	0
328,65	-0,76547	2,207038	-0,7418562	343,15	-1,41707	0,510797	-1,5826815
328,65	-0,87083	15,2057	-1,0292602	343,15	-1,70475	0,677464	-1,6603505
328,65	-0,98861	30,20458	-1,1563625	343,15	-1,88707	1,427464	-1,8841434
328,65	-1,19625	60,27964	-1,3001921	343,15	-2,11021	3,4471	-2,1881318
328,65	-1,56398	90,28397	-1,3924257	343,15	-2,3979	5,401628	-2,3613942
328,65	0	0	0	343,15	0	0	0
328,65	-0,69315	2,207038	-0,7418562	343,15	-1,44036	0,510797	-1,5826815
328,65	-0,865	15,2057	-1,0292602	343,15	-1,69168	0,677464	-1,6603505
328,65	-0,99853	30,20458	-1,1563625	343,15	-1,84583	1,427464	-1,8841434
328,65	-1,15268	60,27964	-1,3001921	343,15	-2,02815	3,4471	-2,1881318
328,65	-1,55814	90,28397	-1,3924257	343,15	-2,38482	5,401628	-2,3613942
328,65	0	0	0	343,15	0	0	0
328,65	-0,69315	2,207038	-0,7418562	343,15	-1,60944	0,510797	-1,5826815
328,65	-0,865	15,2057	-1,0292602	343,15	-1,86075	0,677464	-1,6603505
328,65	-0,99853	30,20458	-1,1563625	343,15	-2,0149	1,427464	-1,8841434
328,65	-1,15268	60,27964	-1,3001921	343,15	-2,07206	3,4471	-2,1881318
328,65	-1,55814	90,28397	-1,3924257	343,15	-2,19722	5,401628	-2,3613942

Ακολουθώντας την διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω, εφαρμόσαμε την ανάλυση σε ένα βήμα και για τα άλλα 2 μοντέλα που δοκιμάσαμε (νιοστής τάξης και μερικής μετατροπής). Η εξίσωση που έλυσε το JMP για τον υπολογισμό των παραμέτρων του μοντέλου νιοστής τάξης μέσω γραμμικής παλινδρόμησης είναι η εξής:

$$A = \sqrt[1-n]{A_0^{1-n} + ((n-1) \cdot k_{T_{ref}} \cdot t \cdot e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{T_{ref}-T}{T \cdot T_{ref}} \right)}} \quad (22)$$

Πίνακας 22. Αποτελέσματα μη γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των παραμέτρων του συνδυαστικού μοντέλου Arrhenius-Nth order.

SSE	DFE	MSE	RMSE	R ²
1,424490552	93	0,0153171	0,123762	0,98975
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
n	7,71014	0,64772632	6,571921	9,304358
E _a /R	61305,3	5601,63902	51545,72	75085
k _{Tref}	7,9132	3,96902202	3,338054	27,622

Η τιμή E_a/R που παίρνουμε από τη γραμμική παλινδρόμηση του συγκεκριμένου συνδυαστικού μοντέλου είναι ίση με 61305,3. Επομένως η ενέργεια ενεργοποίησης θα είναι ίση με 509,692 kJ/mol. Παρατηρούμε πως η τιμή για την ανάλυση σε ένα βήμα είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των δύο βημάτων και επιπροσθέτως υπάρχει μια μικρή βελτίωση στην τιμή του R² σε σχέση με την προηγούμενη (Σχήμα 22).

Η εξίσωση που χρησιμοποιήσαμε στο JMP για το μοντέλο μερικής μετατροπής είναι η:

$$A = A_f + \frac{A_0 - A_f}{e^{-(k_{T_{ref}} \cdot t \cdot e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{T_{ref}-T}{T \cdot T_{ref}} \right)}}} \quad (23)$$

Στον Πίνακα 23 παρατηρούμε τις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν από το στατιστικό πρόγραμμα. Όπως προκύπτει, η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης είναι ίση με 315,73 kJ/mol και η οποία είναι μεγαλύτερη από αυτή που υπολογίσαμε προηγουμένως, ενώ Το R^2 παρατηρούμε πως έχει μειωθεί σε σύγκριση με την ανάλυση σε 2 βήματα (Σχήμα 21).

Πίνακας 23. Αποτελέσματα μη γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των παραμέτρων του συνδυαστικού μοντέλου Arrhenius-Fractional.

SSE	DFE	MSE	RMSE	R^2
5,872235635	93	0,0631423	0,251281	0,957745
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL
A_f	0,57991	0,03242346	0,512858	0,646625
E_a/R	37975,7	4512,69499	28015,76	48456,18
K_f	12,6569	6,81871328	4,19387	42,48658

3.1.6. Πρόβλεψη χρόνων, σχεδιασμός διεργασιών και επιλογή προϊόντων προς μέτρηση ποιοτικών χαρακτηριστικών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι επεξεργασίες των δειγμάτων χυμού, πραγματοποιήθηκαν σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες. Θέτοντας ως στόχο την επίτευξη εναπομενουσών δραστηριοτήτων από 5-20% χρησιμοποιήσαμε τις εξισώσεις των Σχημάτων 15 και 21 ($\log D = (-0,0765 \cdot T) + 6,3365$ και $\ln k = -37497 \cdot (1/T) + 114,18$, αντιστοίχως) ώστε να εκτιμήσουμε ισοδύναμους χρόνους για επεξεργασίες σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, από 50 έως 90°C. Ο λόγος που επιλέχθηκαν εξισώσεις από τα συγκεκριμένα μοντέλα είναι ότι δεν βρέθηκαν εξισώσεις για την τιμή F στα υπόλοιπα.

Πίνακας 24. Εκτιμώμενες τιμές ισοδύναμων χρόνων επεξεργασίας για επίτευξη συγκεκριμένων ποσοστών υπολειπόμενων ενεργοτήτων PME, για διάφορες θερμοκρασίες.

	20% υπολειπόμενη ενεργότητα PME (1st order)								
T (°C)	50	55	60	65	70	75	80	85	90
F (min)	226,96	94,07	38,99	16,16	6,70	2,78	1,15	0,48	0,20
	10% υπολειπόμενη ενεργότητα PME (1st order)								
T (°C)	50	55	60	65	70	75	80	85	90
F (min)	324,71	134,59	55,78	23,12	9,58	3,97	1,65	0,68	0,28
	5% υπολειπόμενη ενεργότητα PME (1st order)								
T (°C)	50	55	60	65	70	75	80	85	90
F (min)	422,46	175,1	72,58	30,08	12,47	5,17	2,14	0,89	0,37
	20% υπολειπόμενη ενεργότητα PME (nth order)								
T (°C)	50	55	60	65	70	75	80	85	90
F (min)	64,09	10,998	2,128	0,446	0,0886	0,0184	0,004	0,0009	0,0002
	10% υπολειπόμενη ενεργότητα PME (nth order)								
T (°C)	50	55	60	65	70	75	80	85	90
F (min)	2707,87	464,66	89,92	18,84	3,74	0,78	0,17	0,04	0,01
	5% υπολειπόμενη ενεργότητα PME (nth order)								
T (°C)	50	55	60	65	70	75	80	85	90
F (min)	114391,69	19629,12	3798,61	795,85	158,17	32,93	7,17	1,63	0,39

Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του F είναι:

$$F_{T_{ref}}^Z = D_{T_{ref}} \cdot \log \frac{A_0}{A} \quad (22)$$

και

$$F_{T_{ref}}^Z = D_{T_{ref}} \cdot \frac{A^{1-n} - A_0^{1-n}}{(n-1) \cdot \ln 10} \quad (23)$$

για της πρώτης, και νιοστής τάξης μοντέλο (Hendrickx *et al.*, 1995· Taoukis and Labuza, 1989), αντίστοιχα. Οι παραπάνω εξισώσεις είναι οι θεμελιώδεις εξισώσεις για το σχεδιασμό και την αξιολόγηση των θερμικών διεργασιών και αποτελούν

ισοδύναμες εκφράσεις των (13) και (17) αντίστοιχα. Η Εξίσωση (23) με την ενσωμάτωση της (4) μετατρέπεται στην:

$$F_{T_{ref}}^{Ea} = \frac{A^{1-n} - A_0^{1-n}}{(n-1) \cdot k} \quad (24)$$

Η τιμή του n θεωρήθηκε ίση με 6,4 (μέσος όρος των εκτιμώμενων από το JMP τιμών για τις πειραματικές θερμοκρασίες) και η τιμή του A_0 θεωρήθηκε ίση με 2,31, που προκύπτει από το μέσο όρο των τιμών της αντίστοιχης παραμέτρου της μη γραμμικής παλινδρόμησης (για το μοντέλο νιοστής τάξης) που έτρεξε στο JMP για κάθε θερμοκρασία.

Η επιλογή των συνδυασμών χρόνου-θερμοκρασίας για τη δημιουργία τελικών προϊόντων και μέτρηση ποιοτικών χαρακτηριστικών έγινε με βάση τα εξής κριτήρια:

- i. Να ανταποκρίνονται στα πρότυπα των HTST/LTLT παστεριώσεων, δηλαδή μία επεξεργασία σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία για μικρό χρόνο και μια σε ηπιότερη θερμοκρασία για μεγάλο χρόνο.
- ii. Χρόνοι που να είναι εύκολα μετρήσιμοι και πρακτικά εφαρμόσιμοι
- iii. Η δραστηκότητα του ενζύμου που απομένει μετά τη θέρμανση να βρίσκεται κοντά στο 10%.

Εκτός αυτών των 2 προϊόντων επιλέχθηκε και ένα παράχθηκε σε συνθήκες επεξεργασίας που αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία, όσον αφορά στην παστερίωση των χυμών από εσπεριδοειδή. Έτσι, υπολογίσαμε την ενεργότητα που αναμένεται να έχει δείγμα χυμού που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία στους 90°C για 1 λεπτό. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 25. Ποσοστά εναπομενουσών ενεργοτήτων PME σε θερμοκρασία 90°C για 1 min.

1st order			
90°C	F =	1,000049	min
	A/A ₀ =	0,000291	
nth order			
90°C	F =	1,000012	min
	A =	0,096791	U/mL
	A/A ₀ =	0,041901	

Έτσι, επιλέχθηκαν τελικώς οι θερμοκρασίες των 65°C και 75°C και οι χρόνοι των 23 και 1 min περίπου, ως συνθήκες επεξεργασίας των LTLT και HTST προϊόντων αντίστοιχα. Ακολούθησε πειραματική μέτρηση με σκοπό την επαλήθευση των λόγων A/A_0 , για τους συνδυασμούς χρόνου-θερμοκρασίας και στα 2 κινητικά μοντέλα. Στο πρώτης τάξης το ποσοστό υπολειπόμενης ενεργότητας στους 65°C για 23 min βρέθηκε ίσο με 8,7%, ενώ στην επεξεργασία στους 75°C για 4 min περίπου βρέθηκε ίσο με 5,2%. Στο νιοστής τάξης το αντίστοιχο ποσοστό για την επεξεργασία των 65°C για 19 min ήταν 9,5%, ενώ στους 75°C για 1 περίπου λεπτό ισούταν με 11,2%. Τέλος, στην θέρμανση του χυμού για 1 min στους 90°C, η πηκτινεστεράση απενεργοποιήθηκε κατά 97,5% (2,5% υπολειπόμενη ενεργότητα). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιλέχθηκαν οι χρόνοι που εκτιμώνται από το μοντέλο νιοστής τάξης, αφού δίνουν ποσοστό εναπομένουσας δραστηκότητας πλησιέστερα σε αυτό που επιδιώκουμε να πετύχουμε (10%).

3.2. Ερμηνεία μετρήσεων χρωματικών παραμέτρων των δειγμάτων χυμού

3.2.1. Εξέταση κατανομής και ομοιογένειας διασπορών

Οι μετρήσεις που καταγράφηκαν στις παραμέτρους του χρώματος (L, a, b, C, h) με το χρωματόμετρο για τα 4 διαφορετικά δείγματα χυμού, ομαδοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν στο JMP για περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Το control δείγμα αντιστοιχεί στο μη επεξεργασμένο (μάρτυρας), το LTLT σε αυτό των 23 min στους 65°C και το HTST σε αυτό του 1 min στους 75°C. Συγκεντρωτικά, παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα. Οι πολλαπλές τιμές για τα L, a, b, C και h σε καθένα από τα 4 δείγματα (samples) αντιστοιχούν στις επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη μέτρησή τους.

Πίνακας 26. Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων των L, a, b, C, h στα 4 προϊόντα χυμού μανταρινιού.

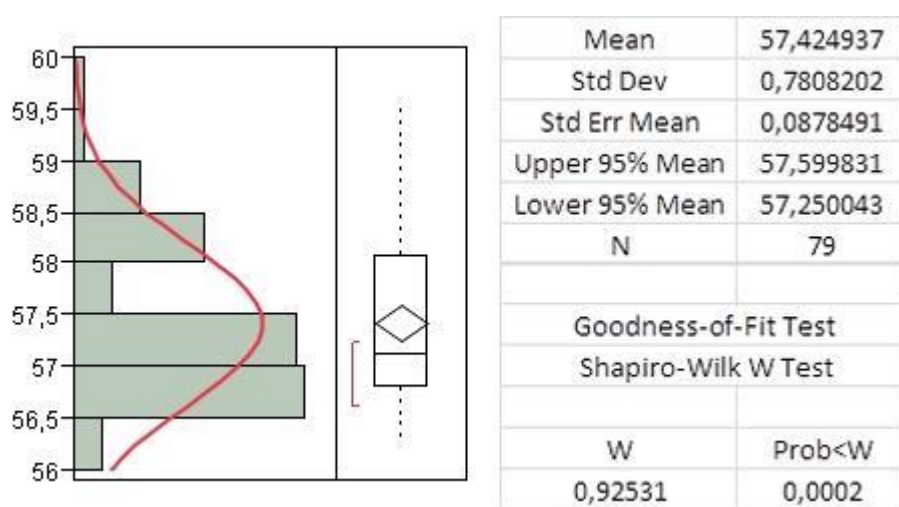
samples	L	a	b	C	h
control	58,9075	-1,9375	66,99	67,01	91,65665973
control	58,44	-1,865	66,265	66,285	91,61213956
control	58,37	-1,955	66,9425	66,965	91,6728001
control	58,4225	-1,9125	66,6325	66,6525	91,64406412
control	58,3775	-1,915	66,3375	66,36	91,65352862
control	57,9025	-1,935	65,335	65,3575	91,69640981
control	58,79	-1,8075	66,7275	66,7475	91,55163618
control	58,0875	-1,7925	65,825	65,845	91,55985279
control	58,1475	-1,7875	65,6925	65,7125	91,55863974
control	57,0975	-2,1625	64,8475	64,8775	91,90996145
control	57,2325	-2,145	64,62	64,65	91,90118134
control	57,195	-2,0875	64,51	64,54	91,85340596
control	57,115	-2,0925	64,7725	64,8025	91,85031822
control	56,905	-1,97	64,445	64,47	91,75091237
control	56,9	-2,11	64,645	64,675	91,86945921
control	56,6425	-2,075	63,7725	63,8025	91,863606
control	57,0175	-2,17	63,99	64,02	91,94224432
control	56,6975	-2,8975	64,39	64,45	92,57652743
control	56,9675	-2,7725	63,8375	63,895	92,48682647
control	56,8125	-2,7775	63,6625	63,72	92,49814525
control	56,8725	-2,7325	63,8825	63,935	92,44926765
LTLT	58,7725	-2,29	67,0975	67,13	91,95471406
LTLT	58,34	-2,15	65,58	65,61	91,87773438
LTLT	58,815	-2,115	66,9125	66,9425	91,81042766
LTLT	59	-2,13	66,8275	66,8575	91,82557643
LTLT	58,3325	-1,825	66,5925	66,6125	91,56973882
LTLT	58,0675	-1,835	65,8125	65,8325	91,59686305
LTLT	58,1525	-1,8125	66,6675	66,6875	91,55691911
LTLT	58,0325	-1,75	66,2025	66,2225	91,51402434
LTLT	57,3075	-2,395	64,77	64,81	92,11766098
LTLT	57,1025	-2,4175	64,13	64,17	92,15884908
LTLT	57,2575	-2,33	64,605	64,6425	92,0654954
LTLT	57,3575	-2,28	64,9775	65,0125	92,00963107
LTLT	57,09	-2,34	64,515	64,555	92,0772437
LTLT	56,5725	-2,2275	63,4225	63,455	92,01149294
LTLT	56,92	-2,3475	64,15	64,19	92,09574205
LTLT	57,0975	-2,3275	64,43	64,465	92,06888039
LTLT	56,52	-2,785	64,0025	64,0575	92,49132949
LTLT	56,795	-2,915	64,1525	64,14	92,60146536
LTLT	56,63	-2,855	64,0525	64,1125	92,55205352

Πίνακας 26 (συνέχεια). Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων των L, a, b, C, h στα 4 προϊόντα χυμού μανταρινιού.

