



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ

ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

**Ανάπτυξη Έξυπνης Συσκευασίας με βάση την αύξηση
και την παραγωγή χρωστικής ουσίας του
μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp.**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ - ΑΙΘΡΑ Τ. ΣΤΕΡΙΩΤΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Σκανδάμης Π., Επ. Καθηγητής

Αθήνα, Ιούλιος 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Ανάπτυξη Έξυπνης Συσκευασίας βασιζόμενη στην
αύξηση και παραγωγή χρωστικής ουσίας από το
μικροοργανισμό *Janthinobacterium* sp.**

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ - ΑΙΘΡΑ Τ. ΣΤΕΡΙΩΤΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Σκανδάμης Π., Επ. Καθηγητής

Εξεταστική Επιτροπή: Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ταούκης Πέτρος, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Καναβούρας Αντώνης, Λέκτορας Γ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σωστή διαχείριση της ψυκτικής αλυσίδας των τροφίμων αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για τη διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας αυτών. Η θερμοκρασία αποτελεί τον κύριο παράγοντα της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων. Επομένως, η ανάπτυξη ενός συστήματος παρακολούθησης και καταγραφής του χρονο-θερμοκρασιακού ιστορικού των τροφίμων, από την παραγωγή ως το τελικό στάδιο της κατανάλωσης, κρίνεται αναγκαία. Την ανάγκη αυτή μπορούν να καλύψουν οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες ή ολοκληρωτές (TTI), οι οποίοι επιτρέπουν τον έλεγχο της ενδεχόμενης θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης του προϊόντος και τον εντοπισμό των προβληματικών σημείων της ψυκτικής αλυσίδας.

Στόχος της μελέτης ήταν, η ανάπτυξη ενός μικροβιακού χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη βασιζόμενου στην αύξηση του μικροοργανισμού *Janthinobacterium sp.* και την παραγωγή της χρωστικής ουσίας βιολασεΐνης ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του. Απόκριση του δείκτη αποτέλεσε ο ιώδης χρωματισμός που λαμβάνουν οι αποικίες του μικροοργανισμού, καθώς πρόκειται για μια εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία, μη αντιστρεπτή και εύκολα ορατή μεταβολή. Το υπό ανάπτυξη TTI αποτελείτο από στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar (TSA) με 1% (w/v) γλυκερόλη, στο οποίο ενοφθαλμίστηκε ο μικροοργανισμός. Το pH του θρεπτικού μέσου, το οποίο ρυθμίστηκε σε τιμές μεταξύ 5.0 και 9.0, καθώς και το επίπεδο συγκέντρωσης του αρχικού ενοφθαλμίσματος του μικροοργανισμού, το οποίο κυμάνθηκε από 3.0 έως 7.0 log CFU/mL, αποτέλεσαν τις παραμέτρους του μικροβιακού δείκτη.

Στην παρούσα εργασία, αρχικά πραγματοποιήθηκε η μελέτη της κινητικής της απόκρισης του δείκτη. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η θερμοκρασιακή εξάρτηση της κινητικής της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Janthinobacterium sp.* και της εμφάνισης της βιολασεΐνης (του ιώδους χρωματισμού) σε ισόθερμες συνθήκες συντήρησης (0, 5, 10 και 15°C) και ακολούθησε μοντελοποίησή της. Η εκτιμώμενη τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης, E_a , του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού κυμάνθηκε μεταξύ 79.2 και 90.7 kJ/mol. Ως σημείο λήξης του δείκτη ορίστηκε είτε η χρονική στιγμή εμφάνισης της πρώτης ιώδους αποικίας (1% ιώδεις αποικίες), είτε η χρονική στιγμή κατά την οποία όλες οι αποικίες έχουν λάβει ιώδη χρωματισμό (100% ιώδεις αποικίες). Στην πρώτη περίπτωση, οι τιμές της E_a των πρότυπων συστημάτων δεικτών με διαφορετικές παραμέτρους δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές και κυμάνθηκαν σε ένα εύρος 84.0 – 108.6 kJ/mol. Στη δεύτερη περίπτωση οι τιμές της E_a παρουσίασαν μεγαλύτερη διακύμανση, τόσο μεταξύ των διαφορετικών τιμών pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης,

αλλά και μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων του αρχικού ενοφθαλμίσματος (88.2 – 127.7 kJ/mol). Το σημείο λήξης του δείκτη μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας ανεξαρτήτως παραμέτρου. Η επίδραση του pH στο σημείο λήξης του δείκτη ακολούθησε ένα συγκεκριμένο μοτίβο με τις τιμές pH 6.5 και 7.0 να σημειώνουν οριακά ταχύτερα σημεία λήξης σε όλες τις θερμοκρασίες. Η απόκριση του υπό ανάπτυξη ΤΠΙ, ορίζοντας ως σημείο λήξης του δείκτη το "1% ιώδεις αποικίες", σχετίστηκε άμεσα με τη συγκέντρωση του ενοφθαλμισμένου στο σύστημα μικροοργανισμού, καθώς όσο υψηλότερο ήταν το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμίσματος, τόσο νωρίτερα επήλθε το σημείο λήξης του δείκτη, ενώ στην περίπτωση που το σημείο λήξης ορίστηκε ως το "100% ιώδεις αποικίες" το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε κυρίως για τα εμβόλια πληθυσμού *Janthinobacterium* sp. 6.0 και 7.0 log CFU/mL.

Τέλος, ο μικροβιακός δείκτης ΤΠΙ, με συγκεκριμένες παραμέτρους (pH: 7.0 και ενοφθαλμισμα: 6.0 log CFU/mL), χρησιμοποιήθηκε για την "παρακολούθηση" της μικροβιακής αλλοίωσης βόειου κρέατος σε ισόθερμες (0 – 15°C) και δυναμικές συνθήκες συντήρησης. Η μελέτη της αλλοίωσης του βόειου κρέατος υπό αερόβιες συνθήκες ανέδειξε τις ψευδομονάδες ως ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό. Κατά την παράλληλη συντήρησή του ΤΠΙ και του τροφίμου κάτω από ισόθερμες συνθήκες, τα δύο συστήματα παρουσίασαν εφάμιλλες τιμές Εα (73.45 ± 5.37 και 71.49 ± 4.92 kJ/mol αντίστοιχα). Επιπλέον το σημείο λήξης του δείκτη συνέπεσε χρονικά με τη στιγμή της αλλοίωσης του τροφίμου για τις θερμοκρασίες 5, 10 και 15°C. Για τη θερμοκρασία των 0°C ο δείκτης δεν έδωσε απόκριση. Όσον αφορά τις δυναμικές συνθήκες συντήρησης, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις έντονα κυμαινόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα, η αλλοίωση του βόειου κρέατος επήλθε μετά από συντήρηση 114 h και το σημείο λήξης του ΤΠΙ στις 116 h συντήρησης. Συνεπώς, το μικροβιακό ΤΠΙ κατάφερε να περιγράψει με ακρίβεια την αλλοίωση του βόειου κρέατος. Το εύρος των τιμών στις οποίες κυμαίνεται η Εα της απόκρισης του δείκτη σε συνδυασμό με την προσαρμογή του σημείου λήξης μεταβάλλοντας τις παραμέτρους του, καθιστούν το προτεινόμενο ΤΠΙ αποτελεσματικό εργαλείο στην παρακολούθηση της μικροβιολογικής ποιότητας διάφορων κατηγοριών ευαλλοίωτων τροφίμων.

Λέξεις Κλειδιά: Χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης, έξυπνη συσκευασία, *Janthinobacterium* sp., βιολασεΐνη, ψυκτική αλυσίδα, μικροβιακή αλλοίωση, ενέργεια ενεργοποίησης (Εα)

"Development of Intelligent Packaging based on *Janthinobacterium's* sp. growth and its pigment production"

ABSTRACT

Maintenance of the cold chain is one of the main factors which ensure the safety and quality of perishable food products. Temperature determines food quality in a great degree. Consequently, the development of a monitoring and recording system of the time-temperature history of food products throughout the cold chain constitutes an essential prerequisite for effective shelf life management. Time - temperature indicators are tools that can potentially satisfy this need, since they allow us to control any eventual temperature abuse and to elucidate the problematic points in the cold chain.

The aim of this study was to develop a microbial time-temperature indicator, based on *Janthinobacterium's* growth and its violet pigment (violacein) production. The violet color that the *Janthinobacterium's* colonies obtain during its growth was defined as the response of the TTI, as it constitutes a temperature dependent, irreversible and easily visible color change. The TTI system consisted of a solid nutrient medium (TSA enriched with 1% (w/v) glycerol) inoculated with *Janthinobacterium* sp. The pH value of the nutrient medium, set to 5.0 - 9.0, and the initial concentration of *Janthinobacterium* sp. (3.0 – 7.0 log CFU/mL) constituted the parameters of the TTI.

The first part of the present study involved the kinetic study of the TTI's response. Specifically, the temperature dependence of both *Janthinobacterium's* growth and the violet pigment's appearance was investigated isothermally, in the range of 0 to 15 °C and modeled with a system of equations. The estimated value of the E_a of *Janthinobacterium's* growth, μ_{max} , was ranged from 79.2 to 90.7 kJ/mol. The TTI's endpoint was set as either the time when the first violet colony appeared (1% violet colonies) or as the time when all the colonies had developed violet color (100% violet colonies). In the first case, the estimated value of the activation energy, E_a , of the TTI systems with different parameters didn't show any notable differences and ranged from 84.0 to 108.6 kJ/mol. In the second case, the estimated value of E_a displayed greater variation, not only among the different pH values of the nutrient medium, but also between the different initial concentration of the inoculated microorganism in the TTI medium (88.2 – 127.7 kJ/mol). The endpoint of the TTI system, regardless its parameters, decreased as storage temperature was increasing. The effect of the pH on the endpoint followed a specific pattern, while the pH values of 6.5 and of 7.0

developed the shortest endpoints. However, the differences between the endpoints of each pH value were narrow. TTI's response, having as endpoint the "1% violet colonies", was directly associated with the level of the bacterial strain inoculated into the system, as the more increased the initial inoculum level was, the shorter were the endpoints. In the case that the endpoint was defined as "100% violet colonies", the fact we described above was mainly observed when the initial concentration of *Janthinobacterium* sp. was 6.0 or 7.0 log CFU/mL, resulting shorter endpoints in every tested temperature.

Finally, the microbial TTI system, with the appropriate parameters, was tested for the monitoring of microbial spoilage of beef under isothermal (0, 5, 10 and 15°C) and dynamic storage conditions. It was evident that *Pseudomonas* sp. constituted the specific spoilage organism (SSO) of beef under aerobic conditions. During the parallel storage of the TTI system and beef, under isothermal conditions, the two systems displayed almost identical E_a values (73.45 5.37 kJ/mol and 71.49 4.92 kJ/mol respectively). In addition, the TTI's endpoint matched with the end of product's shelf life at 5, 10 and 15°C. The TTI didn't respond at 0°C. Under dynamic storage conditions, which represent the real chilling conditions in the distribution chain, the end of the product's shelf life was noted after being stored for 114 h, while the endpoint of the TTI was measured after 116 h of storage. Consequently, the microbial TTI seemed to be applicable in the monitoring of beef's spoilage. The range of E_a values of the TTI's response in conjunction with the endpoint's adjustment, achieved by changing TTI's parameters, render the proposed TTI an effective.

Key words: Time-temperature indicators (TTI), active packaging, *Janthinobacterium* sp., violacein, chill chain, microbial spoilage, activation energy (E_a).

Copyright © 2016

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ - ΑΙΘΡΑ Τ. ΣΤΕΡΙΩΤΗ,

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

*στη μνήμη του πατέρα μου,
Τηλέμαχου*

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα την παρούσα μελέτη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, κ. Παναγιώτη Σκανδάμη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της ερευνητικής αυτής εργασίας και για την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κ. Πέτρο Ταούκη και τον κ. Αντώνη Καναβούρα, Λέκτορα του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Ιδιαίτερα εκφράζω τις ευχαριστίες μου στη Βασιλική Μπικούλη για την καθοδήγηση, την ψυχολογική στήριξη και γενικότερα τη μεγάλη της προθυμία να συνδράμει την προσπάθειά μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Τσακανίκα (Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών), ο οποίος ανέλαβε εξ' ολοκλήρου το κομμάτι της ανάλυσης των φωτογραφιών και χωρίς τη δική του αρωγή δε θα είχα το επιθυμητό αποτέλεσμα. Επιπλέον, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στη μεταδιδάκτορα του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, κ. Αναστασία Καπετανάκου για το χρόνο που αφιέρωνε σε κάθε μου απορία και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά την εκπόνηση και συγγραφή της μελέτης. Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου που μου παρείχαν με χαρά τις συμβουλές τους και ήταν δίπλα μου σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπισα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω σε εκείνους που βρίσκονται πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν, ιδιαίτερα στην οικογένεια μου, τη μητέρα μου, την αδερφή μου, Γλαύκη και το Θείο μου, Μιλτιάδη, για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Κ. - Α. Στεριώτη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	1
1.1.1	Μεταβολές στην ποιότητα των τροφίμων	1
1.1.2	Αρχές κινητικής υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων	5
1.1.3	Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στην ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων	8
1.1.3.1	Επίδραση της θερμοκρασίας	9
1.2	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	11
1.2.1	Θερμοκρασιακές συνθήκες στην ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων	11
1.2.2	Πρόβλεψη της ποιότητας των τροφίμων σε μεταβαλλόμενες συνθήκες συντήρησης	18
1.3	ΧΡΟΝΟ – ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ Ή ΟΛΟΚΛΗΡΩΤΕΣ (TIME – TEMPERATURE INDICATORS OR INTEGRATORS – TTI)	20
1.3.1	Ορισμός των TTI	21
1.3.2	Ταξινόμηση των TTI	21
1.3.3	Διαχρονική εξέλιξη των TTI	24
1.3.4	Προδιαγραφές ενός αποτελεσματικού TTI	29
1.3.5	Σύγχρονα συστήματα TTI	30
1.3.5.1	Δείκτες Μοριακής Διάχυσης	30
1.3.5.2	Δείκτες που βασίζονται στον πολυμερισμό	31
1.3.5.3	Ενζυμικοί Δείκτες	32
1.3.5.4	Φωτοχημικοί δείκτες	37
1.3.5.5	Χημικοί Δείκτες	39
1.3.5.6	Μικροβιακοί Δείκτες	40
1.3.6	Περιορισμοί στη χρήση και την εφαρμογή των χρονο - θερμοκρασιακών δεικτών	43
1.3.7	Αρχές κινητικής απόκρισης των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών	44
1.3.8	Εφαρμογή Χρονο-θερμοκρασιακών Δεικτών	47
1.4	ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>Janthinobacterium</i>	48
2	ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	51
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
3.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	52
3.2	Ανάπτυξη Μικροβιακού Συστήματος TTI	55
3.2.1	Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος	55

3.2.2 Προετοιμασία μικροβιολογικών υποστρωμάτων	56
3.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων	56
3.2.4 Μικροβιολογικές Αναλύσεις	57
3.2.5 Προσδιορισμός pH	58
3.2.6 Επεξεργασία φωτογραφιών	58
3.2.7 Ανάλυση Δεδομένων - Μαθηματική Περιγραφή του Συστήματος	59
3.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΔΕΙΚΤΗ	60
3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων βόειου κρέατος	60
3.3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα βόειου κρέατος	61
3.3.3 Μέτρηση pH	62
3.3.4 Μέτρηση της απόκρισης του πρότυπου συστήματος ΤΤΙ	63
3.3.5 Ανάλυση Δεδομένων	63
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	64
4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΕΥΑΛΛΟΙΩΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	64
4.1.1 Δομικά στοιχεία ΤΤΙ	65
4.1.2 Ανάπτυξη Μικροβιακού Συστήματος ΤΤΙ	65
4.1.2.1 Κινητική Μελέτη Ανάπτυξης του <i>Janthinobacterium</i> sp.	65
4.1.3 Κινητική Μελέτη Εμφάνισης Βιολασεΐνης	71
4.2 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ – ΕΦΑΡΜΟΦΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΤΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΒΟΕΙΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	87
4.2.1 Αλλοίωση του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες	90
4.2.2 Συσχέτιση της απόκρισης του μικροβιακού ΤΤΙ με την αλλοίωση του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες	95
4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΤΤΙ ΣΕ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	99
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	103

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη.....	4
Πίνακας 1.2: Εξισώσεις της ποιοτικής αλλοίωσης των τροφίμων και του χρόνου ημιζωής τους για διαφορετικές τάξεις αντιδράσεων.	7
Πίνακας 1.3: Σημαντικές συναρτήσεις ποιότητας, που ακολουθούν μηδενικής και πρώτης τάξης κινητική.	7
Πίνακας 1.4: Διάφορα συστήματα TTI πατεντών με βάση τον τύπο και τον τρόπο της απόκρισής τους.....	26
Πίνακας 1.5: Διαφορετικοί τύποι VITSAB TTI ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος.....	34
Πίνακας 1.6: Διαφορετικοί τύποι VITSAB TTI με βάση διαφορετικές αναλογίες ενζύμου-υποστρώματος.....	34
Πίνακας 4.1: Εκτιμώμενες παράμετροι και στατιστικά στοιχεία από την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του <i>Janthinobacterium sp.</i> σε διαφορετικές συνθήκες pH.	70
Πίνακας 4.2: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία κατά την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius για την περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στο αντίστροφο της παραμέτρου t_i , σημείο λήξης του δείκτη (1% ώδεις αποικίες), για τα πρότυπα συστήματα TTI με διαφορετικό pH (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0) και διαφορετική αρχική συγκέντρωση του <i>Janthinobacterium sp.</i> (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 log (CFU/mL)).	77
Πίνακας 4.3: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία κατά την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius για την περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στο αντίστροφο της παραμέτρου t_i , σημείο λήξης του δείκτη (100% ώδεις αποικίες), για τα πρότυπα συστήματα TTI με διαφορετικό pH (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0) και διαφορετική αρχική συγκέντρωση του <i>Janthinobacterium sp.</i> (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 log (CFU/mL)).	84
Πίνακας 4.4: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία κατά την εφαρμογή της τροποποιημένης εξίσωσης Arrhenius για σημείο λήξης του δείκτη 1% ώδεις αποικίες.	86
Πίνακας 4.6: Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ_{max} (h^{-1}), για τις διάφορες ομάδες μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος, στις θερμοκρασίες συντήρησης 0 – 15 °C, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου Baranyi και Roberts.....	94
Πίνακας 4.7: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν κατά την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius.....	94

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 4.1: Ανάπτυξη του μικροοργανισμού <i>Janthinobacterium</i> sp. σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με διαφορετικές τιμές pH (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0) στους α) 0 °C, β) 5 °C, γ) 10 °C και δ) 15 °C.	66
Γράφημα 4.2: Μεταβολή του pH κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού <i>Janthinobacterium</i> sp. σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με τιμές pH 6.0, 6.50, 7.0, 8.0 και 9.0 στους α) 0 °C, β) 5 °C, γ) 10 °C και δ) 15 °C.	69
Γράφημα 4.3: Καμπύλες Arrhenius, που περιγράφουν τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του <i>Janthinobacterium</i> sp., μ_{max} για τις διαφορετικές συνθήκες pH.	70
Γράφημα 4.4: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του <i>Janthinobacterium</i> sp. στο σημείο λήξης του δείκτη (1% ιώδεις αποικίες) για τιμές pH (α) 6.0, (β) 6.5, (γ) 7.0, (δ) 8.0 και (ε) 9.0.	74
Γράφημα 4.5: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του <i>Janthinobacterium</i> sp. στο σημείο λήξης του δείκτη (100% ιώδεις αποικίες) για τιμές pH (α) 6.0, (β) 6.5, (γ) 7.0, (δ) 8.0 και (ε) 9.0.	82
Γράφημα 4.6: Καμπύλες ανάπτυξης των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος κατά την αερόβια συντήρηση του στους α) 0 °C, β) 5 °C, γ) 10 °C και δ) 15 °C.	91
Γράφημα 4.7: Μεταβολή του pH του βόειου κρέατος κατά την ισόθερμη συντήρησή του στους 0, 5, 10 και 15 °C.	93
Γράφημα 4.8: Ανάπτυξη των ψευδομονάδων (SSO) στο βόειο κρέας και χρωματική εξέλιξη του πρότυπου συστήματος TTI με το χρόνο κατά την ισόθερμη συντήρησή τους στους (α) 5 °C, (β) 10 °C και (γ) 15 °C.	97
Γράφημα 4.9: Διάρκεια ζωής του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες και σημείο λήξης του δείκτη για το εύρος θερμοκρασιών 0 – 15 °C.	97
Γράφημα 4.10: Καμπύλες Arrhenius. Θερμοκρασιακή εξάρτηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των ψευδομονάδων στο βόειο κρέας και της απόκρισης του TTI.	98
Γράφημα 4.11: Καμπύλες ανάπτυξης των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος κατά την αερόβια συντήρηση του σε περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες και σημείο λήξης του πρότυπου μικροβιακού συστήματος TTI.	100
Γράφημα 4.12: Σωρευτικός χρόνος κάλυψης του σημείου λήξης του δείκτη συναρτήσει του χρόνου.	102
Γράφημα 5.1: Μεταβολή της διάρκειας ζωής βόειου κιμά σε MAP (Muermans et al., 1993) και του σημείου λήξης συστημάτων TTI με διαφορετική αρχική συγκέντρωση του <i>Janthinobacterium</i> sp. συναρτήσει της θερμοκρασίας. ...	105
Γράφημα 5.2: Μεταβολή της διάρκειας ζωής κρέατος ωρίμανσης (Mataragas et al., 2006) και του σημείου λήξης συστημάτων TTI με σημείο λήξης 1% ιώδεις αποικίες και 100% ιώδεις αποικίες συναρτήσει της θερμοκρασίας.	105
Γράφημα 5.3: Σημείο λήξης του δείκτη συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα πρότυπα συστήματα του δείκτη με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl.	106

1.1 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

1.1.1 Μεταβολές στην ποιότητα των τροφίμων

Η ποιότητα των τροφίμων μπορεί να οριστεί ως το σύνολο εκείνων των χαρακτηριστικών, που επιτρέπουν τη διάκρισή τους και έχουν σημασία για τον καθορισμό του βαθμού αποδοχής τους από τον καταναλωτή (Kramer and Twigg, 1970). Η μικροβιολογική ακεραιότητα, η θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, άρωμα, υφή, χρώμα) αποτελούν τα κυριότερα χαρακτηριστικά της ποιότητας των τροφίμων (Τζιά, 2009). Η μεταβολή των χαρακτηριστικών αυτών, κατά την επεξεργασία και τη συντήρηση των προϊόντων, στην πορεία του χρόνου, αποτελεί αναπόφευκτη διαδικασία, η οποία σταδιακά οδηγεί στην υποβάθμιση της συνολικής ποιότητας του τροφίμου.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες, που προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων, σχετίζονται με:

1) την ανάπτυξη και δραστηριότητα μικροοργανισμών, 2) αντιδράσεις, που καταλύονται από ένζυμα των τροφίμων, και άλλες χημικές αντιδράσεις, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο ίδιο το τρόφιμο, 3) την προσβολή από έντομα, παράσιτα και τρωκτικά, 4) μη συνιστώμενες θερμοκρασίες για το εκάστοτε τρόφιμο, 5) την πρόσληψη ή απώλεια υγρασίας, 6) αντιδράσεις με οξυγόνο, 7) το φως, 8) τη μηχανική καταπόνηση και 9) το χρόνο. Οι μεταβολές, που επιφέρουν οι παράγοντες αυτοί, μπορούν να χωριστούν σε φυσικές, χημικές και βιολογικές (Potter, 1995).

Φυσικές Μεταβολές

Φυσικές μεταβολές προκαλούνται από την κακή μεταχείριση των τροφίμων κατά τη διαδικασία της συγκομιδής, μεταποίησης και διανομής. Μώλωπες σε φρούτα και λαχανικά κατά ή μετά τη συγκομιδή, μείωση της υγρασίας και μάρανση φυλλωδών λαχανικών, όταν βρεθούν σε περιβάλλον με χαμηλή υγρασία, πρόσληψη υγρασίας ξηρών τροφίμων, σύνθλιψη αποξηραμένων σνακ κατά τη διάρκεια της διανομής, αλλαγή του ιξώδους ορισμένων τροφίμων, αποτελούν μερικά παραδείγματα. Επίσης, στην περίπτωση των κατεψυγμένων τροφίμων, η διακύμανση της θερμοκρασίας μπορεί να αποβεί καταστροφική, για παράδειγμα, μπορεί να προκαλέσει ανακρυστάλλωση στο παγωτό, που οδηγεί σε μια ανεπιθύμητη αμμώδη υφή (Singh, 2000).

Χημικές Μεταβολές

Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και αποθήκευσης των τροφίμων, πραγματοποιούνται πολλές χημικές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την ποιοτική υποβάθμισή των τροφίμων και τη μείωση της διάρκειας ζωής τους. Οι σημαντικότερες χημικές αλλαγές σχετίζονται με ενζυμικές δράσεις, οξειδωτικές αντιδράσεις και με τη μη ενζυμική αμαύρωση.

Σε ευνοϊκές θερμοκρασίες, όπως είναι η θερμοκρασία δωματίου, πολλές ενζυμικές αντιδράσεις εξελίσσονται με ταχείς ρυθμούς, μεταβάλλοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Για παράδειγμα, κατά την κοπή τα φρούτα έχουν την τάση να «μαυρίζουν» γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου, λόγω της οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων, που απελευθερώνονται από τους ιστούς, από τη φαινόλαση (ενζυμική αμαύρωση). Η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων στα ιχθυρά από φωσφολιπάσες οδηγούν σε αλλαγές στην υφή τους. Επίσης, η οξείδωση των λιπιδίων από λιπάσες και λιποξυγενάση επιδρά στο χρώμα, στο άρωμα και στην υφή του τροφίμου (Singh, 2000).

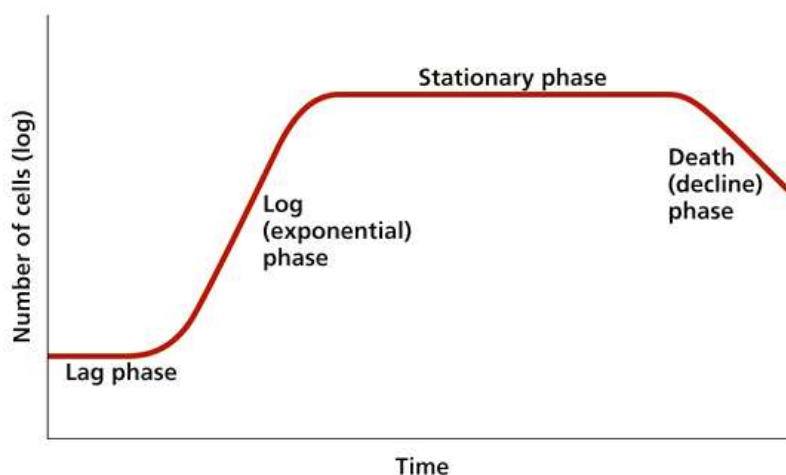
Η παρουσία ακόρεστων λιπαρών οξέων στα τρόφιμα αποτελεί τη συνήθη αιτία ταγγισμού, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, όταν υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο. Η αντίδραση μεταξύ ακόρεστων λιπαρών οξέων και οξυγόνου είναι μια σύνθετη αντίδραση, η οποία βασίζεται στο μηχανισμό των ελεύθερων ριζών και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χαμηλού μοριακού βάρους πτητικών ενώσεων, όπως αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, και αλκοόλες. Μερικές από αυτές τις ενώσεις, όπως είναι η εξανόλη, προσδίδουν μια δυσάρεστη οσμή στα τρόφιμα, καθιστώντας τα μη αποδεκτά. Η δημιουργία ελευθέρων ριζών κατά την αυτοοξείδωση οδηγεί και σε περεταίρω ανεπιθύμητες αντιδράσεις, για παράδειγμα την απώλεια βιταμινών, την αλλοίωση του χρώματος και την υποβάθμιση των πρωτεϊνών (Singh 2000, Labuza, 1984).

Η μη ενζυμική αμαύρωση, και συγκεκριμένα η αντίδραση Maillard, ενώ ορισμένες φορές προσδίδει επιθυμητές ιδιότητες στα τρόφιμα, άλλοτε αποτελεί σημαντική αιτία υποβάθμισης της ποιότητας και της θρεπτικής αξίας αυτών. Πρόκειται για μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων, που πραγματοποιούνται κατά τη θερμική κατεργασία ή τη μακρά αποθήκευση των τροφίμων, μεταξύ αναγόντων σακχάρων και πρωτεϊνών ή πεπτιδίων αμινοξέων. Τα προϊόντα, που υφίστανται μη ενζυμική αμαύρωση, παρουσιάζουν μια χρωματική υποβάθμιση με κυρίαρχο τον καστανό χρωματισμό του τροφίμου. Επίσης, η αντίδραση μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητο άρωμα, σε μεταβολές της υφής των προϊόντων και σε μείωση της θρεπτικής αξίας τους (Belitz et al., 2006, Singh, 2000).

Μικροβιολογικές αλλαγές

Τα τρόφιμα με τα θρεπτικά συστατικά, που διαθέτουν, αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Ωστόσο, για να είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών στο τρόφιμο, θα πρέπει να συντρέξουν ορισμένες προϋποθέσεις και να εξασφαλισθούν ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Μπαλατσούρας, 2006). Συνεπώς, πρωταρχικής σημασίας, για την πρόβλεψη της υποβάθμισης της ποιότητας και της ασφάλειας ενός τροφίμου, είναι η απάντηση στο ερώτημα, κατά πόσον υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης τροφιμογενών παθογόνων, καθώς και αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε αυτό. Προκειμένου να δοθεί απάντηση στο ερώτημα αυτό, είναι πολύ σημαντική η γνώση του pH, της ενεργότητας νερού (a_w), του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (Eh), της χημικής φύσης του τροφίμου, καθώς και της θερμοκρασίας, δεδομένου ότι όλα αυτά επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Labuza, 1984).

Η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού, κάτω από βέλτιστες συνθήκες, ακολουθεί μια πρότυπη καμπύλη στην οποία διακρίνονται τέσσερις φάσεις (εικόνα 1.1). Υπάρχει ένας αρχικός αργός ρυθμός αύξησης του λογαρίθμου της πυκνότητας των κυττάρων, που αυξάνεται σε έναν σχεδόν σταθερό ρυθμό ανάπτυξης, μειώνεται ξανά στο μηδέν και τελικά ο ρυθμός γίνεται αρνητικός. Οι τέσσερις αυτές φάσεις της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι αντίστοιχα: η φάση προσαρμογής ή λανθάνουσα φάση (lag phase), η εκθετική φάση (exponential phase), η φάση στασιμότητας ή σταθεροποίησης του πληθυσμού (stationary phase) και η φάση κάμψης ή φάση θανάτου (decline or death phase) (Ταούκης, 2009).



Εικόνα 1.1: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Η αλλοίωση ενός τροφίμου συνήθως δεν αποδίδεται σε όλους τους μικροοργανισμούς, που αναπτύσσονται σε αυτό, αλλά σε ένα συγκεκριμένο κάθε φορά κλάσμα της συνολικής μικροχλωρίδας, το οποίο καλείται Ειδικός (ή Εφήμερος) Αλλοιογόνος Μικροοργανισμός (Specific Spoilage Microorganism - SSO). Η επικράτηση των SSO εξαρτάται κάθε φορά από μια σειρά παραγόντων, που επικρατούν κατά την επεξεργασία, διανομή και συντήρηση του τροφίμου. Είναι πλέον γνωστό ότι σε κάθε τρόφιμο η ανάπτυξη των μικροοργανισμών επηρεάζεται από πέντε είδη παραγόντων, όπως αναφέρονται στον πίνακα 1.1, που ακολουθεί. Ο έλεγχος ή η τροποποίηση ενός ή περισσότερων από τους παράγοντες αυτούς οδηγεί στην επικράτηση διαφορετικού κλάσματος μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί, που θα καταφέρουν τελικά να επικρατήσουν, είναι αυτοί, οι οποίοι διαθέτουν τέτοιες στρατηγικές, που τους επιτρέπουν να προσαρμοστούν καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου.

Ο πληθυσμός των SSO μπορεί αρχικά να βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, αποτελώντας ένα μικρό κομμάτι της ολικής μικροχλωρίδας, ωστόσο στην πορεία μπορεί να δημιουργηθούν οι ευνοϊκότερες γι' αυτόν συνθήκες, με συνέπεια οι μικροοργανισμοί αυτοί να αναπτύσσονται με μεγαλύτερους ρυθμούς από την υπόλοιπη μικροχλωρίδα και να καταφέρουν να επικρατήσουν, παράγοντας μεταβολικά προϊόντα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του τροφίμου (Nychas and Skandamis, 2005, Dalgaard, 2000).

Πίνακας 1.1: Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη.

1. Ενδογενείς παράγοντες (Intrinsic)	pH, ενεργότητα νερού, δυναμικό οξειδοαναγωγής, παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, σύσταση θρεπτικών συστατικών
2. Παράγοντες κατά την επεξεργασία (Processing)	μπορούν να επηρεάσουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα του τροφίμου
3. Εξωγενείς παράγοντες (Extrinsic)	θερμοκρασία, σχετική υγρασία, σύσταση ατμόσφαιρας κατά τη διανομή και συντήρηση
4. Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες (Implicit)	αναφέρεται σε φαινόμενα όπως ο ανταγωνισμός, ο συνεργισμός και ο συντροφισμός μεταξύ των βακτηρίων
5. Συνεργιστικοί παράγοντες (The emergent effects)	παράγοντες, που αλληλεπιδρούν, με αποτέλεσμα φαινόμενα εντονότερα από ότι εάν οι παράγοντες αυτοί δρούσαν ο καθένας μόνος του

Πηγή: Nychas and Skandamis, 2005.

Τις περισσότερες φορές, οι παράγοντες, που προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση ενός τροφίμου, δε λειτουργούν μεμονωμένα. Η αυξημένη θερμοκρασία και η υγρασία παραδείγματος χάρη επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών, καθώς και τις χημικές αντιδράσεις, που καταλύονται από ένζυμα. Πολλές διαφορετικές μορφές υποβάθμισης μπορεί να λαμβάνουν χώρα κάθε στιγμή, ανάλογα με τη σύνθεση του εκάστοτε τροφίμου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Potter, 1995).

1.1.2 Αρχές κινητικής υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων

Ο ρυθμός μεταβολής της ποιότητας ενός τροφίμου ή η έκταση της ποιοτικής του υποβάθμισης σε γενικά πλαίσια μπορεί να εκφραστεί ως συνάρτηση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων.

Ρυθμός υποβάθμισης ποιότητας: $\frac{dQ}{dt} = F(C_i, E_j)$ εξίσωση 1.1

Όπου:

- C_i : οι ενδογενείς παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται όλες οι παράμετροι σύστασης του τροφίμου, όπως: συγκέντρωση αντιδρώντων συστατικών, ένζυμα, καταλύτες, παρεμποδιστές, pH, ενεργότητα νερού, μικροβιακή χλωρίδα.
- E_j : οι εξωγενείς παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνονται όλες οι περιβαλλοντικές παράμετροι, όπως: θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ολική και μερική πίεση των περιβαλλοντικών αερίων CO₂, N₂, O₂, φως και μηχανικές καταπονήσεις.

Ο ρυθμός μεταβολής της ποιότητας ενός τροφίμου, σύμφωνα με τα παραπάνω, αποτελεί ένα πολύπλοκο φυσικοχημικό σύστημα, που περιλαμβάνει πολυάριθμες φυσικές και χημικές μεταβλητές και σταθερές, οι οποίες είναι ανέφικτο ή μη πρακτικό να καθοριστούν ποσοτικά (Taoukis, 2001).

Η καθιερωμένη μεθοδολογία για την εύρεση της μεταβολής της ποιότητας ενός τροφίμου, και κατ' επέκταση της διάρκειας ζωής του, περιλαμβάνει αρχικά την αναγνώριση των χημικών και βιολογικών δράσεων, οι οποίες επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου και στη συνέχεια, μετά από προσεκτική μελέτη των συστατικών του τροφίμου και της μεθόδου επεξεργασίας του, επιλέγονται εκείνες οι αντιδράσεις, που έχουν τη σημαντικότερη επίδραση στο ρυθμό της υποβάθμισής του. Θεωρώντας ότι η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων, E_j , είναι αμελητέα, η εξίσωση της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου απλοποιείται.

Συνήθως, η ποσοτική έκφραση της ποιοτικής υποβάθμισης των τροφίμων περιγράφεται με την υιοθέτηση κάποιου μετρήσιμου δείκτη ποιότητας, ο οποίος σχετίζεται με τη μικροβιακή σταθερότητα, τις φυσικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου ή τις χημικές μεταβολές, που είναι δυνατόν να συμβούν στο προϊόν. Για παράδειγμα, αν η ποιοτική υποβάθμιση σχετίζεται με την απώλεια μιας επιθυμητής μετρήσιμης ποιοτικής παραμέτρου A (κάποιο θρεπτικό συστατικό ή ένα χαρακτηριστικό άρωμα) ή το σχηματισμό μιας ανεπιθύμητης ποιοτικής παραμέτρου B (άρωμα, χρώμα, μικροβιακό φορτίο), τότε ο ρυθμός απώλειας του ποιοτικού δείκτη A και αντίστοιχα σχηματισμού του δείκτη B εκφράζονται ως εξής (Ταουκίς, 2001, Ταουκίς and Labuza, 1996, Labuza, 1984) :

$$r_A = -\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^m \quad \text{εξίσωση 1.2}$$

και

$$r_B = \frac{d[B]}{dt} = k' \cdot [B]^{m'} \quad \text{εξίσωση 1.3}$$

Όπου: k και k' οι φαινομενικές σταθερές του ρυθμού αντίδρασης και m και m' οι φαινομενικές τάξεις των αντιδράσεων.

Η ολοκλήρωση των παραπάνω σχέσεων οδηγεί σε μια νέα έκφραση της μεταβολής του ποιοτικού δείκτη ως συνάρτηση του χρόνου. Για παράδειγμα, ολοκλήρωση της εξίσωσης 1.3 δίνει:

$$-\int_{A_0}^A \frac{d[A]}{[A]^m} = k \cdot t \quad \rightarrow \quad f(A) = k \cdot t \quad \text{εξίσωση 1.4}$$

Η εξίσωση 1.4 ορίζεται ως **συνάρτηση ποιότητας του τροφίμου**.

Ανάλογα με την τάξη της αντίδρασης, προκύπτουν και διαφορετικές συναρτήσεις ποιότητας για το εκάστοτε τρόφιμο. Στον πίνακα 1.2, που ακολουθεί, παρουσιάζονται η συνάρτηση ποιότητας και ο χρόνος ημιζωής για μηδενικής, πρώτης, δεύτερης και m-οστής τάξης αντίδρασης.

Πίνακας 1.2: Εξισώσεις της ποιοτικής αλλοίωσης των τροφίμων και του χρόνου ημιζωής τους για διαφορετικές τάξεις αντιδράσεων.

Σημείωση: Ως χρόνος ημιζωής ορίζεται ο χρόνος στον οποίο η τιμή της συγκέντρωσης του δείκτη A έχει μειωθεί στο μισό της αρχικής της τιμής (Ταουκίς 2001).

Φαινόμενη Τάξη Αντίδρασης	Συνάρτηση Ποιότητας $f(A)_t$	Χρόνος Ημιζωής $t_{1/2}$
0	$A_0 - A_t$	$\frac{A_0}{(2k_0)}$
1	$\ln\left(\frac{A_0}{A_t}\right)$	$\ln\left(\frac{2}{k_1}\right)$
2	$\frac{1}{A_0} - \frac{1}{A_t}$	$\frac{1}{(k_2 A_0)}$
m (m≠1)	$\frac{1}{m-1} \cdot (A_t^{1-m} - A_0^{1-m})$	$\frac{2^{m-1} - 1}{k_m \cdot (m-1)} \cdot A_0^{1-m}$

Πηγή: Ταούκης, 2001.

Στη μέθοδο ολοκλήρωσης, που περιγράφηκε παραπάνω, ο ποσοτικός προσδιορισμός της τιμής του ποιοτικού δείκτη A υπολογίζεται με κατάλληλες φυσικοχημικές μεθόδους, σε τακτά χρονικά σημεία, και επιλέγεται η εξίσωση του πίνακα, η οποία δίνει την καλύτερη στατιστική προσαρμογή στα πειραματικά σημεία (μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων) (Ταούκης, 2009).

Οι περισσότερες αντιδράσεις αλλοίωσης, που έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική περιγραφή της διατηρησιμότητας των τροφίμων χαρακτηρίζονται ως μηδενικής ή πρώτης τάξης και παρουσιάζονται στον πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3: Σημαντικές συναρτήσεις ποιότητας, που ακολουθούν μηδενικής και πρώτης τάξης κινητική.

Κινητική Μηδενικής τάξης	Αλλοίωση κατεψυγμένων τροφίμων Μη ενζυμική αμαύρωση
Κινητική Πρώτης τάξης	Απώλεια βιταμινών Μικροβιακή μείωση ή ανάπτυξη Οξειδωτική απώλεια χρώματος Απώλεια υφής κατά τη θερμική κατεργασία

Πηγή: Ταούκης, 2009.

Η χρήση των απλών τάξεων συναρτήσεων για την περιγραφή πολύπλοκων αντιδράσεων είναι συχνά χρήσιμη στην περίπτωση που το ενδιαφέρον εστιάζεται στη μοντελοποίηση της διάρκειας ζωής ή σε μεταβολές, που συμβαίνουν κατά την επεξεργασία ενός προϊόντος και όχι στη χημεία ή στη διερεύνηση του μηχανισμού μιας αντίδρασης. Ωστόσο, αν σκοπός της μελέτης είναι η αποσαφήνιση και η κατανόηση μιας αντίδρασης λεπτομερώς, τότε είναι απαραίτητο να προταθεί αρχικά ένας μηχανισμός αντίδρασης και έπειτα να αναπαραχθούν οι κατάλληλες διαφορικές εξισώσεις, που βασίζονται στο μηχανισμό αυτό, ώστε να ελεγχθεί πειραματικά ο τελευταίος (Van Boekel, 1996).