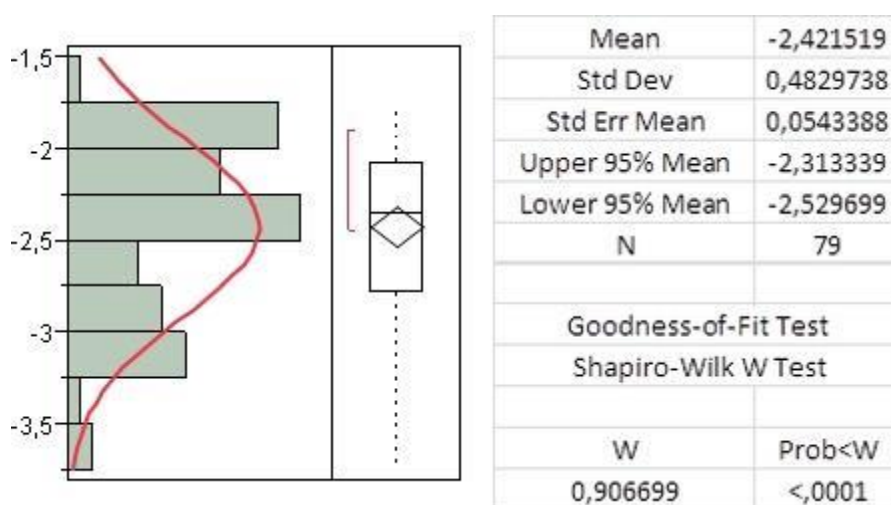
HTST	59,555	-2,36	66,7025	66,7375	92,02633574
HTST	58,5925	-2,075	67,25	67,28	91,76730164
HTST	58,9975	-2,1375	67,1225	67,1525	91,82395405
HTST	58,075	-1,965	65,2875	65,31	91,7239476
HTST	58,0925	-1,8775	66,105	66,125	91,62674763
HTST	58,3025	-1,9025	66,51	66,53	91,63834017
HTST	58,77	-1,8975	67,71	67,73	91,60518286
HTST	57,8625	-1,875	65,68	65,7	91,63511231
HTST	56,9975	-2,335	64,045	64,085	92,0880071
HTST	57,8425	-2,4925	64,4575	64,5	92,21446091
HTST	57,645	-2,74	62,3275	62,385	92,51717813
HTST	57,225	-2,3125	64,4125	64,45	92,05611657
HTST	56,2425	-3,225	63,135	63,215	92,92418512
HTST	56,805	-3,495	63,4325	63,525	93,15369062
HTST	56,5	-3,72	63,24	63,345	93,36646066
HTST	56,63	-3,6775	63,365	63,465	93,32153611
HTST	57,165	-3,055	63,17	63,24	92,77205982
HTST	57,19	-2,83	63,5375	63,6	92,55579351
HTST	56,3825	-3,25	63,085	63,1675	92,94900973
90 cel/ 1min	57,335	-2,5075	64,61	64,6525	92,22252129
90 cel/ 1min	57,34	-2,54	64,805	64,85	92,24453092
90 cel/ 1min	57,0025	-2,435	64,035	64,075	92,17768464
90 cel/ 1min	57,0075	-2,3625	63,915	63,955	92,11686901
90 cel/ 1min	57,06	-2,4625	64,625	64,6675	92,18181924
90 cel/ 1min	57,1	-2,4225	64,3	64,34	92,15751667
90 cel/ 1min	56,4875	-2,445	63,7375	63,78	92,19656707
90 cel/ 1min	56,52	-2,42	63,615	63,655	92,17834421
90 cel/ 1min	57,215	-2,5525	64,235	64,2825	92,27555965
90 cel/ 1min	57,165	-2,5025	64,4125	64,455	92,22488822
90 cel/ 1min	57,115	-2,3575	64,6975	64,7375	92,08686679
90 cel/ 1min	57,045	-2,345	64,08	64,1175	92,09579704
90 cel/ 1min	56,6125	-3,1275	63,5375	63,61	92,81798999
90 cel/ 1min	56,625	-3,0725	63,27	63,34	92,78019749
90 cel/ 1min	56,775	-3,1725	64,01	64,085	92,8374042
90 cel/ 1min	56,8025	-3,1525	63,665	63,7375	92,83479989
90 cel/ 1min	56,9625	-3,095	63,75	63,8175	92,77947155
90 cel/ 1min	56,97	-3,045	63,7375	63,805	92,73517315
90 cel/ 1min	56,75	-3,11	64,045	64,115	92,78007671
90 cel/ 1min	56,745	-2,9225	63,99	64,055	92,6149498

Αρχικά εξετάστηκε η ομοιογένεια διασποράς των δεδομένων μας. Όπως γίνεται φανερό, στα Σχήματα 29, 31, 33, 35 και 37, η πιθανότητα να προκύψει κατά

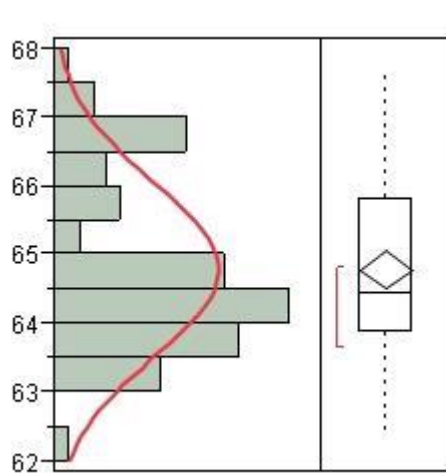
τύχη μικρότερη τιμή για την παράμετρο W που προβλέπει το Shapiro-Wilk Test (κρίσιμη τιμή για τη συγκεκριμένη δοκιμή) είναι 0,0002, <0,0001, 0,0006, 0,0001 και 0,0007 αντίστοιχα, δηλαδή μικρότερη από το επίπεδο σημαντικότητας 5% και επομένως απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση (H_0), σύμφωνα με την οποία τα δεδομένα θα ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Επιπλέον, όπως γίνεται αντιληπτό από τα Σχήματα 29-33, οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων (των χρωματικών παραμέτρων) μερικών εκ των δειγμάτων διαφέρουν από αυτή του συνόλου των μετρήσεων.



Σχήμα 29. Κατανομή των μετρήσεων για το L και για τα 4 δείγματα.

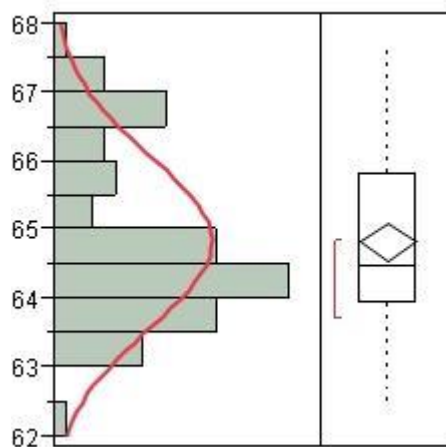


Σχήμα 30. Κατανομή των μετρήσεων για το a και για τα 4 δείγματα.



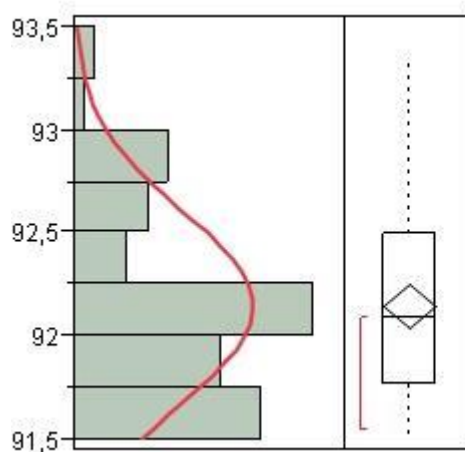
Mean	64,793291
Std Dev	1,2611471
Std Err Mean	0,1418901
Upper 95% Mean	65,075773
Lower 95% Mean	64,51081
N	79
Goodness-of-Fit Test	
Shapiro-Wilk W Test	
W	Prob<W
0,935312	0,0006

Σχήμα 31. Κατανομή των μετρήσεων για το b και για τα 4 δείγματα.



Mean	64,834842
Std Dev	1,2466497
Std Err Mean	0,140259
Upper 95% Mean	65,114076
Lower 95% Mean	64,555607
N	79
Goodness-of-Fit Test	
Shapiro-Wilk W Test	
W	Prob<W
0,92304	0,0001

Σχήμα 32. Κατανομή των μετρήσεων για το C και για τα 4 δείγματα.



Mean	92,147062
Std Dev	0,4599201
Std Err Mean	0,051745
Upper 95% Mean	92,250078
Lower 95% Mean	92,044045
N	79
Goodness-of-Fit Test	
Shapiro-Wilk W Test	
W	Prob<W
0,936774	0,0007

Σχήμα 33. Κατανομή των μετρήσεων για το h και για τα 4 δείγματα.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την ομοιογένεια των διασπορών και τρέξαμε μια σειρά από τεστ άνισων διακυμάνσεων για να επιβεβαιώσουμε ότι τα πειραματικά δεδομένα που λάβαμε δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Σύμφωνα με τις πιθανότητες των τεστ των Levene και Bartlett, αν αυτές είναι μικρότερες του επιπέδου σημαντικότητας (0,05) δε θα ισχύει η H_0 , σύμφωνα με την οποία υπάρχει ομοιογένεια στις διασπορές. Στο δε Welch's test, αν η p-value είναι μικρότερη από το επίπεδο σημαντικότητας, δε γίνεται δεκτή η H_0 (οι μέσοι όροι των δειγμάτων είναι ίσοι μεταξύ τους).

Πίνακας 27. Τεστ άνισων διακυμάνσεων για το L.

UnEqual Variances				
Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
90 cel/ 1min	20	0,2555002	0,21365	0,20675
control	21	0,7645482	0,6995238	0,6517857
HTST	19	0,9480288	0,7880332	0,7973684
LTLT	19	0,8130293	0,7171053	0,6807895
Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	6,1071	3	75	0,0009
Brown-Forsythe	6,7113	3	75	0,0005
Levene	12,5032	3	75	<,0001
Bartlett	8,7006	3	.	<,0001
Welch's Test				
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal				
F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F	
9,2879	3	35,407	0,0001	

Πίνακας 28. Τεστ άνιων διακυμάνσεων για το α.

Unequal Variances				
Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
90 cel/ 1min	20	0,3300538	0,30775	0,2765
control	21	0,3480337	0,2562698	0,2420238
HTST	19	0,6433359	0,554446	0,5332895
LTLT	19	0,3338293	0,2435734	0,2419737
Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	8,113	3	75	<,0001
Brown-Forsythe	4,4642	3	75	0,0061
Levene	8,2155	3	75	<,0001
Bartlett	4,4203	3	.	0,0041
Welch's Test				
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal				
F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F	
10,7243	3	40,617	<,0001	

Πίνακας 29. Τεστ άνιων διακυμάνσεων για το β.

Unequal Variances				
Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
90 cel/ 1min	20	0,421761	0,3336	0,330875
control	21	1,134936	0,991361	0,948333
HTST	19	1,705882	1,497964	1,449079
LTLT	19	1,194991	1,057936	1,019737
Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	10,9224	3	75	<,0001
Brown-Forsythe	8,7708	3	75	<,0001
Levene	16,5532	3	75	<,0001
Bartlett	9,4273	3	.	<,0001
Welch's Test				
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal				
F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F	
9,9258	3	35,824	<,0001	

Πίνακας 30. Τεστ άνιων διακυμάνσεων για το C.

UnEqual Variances				
Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
90 cel/ 1min	20	0,41378	0,325788	0,323625
control	21	1,125248	0,982687	0,939524
HTST	19	1,682716	1,475873	1,425658
LTLT	19	1,190138	1,052438	1,015132
Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	10,596	3	75	<,0001
Brown-Forsythe	8,6085	3	75	<,0001
Levene	16,4156	3	75	<,0001
Bartlett	9,4804	3	.	<,0001
Welch's Test				
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal				
F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F	
9,7561	3	35,748	<,0001	

Πίνακας 31. Τεστ άνιων διακυμάνσεων για το h.

UnEqual Variances				
Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
90 cel/ 1min	20	0,304338	0,2844452	0,253064
control	21	0,331808	0,2455516	0,2379557
HTST	19	0,61916	0,5402493	0,5212225
LTLT	19	0,319269	0,2395168	0,2376291
Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	9,4187	3	75	<,0001
Brown-Forsythe	5,0347	3	75	0,0031
Levene	9,3214	3	75	<,0001
Bartlett	4,7229	3	.	0,0027
Welch's Test				
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal				
F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F	
11,0065	3	40,569	<,0001	

Συνοπτικά, τα δεδομένα για όλες τις παραμέτρους δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, δεν υπάρχει ομοιογένεια στις διασπορές τους και οι μέσοι όροι μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων είναι άνισοι, σε κάθε χρωματική παράμετρο.