1.1.3 Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στην ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων

Σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση των μαθηματικών συναρτήσεων, που περιγράφουν την ποιοτική υποβάθμιση ενός συστήματος τροφίμου, θεωρήθηκε ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες παραμένουν σταθεροί. Ωστόσο, στην πραγματικότητα, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μεταβάλλονται συνεχώς και επηρεάζουν σημαντικά τους ρυθμούς των αντιδράσεων στο εκάστοτε σύστημα τροφίμου. Επομένως, στην ολοκληρωμένη κινητική μελέτη της υποβάθμισης των τροφίμων πρέπει να γενικεύονται τα μαθηματικά μοντέλα, έτσι ώστε να περιλαμβάνουν ως μεταβλητές και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, που επιδρούν ισχυρά στο ρυθμό της αντίδρασης. Ένας τρόπος ενσωμάτωσης της επίδρασης των παραμέτρων αυτών στα παραπάνω μοντέλα είναι η έκφραση της σταθεράς του ρυθμού αντίδρασης στη συνάρτηση ποιότητας, ως συνάρτηση των παραμέτρων αυτών.

$$k = k(E_j) \quad \text{εξίσωση 1.5}$$

Οι σημαντικότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, που επιδρούν στην ποιότητα του τροφίμου, είναι η θερμοκρασία, η ενεργότητα νερού, η ολική και οι μερικές πιέσεις των διαφορετικών αερίων, η σχετική υγρασία, οι ακτινοβολίες και οι μηχανικές πιέσεις (Ταούκης, 2009, Taoukis, 2001).

1.1.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία αποτελεί τον πιο κρίσιμο παράγοντα, που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποιοτική υποβάθμιση και τη συνολική διάρκεια ζωής των τροφίμων, καθώς επηρεάζει ισχυρά τους ρυθμούς των αντιδράσεων, όπως την ανάπτυξη μικροοργανισμών, τις μεταβολικές και χημικές δραστηριότητες, καθώς και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ενός συστήματος τροφίμου. Επιπλέον, από τις περιβαλλοντικές παραμέτρους, η θερμοκρασία είναι εκείνη, η οποία ελέγχεται λιγότερο από τη συσκευασία και καθορίζεται αποκλειστικά από τις συνθήκες αποθήκευσης. Ιδιαίτερα, όταν πρόκειται για τρόφιμα, που διατηρούνται υπό ψύξη, η υποβάθμιση της ποιότητάς τους και η συνολική διάρκεια ζωής τους συνδέεται στενά με τις θερμοκρασιακές συνθήκες, που επικρατούν κατά τη διανομή και τη συντήρηση των προϊόντων (Vinicius et al., 2012). Η μεγάλη σημασία της θερμοκρασίας στην ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων έχει οδηγήσει στη δημοσίευση διαφόρων μοντέλων, που προσπαθούν να περιγράψουν την επίδρασή της, η πλειοψηφία των οποίων στηρίζεται σε αρχές χημικής κινητικής (Labuza and Fu, 1993). Τα πιο γνωστά μοντέλα είναι το Μοντέλο Arrhenius, το Μοντέλο Τετραγωνικής Ρίζας, το Γραμμικό Μοντέλο, το Λογαριθμικό Μοντέλο Προσδιορισμού της Διάρκειας Ζωής, το Μοντέλο WLF (Williams Landel Ferry) και τα Πολυωνυμικά Μοντέλα. Στην παρούσα εργασία θα περιοριστούμε στο Μοντέλο Arrhenius, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Μοντέλο Arrhenius

Η εξίσωση Arrhenius βασίζεται σε θερμοδυναμικά δεδομένα και αποτελεί το πιο διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο στην περιγραφή της θερμοκρασιακής εξάρτησης πολλών χημικών αντιδράσεων, που σχετίζονται με τη διάρκεια ζωής των τροφίμων, καθώς και την απώλειά τους σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Η σχέση Arrhenius έχει την εξής μορφή:

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right) \quad \text{εξίσωση 1.6}$$

Όπου:

- k : ο ρυθμός της αντίδρασης
- k_0 : ο συντελεστής Arrhenius ή σταθερά Arrhenius
- T: η απόλυτη θερμοκρασία (Kelvin)

- R: η παγκόσμια σταθερά αερίων (8.314 J/mol·K)
- E_a: η ενέργεια ενεργοποίησης, η οποία αποτελεί μέτρο της θερμοκρασιακής ευαισθησίας των υπεύθυνων για την ποιοτική υποβάθμιση αντιδράσεων.

Λογαριθμίζοντας την εξίσωση 1.6 προκύπτει η εξής σχέση:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{εξίσωση 1.7}$$

Από την παραπάνω μορφή της εξίσωσης Arrhenius, γνωρίζοντας τις τιμές των k σε διαφορετικές θερμοκρασίες (τουλάχιστον τρεις θερμοκρασίες, το βέλτιστο πέντε ή έξι), με απεικόνιση του lnk ως προς το 1/T προκύπτει ευθεία με κλίση $-E_a/R$, απ' όπου μπορεί να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης, E_a, της εν λόγω αντίδρασης (Taoukis, 2009, Labuza and Fu, 1993).

Καθώς, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι αποτέλεσμα χημικών-βιοχημικών αντιδράσεων, ο ρυθμός ανάπτυξής τους μπορεί να περιγραφεί από την κινητική Arrhenius. Ωστόσο, αρκετοί είναι εκείνοι που υποστηρίζουν πως η βακτηριακή ανάπτυξη περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση πολλών πολύπλοκων αντιδράσεων, με αποτέλεσμα οι καμπύλες Arrhenius να αποκλίνουν από τη γραμμικότητα, καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται ή μειώνεται. Αυτό παρατηρείται κυρίως σε θερμοκρασίες μακριά από τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Labuza and Fu, 1993). Συνεπώς, η εξίσωση Arrhenius μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε ένα εύρος θερμοκρασιών και ως εκ τούτου έχουν προταθεί διάφορες τροποποιήσεις της κλασικής εξίσωσης στοχεύοντας στην προσαρμογή του μοντέλου σε ακραίες θερμοκρασίες.

Ανακεφαλαιώνοντας, για ένα συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος, η συνάρτηση ποιότητας ενός τροφίμου, για μια ποιοτική παράμετρο A, με τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού μεταβολής της απόκρισης k να ακολουθεί την κινητική Arrhenius, μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

(Taoukis, 2001)

$$f(A) = k \cdot t = k_{ref} \exp \left[\frac{-E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \cdot t \quad \text{εξίσωση 1.8}$$

Όπου:

- f(A): η συνάρτηση ποιότητας του τροφίμου
- k_{ref}: η σταθερά του ρυθμού αντίδρασης σε μια θερμοκρασία αναφοράς T_{ref}
- E_a: η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης υποβάθμισης του τροφίμου

Η ενέργεια ενεργοποίησης των χημικών αντιδράσεων, που σχετίζονται με τα τρόφιμα ή της ανάπτυξης αλλοιογόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 30 – 120 kJ/mol. Η θερμοκρασία αναφοράς, που χρησιμοποιείται, είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης του τροφίμου, για παράδειγμα για τρόφιμα, που διατηρούνται υπό ψύξη, ως θερμοκρασία αναφοράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι 273 K (0 °C) (Ταουκίς, 2001).

1.2 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΑΛΛΟΜΕΝΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

1.2.1 Θερμοκρασιακές συνθήκες στην ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων

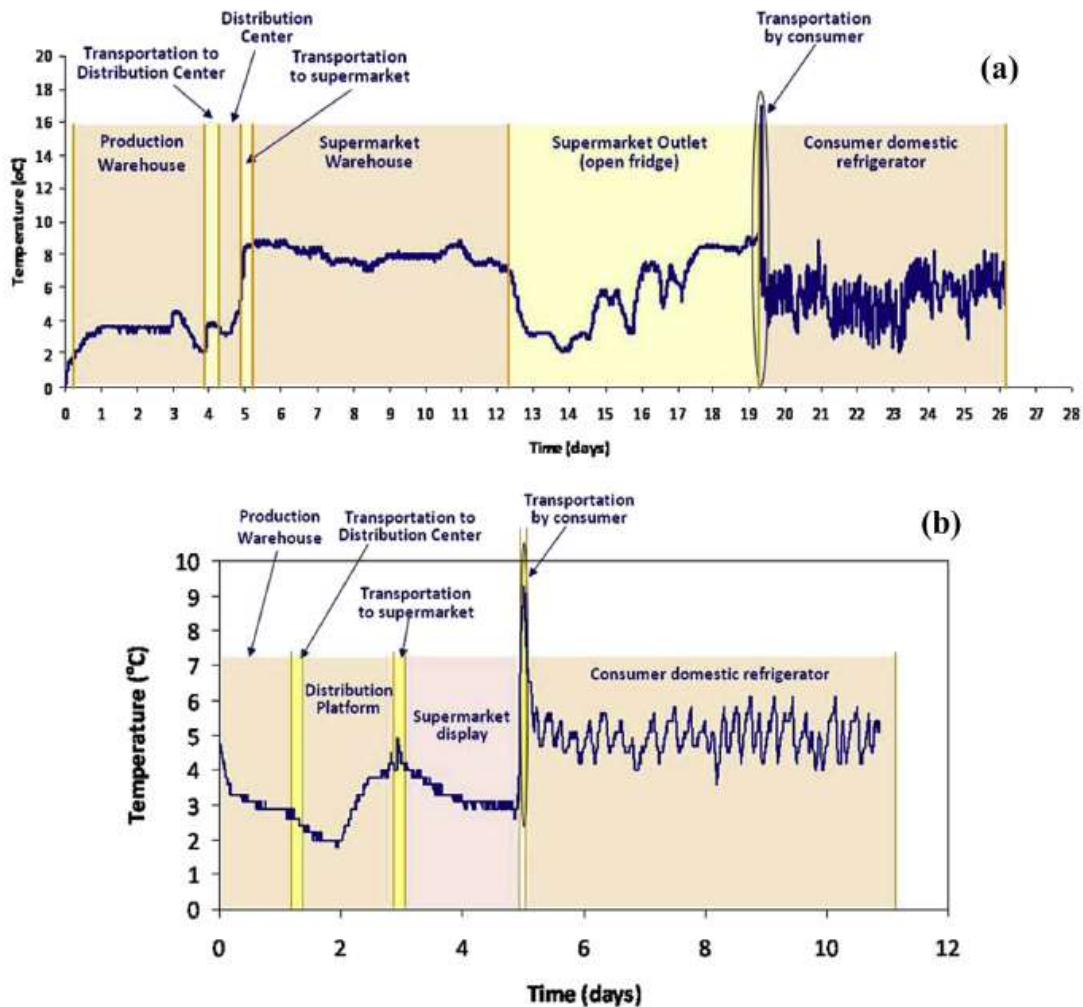
Η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων, η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά, διανομή, αποθήκευση στα ψυγεία των σούπερ μάρκετ και στα ψυγεία των καταναλωτών, είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της ασφάλειας, της ποιότητας (οργανοληπτικών χαρακτηριστικών), της θρεπτικής αξίας και της αξίας της αγοράς των ευαλλοιώτων τροφίμων. Η θερμοκρασία αποτελεί τον πιο κρίσιμο παράγοντα, όπως αναφέρθηκε, στις αντιδράσεις υποβάθμισης των τροφίμων, ιδιαίτερα εκείνων, που διατηρούνται υπό ψύξη. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας σε όλη την ψυκτική αλυσίδα αποτελεί, επομένως, ένα ζωτικής σημασίας εργαλείο για την ελαχιστοποίηση των προβλημάτων, που αφορούν την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων και αναπόσπαστο μέρος κάθε συστήματος διαχείρισης τροφίμων (food management system), καθώς και σε πολλά στάδια της ψυκτικής αλυσίδας νομοθετική απαίτηση (Evans, 2011).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των τροφίμων, η μικροβιακή χλωρίδα τους δεν είναι στατική, αλλά επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Η χρονική διάρκεια και η θερμοκρασία, στην οποία ιδιαίτερα τα "ευπαθή" τρόφιμα διατηρούνται, έχουν τον μεγαλύτερο αντίκτυπο στην ασφάλεια και στην ποιότητα αυτών. Η διακύμανση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των τροφίμων επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη, τον τραυματισμό και το θάνατο των μικροοργανισμών. Θερμοκρασιακές διακυμάνσεις μπορούν εύκολα να συμβούν κατά τη διακίνηση, τη λιανική πώληση και την αποθήκευση στο σπίτι του καταναλωτή. Μία διακύμανση της θερμοκρασίας στα τρόφιμα από 4.4 °C έως 10 °C ή έως 12 °C δε διεγείρει μόνο την ταχεία ανάπτυξη των ψυχρότροφων παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, αλλά και την ανάπτυξη πολλών μεσόφιλων βακτηρίων, που μπορούν να αναπτυχθούν σε αυτές τις θερμοκρασίες (Simon et al., 2005).

Η προτεινόμενη θερμοκρασία ψύξης των τροφίμων έχει αναθεωρηθεί με την πάροδο του χρόνου, καθώς η γνώση και η τεχνολογία έχουν προχωρήσει. Σύμφωνα με τον FDA (Food and Drug Administration – Διεύθυνση Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α.) τα οικιακά ψυγεία πρέπει να λειτουργούν σε θερμοκρασία ίση ή μικρότερη των 4 °C και σύμφωνα με την EFSA (European Food Safety Authority – Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων) η συνιστώμενη θερμοκρασία στην οποία πρέπει να λειτουργούν τα ψυγεία των ευρωπαίων πολιτών είναι μεταξύ των 0 και 5 °C.

Για τα τρόφιμα, που διατηρούνται υπό ψύξη, ο έλεγχος της θερμοκρασίας είναι απαραίτητος, για να διατηρηθεί η μικροβιολογική τους ασφάλεια και η ποιότητα αυτών, καθώς και για να ελαχιστοποιηθούν οι βιοχημικές αλλαγές και οι αλλαγές, που συμβαίνουν, στις φυσικές ιδιότητες τους. Κατά τη διάρκεια ζωής της συντήρησης των τροφίμων υπό ψύξη, υπάρχουν σημαντικές "αφορμές" για θερμοκρασιακή "κακομεταχείριση", όπως αναφέρθηκε. Όσο μεγαλύτερη είναι η κακομεταχείριση αυτή, τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα της μικροβιακής ανάπτυξης και συνεπώς της υποβάθμισης της ποιότητας, καθώς και της ασφάλειας των τροφίμων (Simon et al., 2005).

Πολύ λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με τον έλεγχο της θερμοκρασίας σε όλα τα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας. Οι θερμοκρασιακές συνθήκες, που επικρατούν κατά τη διανομή των προϊόντων και την έκθεσή τους σε καταστήματα λιανικής πώλησης, φαίνεται να αποκλίνουν σημαντικά από τις συνιστώμενες. Αλλά, ακόμα και αν οι παραγωγοί τροφίμων και οι λιανοπωλητές καταφέρνουν να διατηρούν αποδεκτές θερμοκρασιακές συνθήκες στα προϊόντα, ο έλεγχος είναι εύκολο να χαθεί, όταν το προϊόν βγει από το κατάστημα λιανικής πώλησης (Evans, 2011).



Εικόνα 1.2: Χρονο-θερμοκρασιακά προφίλ της συνολικής ψυκτικής αλυσίδας προϊόντων κρέατος σύμφωνα με τεστ πεδίου, που διεξήχθησαν στην (a) Ελλάδα και στη (b) Γαλλία.

Πηγή: Gogou et al., 2015.

Το **σύστημα διανομής** των προϊόντων, που συντηρούνται υπό ψύξη, παρουσιάζει σημαντικές αποκλίσεις από τις απαιτήσεις για τη διατήρηση της ασφάλειας και της ποιότητας, συντελώντας σε μεγάλες απώλειες των προϊόντων με συνέπεια το οικονομικό κόστος.

Το Διεθνές Ινστιτούτο Ψύξης (International Institute of Refrigeration, IIR) αναφέρει πως 300 εκατομμύρια τόνοι προϊόντων απορρίπτονται ετησίως λόγω της ανεπαρκούς ψύξης, ενώ τονίζει πως το πρόβλημα δεν αφορά μόνο τις αναπτυσσόμενες χώρες, αφού η βιομηχανία τροφίμων των Η.Π.Α. απορρίπτει ετησίως αλλοιωμένα προϊόντα, που ανέρχονται σε 35 δισεκατομμύρια δολάρια (IIR, 2008).

Γενικά, μετά την αρχική ψύξη των προϊόντων και καθώς τα προϊόντα διακινούνται στην ψυκτική αλυσίδα, ο έλεγχος και η διατήρηση της θερμοκρασίας τους καθίστανται δύσκολοι. Τα πακέτα μεγάλου όγκου, που συντηρούνται σε μεγάλες αποθήκες, είναι λιγότερα ευαίσθητα σε μικρές ποσότητες θερμότητας σε σύγκριση με τα μεμονωμένα πακέτα λιανικής, που προορίζονται για τους καταναλωτές. Κατά τη μεταφορά μεγάλου όγκου συσκευασιών, η πιθανή αύξηση της θερμοκρασίας είναι μικρή και το σύστημα ψύξης του οχήματος επαναφέρει γρήγορα το προϊόν στην απαιτούμενη θερμοκρασία. Το πρόβλημα εντείνεται κατά τη διανομή προϊόντων σε μεμονωμένα καταστήματα λιανικής πώλησης. Τα οχήματα, που διενεργούν τις μεταφορές αυτές, προβαίνουν σε πολλαπλές φορτοεκφορτώσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας, με αποτέλεσμα η διατήρηση της εσωτερικής τους θερμοκρασίας να καθίσταται δυσχερής. Κατά τη διάρκεια μιας διανομής, κάθε προϊόν, που βρίσκεται υπό ψύξη, μπορεί να υποστεί μέχρι και 50 ανοίγματα πόρτας, με αποτέλεσμα την είσοδο θερμότητας από το εξωτερικό περιβάλλον (James, 2003).

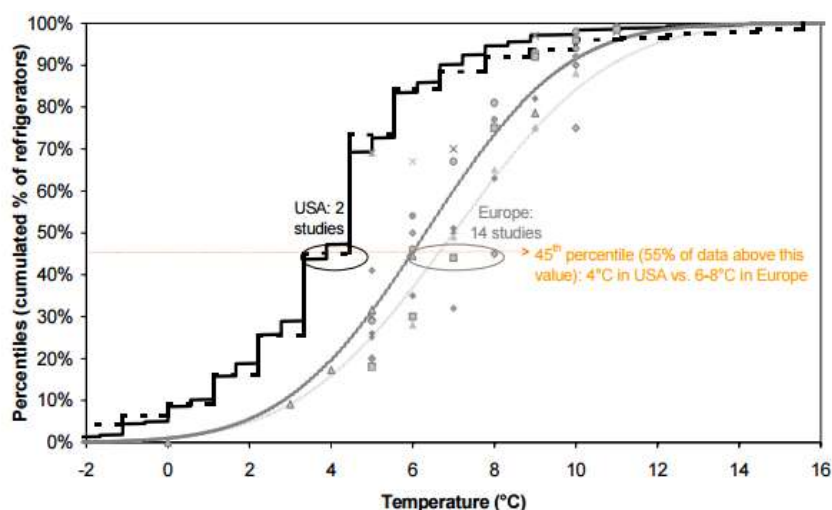
Η έκθεση των προϊόντων σε καταστήματα λιανικής πώλησης, αναφέρεται συχνά ως ο ασθενέστερος κρίκος της ψυκτικής αλυσίδας (James, 1996, Greer et al., 1994).

Οι Gill et al. (2002) διεξήγαγαν μια μελέτη προκειμένου να προσδιορίσουν τις θερμοκρασιακές συνθήκες, που επικρατούν στη λιανική αγορά του βόειου κρέατος στον Καναδά. Στην περίπτωση του ωμού κρέατος είναι πολύ σημαντικό η θερμοκρασία, στην οποία διατηρείται, να είναι χαμηλή, ώστε να μειωθεί ο ρυθμός αύξησης των τυχών ψυχρόφιλων παθογόνων, που μπορεί να είναι παρόντα, να καθυστερήσει η έναρξη της μικροβιολογικής αλλοίωσης, καθώς και ο αποχρωματισμός του κρέατος. Οι ρυθμιστικές αρχές συνιστούν ή απαιτούν το ωμό κρέας κατά την αποθήκευση ή τη λιανική αγορά να διατηρείται σε θερμοκρασίες, που δεν ξεπερνούν τους 4 °C. Ωστόσο, ποικίλες έρευνες της δεκαετίας του '80 έδειξαν ότι το 50 % ή και ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό προϊόντων κρέατος, στη λιανική αγορά βρισκόταν σε θερμοκρασίες άνω των 4 °C, το 10 % σε θερμοκρασίες άνω των 7°C, ενώ η μέση θερμοκρασία των προϊόντων κυμαινόταν μεταξύ 4 – 6 °C (Gill et al., 2002). Στην έρευνα των Gill et al (2002), όπου εξετάστηκαν 1703 συσκευασίες βόειου κρέατος σε 41 καταστήματα στον Καναδά, παρατηρήθηκε μια βελτίωση στον έλεγχο των θερμοκρασιακών συνθηκών, που επικρατούν κατά τη λιανική αγορά. Λιγότερο από το 40 % των προϊόντων, που εξετάστηκαν, βρισκόταν σε θερμοκρασίες άνω των 4 °C. Οι θερμοκρασίες στο πίσω μέρος των βιτρινών ήταν χαμηλότερες σε σύγκριση με το μπροστινό μέρος, όπως και στα κάτω ράφια συγκριτικά με τα επάνω και ενδιάμεσα ράφια. Επιπρόσθετα, οι θερμοκρασίες των συσκευασιών, που

μόλις είχαν φτάσει στο κατάστημα (μιας ημέρας), ήταν μεγαλύτερες από αυτές παλιότερων πακέτων. Αυτό υποδεικνύει πως τα προϊόντα κατά την παραμονή τους στο κατάστημα ψύχονται ολοένα και περισσότερο, αντικρούοντας την άποψη πως η συντήρηση των υπό ψύξη προϊόντων στα καταστήματα λιανικής πώλησης αποτελεί τον πιο αδύναμο κρίκο στην ψυκτική αλυσίδα (Gill et al., 2002).

Σε ό,τι αφορά την ελληνική ψυκτική αλυσίδα, σύμφωνα με μελέτη, που αφορούσε την ψυκτική αλυσίδα του παστεριωμένου γάλακτος, στην οποία εξετάστηκαν 60 ψυγεία σούπερ μάρκετ σε πέντε διαφορετικές πόλεις της Ελλάδας, φαίνεται ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης του παστεριωμένου γάλακτος κυμάνθηκε από 0 έως 11.7 °C με μια μέση τιμή 4.98 °C και τυπική απόκλιση 2.90 °C (Koutsoumanis et al., 2010).

Οι παραγωγείς τροφίμων θεωρούνται υπεύθυνοι για την ασφάλεια των προϊόντων τους, ακόμα και αν δεν έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν πλήρως την αλυσίδα διανομής (Fu and Labuza, 1992). Ωστόσο, μόλις ο καταναλωτής αγοράσει το τρόφιμο, τότε αυτό βρίσκεται σε περιβάλλον εκτός ψυγείου μέχρι ο καταναλωτής να ολοκληρώσει τις αγορές του, να το μεταφέρει σπίτι και να το αποθηκεύσει στο οικιακό ψυγείο (James et al., 2008). Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί μια σειρά από έρευνες, που αφορούν το πως οι καταναλωτές χειρίζονται τα τρόφιμα, που διατηρούνται στο ψυγείο, καθώς και τις θερμοκρασιακές συνθήκες, που επικρατούν στα οικιακά ψυγεία (εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Κατανομή θερμοκρασίας σε οικιακά ψυγεία στην Ευρώπη και στις Η.Π.Α.

Οι γκρι τελείες (μη παραμετρικές κατανομές) ή η S-καμπύλη (παραμετρικές κατανομές) αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα 14 μελετών της Ευρώπης : AFF (2000), Guingois (2000), Volatier (2000), Laguerre et al. (2002), Bakalis et al. (2003), Ghebrehewer and Stevenson (2003), Afchain et al. (2005), Azevedo et al. (2005), Kennedy et al. (2005), Taoukis et al. (2005), Terpstra et al. (2005), Breen et al. (2006), ISSP (2006), Xanthiakos (2006b) και οι μαύρες γραμμές (μη παραμετρικές κατανομές) αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα 2 μελετών των Η.Π.Α. : Audits-International (2000), Kosa et al. (2007).

Οι James και Evans (1992) έδειξαν πως η θερμοκρασία 19 δειγμάτων διαφορετικών προϊόντων, που αγοράστηκαν από ένα μεγάλο κατάστημα λιανικής πώλησης, μέχρι να μεταφερθούν στο αυτοκίνητο κυμάνθηκε από 4 έως 20 °C και η μεγαλύτερη θερμοκρασία σημειώθηκε σε προϊόντα τεμαχισμένα σε φέτες, όπως το ζαμπόν και ο σολωμός. Η θερμοκρασία ορισμένων δειγμάτων, κατά το ταξίδι επιστροφής στο σπίτι με το αυτοκίνητο διάρκειας μίας ώρας, τα οποία βρίσκονταν στο port baggage πλησίασε τους 40 °C, ενώ αυτή των προϊόντων, που τοποθετήθηκαν σε προστατευτικά κουτιά με πάγο, διατηρήθηκε ίδια με την αρχική θερμοκρασία. Μετά το ταξίδι, τα προϊόντα χρειάστηκαν περίπου 5 ώρες στο οικιακό ψυγείο μέχρι η θερμοκρασία τους να φτάσει σε τιμές μικρότερες των 7 °C.

Μία από τις πιο ολοκληρωμένες έρευνες διεξήχθη στο Ηνωμένο Βασίλειο με χρηματοδότηση του Υπουργείου Γεωργίας Αλιείας και Διατροφής (Ministry of Agriculture Fisheries and Food - MAFF), στην οποία συμμετείχαν 252 νοικοκυριά από τρεις διαφορετικές περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου (Evans, 1992). Σύμφωνα με την έρευνα, σχεδόν όλοι οι συμμετέχοντες, όταν ρωτήθηκαν ποια είναι η πραγματική θερμοκρασία στην οποία λειτουργεί το ψυγείο τους, δεν ήταν σε θέση να δώσουν μια τιμή. Οι Evans et al. (1991), για να αξιολογήσουν τις θερμοκρασίες, που επικρατούσαν στα ψυγεία των κατοίκων του Ην. Βασιλείου, χρησιμοποίησαν data loggers (καταγραφικά θερμοκρασιακών δεδομένων) για την καταγραφή της μέσης τιμής της θερμοκρασίας κάθε 5 λεπτά για χρονική περίοδο επτά ημερών (James, 2008). Η μέση θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των επτά ημερών κυμάνθηκε από -0.9 °C έως 11.4 °C. Το 29.9 % των ψυγείων λειτουργούσε σε μια θερμοκρασία μικρότερη των 5 °C και το 66.7 % κάτω από τους 7 °C. Μόνο λίγα ψυγεία (7.3 %) λειτουργούσαν σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 9°C (James and Evans, 1992).

Μια έρευνα των Η.Π.Α., που αφορούσε τη θερμοκρασία προϊόντων κατά τη λιανική πώληση, τη μεταφορά και τη διατήρηση στο σπίτι (Audits International, 1999), έδειξε ότι στο 27 % από τα ψυγεία των 939 ερωτηθέντων η θερμοκρασία του προϊόντος ήταν άνω των 5°C μετά την αρχική μεταφορά και αποθήκευση του για 24 ώρες, ενώ στο 4 % ήταν άνω των 8.3 °C. Η ελάχιστη θερμοκρασία του προϊόντος, που καταγράφηκε μετά από 24 ώρες αποθήκευσής του στο ψυγείο, ήταν 6 °C, ενώ η υψηλότερη ήταν 21 °C (James et al., 2008).

Σύμφωνα με μια γαλλική έρευνα, η οποία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το CREDOC (French Research Centre for the Study and Observation of Living Conditions - Γαλλικό Κέντρο Ερευνών για τη Μελέτη και την Παρατήρηση των Συνθηκών Διαβίωσης) από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο του 1999 και αφορούσε τις θερμοκρασίες στο εσωτερικό 119 ψυγείων, το 26 % των ψυγείων λειτουργούσαν σε μια θερμοκρασία υψηλότερη των 8 °C,

η οποία είναι η προτεινόμενη θερμοκρασία για σταθερά τρόφιμα (stable foods) στη Γαλλία. Επίσης, σύμφωνα με την εν λόγω έρευνα, ο συνδυασμός των συνθηκών χρήσης του ψυγείου (ρύθμιση θερμοκρασίας, συχνότητα του ανοίγματος της πόρτας, πηγές θερμότητας) φαίνεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη θερμοκρασία του ψυγείου (Laguerre et al, 2002).

Οι Sergelidis et al. (1997) αναφέρουν ότι το 25 % των 136 οικιακών ψυγείων, που ερευνηθήκαν στην Ελλάδα, είχε θερμοκρασίες άνω των 10 °C.

Οι Ghebrehewet και Stevenson (2003) διαπίστωσαν ότι, μετά από εκπαίδευση για την υγιεινή στο σπίτι, το ποσοστό των καταναλωτών, που ήταν ενήμεροι για τις σωστές θερμοκρασίες λειτουργίας του ψυγείου, αυξήθηκε από 31.7 % σε 78.4 % (James et al., 2008). Ωστόσο, ακόμα και σε πιο πρόσφατες έρευνες, διαπιστώνεται ότι δεν υπάρχει ιδιαίτερη βελτίωση, όσον αφορά τις θερμοκρασιακές συνθήκες στα οικιακά ψυγεία.

Στην πιο πρόσφατη μελέτη του Ηνωμένου Βασιλείου καταγράφηκαν θερμοκρασίες από 1 έως 12 °C με έναν μέσο 5 °C και το 33 % των ψυγείων να βρίσκεται πάνω από 5 °C. Κατά την ανάλυση των δεδομένων από τις περισσότερες έρευνες οι Peck et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το 61.2 % των ψυγείων σε όλο τον κόσμο λειτουργούν σε θερμοκρασίες άνω των 5 °C (James et al., 2008).

Προκειμένου να αξιολογηθεί η κατάσταση, που επικρατεί κατά το χειρισμό των υπό ψύξη τροφίμων από τους έλληνες καταναλωτές και τη συντήρησή τους στα οικιακά ψυγεία, σύμφωνα με τους Koutsoumanis et al. (2010), data loggers τοποθετήθηκαν σε εκατό οικιακά ψυγεία στη Βόρεια Ελλάδα, στο πάνω ράφι, στο μεσαίο και στο κάτω, καθώς και στο ράφι της πόρτας του ψυγείου, προγραμματισμένα να καταγράφουν τη θερμοκρασία κάθε 5 λεπτά για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν σημαντικές διαφορές, όσον αφορά τη θερμοκρασία στο εσωτερικό των οικιακών ψυγείων μεταξύ των διάφορων θέσεων. Η υψηλότερη θερμοκρασία παρατηρήθηκε στο ράφι της πόρτας (8.4 °C), ακολουθούσε το πάνω ράφι (7.6 °C), ενώ το μεσαίο (6.3 °C) και το κάτω (6.7 °C) ράφι είχαν χαμηλότερες θερμοκρασίες. Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με προηγούμενες έρευνες, όπως του Bakalis et al. (2003), στις οποίες το πιο ζεστό μέρος του ψυγείου ήταν στην πόρτα του ψυγείου. Στη συγκεκριμένη μελέτη σημειώνεται επίσης ότι το άνοιγμα της πόρτας του ψυγείου είχε ως αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία έφτανε μέχρι και τους 12 °C, ενώ η πτώση της θερμοκρασίας στην αρχική της τιμή συνέβαινε σε λιγότερο από 15 λεπτά (Bakalis et al., 2003).

1.2.2 Πρόβλεψη της ποιότητας των τροφίμων σε μεταβαλλόμενες συνθήκες συντήρησης

Οι έντονα κυμαινόμενες θερμοκρασίες, που επικρατούν στα διάφορα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας, όπως διαπιστώθηκε από όσα προαναφέρθηκαν, αποτελούν το σημαντικότερο παράγοντα τροφιμογενών επιδημιών και ασθενειών, χωρίς να είναι απόλυτα γνωστή η έκταση στην οποία οι θερμοκρασιακές διακυμάνσεις επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων. Σε ό,τι αφορά την κατάσταση των προϊόντων σε μεταβλητά θερμοκρασιακά σενάρια συντήρησης, αυτή μπορεί να εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική της ολοκλήρωσης της συνάρτησης, που περιγράφει τη θερμοκρασιακή διακύμανση (Temperature Function Integration, TFI).

Η πρόβλεψη της διάρκειας ζωής ενός τροφίμου, το οποίο αποτελείται από πολλά διαφορετικά συστατικά, γίνεται πολύπλοκη, καθώς υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί υποβάθμισης της ποιότητάς του και κάθε ένας από αυτούς έχει τη δική του θερμοκρασιακή ευαισθησία. Η διάρκεια ζωής του τροφίμου, ως σύνολο, σε κάθε θερμοκρασία, καθορίζεται από το μηχανισμό υποβάθμισης του συστατικού εκείνου, που εξελίσσεται πιο γρήγορα και οδηγεί στη μικρότερη διάρκεια ζωής του προϊόντος (Labuza and Fu, 1993).

Θεωρώντας πως παράγοντες, όπως η ενεργότητα νερού και η σύσταση των αερίων παραμένουν σταθεροί, και μόνο η θερμοκρασία μεταβάλλεται, σύμφωνα με την εξίσωση 1.9, μπορεί να προσδιοριστεί η επίδραση του χρονο-θερμοκρασιακού ιστορικού ενός τροφίμου (Labuza and Fu, 1993).

$$f(A) = \sum k_{[f(T_t)]} dt \quad \text{εξίσωση 1.9}$$

Όπου:

- $f(A)$: η συνάρτηση ποιότητας του τροφίμου και
- $k_{[f(T_t)]}$: η χρονο-θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού υποβάθμισης της ποιότητας του τροφίμου

Η μεταβολή της συνάρτησης της ποιότητας κατά τη διάρκεια έκθεσης σε γνωστή μεταβαλλόμενη θερμοκρασία, $T(t)$, μπορεί να υπολογιστεί με αντικατάσταση της σταθεράς του ρυθμού από την έκφραση της θερμοκρασιακής της εξάρτησης και ολοκλήρωση της εξίσωσης.

$$f(A)_t = \int_0^t k(T(t)) dt = k_{ref} \int_0^t \exp \left[\frac{-E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T(t)} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] dt \quad \text{εξίσωση 1.10}$$

Το ολοκλήρωμα αυτό μπορεί να υπολογιστεί αναλυτικά για απλές συναρτήσεις θερμοκρασίας – χρόνου, $T(t)$, ή αριθμητικά για περισσότερο πολύπλοκες περιπτώσεις (Ταουκίς, 2001, Fu and Labuza, 1992).

Προκειμένου να απλοποιηθεί η λύση του ολοκληρώματος, η χρονο-θερμοκρασιακή έκθεση του τροφίμου μπορεί να διαιρεθεί σε μικρά χρονικά διαστήματα, στα οποία η θερμοκρασία θεωρείται ότι παραμένει σταθερή και στη συνέχεια το αποτέλεσμα της συνολικής έκθεσης να συναθροιστεί στο δεύτερο μέρος της εξίσωσης, όπως δίνεται στην *εξίσωση 1.11* (Labuza and Fu, 1993).

$$f(A) = \sum_{i=1}^{i=n} k_i \Delta t_i \quad \text{εξίσωση 1.11}$$

Ένας διαφορετικός τρόπος έκφρασης της ποιοτικής μεταβολής ενός τροφίμου σε κάποιο μεταβλητό χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ είναι συναρτήσει της **δραστηκής θερμοκρασίας**, T_{eff} . Ως δραστηκή θερμοκρασία μπορεί να οριστεί η σταθερή θερμοκρασία στην οποία, όταν εκτίθεται το τρόφιμο, προκαλείται η ίδια ποιοτική μεταβολή με αυτή, που παρατηρείται κατά την έκθεση του τροφίμου στη μεταβλητή θερμοκρασιακή κατανομή για την ίδια χρονική περίοδο (Ταουκίς, 2001, Fu and Labuza, 1992).

Επομένως, η συνάρτηση ποιότητας τη χρονική στιγμή t μπορεί να πάρει την εξής μορφή:

$$f(A) = kt = k_{ref} \exp \left[\frac{-E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_{eff}} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] t \quad \text{εξίσωση 1.12}$$

Η δραστηκή θερμοκρασία αποτελεί μια πολύ σημαντική έννοια, καθώς αντικαθιστά μια κατανομή θερμοκρασίας $T(t)$ με μία μόνο τιμή. Καλό θα ήταν να τονιστεί πως η T_{eff} δεν είναι ίση με τη μέση θερμοκρασία.

1.3 ΧΡΟΝΟ – ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ Ή ΟΛΟΚΛΗΡΩΤΕΣ (TIME – TEMPERATURE INDICATORS OR INTEGRATORS – TTI)

Η σύγχρονη προσέγγιση της διασφάλισης της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων, τόσο από την πλευρά των παραγωγών, όσο και των ρυθμιστικών αρχών, επικεντρώνεται στην πρόληψη μέσω της παρακολούθησης, καταγραφής και ελέγχου των κρίσιμων παραμέτρων σε όλο τον κύκλο ζωής του προϊόντος, από την παραγωγή και επεξεργασία του έως την κατανάλωση. Με τη θερμοκρασία να αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα, που καθορίζει το ρυθμό της ποιοτικής υποβάθμισης ενός τροφίμου και κατ' επέκταση τη διάρκεια ζωής του, ένα αποτελεσματικό σύστημα διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας, όπως αυτό που ορίζεται από τις αρχές της Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής και Ορθής Υγιεινής Πρακτικής, θέτει ως παράγοντα κρίσιμης σημασίας την καταγραφή και τον έλεγχο της παραμέτρου αυτής σε όλη την αλυσίδα. Πρακτική λύση αποτελεί η «έξυπνη συσκευασία» με τους **Χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες (ΤΤΙ)**, οι οποίοι επιτρέπουν τον έλεγχο της πιθανής θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης του προϊόντος, όσον αφορά τη θερμοκρασία συντήρησης του (Ταούκης, 2010, Ταουκίς, 2001).

Οι θερμοκρασιακές συνθήκες, που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα των μελετών, που αναφέρθηκαν στην ενότητα 1.2.1, αποκλίνουν σημαντικά από τις συνιστώμενες. Συνεπώς, ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας βασιζόμενο σε ΤΤΙ μπορεί να συμβάλει στον αποτελεσματικό έλεγχο της ψυκτικής αλυσίδας εντοπίζοντας τα πιθανά προβλήματα, στον προγραμματισμό της διαχείρισης του συστήματος αποθήκευσης και διανομής των προϊόντων αποδεδειγμένα από τα σημεία λιανικής πώλησης πρώτα εκείνα, που βρίσκονται κοντά στο τέλος του χρόνου ζωής τους, με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους της εταιρίας ή βιομηχανίας των απορριπτέων, λόγω αλλοίωσης, προϊόντων, και τέλος μπορεί να λειτουργεί συμπληρωματικά ως μια νέου τύπου «ζωντανή» σήμανση, η οποία θα λειτουργεί επικουρικά της ημερομηνίας λήξης του προϊόντος (Ταούκης, 2010, Ταουκίς and Labuza, 2003, Ταουκίς, 2001).

Προϋπόθεση για την αποτελεσματική εφαρμογή των ΤΤΙ αποτελεί η λεπτομερής γνώση των κινητικών χαρακτηριστικών της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου, καθώς και της απόκρισης του δείκτη. Οι παράμετροι, που εκφράζουν τη θερμοκρασιακή ευαισθησία του τροφίμου και του δείκτη αντίστοιχα, πρέπει να έχουν παρόμοια τιμή. Με βάση αξιόπιστα μαθηματικά μοντέλα της διάρκειας ζωής ενός προϊόντος και των κινητικών απόκρισης του ΤΤΙ καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση, η καταγραφή και η "μετάφραση" της επίδρασης της θερμοκρασίας από την παραγωγή του προϊόντος μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή (Ταουκίς and Labuza, 2003).

1.3.1 Ορισμός των ΤΤΙ

Ο χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης ή ολοκληρωτής (ΤΤΙ – Time - Temperature Indicator or Integrator) είναι μία απλή, χαμηλού κόστους συσκευή, η οποία μπορεί να δείξει εύκολα μια εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία μετρήσιμη αλλαγή και η οποία μπορεί να περιγράψει με ακρίβεια το θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου, που συνοδεύει και συνεπώς την ποιοτική του κατάσταση (Ταουκίς and Labuza, 1989).

Η αρχή λειτουργίας των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών στηρίζεται σε μια μηχανική, χημική, ηλεκτροχημική, ενζυμική ή μικροβιολογική μη αντιστρεπτή μεταβολή, η οποία συνήθως εκδηλώνεται ως μια ορατή απόκριση με τη μορφή μηχανικής παραμόρφωσης, εμφάνισης ή αλλαγής χρώματος. Ο ρυθμός της ορατής απόκρισης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και συγκεκριμένα αυξάνεται με την αύξησή της. Η ορατή αυτή απόκριση παρέχει μια αθροιστική ένδειξη των θερμοκρασιακών συνθηκών στις οποίες έχει εκτεθεί ο ΤΤΙ (Ταουκίς and Labuza, 2003).

1.3.2 Ταξινόμηση των ΤΤΙ

Σε ένα χρονο-θερμοκρασιακό δείκτη η έκταση, στην οποία η ορατή απόκριση ανταποκρίνεται στο πραγματικό χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου, εξαρτάται από τον τύπο του δείκτη και τις φυσικοχημικές αρχές, στις οποίες στηρίζεται η λειτουργία του. Επομένως, οι εν λόγω δείκτες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τη λειτουργικότητά τους, δηλαδή τις πληροφορίες, που καταγράφουν και παρέχουν, και την αρχή λειτουργία τους.

Ένα αρχικό σύστημα ταξινόμησης χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών προτάθηκε από τους Schoen and Byrne το 1972 (Ταουκίς and Labuza, 2003), το οποίο τους διαχώριζε σε έξι κατηγορίες. Λίγα χρόνια αργότερα ο Byrne αναθεώρησε την ταξινόμηση αυτή, καθώς αντιλήφθηκε ότι η κύρια λειτουργική διαφορά οφείλεται στο αν ο δείκτης ανταποκρίνεται σε παραπάνω από μία προκαθορισμένη θερμοκρασία ή ανταποκρίνεται συνεχώς, δίνοντας, με αυτό τον τρόπο, μια αθροιστική ένδειξη των θερμοκρασιακών συνθηκών, στις οποίες έχει εκτεθεί. Πρότεινε, συνεπώς, τρεις τύπους δεικτών:

1. Δείκτες απόψυξης (Defrost Indicators)
2. Χρονο-θερμοκρασιακούς ολοκληρωτές (Time - Temperature Integrators)
3. Χρονο-θερμοκρασιακούς ολοκληρωτές/δείκτες (Time - Temperature Integrators/ Indicators)

Ένα παρόμοιο σύστημα ταξινόμησης με τρεις τύπους δεικτών πρότειναν οι Singh και Wells το 1986 (Taoukis and Labuza, 2003):

1. Δείκτες που δηλώνουν κακομεταχείριση (Abuse indicators)
2. Δείκτες μερικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ (Partial temperature history indicators), οι οποίοι δίνουν απόκριση μόνο, όταν ξεπεραστεί ένα θερμοκρασιακό όριο, και δείχνουν ότι το προϊόν έχει εκτεθεί σε μία θερμοκρασία επαρκή, για να προκαλέσει μια αλλαγή στην ποιότητα ή την ασφάλειά του (Kerry et al., 2006).
3. Δείκτες συνολικού θερμοκρασιακού ιστορικού προφίλ (Full temperature history indicators), οι οποίοι δείχνουν μια συνεχή θερμοκρασιακά εξαρτώμενη απόκριση για όλο το ιστορικό του προϊόντος (Kerry et al., 2006).