3.2.2. Μη παραμετρικές δοκιμές διακύμανσης και σύγκριση μεταξύ των προϊόντων

Από τη στιγμή που γίνεται αντιληπτό πως τα δεδομένα μας δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και οι διακυμάνσεις είναι ανόμοιες μεταξύ τους, μολονότι τα δείγματα είναι τελείως ανεξάρτητα μεταξύ τους, η χρήση της ANOVA δεν ενδείκνυται σε αυτή την περίπτωση (αυξάνεται η πιθανότητα να δεχθούμε μια μηδενική υπόθεση ενώ αυτή δεν ισχύει) (Glass *et al.*, 1972). Για αυτό, χρησιμοποιήσαμε κάποια μη παραμετρικά τεστ. Η δοκιμή Wilcoxon (Kruskal-Wallis αν έχουμε 2 και περισσότερες ομάδες δεδομένων) αξιολογεί τα δεδομένα και αντιστοιχεί τις τιμές τους σε βαθμούς ξεκινώντας από τη μικρότερη τιμή που βαθμολογεί με το 1, την αμέσως μεγαλύτερη με το 2, και ούτω καθεξής. Η μηδενική υπόθεση στη συγκεκριμένη δοκιμή θεωρεί πως δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των αθροισμάτων των βαθμολογιών (score sum και score mean όπως φαίνονται στον Πίνακα 32, αντίστοιχα). Το δεύτερο τεστ, αφορά στο τεστ των διαμέσων όπου εκεί η αξιολόγηση γίνεται με βάση το πόσες παρατηρήσεις (που εντάσσονται σε κάθε ξεχωριστή ομάδα δείγματος) έχουν αριθμητικές τιμές μεγαλύτερες από τη διάμεσο του συνόλου των τιμών. Η μηδενική υπόθεση εν προκειμένω, θεωρεί πως οι διάμεσοι των τιμών των 4 δειγμάτων δε διαφέρουν (Lix *et al.*, 1996). Και στα 2 τεστ αποδεχόμαστε την εναλλακτική υπόθεση (H_1) αν η $Prob > ChiSq$ είναι μικρότερη από 0,05.

Από τα μη παραμετρικά τεστ, σημαντικός είναι και ο λόγος (Mean-Mean₀)/Std₀, όπου Mean₀ και Std₀ ο μέσος όρος (score mean) και η τυπική απόκλιση του αθροίσματος της βαθμολογίας (score sum) που θα ίσχυαν στην περίπτωση της μηδενικής υπόθεσης. Από το λόγο αυτό σε κάθε δείγμα προκύπτει ένα αποτέλεσμα με θετικό ή αρνητικό πρόσημο. Τα δείγματα με θετικό (ή αρνητικό πρόσημο) δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους, είναι όμως διαφορετικά από αυτά που έχουν αρνητικό (ή θετικό αντίστοιχα) πρόσημο. Επίσης, δείγματα με

αρνητικές τιμές παρουσιάζουν μικρότερους μέσους όρους στα χρωματικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με αυτά που εμφανίζουν τιμές με θετικό πρόσημο. Κατ' αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατό να διαχωρίσουμε τα 4 προϊόντα με βάση τις διαφορές που παρουσιάζουν για κάθε χαρακτηριστικό του χρώματος. Γνωρίζοντας πλέον τη λογική πάνω στην οποία βασίζεται η κάθε μη παραμετρική δοκιμή που δοκιμάσαμε, παραθέτουμε αναλυτικά όλα τα τεστ που τρέξαμε στα 4 διαφορετικά προϊόντα για τα L, a, b, C και h του χρώματος, καθώς και τις στατιστικές παραμέτρους που συνδράμουν στην ανάλυσή τους.

Πίνακας 32. Μη παραμετρικά τεστ για τα δεδομένα του L σε κάθε προϊόν. Τα τεστ αυτά δεν θεωρούν ότι τα δεδομένα προέρχονται από κατανομή που μπορεί να περιγραφεί πλήρως από το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση.

Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	528,5	26,425	-3,056
control	21	936	44,5714	1,06
HTST	19	840	44,2105	0,912
LTLT	19	855,5	45,0263	1,09
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
9,3828	3	0,0246		
Median Test (Number of Points Above Median)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	4	0,2	-3,02
control	21	11	0,52381	0,32
HTST	19	13	0,684211	1,894
LTLT	19	11	0,578947	0,848
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
10,159	3	0,0173		

Πίνακας 33. Μη παραμετρικά τεστ για τα δεδομένα του α σε κάθε προϊόν. Τα τεστ αυτά δεν θεωρούν ότι τα δεδομένα προέρχονται από κατανομή που μπορεί να περιγραφεί πλήρως από το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση.

Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	449	22,45	-3,952
control	21	1150,5	54,7857	3,44
HTST	19	671,5	35,3421	-1,009
LTLT	19	889	46,7895	1,474
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
22,8593	3	<,0001		
Median Test (Number of Points Above Median)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	0	0	-5,077
control	21	17	0,809524	3,357
HTST	19	9	0,473684	-0,199
LTLT	19	13	0,684211	1,894
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
30,2832	3	<,0001		

Πίνακας 34. Μη παραμετρικά τεστ για τα δεδομένα του b σε κάθε προϊόν. Τα τεστ αυτά δεν θεωρούν ότι τα δεδομένα προέρχονται από κατανομή που μπορεί να περιγραφεί πλήρως από το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση.

Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	542	27,1	-2,903
control	21	1001,5	47,6905	1,787
HTST	19	692,5	36,4474	-0,769
LTLT	19	924	48,6316	1,876
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
11,8215	3	0,008		
Median Test (Number of Points Above Median)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	4	0,2	-3,02
control	21	14	0,666667	1,839
HTST	19	9	0,473684	-0,199
LTLT	19	12	0,631579	1,371
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
10,753	3	0,0131		

Πίνακας 35. Μη παραμετρικά τεστ για τα δεδομένα του C σε κάθε προϊόν. Τα τεστ αυτά δεν θεωρούν ότι τα δεδομένα προέρχονται από κατανομή που μπορεί να περιγραφεί πλήρως από το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση.

Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	547,5	27,375	-2,841
control	21	997,5	47,5	1,742
HTST	19	692	36,4211	-0,774
LTLT	19	923	48,5789	1,864
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
11,4132	3	0,0097		
Median Test (Number of Points Above Median)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	4	0,2	-3,02
control	21	14	0,666667	1,839
HTST	19	9	0,473684	-0,199
LTLT	19	12	0,631579	1,371
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
10,753	3	0,0131		

Πίνακας 36. Μη παραμετρικά τεστ για τα δεδομένα του h σε κάθε προϊόν. Τα τεστ αυτά δεν θεωρούν ότι τα δεδομένα προέρχονται από κατανομή που μπορεί να περιγραφεί πλήρως από το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση.

Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	1151	57,55	3,952
control	21	545	25,9524	-3,268
HTST	19	842	44,3158	0,935
LTLT	19	622	32,7368	-1,577
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
22,1398	3	<,0001		
Median Test (Number of Points Above Median)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
90 cel/ 1min	20	19	0,95	4,693
control	21	4	0,190476	-3,223
HTST	19	10	0,526316	0,325
LTLT	19	6	0,315789	-1,768
1-way Test, ChiSquare Approximation				
ChiSquare	DF	Prob>ChiSq		
26,5307	3	<,0001		

Εν κατακλείδι έχουμε για την κάθε περίπτωση ξεχωριστά:

- ♦ Στην περίπτωση του L, βλέπουμε το προϊόν που επεξεργάστηκε στους 90°C για 1 min (βιομηχανικό προϊόν) να διαφέρει σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% στη φωτεινότητα από τα υπόλοιπα 3 (Πίνακας 32) και να έχει το μικρότερο μέσο όρο μετρήσεων αυτής.
- ♦ Στην περίπτωση του a βλέπουμε το προϊόν των 90°C να μη διαφέρει σημαντικά από το HTST (αλλά και τα δύο να έχουν διαφορετική απόχρωση (μικρότερη) κόκκινου-πράσινου (a) από το μάρτυρα και το LTLT (Πίνακας 33).

- ◆ Ομοίως με την προηγούμενη περίπτωση, ο μάρτυρας και το LTLT δείγμα έχουν μέσους όρους απόχρωσης κίτρινου-μπλε που δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, αλλά παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από το βιομηχανικό και το HTST (Πίνακας 34).
- ◆ Τα ίδια με προηγουμένως ισχύουν και στην περίπτωση της χρωματικής πυκνότητας (C) (Πίνακας 35).
- ◆ Σε όμοια συμπεράσματα οδηγούμαστε και σε ότι αφορά τη χροιά (h) των δειγμάτων χυμού, με τη μόνη διαφορά εδώ να είναι πως μάρτυρας και LTLT παρουσιάζουν μειωμένο h σε σχέση με τα άλλα 2 δείγματα (Πίνακας 36).
- ◆ Όπως φαίνεται από τον πίνακα που ακολουθεί τα παστεριωμένα δείγματα εκτός από αυτό στους 90°C έδειξαν υψηλότερη φωτεινότητα από το μάρτυρα, ήταν λιγότερο κόκκινα από το μάρτυρα (μείωση του a) λόγω πιθανής καταστροφής μέρους των καροτενοειδών χρωστικών, λιγότερο κίτρινα από αυτόν (εκτός του δείγματος των 65°C), είχαν μικρότερη χρωματική πυκνότητα (επίσης εκτός του δείγματος των 65°C) και όλα είχαν εντονότερη χροιά από το μάρτυρα.

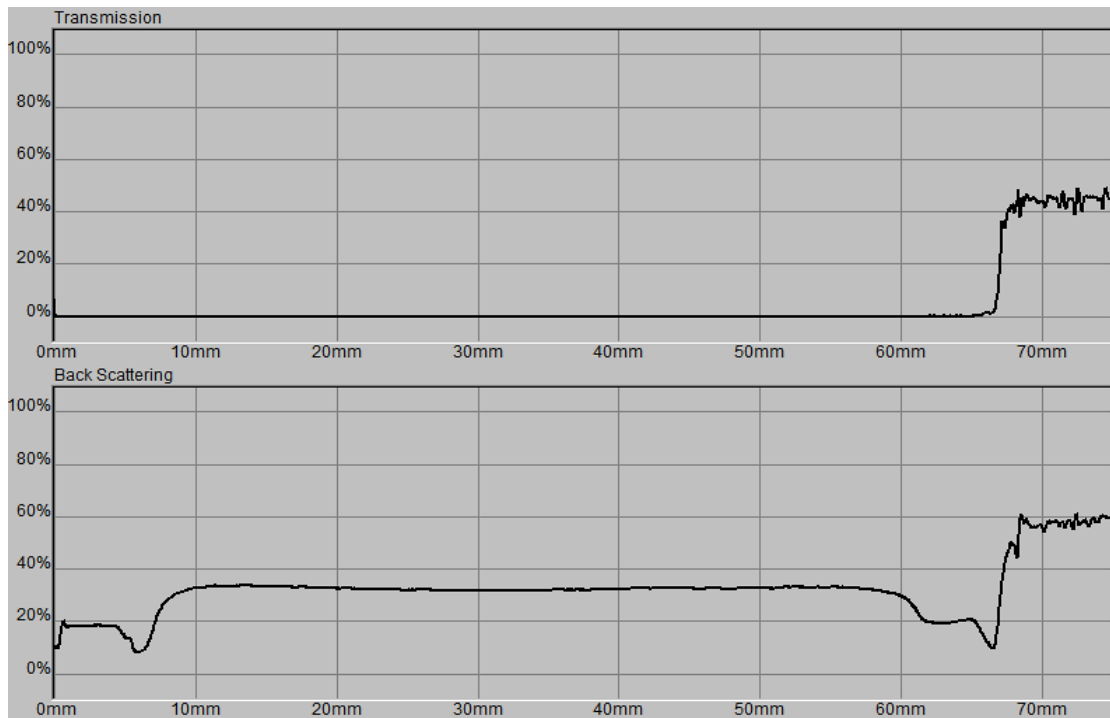
Πίνακας 37. Μέσοι όροι μετρήσεων χρωματικών παραμέτρων για κάθε προϊόν (ξεχωριστά).

	μάρτυρας	60°C/19 min	75°C/ 1min	90°C/1 min
L	57,531±0,764	57,54±0,813	57,589±0,948	56,931±0,255
a	-2,152±0,348	-2,298±0,333	-2,613±0,643	-2,702±0,33
b	65,106±1,135	65,148±1,195	64,692±1,706	64,053±0,421
C	65,138±1,125	65,18±1,19	64,744±1,168	64,106±0,414
h	91,897±0,332	92,025±0,319	92,326±0,619	92,416±0,304

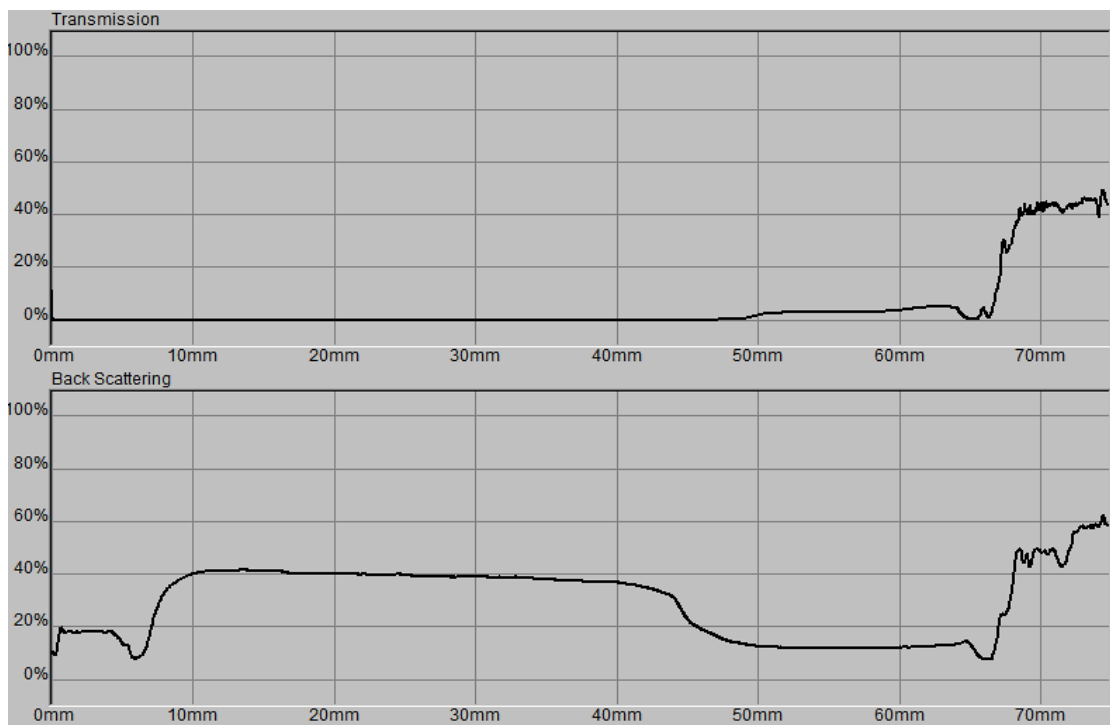
Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι και τα 2 μη παραμετρικά τεστ που δοκιμάσαμε έδωσαν αποτελέσματα σε πλήρη συμφωνία μεταξύ τους σχετικά με την κατάταξη των 4 προϊόντων και τις διαφορές που παρουσιάζουν στα χαρακτηριστικά του χρώματος.

3.3. Διαπερατότητα και σκέδαση φωτός στα δείγματα χυμού

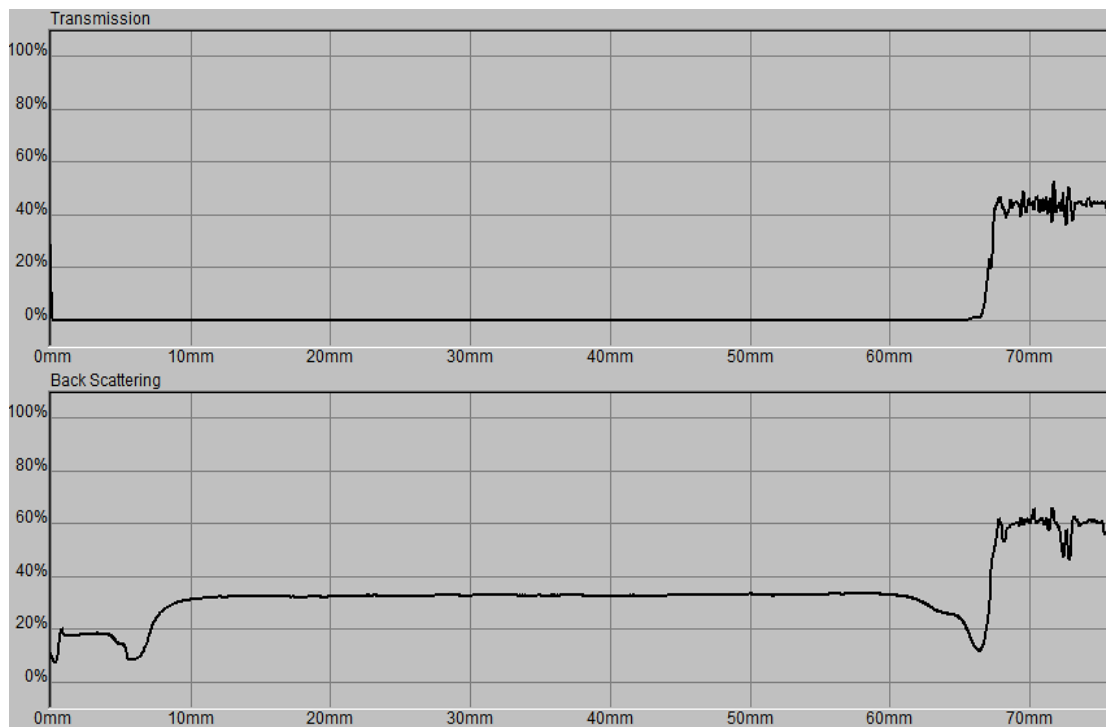
Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα χυμού ήταν μία ημέρα μετά τη θερμική επεξεργασία και εννέα ημέρες μετά από αυτή. Τα αποτελέσματα απώλειας της θολερότητας, εκφράστηκαν από το Turbiscan ως γραφήματα περατότητας και σκέδασης συναρτήσει του ύψους του σωλήνα που είχε τοποθετηθεί το δείγμα χυμού. Πριν από τα χρονικά σημεία των μετρήσεων τα δείγματα διατηρούνταν στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 5°C περίπου, ώστε να αποφευχθεί πιθανή αλλοίωση από ζύμες. Ο οριζόντιος άξονας αναπαριστά το μήκος του σωλήνα σε χιλιοστά (στο σημείο 0 βρίσκεται η βάση του δοκιμαστικού σωλήνα και όσο προχωράμε προς τα δεξιά οι τιμές αυξάνονται αντίστοιχα με το ύψος του σωλήνα) ενώ στους κάθετους άξονες διακρίνουμε από πάνω προς τα κάτω τη μετάδοση του φωτός μέσα από το δείγμα και τη σκέδαση του, εκφρασμένες ως ποσοστά επί %. Όσον αφορά στα γραφήματα της σκέδασης (backscattering), ως αρχή του δείγματος λαμβάνεται η μέση του δεύτερου πυθμένα και ως τέλος του δείγματος η μέση του αμέσως επόμενου προς τα δεξιά πυθμένα. Τα ίδια σημεία προφανώς οριοθετούν το ύψος του δείγματος και στο γράφημα της διαπερατότητας (transmission). Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται εκτενώς τα γραφήματα που περιγράφηκαν προηγουμένως.



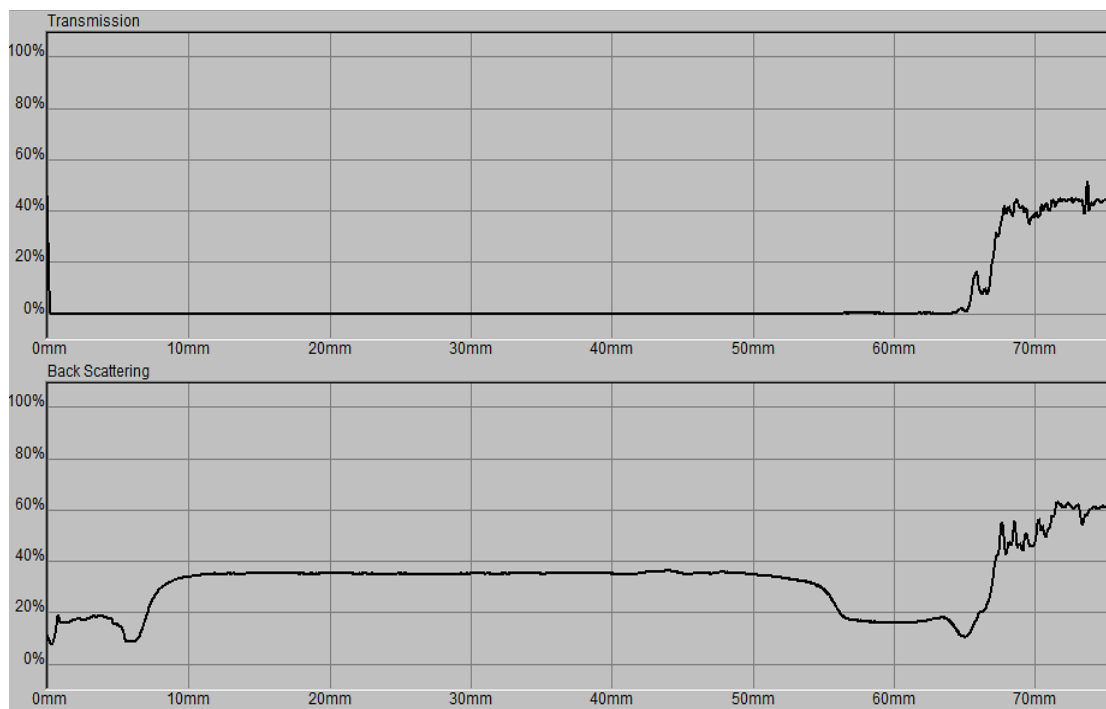
Σχήμα 34. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο δείγμα του μάρτυρα, μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης.



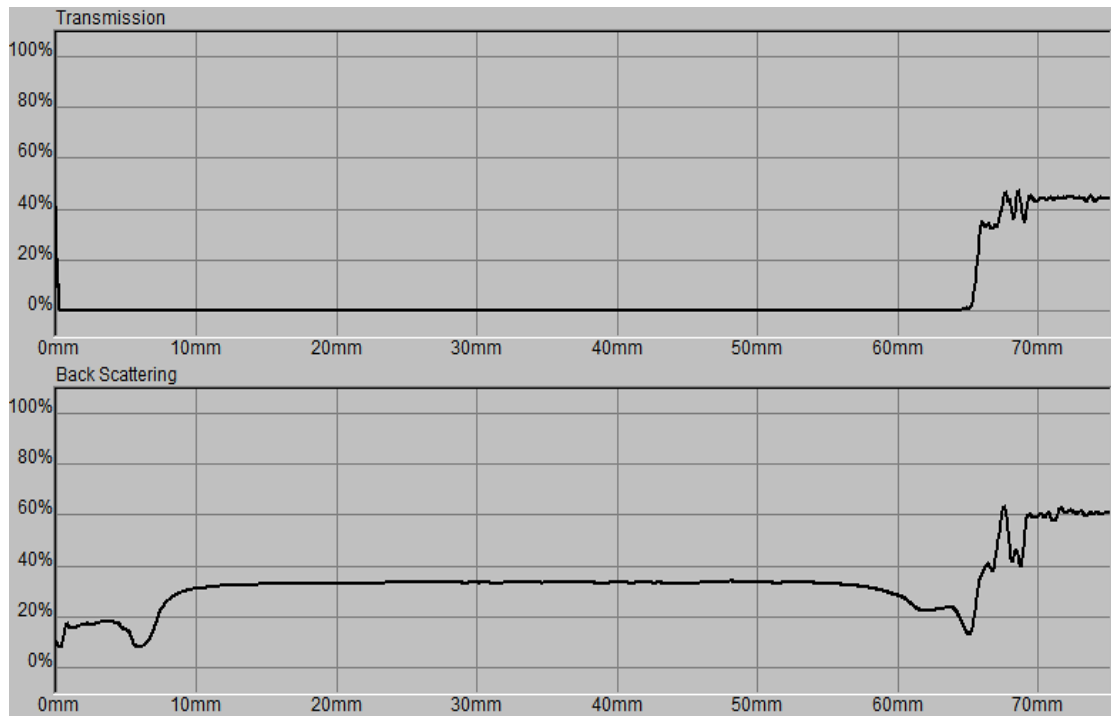
Σχήμα 35. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο δείγμα του μάρτυρα, μετά από 9 ημέρες αποθήκευσης.



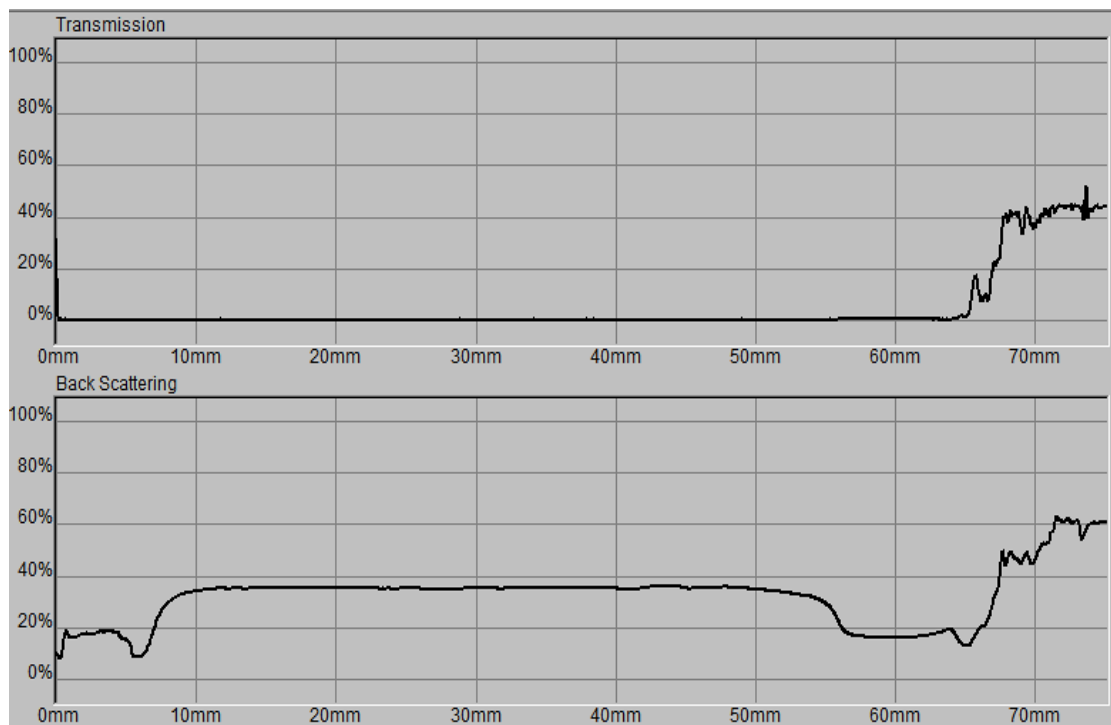
Σχήμα 36. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο LTLT δείγμα, μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης.



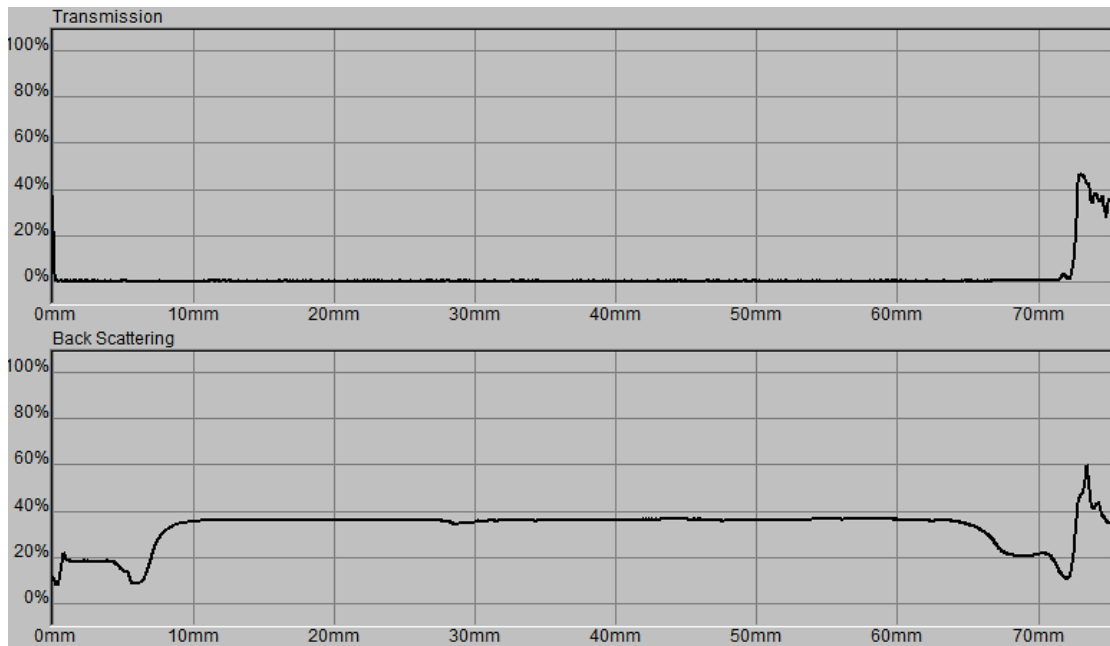
Σχήμα 37. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο LTLT δείγμα, μετά από 9 ημέρες αποθήκευσης.