Η επικρατέστερη από τις ταξινομήσεις, που έχουν γίνει κατά καιρούς, είναι αυτή που προτάθηκε από τον Taoukis et al. (2001) και η οποία διακρίνει τις εξής τρεις κατηγορίες δεικτών:

1. Δείκτες Κρίσιμης Θερμοκρασίας (Critical temperature indicators, CTI)
2. Ολοκληρωτές Κρίσιμης Θερμοκρασίας - Χρόνου (Critical temperature / time integrators - CTTI)
3. Χρονο - Θερμοκρασιακοί Ολοκληρωτές ή Δείκτες (Time - temperature integrators/ indicators - TTI)

Δείκτες Κρίσιμης Θερμοκρασίας

Οι εν λόγω δείκτες δίνουν απόκριση, όταν η θερμοκρασία είναι πάνω ή κάτω από μία θερμοκρασία αναφοράς. Περιλαμβάνουν ένα στοιχείο του χρόνου (συνήθως μικρό, από λίγα λεπτά έως λίγες ώρες), όμως δε φανερώνουν το ιστορικό έκθεσης πάνω ή κάτω από τη θερμοκρασία αναφοράς. Οι δείκτες αυτοί ουσιαστικά υποδεικνύουν το γεγονός ότι το προϊόν έχει εκτεθεί σε μια ανεπιθύμητη θερμοκρασία για ένα χρονικό διάστημα αρκετό, ώστε να προκληθεί μια κρίσιμη αλλαγή, η οποία επηρεάζει δυσμενώς την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου. Επίσης, μπορούν να προειδοποιήσουν σε περιπτώσεις, όπου φυσικοχημικές ή βιολογικές αντιδράσεις εμφανίζουν κάποια ασυνεχή αλλαγή στο ρυθμό τους. Παραδείγματα πιθανής εφαρμογής αυτού του τύπου θερμοκρασιακών δεικτών θα μπορούσε να αποτελέσει η μη αντιστρεπτή αλλοίωση της υφής ενός τροφίμου, η οποία συμβαίνει όταν πραγματοποιείται αλλαγή φάσης, όπως κατά την κατάψυξη φρέσκων ή ψυγμένων προϊόντων ή την απόψυξη κατεψυγμένων προϊόντων, ή η μετουσίωση μιας

σημαντικής πρωτεΐνης κατά τη θέρμανση του τροφίμου πάνω από μια κρίσιμη θερμοκρασία.

Ολοκληρωτές Κρίσιμης Θερμοκρασίας - Χρόνου

Οι CTTI συνοδεύονται από κάποια απόκριση, η οποία αντικατοπτρίζει την αθροιστική χρονο-θερμοκρασιακή έκθεση του τροφίμου, πάνω από μια κρίσιμη θερμοκρασία αναφοράς. Η απόκρισή τους θα μπορούσε να μεταφραστεί σε ισοδύναμο χρόνο έκθεσης στην κρίσιμη θερμοκρασία. Οι εν λόγω δείκτες μπορούν να χρησιμεύσουν ως υπόδειξη προβλημάτων στην αλυσίδα διανομής των προϊόντων, καθώς και σε περιπτώσεις, όπου οι κύριες αντιδράσεις, που σχετίζονται με την ποιότητα και την ασφάλεια των προϊόντων, ξεκινούν να συμβαίνουν πάνω από μια κρίσιμη θερμοκρασία. Παραδείγματα τέτοιων αντιδράσεων αποτελούν η μικροβιακή ανάπτυξη ή η ενζυμική δραστηριότητα, οι οποίες αναστέλλονται κάτω από μια κρίσιμη θερμοκρασία.

Χρονο-Θερμοκρασιακοί Ολοκληρωτές ή Δείκτες (TTI)

Οι TTI δίνουν μια συνεχή, εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία απόκριση καθ' όλη τη διάρκεια του ιστορικού του προϊόντος. Ολοκληρώνουν, σε μία μόνο μέτρηση, το συνολικό χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόδειξη μιας "μέσης" θερμοκρασίας, που επικρατεί κατά τη διακίνηση του τροφίμου. Οι συγκεκριμένοι δείκτες μπορούν να συσχετισθούν με συνεχείς εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία αντιδράσεις, που έχουν ως αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου.

Οι δείκτες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μπορούν να ταξινομηθούν και με βάση την αρχή, στην οποία στηρίζεται η λειτουργία τους. Η κατηγοριοποίηση σύμφωνα με αυτό το κριτήριο μπορεί να γίνει ως εξής:

- ✓ Χημικοί δείκτες
- ✓ Ενζυμικοί δείκτες
- ✓ Μηχανικοί δείκτες
- ✓ Δείκτες πολυμερισμού
- ✓ Φωτοχημικοί δείκτες
- ✓ Ηλεκτροχημικοί δείκτες
- ✓ Δείκτες διάχυσης
- ✓ Βιολογικοί και μικροβιακοί δείκτες

(Taoukis, 2001)

1.3.3 Διαχρονική εξέλιξη των ΤΤΙ

Το έναυσμα για τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού, καθώς και χαμηλού κόστους, χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη δόθηκε, όταν αναγνωρίστηκε η μεγάλη σημασία των θερμοκρασιακών μεταβολών, κατά τη διακίνηση, στην τελική ποιότητα και ασφάλεια του τροφίμου.

Η πρώτη εφαρμογή "συσκευής", η οποία δείχνει πιθανή θερμοκρασιακή κακομεταχείριση τροφίμου, τοποθετείται κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, όταν ομάδες εφοδιαστών του στρατού τοποθετούσαν ένα παγάκι σε κάθε συσκευασία κατεψυγμένου τροφίμου. Η εξαφάνιση του πάγου σηματοδοτούσε κακή μεταχείριση του τροφίμου (Ταουκίς, 2003 παραθέτει Schoen and Byrne, 1972).

Ο πρώτος δείκτης κατοχυρωμένος με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (πατέντα) χρονολογείται το 1933 και από τότε πάνω από εκατό πατέντες χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών έχουν εκδοθεί (Ταουκίς and Labuza, 2003)

Σύμφωνα με τους Renier et al. (1962) ο πρώτος εμπορικά διαθέσιμος χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης αφορούσε τη βιομηχανία κατεψυγμένων τροφίμων και δημιουργήθηκε από την Honeywell Corp (Renier and Morin, 1962). Η συσκευή αυτή δημιουργήθηκε, διότι "η έλλειψη επαρκούς συστήματος παρακολούθησης και ελέγχου της ποιότητας των κατεψυγμένων τροφίμων αποτελούσε πηγή προβλημάτων για πολλούς" (Singh and Wells, 1987). Στο συγκεκριμένο ΤΤΙ, με άσκηση υψηλής πίεσης στο εύθραυστο φιαλίδιο του ηλεκτρολύτη απελευθερωνόταν διάλυμα, το οποίο απορροφούσε ένα ειδικά επεξεργασμένο στυπόχαρτο. Με αυτό τον τρόπο λάμβανε χώρα η ενεργοποίηση του δείκτη και σχηματιζόταν ένα ηλεκτρολυτικό κελί με τα ηλεκτρόδια βραχυκυκλωμένα. Τα παραγόμενα υδροξύλια, OH^- , της καθόδου του χάλκινου ηλεκτροδίου μετέβαλλαν το χρώμα του ειδικά επεξεργασμένου στυπόχαρτου από κίτρινο σε κόκκινο. Στην πρώτη άκρη του χάλκινου ηλεκτροδίου εμφανιζόταν ένα κόκκινο σημάδι, το οποίο συνέπιπτε με την ένδειξη «0» της κλίμακας. Η κίνηση της κόκκινης αυτής ένδειξης κατά μήκος της κλίμακας γινόταν κατά τρόπο (ρυθμό) εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία. Το συγκεκριμένο ΤΤΙ αναλύθηκε από το USDA στο Εργαστήριο Ερευνών Δυτικής Περιφέρειας και κρίθηκε αξιόπιστο, ωστόσο δε διατέθηκε ευρέως στην αγορά πιθανόν λόγω του υψηλού κόστους του και του μεγάλου όγκου του (Ταουκίς, 2010).

Οι Renier et al. παρουσίασαν τις τεχνικές απαιτήσεις, που θα έπρεπε ένα ΤΤΙ να πληροί, και επισήμαναν ότι την πιο κρίσιμη απαίτηση αποτελεί η ικανότητα ενός δείκτη να παρακολουθεί συγκεκριμένες σχέσεις θερμοκρασίας-χρόνου στα κατεψυγμένα προϊόντα (Singh and Wells, 1987).

Στις αρχές της δεκαετίας του '70 η κυβέρνηση των Η.Π.Α. θεώρησε επιτακτική την ανάγκη της χρήσης χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών σε ορισμένα προϊόντα. Το γεγονός αυτό οδήγησε και στην εντατικοποίηση της ερευνητικής δραστηριότητας στον συγκεκριμένο τομέα (Taoukis and Labuza, 2003)

Ο Hu το 1972 αναφέρει την ανάπτυξη ενός χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη, η αρχή λειτουργίας του οποίου βασιζόταν στη διάχυση του οξυγόνου. Ο δείκτης αυτός κατασκευάστηκε στα εργαστήρια του στρατού των Ηνωμένων Πολιτειών (U.S. Army Natick Laboratories). Συγκεκριμένα στον εν λόγω δείκτη, οξυγόνο διεισδύει μέσα από μια πλαστική μεμβράνη, ενώ ο ρυθμός διαπερατότητας του οξυγόνου ήταν εξαρτώμενος από το χρόνο και τη θερμοκρασία. Στο εσωτερικό της πλαστικής μεμβράνης υπήρχε το αντιδρών σύστημα (ένα διάλυμα), το οποίο, καθώς εισερχόταν το οξυγόνο, οξειδωνόταν. Το διάλυμα λόγω της οξειδωτικής αντίδρασης άλλαζε χρώμα από κόκκινο σε άχρωμο και αποκάλυπτε ένα προτυπωμένο μήνυμα "Χρήση έως . . ." ή "Απόρριψη". Η έκταση της αντίδρασης είχε να κάνει με την ποσότητα του οξυγόνου, που διαπερνούσε τη μεμβράνη. Ο Hu δοκίμασε τον εν λόγω δείκτη για ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών αποθήκευσης (5.5 – 55oC) (Taoukis, 2010, Singh and Wells, 1987). Επιπλέον, μελετήθηκαν διάφορες μεμβράνες και προέκυψε πως το πολυαιθυλένιο ήταν το καταλληλότερο υλικό μεμβράνης για τα μισά στρατιωτικά σιτηρέσια με γνωστή διάρκεια ζωής και το nylon-6 για τα άλλα μισά (Taoukis, 2010 παραθέτει Killoran, 1976). Το συγκεκριμένο ΤΠI παρήχθηκε μαζικά από την Arthech Corp (Falls Church, VA) (Taoukis, 2010).

Οι Schoen και Byrne εξέτασαν κατοχυρωμένους με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και μη χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες, η λειτουργία των οποίων στηριζόταν σε διάφορους φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς μηχανισμούς. Οι ερευνητές αυτοί αναφέρουν ότι ο ιδανικός δείκτης για κατεψυγμένα τρόφιμα πρέπει να ενημερώνει αξιόπιστα τον υπεύθυνο, πότε το προϊόν πρέπει να απορριφθεί, ενώ επισημαίνουν πως μέχρι εκείνη τη χρονική στιγμή ένας τέτοιος δείκτης δεν είχε ακόμα αναπτυχθεί, λόγω της υποκειμενικότητας στον καθορισμό της ποιότητας ενός προϊόντος, που διατηρείται υπό ψύξη και των δυσκολιών στον καθορισμό των σχετικών μεταβλητών των συνθηκών αποθήκευσης, που θα έπρεπε να μετρηθούν (Singh and Wells, 1987).

Στον πίνακα 4, που ακολουθεί, παρουσιάζεται μια επισκόπηση αξιόλογων πατέντων χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών από το 1991 και μετά, οι οποίες έχουν ταξινομηθεί ανάλογα με τον τύπο και την αρχή, στην οποία στηρίζεται η λειτουργία τους.

Πίνακας 1.4: Διάφορα συστήματα TTI πατεντών με βάση τον τύπο και τον τρόπο της απόκρισής τους.

Χρονολογία	Εφευρέτης	Αρχή Λειτουργίας
1991	Jalinski T.J.	Χημικός (TTI)
1991	Jalinski T.J.	Χημικός (TTI)
1991	Thierry A.	Χημικός (CTI)
1991	Swartzel K.R.	Φυσικοχημικός (TTI)
1992	Jalinski T.J.	Χημικός (CTI)
1993	Veitch R.J.	Φυσικοχημικός (TTI)
1993	Loustaunau A.	Φυσικός (CTI)
1994	Loutsaunau A.	Φυσικός (CTI)
1994	Veitch R.J.	Φυσικοχημικός (CTI)
1995	Prusik T.	Φυσικοχημικός (TTI)
1996	Cannelongo J.F.	Φυσικός (CTI)
1997	Veitch R.J.	Φυσικός (CTI)
1997	Arens R. et al	Φυσικοχημικός (TTI)
1997	Schneider N.	Φυσικός (CTI)
1999	Simons M.J.	Φυσικοχημικός (CTI)
2000	Schaten B.B.	Φυσικός (CTI)
2000	Leak & Ronnow	Ενζυμικός (TTI)
2000	Prusik T.	Φυσικός (CTTI)
2000	Ram A.T.	Χημικός (TTI)
2000	Bray A.V.	Φυσικός (TTI)
2001	Simons M.J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2001	Qiu J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2002	Qiu J.	Φυσικοχημικός (TTI)
2003	Haarer D.	Φυσικοχημικός (TTI)
2005	Bauer & Knorr	Pressure TTI (PTTI)
2006	Ciba & Fresh Point Cooperation	Φυσικοχημικός (OnVu TTI)
2008	Sum	Amylase Type TTI

Έως το 1976, έξι εταιρείες κατασκεύαζαν δείκτες, τουλάχιστον μέχρι το στάδιο των πρωτοτύπων. Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του '70 οι εμπορικές εφαρμογές των TTI, παρ' όλη την ανάπτυξη των δεικτών, ήταν πολύ λίγες, με αποτέλεσμα η ερευνητική και η βιομηχανική δραστηριότητα στον τομέα να υποχωρήσει προσωρινά, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση των σχετικών δημοσιεύσεων και την κατασκευή νέων μοντέλων. Η έρευνα όμως για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων των υπαρχόντων δεικτών συνεχίστηκε. Στις επόμενες δύο δεκαετίες η προσοχή του επιστημονικού κοινού, όσο και του βιομηχανικού είχε εστιαστεί σε τρεις τύπους TTI, τους 3M Monitor Mark, I-Point Time Temperature Monitor και Lifelines Freshness Monitor και Fresh-Check (Taoukis, 2010, Taoukis 2001).

Η 3M Monitor Marko (3M Co., St. Paul., Minnesota, US Patent, 3,954,011, 1976) πέτυχε μία από τις πρώτες σημαντικές εφαρμογές ΤΠΙ, καθώς ο εν λόγω δείκτης χρησιμοποιήθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας κατά την μεταφορά εμβολίων, που διατηρούνταν σε κατάψυξη (Ταουκίς, 2001). Ο δείκτης 3M Monitor Mark® αποτελείτο από μια επιφάνεια κορεσμένη με ένα μίγμα εστέρων λιπαρών οξέων και φθαλικών ενώσεων (χρωματισμένο με μπλε χρωστική) και το οποίο χρησίμευε ως δεξαμενή. Προσαρμοσμένο στο πάνω μέρος της επιφάνειας ήταν το τέλος ενός μακριού πορώδους φυτιλιού, κατά μήκος του οποίου το χημικό μίγμα μπορούσε να διαχυθεί. Το φαινόμενο της διάχυσης ξεκινούσε όταν η θερμοκρασία συντήρησης του προϊόντος υπερέβαινε το σημείο τήξης του μίγματος και στη συνέχεια εξελισσόταν σταδιακά, ενώ ο ρυθμός της διάχυσης ήταν εξαρτώμενος από το χρόνο και τη θερμοκρασία. Η μετατόπιση της διαχεόμενης ουσίας γινόταν ορατή μέσω ανοιγμάτων κατά μήκος του φυτιλιού και μπορούσε να διαβαστεί, όπως ένα θερμόμετρο, ή να μετρηθεί σε κατάλληλη κλίμακα, όταν όλο το μήκος του φυτιλιού ήταν ορατό (Ταουκίς 2010, Ταουκίς, 2001, Fu and Labuza, 1992). Αλλαγές στη συγκέντρωση του εστέρα, αλλά και στο είδος του, είχαν ως αποτέλεσμα διαφορετική απόκριση του ΤΠΙ, για παράδειγμα διαφορετικός εστέρας θα είχε διαφορετικό σημείο τήξης και επομένως διαφορετικό σημείο έναρξης της διάχυσης. Ο δείκτης είχε ένα εύρος θερμοκρασιών απόκρισης από τους -17 °C έως τους 48 °C (Fu and Labuza, 1992) και μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως CΤΠΙ, όταν η κρίσιμη θερμοκρασία ήταν ίδια με το σημείο τήξης του εστέρα ή ως ΤΠΙ, όταν το σημείο τήξης του εστέρα ήταν μικρότερο από το θερμοκρασιακό εύρος, στο οποίο συντηρούταν το τρόφιμο (Ταουκίς, 2001).

Ο δείκτης I-Point Time Temperature Monitor, (US Patents 4,043,871, 1977 and 4,284,719, 1981) ήταν ο πρώτος ενζυμικός δείκτης. Η αρχή λειτουργίας του στηριζόταν στην αλλαγή του χρώματος λόγω της μείωσης του pH, ως αποτέλεσμα μιας ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός υποστρώματος λιπιδίου (Ταουκίς, 2001, Fu and Labuza, 1992). Ο μηχανισμός της αντίδρασης ενζύμου-υποστρώματος, στον οποίο στηρίχτηκε η αρχή λειτουργίας του δείκτη, θεωρήθηκε ότι είναι ανώτερος από καθαρά χημικές ή φυσικές μεθόδους ενδείξεων, διότι ανταποκρίνεται καλύτερα στις βιολογικές αλλαγές, που συμβαίνουν στα συστήματα τροφίμων (Singh and Wells, 1987).

Οι δείκτες της Lifelines, Freshness Monitor® και Fresh-Check® (Lifelines Inc., Morris Plains, NJ), στήριξαν τη λειτουργία τους σε αντιδράσεις πολυμερισμού (US Patents 3,999,946, 1976 and 4,228,126, 1980). Πιο συγκεκριμένα, οι εν λόγω δείκτες βασίστηκαν

στην ιδιότητα των δις-υποκατεστημένων κρυστάλλων διακετυλενίου ($R-C=C-C=C-R$) να πολυμερίζονται σε ένα πολυμερές σκούρου χρώματος. Κατά τον πολυμερισμό, διατηρείται η κρυσταλλική δομή του μονομερούς, ενώ οι κρύσταλλοι του πολυμερούς παραμένουν ενωμένοι σε μια ευθύγραμμη αλυσίδα και διατηρούν τη μονοδιάστατη φύση τους σε ό,τι αφορά τις οπτικές τους ιδιότητες. (Ταουκίς, 2001, Fu and Labuza, 1992).

Ο δείκτης Lifelines Freshness Monitor[®] αποτελείτο από ένα ορθογώνιο κομμάτι συνενωμένων φύλλων χαρτιού. Το μπροστινό μέρος περιελάμβανε μια ταινία, η οποία έφερε μια λεπτή επικάλυψη από το άχρωμο μονομερές του διακετυλενίου και δύο barcodes, ένα για το προϊόν και ένα για την αναγνώριση του μοντέλου του δείκτη. Η ανάκλαση του φωτός εμετράτο με σάρωση μέσω μιας οπτικής συσκευής, η οποία λειτουργούσε με laser, ενώ το αποτέλεσμα της σάρωσης αποθηκευόταν σε μια φορητή συσκευή (Ταουκίς and Labuza, 2003). Αρχικά, η ανάκλαση έπρεπε να είναι υψηλή (95 - 100 %), στη συνέχεια και καθώς προχωρούσε η αντίδραση του πολυμερισμού και το χρώμα του πολυμερούς σκούραινε, η ανάκλαση μειωνόταν (50 % ανάκλαση). Η φορητή συσκευή συσχέτιζε την αλλαγή στην ανάκλαση με τα χαρακτηριστικά του δείκτη. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αλλαγή του χρώματος στον δείκτη αυτό μπορεί να συσχετισθεί καλά με την υποβάθμιση της ποιότητας στις ντομάτες και στο γάλα μακράς διάρκειας (γάλα υπερ-υψηλής θερμικής επεξεργασίας - UHT) (Woolfe, 2000, Selman, 1995).

Ο δείκτης Lifelines Fresh-Check[®] απευθυνόταν στο καταναλωτικό κοινό. Είχε στρογγυλό σχήμα και αποτελείτο από δύο δακτυλίους, ένα μικρό εσωτερικό, ο οποίος περιείχε το πολυμερές και ένα σκούρο ή μαύρο εξωτερικό, ο οποίος αποτελούσε και το χρώμα αναφοράς. Ο εσωτερικός δακτύλιος άρχιζε να σκουραίνει, όταν εκτίθετο σε συνδυασμούς χρόνου – θερμοκρασίας με έναν προκαθορισμένο ρυθμό, που είχε να κάνει με τη διάρκεια ζωής του τροφίμου. Όταν ο εσωτερικός δακτύλιος αποκτούσε την ίδια απόχρωση με τον εξωτερικό, ο καταναλωτής δε θα έπρεπε να καταναλώσει πλέον το τρόφιμο (Ταουκίς, 2001, Selman 1995).

1.3.4 Προδιαγραφές ενός αποτελεσματικού ΤΤΙ

Η αποτελεσματικότητα και η αξιοπιστία ενός ΤΤΙ, ως δείκτη ποιότητας ενός τροφίμου, εξαρτάται από τα κινητικά χαρακτηριστικά της απόκρισής του. Βασική απαίτηση αποτελεί η εξάρτηση του ρυθμού απόκρισης του δείκτη από τη θερμοκρασία να προσεγγίζει κατά το δυνατόν την εξάρτηση από τη θερμοκρασία των δράσεων της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου. Οι απαιτήσεις για ένα αποτελεσματικό ΤΤΙ είναι ο δείκτης να μπορεί να δείχνει μία συνεχή αλλαγή, ο ρυθμός της οποίας αυξάνεται με τη θερμοκρασία και δεν αντιστρέφεται, όταν η θερμοκρασία μειώνεται. Πιο αναλυτικά ένας ιδανικός ΤΤΙ πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Να παρουσιάζει μια συνεχή, χρονο-θερμοκρασιακά εξαρτώμενη αλλαγή.
- Η αλλαγή αυτή να εκφράζεται ως μία απόκριση, η οποία να είναι εύκολα μετρήσιμη και μη αντιστρεπτή.
- Η αλλαγή πρέπει να μιμείται ή να μπορεί να συσχετιστεί με το βαθμό ποιοτικής αλλοίωσης του τροφίμου και την εναπομένουσα διάρκεια ζωής του.
- Να είναι αξιόπιστος και να δίνει σταθερές αποκρίσεις, όταν εκτίθεται στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες.
- Να έχει χαμηλό κόστος.
- Να είναι ευέλικτος, ώστε διαφορετικές μορφές του να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλα θερμοκρασιακά διαστήματα (π.χ. ψύξη, κατάψυξη, θερμοκρασία δωματίου), με περιόδους απόκρισης από μερικές μέρες μέχρι περισσότερο από ένα χρόνο.
- Να είναι μικρός, να προσαρμόζεται εύκολα στη συσκευασία του τροφίμου και να είναι συμβατός με μια διεργασία συσκευασίας υψηλής ταχύτητας.
- Να είναι σταθερός πριν την ενεργοποίησή του και να μπορεί να ενεργοποιηθεί εύκολα.
- Να μην επηρεάζεται από τις άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες, εκτός της θερμοκρασίας, όπως το φως, ρυπαντές του αέρα και τη σχετική υγρασία (RH) του περιβάλλοντος.
- Να είναι ανθεκτικός σε φυσιολογικές μηχανικές καταπονήσεις, χωρίς να επηρεάζεται η απόκρισή του.
- Να είναι μη τοξικός και στην απίθανη περίπτωση επαφής του με το τρόφιμο να μη δημιουργεί κινδύνους.

- Να είναι σε θέση να μεταφέρει με απλό και εύκολα αντιληπτό τρόπο το μήνυμα στον απλό καταναλωτή ή στον εκάστοτε ενδιαφερόμενο.
- Η απόκρισή του να είναι οπτικά κατανοητή και εύκολα μετρήσιμη από ηλεκτρονικές συσκευές, ώστε οι πληροφορίες να λαμβάνονται, να αποθηκεύονται και να μεταδίδονται εύκολα και γρήγορα.

(Taoukis and Labuza, 2003, Taoukis, 2001)

Οι απαιτήσεις για τον ιδανικό ΤΠΙ είναι πολλές και επομένως είναι δύσκολο κάποιος δείκτης να ικανοποιεί όλες τις προϋποθέσεις. Όμως, η εξέλιξη των δεικτών έχει οδηγήσει σε ικανοποιητικό επίπεδο και σήμερα χρησιμοποιούνται δείκτες σε διάφορες εφαρμογές, οι οποίοι πληρούν αρκετά από τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά.

Ακολουθούν κάποια παραδείγματα χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών, οι οποίοι είναι διαθέσιμοι στην αγορά και βρίσκουν εφαρμογές στην εκτίμηση της ποιότητας διαφόρων προϊόντων.

1.3.5 Σύγχρονα συστήματα ΤΠΙ

Αρκετοί είναι οι εμπορικά διαθέσιμοι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες, που έχουν αναπτυχθεί. Όπως αναφέρθηκε, ένας τρόπος κατηγοριοποίησης των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών αποτελεί η αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία τους. Στη συνέχεια παρατίθενται παραδείγματα σύγχρονων ΤΠΙ με βάση την κατηγοριοποίηση αυτή.

1.3.5.1 Δείκτες Μοριακής Διάχυσης

Η 3M Co, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είχε κυκλοφορήσει έναν από τους πρώτους χρονο-θερμοκρασιακούς δείκτες, που βασιζόταν στην αρχή της μοριακής διάχυσης. Ο Monitor Mark® Time Temperature Monitor (1997), αποτελεί τον διάδοχο του 3M Monitor Mark®. Η λειτουργία του δείκτη βασίζεται στη διάχυση ενός ιξωδοελαστικού υλικού σε μια φωτο-αντανεκλαστική πορώδη μήτρα, με ρυθμό εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία. Αποτέλεσμα της διάχυσης είναι η σταδιακή μεταβολή της διαπερατότητας του φωτός μέσα από την πορώδη μήτρα. Η μεταβολή αυτή δίνει μια ορατή απόκριση. Ο ρυθμός μεταβολής της απόκρισης του δείκτη και η θερμοκρασιακή εξάρτησή του ελέγχονται από τη σύνθεση του πορώδους υλικού, τη συγκέντρωση του πολυμερούς, που διαχέεται, καθώς και τη

θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης. Το ΤΠ ενεργοποιείται κατά την προσκόλληση των δύο υλικών, τα οποία πριν τη χρήση τους μπορούν να αποθηκεύονται ξεχωριστά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Ταουκίς, 2010).



Εικόνα 1.4: Χρονο-θερμοκρασιακός Δείκτης Διάχυσης 3M Monitor Mark®.

1.3.5.2 Δείκτες που βασίζονται στον πολυμερισμό

Ο δείκτης Fresh-Check® της Temptime (TempTime Corp., NJ, USA) αποτελεί το διάδοχο του Fresh-Check της Lifelines και βασίζεται στον πολυμερισμό σε στερεή φάση ενός λεπτά επικαλυμμένου, άχρωμου, διακετυλενικού μονομερούς, το οποίο μετατρέπεται σε ένα πολύ σκούρο πολυμερές (Ταούκης, 2010).

Ένα μειονέκτημα, που παρουσιάζουν οι πολυμερικοί δείκτες, είναι πως ενεργοποιούνται τη στιγμή της παραγωγής τους. Ως εκ τούτου, οι δείκτες θα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των -18°C , ώστε οι αλλαγές να συμβαίνουν με πολύ αργό ρυθμό (Woolfe, 2000)



Εικόνα 1.5: Δείκτης Fresh- Check® της Temptime.

Οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες Fresh-Check® χρησιμοποιούνται σε αρκετά προϊόντα διατροφής, όπως σε ευαλλοίωτα προϊόντα της μεγάλης αλυσίδας λιανικού εμπορίου Monoprix (Γαλλία), σε έτοιμες σαλάτες και φρούτα της εταιρίας Carrefour, που διανέμονται μέσω e-shopping, και σε γαλακτοκομικά προϊόντα και χυμούς της εταιρίας Milco. Επίσης, οι δείκτες Fresh-Check® χρησιμοποιούνται στα εμβόλια που παρέχονται στις χώρες του Τρίτου Κόσμου στα πλαίσια εκστρατείας της UNICEF (Ταουκίς, 2010).

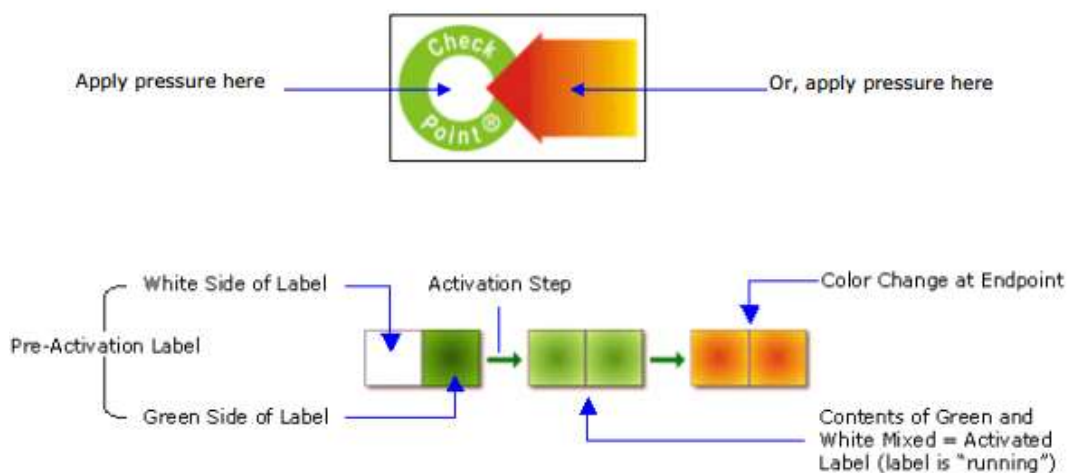


Εικόνα 1.6: Εφαρμογή του ΤΤΙ Fresh-Check® σε συσκευασμένα φρέσκα φρούτα.

1.3.5.3 Ενζυμικοί Δείκτες

Ο CheckPoint® ΤΤΙ (VITSAB A.B. Malmo, Sweden) είναι ένας ενζυμικός ΤΤΙ και αποτελεί διάδοχο του I-Point Time Temperature Monitor. Η εταιρία VITSAB έχει κατασκευάσει μια πληθώρα ενζυμικών δεικτών από τη δεκαετία του '80 έως σήμερα. Οι εν λόγω δείκτες μεταβάλλουν το χρώμα τους λόγω της πτώσης του pH, που συμβαίνει μέσω μια ελεγχόμενης ενζυμικής υδρόλυσης ενός υποστρώματος, το οποίο περιέχει κάποιο λιπίδιο. Πριν λάβει χώρα η ενεργοποίηση του δείκτη, το ένζυμο και το υπόστρωμα βρίσκονται σε δύο ανεξάρτητα διαμερίσματα, το ένα από τα οποία έχει ένα ορατό παράθυρο. Το ένα διαμέρισμα περιέχει ένα υδατικό διάλυμα ενός λιπολυτικού ενζύμου (π.χ. παγκρεατική λιπάση), ενώ το άλλο το υπόστρωμα, που περιέχει το λιπίδιο (εστέρας-γλυκερόλης) προσροφημένο σε κονιοποιημένο φορέα από πολυβινυλοχλωρίδιο (Ταουκίς, 2010). Κατά την ενεργοποίηση του δείκτη, η οποία γίνεται με εφαρμογή μικρής μηχανικής πίεσης, το διάφραγμα, που χωρίζει τα δύο διαμερίσματα, διαρρηγνύεται με αποτέλεσμα το ένζυμο και το υπόστρωμα να αναμειχθούν. Με αυτό τον τρόπο ξεκινά η αντίδραση της υδρόλυσης. Η υδρόλυση του υποστρώματος προκαλεί παραγωγή οργανικού οξέος με συνέπεια τη μείωση του pH και εν συνεχεία τη μεταβολή του χρώματος, λόγω της

παρουσίας ενός χημικού δείκτη pH. Το χρώμα του ΤΠΙ μεταβάλλεται από σκούρο πράσινο σε ανοιχτό κίτρινο. Η χρωματική αλλαγή μπορεί να αναγνωρισθεί οπτικά και συγκρίνοντάς τη με τα χρώματα αναφοράς στην αρχή και στο τέλος της αντίδρασης, τα οποία είναι εκτυπωμένα γύρω από το παράθυρο, στο οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση. Επιπλέον, η συνεχής χρωματική αλλαγή του δείκτη μπορεί να μετρηθεί ενόργανα με χρήση χρωματόμετρου (electronic color scanner).



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του ενζυμικού ΤΠΙ της VITSAB.

Ο συνδυασμός διαφορετικών τύπων υποστρωμάτων, ενζύμων και συγκεντρώσεων αυτών, δίνει τη δυνατότητα παραγωγής ποικίλων δεικτών με διαφορετικές αποκρίσεις και θερμοκρασιακή εξάρτηση, και άρα δεικτών με διαφορετική διάρκεια ζωής (Taoukis and Labuza, 2003, Taoukis, 2001, VITSAB).

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

- Είδος ενζύμου και υποστρώματος
- Συγκέντρωση και αναλογία ενζύμου – υποστρώματος
- Διακριτά στάδια χρωματικής αλλαγής

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

▪ Ταξινόμηση με βάση το είδος του ενζύμου και του υποστρώματος

Ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος προκύπτουν διαφορετικοί τύποι ΤΠΙ με διαφορετικά χαρακτηριστικά απόκρισης και θερμοκρασιακή ευαισθησία.

Πίνακας 1.5: Διαφορετικοί τύποι VITSAB ΤΤΙ ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος.

Τύπος	Ένζυμο	Υπόστρωμα
L	παγκρεατική λιπάση	τριλαουρίνη
P	παγκρεατική λιπάση	τριπαλμιτίνη
B	παγκρεατική λιπάση	τριβουτυρίνη
C	παγκρεατική λιπάση	τρικαπροΐνη
M	παγκρεατική λιπάση	μυριστικός μεθυλεστέρας
LP	παγκρεατική λιπάση	τριλαουρίνη-τριπαλμιτίνη
LM	παγκρεατική λιπάση	τριλαουρίνη-μυριστικός μεθυλεστέρας
νέος τύπος LP	λιπάση μικροβιακής προέλευσης (Rhizopus Oryzae lipase)	τριλαουρίνη-τριπαλμιτίνη
Νέος τύπος M	λιπάση μικροβιακής προέλευσης (Rhizopus Oryzae lipase)	μυριστικός μεθυλεστέρας

▪ Ταξινόμηση με βάση τη συγκέντρωση και την αναλογία ενζύμου – υποστρώματος

Οι αναλογίες ενζύμου - υποστρώματος προσδιορίζουν διαφορετικές διάρκειες ζωής και σε διαφορετικά θερμοκρασιακά φάσματα. Μερικά παραδείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1.6, που ακολουθεί.

Πίνακας 1.6: Διαφορετικοί τύποι VITSAB ΤΤΙ με βάση διαφορετικές αναλογίες ενζύμου-υποστρώματος.

Τύπος	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
M4-30	4°C	30 ημέρες
M4-5	4°C	5 ημέρες
L5-24	5°C	24 ημέρες
L5-8	5°C	8 ημέρες
LM10-2	10°C	2 ημέρες

▪ Ταξινόμηση με βάση τα στάδια της χρωματικής αλλαγής

Ανάλογα με τα διακριτά στάδια χρωματικής αλλαγής οι ενζυμικοί ΤΤΙ της VITSAB διακρίνονται σε δύο κατηγορίες :

- **Δίχρωμοι (Bicolor) ΤΤΙ:** κατά την ενεργοποίησή τους το "παράθυρο ελέγχου" φέρει βαθύ πράσινο χρωματισμό, ο οποίος καταλήγει σε κίτρινο στο τέλος της αντίδρασης.
- **Τρίχρωμοι (Tricolor) ΤΤΙ:** πριν την ενεργοποίησή τους το ένζυμο είναι διαχωρισμένο και το χρώμα του "παραθύρου ελέγχου" του δείκτη είναι λευκό, κατά την ενεργοποίησή τους φέρει βαθύ πράσινο χρωματισμό, ο οποίος στη μέση της αντίδρασης γίνεται κίτρινος και στο τέλος της αντίδρασης κόκκινος.



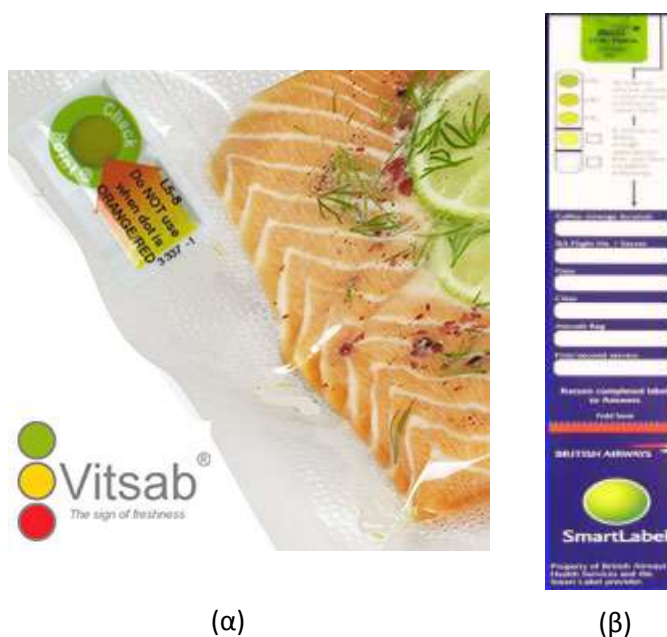
Εικόνα 1.8: Τρόπος λειτουργίας τρίχρωμου ενζυμικού ΤΤΙ της VITSAB.

Τα τρίχρωμα ΤΤΙ εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς από αυτούς των δίχρωμων ΤΤΙ. Συγκεκριμένα, παρέχουν τη δυνατότητα ένδειξης της ενδιάμεσης κατάστασης του τροφίμου (κίτρινος χρωματισμός του δείκτη) και όχι μόνο των ακραίων καταστάσεων του φρέσκου (πράσινος χρωματισμός του δείκτη) και μη φρέσκου (πορτοκαλί χρωματισμός του δείκτη) τροφίμου. Αντίθετα τα δίχρωμα ΤΤΙ παρέχουν ενδείξεις για τις ακραίες καταστάσεις του φρέσκου (πράσινος χρωματισμός) και του μη φρέσκου (κίτρινος χρωματισμός) τροφίμου και επομένως βρίσκουν εφαρμογή σε περιπτώσεις, όπου είναι αναγκαία μόνο η γνώση του αποδεκτού και του μη αποδεκτού και όχι του επιπέδου φρεσκότητας. Επίσης, οι δύο τύποι δεικτών απευθύνονται σε διαφορετικές ομάδες ατόμων.

Στο καταναλωτικό κοινό περισσότερο κατανοητοί είναι οι τρίχρωμοι δείκτες, αφού είναι ευκολότερη η παρακολούθηση των σταδίων χρωματικής μεταβολής, ενώ οι δίχρωμοι δείκτες είναι λιγότερο κατανοητοί, εκτός και εάν δε συνοδεύονται από χρωματική κλίμακα.

Παρόλα αυτά οι δίχρωμοι ΤΤΙ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως από τη βιομηχανία, αλλά και από άλλους εμπλεκόμενους φορείς στην αλυσίδα τροφίμων (Τούλη, 2013).

Ο δείκτης CheckPoint® της VITSAB έχει βρει εφαρμογή σε συσκευασίες υπό κενό ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας φρέσκων θαλασσινών, που εισάγονται στις Η.Π.Α. Επιπρόσθετα, η εταιρία VITSAB έχει δημιουργήσει τα «flight labels». Πρόκειται για ενζυμικού τύπου bicolor ΤΤIs, που χρησιμοποιούνται στις εσωτερικές πτήσεις της British Airways στις κατεψυγμένες έτοιμες τροφές, που καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της πτήσης (Ταουκίς, 2010).

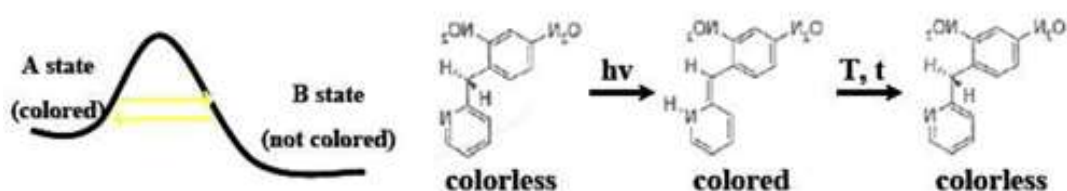


Εικόνα 1.9: Εφαρμογή του δείκτη CheckPoint® της VITSAB σε (α) προϊόν και (β) το σύστημα ελέγχου SmartLabel της British Airways.

Ένας νέος τύπος ενζυμικού δείκτη αναπτύχθηκε πρόσφατα και στηρίχτηκε στην ενζυμική υδρόλυση του αμύλου από μια α-αμυλάση (Yan et al, 2007).