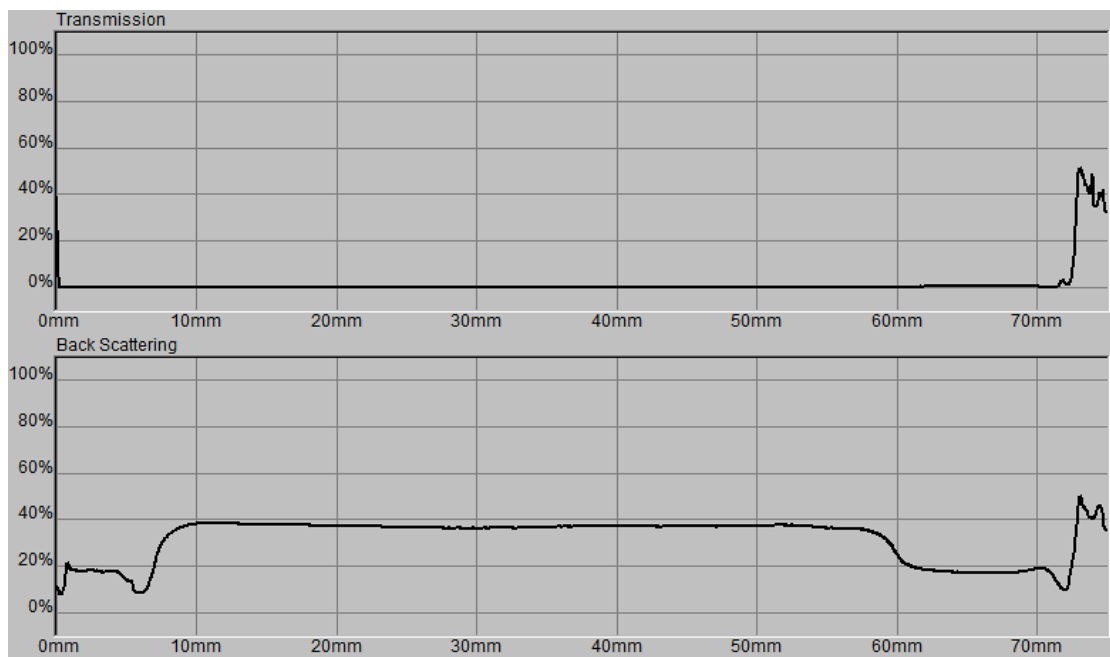
Σχήμα 38. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο HTST δείγμα, μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης.



Σχήμα 39. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο HTST δείγμα, μετά από 9 ημέρες αποθήκευσης.



Σχήμα 40. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο δείγμα των 90°C - 1 min, μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης.



Σχήμα 41. Περατότητα (πάνω) και σκέδαση φωτός (κάτω) στο δείγμα των 90°C - 1 min, μετά από 9 ημέρες αποθήκευσης.

Στην περίπτωση του μάρτυρα διακρίνουμε καθαρά πως η περατότητα αυξανόταν και η σκέδαση μειωνόταν κατά μήκος του σωλήνα (από τα δεξιά προς τα αριστερά) με την πάροδο των ημερών (Σχήματα 34 και 35). Επιπλέον, στο δείγμα

ήταν σαφής ο διαχωρισμός μεταξύ 2 φάσεων και καθ' όλα ευκρινής η άνω διαυγής φάση (Εικόνα 3). Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στη δράση του ενζύμου (απομεθυλίωση της πηκτίνης του χυμού) που παραμένει ενεργό στο συγκεκριμένο δείγμα. Επίσης ένα μικρό ποσοστό πιθανόν να οφειλόταν και στα αιωρούμενα στερεά σωματίδια που με το πέρασμα του χρόνου κατακάθονταν. Σε ίδια συμπεράσματα οδηγούμαστε από την παρατήρηση και των υπόλοιπων γραφημάτων που ανήκουν στα εναπομείναντα 3 δείγματα (65°C-19 min, 75°C-1 min και 90°C-1 min).

Πιο συγκεκριμένα η περατότητα στο μάρτυρα κυμαινόταν στο 0-1% ενώ η σκέδαση στο 20%, μία ημέρα μετά την επεξεργασία (Σχήμα 34). Εννέα ημέρες μετά, η περατότητα έχει φτάσει στο 5-6% και η σκέδαση στο 12%, ενώ παρατηρούμε πως η συγκεκριμένη τιμή ξεκινά στα 45 mm ύψος (Σχήμα 35). Οι τιμές που αναφέρθηκαν αφορούν ουσιαστικά την άνω φάση (ορρός του χυμού) και ήταν αναμενόμενες καθώς με την πρόοδο του χρόνου, η διαύγαση κατερχόταν στο δείγμα. Όσον αφορά στα LTLT και HTST, βλέπουμε πως η περατότητα 1 ημέρα μετά, βρίσκεται στο 0-1%, ενώ η σκέδαση στο 27% και 24%, αντίστοιχα (Σχήματα 36 και 38). Εννιά ημέρες αργότερα, η περατότητα βρίσκεται στο 2% περίπου, ενώ η σκέδαση έχει κατέλθει στο 17% και η τιμή αυτή ξεκινούσε από τα 56 περίπου χιλιοστά (Σχήματα 37 και 39). Αναμενόμενα και αυτά τα αποτελέσματα καθώς η πηκτινομεθυλεστεράση έχει απενεργοποιηθεί κατά μεγάλο ποσοστό και επομένως η διαύγαση επεκτεινόταν βραδύτερα σε σχέση με το control δείγμα. Τέλος, στο δείγμα των 90°C-1 min, η περατότητα βρισκόταν στο 0-1% την αμέσως επόμενη της επεξεργασίας ημέρα και η σκέδαση στο 22% (Σχήμα 40). Μετά από εννέα ημέρες, η περατότητα βρισκόταν στο 2% και η σκέδαση είχε μειωθεί στο 18% (Σχήμα 41). Η χαμηλότερη τιμή της σκέδασης εντοπιζόταν από τα 60 mm και πάνω, στο ύψος του σωλήνα, επακόλουθο της μικρότερης από τα υπόλοιπα δείγματα εναπομένουσας ενεργότητας της PME.

3.4. Μετρήσεις περιεκτικότητας ασκορβικού οξέος

Το ακριβές βάρος του καθαρού ασκορβικού οξέος (στερεά ουσία) που ζυγίστηκε για να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή του προτύπου διαλύματος

ασκορβικού (γνωστή συγκέντρωση) ήταν 51 mg. Χρησιμοποιώντας αυτή την ένδειξη καθώς και το μέσο όρο από τις μετρήσεις κατανάλωσης διχλωροινδοφαινόλης στα τυφλά δείγματα ($B = 0,09 \text{ mL}$) και το αντίστοιχο μέσο όρο από τις τιτλοδοτήσεις του πρότυπου διαλύματος ασκορβικού ($13,865 \text{ mL}$), υπολογίσαμε από την Εξίσωση 14 την ογκομετρική δύναμη του διαλύματος τιτλοδοσίας. Συνεπώς είχαμε $F = 0,1481 \text{ mg/mL}$. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μετρήσεις (Πίνακας 38) που λάβαμε από την τιτλοδότηση των 4 διαφορετικών δειγμάτων χυμού με ινδοφαινόλη, με κάθε δοκιμή να προέρχεται από διαφορετικό καρπό μανταρινιού.

Αντικαθιστώντας όλες τις τιμές στις παραμέτρους της Εξίσωσης 15 υπολογίσαμε για κάθε ένδειξη κατανάλωση του διαλύματος του τίτλου, τη συγκέντρωση των δειγμάτων σε ασκορβικό οξύ. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είχαν μονάδες συγκέντρωσης mg/mL και τα μετατρέψαμε σε mg/100 mL (χυμού) που είναι η συνήθης έκφραση περιεκτικότητας της βιταμίνης C στους χυμούς φρούτων. Στον Πίνακα 39 παρουσιάζονται αναλυτικά οι εν λόγω περιεκτικότητες.

Πίνακας 38. Κατανάλωση διαλύματος της χρωστικής κατά την τιτλοδότηση δειγμάτων χυμού σε όξινο περιβάλλον (διάλυμα μεταφωσφορικού-οξικού οξέος).

Κατανάλωση διχλωροινδοφαινόλης σε mL				
	μάρτυρας	65°C /19 min	75°C/1 min	90°C/1 min
1η δοκιμή	7,133	6,983	6,767	6,753
2η δοκιμή	7,264	6,969	6,809	6,754
3η δοκιμή	6,88	6,654	6,465	6,338
4η δοκιμή	5,76	5,212	4,701	4,415
5η δοκιμή	6,007	5,93	5,707	5,683
6η δοκιμή	6,332	6,215	5,726	5,683



Εικόνα 8. Δείγματα χυμού μανταρινιού μετά τη αντίδραση της 2,6-διχλωροινδοφαινόλης με το ασκορβικό οξύ. Η μετατροπή του χρώματος από πορτοκαλί σε μπλε σηματοδοτεί το τέλος της τιτλοδότησης.

Πίνακας 39. Συγκέντρωση διαφορετικών προϊόντων χυμού σε ασκορβικό οξύ.

Περιεκτικότητα ασκορβικού οξέος στο χυμό (mg/100 mL)				
	μάρτυρας	65°C /19 min	75°C/1 min	90°C/1 min
1η δοκιμή	52,153	51,042	49,440	49,341
2η δοκιμή	53,123	50,936	49,751	49,346
3η δοκιμή	50,279	48,606	47,204	46,266
4η δοκιμή	41,986	37,928	34,142	32,026
5η δοκιμή	43,817	43,245	41,596	41,418
6η δοκιμή	46,220	45,355	41,734	41,418

Αυτό που διαπιστώνουμε από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι πως η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος μειωνόταν με την άνοδο της θερμοκρασίας αλλά η μείωση αυτή σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση (μάρτυρας) δεν ήταν τόσο ραγδαία (Cinquanta *et al.*, 2010· Njoku *et al.*, 2001), ακόμα και στην περίπτωση της επεξεργασίας στους 90°C, γεγονός που επιβεβαιώνει τις αναφορές για την ανθεκτικότητα της βιταμίνης C στη θέρμανση.

Πίνακας 40. Ποσοστό διατήρησης ασκορβικού οξέος μετά τις διάφορες επεξεργασίες.

Ποσοστό % διατήρησης βιταμίνης C στο χυμό			
	65°C - 19 min	75°C - 1 min	90°C - 1 min
1η δοκιμή	97,87	94,8	94,61
2η δοκιμή	95,88	93,65	92,89
3η δοκιμή	96,67	93,88	92,02
4η δοκιμή	90,34	81,32	76,28
5η δοκιμή	98,69	94,93	94,52
6η δοκιμή	98,13	90,29	89,61

4. Συζήτηση

Σε παγκόσμια κλίμακα ο χυμός μανταρινιού έχει μικρότερη οικονομική σημασία από το χυμό πορτοκαλιού και δεν έχει τραβήξει αρκετά την προσοχή των επιστημονικών ερευνητών. Ο παστεριωμένος χυμός πορτοκαλιού, από τα αρχικά στάδια του ως εμπορεύσιμο προϊόν (Wenzel *et al.*, 1955), ολοένα και συνεχώς αποκτούσε μεγαλύτερη σημαντικότητα λόγω της υψηλής του ποιότητας, πιθανόν της μεγαλύτερης επιτεύξιμης μεταξύ των επεξεργασμένων χυμών (Berry and Veldhuis, 1977). Όλες οι προοπτικές επεξεργασίας του έχουν μελετηθεί εκτενώς συμπεριλαμβανομένων καταλληλότητας διαφορετικών ποικιλιών (Lafuente *et al.*, 1978a), επίδρασης θερμικής επεξεργασίας (Lafuente *et al.*, 1978b; Marcotte *et al.*, 1998), μεταβολών στην ποιότητα κατά την αποθήκευση (Lafuente *et al.*, 1979a) και ανάμειξη νωπών χυμών για προετοιμασία τυποποιημένων ποιοτικών καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Izquierdo *et al.*, 1980). Αντιθέτως, οι αναφορές που σχετίζονται με το χυμό μανταρινιού είναι λιγοστές (Ogawa *et al.*, 1990) και καταπιάνονται κυρίως με σύσταση (Bonfanti *et al.*, 1990; Trifiro *et al.*, 1999) και έλεγχο καθαρότητας (Ooghe and Detavernier, 1997) αλλά όχι με την επεξεργασία. Παρόλα αυτά, η βιολογική ομοιότητα μεταξύ πορτοκαλιών και μανταρινιών υποδηλώνει μια παρόμοια συμπεριφορά κατά την επεξεργασία τους και οι μελέτες πάνω στο χυμό των πρώτων θα μπορούσαν να αποδειχθούν πολύτιμες για το χυμό των δεύτερων.

Η απώλεια θολώματος στους χυμούς των εσπεριδοειδών λόγω δράσης της πηκτινομεθυλεστεράσης, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα ποιοτικής υποβάθμισης αυτών των προϊόντων που μειώνει σημαντικά την εμπορική αξία τους. Η μελέτη της κινητικής απενεργοποίησης του ενζύμου αυτού, επιτρέπει την εκτίμηση κατάλληλων χρόνων και θερμοκρασιών που δίνουν τη δυνατότητα σχεδιασμού της παστερίωσης, τέτοιας ώστε να διατηρείται σε ικανοποιητικό βαθμό το θόλωμα στο χυμό και ταυτοχρόνως να περιορίζεται η υποβάθμιση των ποιοτικών παραμέτρων, κάτι που είναι ιδιαίτερα επιθυμητό από τους καταναλωτές. Αφού οι μικροοργανισμοί παρόντες στους χυμούς είναι συνήθως λιγότερο θερμοάντοχοι από την PME, οι συνθήκες επεξεργασίας θα πρέπει να τέτοιες ώστε να επέρχεται επαρκής απενεργοποίησή της (Kimball, 1999), παράλληλα όμως να διατηρείται η φρέσκια γεύση του χυμού αφού παρατεταμένη θέρμανση μπορεί να προκαλέσει σημαντική αλλοίωση (Berry and Veldhuis, 1977).

Οι Sentandreu *et al.* (2005) αναφέρουν πως σε δοκιμές μέτρησης εναπομένουσας PME ενεργότητας σε χυμούς από πορτοκάλι, μανταρίνι και υβρίδια τους, βρέθηκαν ποσοστά κοντά στο 20%, με συνθήκες επεξεργασίας 70°C για 5, 10 και 20 δευτερόλεπτα και 80°C για 5 και 10 sec. Η ενεργότητα αυτή κατήλθε στο 15% όταν στους 80°C η διάρκεια επεξεργασίας ήταν 20 sec. Μάλιστα, όσον αφορά στους χυμούς μανταρινιού, η ενεργότητα στους 85°C για 10 s βρέθηκε να κυμαίνεται στο 2-5%. Πλήρης απενεργοποίηση στους ίδιους χυμούς (0-1%) επετεύχθη στους 95°C, στον ίδιο χρόνο θέρμανσης. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία τόσο με αυτά των Carbonell *et al.* (2006) (υπολειπόμενη δραστηριότητα ενζύμου στο 3,9% περίπου, μετά από θέρμανση στους 84°C για 10 s) όσο και με αυτά της παρούσας μελέτης. Οι Cameron *et al.* (1994) αναφέρουν πως η θέρμανση πορτοκαλοχυμού με συμβατική μέθοδο στους 80°C για 2 min, ήταν αρκετή για να απενεργοποιηθεί και η πιο θερμοάντοχη μορφή της PME ενώ σύμφωνα με τους Sadler *et al.* (1992) η συνολική ενεργότητα όλων των ισομορφών μειώθηκε στο 0,1%, ύστερα από 1 min επεξεργασίας στους 90°C. Τέλος, οι Cinquanta *et al.* (2010) αναφέρουν πως το θερμοευαίσθητο κλάσμα της PME στο χυμό πορτοκαλιού ήταν δυνατό να απενεργοποιηθεί πλήρως, με θέρμανση με μικροκύματα στους 70°C για 1 min.