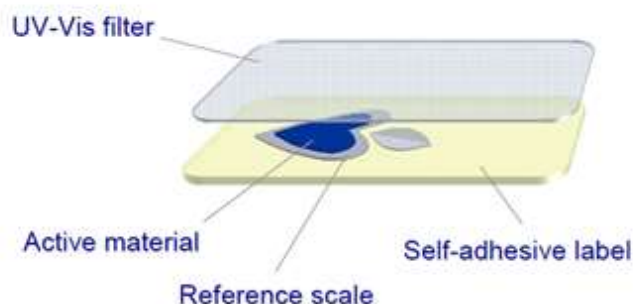
1.3.5.4 Φωτοχημικοί δείκτες

Ο δείκτης OnVu™ (Ciba Specialty Chemicals & Freshpoint, SW) βασίζεται σε μια φωτοχημική αντίδραση και ενεργοποιείται ύστερα από έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Φωτοευαίσθητες ενώσεις, όπως βενζυλοπυριδίνες, που βρίσκονται στον πολυμερικό κρύσταλλο του ΤΤΙ, διεγείρονται και αποκτούν έναν έντονο μπλε χρωματισμό ύστερα από την έκθεση του δείκτη σε χαμηλά μήκη κύματος (UV). Το έντονο μπλε χρώμα σταδιακά φθίνει με ρυθμό, που εξαρτάται από το χρόνο και τη θερμοκρασία, μέχρι να φθάσει στην αρχική του κατάσταση (άχρωμο) με το πέρας της φωτοχημικής αντίδρασης (Ταουκίς, 2010).



Εικόνα 1.10: Φωτοχρωμική αντίδραση των βενζυλοπυριδίνων ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Μετά την ενεργοποίησή του, ο φωτοχημικός δείκτης OnVu™, δε θα πρέπει να επηρεάζεται από την υπεριώδη ακτινοβολία του περιβάλλοντος στην οποία μπορεί να εκτεθεί, καθώς μπορεί να ενεργοποιηθεί ξανά. Γι' αυτό το λόγο τοποθετείται ένα ειδικό φίλτρο UV-Vis πάνω από την ετικέτα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.11. Ελέγχοντας τον τύπο των φωτοευαίσθητων ενώσεων και το χρόνο έκθεσης του δείκτη στην υπεριώδη ακτινοβολία κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής του, ο δείκτης μπορεί να ρυθμιστεί κατάλληλα, ώστε να μπορεί να περιγράψει την αλλοίωση διαφορετικών ειδών τροφίμων. Η ευελιξία του αυτή, η ευκολία εφαρμογής, αφού θα μπορούσε να εκτυπωθεί στη συσκευασία στο επιθυμητό σχήμα, και το χαμηλό κόστος του το καθιστούν πολύ λειτουργικό (Ταουκίς, 2010, Ταούκης 2010, Freshpoint, Freshlab – Research Project).



Εικόνα 1.11: Δείκτης OnVu™ με φίλτρο για την προστασία του από πιθανή επανεργοποίηση.

Η ίδια εταιρία έχει δημιουργήσει δύο ακόμα δείκτες τον OnVu™_{Logistics} και τον OnVu™_{Ice}. Ο OnVu™_{Logistics}, βασίζεται στην ίδια αρχή λειτουργίας με τον δείκτη OnVu™, ωστόσο παρέχει μία επιπλέον οργανοληπτική διαδικασία αντίληψης του αποχρωματισμού του εσωτερικού του δείκτη. Γύρω από την εσωτερική περιοχή του δείκτη, που ενεργοποιείται με έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία, υπάρχει μια τετραμερής χρωματική κλίμακα (A, B, C, D), η οποία βοηθά τους παραγωγούς, τους υπεύθυνους για τη διανομή και τους λιανοπωλητές να αντιληφθούν έμμεσα την ποιότητα του προϊόντος και να λάβουν τις κατάλληλες αποφάσεις για τον χειρισμό του. Ο OnVu™_{Ice} καθιστά άμεσα ορατή οποιαδήποτε διαταραχή υποστεί η αλυσίδα κατάψυξης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα, όπως παγωτά, κατεψυγμένα κρέατα, πουλερικά, λαχανικά και έτοιμα γεύματα, τα οποία, αν ξεπαγώσουν και στη συνέχεια ξαναψυχθούν, χάνουν τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά ή/και καθίστανται μη ασφαλή για κατανάλωση (Freshpoint).



Εικόνα 1.12: Φωτοχημικοί δείκτες OnVu™, OnVu™ Ice και OnVu™ Logistics αντίστοιχα.

Οι φωτοχημικοί δείκτες OnVu™ ξεκίνησαν πρώτα να χρησιμοποιούνται από την ελβετική εταιρία Ernst Kneuss Geflügel A.G., η οποία δραστηριοποιείται στην παραγωγή πουλερικών (Ταουκίς, 2010, Freshpoint). Παραδείγματα της εφαρμογής των δεικτών της OnVu παρουσιάζονται στην εικόνα 1.13.



Εικόνα 1.13: Εφαρμογή φωτοχημικού δείκτη OnVu™ σε διάφορα προϊόντα.

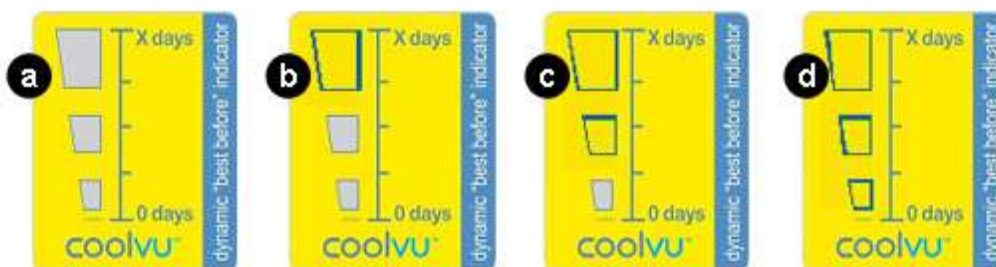
1.3.5.5 Χημικοί Δείκτες

Η εταιρία Freshpoint πρόσφατα δημιούργησε μια νέα τεχνολογία στον τομέα των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών, του δείκτη CoolVu. Η λειτουργία των εν λόγω δεικτών βασίζεται σε μια χρονο-θερμοκρασιακά εξαρτώμενη διαδικασία διάλυσης (χάραξης) ενός λεπτού στρώματος αλουμινίου, αποκαλύπτοντας μια έντονη κίτρινη επιφάνεια. Οι δείκτες CoolVu συνίστανται από δύο ανεξάρτητες ετικέτες, η πρώτη αποτελείται από μια τυπωμένη ετικέτα αλουμινίου, ενώ η δεύτερη είναι μια διαφανής μεμβράνη, που φέρει το χαρακτηριστικό. Η ενεργοποίηση της ετικέτας πραγματοποιείται μόλις η ετικέτα, που φέρει το χαρακτηριστικό, τοποθετηθεί στην επιφάνεια του λεπτού στρώματος αλουμινίου. Κατά την πρώτη φάση μετά την ενεργοποίηση, το στρώμα του αλουμινίου γίνεται λεπτότερο με ρυθμό, που εξαρτάται από το χρόνο και τη θερμοκρασία, διατηρώντας ωστόσο την αρχική του όψη (η οποία μοιάζει με καθρέφτη), εικόνα 1.14 (1). Καθώς εξελίσσεται η διαδικασία, το ενεργό σημείο του δείκτη μετατρέπεται από μεταλλικό καθρέφτη σε μαύρο, εικόνα 1.14 (2). Προς το τέλος της ζωής του δείκτη, το ενεργό σημείο αποκτά σταδιακά το χρώμα, που βρίσκεται τυπωμένο στο πίσω μέρος του (κίτρινο), και στο τέλος της ζωής του αποκαλύπτεται το πλήρες χρώμα του φόντου, εικόνα 1.14 (3) (Freshpoint).



Εικόνα 1.14: Η εξέλιξη του δείκτη CoolVu από την ενεργοποίηση μέχρι τη λήξη του.

Μία διαφορετική προσέγγιση του ίδιου δείκτη, προκειμένου να καταστεί πιο εύκολα ορατή η χρονο-θερμοκρασιακή εξέλιξη, είναι η εκτύπωση της ετικέτας με τέτοιο τρόπο ώστε το δραστικό κέντρο να χωρίζεται σε τρεις τομείς, ο καθένας από τους οποίους μεταβάλλεται ("εξαφανίζεται") με διαφορετικό ρυθμό (εικόνα 1.15) (Freshpoint).



Εικόνα 1.15: Η εξέλιξη του δείκτη CoolVu χωρισμένου σε τρεις τομείς.

a) μόλις ενεργοποιηθεί ο δείκτης, b) αρχή μέσης ζωής δείκτη, c) τέλος μέσης ζωής δείκτη, d) τέλος ζωής δείκτης

1.3.5.6 Μικροβιακοί Δείκτες

Η γαλλική εταιρία Cryolog έχει αναπτύξει δύο εμπορικούς τύπους βιολογικών δεικτών, τους (eO)[®] και Traceo[®] (CRYOLOG, Gentilly, France). Οι εν λόγω δείκτες βασίζονται στη μεταβολή του χρώματος, λόγω της μεταβολής του pH ως συνέπεια της ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών μικροοργανισμών.

Ο δείκτης (eO)[®] βασίζεται σε μια χρονο-θερμοκρασιακά εξαρτώμενη αλλαγή του pH, η οποία εκφράζεται σαν αλλαγή του χρώματος μέσω των κατάλληλων δεικτών pH. Η αλλαγή του pH είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης οξυγαλακτικών βακτηρίων, που περιέχονται στο gel του ΤΠΙ. Συγκεκριμένα, στο δείκτη (eO)[®] εικονίζεται ένα "λουλούδι", το οποίο αλλάζει χρώμα από πράσινο σε κόκκινο, όταν το τρόφιμο φθάσει σε επίπεδο αλλοίωσης, που το καθιστά ακατάλληλο για κατανάλωση. Ο εν λόγω δείκτης έχει

σχεδιαστεί, για να συνοδεύει τα πακέτα λιανικής πώλησης κάποιου τύπου σάντουιτς, ενώ οι παράμετροι του ΤΤΙ μπορούν να προσαρμοστούν για επιλεγμένους μικροοργανισμούς με τις κατάλληλες μεταβολές στη σύνθεση του gel του ΤΤΙ (Ταουκίς, 2010, Ellouze et al., 2008). Ο δείκτης (eO)[®] της Cryolog έχει βρει εφαρμογή σε διάφορα προϊόντα, όπως σε συσκευασμένα φρέσκα προϊόντα χοιρινού από την εταιρία Monoprix ή σε έτοιμα συσκευασμένα σάντουιτς των εταιρειών Auchan, Coran και Elior (Ταουκίς, 2010). Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για την αξιολόγηση του εν λόγω δείκτη ως δείκτη ασφάλειας σε προϊόντα με βάση το κρέας για την ανάπτυξη σε αυτά παθογόνων (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes*) (Ellouze and Augustin, 2010).



Εικόνα 1.16: Ο δείκτης (eO)[®] της Cryolog και εφαρμογή του σε διάφορα προϊόντα.

Ο δείκτης Traceo[®] στην ουσία είναι μια μπλε ετικέτα, η οποία είναι προσκολλημένη στο πακέτο του προϊόντος. Στην εν λόγω ετικέτα βρίσκεται "παγιδευμένο" ένα μίγμα στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η ετικέτα τοποθετείται πάνω στο γραμμωτό κώδικα (barcode) του υπό ψύξη προϊόντος και ανάλογα με το προφίλ θερμοκρασίας-χρόνου, στο οποίο υποβάλλεται η συσκευασία, ο δείκτης ανταποκρίνεται με μια διπλή απόκριση: το χρώμα του δείκτη αλλάζει από μπλε σε ροζ και ταυτόχρονα πραγματοποιείται μια αντίδραση, κατά την οποία ο διαφανής barcode μετατρέπεται σε αδιαφανή. Τότε το προϊόν δε θεωρείται πλέον κατάλληλο για κατανάλωση, λόγω των χρονο-θερμοκρασιακών κακομεταχειρίσεων, που έχει υποστεί, ή επειδή έχει φθάσει στην ημερομηνία λήξης του. Η αντίδραση, που μετατρέπει την ετικέτα από διαφανή σε αδιαφανή, εμποδίζει τη σωστή ανάγνωση του γραμμωτού κώδικα, έτσι ώστε το προϊόν να απορρίπτεται από το σαρωτή κατά το check out, επιτρέποντας αυτοματοποιημένη και συστηματική ανίχνευση των αλλοιωμένων τροφίμων στη λιανική αγορά, ενώ η ορατή αλλαγή χρώματος από μπλε σε ροζ

προειδοποιεί τον καταναλωτή ότι το προϊόν δεν είναι κατάλληλο προς κατανάλωση. Οι δύο μεταβολές εξαρτώνται από την οξίνιση του μέσου ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις εκάστοτε συνθήκες συντήρησης (Ellouze et al., 2008).



Εικόνα 1.17: Ο δείκτης Traceo® της εταιρίας Cryolog.

Πριν από τη χρήση, οι ΤΠΙ της Cryolog αποθηκεύονται στην κατάψυξη (-18 °C), προκειμένου να αποφευχθεί η βακτηριακή ανάπτυξη. Η ενεργοποίησή τους λαμβάνει χώρα με την απόψυξή τους για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Μια παραπλήσια ιδέα για την ανάπτυξη ενός μικροβιακού χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη είχαν και στη Γεωπονική Σχολή του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Vaikousi et al. (2008), στόχος ήταν η ανάπτυξη ενός μικροβιακού ΤΠΙ, το οποίο στηρίζεται στη μεταβολική δραστηριότητα ενός οξυγαλακτικού βακτηρίου, του *Lactobacillus sakei*, που, κατά την ανάπτυξή του, παράγει γαλακτικό οξύ και προκαλεί την πτώση του pH του μέσου ανάπτυξης. Η πτώση του pH μεταφράζεται σε αλλαγή του χρώματος ενός χημικού δείκτη, που επίσης έχει προστεθεί στο σύστημα, από κόκκινο σε κίτρινο.

Ένα μικροβιακό ΤΠΙ, το οποίο βασίζεται στη μικροβιακή ανάπτυξη και το μεταβολισμό, υπερτερεί σε σχέση με τους δείκτες που στηρίζουν τη λειτουργία τους σε αντιδράσεις διάχυσης, πολυμερισμού, χημικές ή ενζυμικές μεταβολές, καθώς αντανακλά άμεσα την ανάπτυξη και το μεταβολισμό του μικροβιακού πληθυσμού του τροφίμου (Vaikousi et al., 2008).

Οι McMeekin και Ross (1996) ήταν οι πρώτοι που εστίασαν στη δυναμική ανάπτυξης βιολογικών δεικτών, ονομάζοντάς τους "bioindicators", ενώ αναφέρουν πως στις μελέτες εκτίμησης της διάρκειας ζωής των τροφίμων, ο μικροοργανισμός, που θα συμμετέχει στο βιολογικό δείκτη θα πρέπει να παρουσιάζει τα ίδια θερμοκρασιακά χαρακτηριστικά με τον ειδικό αλλοιογόνο οργανισμό του τροφίμου.

1.3.6 Περιορισμοί στη χρήση και την εφαρμογή των χρονο - θερμοκρασιακών δεικτών

Οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες παρά τις δυνατότητες που προσφέρουν, να συμβάλουν ουσιαστικά στη βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων με τον έλεγχο της πιθανής θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης, προστατεύοντας τόσο τον καταναλωτή, όσο και τους παραγωγούς, δεν έχουν την προσδοκώμενη απήχηση, με τη χρήση τους να είναι αρκετά περιορισμένη. Οι κύριες αιτίες, που οδήγησαν στην επιφυλακτικότητα των παραγωγών να υιοθετήσουν τη χρήση των ΤΠΙ είναι το κόστος, η αξιοπιστία και η δυνατότητα εφαρμογής τους.

Το κόστος εξαρτάται από το ΤΠΙ και κυμαίνεται μεταξύ 0.02 και 0.20\$ ανά μονάδα (Ταουκίς, 2010). Δεδομένης της οικονομίας κλίμακας, η ανάλυση κόστους-οφέλους φαίνεται να ευνοεί την ευρύτερη χρήση των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (Kerry et al., 2006).

Η αμφισβήτηση της αξιοπιστίας των δεικτών οφείλεται σε ένα βαθμό στους υπερβολικούς ισχυρισμούς των κατασκευαστών των πρώτων μοντέλων και στην έλλειψη επαρκών δεδομένων, τόσο από τις διάφορες μελέτες, όσο και από τους προμηθευτές. Συζητήσεις των ρυθμιστικών αρχών σχετικά με την υποχρεωτική χρήση των ΤΠΙ, προτού κατανοηθούν πλήρως οι έννοιες γύρω από την ανάπτυξή τους και αποδειχθεί η αξιοπιστία τους, οδήγησε στην αρνητική στάση των βιομηχανιών για την υιοθέτησή τους, βλέποντας ουσιαστικά την εφαρμογή τους (Ταουκίς, 2010, Ταουκίς and Labuza, 2003).

Το πιο σημαντικό εμπόδιο στη χρήση των ΤΠΙ αποτελεί η δυνατότητα της εφαρμογής τους. Οι αρχικές μελέτες δεν ήταν αποτελεσματικές στην καθιέρωση μιας σαφούς μεθοδολογίας συσχετισμού της απόκρισης του ΤΠΙ με την εκτίμηση της ποιότητας του τροφίμου. Η αρχική υπόθεση αφορούσε την εύρεση μιας γενικευμένης σχέσης μεταξύ θερμοκρασίας και ποιότητας μιας γενικής κατηγορίας τροφίμων, όπως κατεψυγμένα τρόφιμα, στοχεύοντας σ' ένα δείκτη, η απόκριση του οποίου να είχε παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση. Μια τέτοια γενίκευση, ωστόσο, αποδείχτηκε ανεπαρκής, αφού τρόφιμα παρόμοιου τύπου διαφέρουν σημαντικά σε ό,τι αφορά τη θερμοκρασιακή εξάρτηση της ποιοτικής τους υποβάθμισης (Ταουκίς and Labuza, 2003).

Εκτός από τα παραπάνω τεχνικά και οικονομικά ζητήματα, μια πιθανή αιτία της μικρής εμπορικής χρήσης των δεικτών θα μπορούσε να αποτελεί η απροθυμία των καταναλωτών στην παρουσία του δείκτη στα τρόφιμα, που αγοράζουν, κυρίως λόγω της έλλειψης ενημέρωσής τους σχετικά με την εφαρμογή των δεικτών και των οφελών, που προσφέρουν. Σύμφωνα με έρευνα (project QLK1-CT2002-02545, 2003-2006) στην οποία έλαβαν μέρος 800 καταναλωτές από τέσσερις διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες, ανάμεσά

τους και η Ελλάδα, παρατηρείται μια θετική στάση στη χρήση των ΤΠΙ, με το 80 % των καταναλωτών να θεωρεί την απόκριση του ΤΠΙ περισσότερο αξιόπιστη από ό,τι μόνη της η ημερομηνία λήξης του τροφίμου (Ταουκίς, 2010). Επιπλέον, σύμφωνα με μία ακόμα Ευρωπαϊκή έρευνα, στην οποία έλαβαν μέρος 2525 καταναλωτές, οι Γάλλοι, οι Έλληνες και οι Γερμανοί συμμετέχοντες θεωρούν ότι η χρήση των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών θα αυξήσει την ασφάλεια των τροφίμων, ωστόσο υπάρχουν κάποιες ανησυχίες για πιθανή αύξηση της σπατάλης των τροφίμων, καθώς και για αύξηση στις τιμές τους (Pennanen et al., 2015).

1.3.7 Αρχές κινητικής απόκρισης των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών

Ένα σύστημα βασιζόμενο σε ΤΠΙ παρέχει δεδομένα και πληροφορίες για το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου, επιτρέποντας τον καθορισμό της ποιότητάς του σε οποιοδήποτε στάδιο της ψυκτικής αλυσίδας, μέσω μιας εύκολα μετρήσιμης, εξαρτώμενης από το χρόνο και τη θερμοκρασία μεταβολής. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματική εφαρμογή των ΤΠΙ είναι η συστηματική κινητική μοντελοποίηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Παρόμοια κινητική μελέτη πρέπει να γίνει και για την απόκριση του δείκτη.

Η κινητική προσέγγιση της ποιοτικής υποβάθμισης ενός τροφίμου (η οποία αναλύθηκε στην ενότητα 1.1.2) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μοντελοποίηση της μετρούμενης αλλαγής στην απόκριση του ΤΠΙ.

Έστω ότι X η μετρήσιμη απόκριση του ΤΠΙ, τότε η συνάρτηση απόκρισης $F(X)$ μπορεί να οριστεί ως εξής:

$$F(X) = k_I t \quad \text{εξίσωση 1.13}$$

Αν η θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού μεταβολής της απόκρισης, k_I , ακολουθεί την κινητική Arrhenius, τότε η συνάρτηση απόκρισης γίνεται (Ταουκίς, 2001):

$$F(X) = k_I t = k_{I_{ref}} \exp \left[\frac{-E_{aI}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] \cdot t \quad \text{εξίσωση 1.14}$$

Όπου:

- $k_{I_{ref}}$: η σταθερά του ρυθμού μεταβολής της απόκρισης στη θερμοκρασία αναφοράς, T_{ref}
- E_{aI} : η ενέργεια ενεργοποίησης της απόκρισης

Για την περιγραφή της απόκρισης του ΤΠΙ για ένα μεταβλητό χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ μπορεί να χρησιμοποιηθεί η έννοια της δραστικής θερμοκρασίας και οι αντίστοιχες εξισώσεις, όπως και στην ποιοτική υποβάθμιση ενός τροφίμου σε μεταβαλλόμενες συνθήκες (κεφάλαιο 1.2.2).

Συνεπώς, για ένα ΤΠΙ, που εκτίθεται στο ίδιο θερμοκρασιακό προφίλ, $T(t)$, στο οποίο εκτίθεται το τρόφιμο, η συνάρτηση απόκρισης του μπορεί να εκφραστεί από τις εξισώσεις 1.15 και 1.16, που ακολουθούν.

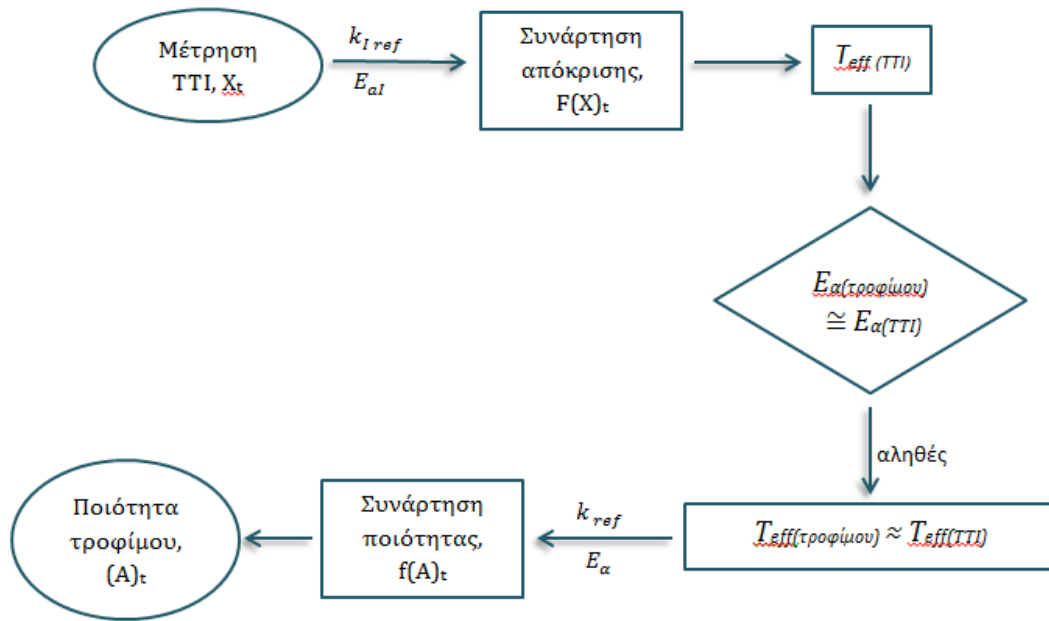
$$F(X)_t = \int_0^t k_I(T(t))dt = k_{Iref} \int_0^t \exp \left[\frac{-E_{aI}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T(t)} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] dt \quad \text{εξίσωση 1.15}$$

$$F(X)_t = k_I t = k_{Iref} \exp \left[\frac{-E_{aI}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_{eff}(TPI)} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right] t \quad \text{εξίσωση 1.16}$$

Βασιζόμενοι στις κινητικές εξισώσεις, που περιγράφουν την ποιοτική υποβάθμιση των τροφίμων και την απόκριση του ΤΠΙ, για το ίδιο χρονο-θερμοκρασιακό προφίλ, οι Ταουκίς και Labuza (1989) ανέπτυξαν ένα σχεδιάγραμμα εφαρμογής των ΤΠΙ, το οποίο επιτρέπει την εκτίμηση της τιμής του παράγοντα ποιότητας A , οποιαδήποτε χρονική στιγμή, μέσω της μετρούμενης αλλαγής της απόκρισης του ΤΠΙ την ίδια χρονική στιγμή.

Το σχεδιάγραμμα βασίζεται στη γνώση των κινητικών χαρακτηριστικών της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου ($f(A)$, k_A , E_a) και των κινητικών χαρακτηριστικών απόκρισης του ΤΠΙ ($F(X)$, k_I , E_{aI}).

Σύμφωνα με το σχήμα εφαρμογής των ΤΠΙ, το οποίο παρουσιάζεται στο σχήμα 1.3, από τη μετρούμενη τιμή X του ΤΠΙ τη χρονική στιγμή t μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της συνάρτησης απόκρισης και επιλύοντας την εξίσωση 2.16 γίνεται εκτίμηση της δραστικής θερμοκρασίας, T_{eff} , η οποία περιγράφει την κατανομή της θερμοκρασίας. Εάν το ΤΠΙ και η αντίδραση υποβάθμισης της ποιότητας του τροφίμου έχουν παρόμοια θερμοκρασιακή ευαισθησία, η οποία αντιστοιχεί σε διαφορά των δύο ενεργειών ενεργοποίησης μικρότερη των 25 kJ/mol, τότε η ίδια δραστική θερμοκρασία του ΤΠΙ, $T_{eff(TPI)}$ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το προϊόν. Γνωρίζοντας την T_{eff} , καθώς και τις παραμέτρους της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου, υπολογίζεται η συνάρτηση ποιότητάς του από την εξίσωση 1.12 και με βάση την τιμή της συνάρτησης ποιότητας του τροφίμου υπολογίζεται η τιμή του δείκτη ποιότητας A_t . Ο δείκτης ποιότητας υποδεικνύει το βαθμό της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου και επιπλέον επιτρέπει την εκτίμηση της εναπομένουσας διάρκειας ζωής του σε οποιαδήποτε μέση θερμοκρασία (Ταουκίς, 2001, Ταουκίς and Labuza, 1989).



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της συστηματικής προσέγγισης για την εφαρμογή των ΤΤΙ ως δείκτες ποιότητας.

Πηγή: Ταoukis, 2001.

Τα μοντέλα της διάρκειας ζωής των τροφίμων πρέπει να κατασκευάζονται με την κατάλληλη επιλογή και μέτρηση αποτελεσματικών δεικτών ποιότητας και να βασίζονται σε έναν πειραματικό σχεδιασμό σε ισόθερμες συνθήκες, οι οποίες να καλύπτουν το χρονοθερμοκρασιακό εύρος, που ενδιαφέρει ανάλογα το τρόφιμο. Η δυνατότητα εφαρμογής των μοντέλων θα πρέπει να επικυρώνεται σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες αντιπροσωπευτικές των πραγματικών συνθηκών, που επικρατούν στην αλυσίδα διανομής. Παρόμοια κινητικά μοντέλα πρέπει να αναπτυχθούν και να επικυρωθούν και για την απόκριση του ΤΤΙ. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο ΤΤΙ θα πρέπει να έχει έναν ρυθμό απόκρισης, η θερμοκρασιακή εξάρτηση του οποίου, δηλαδή η ενέργεια ενεργοποίησής του, E_a , να είναι στο εύρος της E_a του ρυθμού υποβάθμισης της ποιότητας του τροφίμου. Μια διαφορά στις E_a μικρότερη των 25 kJ/mol, μεταφράζεται σε ένα μικρότερο σφάλμα (<1 °C), στη διαφορά της δραστικής θερμοκρασίας του τροφίμου και του ΤΤΙ, το οποίο, με τη σειρά του, θα έχει ως αποτέλεσμα μια αποδεκτή εκτίμηση της ποιότητας (σφάλμα μικρότερο από 10 – 15 %). Ο συνολικός χρόνος απόκρισης του ΤΤΙ πρέπει να είναι τουλάχιστον όσο η διάρκεια ζωής του τροφίμου σε μια επιλεγμένη θερμοκρασία αναφοράς (Ταoukis, 2010).

1.3.8 Εφαρμογή Χρονο-θερμοκρασιακών Δεικτών

Οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της θερμοκρασιακής έκθεσης των τροφίμων από τη στιγμή της παραγωγής τους, κατά τη διανομή και μέχρι να φτάσουν στον καταναλωτή.

Οι ΤΤΙ, όταν συνοδεύουν ξεχωριστές παλέτες, μπορούν να δώσουν ένα μέτρο των προηγούμενων θερμοκρασιακών συνθηκών σε επιλεγμένα σημεία ελέγχου. Οι πληροφορίες των ΤΤΙ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συνεχή, ολοκληρωμένη παρακολούθηση του συστήματος διανομής, οδηγώντας στην αναγνώριση και τη διόρθωση των αδύναμων κρίκων της αλυσίδας. Επιπλέον, οι δείκτες χρησιμεύουν ως απόδειξη της τήρησης των συμβατικών απαιτήσεων των παραγωγών και διανομέων, εξαλείφοντας έτσι την πιθανότητα αβάσιμων ισχυρισμών για απόρριψη προϊόντων από τους λιανοπωλητές. Η ίδια η παρουσία του ΤΤΙ πιθανόν έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των χειρισμών, χρησιμεύοντας ως κίνητρο και υπενθύμιση για τους εργαζόμενους, σε όλη την αλυσίδα διανομής, της σημασίας του σωστού ελέγχου των θερμοκρασιακών συνθηκών.

Οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες, όταν συνοδεύουν μεμονωμένα προϊόντα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες του τέλος της διάρκειας ζωής των προϊόντων, απευθυνόμενοι στους καταναλωτές. Ωστόσο, για μια επιτυχή εφαρμογή αυτού του είδους υπάρχει μια πολύ αυστηρότερη απαίτηση σχετικά με την ταύτιση της απόκρισης του ΤΤΙ και της συμπεριφοράς του τροφίμου. Το τελικό σημείο του ΤΤΙ θα πρέπει να συμπίπτει με το τέλος της διάρκειας ζωής του τροφίμου σε μια θερμοκρασία αναφοράς και η ενέργεια ενεργοποίησης της απόκρισης του δείκτη και της αντίδρασης της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου πρέπει να διαφέρουν λιγότερο από 10 kJ/mol. Με αυτό τον τρόπο ο ΤΤΙ μπορεί να χρησιμεύσει ως μια "ζωντανή σήμανση", η οποία θα λειτουργεί επικουρικά στην ημερομηνία λήξης του τροφίμου επισημαίνοντας τις περιπτώσεις αυξημένης ποιοτικής υποβάθμισης λόγω ενδεχόμενης ανεπάρκειας της ψυκτικής αλυσίδας ή περιστασιακής κακομεταχείρισης του προϊόντος και υποδεικνύοντας την εναπομείνασα διάρκεια ζωής του τροφίμου (Ταουκίς, 2010, Ταούκης, 2010, Ταουκίς and Labuza, 2003).

Οι χρονο-θερμοκρασιακοί δείκτες δύναται να έχουν ένα καλύτερο μέλλον και ευρύτερη εφαρμογή ως εργαλεία για τον έλεγχο της διακίνησης των προϊόντων, όταν το σύνολο των δυνατοτήτων, που παρέχουν, καθώς και οι περιορισμοί τους, γίνουν απόλυτα αντιληπτοί από τη βιομηχανία τροφίμων. Η πρόοδος στην ποικιλία, την αξιοπιστία και την ευελιξία των δεικτών, καθώς και στον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής των τροφίμων, θα επιτρέψει την επιτυχή εφαρμογή των εργαλείων αριστοποίησης των ψυκτικής αλυσίδας, όπως είναι το σύστημα LSFO (Least Shelf-life First Out) και το σύστημα λήψης αποφάσεων

SLDS (Shelf Life Decision System). Επιπλέον, η τεχνολογία ανάπτυξης των ΤΠΙ, στοχευμένη στην ποσοτική ανάλυση της επικινδυνότητας (risk assessment) των τροφίμων, θα επιτρέψει τη μελέτη και την ανάπτυξη ενός συστήματος διαχείρισης, βασιζόμενο στους ΤΠΙ, το οποίο θα βεβαιώνει την ποιότητα και την ασφάλεια της ψυκτικής αλυσίδας, όπως συμβαίνει με το σύστημα SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) (Taoukis and Labuza, 2003, Taoukis, 2001). Το σύστημα αυτό θα μπορούσε να αντικαταστήσει το "FIFO" (First In First Out) και να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση της διακίνησης των προϊόντων, όσον αφορά την ασφάλεια και την ποιότητά τους. Με το SMAS αξιολογούνται τα προϊόντα χρησιμοποιώντας ως κριτήριο την απόκριση των συνειμμένων σε αυτά δεικτών και δίνεται προτεραιότητα σε αυτά με το μεγαλύτερο βαθμό αλλοίωσης (μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο), ο οποίος βέβαια εξακολουθεί να βρίσκεται σε αποδεκτά επίπεδα (Taoukis, 2010).

1.4 ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Janthinobacterium*

Απόκριση των χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών μπορεί να αποτελέσει η μεταβολή ή εμφάνιση χρώματος. Στα μικροβιακά ΤΠΙ, η μεταβολή αυτή μπορεί να επέλθει ως συνέπεια του μεταβολισμού τους. Για παράδειγμα, ορισμένοι μικροοργανισμοί κατά την ανάπτυξή τους παράγουν μεταβολικά προϊόντα, τα οποία προκαλούν μεταβολή του pH του υποστρώματος στο οποίο αναπτύσσονται. Η μεταβολή αυτή μπορεί να "μεταφραστεί" σε αλλαγή χρώματος με τη βοήθεια ενός χημικού δείκτη. Ένας ακόμη τρόπος μεταβολής του χρώματος, θα μπορούσε να στηριχτεί στην ιδιότητα ορισμένων μικροοργανισμών να παράγουν χρωστικές ουσίες. Βακτήρια του γένους *Janthinobacterium* αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα χρωμογόνων μικροοργανισμών.

Το γένος *Janthinobacterium* δεν είναι ευρέως γνωστό και δεν έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα, παρά μόνο τα τελευταία χρόνια. Ανήκει στην οικογένεια *Oxalobacteriaceae* της τάξης των *Betaproteobacteria* και απαρτίζεται από δύο είδη, το *J. lividum* (Eisenberg, 1891) και το *J. agaricidamnosum* (Lincoln et al., 1999), ενώ στην μελέτη των Avgustin et al. (2013) γίνεται λόγος για ένα νέο στέλεχος, το *Janthinobacterium svalbardensis* (JA-1 στέλεχος). Βακτήρια του γένους *Janthinobacterium*, απαντώνται στο έδαφος και σε νερά ποταμών, λιμνών και πηγών σε θερμά και ψυχρά κλίματα. Επίσης, έχουν απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα, όπως μεταποιημένα πουλερικά (Cox, 1975), διάφορα λαχανικά (Koburger and May, 1982) και ιαπωνικά νουντλς (Naito et al., 1986) και σύμφωνα με τους Eneroth et al. (2000) φαίνεται ότι το *J. lividum* έχει εμπλακεί σε αλλοίωση παστεριωμένου γάλακτος.

Η βασική περιγραφή του γένους έγινε από τον Sneath (1984). Πρόκειται για αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια, θετικά στην καταλάση και στην οξειδάση. Παρουσιάζουν κινητικότητα μέσω ενός κυρίου ή τεσσάρων πλευρικών μαστιγίων και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πρόκειται για αυστηρά αερόβια βακτήρια, ωστόσο οι Hornung et al. (2013) με προσεκτική ανάλυση του γονιδιώματος παρατήρησαν πως μπορούν να αναπτυχθούν και κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Τα βακτήρια του γένους *Janthinobacterium* είναι ετερότροφα και πολλαπλασιάζονται γρήγορα σε μέσο που περιέχει κιτρικό και αμμωνία ως αποκλειστική πηγή άνθρακα και αζώτου αντίστοιχα. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι οι 25 °C, η μέγιστη οι 32 °C και η ελάχιστη οι 2 °C, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ψυχρότροφα βακτήρια. Το βέλτιστο pH κυμαίνεται μεταξύ του 7.0 και 8.0, ενώ δεν παρατηρείται ανάπτυξη σε pH μικρότερο του 5.0 (Valdes et al., 2015, Gillis and De Ley, 2006, Pantanella et al., 2006, Garrity et al., 2005).

Σύμφωνα με τους Rossolini et al. (2001) το *J. lividum* παράγει μεταλλο-β'-λακταμάσες, οι οποίες προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά β-λακτάμης.

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του γένους *Janthinobacterium* και συγκεκριμένα του στελέχους *Janthinobacterium lividum* είναι η ιώδης χρωστική ουσία, που παράγει, η οποία καλείται **βιολασεΐνη (violacein)**. Μάλιστα το όνομά "*Janthinobacterium*" προέρχεται από τη λατινική λέξη "janthinus", που σημαίνει ιώδης. Οι αποικίες, που σχηματίζει το στέλεχος αυτό, σε στερεά θρεπτικά μέσα, έχουν ένα μωβ - μπλε χρώμα, λόγω της βιολασεΐνης, ενώ σε υγρά θρεπτικά μέσα σχηματίζεται ένα ιώδες δαχτυλίδι στη διεπιφάνεια μεταξύ υγρού και αέρα (Valdes et al., 2015).

Η βιολασεΐνη παράγεται από στελέχη διάφορων γενών συμπεριλαμβανομένων των *Janthinobacterium*, *Chromobacterium* (*Chromobacterium violaceum*), *Collimonas*, *Duganella*, *Microbulbifer* sp. και *Pseudoalteromonas* (Choi et al., 2014). Πρόκειται για μια δις-ινδόλη, η οποία σχηματίζεται με τη συμπύκνωση δύο μορίων L-τρυπτοφάνης (Wang et al., 2012) και η βιοσύνθεση της κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο, που αποτελείται από τα γονίδια vioD, vioB, vioC και vioA (Sanchez et al., 2006, Antonio et al., 2004). Η έκφραση της βιολασεΐνης ρυθμίζεται από την πηγή άνθρακα και μάλιστα ευνοείται από την παρουσία γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο, καθώς και από χαμηλές θερμοκρασίες. Η παραγωγή της παρατηρείται κυρίως στο τέλος της εκθετικής και στην αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Η βιολασεΐνη είναι αδιάλυτη στο νερό και διαλυτή σε αλκοόλες, όπως μεθανόλη, αιθανόλη και ακετόνη και η μέγιστη απορρόφησή της σε διάλυμα μεθανόλης είναι στα 585nm (Pantanella et al., 2006).

Η βιολασεΐνη αποτελεί ένα δευτερογενή μεταβολίτη και επομένως δεν εξυπηρετεί βασικές ανάγκες στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό του μικροοργανισμού, όμως παρουσιάζει άλλες δράσεις, οι οποίες βοηθούν το μικροοργανισμό, που την παράγει, να επιβιώσει. Πολλές από αυτές τις δράσεις φαίνεται να έχουν κινήσει την περιέργεια των ερευνητών, καθώς παρουσιάζουν ιδιαίτερο ιατρικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Η βιολασεΐνη φαίνεται να έχει αντιβακτηριακή δράση, ιδιαίτερα στα Gram-θετικά στελέχη. Δύο έρευνες (Choi et al., 2006) έδειξαν ότι εκχύλισμα βιολασεΐνης σε συγκεντρώσεις μεταξύ 5.7 και 15 mg/L είναι ικανό να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*. Η βιολογική της δράση δεν περιορίζεται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς έχει και αρνητική επίδραση σε πρωτόζωα και μετάζωα. Επιπλέον, παρουσιάζει αντική, αντιλεισμμανιακή και αντιμυκητιακή δράση, καθώς και κυττοτοξική δραστηριότητα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα (και συγκεκριμένα σε λεμφοκύτταρα) καθιστώντας την πιθανή θεραπεία για τον καρκίνο. (Choi et al., 2014, Duran et al., 2007, Pantanella et al., 2006, Ferreira et al., 2004, Leon et al., 2001).

2 ΣΤΟΧΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη ενός μικροβιακού χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη, ο οποίος στηρίζεται στην αύξηση και μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp., και συγκεκριμένα στην παραγωγή και εμφάνιση της χρωστικής ουσίας βιολασεΐνης. Η εμφάνιση του ιώδους χρώματος, που λαμβάνουν οι αποικίες κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, αποτέλεσε την απόκριση του δείκτη, καθώς πρόκειται για μια μη αντιστρεπτή, χρονο-θερμοκρασιακά εξαρτώμενη και εύκολα ορατή χρωματική ένδειξη.

Πιο συγκεκριμένα οι δύο βασικοί στόχοι της είναι:

✓ Η μελέτη της κινητικής του υπό ανάπτυξη μικροβιακού συστήματος - δείκτη, καθώς και η επίδραση των παραμέτρων του συστήματος τόσο στην ενέργεια ενεργοποίησής του, όσο και στο σημείο λήξης του.

✓ Η αξιολόγηση της δυνατότητας του μικροβιακού συστήματος - δείκτη να εκτιμήσει την πραγματική αλλοίωση ενός τροφίμου κατά την ταυτόχρονη συντήρησή τους σε ισόθερμες, καθώς και σε δυναμικές συνθήκες σε μια προσπάθεια να προσομοιωθούν οι πραγματικές θερμοκρασιακές συνθήκες, που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων.

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Κύριος στόχος της μελέτης για την ανάπτυξη ενός μικροβιακού χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη ήταν ο σχεδιασμός ενός συστήματος, το οποίο να μπορεί να προσομοιάζει ικανοποιητικά τη μικροβιακή αλλοίωση, που συμβαίνει στα προϊόντα τροφίμων, συντηρούμενα υπό ψύξη.

Για την επιτυχή εφαρμογή ενός ΤΠΙ πρέπει να ικανοποιούνται δύο απαραίτητες προϋποθέσεις (Ταουκίς, 2001):

i) η εξάρτηση του ρυθμού απόκρισης του συστήματος ΤΠΙ από τη θερμοκρασία θα πρέπει να προσεγγίζει την εξάρτηση από τη θερμοκρασία των δράσεων, που είναι υπεύθυνες για την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου, π.χ. ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η εξάρτηση αυτή αποτυπώνεται με την ενέργεια ενεργοποίησης (**Εα**).

$$\mathbf{Ea_{\text{ΤΠΙ}} = Ea_{\text{SSO τροφίμου}}}$$

ii) το σημείο λήξης του ΤΠΙ (**endpoint**) θα πρέπει να συμπίπτει με το τέλος της εμπορικής διάρκειας ζωής του τροφίμου σε μια θερμοκρασία αναφοράς.

$$\mathbf{\text{ΤΠΙ's Endpoint} \approx \text{Τέλος χρόνου ζωής τροφίμου}}$$

Ένας χρονο-θερμοκρασιακός δείκτης εκτός από αποτελεσματικός, πρέπει να είναι και ευέλικτος. Θα πρέπει να παρέχει τη δυνατότητα εύκολης ρύθμισης του σημείου λήξης του, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής του τροφίμου, η αλλοίωση του οποίου πρόκειται να προσομοιωθεί από το ΤΠΙ. Ο χρόνος ζωής των τροφίμων μπορεί να διαφοροποιείται σημαντικά, καθώς εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως είναι το αρχικό επίπεδο μόλυνσης από τον ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό (SSO). Επίσης, η ευελιξία ενός δείκτη έγκειται στο αν ο δείκτης μπορεί να προσομοιάζει διαφορετικά είδη τροφίμων. Η ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων τροφίμων μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικό ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό, ο οποίος πιθανόν να παρουσιάζει διαφορετική κινητική

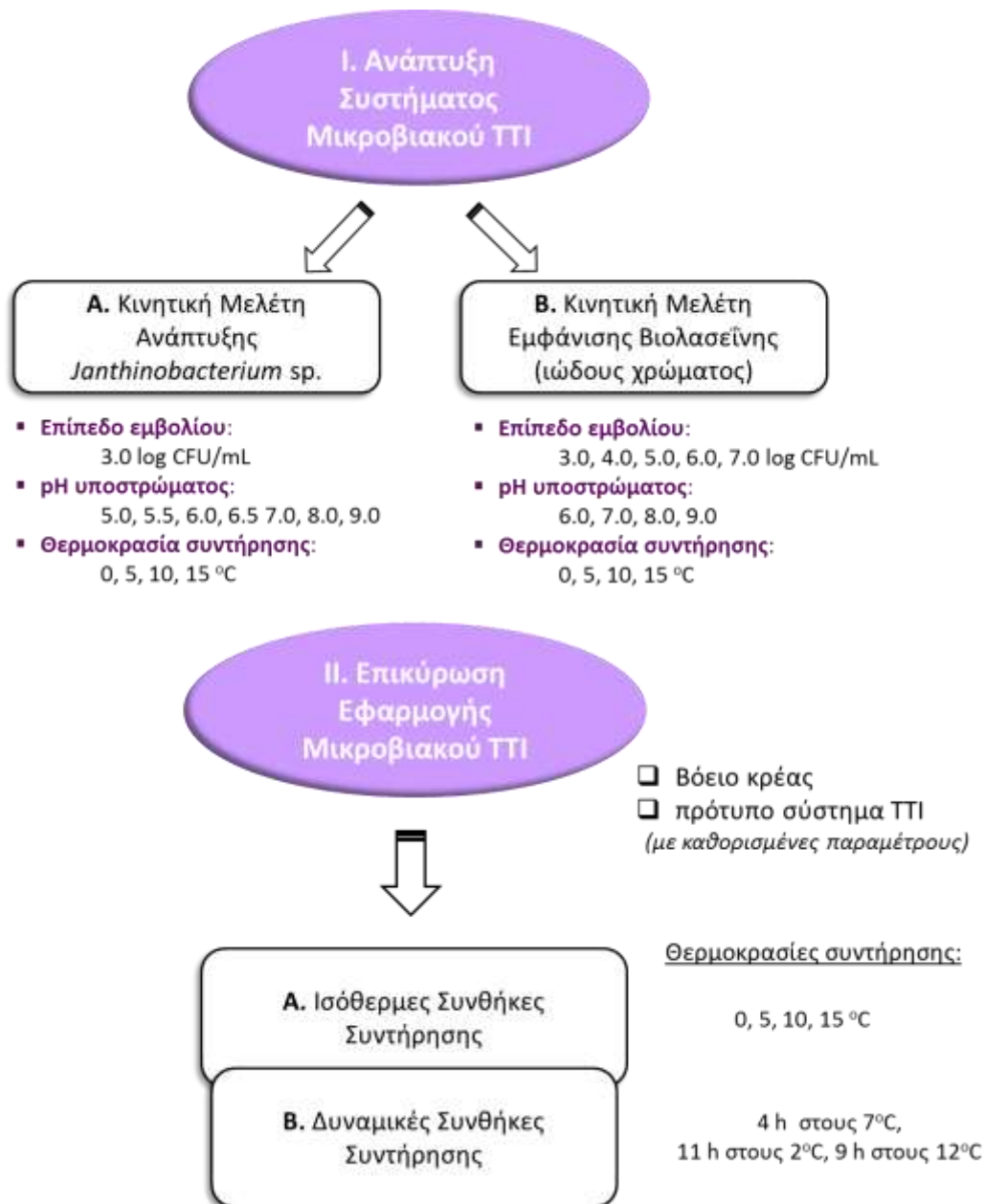
συμπεριφορά και επομένως άλλη ενέργεια ενεργοποίησης. Προκειμένου να εξεταστεί η ευελιξία του δείκτη, διερευνήθηκαν οι παράμετροι που αποτελούν το σύστημα του ΤΤΙ και συγκεκριμένα διαφορετική αρχική συγκέντρωση με την οποία ενοφθαλμίζεται ο μικροοργανισμός στο σύστημα και διαφορετικές τιμές pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Αρχικά μελετήθηκε η θερμοκρασιακή εξάρτηση της κινητικής του συστήματος ΤΤΙ, όσον αφορά την ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp., καθώς και την εμφάνιση της βιολασεΐνης (ιώδους χρώματος των αποικιών), σε ισόθερμες συνθήκες συντήρησης και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοντελοποίησή της. Συγχρόνως, διερευνήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού και της τιμής pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του στο σημείο λήξης του ΤΤΙ. Τέλος, αξιολογήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής πρότυπου συστήματος ΤΤΙ (με καθορισμένο αρχικό επίπεδο ενοφθαλμίσματος και pH θρεπτικού μέσου) σε βόειο κρέας κατά την παράλληλη συντήρηση των δύο συστημάτων σε ισόθερμες, καθώς και σε δυναμικές συνθήκες συντήρησης.

Ως σημείο λήξης του ΤΤΙ, και μέρος της ευελιξίας του υπό ανάπτυξη δείκτη, θεωρήθηκε ότι μπορεί να οριστεί είτε η χρονική στιγμή της εμφάνισης της πρώτης ιώδους αποικίας (**1% ιώδεις αποικίες**), είτε η χρονική στιγμή κατά την οποία όλες οι αποικίες του *Janthinobacterium* sp. έχουν αποκτήσει ιώδη χρωματισμό (**100% ιώδεις αποικίες**). Η παραγωγή της βιολασεΐνης, και συνεπώς η εμφάνιση του ιώδους χρώματος, δε συμβαίνει ταυτόχρονα από όλες τις αποικίες του *Janthinobacterium* sp., καθώς εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η έλλειψη θρεπτικών και η πληθυσμιακή πυκνότητα.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως στην περίπτωση των υψηλών επιπέδων ενοφθαλμίσματος, λόγω του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν ευδιάκριτες αποικίες στο τρυβλίο, η έννοια της πρώτης ιώδους αποικίας ουσιαστικά δεν υφίσταται, αλλά γίνεται λόγος για την εμφάνιση ιώδους απόχρωσης.

Στο σχήμα 3.1, που ακολουθεί, απεικονίζεται σχηματικά ο πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήθηκε.



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού για την ανάπτυξη ενός μικροβιακού χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη.

3.2 Ανάπτυξη Μικροβιακού Συστήματος ΤΤΙ

3.2.1 Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος

Ανανέωση καλλιιεργειών

Ο μικροοργανισμός *Janthinobacterium* sp., απομονώθηκε από κομμένη σαλάτα ρόκα. Συντηρούνταν (σε θερμοκρασία -20 °C) σε μίγμα Tryptic Soy Broth (TSB - LAB M, Lancashire, UK) και γλυκερόλης (80:20 v/v) (Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Ποσότητα 0.1 mL αιωρήματος μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL TSB κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 48h. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε γραμμική εξάπλωση (streaking) της ανανεωμένης καλλιέργειας του μικροοργανισμού σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar (TSA - LAB M, Lancashire, UK) και επώαση στους 25 °C για 48 h. Οι αποικίες εξετάστηκαν μακροσκοπικά (ξεχωρίζουν λόγω του ιώδους χρώματός τους), επιβεβαιώθηκε η καθαρότητα της καλλιέργειας, και στη συνέχεια επιλέχθηκαν μεμονωμένες αποικίες και μεταφέρθηκαν με μικροβιολογικό κρίκο σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10mL TSB (LAB M, Lancashire, UK) για ανανέωση του μικροοργανισμού, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η διαδικασία των δύο διαδοχικών ανανεώσεων γινόταν προκειμένου ο μικροοργανισμός να βρίσκεται στην καλύτερη δυνατή κατάσταση από πλευράς ζωτικότητας και να απαλειφθεί η καταπόνηση που δημιουργείται κατά την παραμονή του σε συνθήκες κατάψυξης. Οι ανανεωμένες καλλιέργειες των μικροβιακών κυττάρων έφεραν συγκέντρωση κυττάρων της τάξης των 10^8 CFU/mL – 10^9 CFU/mL.

Καθαρισμός Εμβολίου

Το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων μεταφέρθηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένα falcon και φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο θερμοκρασίας 4 °C με ταχύτητα 3600 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε, ενώ η προκύπτουσα βιομάζα (ίζημα) επανααιωρήθηκε σε 10 mL αποστειρωμένου διαλύματος 1/4 Ringer (LAB M, Lancashire, UK). Ακολούθησαν δύο ακόμα φυγοκεντρήσεις και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Το τελευταίο αιώρημα των κυττάρων αποτέλεσε το αρχικό διάλυμα ενοφθαλμισμού

3.2.2 Προετοιμασία μικροβιολογικών υποστρωμάτων

Το υπόστρωμα, που μελετήθηκε ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. στο υπό ανάπτυξη μικροβιακό ΤΤΙ, ήταν TSA (LAB M, Lancashire, UK) με 1 % (w/v) γλυκερόλη. Εξετάστηκαν διαφορετικές τιμές pH του υποστρώματος, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, καθώς και στην παραγωγή (και εμφάνιση) βιολασεΐνης. Τα θρεπτικά μέσα αποστειρώθηκαν στους 121°C για 15 min, αφού πρώτα ρυθμίστηκε το pH τους στις τιμές 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 και 9.0 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας είτε HCl (6 N) είτε NaOH (5 N). Τα τρυβλία, που παρασκευάστηκαν, περιείχαν ποσότητα 12 mL θρεπτικού μέσου έκαστο.

3.2.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Κατά την έναρξη κάθε πειραματικής δοκιμής 0.1 mL από την κατάλληλη αραιώση του αιωρήματος του εμβολίου ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία TSA (LAB M, Lancashire, UK) με προσθήκη 1 % (w/v) γλυκερόλης και διαφορετική τιμή pH. Τα τρυβλία επωάστηκαν ισοθερμικά στους 0, 5, 10 και 15 °C σε επωαστικούς κλιβάνους υψηλής ακρίβειας (SANYO MIR-153, Japan).

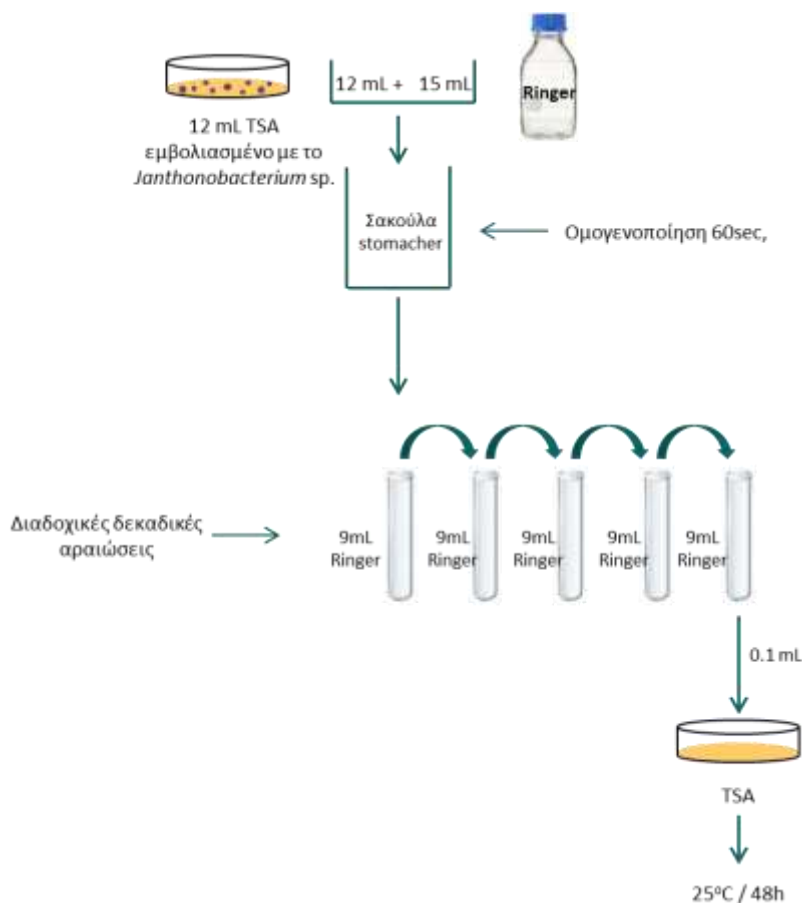
Όσον αφορά την κινητική μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp., το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμίσματος ήταν 10³ CFU/mL. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβανόταν δείγματα προκειμένου να περιγραφεί η κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στις διαφορετικές συνθήκες (pH και θερμοκρασία). Κάθε πειραματική δοκιμή διεξήχθη με δύο δείγματα, ενώ έγιναν δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις.

Σχετικά με την κινητική μελέτη της εμφάνισης της βιολασεΐνης (ιώδους χρώματος των αποικιών) μελετήθηκαν διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του *Janthinobacterium* sp. και συγκεκριμένα εξετάστηκαν οι περιπτώσεις των 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 και 7.0 log CFU/mL. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβανόταν φωτογραφίες των τρυβλίων, προκειμένου να γίνει περεταίρω μελέτη και ανάλυση με πρόγραμμα επεξεργασίας φωτογραφιών (Image Analysis). Κάθε πειραματική δοκιμή διεξήχθη με τρία δείγματα.

3.2.4 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, δείγματα ενοφθαλισμένου θρεπτικού υποστρώματος μεταφέρονταν ασηπτικά σε στείρες σακούλες stomacher, ακολουθούσε προσθήκη 15 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (ποσότητα κατάλληλη για την ομογενοποίηση, σύμφωνα με Zilelidou et al., 2016) και στη συνέχεια ομογενοποίησή τους με συσκευή stomacher (Lab blender 400, Seward Medical, London) για 60 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων με μεταφορά 1 mL δείγματος της προηγούμενης αραιώσης σε 9 mL διαλύματος Ringer. Έγινε επίστρωση ποσότητας 0.1 mL από την κατάλληλη ανά περίπτωση αραιώση σε τρυβλία με TSA (LAB M, Lancashire, UK). Μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 h έγινε καταμέτρηση των σχηματισθέντων αποικιών (Σχήμα 3.2).

Η επιλογή του κάθε τρυβλίου για καταμέτρηση έγινε σύμφωνα με τη συνθήκη, οι αποικίες να βρίσκονται εντός του εύρους 30 – 300 (Meynel and Meynel, 1970). Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών, ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιάζοταν με την εκάστοτε αραιώση, που χρησιμοποιήθηκε.



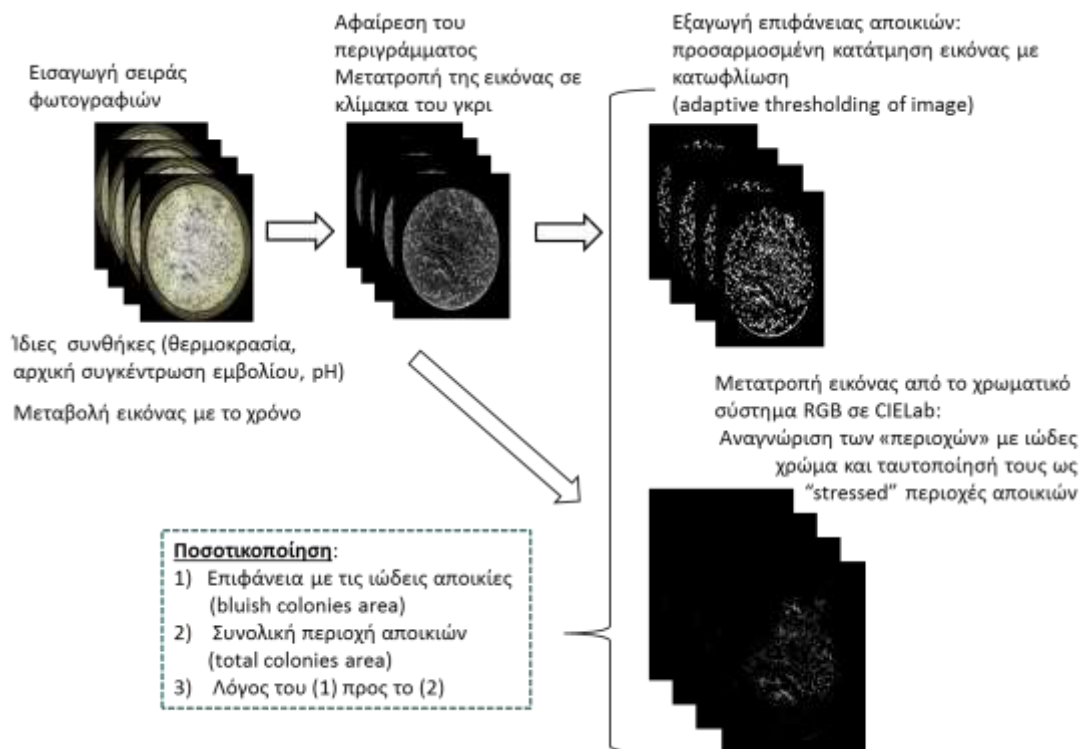
Σχήμα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας, που ακολουθήθηκε για τη μικροβιολογική ανάλυση των ενοφθαλισμένων τρυβλίων με το *Janthinobacterium* sp.

3.2.5 Προσδιορισμός pH

Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η τιμή του pH με τη χρήση ψηφιακού πεχάμετρου (pH 526, Metrohm Ltd, Switzerland). Η μέτρηση γινόταν με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο ομογενοποιημένο δείγμα μετά το πέρας κάθε μικροβιολογικής ανάλυσης.

3.2.6 Επεξεργασία φωτογραφιών

Για τη μελέτη της κινητικής της εμφάνισης της βιολασεΐνης λαμβανόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα φωτογραφίες του συστήματος - δείκτη (τρυβλία με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSA + 1% (w/v) γλυκερόλη ενοφθαλμισμένο με το *Janthinobacterium* sp.) με αυτόματο μετρητή αποικιών (Scan 1200, Interscience, France). Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση των φωτογραφιών με ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας. Το διάγραμμα ροής της επεξεργασίας, που ακολουθήθηκε, παρουσιάζεται στο σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3: Διάγραμμα Ροής Επεξεργασίας φωτογραφιών.

3.2.7 Ανάλυση Δεδομένων - Μαθηματική Περιγραφή του Συστήματος

Τα πειραματικά δεδομένα ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994), με το λογισμικό πρόγραμμα DMFit (www.combase.cc/index.php/en/tools), ώστε να προσδιοριστούν οι παράμετροι, όπως ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης του *Janthinobacterium* sp. (μ_{max}) και ο χρόνος λανθάνουσας φάσης του μικροοργανισμού (lag phase).

Επιπρόσθετα, το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts εφαρμόστηκε, για να περιγράψει την εμφάνιση του ιώδους χρώματος, που λαμβάνουν οι αποικίες λόγω της παραγωγής βιολασεΐνης, με σκοπό να προσδιοριστούν ο χρόνος εμφάνισης της πρώτης ιώδους αποικίας, ο ρυθμός με τον οποίο εμφανίζεται το ιώδες χρώμα και η χρονική στιγμή κατά την οποία όλες οι αποικίες θα έχουν λάβει ιώδη χρωματισμό.

Σύμφωνα με το μοντέλο των Baranyi and Roberts, η συγκέντρωση των κυττάρων, $y(t) = \ln x(t)$, δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} \cdot A(t) - \frac{1}{m} \cdot \ln \left(1 + \frac{e^{m \cdot \mu_{max} \cdot A(t)} - 1}{e^{m \cdot (y_{max} - y_0)}} \right) \quad \text{εξίσωση 3.1}$$

Όπου:

- y_{max} και y_0 : οι φυσικοί λογάριθμοι της μέγιστης και αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων αντίστοιχα
- μ_{max} : ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού
- m : η παράμετρος, η οποία καθορίζει την κυρτότητα της καμπύλης ανάπτυξης και χαρακτηρίζει τη μετάβαση από την εκθετική φάση
- $A(t)$: η συγκέντρωση του περιοριστικού παράγοντα, η οποία μεταβάλλεται με το χρόνο σύμφωνα με την εξίσωση 3.2, που ακολουθεί:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \ln(e^{-\mu_{max} \cdot t} + e^{-h_0} + e^{-\mu_{max} \cdot t - h_0}) \quad \text{εξίσωση 3.2}$$

- h_0 : η παράμετρος, που σχετίζεται με την φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων και χαρακτηρίζει το έργο προσαρμογής, που απαιτείται, ώστε τα κύτταρα να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον.

(Baranyi and Roberts, 1994)

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση τόσο του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp., όσο και του αντίστροφου του χρόνου, στο οποίο παρατηρείται το σημείο λήξης του ΤΤΙ (1/ΤΤΙ's endpoint), περιγράφηκε από το δευτερογενές μοντέλο Arrhenius.

$$\ln Y = \ln Y_{ref} - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad \text{εξίσωση 3.3}$$

Όπου :

- Y : ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp., μ_{max} , ή το αντίστροφο κλάσμα του χρόνου στον οποίο παρατηρείται το σημείο λήξης του ΤΤΙ, $\frac{1}{TTI's \text{ end point}}$
- E_a : η ενέργεια ενεργοποίησης (kJ/mol)
- Y_{ref} : ο ρυθμός και ο όρος $\frac{1}{TTI's \text{ end point}}$ στη θερμοκρασία αναφοράς (h^{-1})
- R : η παγκόσμια σταθερά αερίων (8.314 J/K·mol).
- T : η απόλυτη θερμοκρασία (Kelvin)
- T_{ref} : η θερμοκρασία αναφοράς (273 K)

3.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΔΕΙΚΤΗ

3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων βόειου κρέατος

Νωπό βόειο μπουτί χωρίστηκε σε μερίδες των 13 - 16 g, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε τρυβλία χωρίς το καπάκι και στη συνέχεια τυλίχτηκαν με διάφανη μεμβράνη οικιακής χρήσης, διαπερατή στο οξυγόνο. Τα δείγματα συντηρήθηκαν κάτω από ισόθερμες συνθήκες (0, 5, 10 και 15 °C), καθώς και κάτω από ένα μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ, σε επωαστικούς θαλάμους (SANYO MIR-153, Japan) σταθερής θερμοκρασίας (± 0.5 °C) μέχρι την αλλοίωσή τους. Όσον αφορά τις δυναμικές συνθήκες συντήρησης, χρησιμοποιήθηκε ένα προφίλ χαμηλών θερμοκρασιών συντήρησης, προκειμένου να προσομοιωθούν οι συνεχώς μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες, που παρατηρούνται στην ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων. Το δυναμικό προφίλ συντήρησης αφορούσε ένα περιοδικώς επαναλαμβανόμενο 24h κύκλο, που περιλάμβανε συντήρηση στους 7 °C για 4 h, στη συνέχεια στους 2 °C για 11 h και τελικά στους 12 °C για 9 h. Η θερμοκρασία των κλιβάνων κατά τη διάρκεια της συντήρησης καταγραφόταν με τη χρήση ηλεκτρονικού καταχωρητή δεδομένων, data logger, ο οποίος κατέγραφε τη θερμοκρασία κάθε 10'.

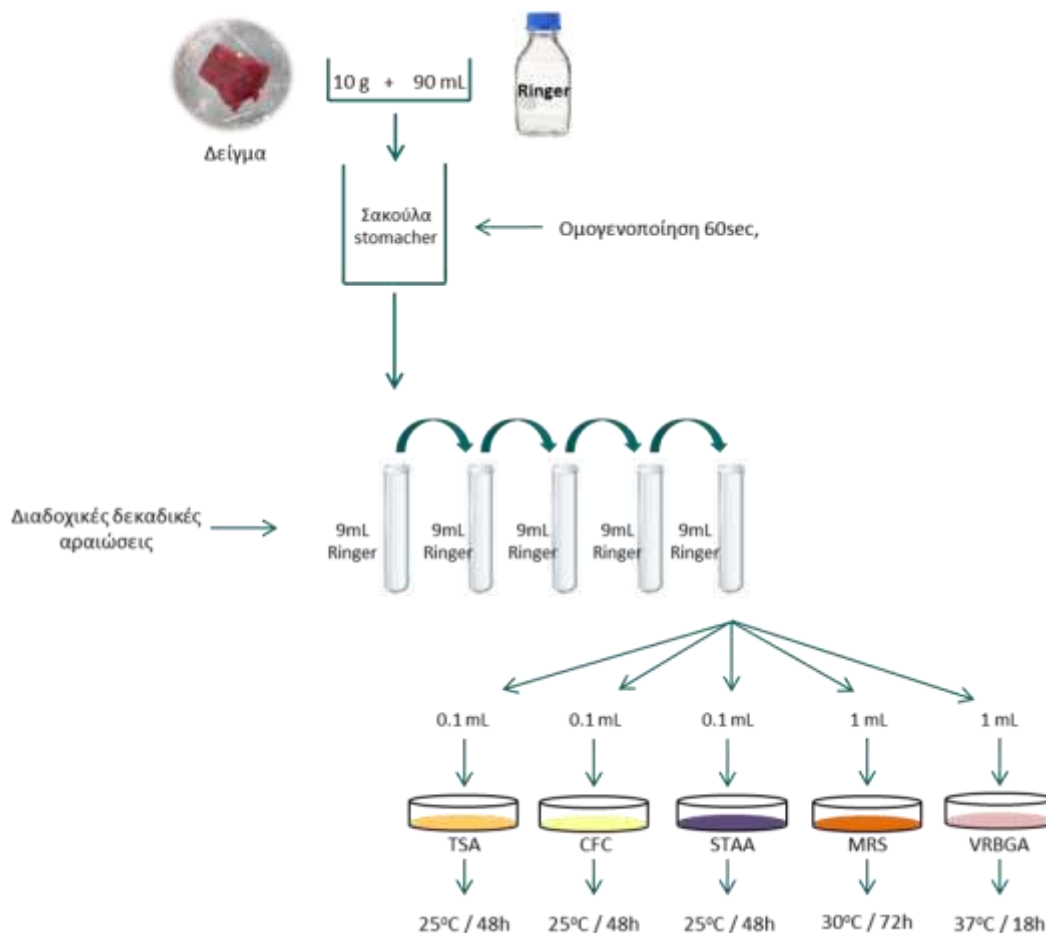
Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, σε δύο δείγματα βόειου κρέατος από κάθε θερμοκρασιακό περιβάλλον αλλοίωσης πραγματοποιούνταν μικροβιολογική ανάλυση, και μέτρηση του pH, προκειμένου να περιγραφεί η κινητική μελέτη της μικροβιολογικής αλλοίωσης του τροφίμου, να προσδιοριστεί ο ειδικός αλλοιογόνος μικροοργανισμός και να οριστεί η ημερομηνία απόρριψής του.

3.3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις στα δείγματα βόειου κρέατος

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Ζυγίστηκαν 10 g από το κάθε δείγμα σε σακούλα stomacher υπό ασηπτικές συνθήκες, προστέθηκαν 90 mL διαλύματος Ringer και ακολούθησε ομογενοποίησή τους για 60 sec με συσκευή stomacher (Lab blender 400, Seward Medical, London) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ακολούθησε η παρασκευή των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Οι κατάλληλες, ανά περίπτωση, δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα. Τα υλικά και οι συνθήκες επώασης ανά κατηγορία μικροοργανισμών, που προσδιορίστηκε, ήταν οι ακόλουθες (Σχήμα 3.4) :

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Total Viable Count, TVC) σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar (TSA - LAB M, Lancashire, UK). Η επώαση έγινε στους 25 °C για 48 h.
- Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.) σε εκλεκτικό υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base (Oxoid, Basingstoke, UK) με την προσθήκη αντιβιοτικών Certimide – Flucidin - Cephaloridine (C.F.C, Oxoid, Basingstoke, UK) και επώαση στους 25 °C για 48 h.
- *Brochothrix thermosphacta* σε εκλεκτικό υπόστρωμα Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base (STAA, Biolife, Italiana S.r.L., Milano, Italy) με την προσθήκη αντιβιοτικού (streptomycin sulphate, thallus acetate και cycloheximide). Η επώαση έγινε στους 25 °C για 48 h.
- Οξυγαλακτικά Βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) στο επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar (LAB M, Lancashire, UK). Τα τρυβλία επικαλύφθηκαν με δεύτερη στρώση με το ίδιο υπόστρωμα και επώαστηκαν στους 30 °C για 72 h.
- Εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae*) στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA - LAB M, Lancashire, UK). Τα τρυβλία επικαλύφθηκαν με δεύτερη στρώση με το ίδιο υπόστρωμα και επώαστηκαν στους 37 °C για 18 – 24 h.



Σχήμα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση των μικροβιολογικών αναλύσεων για τις μελετώμενες ομάδες μικροοργανισμών.

Δύο επαναλήψεις από τουλάχιστον δύο αραιώσεις καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Όλα τα τρυβλία εξετάστηκαν οπτικά για τυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών για κάθε υπόστρωμα.

3.3.3 Μέτρηση pH

Το pH του κάθε δείγματος μετρήθηκε με τη χρήση ψηφιακού πεχάμετρου (pH 526, Metrohm Ltd, Switzerland).

3.3.4 Μέτρηση της απόκρισης του πρότυπου συστήματος ΤΠΙ

Προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα εφαρμογής του ΤΠΙ στην "απεικόνιση" της μικροβιολογικής αλλοίωσης του βόειου κρέατος, σε πραγματικές συνθήκες, δείγματα πρότυπου συστήματος ΤΠΙ με καθορισμένες παραμέτρους (αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. και τιμή pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξής του), συντηρήθηκαν κάτω από ισόθερμες συνθήκες ψύξης (0, 5, 10 και 15 °C), καθώς και κάτω από το ίδιο δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ μαζί με τα δείγματα κρέατος.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν φωτογραφίες του συστήματος ΤΠΙ και ακολούθησε επεξεργασία τους, προκειμένου να γίνει η κινητική μελέτη του μικροβιακού δείκτη. Η ευδιάκριτη εμφάνιση του ιώδους χρώματος, που έλαβαν οι αποικίες, αποτέλεσε την απόκρισή του.

3.3.5 Ανάλυση Δεδομένων

Τα δεδομένα ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, που μελετήθηκαν, στο βόειο κρέατος μοντελοποιήθηκαν ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης χρησιμοποιώντας το μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος DMFit (ενότητα 3.2.7).

Η επεξεργασία των φωτογραφιών του συστήματος ΤΠΙ έγινε με πρόγραμμα Ανάλυσης Εικόνας, σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στην ενότητα 3.2.6.

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση των ρυθμών ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο βόειο κρέας και του αντίστροφου του σημείου λήξης του ΤΠΙ περιγράφηκε από την εξίσωση Arrhenius (ενότητα 3.2.7).

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 **ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΤΤΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΕΥΑΛΛΟΙΩΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων χαρακτηρίζεται από μεγάλες απώλειες λόγω των σημαντικών αποκλίσεων των θερμοκρασιακών συνθηκών, που επικρατούν, από τις συνιστώμενες. Τα τρόφιμα, επομένως, υπόκεινται σε ποιοτική υποβάθμιση με αποτέλεσμα πολλές φορές την αλλοίωση τους, πριν ακόμα φθάσουν στο τέλος της εμπορικής διάρκειας ζωής τους. Η πιθανή αντιμετώπιση του προβλήματος, ο ποσοτικός προσδιορισμός της επίδρασης των απωλειών ποιότητας στην ψυκτική αλυσίδα και η συνεχής παρακολούθηση του πραγματικού ποιοτικού επιπέδου των τροφίμων δύνανται να επιτευχθούν με τη χρήση χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών. Η αξιοπιστία και η αποτελεσματικότητα ενός δείκτη στην παρακολούθηση της ποιότητας ενός τροφίμου εξαρτάται από τα κινητικά χαρακτηριστικά της απόκρισής του. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η ενδελεχής μελέτη της κινητικής της απόκρισης του δείκτη.

Το μικροβιακό ΤΤΙ, που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, στηρίχτηκε στην αύξηση και την παραγωγή βιολασεΐνης του μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp. Η ιδιότητα του μικροοργανισμού να παράγει ως δευτερογενή μεταβολίτη μια χρωμογόνο ουσία, χάρη στην οποία οι αποικίες του λαμβάνουν έναν ιώδη χρωματισμό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως απόκριση του δείκτη, αφού πρόκειται για μία μη αντιστρεπτή, εύκολα ορατή χρωματική μεταβολή.

Για την επιτυχή εφαρμογή ενός ΤΤΙ σε ένα τρόφιμο, θα πρέπει η απόκρισή του να αντικατοπτρίζει την ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος. Κατά συνέπεια είναι απαραίτητο η θερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης του δείκτη να προσεγγίζει κατά το δυνατόν την εξάρτηση από τη θερμοκρασία των δράσεων, που είναι υπεύθυνες για την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου ($Ea_{\text{ΤΤΙ}} = Ea_{\text{SSO τροφίμου}}$), ενώ επιπλέον θα πρέπει το σημείο λήξης του δείκτη να ταυτίζεται με το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος σε μια θερμοκρασία αναφοράς (ΤΤΙ's Endpoint \approx End of product's Shelf Life). Η μελέτη της κινητικής του υπό ανάπτυξη συστήματος έγινε δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στις δύο προαναφερθείσες προϋποθέσεις.

4.1.1 Δομικά στοιχεία ΤΤΙ

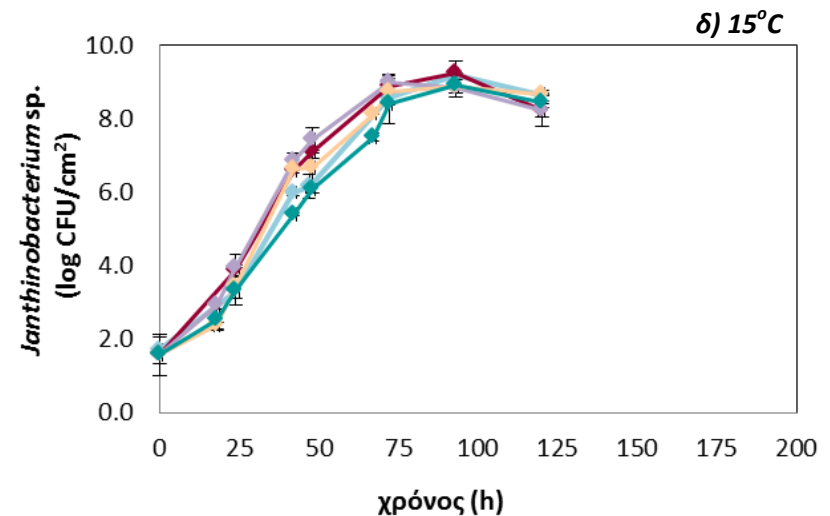
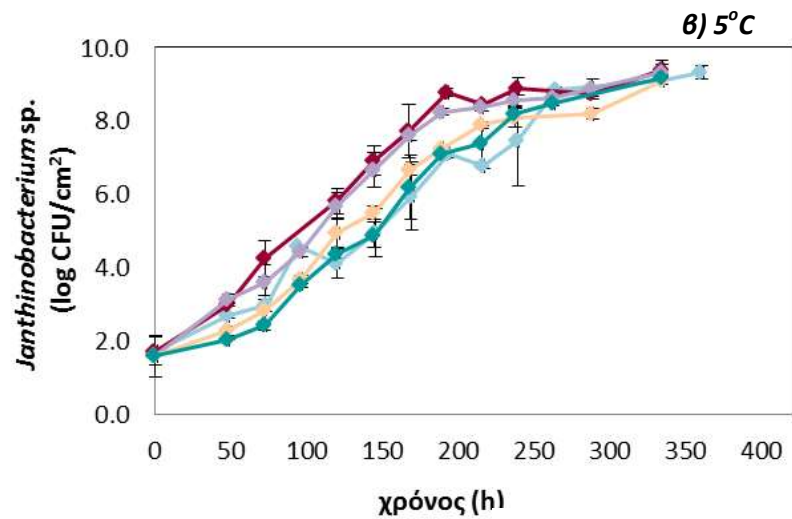
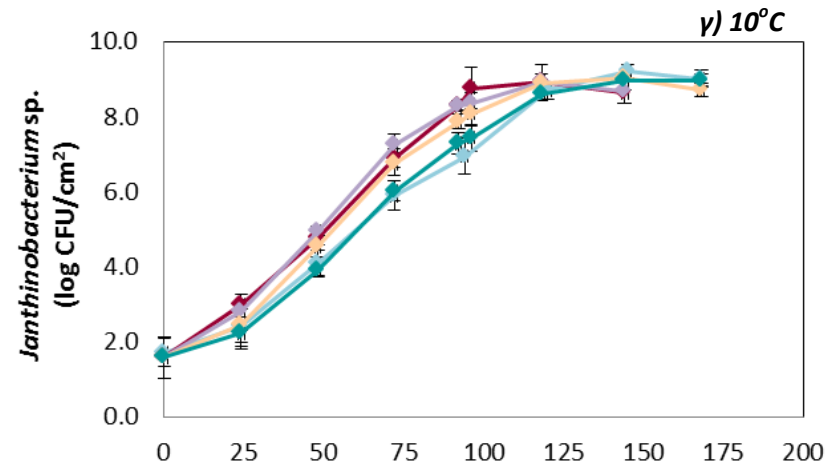
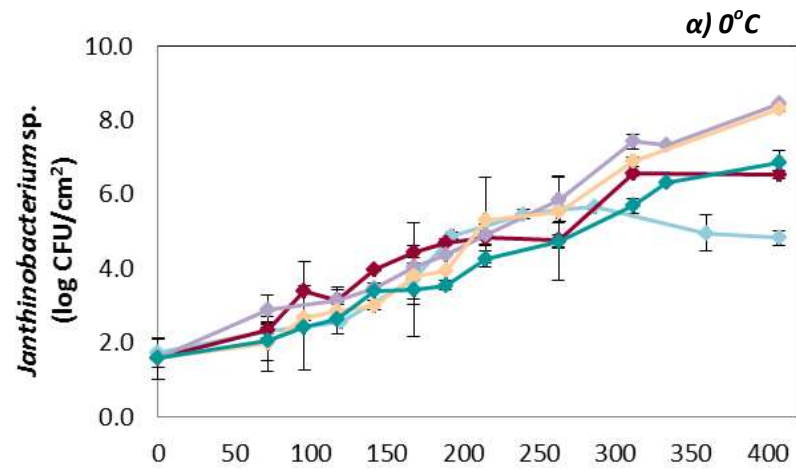
Το μικροβιακό ΤΤΙ που αναπτύχθηκε αποτελείτο από στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Tryptone Soy Agar – TSA), στο οποίο είχε προστεθεί γλυκερόλη (1% (w/v)), καθώς σύμφωνα με τους Pantanella et al. (2006) η πηγή άνθρακα καθορίζει την παραγωγή βιολασεΐνης, με τη γλυκερόλη να έχει θετική επίδραση, σε αντίθεση με τη γλυκόζη, η οποία δρα παρεμποδιστικά. Το pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης ρυθμίστηκε σε τιμές 5.0 – 9.0 και εμβολιαζόταν με διαφορετική αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. Οι διαφορετικές τιμές του pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού και τα διαφορετικά **επίπεδα ενοφθαλμίσματος** αποτέλεσαν τις **παραμέτρους** του υπό ανάπτυξη μικροβιακού ΤΤΙ. Η επίδραση των παραμέτρων αυτών στα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη, όπως και στο σημείο λήξης του, θα αναλυθούν στις ενότητες, που ακολουθούν.

4.1.2 Ανάπτυξη Μικροβιακού Συστήματος ΤΤΙ

4.1.2.1 Κινητική Μελέτη Ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη και την εφαρμογή ενός χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη είναι η μελέτη της κινητικής της απόκρισής του, επομένως πρώτο βήμα της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της κινητικής της ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. Ο εν λόγω μικροοργανισμός δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένος, με αποτέλεσμα να είναι λίγες οι πληροφορίες, που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, σχετικά με την κινητική της ανάπτυξής του. Η κινητική του μικροοργανισμού περιγράφηκε για τις θερμοκρασίες των 0, 5, 10 και 15 °C, ένα εύρος που περιλαμβάνει τις συνθήκες αποθήκευσης των τροφίμων που διατηρούνται υπό ψύξη, καθώς και τις θερμοκρασίες που μπορεί να βρεθούν λόγω πιθανής κακομεταχείρισής τους. Επίσης, εξετάστηκαν διαφορετικές τιμές pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 και 9.0) του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού, προκειμένου να περιγραφεί η επίδραση του pH στην ανάπτυξή του, αφού, όπως αναφέρθηκε, το pH αποτελεί μια από τις δύο παραμέτρους του μικροβιακού δείκτη. Επιπρόσθετα, σημαντική ήταν η εύρεση της χρονικής στιγμής κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, που παρατηρείται η εμφάνιση της βιολασεΐνης, καθώς αποτελεί και την απόκριση του υπό ανάπτυξη ΤΤΙ.

Στο γράφημα 4.1, που ακολουθεί, αποτυπώνεται η επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp.



— pH 6.0 — pH 6.5 — pH 7.0 — pH 8.0 — pH 9.0

Γράφημα 4.1: Ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp. σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με διαφορετικές τιμές pH (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0) στους α) 0 °C, β) 5 °C, γ) 10 °C και δ) 15 °C.