Αρκετοί ερευνητές (Ly Nguyen *et al.*, 2002a, 2002b· Guiavarch *et al.*, 2005· Castro *et al.*, 2006· Boulekou *et al.*, 2008) αναφέρουν μεγάλες τιμές στην ενέργεια ενεργοποίησης (E_a), όπως προέκυψε και από τη δική μας μελέτη. Επίσης, ιδιαίτερα υψηλές τιμές για την ενέργεια ενεργοποίησης κατά τη μετουσίωση της PME σε καρότο και πατάτα (510-635 kJ/mol και 493-759 kJ/mol, αντίστοιχα) έκαναν λόγο οι Anthon και Barret (2002). Υψηλή τιμή στην ενέργεια ενεργοποίησης υποδηλώνει μεγάλη εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης (k) από τη θερμοκρασία και κατά συνέπεια μικρές αλλαγές στη θερμοκρασία συνεπάγονται μεγάλη αύξηση στο ρυθμό απενεργοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης. Αυτό όμως ισχύει μόνο από μία κρίσιμη θερμοκρασία και πάνω όπου η απενεργοποίηση του ενζύμου είναι μεγάλη (μικρή υπολειπόμενη ενεργότητα). Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, όπου δεν επέρχονται μη αντιστρεπτές αλλαγές στη δομή του ενζύμου, η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης δεν είναι ιδιαίτερος σημαντική (Anthon and Barrett, 2002).

Όσον αφορά στο χρώμα του χυμού, οι Agcam και Akyildiz (2014) πραγματοποίησαν συγκρίσεις στα L, a, b, C και h μεταξύ δειγμάτων φυσικού και

παστεριωμένου χυμού (95°C για 15 s) από τις ποικιλίες μανταρινιών Fremont, Robinson και Satsuma και κατέληξαν στο ότι υπήρχε αύξηση των τιμών τους μετά τη θερμική επεξεργασία, εκτός από το *h* όπου στις Satsuma και Robinson βρέθηκε μειωμένο σε σχέση με το φυσικό χυμό. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν σε μεγάλο βαθμό με αυτά που παραθέσαμε στη μελέτη μας. Σε αντίστοιχες συγκρίσεις (μάρτυρας σε σχέση με παστεριωμένο δείγμα στους 95°C-1 min) που πραγματοποίησαν οι Demirdoven και Baysal (2014) σε χυμό πορτοκαλιού βρήκαν πως τα *L*, *a* και *b* είχαν μειωθεί στο επεξεργασμένο προϊόν. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 2 διαφορετικές ποικιλίες (Ruby Red, Star Ruby) κόκκινων grapefruit (Lee and Coates, 1999), τα *L*, *a* και *b* παρουσίασαν αύξηση σε παστεριωμένα δείγματα σε σχέση με αυτά του φρέσκου χυμού και ειδικά στην απόχρωση κίτρινου-μπλε ήταν σημαντική σε βαθμό που το κιτρίνισμα ήταν αντιληπτό και οπτικά. Η δε χρωματική γωνία (*h*) και πυκνότητα (*C*) αυξήθηκαν επεξεργασμένους χυμούς Star Ruby ενώ στους Ruby Red η πρώτη μειώθηκε και η δεύτερη αυξήθηκε.

Τέλος, σχετικά με τη θολερότητα του χυμού, οι Carbonell *et al.* (2011) υπολόγισαν περατότητα φωτός 0,8%-2,1% σε διάφορα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα χυμού πορτοκαλιού. Σε παρόμοια αποτελέσματα είχαν καταλήξει οι Mizrahi και Berk (1970) όπου μεταξύ άλλων είχαν διαπιστώσει πως η παστερίωση προκαλούσε μια αύξηση των λεπτών στερεών σωματιδίων εις βάρος των χονδροειδών σωματιδίων. Κατ' αυτό τον τρόπο, η ιζηματογενής πούλα μετατρέπεται σε κολλοειδής, συνεισφέροντας σημαντικά στο θόλωμα του επεξεργασμένου χυμού. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με την κλίμακα (περατότητα 0-24% αντιστοιχεί σε μηδενική διαύγαση, 25-35% σε ελαφριά, 36-60% σε καθοριστική και 61-100% σε ακραία) που εξέδωσε ο Cheng (2002) για την εκτίμηση της διαύγασης των χυμών, τα δείγματα μας άνηκαν στην πρώτη κατηγορία.

5. Συμπεράσματα

Ανακεφαλαιώνοντας, στην παρούσα μελέτη μετρήθηκε η ενεργότητα της πηκτινομεθυλεστεράσης (PME) στο χυμό μανταρινιού και προσαρμόστηκαν τα δεδομένα ενεργότητας της μετά από θερμική επεξεργασία σε διάφορα κινητικά μοντέλα. Κατόπιν μετρήθηκαν οι μεταβολές στις χρωματικές παραμέτρους και στην περιεκτικότητα του ασκορβικού οξέος και καταγράφηκε η αποδυνάμωση του θολώματος, πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία του χυμού σε διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες. Τα συμπεράσματα στα οποία οδηγηθήκαμε είναι τα εξής:

- ❖ Η αρχική ενεργότητα της πηκτινομεθυλεστεράσης (PME) στο φρέσκο, μη θερμικά επεξεργασμένο χυμό μανταρινιού κυμαινόταν στα 2,3-2,4 U/mL, με εύρος τιμών από 1,8 έως 2,88.
- ❖ Η κινητική της θερμικής απενεργοποίησης της PME δεν ήταν εφικτό να ερμηνευθεί από μοντέλο 1^{ης} τάξης. Το μοντέλο μερικής μετατροπής έδινε σαφέστατα μία καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, αλλά αυτό της νιοστής τάξης καθώς και η κατανομή Weibull έδειξαν την πιο ιδανική προσαρμογή στα δεδομένα μας.
- ❖ Με βάση τους συνδυασμούς χρόνων και θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκαν και σε συσχέτισμό με τις εναπομείνουσες δραστηριότητες της PME, διαπιστώνουμε πως πρόκειται για ένα αρκετά ανθεκτικό στη θέρμανση ένζυμο.
- ❖ Η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) της αδρανοποίησης της πηκτινομεθυλεστεράσης στο χυμό μανταρινιού βρέθηκε σχετικά υψηλή, αλλά όχι σημαντικά διαφορετική από αυτή που αναφέρεται για χυμούς άλλων εσπεριδοειδών ή φρούτων γενικότερα. Πιο συγκεκριμένα, η προσαρμογή στα περισσότερα μοντέλα έδωσε τιμές που κυμαίνονταν στα 280-395 kJ/mol.
- ❖ Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη μελέτη της θολερότητας των χυμών ήταν ανάλογα της εναπομένουσας ενεργότητας της PME, και κατ' επέκταση του εύρους της απώλειας του θολώματος που αυτή συνεπάγεται.
- ❖ Η φωτεινότητα (L) ήταν μικρότερη στο δείγμα των 90°C από αυτή των υπολοίπων δειγμάτων. Η απόχρωση κόκκινου-πράσινου (a) ήταν μεγαλύτερη στα δείγματα 65°C/19 min και μάρτυρα από εκείνη στα δείγματα 75°C/1 min

και 90°C/1 min. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα οδηγούμαστε από τα αποτελέσματα για την απόχρωση κίτρινου-μπλε (b) και τη χρωματική πυκνότητα (C). Η χροιά του χρώματος (h) βρέθηκε μεγαλύτερη στα δείγματα 75°C/1 min και 90°C/1 min από την αντίστοιχη σε 65°C/19 min και control.

- ❖ Τέλος, η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα ήταν ελαφρώς μειωμένη σε σχέση με το δείγμα φρέσκου χυμού και ακολουθούσε φθίνουσα πορεία με την άνοδο της θερμοκρασίας, χωρίς όμως να διακρίνονται μεγάλες διαφορές μεταξύ των 4 προϊόντων.

Ξένη Βιβλιογραφία

Ağçam E. and Akyıldız A. (2014). A Study on the Quality Criteria of Some Mandarin Varieties and Their Suitability for Juice Processing. *Journal of Food Processing*, vol. 2014, Article ID 982721, 8 pages.

Aguilera-Carbó A., Montañez J.C., Anzaldúa-Morales A., Reyes M.L., Contreras-Esquivel J.C. and Aguilar C.N. (1999). Improvement of color and limpness of fried potatoes by *in situ* pectinesterase activation. *European Food Research and Technology*, 210: 49-52.

Ahmed, J., Shivhare, U.S., & Sandhu, K.S. (2002). Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *Journal of Food Science*, 67: 2692–2695.

Amstalden, L.C. and Montgomery M.W. (1994). Pectinesterase in orange juice: Characterization. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 14(1): 37–45.

Anthon G. E. and Barrett D. M. (2002). Kinetic Parameters for the Thermal Inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, No. 14: 4121-4123.

AOAC International (2007). Official methods of analysis, 18th ed. (2005), Current through revision 2, 2007 (On-line). AOAC International, Gaithersburg, MD.

Arias C.R., Burns J.K., Friedrich L.M., Goodrich R.M. and Parish M.E. (2002). Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 4: 1955–1961.

Atkins C.D., Wiederhold E. and Moore E.L. (1945). Vitamin C content of processing residue from Florida citrus waste. *Fruit Products. Journal of American Food Manufacturing*, 24: 260–262, 281.

Baker R.A. (1979). Clarifying properties of pectin fractions separated by ester content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1387–1389.

Baker R.A. and Cameron R.G. (1999). Clouds of citrus juices and juice drinks. *Food Technology*, 53(1): 64–69.

- Balogh T., Smout C., Ly Nguyen B., Van Loey A. and Hendrickx M. (2004). Thermal and high pressure inactivation kinetics of carrot pectinmethylesterase (PME): from model systems to real foods. *Innovative Food Science and Emerging Tehcnologies*, 5:429–436.
- Berry R.E. and Veldhuis M.K. (1977). Processing of oranges, grapefruit and tangerines. In: Nagy S., Shaw P.E. and Veldhuis M.K. (eds), *Citrus Science and Technology – 2*. Westport, CT: The Avi Publishing Company, Inc.: 177–252.
- Beuchat L.R. (1982). Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *Journal of Food Science*, 47: 1679-1682.
- Biacs P. and Wissgot U. (1997). Investigation of colour changes of some tomato products during frozen storage. *Nahrung*, 41: 306–310.
- Bigelow W.D. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal of Infectious Diseases*, 29(5):528-536.
- Bonfanti G., Decio P., Gherardi S. and Trifiro A. (1990). Analytical characterization of mandarin juice var. Rangsit produced by different extraction technologies. *Essenze Derivati Agrumari*, 60: 16–28.
- Boulekou S.S., Katsaros G.J. and Taoukis P.S. (2008). Inactivation kinetics of peach pulp pectin methylesterase as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Food and Bioprocess Tehnology*, doi: 10.1007/s11947-008-0132-4.
- Braddock R. J. (1999). Single-strength orange juice and concentrates, in R. J. Braddock (Ed.), *Handbook of citrus by-products and processing technology*, Wiley, New York: 53-83.
- Buckow R., Weiss U. and Knorr D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Tehcnologies*, 10(4):441–448.
- Cameron J.W., Soost R.K. and Frost H.B. (1965). Encore and Pixie-two new mandarin hybrids with unusually late seasons of use. *California’s Agricultural Experiment Station Bulletin*, 814: 8.
- Cameron R. G. and Grohmann K. (1995). Partial purification and thermal characterization of pectinmethylesterase from red grapefruit finisher pulp. *Journal of Food Science*, 60(4): 821–825.

Cameron R.G. and Grohmann K. (1996). Purification and characterization of a thermally tolerant pectin methylesterase from a commercial Valencia fresh frozen orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2): 458–462.

Cameron R.G., Baker A.R., Buslig A.B. and Grohmann K. (1999). Effect of juice extractor settings on juice cloud stability *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7): 2865–2868.

Cameron R.G., Baker R.A. and Grohmann K. (1997). Citrus tissue extracts affect juice cloud stability. *Journal of Food Science*, 62(2): 242-245.

Cameron R.G., Niedz R.P. and Grohmann K. (1994). Variable heat stability for multiple forms of pectin methylesterase from citrus tissue culture cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4): 903–908.

Carbonell J.V., Tárrega A., Gurrea M.C. and Sentandreu E. (2011). Chilled orange juices stabilized by centrifugation and differential heat treatments applied to low pulp and pulpy fractions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(3): 315-319.

Carbonell J. V., Contreras P., Carbonell L. and Navarro J. L. (2006). Pectin methylesterase activity in juices from mandarins, oranges and hybrids. *European Food Research and Technology*, 222(1–2): 83–87.

Carreño J.M., Gurrea M.C., Sampedro F. and Carbonell J.V. (2011). Effect of high hydrostatic pressure and high-pressure homogenisation on *Lactobacillus plantarum* inactivation kinetics and quality parameters of mandarin juice. *European Food Research and Technology*, 232: 265–274.

Castaldo D., Quagliuolo L., Servillo L., Balestrieri C. and Giovane A. (1989). Isolation and characterization of pectinmethylesterase from apple fruit. *Journal of Food Science*, 54: 653-655, 673.

Castro S.M., Van Loey A., Saraiva J.A., Smout C. and Hendrickx M. (2006). Inactivation of pepper (*Capsicum annuum*) pectin methylesterase by combined high-pressure and temperature treatments. *Journal of Food Engineering*, 75: 50–58.

Chávez S.N., De la Garza-Toledo H., Aguilera-Carbó A., Montañez J.C., Contreras-Esquivel J.C. and Aguilar C.N. (1998). Effect of no ordinary blanchings on physico-chemical and microbiological quality of fried potato strips. *Industria Alimentari*, 20: 19-22

Chen B.H., Chen T.M. and Chien J.T. (1994). Kinetic model for studying the isomerization of α -carotene during heating and illumination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2391–2397.

Chen C.S. and Wu M.C. (1998). Kinetic models for thermal evaluation of evaporators. In: Valentas KJ, Rotsten E, Singh RP (eds). *Journal of Food Science*, 63(5): 747-750.

Chen C.S., Shaw P.E. and Parish M.E. (1993). Orange and tangerine juices. In: Nagy, S., Chen, C.S., Shaw, P.E. (Eds). *Fruit Juice Processing Technology*, p. 110-165. AGSCIENCE, Inc., Auburndale, Florida.

Cheng G. (2002). *Procedures for analysis of citrus products* (4th ed), p. 192. Lakeland , Fla. USA: FMC Technologies, Inc. FMC FoodTech, Citrus Systems

Cinquanta L., Albanese D., Cuccurullo G. and Dimatteo M. (2010). Effect on Orange Juice of Batch Pasteurization in an Improved Pilot-Scale Microwave Oven. *Journal of Food Science*, 75(1): 46-50.

Crandall P.G., Matthews R.F. and Baker R.A. (1983). Citrus beverage clouding agents-review and status. *Food Technology*, 37(12): 106–109.

Crelier S., Robert M.C., Claude J. and Juillerat M.A. (2001). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat and pressure-induced inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5566-5575.

Curl A.L. and Baily G.F. (1956). Orange carotenoids. Comparison of Valencia orange peel and pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4: 156-159.