*Στο θρεπτικό μέσο με τιμή pH 5.0 ο μικροοργανισμός δεν επιβίωσε, ενώ το pH 5.5 αποτελεί το όριο ανάπτυξης/μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

**Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο τεσσάρων επαναλήψεων (n=4).

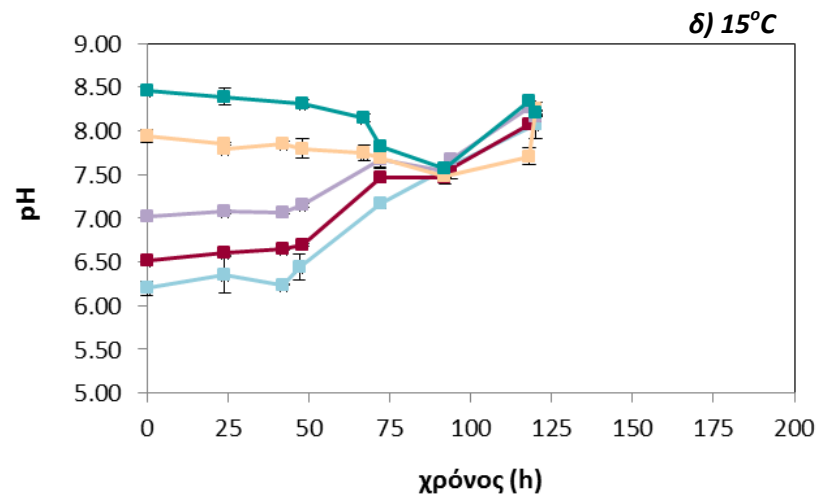
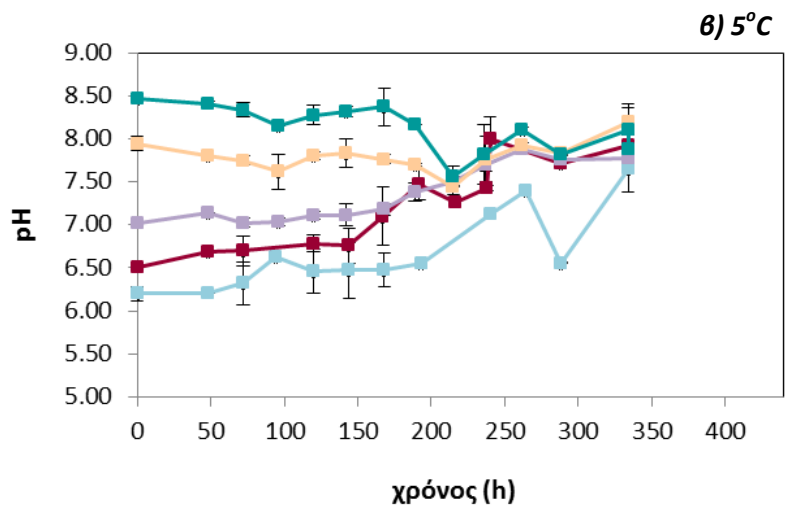
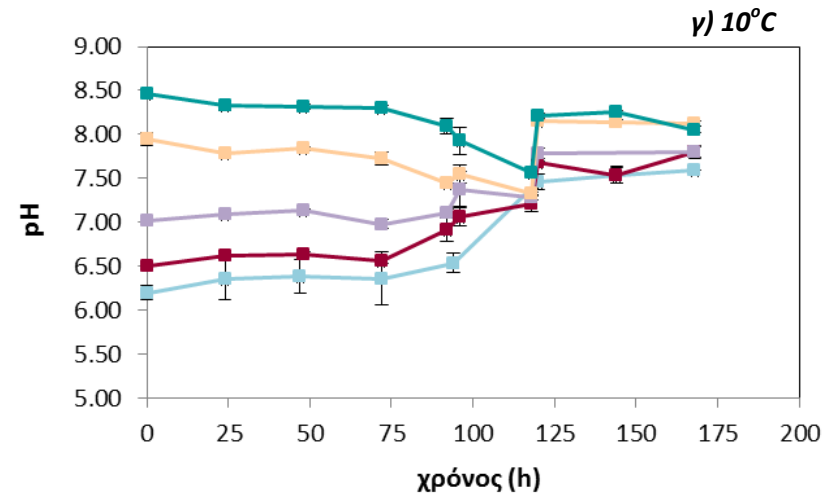
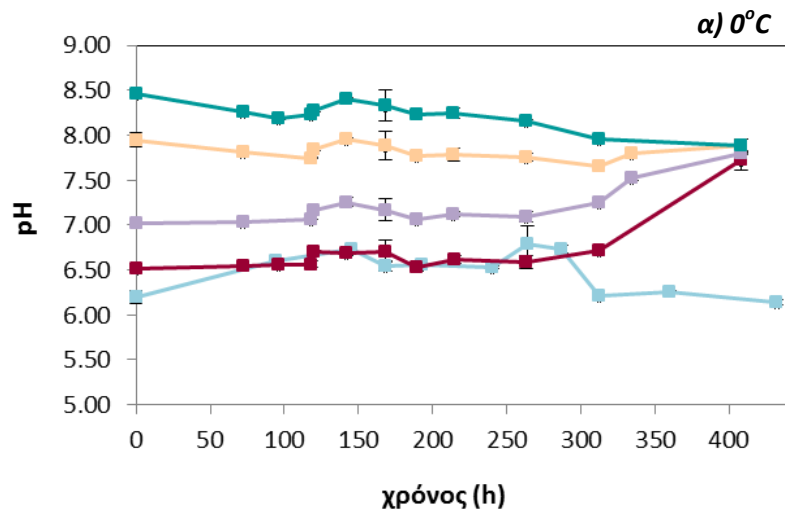
***Για την καλύτερη απεικόνιση των πειραματικών δεδομένων, στα γραφήματα ανάπτυξης του μικροοργανισμού για τους 0 και 5 °C ο οριζόντιος άξονας αναφέρεται σε 400 h, ενώ για τους 10 και 15 °C σε 200 h.

Σύμφωνα με το γράφημα 4.1, παρατηρείται ότι η θερμοκρασία επηρέασε με ανάλογο τρόπο το ρυθμό αύξησης του *Janthinobacterium* sp. για όλες τις τιμές pH, καθώς ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης του αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ο μικροοργανισμός έφθασε υψηλούς πληθυσμούς της τάξης των 7.0 – 9.0 log CFU/cm² σε όλες τις θερμοκρασίες, ακόμα και στους 0 °C. Το γεγονός αυτό δεν προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς πρόκειται για ένα ψυχρότροφο βακτήριο. Εξαιρεση αποτέλεσε το pH 6.0, το οποίο σε συνδυασμό με τους 0 °C πιθανόν να κατέστη ένα αρκετά δυσχερές περιβάλλον για το μικροοργανισμό, ο οποίος έφθασε πληθυσμούς της τάξης των 4.8 log CFU/cm².

Όσον αφορά την επίδραση του pH στην ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp. (γράφημα 4.1), για τιμές pH 6.5 και 7.0 ο μικροοργανισμός παρουσίασε τους μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης, ενώ ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα με pH 8.0 διέφερε ελάχιστα. Συνεπώς, το εύρος τιμών pH μεταξύ 6.5 και 8.0 αποτελεί ιδανικό για την ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp. Σε τιμές pH 6.0 και 9.0 ο μικροοργανισμός σημείωσε αισθητά μικρότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Τέλος τιμή pH ίση με 5.0 φαίνεται να είναι ανασταλτική για την επιβίωση του μικροοργανισμού, ενώ για τιμή pH 5.5 ο μικροοργανισμός είναι στο όριο ανάπτυξης/μη ανάπτυξης. Οι διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξη μεταξύ των διαφορετικών τιμών pH του θρεπτικού μέσου ήταν μεγαλύτερες στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Σχετικά με την εμφάνιση της βιολασεΐνης, η εκτίμηση της οποίας στο στάδιο αυτό έγινε με απλή παρατήρηση των τρυβλίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ξεκίνησε τη στιγμή που ο μικροοργανισμός βρισκόταν στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του και στην αρχή της στατικής φάσης, για την πλειοψηφία των θερμοκρασιών και των διαφορετικών pH. Τη χρονική αυτή στιγμή οι αποικίες του τρυβλίου ξεκίνησαν να αποκτούν έναν ιώδη χρωματισμό, ο οποίος με την πάροδο του χρόνου γινόταν πιο σκούρος. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνονται και από τους Lu et al. (2009), καθώς σύμφωνα με τη μελέτη τους η έναρξη της παραγωγής της χρωστικής ουσίας ξεκίνησε όταν ο μικροοργανισμός βρισκόταν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης ήδη δύο ημέρες, ενώ η συγκέντρωσή της συνέχισε να αυξάνεται ακόμα και όταν η κυτταρική αύξηση σταμάτησε. Η βιολασεΐνη αποτελεί έναν δευτερογενή μεταβολίτη και όπως είναι γνωστό οι δευτερογενείς μεταβολίτες δε σχετίζονται με την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αλλά εξυπηρετούν άλλες λειτουργίες στο βακτηριακό κύτταρο. Πολλά από αυτά τα μόρια είναι βιολογικά ενεργά και κάποια έχουν τοξικές ιδιότητες ως προς ανταγωνιστικά είδη, δίνοντας ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στα βακτήρια που τα παράγουν (Choi et al. , 2015).

Το γράφημα 4.2 περιγράφει τη μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μικροοργανισμού για τις διαφορετικές τιμές pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξής του στους 0, 5, 10 και 15 °C. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός, πως ανεξαρτήτως αρχικού pH, όλα συνέκλιναν σε μια τιμή κοντά στο 7.50, ενώ στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν. Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε πιο έντονα στους 10 και 15 °C και μάλιστα η στιγμή αυτή συνέπεσε και με την έναρξη της εμφάνισης του ιώδους χρωματισμού στις αποικίες.



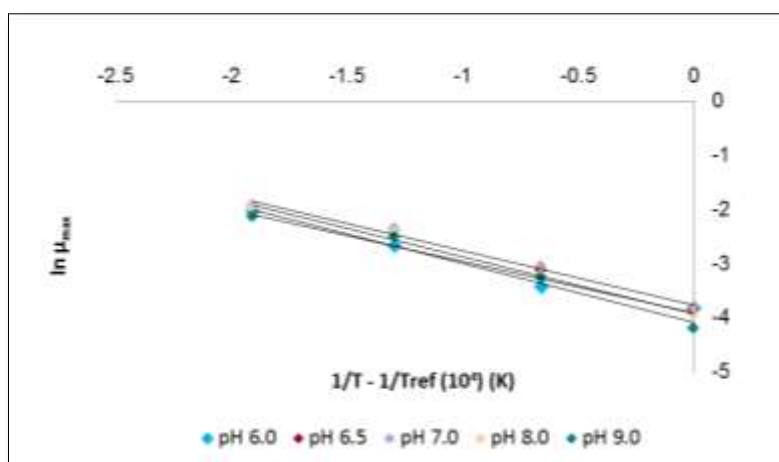
—■— pH 6.00 —■— pH 6.50 —■— pH 7.00 —■— pH 8.00 —■— pH 9.00

Γράφημα 4.2: Μεταβολή του pH κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp. σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με τιμές pH 6.0, 6.50, 7.0, 8.0 και 9.0 στους α) 0 °C, β) 5 °C, γ) 10 °C και δ) 15 °C.

*Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο τεσσάρων επαναλήψεων (n=4).

**Για την καλύτερη απεικόνιση των πειραματικών δεδομένων, στα γραφήματα ανάπτυξης του μικροοργανισμού για τους 0 και 5 °C ο οριζόντιος άξονας αναφέρεται σε 400 h, ενώ για τους 10 και 15 °C σε 200 h.

Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης του μικροοργανισμού για τις διαφορετικές τιμές pH και τις διαφορετικές θερμοκρασίας υπολογίστηκαν με το μοντέλο Baranyi και Roberts (1994) και στη συνέχεια προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Arrhenius. Με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης εκτιμήθηκαν τα κινητικά χαρακτηριστικά του δείκτη, και συγκεκριμένα η ενέργεια ενεργοποίησης του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp., E_a , για τις διαφορετικές τιμές pH του θρεπτικού μέσου και οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης στη θερμοκρασία αναφοράς, μ_{ref} , ($T_{ref} = 273$ K), τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.



Γράφημα 4.3: Καμπύλες Arrhenius, που περιγράφουν τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp., μ_{max} , για τις διαφορετικές συνθήκες pH.

Πίνακας 4.1: Εκτιμούμενες παράμετροι και στατιστικά στοιχεία από την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius στο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. σε διαφορετικές συνθήκες pH.

pH	E_a (kJ/mol)	μ_{ref}	R^2
6.0	79.24 ± 17.71^a	0.021 ± 0.007	0.983
6.5	82.95 ± 1.80^a	0.022 ± 0.001	0.990
7.0	83.77 ± 0.20^a	0.023 ± 0.001	0.989
8.0	87.55 ± 9.00^a	0.020 ± 0.003	0.990
9.0	90.71 ± 2.50^a	0.017 ± 0.000	0.971

*Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο δύο επαναλήψεων \pm τυπική απόκλιση.

**Η T_{ref} , όπως υπολογίστηκε από τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης αναφέρεται στους 273 K (0 °C).

*** Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς την παράμετρο pH ($p \leq 0.05$).

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση, η οποία εκφράζεται με την ενέργεια ενεργοποίησης, του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. για τις διαφορετικές συνθήκες pH περιγράφηκε ικανοποιητικά από την εξίσωση Arrhenius. Οι τιμές της Εα μεταξύ των διαφορετικών τιμών pH δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές και κυμάνθηκαν σε ένα εύρος μεταξύ 79.2 – 90.7 kJ/mol (πίνακας 4.1). Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση, που πραγματοποιήθηκε, το pH δεν ασκεί σημαντική επίδραση στην ενέργεια ενεργοποίησης του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης του μικροοργανισμού, μ_{max} . Το γεγονός αυτό γίνεται αντιληπτό και από τις παράλληλες καμπύλες Arrhenius (γράφημα 4.3), από την κλίση των οποίων υπολογίζεται η Εα.

4.1.3 Κινητική Μελέτη Εμφάνισης Βιολασεΐνης

Ο μικροβιακός δείκτης στηρίζεται στην εμφάνιση της χρωστικής ουσίας, βιολασεΐνης, που παράγει ο μικροοργανισμός. Συγκεκριμένα η εμφάνιση του ιώδους χρώματος, που λαμβάνουν οι αποικίες του μικροοργανισμού κατά τη στατική φάση ανάπτυξής του, σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, αποτέλεσε την απόκριση του ΤΠΙ.

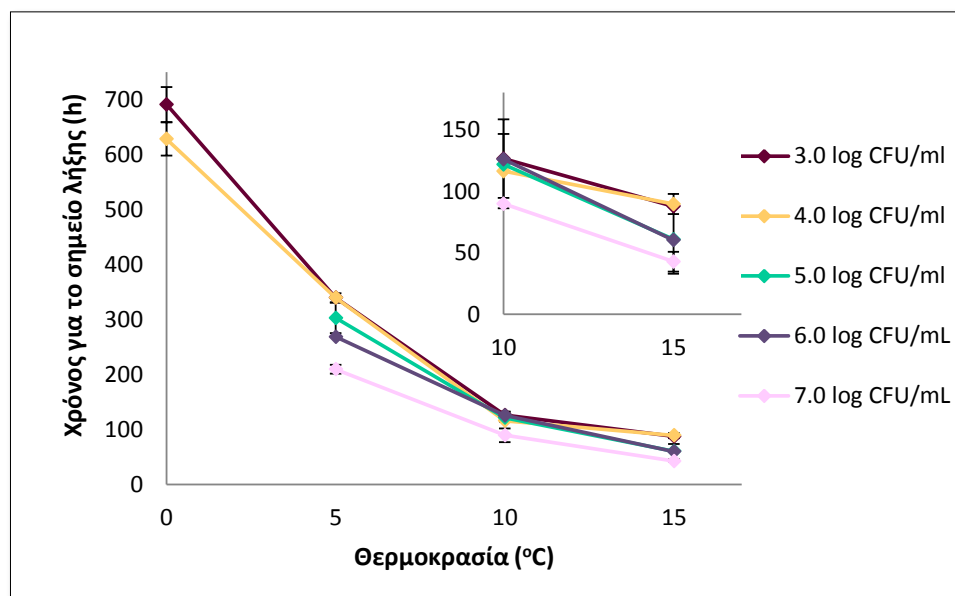
Η παραγωγή της βιολασεΐνης εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως τη συγκέντρωση του μικροοργανισμού, το pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, την παρουσία οξυγόνου, την ανακίνηση (agitation) και τη συγκέντρωση τρυπτοφάνης (Yang et al., 2007, Wang et al., 2009, Aranda et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη, η αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού και το pH του θρεπτικού μέσου, αποτέλεσαν τις παραμέτρους, η μεταβολή των οποίων καθόρισε και τα κινητικά χαρακτηριστικά της απόκρισης του δείκτη.

Η παραγωγή και επομένως η εμφάνιση της βιολασεΐνης μπορεί να διαφοροποιείται ακόμα και ανάμεσα σε γειτονικές αποικίες πιθανότατα λόγω διαφοροποίησης του τοπικού pH ή λόγω συνωστισμού των αποικιών σε ένα συγκεκριμένο σημείο με συνέπεια την έλλειψη θρεπτικών στο σημείο εκείνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι αποικίες του *Janthinobacterium* sp. να μην αποκτούν ταυτόχρονα ιώδη χρωματισμό. Η εμφάνιση του ιώδους χρώματος ξεκινά από κάποιες αποικίες και με το χρόνο το ποσοστό των αποικιών, που αποκτούν το χρώμα αυτό, αυξάνεται έως ότου όλες οι αποικίες γίνουν ιώδεις.

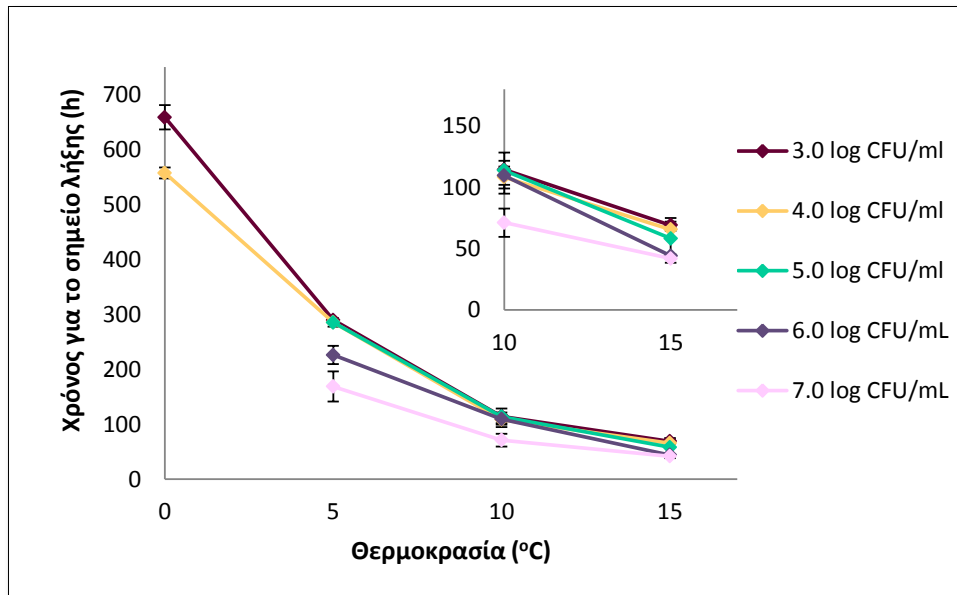
Ένα μέρος της ευελιξίας του παρόντος μικροβιακού δείκτη αποτελεί η δυνατότητα ορισμού του σημείου λήξης του. Συγκεκριμένα, σημείο λήξης του δείκτη (endpoint) θα μπορούσε να οριστεί είτε η χρονική στιγμή εμφάνισης της "πρώτης" ιώδους αποικίας (**1% ιώδεις αποικίες**), είτε η χρονική στιγμή κατά την οποία όλες οι αποικίες του μικροοργανισμού έχουν λάβει ιώδες χρώμα (**100% ιώδεις αποικίες**). Η μελέτη της κινητικής της εμφάνισης της βιολασεΐνης, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στη συνέχεια, έγινε με βάση τα δύο αυτά πιθανά σημεία λήξης.

Σημείο Λήξης του Δείκτη : 1% ιώδεις αποικίες

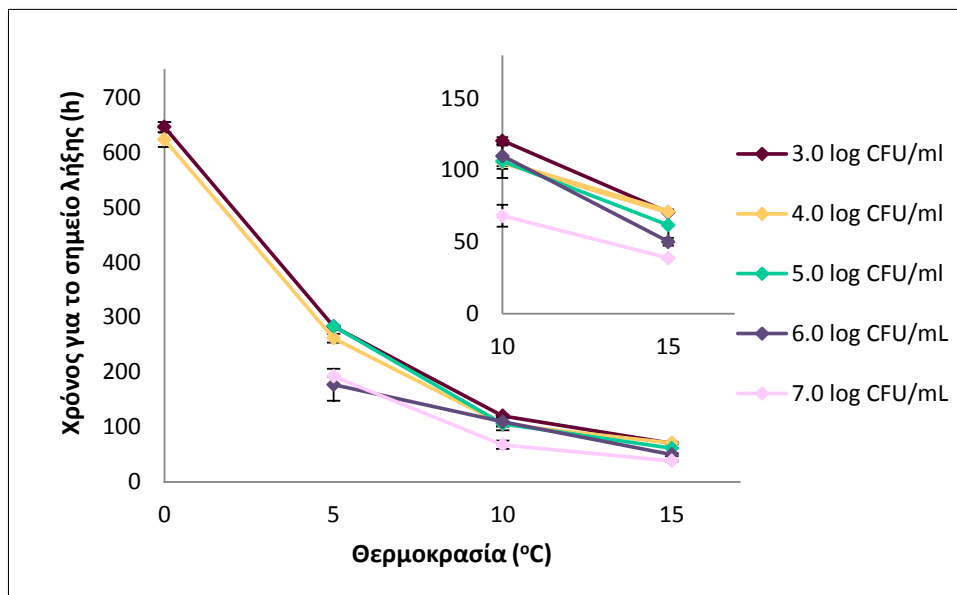
Στα γραφήματα, που ακολουθούν, αποτυπώνεται η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του *Janthinobacterium* sp. για τις διαφορετικές τιμές pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο χρόνο που απαιτείται για το σημείο λήξης του δείκτη (TPI's endpoint ή t_i) συναρτήσει της θερμοκρασίας.



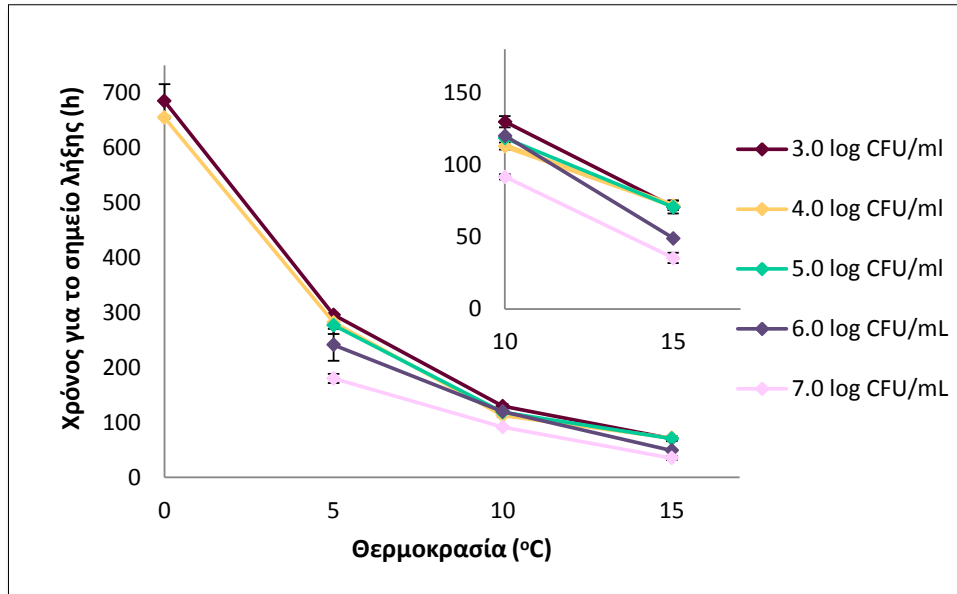
(α) pH: 6.0



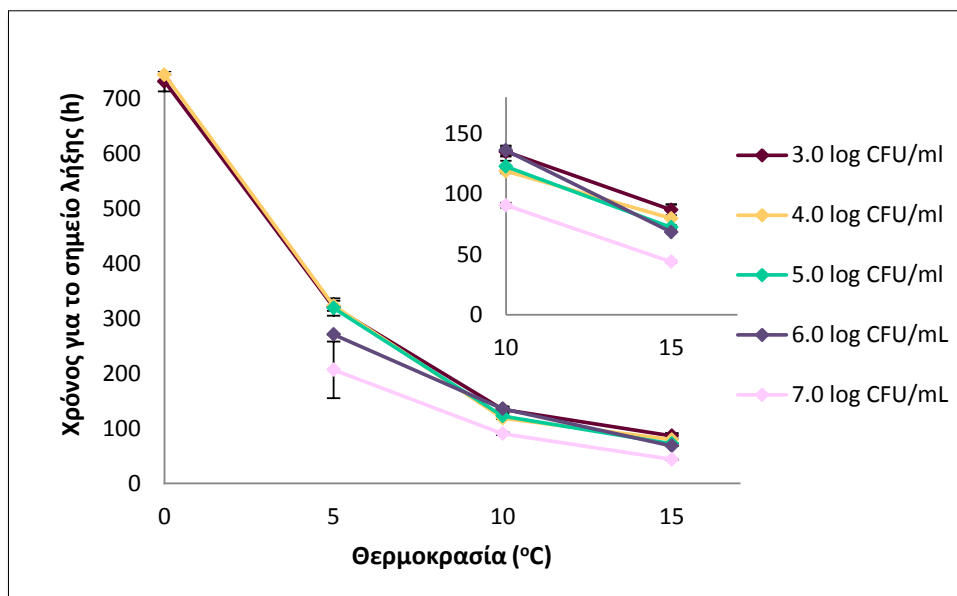
(β) pH: 6.5



(γ) pH: 7.0



(δ) pH: 8.0



(ε) pH: 9.0

Γράφημα 4.4: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του *Janthinobacterium* sp. στο σημείο λήξης του δείκτη (**1% ιώδεις αποικίες**) για τιμές pH (α) 6.0, (β) 6.5, (γ) 7.0, (δ) 8.0 και (ε) 9.0.

*Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων (n=3).

**Στην περίπτωση των 0 °C για αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 5.0, 6.0 και 7.0 (log CFU/mL) δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση ιώδους χρώματος στις αποικίες.

Το σημείο λήξης του υπό ανάπτυξη μικροβιακού δείκτη μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας ανεξαρτήτως pH και αρχικού επιπέδου ενοφθαλμίσματος.

Στα γραφήματα 4.4 παρατηρείται η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού στο σημείο λήξης του δείκτη για τα διαφορετικά pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, παρατηρείται πως όσο υψηλότερη ήταν η αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp., τόσο νωρίτερα επήλθε το σημείο λήξης του δείκτη στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Αξίζει να σημειωθεί πως οι διαφορές στους χρόνους λήξης του δείκτη μεταξύ των εμβολίων 3.0 και 4.0 log CFU/mL για την ίδια θερμοκρασία ήταν μικρές, ενώ, όταν ο αρχικός πληθυσμός του *Janthinobacterium* sp. ήταν 6.0 και 7.0 log CFU/mL αντίστοιχα, το σημείο λήξης επήλθε γρηγορότερα με ανάλογο τρόπο σε όλες τις θερμοκρασίες. Το γεγονός αυτό φαίνεται ιδιαίτερα έντονο στους 5 °C. Ωστόσο παρ' ότι οι διαφορές μεταξύ των πρότυπων συστημάτων δεικτών με διαφορετικό αρχικό επίπεδο ενοφθαλμίσματος στους 10 °C και στους 15 °C φαίνονται μικρές, θα μπορούσαν να θεωρηθούν σημαντικές, διότι η διάρκεια ζωής των ευαλλοίωτων τροφίμων σε αυτές τις θερμοκρασίες και ιδιαίτερα στους 15 °C είναι πολύ μικρή, επομένως διαφορές ακόμα και μερικών ωρών κρίνονται σημαντικές. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε πως η απόκριση του υπό ανάπτυξη μικροβιακού δείκτη σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του εμβολιασμένου στο σύστημα μικροοργανισμού, καθιστώντας το επίπεδο ενοφθαλμίσματος χαρακτηριστικό ευελιξίας και προσαρμοστικότητας του ΤΠΙ.

Για αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 5.0, 6.0 και 7.0 log CFU/mL δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση βιολασεΐνης στους 0 °C. Το υπό ανάπτυξη ΤΠΙ αποτελεί ένα βιολογικό σύστημα, που στηρίζεται στην παραγωγή και εμφάνιση μιας χρωστικής ουσίας ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του *Janthinobacterium* sp. Το μεταβολικό μονοπάτι της σύνθεσης της βιολασεΐνης ερευνάται για περισσότερο από 80 χρόνια, λόγω της πολυπλοκότητάς του, ενώ πλέον είναι γνωστό ότι η βιολασεΐνη παράγεται μέσω μιας ενζυμικής 5- βημάτων διαδικασίας, η οποία ακολουθείται από ένα μη ενζυμικό βήμα (Duran et al., 2016). Οι παράγοντες, ωστόσο, που οδηγούν στην παραγωγή της, δεν έχουν μέχρι σήμερα εξακριβωθεί πλήρως. Στα περισσότερα βακτηριακά στελέχη, που παράγουν βιολασεΐνη, η εν λόγω δις-ινδόλη σχετίζεται με το σχηματισμό βιοϋμενίων σύμφωνα με τους Pantanella et al. (2007) και η παραγωγή της από το *Chromobacterium violaceum* και άλλα στελέχη ρυθμίζεται από το μηχανισμό quorum sensing ("απαρτία της αίσθησης") (Choi et al., 2015). Συνεπώς, η παραγωγή της βιολασεΐνης στηρίζεται σε πολύπλοκους μηχανισμούς, και ως επακόλουθο η αναστολή της εμφάνισής της μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες.

Για παράδειγμα ο μεγάλος ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά, που δημιουργείται όταν εμβολιάζονται υψηλοί πληθυσμοί σε μια συγκεκριμένη επιφάνεια, σε συνδυασμό με την καταπόνηση, που δέχονται οι μικροοργανισμοί λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας, μπορεί να δρουν παρεμποδιστικά στην παραγωγή και εμφάνισή της.

Η επίδραση του pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού στο σημείο λήξης του δείκτη ακολούθησε ένα συγκεκριμένο μοτίβο. Τα πρότυπα συστήματα ΤΠΙ με τιμές pH 6.5 και 7.0 εμφάνισαν σε όλες τις θερμοκρασίες συντομότερα σημεία λήξης. Ακολούθησε το πρότυπο σύστημα δείκτη με τιμή pH 8.0, ενώ εκείνα με pH 6.0 και 9.0 εμφάνισαν τους πιο μεγάλους χρόνους απόκρισης. Οι διαφορές μεταξύ των πρότυπων συστημάτων ΤΠΙ με διαφορετικό pH ήταν εντονότερες στις χαμηλές θερμοκρασίες και συγκεκριμένα στους 5 και 0 °C. Το μοτίβο αυτό ακολουθήθηκε και κατά την ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp., με το μικροοργανισμό να εμφανίζει μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης στα pH 6.5 και 7.0, με το pH 8.0 να ακολουθεί (Γράφημα 4.3). Όπως αναφέρθηκε η εμφάνιση της βιολασεΐνης αρχίζει στο τέλος της εκθετικής και αρχή της στατικής φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Καθώς ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται γρηγορότερα σε τιμές pH 6.50 και 7.0, επόμενο είναι η εμφάνιση της βιολασεΐνης να επέλθει γρηγορότερα στις συνθήκες αυτές. Συνεπώς, η παραγωγή και εμφάνιση βιολασεΐνης, δηλαδή η απόκριση του δείκτη, σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση του σημείου λήξης του ΤΠΙ για τα διάφορα πρότυπα συστήματα με διαφορετικό pH και αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. περιγράφηκε ικανοποιητικά από την εξίσωση Arrhenius και προέκυψαν οι αντίστοιχες τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης. Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται οι τιμές της Εα για τα πρότυπα συστήματα ΤΠΙ με διαφορετικές παραμέτρους, οι οποίες εκφράζουν τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του αντίστροφου του χρόνου στον οποίο σημειώθηκε το σημείο λήξης $\left(\frac{1}{t_i}\right)$, των πρότυπων δεικτών, καθώς και ο όρος $\left(\frac{1}{t_i}\right)_{ref}$, στη θερμοκρασία αναφοράς ($T_{ref} = 273 \text{ K}$).

Πίνακας 4.2: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία κατά την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius για την περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στο αντίστροφο της παραμέτρου t_i , σημείο λήξης του δείκτη (**1% ώδεις αποικίες**), για τα πρότυπα συστήματα ΤΠΙ με διαφορετικό pH (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0) και διαφορετική αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 log (CFU/mL)).

Αρχική συγκέντρωση του <i>Janthinobacterium</i> sp. (log CFU/mL)															
3.0			4.0			5.0			6.0			7.0			
pH	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²
6.0	94.06 ± 0.30 ^{Aa}	0.0015 ± 0.0000	0.977	90.60 ± 4.37 ^{Aa}	0.0016 ± 0.0001	0.959	107.00 ± 6.17 ^{Aa}	0.0015 ± 0.0002	0.995	99.55 ± 15.29 ^{Aa}	0.0017 ± 0.0002	1	105.85 ± 1.38 ^{Aa}	0.0021 ± 0.0000	0.999
6.5	99.92 ± 2.85 ^{Aa}	0.0016 ± 0.0000	0.990	96.58 ± 3.34 ^{Aa}	0.0018 ± 0.0000	0.988	105.76 ± 19.41 ^{Aa}	0.0016 ± 0.0004	0.994	108.58 ± 4.96 ^{Aa}	0.0018 ± 0.0001	0.994	92.78 ± 5.63 ^{Aa}	0.0030 ± 0.0003	0.984
7.0	98.11 ± 0.61 ^{Aa}	0.0016 ± 0.0000	0.993	97.33 ± 1.40 ^{Aa}	0.0017 ± 0.0000	0.979	101.76 ± 11.48 ^{Aa}	0.0017 ± 0.0003	0.976	84.00 ± 14.07 ^{Aa}	0.0030 ± 0.0009	0.978	107.08 ± 1.48 ^{Aa}	0.0024 ± 0.0001	0.975
8.0	99.93 ± 3.93 ^{Aa}	0.0015 ± 0.0001	0.997	98.87 ± 1.89 ^{Aa}	0.0016 ± 0.0000	0.985	91.10 ± 4.83 ^{Aa}	0.0018 ± 0.0002	0.984	105.98 ± 8.42 ^{Aa}	0.0017 ± 0.0003	0.993	108.46 ± 3.77 ^{Aa}	0.0022 ± 0.0000	0.988
9.0	95.08 ± 2.05 ^{Aa}	0.0014 ± 0.0000	0.986	100.82 ± 6.15 ^{Aa}	0.0014 ± 0.0001	0.978	99.00 ± 1.67 ^{Aa}	0.0015 ± 0.0000	0.976	90.79 ± 8.20 ^{Aa}	0.0018 ± 0.0003	1	102.19 ± 15.64 ^{Aa}	0.0023 ± 0.0007	0.999

*Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο 3 επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

** Για αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 5.0, 6.0 και 7.0 (log CFU/mL) η εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius έγινε για θερμοκρασιακό εύρος 5 – 15°C.

***Η θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} αναφέρεται στους 273 K (0°C).

****Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς την παράμετρο pH και διαφορετικά μικρά γράμματα ως προς την παράμετρο αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. (p≤0.05).

Οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης των πρότυπων συστημάτων δεικτών (διαφορετικό pH και αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού) κυμάνθηκαν σε ένα εύρος μεταξύ 84.0 και 108.6 kJ/mol. Η ενέργεια ενεργοποίησης για το ίδιο επίπεδο ενοφθαλμίσματος και διαφορετικό pH ότι δεν διέφερε σημαντικά, κάτι που υποδηλώνει παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση μεταξύ των δεικτών με διαφορετικό pH. Επιπρόσθετα, οι τιμές της E_a για τα συστήματα με το ίδιο pH και διαφορετικό επίπεδο ενοφθαλμίσματος, επίσης δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές, με τη μέγιστη τυπική απόκλιση να ανέρχεται στα 10.3 kJ/mol.

Άξιο λόγου να αναφερθεί είναι το γεγονός πως η E_a της απόκρισης του συστήματος χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη βρίσκεται κοντά στην ενέργεια ενεργοποίησης ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. (79.2 – 90.7 kJ/mol), το οποίο δείχνει παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση τόσο της μικροβιακής ανάπτυξης, όσο και της απόκρισης του δείκτη. Εξάλλου, το κύριο πλεονέκτημα ενός μικροβιακού δείκτη σε σύγκριση με άλλους δείκτες, που στηρίζονται σε χημικές, ενζυμικές και άλλες αντιδράσεις, είναι πως η απόκρισή του αποτελεί την απόρροια μιας διεργασίας, η οποία συνδέεται άμεσα με τον πραγματικό μηχανισμό της ποιοτικής υποβάθμισης πολλών τροφίμων, τη μικροβιακή ανάπτυξη.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τη μελέτη της απόκρισης του δείκτη, ορίζοντας ως σημείο λήξης την εμφάνιση της πρώτης ιώδους αποικίας (1% ιώδεις αποικίες), θα μπορούσε να θεωρηθεί πως η E_a του συστήματος TPI είναι σταθερή ανεξαρτήτως παραμέτρου. Από την άλλη, η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του *Janthinobacterium* sp. φαίνεται να είναι ισχυρή στο σημείο λήξης του δείκτη, ενώ το pH αν και επιδρά στο σημείο λήξης του δείκτη, η επίδραση αυτή είναι οριακή, ειδικά στις υψηλές θερμοκρασίες. Μεταβάλλοντας λοιπόν την αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού, το σημείο λήξης του υπό ανάπτυξη δείκτη θα μπορούσε να ρυθμιστεί κατάλληλα, ώστε να "προσομοιάσει" την ποιοτική υποβάθμιση διαφορετικών ειδών τροφίμων ή τροφίμου με διαφορετικό επίπεδο αρχικής μόλυνσης και επομένως διαφορετική διάρκεια ζωής.

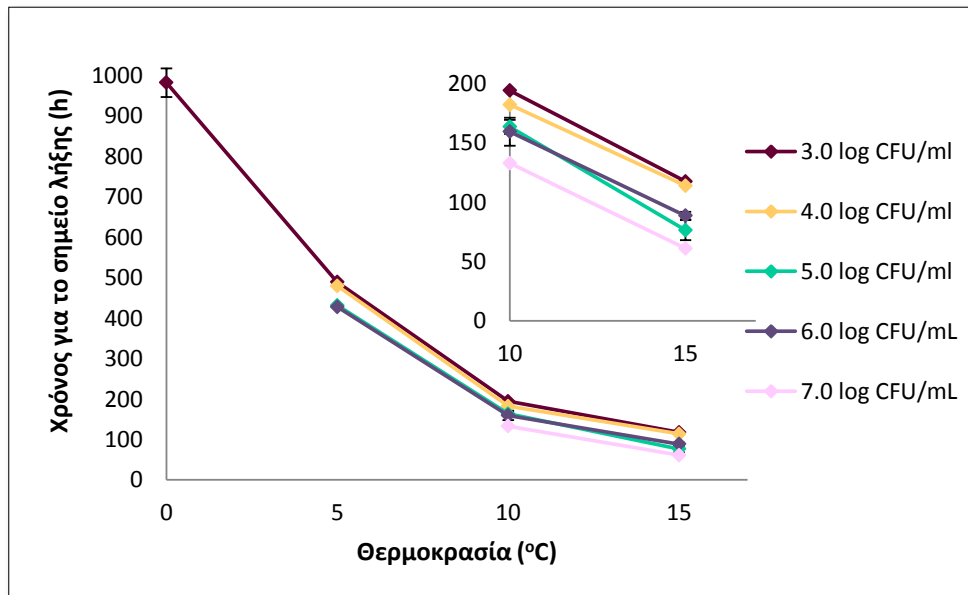
Όπως αναφέρθηκε οι ενέργειες ενεργοποίησης των πρότυπων συστημάτων δεικτών δε διαφέρουν σημαντικά, ωστόσο, ακόμα και οι μικρές αυτές διαφορές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ένα μέσο ευελιξίας του δείκτη. Ρυθμίζοντας κατάλληλα τις παραμέτρους του δείκτη, θα μπορούσε να "προσομοιάσει ιδανικά" την κινητική της ποιοτικής υποβάθμισης προϊόντων τροφίμων, όπου η αλλοίωσή τους πραγματοποιείται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, που πιθανόν η θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξής τους να παραλλάσει.

Σύμφωνα με τον Ταουκίς (2001), ένας δείκτης με μια Εα, η οποία δε διαφέρει περισσότερο από 25 kJ/mol από την Εα της δράσης, που είναι υπεύθυνη για την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά στην πρόβλεψη της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου. Η ενέργεια ενεργοποίησης της ανάπτυξης αλλοιογόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 30 – 120 kJ/mol (Ταουκίς, 2001). Σύμφωνα με διάφορες ερευνητικές μελέτες η Εα του *Brochothrix thermosphacta* στο χοιρινό κιμά συσκευασμένο με χαμηλής διαπερατότητας μεμβράνη είναι 91.9 kJ/mol (Koutsoumanis, 2008), εκείνη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φιλέτα τσιπούρας συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) βρέθηκε 100.2 ± 2.6 kJ/mol (Tsironi et al., 2011), ενώ η ενέργεια ενεργοποίησης των ψευδομονάδων σε βόειο κρέας κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες υπολογίστηκε στα 80.28 kJ/mol (Muermans et al., 1993). Συνεπώς, ο εν λόγω μικροβιακός δείκτης, στηριζόμενοι στην κινητική του μελέτη, φαίνεται πως θα μπορούσε να προβλέψει ικανοποιητικά την ποιοτική υποβάθμιση διάφορων προϊόντων τροφίμων, που αλλοιώνονται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς.