D'Amico D. J., Silk T.M., Wu J. and Guo M. (2006). Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 69(3): 556-563.

De Sio F., Palmieri A., Servillo L., Giovane A. and Castaldo D. (2001). Thermoresistance of pectin methylesterase in Sanguinello orange juice. *Journal of Food Biochemistry*, 25(2): 105-115.

Demirdöven A. and Baysal T. (2014). Optimization of ohmic heating applications for pectin methylesterase inactivation in orange juice. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9): 1817–1826

- Denes J., Baron A. and Drilleau J. (2000). Purification, properties and heat inactivation of pectinmethylesterase from apple (cv. Golden Delicious). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1503–1509.
- Deshpande S.S., Deshpande U.S. and Salunkhe D.K. (1996). Nutritional and health aspects of food antioxidants. In: Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. (Eds.), *Food Antioxidants (Technological, Toxicological, and Health Perspectives)*, p. 361-470. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Do Amaral S.H., De Assis S.A. and Oliveira O.M.M.D.F. (2005). Partial purification and characterization of pectin methylesterase from orange (*Citrus sinensis*) CV. Pera-Rio. *Journal of Food Biochemistry*, 29: 367–380.
- Durak M.Z., Churey J.J., Danyluk M.D. and Worobo R.W. (2010). Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 142, no. 3: 286-291.
- Eagerman B. A. and Rouse A. H. (1976). Heating inactivation temperature-time relationships for pectinesterase inactivation in citrus juice. *Journal of Food Science*, 41: 1396-1397.
- Eilati S.K. (1970). The changes in the ripening orange fruit as affected by exogenous and endogenous factors. Ph.D. Thesis. The Hebrew University of Jerusalem.
- Elez-Martinez P., Aguilo-Aguayo I. and Martin-Belloso O. (2006). Inactivation of orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 71-81.
- Elez-Martinez P., Suarez-Recio M. and Martin-Belloso O. (2007). Modeling the reduction of pectin methyl esterase activity in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 78: 184-193.
- Eskin, N.A.M. (1990). Biochemistry of food processing: Browning reactions in foods. In: *Biochemistry of foods* (second ed), p. 240-295. London-Academic Press.
- Evans R. and McHale D. (1978). Multiple forms of pectinesterase in limes and oranges. *Phytochemistry*, 17(7): 1073–1075.

- Fachin D., Van Loey A., Ly Nguyen B., Verlent I., Indrawatti I. and Hendrickx M.E. (2002a). Comparative study of the inactivation kinetics of pectinmethylesterase in tomato juice and purified form. *Biotechnology Progress*, 18: 739–744.
- Fayyaz A., Asbi B.A., Ghazali H.M., Che Man Y.B. and Jinap S. (1994). Purification and molecular properties of papaya pectinesterase. *Food Chemistry*, 49: 373-378.
- Fellers P.J. (1988). Shelf life and quality of freshly squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled citrus juice. *Journal of Food Science*, 53(6), 1699–1702.
- Francis F.J. (1962). Relationship between flesh color and pigment content in squash. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 81: 408-414.
- Giner J., Grouberman P., Gimeno V. and Martin O. (2005). Reduction of pectinesterase activity in a commercial enzyme preparation by pulsed electric fields: comparison of inactivation kinetic models. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1613-1621.
- Giovane A., Quagliulo L., Castaldo D., Servillo L. and Balestrieri C. (1990). Pectin methylesterase from *Actinidia chinensis* fruits. *Phytochemistry*, 29: 2821- 2823.
- Glass G.V., Peckham P.D. and Sanders J.R. (1972). Consequences of failure to meet assumptions underlying fixed effects analyses of variance and covariance. *Review of Educational Research*, 42: 237-288.
- Gordon L.R. and Samaniego-Esquerria M.C. (1990). Effect of soluble solids and temperature on ascorbic acid degradation in lemon juice stored in glass bottles. *Journal of Food Quality*, 13: 361–374.
- Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Fujita R., *et al.* (2007). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangioides* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 57, no. 6: 1276-1285.
- Graumlich T.R., Marcy J.E. and Adams J.P. (1986). Aseptically packaged orange juice and concentrate: a review of the influence of processing and packaging conditions on quality. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 34: 402-405.

Gregory J.F. (1996). Vitamins. In: O. R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry*, 3rd ed., p. 559-568. Marcel Dekker, New York.

Gross J. (1991). *Pigments in Vegetables. Chlorophylls and Carotenoids*, Van Nostrand Reinhold, New York.

Guiavarch Y., Segovia O., Hendrickx M. and Van Loey A. (2005). Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of a pectin methylesterase from white grapefruit (*Citrus paradisi*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6: 363–371.

Hang Y., Nielsen S.S. and Nelson P.E. (2000). Thermostable and thermostable isoforms in commercial orange peel pectinesterase. *Journal of Food Biochemistry*, 24: 41–54.

Hendrickx M., Maesmans G., De Gordt S., Noronha J., Van Loey A. and Tobback P. (1995). Evaluation of the integrated time-temperature effect in thermal processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(3): 231-262.

Hendrix C.M. and Redd J.B. (1995). Chemistry and technology of citrus juices. In: Ashurst, P.R. (Ed.), *Production and Packaging of non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Beverages*, 2nd ed., p. 53-87. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.

Hills C.H., Mottern H.H., Nutting G.C. and Speiser R. (1949). Enzyme demethylated pectinates and their gelation. *Food Technology*, 3: 90–94.

Holland, R.R., Reder S.K. and Pritchett D.E. (1976). An accelerated test for residual cloud reducing enzyme activity in citrus juices. *Journal of Food Science*, 41: 812–814.

Hotchkiss A.T., Savary B.J., Cameron R.G., Chau H.K., Brouillette J., Luzio G.A. and Fishman M.L. (2002). Enzymatic modification of pectin to increase its calcium sensitivity while preserving its molecular weight. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2931–2937.

Hou W.N., Jeong Y., Walker B.L., Wie C.I. and Marshall M.R. (1997). Isolation and characterization of pectinesterase from Valencia orange. *Journal of Food Biochemistry*, 21(3): 309–333.

https://en.wikipedia.org/wiki/Mandarin_orange (<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>, NDB No. 09218), accessed 2 September 2015.

Huelin F.E. (1953). Studies on the anaerobic decomposition of ascorbic acid. *Food Research*, 18: 633–639.

ICMSF (2005). Soft drinks, fruit juices, concentrates and food preserves. *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodity*. Kluwer Academic Publisher.

Image from the Protein Data Bank in Europe (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>, accessed 28 September 2015) of PDB ID 1GQ8 (Johansson K., El-Ahmad M., Friemann R., Jornvall H., Markovic O. and Eklund H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters*, 514: 243-249).

Indrawatti I. (2000). Lipoxygenase inactivation by high pressure treatment at subzero and elevated temperatures: A kinetic study. Ph.D. Thesis. Department of Microbial and Molecular Systems, Faculty of Bioscience Engineering, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

Ingallinera B., Barbagallo R.N., Spagna G, Palmeri R. and Todaro A. (2005). Effects of thermal treatments on pectinesterase activity determined in blood oranges juices. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2–3): 258–263.

Irwe S. and Olsson I. (1994). Reduction of pectinesterase activity in orange juice by high pressure treatment. In: R.P. Singh, F.A.R. Oliveira (Eds.), *Minimal processing of foods and process optimization- an interface*, p. 35-42. CRC Press, Boca Raton, Fla. USA.

Izquierdo L., Gasque F., Nieto P. and Lafuente B. (1980). Zumo de naranja refrigerado. IV. Preparación de zumo de calidad uniforme a lo largo del año. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 20: 525–530.

Jayani R.S., Saxena S. and Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40: 2931-2944.

Johansson K., El-Ahmad M., Friemann R., Jornvall H., Markovic O. and Eklund H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters*, 514: 243-249.

Johnson J.R., Braddock R.J. and Chen C.S. (1995). Kinetics of ascorbic acid loss and non-enzymatic browning in orange juice serum: Experimental rate constants. *Journal of Food Science*, 60(3): 502–505.

Joye D.D. and Luzio G.A. (2000). Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. *Carbohydrate Polymers*, 43: 337–342.

- Kenawi M.A., Shekib L.A. and Elshimi N.M. (1994). The storage effects of calcium-fortified orange juice concentrate in different packaging materials. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45(3): 265-275.
- Kennedy J.F., Rivera Z.S., Lloyd L.L., Warner F.P. and Jumel K. (1992). L-ascorbic acid stability in aseptically processed orange juice in TetraBrik cartons and the effect of oxygen. *Food Chemistry*, 45(5): 327-331.
- Kim H.B., Tadini C.C. and Singh R.K. (1999). Effect of different pasteurization conditions of enzyme inactivation on orange juice in pilot scale experiments. *Journal of Food Process Engineering*, 22: 395-403.
- Kimball D.A. (1999). Citrus Processing, 2nd ed. Aspen Publications.
- Klavons J.A., Bennett R.D. and Vannier SH (1991). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1546–1548.
- Klavons, J.A., Bennett R.D. and Vannier S.H. (1994). Physical/chemical nature of pectin associated with commercial orange juice cloud. *Journal of Food Science*, 59: 399–401.
- Komae K. and Misaki A. (1989). Isolation and characterization of gel-forming polygalacturonoide from seeds of *Ficus awkeotsang*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 1237-1245.
- Komae K., Sone Y., Kakuta M. and Misaki A. (1990). Purification and characterization of pectinesterase from *Ficus awkeotsang*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 1469-1476.
- Ladaniya M. (2008). Nutritive and Medicinal Value of Citrus Fruits. In: *Citrus Fruits-Biology, Technology and Evaluation*, p. 503. Elsevier, San Diego, USA.
- Lafuente B., Gasque F., Nieto P. and Izquierdo L. (1978a). Zumo de naranja refrigerado. II. Influencia de la variedad y del índice de madurez sobre su calidad. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 18:180–192.
- Lafuente B., Gasque F., Nieto P. and Izquierdo L. (1978b). Zumo de naranja refrigerado. I. Influencia de las condiciones de elaboración sobre su calidad. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 18: 65–72.

- Lafuente B., Gasque F., Nieto P. and Izquierdo L. (1979a). Zumo de naranja refrigerado.. Estabilidad durante el almacenamiento. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 19: 243–252.
- Laratta B., De Masi L., Minasi P. and Giovane A. (2008). Pectin methylesterase in *Citrus bergamia* R.: Purification, biochemical characterisation and sequence of the exon related to the enzyme active site. *Food Chemistry*, 110(4): 829–837.
- Lawlor K.A., Schuman J.D., Simpson P.G. and Taormina P.J. (2009). Microbiological spoilage of beverages. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. W. H. Sperber and M. P. Doyle, Eds., Food Microbiology and Food Safety. Springer Science and Business Media, NY, USA.
- Lee H.S. and Chen C.S. (1998). Rates of vitamin C loss and discoloration in clear orange juice concentrate during storage at temperatures of 4-24°C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11): 4723-4727.
- Lee H.S. and Coates G.A. (1999). Thermal pasteurization effect on color of red grapefruit juices. *Journal of Food Science*, Volume 64, No. 4: 663-666.
- Lee H.S. and Coates G.A. (1999b). Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chemistry*, 65: 165-168.
- Lee H.S. and Nagy S. (1988a). Quality changes and nonenzymatic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *Journal of Food Science*, 53(1): 168–171.
- Lee H.S. and Nagy S. (1988b). Relationship of sugar degradation to detrimental changes in citrus juice quality. *Food Technology*, 11: 91–97.
- Lee H.S., Castle W.S. and Coates G A. (2001). High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange grown in Florida, USA. *Journal of Chromatography A*, 913: 371–377.
- Lee J.Y., Lin Y.S., Chang H.M., Chen W. and Wu M.C. (2003). Temperature time relationships for thermal inactivation of pectinesterases in orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(7): 681-684.
- Lee M. and Macmillan J.D. (1968). Mode of action of pectic enzymes. I. Purification and certain properties of tomato pectinesterase. *Biochemistry*, 7: 4005-4010.

- Lemos M.A., Oliveira J.C., Van Loey A.M. and Hendrickx M.E. (1999). Influence of pH and high pressure on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase. *Food Biotechnology*, 13: 13-32.
- Lessin W.J., Catigani G.L. and Schwartz S.J. (1997). Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:3728-3732.
- Lewis I.N., Coggins C.W. and Garber M.J. (1964). Chlorophyll concentration in the Navel orange rind as related to potassium giberellate, light intensity and time. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 84: 177-180.
- Lima M., Heskitt B.F., Burianek L.L., Nokes S.E. and Sastry S.K. (1999). Ascorbic acid degradation kinetics during conventional and ohmic heating. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23(5): 421-434.
- Lix L.M., Keselman J.C. and Keselman H.J. (1996). Consequences of assumption violations revisited: A quantitative review of alternatives to the one-way analysis of variance F test. *Review of Educational Research*, 66: 579-619.
- Lourenco E.J. and Catutani A.T. (1984). Purification and properties of pectinesterase from papaya. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35: 1120-1127.
- Lund D.B. (1975). Heat processing. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Principles of Food Science, Part II. Physical Principles of Food Preservation*, p. 31-92. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Ly Nguyen B., Van Loey A., Fachin D., Verlent I., Indrawati and Hendrickx M. (2002a). Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv. Cavendish). *Biotechnology and Bioengineering*, 78: 683-691.
- Ly Nguyen B., Van Loey A., Fachin D., Verlent I., Indrawati and Hendrickx M. (2002b). Partial purification, characterization and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5437-5444.
- Ly Nguyen B., Van Loey A., Fachin D., Verlent I., Duvetter T., Smout C., Vu S.T., Hendrickx M.E. (2002c). Strawberry pectin methylesterase (PME): purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. *Biotechnology Progress*, 18: 1447-1450.

- Ly Nguyen B., Van Loey A.M., Smout C., Ozcan S.E., Fachin D., *et al.* (2003a). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: a kinetic study. *Journal of Food Science*, 68: 1377–1383.
- Ly Nguyen B., Van Loey A.M., Smout C., Verlent I., Duvetter T. and Hendrickx M. (2003b). Effects of mild heat and high pressure processing on banana pectinmethylesterase: a kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7974–7979.
- Manso M.C., Oliveira F.A.R., Oliveira J.C. and Frias J.M. (2001). Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(3): 303-312.
- Mapson L.W. (1967). *The Vitamins*. Vol. I, p. 385. Academic Press, London and New York.
- Marcotte M., Stewart B. and Fustier P. (1998). Abused thermal treatment impact on degradation products of chilled pasteurized orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1991–1996.
- Maroulis Z.B. and Saravacos G.D. (2003). *Food Process Design*. Marcel Dekker, New York.
- Marshall M.R., Marcy J.E. and Braddock R.J. (1985). Effect of total solids level on heat inactivation of pectinesterase on orange juice. *Journal of Food Science*, 50: 220-222.
- McDonald H.M., Evans R. and Spencer W.J. (1993). Purification and properties of the major pectinesterases in lemon fruits (*Citrus limon*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62: 163–168.
- McGuire R.G. (1992). Reporting of objective color measurements. *Horticultural Science*, 27: 1247-1255.
- McIntyre S., Ikawa J.Y., Parkinson N., Haglund J. and Lee J. (1995). Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolates from shelf-stable juices. A research note. *Journal of Food Protection*, 58(3): 319-321.
- McMillan J.D. and Sheman M.I. (1974). Pectin Enzymes. In : Whitaker J. R. (ed.). *Food Related Enzymes* (Advances in Chemistry Series VI. 136), p.101-130. Washington DC: American Chemical Society.
- Melendez-Martinez A.J., Vicario I.M. and Heredia F.J. (2007). Review: analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:638–649.

- Micheli F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6(9): 414-419.
- Mizrahi S. and Berk Z. (1970). Physico-chemical characteristics of orange juice cloud. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21: 250–253.
- Mortensen A. and Skibsted L.H. (2000). Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 279–286.
- Moss M.O. (2008). Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 104, no. 5: 1239-1243.
- Moyer J.C. and Aitken H.C. (1980). Apple juice. In P. E. Nelson & D. K. Tressler (Eds.), *Fruit and vegetable juice processing technology*, p. 212-267. Westport: AVI.
- Nath N. and Ranganna S. (1977). Time/temperature relationship for thermal inactivation of pectinesterase in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) juice. *Journal of Food Technology*, 12: 411-419.
- Nath N., Rao A. and Gupta R. (1983). Thermal resistance of pectin methyl esterase in juice of pusa-ruby tomatoes. *Indian Food Packer*, 37: 30-38.
- Nienaber U, Shellhammer T.H. 2001. High-pressure processing of orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science*, 66: 328–31.
- Njoku P.C., Ayuk A.A. and Okoye C.V. (2011). Temperature Effects on Vitamin C Content in Citrus Fruits. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(12): 1168-1169.
- Ogawa H., Fukuhisa K., Kuba Y. and Fukumota H. (1990). Pressure inactivation of yeasts, molds and pectinesterase in satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH and organic acids and comparison with heat sanitation *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(5): 1219-1225.
- Ooghe W.C. and Detavernier C.M. (1997). Detection of the addition of *Citrus reticulata* and hybrids to *Citrus sinensis* by flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1633–1637.
- Owusu-Yaw J., Marshall M.R., Koburger J.A. and Wei C.I. (1988). Low pH inactivation of pectinesterase in single strength orange juice. *Journal of Food Science*, 53(2): 504-507.

- Pao S. and Davis C.L. (2001). Transfer of natural and artificially inoculated microorganisms from orange fruit to fresh juice during extraction. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 34: 113-117.
- Park Y.W. (1987). Effect of Freezing, Thawing, Drying, and Cooking on Carotene Retention in Carrots, Broccoli and Spinach. *Journal of Food Science*, 52: 1022–1025.
- Pegg R.B., Landen W.O. and Eitenmiller R.R. (2010). Vitamin analysis. Ch. 11. In: Nielsen SS (ed) *Food analysis*, 4th edn. Springer, New York.
- Peleg M. and Cole M.B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 353-80.
- Perez-Lopez A.J., Beltran F., Serrano-Megias M., Saura D. and Carbonell A.A. (2005). Changes in orange juice color by addition of mandarin juice. *European Food Research and Technology*, 222: 516–520.
- Pflug I. J. and Odlaug T.E. (1978). A review of z and F values used to ensure the safety of low-acid canned food. *Food Technology*, 32: 63-70.
- Pilnik W. and Voragen A. (1991). The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing. In: *Food Enzymology*, Vol. 1, ed. P.F. Fox, p. 304-336. Elsevier Applied Science, London.
- Pilnik W. and Voragen A.G.J. (1993). *Enzymes in food processing*. 3rd ed., p. 363–393. Academic Press, London, UK.
- Polydera A.C., Galanou E., Stoforos N.G. and Taoukis P.S. (2004). Inactivation kinetics of pectin methylesterase of Greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering*, 62(3): 291-298.
- Pruthi J.S., Manan J.K., Teotia M.S., Radhakrishna Setty G., Eipeson W.E., Saroja S. and Chikkappajii K.C. (1984). Studies on the utilization of Kinnow and Malta oranges. *Journal of Food Science and Technology*, India 21(3): 123-127.
- Puri A., Solomos T. and Kramer A. (1982). Partial purification and characterization of potato pectinesterase. *Food Chemistry*, 8: 203-213.
- Redd B.J., Hendrix Jr. C.M. and Hendrix D.L. (1986). In: *Quality Control Manual for Citrus Processing Plants*, Vol. 1. Safety Harbor, Florida: Intercit.

- Riahi E. and Ramaswamy H.S. (2003). High-Pressure processing of apple juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Biotechnology Progress*, 19(3): 908-914.
- Rillo L., Castaldo D., Giovane A., Servillo L., Balestrieri G. and Quagliuolo L. (1992). Purification and properties of pectin methylesterase from mandarin orange fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40: 591–593.
- Ringblom, U. (2004). The Orange Book. *Tetra Pak Processing Systems*. Lund, Sweden.
- Robertson G.L. and Samaniego C.M.L. (1986). Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage. *Journal of Food Science*, 51(1): 184–187.
- Rodrigo D., Barbosa-Canovas G.V., Martinez A. and Rodrigo M. (2003). Pectin methylesterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 66: 2336-2342.
- Rodrigo D., Martinez A., Harte F., Barbosa-Canovas G.V. and Rodrigo M. (2000). Study of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange–carrot juice by means of pulsed electric fields: comparison of inactivation kinetics models. *Journal of Food Protection*, 64: 259–263.
- Rodriguez-Amaya D.B. (1997) Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored food, USAID, OMNI Project.
- Roig M.G, Bello J.F., Rivera Z.S. and Kennedy J.F. (1999). Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Research International*, 32: 609-619.
- Rojas A.M. and Gerschenson L.N. (1997b). Influence of system composition on ascorbic acid destruction at processing temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(3): 369-378.
- Rothschild G., Vlist C.V. and Karsenty A. (1975). Pasteurization condition for juice and comminuted products of Israel citrus fruits. *Journal of Food Technology*, 10: 29-38.
- Rouse A.H. and Atkins C.D. (1954). Lemon and lime pectinesterase and pectin. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, 67: 203–206.
- Sadler G., Parish M., Van Clief D. and Davis J. (1997). The effect of volatile absorption by packaging polymers on flavor, microorganisms and ascorbic acid in reconstituted orange

juice. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie - Food Science and Technology*, 30: 686-690.

Sadler G.D., Parish M.E. and Wickerm L. (1992). Microbial, enzymatic and chemical changes during storage of fresh and processed orange juice. *Journal of Food Science*, 57(5): 1187–1197.

Sahin S. and Sumnu S.G. (2006). Physical properties of foods. Springer Science+Business Media, LLC., New York.

Sampedro F., Rodrigo D. and Hendrickx M. (2008). Inactivation kinetics of pectin methyl esterase under combined thermal high-pressure treatment in an orange juice–milk beverage. *Journal of Food Engineering*, 86(1): 133–139.

Sandhu K.S. and Bhatia B.S. (1985). Physico-chemical changes during preparation of fruit juice concentrate. *Journal of Food Science and Technology*, India 22(3): 202-206.

Saravacos G.D. and Kostaropoulos A.E. (2002). Handbook of Food Processing Equipment. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Savary B.J., Hotchkiss A.T. and Cameron R.G. (2002). Characterization of a salt independent pectin methylesterase purified from Valencia orange peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3553–3558.

Sentandreu E., Carbonell L., Carboneil J. V. and Izquierdo L. (2005). Effects of heat treatment conditions on fresh taste and on pectinmethylesterase activity of chilled mandarin and orange juices. *Food Science and Technology International*, vol. 11, no. 3: 217–222.

Seymour T.A., Preston J.F., Wicker L., Lindsay J.A. and Marshall M.R. (1991). Purification and properties of pectinesterases of Marsh white grapefruit pulp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39(6): 1080–1085.

Shaw P.E., Nagy S. and Rouseff R.L. (1993). The shelf life of citrus products. In: *Shelf Life Studies of Fruits and Beverages*, p. 755. Elsevier Science Publishers B.V.

Silva F.V.M. and Gibbs P. (2004). Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 44, no. 5: 353–360.

- Simpson K.L. (1985). Chemical changes in natural food pigments. In: Richardson T., *Chemical changes in Food during Processing*, p. 409-441. AVI Publishing Co., Westport, Conn.
- Sinclair W.B. (1984). *The Biochemistry and Physiology of the Lemon*. Oakland, CA: University of California, Division of Agriculture & Natural Resources.
- Snir R., Koehler P.E., Sims K.A. and Wicker L. (1996). Total and thermostable pectinesterases in citrus juices. *Journal of Food Science*, 61(2): 349–382.
- Solomon O., Svanberg U. and Sahlstrom A. (1995). Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8°C. *Food Chemistry*, 53: 363–368.
- Stanley D.W., Bourne M., Stone A. and Wismer W. (1995). Low temperature blanching effects on chemistry, firmness and structure of canned green beans and carrots. *Journal of Food Science*, 60: 327-333.
- Steyn C.E., Cameron M. and Witthuhn R.C. (2011). Occurrence of Alicyclobacillus in the fruit processing environment-a review. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 147, no. 1: 1-11.
- Stoforos N.G., Crelier S., Robert M.C. and Taoukis P.S. (2002). Kinetics of tomato pectin methylesterase inactivation by temperature and high pressure. *Journal of Food Science*, 67: 1026-1031.
- Tajchakavit S. and Ramaswamy H.S. (1997a). Continuous flow microwave inactivation kinetics of pectin methyl esterase in orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 21(5): 365-378.
- Tajchakavit S. and Ramaswamy H.S. (1997b). Thermal versus microwave inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice under bath mode heating conditions. *Food Science and Technology (Lebensmittel Wissenschaft und Technologie)*, 30: 85-93.
- Taoukis P.S. and Labuza T.P. (1989). Applicability of Time-Temperature Indicators as shelf-life monitors of food products. *Journal of Food Science*, 54(4): 783-788.
- Taoukis P.S., Labuza T.P. and Saguy I.S. (1997). Kinetics of food deterioration and shelf-life prediction. In: Valentas, K.J., Rotstein, E., Singh, R.P. (Eds.), *Handbook of Food Engineering Practice*, pp. 361-403. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.

- Tawfik M.S. and Huyghebaert A. (1998). Effect of storage temperature, time, dissolved oxygen and packaging materials on the quality of aseptically filled orange juice. *Acta Alimentaria*, 27(3): 231-244.
- Taylor A. (1982). Intramolecular distribution of carboxyl groups in low methoxyl pectins-a review. *Carbohydrate Polymers*, 2: 9-17.
- Tetrapak (1998). The Orange Book. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden.
- Torres E.F., González-M.G., Klotz B. and Rodrigo D. (2015). Effects of high hydrostatic pressure and temperature increase on *Escherichia coli* spp. and pectin methyl esterase inactivation in orange juice. *Food Science and Technology International*.
- Trammell D.J., Dalsis D.E. and Malone C.T. (1986). Effect of oxygen on taste, ascorbic acid loss and browning for HTST-pasteurized, single-strength orange juice. *Journal of Food Science*, 51(4): 1021-1023.
- Tribess T.B. and Tadini C.C. (2006). Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature/time process conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1328-1335.
- Trifiro A., Sacconi G., Bazzarini R., Zoni C., Zanotti A. and Gherardi S. (1999). Composition of mandarin and clementine juices of Italian production. *Industria Conserve*, 74: 125-132.
- USDA, Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference Release 27, NDB No.: 09218.
- Van Boekel M.A.J.S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 139-159.
- Van den Broeck I. (2000). Kinetics of temperature and pressure inactivation of pectinesterase from oranges and tomatoes. Ph.D. thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
- Van den Broeck I., Ludikhuyze L.R., Van Loey A.M. and Hendrickx M. (2000). Inactivation of orange pectinesterase by combined high pressure and temperature treatments: a kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1960-1970.

- Van den Broeck I., Ludikhuyze L.R., Van Loey A.M., Weemaes C.A. and Hendrickx M. (1999a). Thermal inactivation kinetics of pectinase extracted from oranges. *Journal of Food Processing and Preservation*, 23: 391-406.
- Van den Broeck I., Ludikhuyze L.R., Van Loey A.M., Weemaes C.A. and Hendrickx M. (1999b). Thermal and combined pressure-temperature inactivation of orange pectinesterase: influence of pH and additives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2950-2958.
- Versteeg C. (1979). Pectinesterases from the orange fruit: Their purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. Ph.D. thesis, *Agricultural Research Reports*, 892: 1-109.
- Versteeg C., Rombouts F. and Pilnik W. (1978). Purification and some characteristics of two pectinesterase isoenzymes from orange. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 11: 267-274.
- Versteeg C., Rombouts F.M., Spaansen C.H. and Pilnik W. (1980). Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange. *Journal of Food Science*, 45: 969-971.
- Vervoort L., Van der Plancken I., Grauwet T., Timmermans R.A.H., *et al.* (2011). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 466-477.
- Vikram V.B., Ramesh M.N. and Prapulla S.G. (2005). Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *Journal of Food Engineering*, 69: 31-40.
- Walker M. and Phillips C.A. (2008). Alicyclobacillus acidoterrestris: an increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 43, no. 2: 250-260.
- Wareing P. and Davenport R.R. (2005). Microbiology of soft drinks and fruit juices. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*. P.R. Ashurst, Ed., Blackwell Publishing, London, UK.
- Wenzel F.W., Moore E.L., Atkins C.D. and Patrick R. (1955). Chilled citrus products. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 68: 161-166.

Wicker L. and Temmelli F. (1988). Heat inactivation of pectinesterase in orange juice pulp. *Journal of Food Science*, 53: 162–164.

Wicker L., Ackerly J.L. and Hunter J.L. (2003). Modification of pectin by pectinmethylesterase and the role in stability of juice beverages. *Food Hydrocolloids*, 17: 809–814.

Willats W.G.T., Orfila C., Limberg G., Buchholt H.C., Van Alebeek G.J.W.M., Voragen A.G.J., *et al.* (2001). Modulation of the degree and pattern of methylesterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties and cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22): 19404–19413.

Witthuhn R.C., Duvenage W. and Gouws P.A. (2007). Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 45, no. 2: 224–229.

Wong D.W.S (1995). Food enzymes: structure and mechanism, p. 7–125. 1st ed, Chapman & Hall, New York.

Worbo R.W. and Splistosser D.F. (2004). Microbiology of fruit products. *Processing of Fruit Science and Technology*. Barret D.M., Somogyi L.P. and Ramaswamy H.S., Eds., CRC Press, London, U.K.

Yeom H.W., Zhang Q.H. and Chism G.W. (2002). Inactivation of pectin methylesterase in orange juice by pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 67: 2154–2159.

Yokoyama H. and White M.J. (1967). Carotenoids in the flavedo of Marsh grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15: 693–696.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Γιαννιώτης Σ. (2013). Συμπληρωματικές Σημειώσεις Μαθήματος Μηχανικής Τροφίμων. Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, ΓΠΑ, Αθήνα.

Ποντίκης Κ. Α. (1993) Εσπεριδοειδή. Έκδοση Α.

Ποντίκης Κ. Α. (2003) Εσπεριδοειδή. Ειδική Δενδροκομία, τόμος Δ. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.