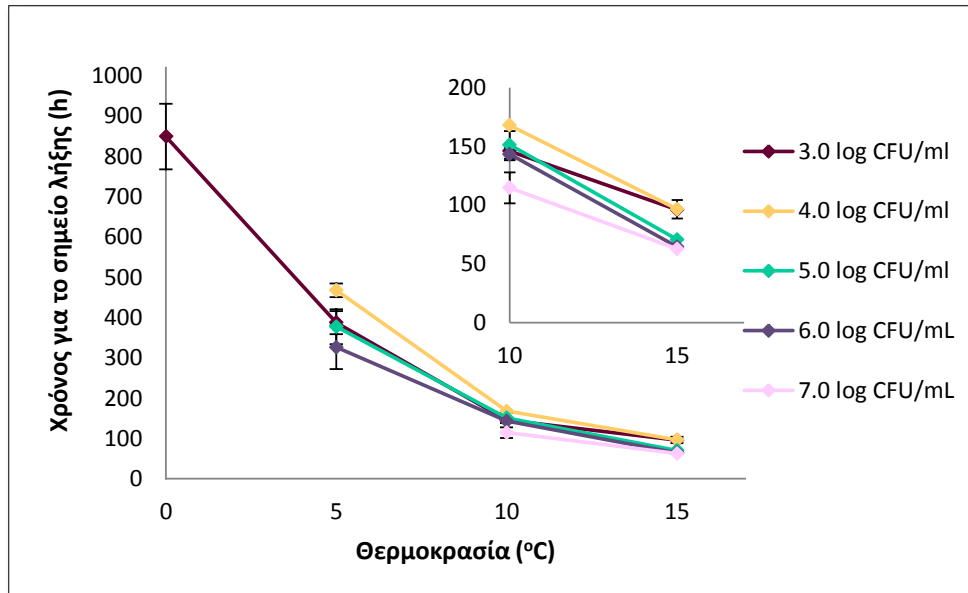
Σημείο Λήξης του δείκτη : 100% ιώδεις αποικίες

Ως σημείο λήξης του δείκτη, όπως αναφέρθηκε, θα μπορούσε να οριστεί εκείνη η χρονική στιγμή κατά την οποία όλες οι αποικίες του ΤΠΙ έχουν αποκτήσει ιώδη χρωματισμό. Με αυτόν τον τρόπο ο μικροβιακός δείκτης θα μπορούσε να αποτυπώσει όλη την πορεία της αλλοίωσης του τροφίμου. Στην αρχή της αλλοίωσης μόνο μερικές αποικίες θα έχουν λάβει ιώδες χρώμα, καθώς ο ειδικός αλλοιογόνος μικροοργανισμός στο τρόφιμο θα αγγίζει πληθυσμούς που θα οδηγούν στην αλλοίωση του προϊόντος το μεγαλύτερο ποσοστό των αποικιών θα έχουν γίνει ιώδεις, ενώ όταν το προϊόν έχει αλλοιωθεί όλες οι αποικίες του δείκτη θα είναι ιώδεις.

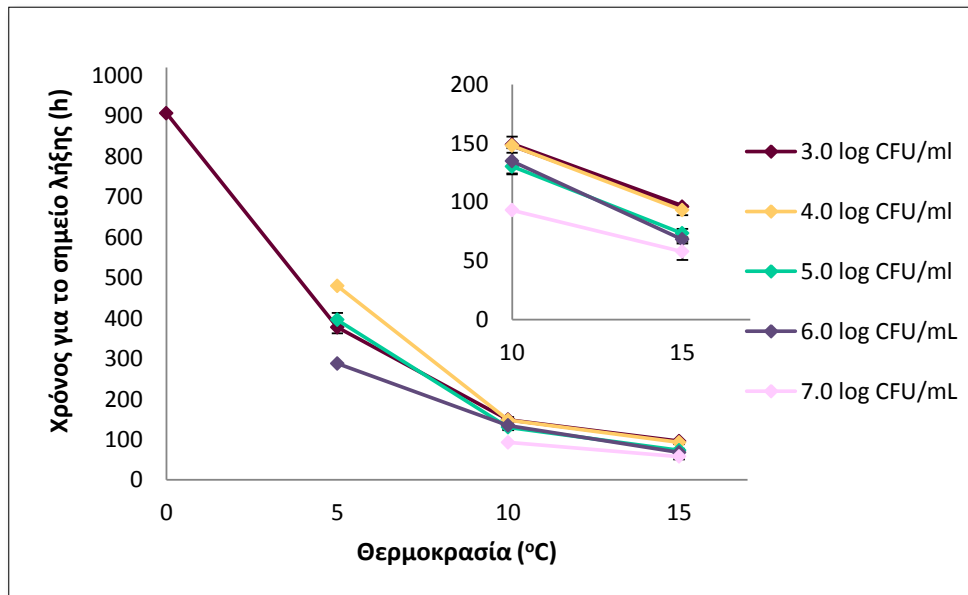
Στα γραφήματα 4.5, που ακολουθεί, παρουσιάζεται η επίδραση της διαφορετικής αρχικής συγκέντρωσης του *Janthinobacterium* sp. στο σημείο λήξης του δείκτη (100% ιώδεις αποικίες) για τα διαφορετικά pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού.



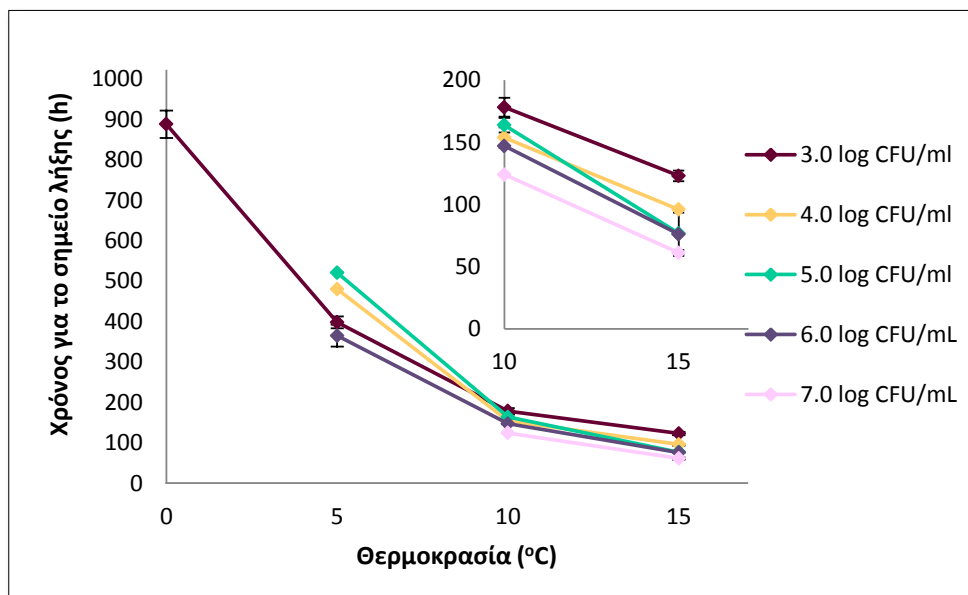
(α) pH: 6.0



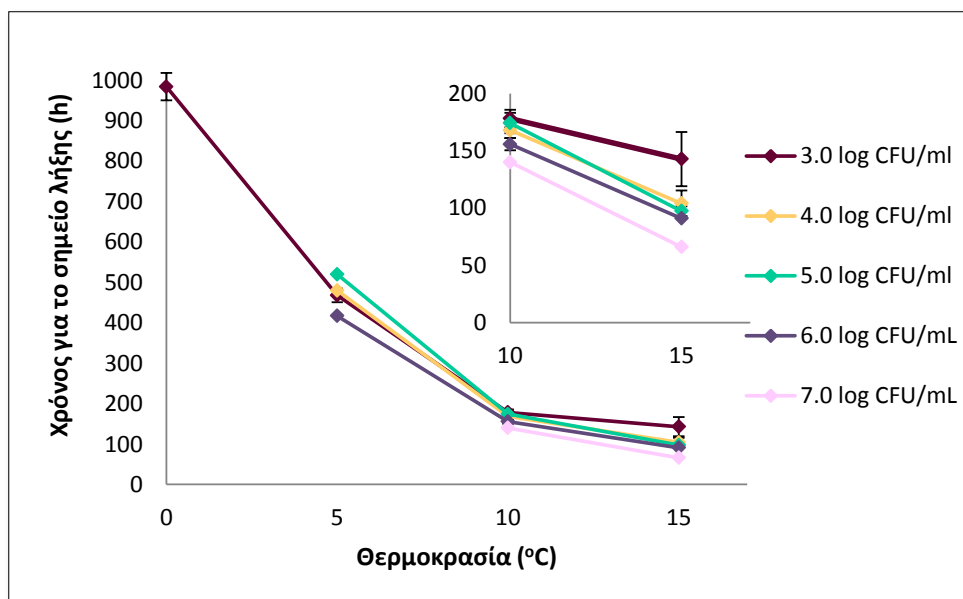
(β) pH: 6.5



(γ) pH: 7.0



(δ) pH: 8.0



(ε) pH:9.0

Γράφημα 4.5: Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του *Janthinobacterium* sp. στο σημείο λήξης του δείκτη (**100% ιώδεις αποικίες**) για τιμές pH (α) 6.0, (β) 6.5, (γ) 7.0, (δ) 8.0 και (ε) 9.0.

*Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων (n=3).

**Στην περίπτωση των 0 °C για αρχική συγκέντρωση *Janthinobacterium* sp. 4.0, 5.0, 6.0 και 7.0 (log CFU/mL), καθώς και για τους 5 °C για αρχική συγκέντρωση *Janthinobacterium* sp. 7.0 (log CFU/mL) δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση ιώδους χρώματος στο 100 % των αποικιών.

Το σημείο λήξης του δείκτη ανεξάρτητα από το αρχικό επίπεδο εμβολιασμού με το *Janthinobacterium* sp. μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας για όλα τα pH, που μελετήθηκαν.

Σχετικά με την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού για το pH 6.0 (γράφημα 4.5, α) παρατηρήθηκε μια μείωση του χρόνου για το σημείο λήξης του ΤΤΙ με την αύξηση του αρχικού πληθυσμού του *Janthinobacterium* sp., η οποία ήταν μεγαλύτερη, καθώς αυξανόταν ο πληθυσμός. Το γεγονός αυτό σημειώθηκε σε όλες τις θερμοκρασίες. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε σε γενικές γραμμές και στα pH 6.5, 7.0, 8.0 και 9.0 για τις θερμοκρασίες των 10 και 15 °C. Αντίθετα, στους 5 °C τα πρότυπα συστήματα ΤΤΙ με αρχικό πληθυσμό του *Janthinobacterium* sp. της τάξης των 3.0 log CFU/mL, είχαν νωρίτερα σημεία λήξης συγκριτικά με εκείνα με αρχικό πληθυσμό 4.0 και 5.0 log CFU/mL. Τα πρότυπα συστήματα ΤΤΙ με αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού 6.0 και 7.0 log CFU/mL έδωσαν σημεία λήξης σε μικρότερους χρόνους, αντίστοιχα, σε όλες τις θερμοκρασίες.

Η επίδραση του pH ακολούθησε το γνώριμο μοτίβο (όπως και στην περίπτωση "1% ιώδεις αποικίες"). Τα πρότυπα συστήματα TTI με pH 6.5 και 7.0 παρουσίασαν νωρίτερα σημεία λήξης σε όλες τις θερμοκρασίες, ακολούθησε το pH 8.0, ενώ εκείνα με pH 6.0 και 9.0 έφτασαν στο σημείο λήξης τους σε μεγαλύτερους χρόνους.

Επιπρόσθετα, σε σχέση με την περίπτωση, όπου ορίσαμε ως σημείο λήξης του δείκτη το "1% ιώδεις αποικίες", στη δεδομένη περίπτωση ο χρόνος για το σημείο λήξης των πρότυπων συστημάτων TTI σε κάθε θερμοκρασία ήταν μεγαλύτερος. Συνεπώς, ο δείκτης με σημείο λήξης, το οποίο αναφέρεται στο "100% ιώδεις αποικίες", θα μπορούσε να στοχεύσει σε ευαλλοίωτα τρόφιμα, που συντηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης, αλλά με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής.

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση του σημείου λήξης του δείκτη περιγράφηκε ικανοποιητικά από την εξίσωση Arrhenius. Οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης για τα διάφορα πρότυπα συστήματα TTI με διαφορετικό αρχικό πληθυσμό *Janthinobacterium* sp. και διαφορετικό pH θρεπτικού μέσου παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.

Οι τιμές της Εα στην περίπτωση αυτή, παρουσίασαν μεγαλύτερη διακύμανση, μεταξύ διαφορετικού επιπέδου αρχικού ενοφθαλμίσματος. Συγκεκριμένα, για αρχική συγκέντρωση *Janthinobacterium* sp. 3.0 και 5.0 log CFU/mL για pH 8.0 και 9.0 παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην Εα. Η μεταβολή του pH, σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, δεν είχε σημαντική επίδραση στην ενέργεια ενεργοποίησης της απόκρισης του δείκτη. Οι τιμές της Εα κυμάνθηκαν σε ένα εύρος μεταξύ 88.2 και 127.7 kJ/mol και οι υψηλότερες τιμές της καταγράφηκαν για τα πρότυπα συστήματα TTI με αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 5.0 log CFU/mL, γεγονός το οποίο δείχνει μεγαλύτερη θερμοκρασιακή εξάρτηση του σημείου λήξης τους σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις, που η Εα κυμάνθηκε σε μικρότερες τιμές.

Να σημειωθεί πως για αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 7.0 log CFU/mL, η εξίσωση Arrhenius εφαρμόστηκε για τις θερμοκρασίες 10 και 15 °C. Για την εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius χρειάζονται τουλάχιστον τρία σημεία (θερμοκρασίες), επομένως το αποτέλεσμα κρίνεται μη αξιόπιστο.

Πίνακας 4.3: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία κατά την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius για την περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στο αντίστροφο της παραμέτρου t_i , σημείο λήξης του δείκτη (**100% ώδεις αποικίες**), για τα πρότυπα συστήματα ΤΤΙ με διαφορετικό pH (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0) και διαφορετική αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 log (CFU/mL)).

Αρχική συγκέντρωση του <i>Janthinobacterium</i> sp. (log CFU/mL)															
3.0			4.0			5.0			6.0			7.0			
pH	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²	Ea (kJ/mol)	1/t _{i ref} (h ⁻¹)	R ²
6.0	96.82 ± 1.44 ^{Aa}	0.0010 ± 0.0000	0.983	95.88 ± 0.00 ^{Aa}	0.0011 ± 0.0000	0.965	115.26 ± 7.44 ^{Aa}	0.0010 ± 0.0001	0.997	104.89 ± 2.46 ^{Aa}	0.0011 ± 0.0000	0.982	105.58 ± 5.18	0.0015 ± 0.0001	1
6.5	98.43 ± 5.01 ^{Aa}	0.0012 ± 0.0001	0.982	105.27 ± 7.77 ^{Aa}	0.0010 ± 0.0001	0.975	111.44 ± 7.75 ^{Aa}	0.0011 ± 0.0001	0.998	107.83 ± 11.16 ^{Aa}	0.0013 ± 0.0003	1	81.41 ± 15.57	0.0025 ± 0.0009	1
7.0	101.70 ± 1.63 ^{Aa}	0.0012 ± 0.0000	0.983	109.51 ± 3.02 ^{Aa}	0.0010 ± 0.0000	0.946	112.40 ± 6.15 ^{Aa}	0.0011 ± 0.0001	0.971	95.99 ± 0.00 ^{Aa}	0.0016 ± 0.0000	1	65.07 ± 16.47	0.0040 ± 0.0010	1
8.0	88.21 ± 1.22 ^{Aa}	0.0012 ± 0.0001	0.980	107.38 ± 0.05 ^{Aab}	0.0010 ± 0.0000	0.950	127.71 ± 14.57 ^{Ab}	0.0008 ± 0.0001	0.976	104.50 ± 4.99 ^{Aab}	0.0012 ± 0.0001	0.993	104.30 ± 6.45	0.0015 ± 0.0003	1
9.0	88.55 ± 6.15 ^{Aa}	0.0011 ± 0.0000	0.957	102.02 ± 7.18 ^{Aab}	0.0010 ± 0.0001	0.960	111.72 ± 2.80 ^{Ab}	0.0009 ± 0.0000	0.973	101.54 ± 2.40 ^{Aab}	0.0011 ± 0.0001	0.975	101.91 ± 0.00	0.0015 ± 0.0000	1

*Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο 3 επαναλήψεων ± τυπική απόκλιση.

** Για αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 4.0, 5.0 και 6.0 (log CFU/mL) η εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius έγινε για θερμοκρασιακό εύρος 5 – 15 °C.

*** Για αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 7.0 (log CFU/mL) η εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius έγινε για θερμοκρασιακό εύρος 10 – 15 °C.

**** Η θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} αναφέρεται στους 273 K (0°C).

***** Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς την παράμετρο pH και διαφορετικά μικρά γράμματα ως προς την παράμετρο αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. (p≤0.05).

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη της ανάπτυξης του μικροβιακού συστήματος ΤΠΙ θα μπορούσαμε να καταλήξουμε στα εξής συμπεράσματα:

1. Η επίδραση των παραμέτρων του δείκτη στην ενέργεια ενεργοποίησης της απόκρισής του δεν ήταν σημαντική για την περίπτωση ορισμού του σημείου λήξης ως 1% ώδεις αποικίες. Συνεπώς, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως η Εα είναι σταθερή ανεξαρτήτως παραμέτρου (pH και επίπεδο ενοφθαλμίσματος). Στην περίπτωση που το σημείο λήξης του δείκτη ορίστηκε ως 100% ώδεις αποικίες, το pH δεν είχε σημαντική επίδραση στην Εα της απόκρισης του δείκτη. Το επίπεδο ενοφθαλμίσματος για τιμές pH 6.0, 6.5 και 7.0 δεν παρουσίασε επίσης σημαντική επίδραση στην Εα, ενώ για τις τιμές pH 8.0 και 9.0 παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές για αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 3.0 και 5.0 log CFU/mL.
2. Το σημείο λήξης του δείκτη διαφοροποιήθηκε με τη μεταβολή της τιμής του pH, ωστόσο η επίδραση αυτή ήταν οριακή.
3. Η αρχική συγκέντρωση με την οποία ενοφθαλμίζεται στο σύστημα το *Janthinobacterium* sp. άσκησε σημαντική επίδραση στο σημείο λήξης του δείκτη, καθώς με αύξησή της παρατηρήθηκε συστηματική μείωση του σε όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες.

Στην περίπτωση του σημείου λήξης του δείκτη 1% ώδεις αποικίες, έχοντας ως δεδομένα πως η Εα είναι σταθερή, ανεξαρτήτως παραμέτρου, και πως το σημείο λήξης του δείκτη επηρεάζεται μόνο από την αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp., πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια εύρεσης μιας βασικής μεθοδολογίας επιλογής του βέλτιστου συστήματος-ΤΠΙ για το εκάστοτε τρόφιμο. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε η τροποποιημένη εξίσωση Arrhenius (εξίσωση 4.1).

$$\ln\left(\frac{1}{t_i}\right) = a + b \cdot N - \frac{Ea}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) \quad \text{εξίσωση 4.1}$$

Όπου: N η αρχική συγκέντρωση με την οποία ενοφθαλμίζεται ο μικροοργανισμός στο σύστημα (log CFU/mL).

Με βάση τα δεδομένα της ανάπτυξης των πρότυπων συστημάτων δεικτών και εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης υπολογίστηκαν οι παράμετροι της εξίσωσης για σημείο λήξης του δείκτη 1% ώδεις αποικίες, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία κατά την εφαρμογή της τροποποιημένης εξίσωσης Arrhenius για σημείο λήξης του δείκτη 1% ώδεις αποικίες.

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή	Τυπικό Σφάλμα
Ea (kJ/mol)	97.84	2.10
α	-6.900	0.057
b	0.119	0.011
RMSE	0.144	

Επομένως, γνωρίζοντας τη διάρκεια ζωής του τροφίμου – στόχου σε μια θερμοκρασία αναφοράς, με εφαρμογή της εξίσωσης 4.1 προκύπτει η βέλτιστη αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp., που απαιτείται, προκειμένου το ΤΤΙ (με σημείο λήξης 1% ώδεις αποικίες) να μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά την αλλοίωση που συμβαίνει στο τρόφιμο. Απαραίτητο ωστόσο είναι η θερμοκρασιακή εξάρτηση της δράσης, υπεύθυνης για την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου, να είναι παρόμοια με τη θερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης του δείκτη.

Όσον αφορά το σημείο λήξης του δείκτη 100% ώδεις αποικίες, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μια παρόμοια μεθοδολογία επιλογής του βέλτιστου ΤΤΙ. Στην περίπτωση αυτή, λόγω του γεγονότος ότι το επίπεδο ενοφθαλμίσματος για συγκεκριμένες τιμές pH έχει σημαντική επίδραση στην Ea, η εφαρμογή της εξίσωσης θα γινόταν σε ένα μικρότερο εύρος τιμών pH (6.0 – 7.0), όπου η Ea θα μπορούσε να θεωρηθεί σταθερή.

Η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης του δείκτη κυμάνθηκε σε ένα εύρος μεταξύ 84.0 – 108.6 kJ/mol (99.25 ± 6.41) ορίζοντας ως σημείο λήξης του δείκτη το 1% ώδεις αποικίες και μεταξύ 88.2 – 127.7 kJ/mol (102.46 ± 11.70) για σημείο λήξης του δείκτη το 100% ώδεις αποικίες. Οι τιμές αυτές τις ενέργειας ενεργοποίησης είναι κοντά στις Ea άλλων δεικτών, όπως i) του πειραματικού μικροβιακού ΤΤΙ, που στηρίζεται στην ανάπτυξη του *L. sakei* με Ea 111.90 kJ/mol (Vaikousi et al., 2009), ii) ενός προτεινόμενου ενζυμικού ΤΤΙ βασιζόμενο στο ένζυμο της αμυλάσης (Yan et al., 2008) με Ea μεταξύ 102.74 kJ/mol και 114.59 kJ/mol ανάλογα τον τύπο του δείκτη (ΤΤΙ#1 – ΤΤΙ#4), iii) του ενζυμικού ΤΤΙ της Vitsab (VITSAB A.B., Malmo, Sweden) και συγκεκριμένα του Checkpoint M4-10 με Ea 94.8 ± 9.9 kJ/mol (Tsironi et al., 2008), iv) του δείκτη OnVu™ (OnVu A1) (Ciba Specialty Chemicals & Freshpoint, SW), ο οποίος στηρίζεται σε φωτοχημική αντίδραση, με Ea 139.6 ± 19.5 kJ/mol (Tsironi et al., 2008), v) του δείκτη της εταιρίας Lifelines, Freshness Monitor, με Ea 86 kJ/mol (Taoukis and Labuza, 1989), vi) των δεικτών της Monitor Mark με Ea που κυμαίνονται στο εύρος 96.30 - 129.79 kJ/mol (Shimoni et al., 2001).

Ο εν λόγω δείκτης, επομένως, δύναται να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της μικροβιακής αλλοίωσης ευαλλοίωτων τροφίμων, επισημαίνοντας τις περιπτώσεις αυξημένης ποιοτικής υποβάθμισης λόγω της πιθανής ανεπάρκειας της ψυκτικής αλυσίδα.

4.2 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ – ΕΦΑΡΜΟΦΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΤΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΒΟΕΙΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Μετά την ανάπτυξη του μικροβιακού δείκτη, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 4.1, επόμενος στόχος ήταν να εξεταστεί η αποτελεσματικότητά του κατά την εφαρμογή του, στην παρακολούθηση της αλλοίωσης ενός φρέσκου προϊόντος τροφίμου, τόσο σε ισόθερμες, όσο και σε δυναμικές συνθήκες συντήρησης.

Σύμφωνα με τη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε, για την ανάπτυξη του μικροβιακού δείκτη, η ενέργεια ενεργοποίησης των διάφορων πρότυπων συστημάτων δεικτών (καθορισμένη αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. και τιμή pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης) βρίσκεται κοντά σ' εκείνη της ποιοτικής υποβάθμισης προϊόντων, που αλλοιώνονται λόγω της μικροβιακής ανάπτυξης. Ο εν λόγω δείκτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αλλοίωσης διάφορων κατηγοριών τροφίμων, που συντηρούνται υπό ψύξη, παρουσιάζουν διαφορετική διάρκεια ζωής και πιθανόν αλλοιώνονται από διαφορετικό ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό, καθώς μεταβάλλοντας τις παραμέτρους του, και συγκεκριμένα την αρχική συγκέντρωση με την οποία ενοφθαλμίζεται ο μικροοργανισμός στο σύστημα και σε μικρότερο βαθμό την τιμή pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του, το σημείο λήξης του ΤΤΙ μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με τη διάρκεια ζωής του τροφίμου – στόχου.

Σε συνδυασμό των αποτελεσμάτων της ενότητας 4.1 και δεδομένων της βιβλιογραφίας, το πρότυπο σύστημα ΤΤΙ με αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 6.0 log CFU/mL, τιμή pH ίση με 7.0 και θεωρώντας ως σημείο λήξης το 1% ώδεις αποικίες, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της μικροβιακής αλλοίωσης βόειου κρέατος, το οποίο συντηρείται υπό αερόβιες συνθήκες.

Το κρέας, λόγω της χημικής του σύνθεσης, αποτελεί ένα τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας, ενώ ταυτόχρονα είναι ένα προϊόν ιδιαίτερα ευπαθές και ευαλλοίωτο (Doulgeraki et al., 2012). Η αλλοίωση του αποτελεί ένα οικολογικό φαινόμενο, το οποίο επιφέρει αλλαγές στη φυσική, χημική και βιοχημική σύστασή του, ως αποτέλεσμα της

αύξησης των βακτηρίων, που βρίσκονται στην επιφάνειά του (Doulgeraki et al., 2012, Fung, 2010). Η αρχική μικροχλωρίδα του κρέατος αποτελείται από τη φυσική (ενδογενή) μικροχλωρίδα και την περιβαλλοντική μόλυνση κατά το χειρισμό του (εξωγενή χλωρίδα), ενώ ένα μόνο μικρό κλάσμα της αρχικής χλωρίδας είναι ικανό να αναπτυχθεί και να φτάσει σε υψηλούς πληθυσμούς με συνέπεια την αλλοίωση του προϊόντος (Nychas et al., 2008, Νυχάς). Η επικράτηση ενός συγκεκριμένου κλάσματος της μικροχλωρίδας του κρέατος, που θα αποτελέσει τον ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό (SSO), εξαρτάται από παράγοντες που υφίστανται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, της μεταφοράς και της αποθήκευσής του (Nychas and Skandamis, 2005).

Η επιβίωση και η ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο φρέσκο κρέας επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη σύνθεση των αερίων, που περιβάλλουν το προϊόν. Έτσι, στο φρέσκο κρέας κατά την αερόβια συντήρησή του σε χαμηλές θερμοκρασίες, βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Moraxella* και *Acinetobacter* αποτελούν την κυριότερη αλλοιογόνο μικροβιακή χλωρίδα, με τις ψευδομονάδες, και συγκεκριμένα τα είδη *P. fragi*, *P. lundensis* και *P. fluorescens*, να αποτελούν τον πλέον ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό, λόγω του μεγαλύτερου ρυθμού ανάπτυξής τους και της μεγαλύτερης συγγένειάς τους για οξυγόνο (Nychas and Drosinos, 2014, Doulgeraki et al., 2012). Η συγγενής στις ψευδομονάδες, *Shewanella putrefaciens*, επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση του νωπού κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες, ωστόσο σύμφωνα με τους Gram και Dalgaard (2002) φαίνεται ότι η ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp. δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη της χάρη στην ικανότητα των πρώτων να παράγουν σιδηροφόρες ουσίες (siderophores) και να χρησιμοποιούν τη γλυκόζη με ταχύτερο ρυθμό. Ο ψυχρότροφος, προαιρετικά αναερόβιος *Brochothrix thermosphacta*, επίσης αποτελεί μέρος της αλλοιογόνου χλωρίδας του κρέατος κατά την αερόβια συντήρησή του, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι οι ψευδομονάδες μπορούν να διαδραματίσουν συνεργιστικό ρόλο στην ανάπτυξή του (Paramithiotis et al., 2009). Εκτός από τους παραπάνω μικροοργανισμούς ψυχρότροφα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του κρέατος, που συντηρείται αερόβια. Τα βακτήρια αυτά, αν και δε συμμετέχουν ιδιαίτερα στην αλλοίωση του κρέατος, αποτελούν δείκτες υγιεινής του προϊόντος (Nychas and Skandamis, 2005), ενώ η αλλοιογόνος δράση τους είναι μέγιστη σε κρέας με τιμές pH μεγαλύτερες του 6.0 και σε θερμοκρασίες συντήρησης σημαντικά υψηλότερες από τις συνήθεις θερμοκρασίες ψύξης (Νυχάς).

Η οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος επέρχεται λόγω δυσσομίας (off-odour), η οποία μπορεί να εντοπιστεί, όταν οι ψευδομονάδες υπερβούν πληθυσμούς της τάξης των 10^7 CFU/cm² και εμφάνισης βακτηριακής γλίτσας (slime), η οποία παρατηρείται σε πληθυσμιακά επίπεδα άνω των 10^8 CFU/cm² (Nychas and Drosinos, 2014). Οι ψευδομονάδες καταβολίζουν διαδοχικά την D-γλυκόζη και το L- και D-γαλακτικό οξύ, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η χρήση των αμινοξέων και των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την παραγωγή διάφορων δύσοσμων προϊόντων, όπως αμίνες, σουλφίδια και εστέρες (Paramithiotis et al., 2009, Nychas et al., 2008). Επίσης, από τον καταβολισμό της κρεατίνης και της κρεατινίνης παράγεται αμμωνία, η οποία αποτελεί και τον κύριο λόγο της αύξησης του pH του κρέατος (Nychas and Drosinos, 2014).

Οι αλλαγές των συγκεντρώσεων του O₂ και του CO₂ στη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα προσδιορίζουν το είδος της αλλοίωσης και το χρόνο ζωής του συσκευασμένου προϊόντος, καθώς προκαλείται μερική ή ολοκληρωτική παρεμπόδιση των γρήγορα αναπτυσσόμενων ψευδομονάδων και επικράτηση των αργά αναπτυσσόμενων οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *Brochothrix thermosphacta* (Paramithiotis et al., 2009, Nychas and Skandamis, 2005). Εκτός από τη σύνθεση των αερίων στη συσκευασία του κρέατος, που καθορίζει τον μικροβιακό πληθυσμό, που θα επικρατήσει, η θερμοκρασία αποθήκευσης θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας, που θα έχει επίδραση στην αλλοίωση του κρέατος, επηρεάζοντας τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής, τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και τους τελικούς αριθμούς κυττάρων των μικροοργανισμών (Koutsoumanis and Taoukis, 2005, Labuza και Fu, 1993).

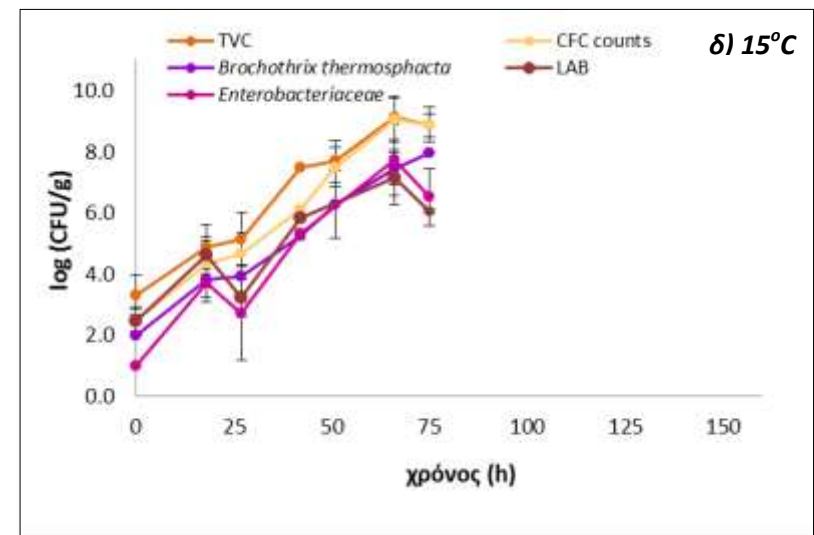
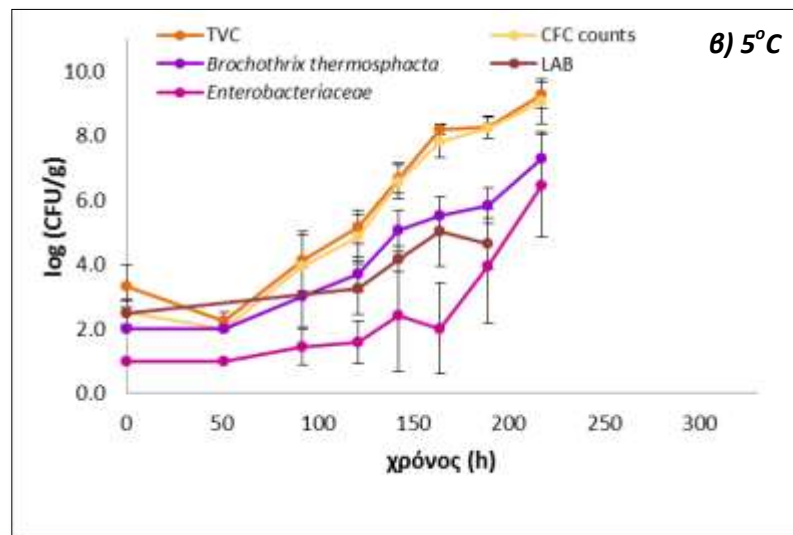
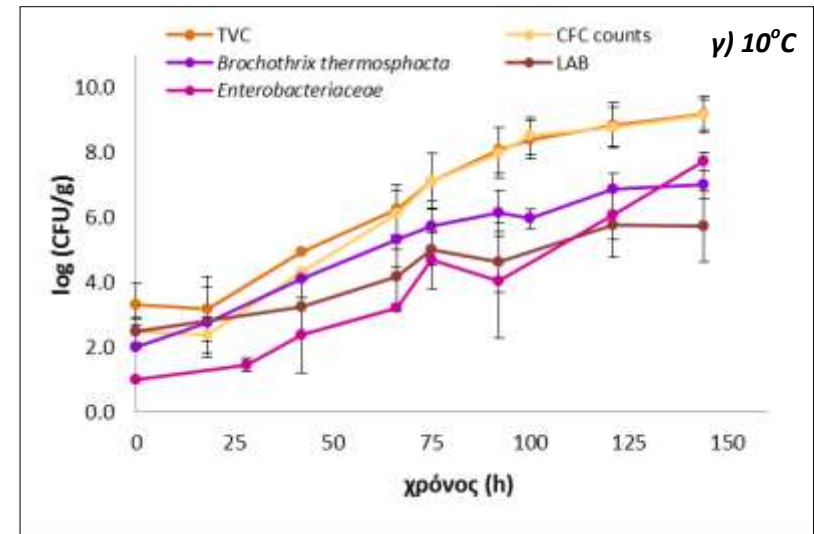
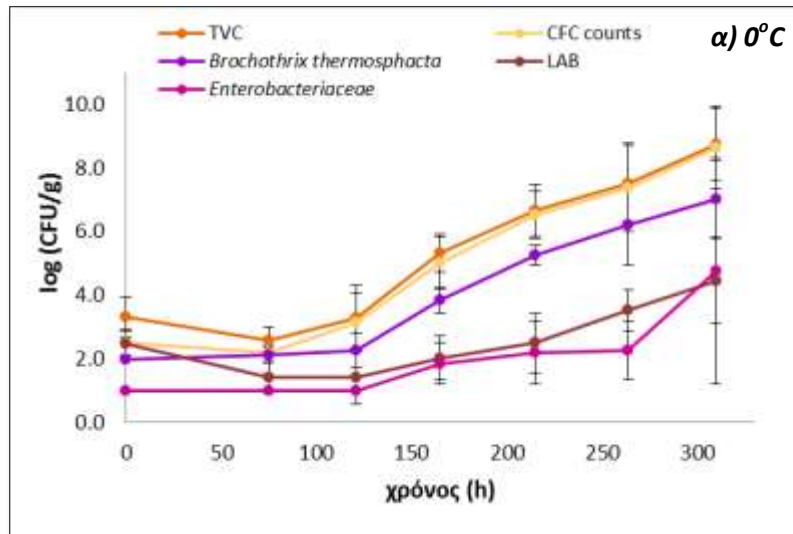
Η πιθανή λοιπόν χρήση του στηριζόμενου στην αύξηση του *Janthinobacterium* sp. και την παραγωγή βιολασεΐνης, ΤΠΙ θα μπορούσε να συμβάλλει αποτελεσματικά στη συνεχή καταγραφή του θερμοκρασιακού ιστορικού προϊόντων κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια της ψυκτικής αλυσίδας, από τη διανομή, το λιανικό εμπόριο μέχρι και τη συντήρησή τους στο ψυγείο του καταναλωτή, όπου οι θερμοκρασιακές συνθήκες, που επικρατούν, είναι έντονα κυμαινόμενες.

Για την επιτυχή εφαρμογή του δείκτη στην παρακολούθηση της αλλοίωσης του βόειου κρέατος, απαραίτητη είναι η γνώση της κινητικής της απόκρισής του, καθώς και η κινητική μελέτη της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου. Η απόκριση του ΤΠΙ θα πρέπει να σχετίζεται άμεσα με τη διεργασία της ποιοτικής υποβάθμισης του τροφίμου και η θερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης του δείκτη θα πρέπει να είναι παρόμοια με εκείνη της δράσης, που είναι υπεύθυνη για την ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου, και

συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη, με τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης του ειδικού αλλοιογόνου μικροοργανισμού.

4.2.1 Αλλοίωση του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες

Τα πειραματικά δεδομένα της ανάπτυξης των διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος, που προέκυψαν κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες στους 0, 5, 10 και 15 °C, παρουσιάζονται στο γράφημα 4.6.



Γράφημα 4.6: Καμπύλες ανάπτυξης των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος κατά την αερόβια συντήρηση του στους α) 0 °C, β) 5 °C, γ) 10 °C και δ) 15 °C.

*Οι καμπύλες ανάπτυξης αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων επαναλήψεων (n=4).

**Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για τον *Brochothrix thermosphacta* και των CFC counts είναι 2.0 log CFU/g, ενώ για τα Οξυγαλακτικά βακτήρια και τα Εντεροβακτήρια είναι 1.0 log CFU/g.

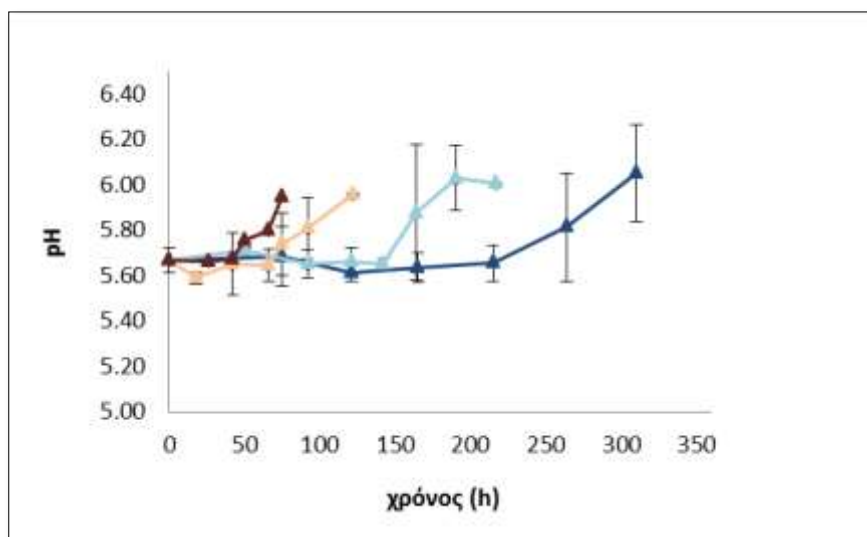
Όπως παρατηρείται από το γράφημα 4.6, οι ψευδομονάδες (CFC counts) αποτέλεσαν τον κυρίαρχο αλλοιογόνο μικροοργανισμό (SSO) κατά τη συντήρηση του βόειου κρέατος υπό αερόβιες συνθήκες, καθώς σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης η αύξησή τους ταυτίστηκε με την αύξηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (TVC). Η επικράτηση των ψευδομονάδων κατά τη συντήρηση του κρέατος σε συνθήκες ψύξης παρουσία αέρα, έχει αναφερθεί επανειλημμένα στη βιβλιογραφία (Nychas and Drosinos, 2014, Doulgeraki et al., 2012). Συγκεκριμένα, οι ψευδομονάδες ξεκίνησαν από έναν αρχικό πληθυσμό 2.5 log CFU/g στο φρέσκο κρέας, αυξήθηκαν με γρήγορο ρυθμό και έφθασαν σε αρκετά υψηλούς πληθυσμούς, της τάξης των 9.0 – 9.5 log CFU/g, στο τέλος της περιόδου συντήρησης επιφέροντας την αλλοίωση. Η αλλοίωση, που επέφεραν στο κρέας χαρακτηρίστηκε από έντονες σηπτικές οσμές και από επιφανειακή γλίτσα, όπως παρατηρήθηκε σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση, γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα (Nychas and Drosinos, 2014). Αξίζει να σημειωθεί πως η θερμοκρασία συντήρησης φάνηκε να μην είχε σημαντική επίδραση στη μέγιστη συγκέντρωση των ψευδομονάδων, αφού σε όλες τις θερμοκρασίες οι ψευδομονάδες έφθασαν υψηλούς πληθυσμούς.

Την ανάπτυξη των ψευδομονάδων ακολούθησε ο *Brochothrix thermosphacta*, ο οποίος ξεκίνησε από έναν αρχικό πληθυσμό 2.0 log CFU/g και έφθασε πληθυσμούς της τάξης των 7.0 – 7.5 log CFU/g στο τέλος της συντήρησης του προϊόντος.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) σημείωσαν χαμηλούς πληθυσμούς κατά τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος με εξαίρεση τους 15 °C, όπου, αν και ο ρυθμός αύξησής τους ήταν αργός, άγγιξαν πληθυσμούς της τάξης των 8.0 log CFU/g στο τέλος της συντήρησης του κρέατος. Τα οξυγαλακτικά αποτελούν αναερόβια βακτήρια και είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικά σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή κενού, όπου και συνιστούν ως επί το πλείστον τον κυρίαρχο αλλοιογόνο μικροοργανισμό (Nychas and Skandamis, 2005).

Τέλος, τα εντεροβακτήρια παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα κατά τη συντήρηση του κρέατος στις χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ στους 10 και 15 °C σημείωσαν πληθυσμούς της τάξης των 7.0 log CFU/g στο τέλος της περιόδου συντήρησης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία η αλλοιογόνος δράση των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* είναι μέγιστη σε θερμοκρασίες συντήρησης σημαντικά μεγαλύτερες από τις συνήθεις θερμοκρασίες ψύξης και σε κρέας με τιμή pH μεγαλύτερη του 6.0 (Νυχάς). Το pH του προϊόντος, όπως παρατηρείται και στο γράφημα

4.7, που ακολουθεί, στο τέλος της περιόδου συντήρησης κυμάνθηκε στο 6.0, συνεπώς στο γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται η απότομη αύξηση των εντεροβακτηρίων.



Γράφημα 4.7: Μεταβολή του pH του βόειου κρέατος κατά την ισόθερμη συντήρησή του στους 0, 5, 10 και 15 °C.

*Οι καμπύλες μεταβολής του pH αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων επαναλήψεων (n=4).

Το αρχικό pH του βόειου κρέατος ήταν 5.67 ± 0.06 , ενώ προς το τέλος της συντήρησής του, σε όλες τις θερμοκρασίες παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση. Συγκεκριμένα, στο τέλος της περιόδου συντήρησης του προϊόντος και αφού είχε επέλθει η αλλοίωση (οι ψευδομονάδες είχαν αγγίξει πληθυσμούς της τάξης των $9.0 \log \text{CFU/g}$), οι τιμές pH ήταν κοντά στο 6.00 ± 0.05 σε όλες τις θερμοκρασίες. Η αύξηση του pH οφείλεται κυρίως σε μεταβολικά προϊόντα των ψευδομονάδων, όπως η αμμωνία (Nychas and Drosinos, 2014).

Τα πειραματικά δεδομένα της ανάπτυξης των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος, κατά τη συντήρηση του σε ισόθερμες συνθήκες, προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi και Roberts (1994) για την εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων του και συγκεκριμένα της αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων, N_{\min} (CFU/g), του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, μ_{\max} (h^{-1}), της διάρκειας της φάσης προσαρμογής, lag phase (h) και της μέγιστης συγκέντρωσης του βακτηριακού πληθυσμού, N_{\max} (CFU/g). Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των ομάδων μικροοργανισμών, που μελετήθηκαν, κατά τη συντήρηση του προϊόντός σε ισόθερμες συνθήκες, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.5: Μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης, μ_{\max} (h^{-1}), για τις διάφορες ομάδες μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος, στις θερμοκρασίες συντήρησης 0 – 15 °C, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του μοντέλου Baranyi και Roberts.

T(°C)	μ_{\max} (h^{-1})			
	Ψευδομονάδες	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Οξυγαλακτικά Βακτήρια	Εντεροβακτήρια
0	0.035±0.003	0.03±0.002	0.017±0.005	0.016±0.005
5	0.061±0.012	0.045±0.005	0.026±0.016	0.032±0.012
10	0.097±0.005	0.075±0.006	0.047±0.016	0.083±0.006
15	0.183±0.009	0.159±0.016	0.136±0.040	0.157±0.039

*Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο ± τυπική απόκλιση.

Οι τιμές των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης, μ_{\max} , όπως αυτές εκτιμήθηκαν από το πρωτογενές μοντέλο Baranyi και Roberts, προσαρμόστηκαν στο δευτερογενές μοντέλο Arrhenius. Προέκυψαν λοιπόν οι τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης, E_a , η οποία εκφράζει τη θερμοκρασιακή ευαισθησία των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.6: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν κατά την εφαρμογή του μοντέλου Arrhenius.

Ομάδα μικροοργανισμών	E_a (kJ/mol)	μ_{ref} (h^{-1})	R^2
Ψευδομονάδες	73.45 ± 5.37	0.034 ± 0.004	0.996
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	74.03 ± 5.72	0.030 ± 0.006	0.969
Οξυγαλακτικά βακτήρια	94.51 ± 2.01	0.015 ± 0.007	0.963
Εντεροβακτήρια	96.69 ± 17.62	0.017 ± 0.002	0.997

*Οι τιμές της E_a εκφράζουν την επίδραση της θερμοκρασίας στο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των ομάδων μικροοργανισμών, που μελετήθηκαν, κατά την αλλοίωση του βόειου κρέατος υπό αερόβιες συνθήκες συντήρησης. Η τιμή μ_{ref} αναφέρεται στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης στη θερμοκρασία αναφοράς ($T_{ref} = 273K$).

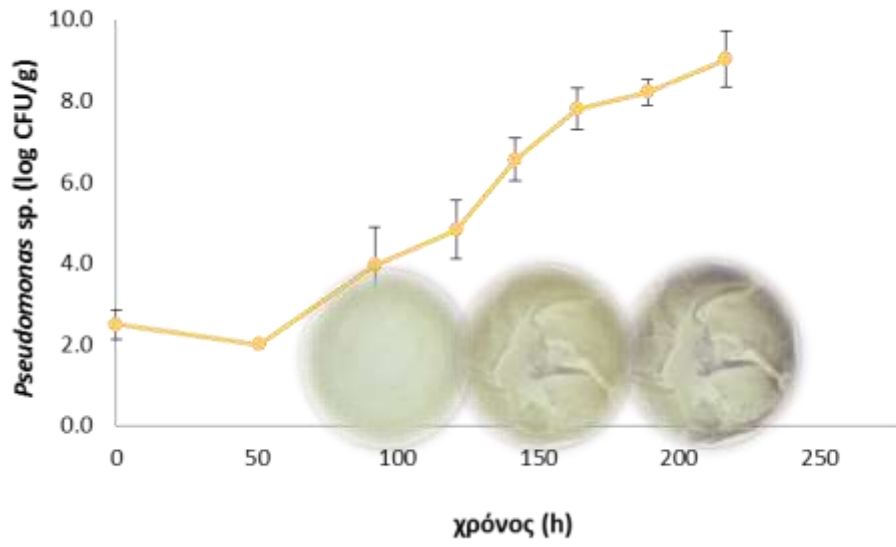
**Τα αποτελέσματα αναφέρονται στο μέσο όρο ± τυπική απόκλιση.

Η αλλοίωση του κρέατος, που συντηρείται υπό αερόβιες συνθήκες, επέρχεται, όταν ο πληθυσμός των ψευδομονάδων είναι της τάξης των 7.0 – 8.0 log CFU/g. Στηριζόμενοι σε αυτό, καθώς και στην οργανοληπτική αξιολόγηση του κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησής του, προέκυψε ο χρόνος λήξης της διάρκειας ζωής του προϊόντος για κάθε θερμοκρασία συντήρησης. Η ανάπτυξη και η μεταβολική δραστηριότητα των ψευδομονάδων στο βόειο κρέας συνεισέφερε σε σημαντικό βαθμό στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος με αποτέλεσμα την τελική απόρριψή του. Συγκεκριμένα, η διάρκεια ζωής του προϊόντος εκτιμήθηκε στις 11.3 ημέρες (271.80 h \pm 19.89 h) για τη συντήρησή του στους 0 °C, στις 7 ημέρες (169 h \pm 10 h) για τους 5 °C, στις 4.2 ημέρες (102 h \pm 7 h) για τους 10 °C και στις 2.4 ημέρες (57 h \pm 9 h) για τους 15 °C.

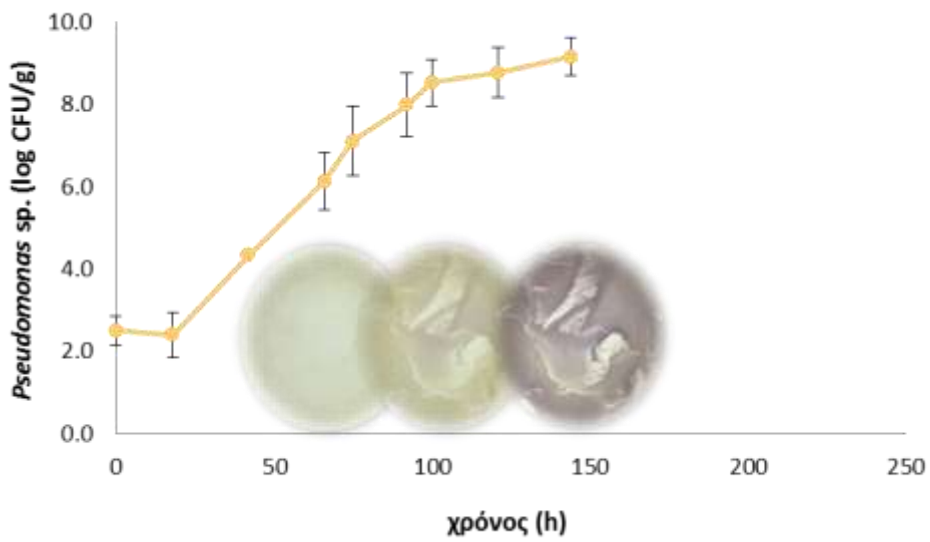
4.2.2 Συσχέτιση της απόκρισης του μικροβιακού ΤΤΙ με την αλλοίωση του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες

Δεδομένης της επικράτησης των ψευδομονάδων κατά την αλλοίωση του βόειου κρέατος υπό αερόβιες συνθήκες, ο επόμενος στόχος της μελέτης αφορούσε τη διερεύνηση της πιθανής χρήσης του ΤΤΙ στην παρακολούθηση της ποιοτικής υποβάθμισης του προϊόντος. Το πρότυπο σύστημα ΤΤΙ με αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. 6.0 log CFU/mL και τιμή pH ίση με 7.0, αποθηκεύτηκε στις ίδιες ισόθερμες συνθήκες (0, 5, 10 και 15 °C) μαζί με το βόειο κρέας.

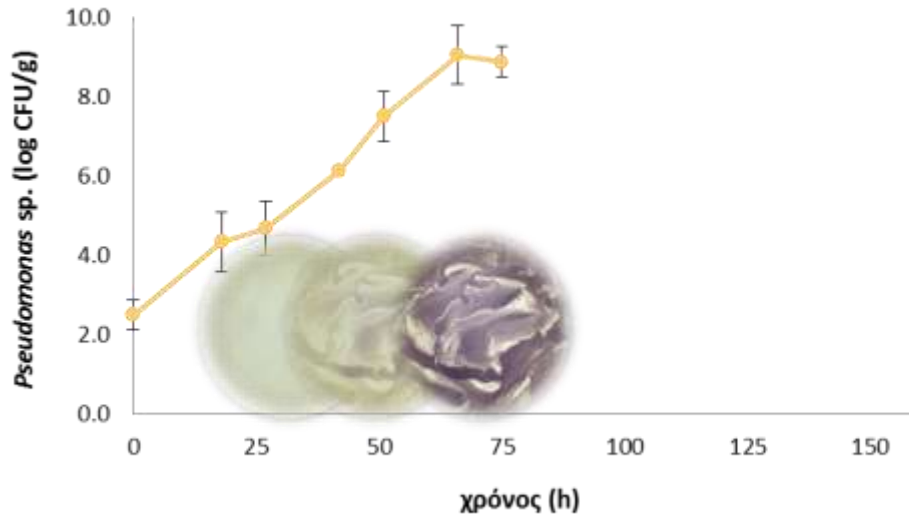
Όπως αποδείχθηκε υπήρξε αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ της χρονικής στιγμής, όπου επήλθε η αλλοίωση του προϊόντος, δηλαδή οι ψευδομονάδες σημείωσαν πληθυσμούς της τάξης των 8.0 log CFU/mL, και του σημείου λήξης του ΤΤΙ σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσαν οι 0 °C, όπου δεν παρατηρείται εμφάνιση της βιολασεΐνης, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 4.1.2.2 της ανάπτυξης του μικροβιακού ΤΤΙ. Στο γράφημα 4.8, που ακολουθεί, παρουσιάζεται η ανάπτυξη των ψευδομονάδων στους 5, 10 και 15 °C και κάποιες αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του πρότυπου συστήματος δείκτη, οι οποίες δείχνουν την εξέλιξη της εμφάνισης του ιώδους χρώματος στις αποικίες (ιώδους απόχρωσης στο τρυβλίο) με το χρόνο, κατά την ταυτόχρονη συντήρησή του ΤΤΙ με το βόειο κρέας στις ίδιες ισόθερμες συνθήκες. Το σημείο λήξης του δείκτη έχει οριστεί ως η χρονική στιγμή κατά την οποία εμφανίζεται η πρώτη ιώδης απόχρωση στο τρυβλίο (1% ιώδεις αποικίες).



(α) 5 °C



(β) 10 °C

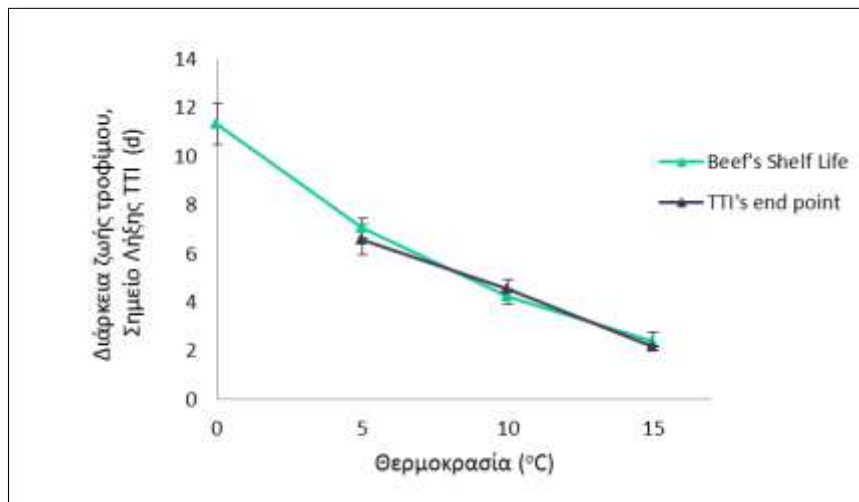


(γ) 15 °C

Γράφημα 4.8: Ανάπτυξη των ψευδομονάδων (SSO) στο βόειο κρέας και χρωματική εξέλιξη του πρότυπου συστήματος TTI με το χρόνο κατά την ισόθερμη συντήρησή τους στους (α) 5 °C, (β) 10 °C και (γ) 15 °C.

*Πρότυπο σύστημα TTI: τρυβλία με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSA + 1% (w/v) γλυκερόλη και τιμή pH 7.0 ενοφθαλμισμένο με αρχική συγκέντρωση *Janthinobacterium* sp. 6.0 log CFU/mL.

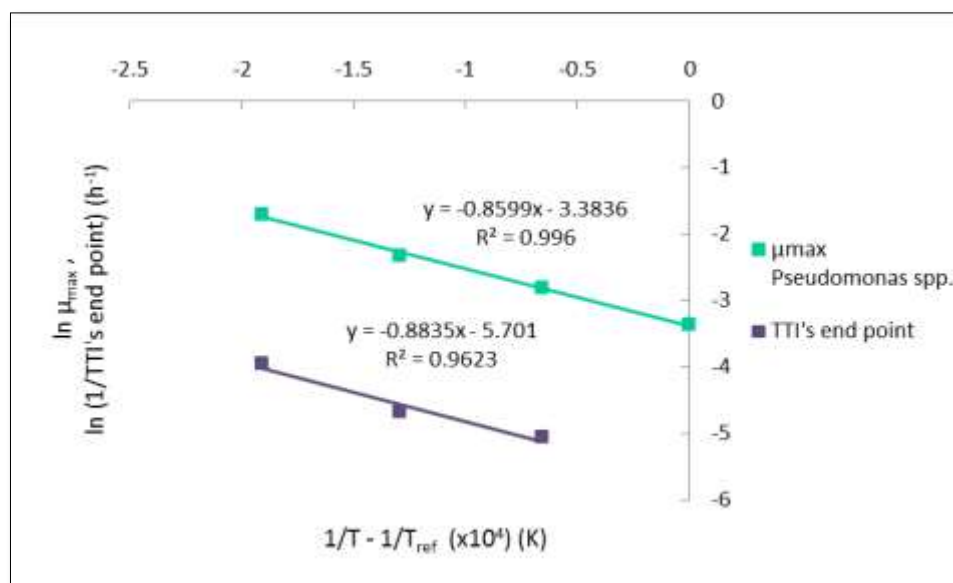
**Η εμφάνιση της πρώτης ιώδους απόχρωσης σηματοδοτεί το σημείο λήξης του δείκτη.



Γράφημα 4.9: Διάρκεια ζωής του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες και σημείο λήξης του δείκτη για το εύρος θερμοκρασιών 0 – 15 °C.

Αυξανόμενης της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την εμφάνιση του χρώματος του δείκτη και κατά συνέπεια συντομότερα σημεία λήξης. Στο γράφημα 4.9 αποτυπώνεται η συμφωνία της απόκρισης του δείκτη με την αλλοίωση του προϊόντος, όπως προαναφέρθηκε. Για τις θερμοκρασίες 5, 10 και 15 °C το σημείο λήξης του δείκτη σχεδόν ταυτίστηκε με το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος.

Η ενέργεια ενεργοποίησης του πρότυπου συστήματος ΤΤΙ, η οποία εκφράζει την επίδραση της θερμοκρασίας στο σημείο λήξης του δείκτη, εκτιμήθηκε στα 73.45 ± 5.37 kJ/mol ($\mu_{ref} = 0.0033$ και $R^2 = 0.962$). Η ενέργεια ενεργοποίησης του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης των ψευδομονάδων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αλλοίωση του βόειου κρέατος κατά την αερόβια συντήρησή του, εκτιμήθηκε στα 71.49 ± 4.92 kJ/mol ($\mu_{ref} = 0.034$ και $R^2 = 0.996$). Οι εφάμιλλες τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης στα δύο συστήματα υποδηλώνουν όμοια θερμοκρασιακή εξάρταση τόσο της αλλοίωσης, που συμβαίνει στο βόειο κρέας, όσο και της απόκρισης του ΤΤΙ. Το γεγονός αυτό φαίνεται και από τις παράλληλες καμπύλες Arrhenius, που δείχνουν τη μεταβολή των ρυθμών ανάπτυξης των ψευδομονάδων στο βόειο κρέας και του αντιστρόφου του χρόνου που απαιτείται για το σημείο λήξης του δείκτη ως συνάρτηση της θερμοκρασίας (γράφημα 4.10).



Γράφημα 4.10: Καμπύλες Arrhenius. Θερμοκρασιακή εξάρτηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των ψευδομονάδων στο βόειο κρέας και της απόκρισης του ΤΤΙ.

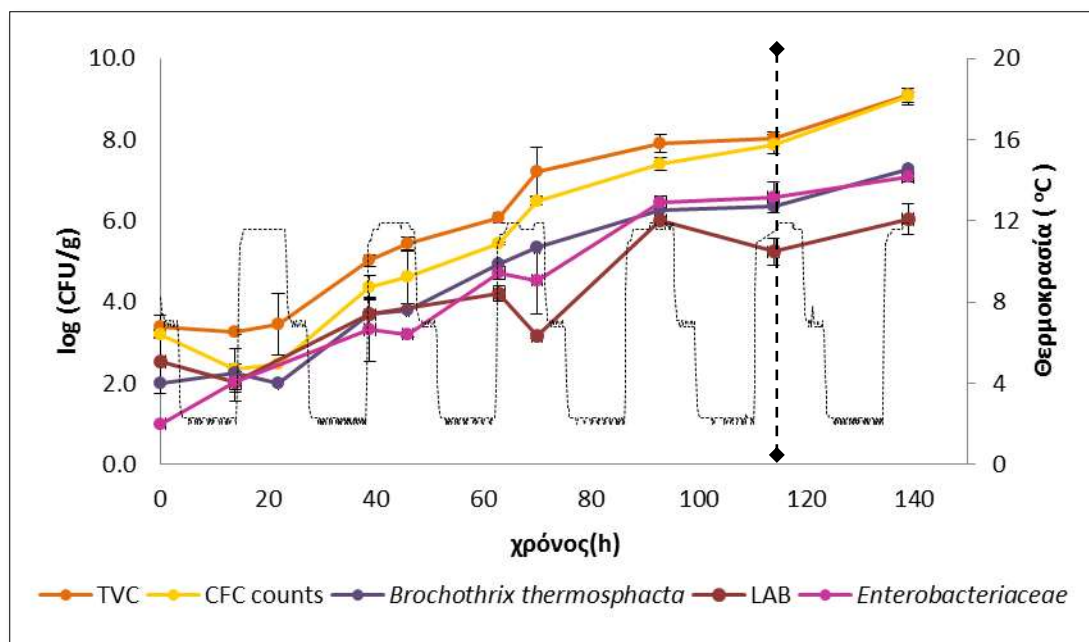
Εν κατακλείδι, κατά τη διερεύνηση της εφαρμογής του πρότυπου συστήματος ΤΤΙ στην παρακολούθηση της μικροβιακής αλλοίωσης του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες, παρατηρήθηκε πως το σημείο λήξης του δείκτη σχεδόν ταυτίζεται με το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος για τις θερμοκρασίες 5, 10 και 15 °C και πως τα δύο συστήματα παρουσιάζουν όμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση, η οποία αποτυπώνεται στις πολύ κοντινές τιμές της Εα. Μάλιστα η διαφορά των ενεργειών ενεργοποίησης των δύο συστημάτων είναι πολύ μικρότερη των 25 kJ/mol, κριτήριο για την αποτελεσματική εφαρμογή του δείκτη στην παρακολούθηση της υποβάθμισης της ποιότητας του τροφίμου (Ταουκίς, 2001). Συνεπώς, εκπληρώνονται οι δύο βασικές προϋποθέσεις για την αποτελεσματική και αξιόπιστη εφαρμογή του δείκτη.

4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΤΤΙ ΣΕ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

Μετά την αξιολόγηση της δυνατότητας εφαρμογής του ΤΤΙ στην αλλοίωση του βόειου κρέατος σε ισόθερμες συνθήκες συντήρησης, κρίθηκε αναγκαία η εφαρμογή του και κάτω από δυναμικές συνθήκες συντήρησης, σε μια προσπάθεια προσομοίωσης των θερμοκρασιακών συνθηκών που επικρατούν στην ψυκτική αλυσίδα, οι οποίες είναι έντονα μεταβαλλόμενες.

Δείγματα βόειου κρέατος και πρότυπου συστήματος ΤΤΙ συντηρήθηκαν ταυτόχρονα στο ίδιο δυναμικό προφίλ, το οποίο περιλάμβανε ένα περιοδικώς επαναλαμβανόμενο 24 h κύκλο (4 h στους 7 °C, 11 h στους 2 °C και 9 h στους 12 °C), με μια μέση θερμοκρασία 6.5 °C.

Στο γράφημα 4.11, που ακολουθεί, παρουσιάζεται η ανάπτυξη των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του προϊόντος, η διακύμανση της θερμοκρασίας με το χρόνο, όπως αυτή καταγράφεται από data loggers, καθώς και η χρονική στιγμή, όπου παρατηρήθηκε το σημείο λήξης του πρότυπου συστήματος ΤΤΙ.



Γράφημα 4.11: Καμπύλες ανάπτυξης των διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος κατά την αερόβια συντήρηση του σε περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες και σημείο λήξης του πρότυπου μικροβιακού συστήματος ΤΤΙ.

*Το δυναμικό προφίλ θερμοκρασιών περιλάμβανε έναν περιοδικώς επαναλαμβανόμενο 24-ωρο κύκλο, αποτελούμενο από συντήρηση για 4 h στους 7 °C, για 11 h στους 2 °C και για 9 h στους 12 °C.

**Η διακεκομμένη γραμμή σηματοδοτεί το σημείο λήξης του πρότυπου συστήματος ΤΤΙ.

Σύμφωνα με το γράφημα 4.11 είναι εμφανές πως οι ψευδομονάδες επικράτησαν έναντι των άλλων ομάδων μικροοργανισμών, ξεκινώντας από αρχικό επίπεδο πληθυσμού της τάξης των 3.2 log CFU/g και φθάνοντας στο τέλος της συντήρησης του κρέατος υψηλούς πληθυσμούς των 9.1 log CFU/g, προκαλώντας την αλλοίωση στο προϊόν. Το αλλοιωμένο προϊόν παρουσίαζε όμοια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με αυτό κατά την ισόθερμη συντήρησή του και συγκεκριμένα μια δυσάρεστη οσμή σήψης. Το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος, το οποίο εκτιμήθηκε με βάση τον πληθυσμό των ψευδομονάδων, και συγκεκριμένα όταν έφθασαν πληθυσμούς της τάξης των 8.0 log CFU/g, σημειώθηκε μετά από συντήρηση 114 h.

Το μικροβιακό ΤΤΙ φάνηκε αποτελεσματικό στην παρακολούθηση της αλλοίωσης του βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του σε δυναμικές συνθήκες, καθώς το σημείο λήξης του, συνέπεσε με τη λήξη της διάρκειας ζωής του προϊόντος και συγκεκριμένα συνέβη μετά από συντήρηση 116 h.

Στην εικόνα 4.1 απεικονίζονται εικόνες της εξέλιξης με το χρόνο του πρότυπου συστήματος ΤΤΙ κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης συντήρησής του με το βόειο κρέας κάτω από δυναμικές συνθήκες. Στις 116 h συντήρησης παρατηρείται η εμφάνιση της πρώτης ώδους απόχρωσης, η οποία σηματοδοτεί και το σημείο λήξης του μικροβιακού δείκτη.



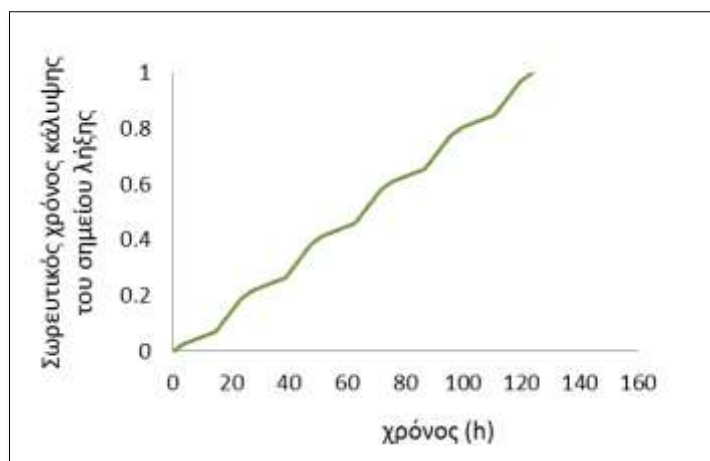
Εικόνα 4.1: Χρωματική μεταβολή του πρότυπου συστήματος ΤΤΙ κατά την ταυτόχρονη συντήρηση του με το βόειο κρέας σε περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες.

*Πρότυπο σύστημα ΤΤΙ: τρυβλία με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSA + 1% (w/v) γλυκερόλη και τιμή pH 7.0 ενοφθαλμισμένο με αρχική συγκέντρωση *Janthinobacterium* sp. 6.0 log CFU/mL.

**Η εμφάνιση της πρώτης ώδους απόχρωσης σηματοδοτεί το σημείο λήξης του δείκτη.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως πριν την επικύρωση της εφαρμογής του ΤΤΙ στο βόειο κρέας κατά τη συντήρησή τους κάτω από δυναμικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε η επικύρωση του κινητικού μοντέλου, που αναπτύχθηκε, για τις συνθήκες αυτές. Με βάση τα δεδομένα των μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακών συνθηκών και την εξίσωση 1.16 υπολογίστηκε η δραστική θερμοκρασία, T_{eff} . Η T_{eff} εκφράζει τη θερμοκρασία που θα είχε την ίδια επίδραση στο ΤΤΙ με εκείνη των μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακών συνθηκών. Στη συνέχεια, γνωρίζοντας την τιμή της T_{eff} με εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius προέκυψε ο προβλεπόμενος χρόνος για το σημείο λήξης του δείκτη. Η T_{eff} εκτιμήθηκε ίση με 7.49 °C και το σημείο λήξης του δείκτη ίσο με 125 h. Συνεπώς, η προβλεπόμενη τιμή του σημείου λήξης του δείκτη συσχετίστηκε πολύ καλά με την αντίστοιχη πειραματική τιμή (116h).

Το γράφημα 4.12 παρουσιάζει το σωρευτικό χρόνο κάλυψης του σημείου λήξης. Τιμή του χρόνου αυτού ίση με 1 (100%) αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή του σημείου λήξης του δείκτη.



Γράφημα 4.12: Σωρευτικός χρόνος κάλυψης του σημείου λήξης του δείκτη συναρτήσει του χρόνου.

Με βάση τα αποτελέσματα της εφαρμογής του ΤΠΙ, τόσο στις ισόθερμες συνθήκες συντήρησης, όσο και στις δυναμικές, η απόκριση του μικροβιακού δείκτη μπόρεσε να συσχετιστεί άμεσα με τη μικροβιακή αλλοίωση, που συμβαίνει στο βόειο κρέας κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες. Επιπλέον, η δυνατότητα ρύθμισης του σημείου λήξης του δείκτη μεταβάλλοντας κυρίως το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμίσματος του *Janthinobacterium* sp. και σε μικρότερο βαθμό το pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού, σε συνδυασμό με την ευελιξία που προσδίδει στο δείκτη η δυνατότητα ορισμού του σημείου λήξης του, καθιστά το μικροβιακό ΤΠΙ αξιόπιστο και αποτελεσματικό στην παρακολούθηση της μικροβιακής αλλοίωσης προϊόντων τροφίμων, που αλλοιώνονται από βακτήρια με παρόμοια κινητική συμπεριφορά με αυτή της απόκρισης του δείκτη.

Το μικροβιακό ΤΠΙ μπορεί να παρακολουθήσει το χρονο-θερμοκρασιακό ιστορικό του τροφίμου σε όλη την πορεία του, από το σημείο παραγωγής, τη διανομή, τη λιανική αγορά μέχρι τα ψυγεία των καταναλωτών και με αυτό τον τρόπο να επιτρέψει τον έλεγχο ενδεχόμενης θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης του προϊόντος, η οποία μπορεί εύκολα να συμβεί λόγω των σημαντικών αποκλίσεων από τις προδιαγραφές θερμοκρασίας, που χαρακτηρίζει την ψυκτική αλυσίδα. Η απόκριση του δείκτη, η εμφάνιση ιώδους χρώματος στις αποικίες του *Janthinobacterium* sp., είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής του δραστηριότητας. Αυτό έχει ως συνέπεια η κινητική της απόκρισής του μικροβιακού δείκτη να σχετίζεται άμεσα με την ποιοτική υποβάθμιση προϊόντων, που αλλοιώνονται από μικροοργανισμούς με παρόμοια κινητική συμπεριφορά.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός μικροβιακού χρονο-θερμοκρασιακού δείκτη, ο οποίος μπορεί να εφαρμόζεται στην παρακολούθηση της μικροβιολογικής ποιότητας ευαλλοιώτων τροφίμων. Ο μικροβιακός δείκτης στηρίχτηκε στη μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp. Συγκεκριμένα, ο εν λόγω μικροοργανισμός παράγει ως δευτερογενή μεταβολίτη τη βιολασεΐνη, μια χρωστική ουσία, χάρη στην οποία οι αποικίες του λαμβάνουν ώδη χρωματισμό. Ο ώδης αυτός χρωματισμός των αποικιών αποτέλεσε και την απόκριση του δείκτη.

Η αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. με την οποία ενοφθαλμίστηκε στο σύστημα και το pH του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του μικροοργανισμού αποτέλεσαν τις εξεταζόμενες παραμέτρους του ΤΤΙ. Ένα βασικό στοιχείο του μικροβιακού δείκτη, που αναπτύχθηκε, αποτελεί η δυνατότητα ορισμού του σημείου λήξης του είτε ως τη χρονική στιγμή εμφάνισης "1% ώδεις αποικίες", είτε "100% ώδεις αποικίες". Η δυνατότητα αυτή καθιστά το ΤΤΙ εφαρμόσιμο σε διαφορετικά προϊόντα τροφίμων, με μικρότερη ή μεγαλύτερη διάρκεια ζωής αντίστοιχα.

Ανάπτυξη μικροβιακού συστήματος ΤΤΙ

✓ Η θερμοκρασιακή εξάρτηση του σημείου λήξης του δείκτη περιγράφηκε ικανοποιητικά από την εξίσωση Arrhenius. Στην περίπτωση που το σημείο λήξης ορίστηκε ως η χρονική στιγμή για το "1% ώδεις αποικίες", η ενέργεια ενεργοποίησης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές για τα συστήματα με διαφορετικές παραμέτρους. Αντίθετα, στην περίπτωση που το σημείο λήξης του δείκτη ορίστηκε ως η χρονική στιγμή για το "100% ώδεις αποικίες", η αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού και το pH παρουσίασαν μεγαλύτερη επίδραση στην τιμή της Εα. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί το γεγονός πως η Εα του ΤΤΙ ήταν παραπλήσια με την ενέργεια ενεργοποίησης του ρυθμού ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp., το οποίο δείχνει παρόμοια θερμοκρασιακή εξάρτηση της μικροβιακής ανάπτυξης και της εμφάνισης ώδους χρώματος, δηλαδή της απόκρισης του δείκτη.

✓ Με βάση τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, για την ανάπτυξη του μικροβιακού συστήματος ΤΤΙ, παρατηρήθηκε πως η αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. έχει σημαντική επίδραση στο σημείο λήξης του δείκτη. Η απόκριση του μικροβιακού δείκτη σχετίστηκε άμεσα με τη συγκέντρωση του ενοφθαλμισμένου στο σύστημα

μικροοργανισμού, καθώς ο χρόνος για το σημείο λήξης του δείκτη μειώθηκε με την αύξηση της αρχικής του συγκέντρωσης. Μεταβάλλοντας επομένως την αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού δίνεται η δυνατότητα εύκολης ρύθμισης του σημείου λήξης του δείκτη σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής του τροφίμου - στόχου.

Η τιμή pH του θρεπτικού μέσου επίσης επηρέασε το χρόνο για το σημείο λήξης του δείκτη, ωστόσο οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τιμών pH ήταν οριακές.

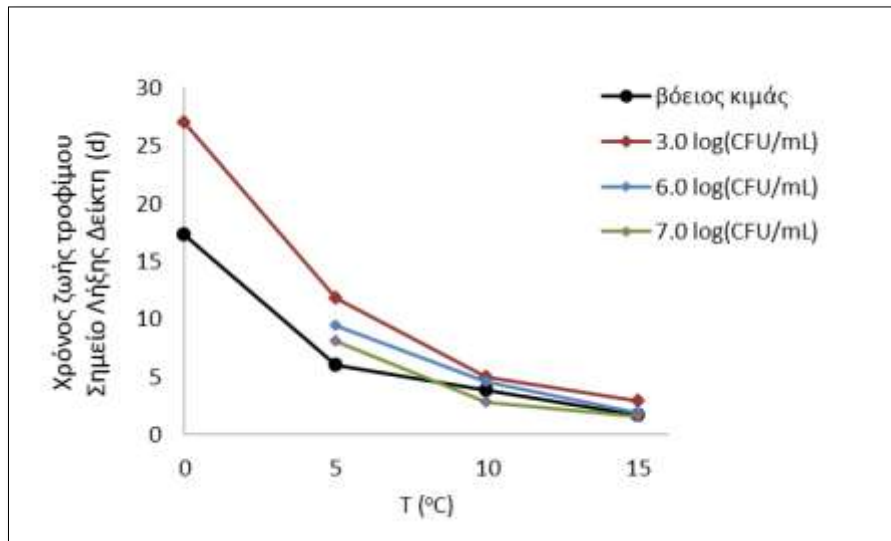
Επικύρωση Εφαρμογής Συστήματος ΤΤΙ

✓ Το σύστημα ΤΤΙ με τις κατάλληλες παραμέτρους κρίθηκε αξιόπιστο για την παρακολούθηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης βόειου κρέατος κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες. Η θερμοκρασιακή εξάρτηση της απόκρισης του δείκτη ήταν όμοια με εκείνη της ανάπτυξης των ψευδομονάδων (SSO) για το θερμοκρασιακό εύρος 5 – 15 °C. Επιπλέον, το σημείο λήξης του δείκτη σχεδόν ταυτίστηκε με το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος, τόσο κατά την συντήρησή των δύο συστημάτων σε ισόθερμες συνθήκες, αλλά και κάτω από δυναμικές συνθήκες συντήρησης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως το κινητικό μοντέλο, που αναπτύχθηκε, πρόβλεψε ικανοποιητικά την απόκριση του δείκτη στις μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες.

Το μικροβιακό σύστημα δείκτη, που αναπτύχθηκε, υπερέχει σε σύγκριση με άλλους δείκτες, που στηρίζονται σε χημικές, ενζυμικές και άλλες αντιδράσεις, καθώς η απόκρισή του, η οποία είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δραστηριότητας του μικροοργανισμού *Janthinobacterium* sp., συνδέεται άμεσα με τον μικροβιακή αλλοίωση που συμβαίνει στα τρόφιμα.

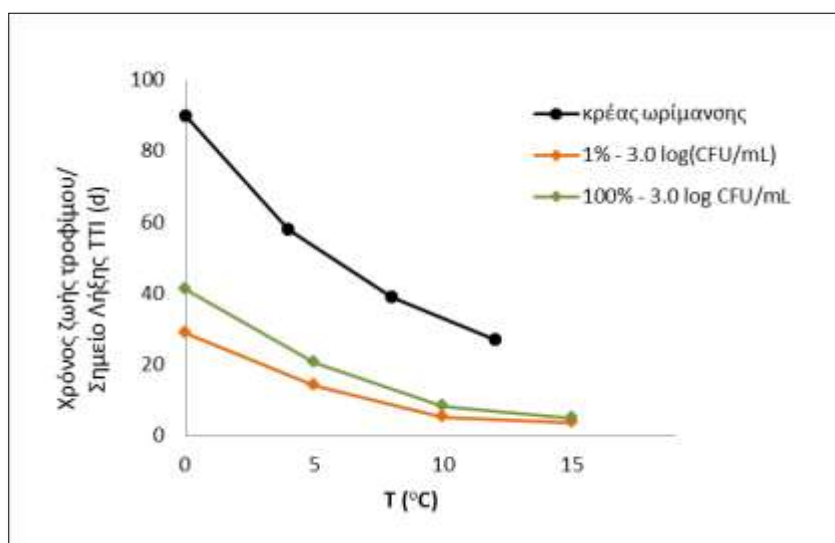
Όπως αναφέρθηκε, η δυνατότητα εύκολης ρύθμισης του σημείου λήξης ενός δείκτη, ανάλογα με τη διάρκεια ζωής του υπό ενδιαφέροντος προϊόντος, αποτελεί καίριο σημείο για την ευελιξία της εφαρμογής του. Προκειμένου λοιπόν να εξεταστεί η ευελιξία του μελετηθέντος δείκτη της παρούσας μελέτης, εξετάστηκαν δύο παράμετροι από τις οποίες η αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. παρατηρήθηκε πως έχει σημαντική επίδραση στο σημείο λήξης του δείκτη. Η επικύρωση της εφαρμογής του δείκτη έγινε σε βόειο κρέας κατά τη συντήρησή του υπό αερόβιες συνθήκες, ωστόσο ο δείκτης θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε ένα ευρύτερο φάσμα τροφίμων υπό διαφορετικές συνθήκες συσκευασίας (π.χ. κενό ή τροποποιημένες ατμόσφαιρες). Όπως φαίνεται στο γράφημα 5.1, το σημείο λήξης του δείκτη θα μπορούσε να ρυθμιστεί κατάλληλα ώστε να μπορεί να παρακολουθήσει την αλλοίωση που συμβαίνει σε κιμά συσκευασμένο σε

τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) από οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB). Η ενέργεια ενεργοποίησης των οξυγαλακτικών βακτηριών στον βόειο κιμά (107 kJ/mol) βρίσκεται στο εύρος τιμών της Εα της απόκρισης του δείκτη που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη.



Γράφημα 5.1: Μεταβολή της διάρκειας ζωής βόειου κιμά σε MAP (Muermans et al., 1993) και του σημείου λήξης συστημάτων TTI με διαφορετική αρχική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. συναρτήσει της θερμοκρασίας.

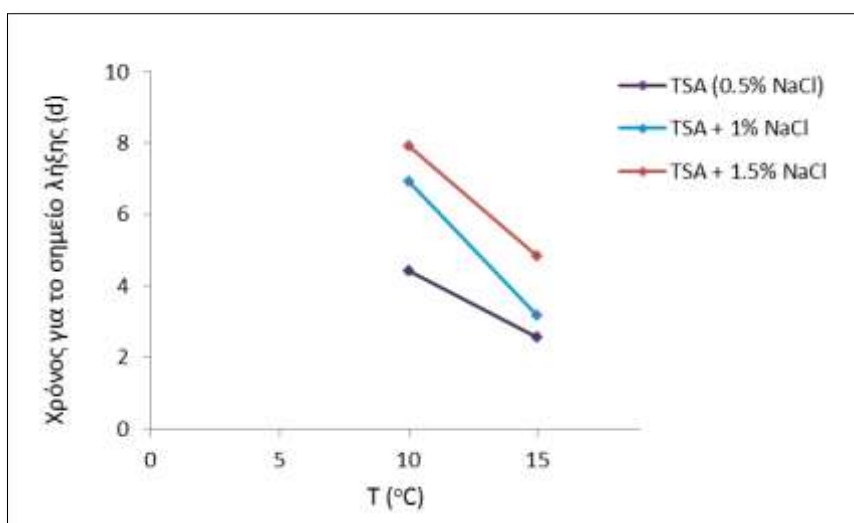
Το σύστημα TTI, που αναπτύχθηκε, αν και ευέλικτο, μπορεί να εφαρμοστεί σε τρόφιμα με ένα συγκεκριμένο εύρος διάρκειας ζωής. Στο γράφημα 5.2 παρατηρείται η ανάγκη ρύθμισης του σημείου λήξης του δείκτη, προκειμένου να καταστεί εφαρμόσιμος και σε τρόφιμα με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, όπως για παράδειγμα είναι τα τρόφιμα θερμικής επεξεργασίας.



Γράφημα 5.2: Μεταβολή της διάρκειας ζωής κρέατος ωρίμανσης (Mataragas et al., 2006) και του σημείου λήξης συστημάτων TTI με σημείο λήξης 1% ώδεις αποικίες και 100% ώδεις αποικίες συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχει η δυνατότητα εξέτασης και άλλων παραμέτρων, όσον αφορά την επίδρασή τους στο σημείο λήξης του δείκτη, όπως για παράδειγμα η προσθήκη NaCl σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στο σύστημα ή θρεπτικό μέσο διαφορετικής ισχύος. Σε κάθε περίπτωση, στόχος είναι να δημιουργηθεί ένα περιβάλλον στο σύστημα ΤΠΙ, το οποίο να προσεγγίζει όσο το δυνατόν καλύτερα εκείνο του τροφίμου – στόχου, ώστε να επιτευχθεί παρόμοια μικροβιακή ανάπτυξη στα δύο συστήματα. Εντούτοις, απαραίτητο κρίνεται η μελέτη της επίδρασης των παραμέτρων αυτών στην ενέργεια ενεργοποίησης του συστήματος.

Μια πρώτη προσέγγιση όσον αφορά στην προσθήκη NaCl στο σύστημα ΤΠΙ και την επίδρασή της στο σημείο λήξης του δείκτη έχει ήδη γίνει. Σύμφωνα με τις πρώτες ενδείξεις με την αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl ο δείκτης σημείωσε μεγαλύτερους χρόνους για το σημείο λήξης (γράφημα 5.2). Το γεγονός αυτό δείχνει πως ο δείκτης δύναται να παρακολουθήσει την μεταβολή της ποιότητας τροφίμων με ένα μεγαλύτερο εύρος διάρκειας ζωής.



Γράφημα 5.3: Σημείο λήξης του δείκτη συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα πρότυπα συστήματα του δείκτη με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl.

Η απόκριση του δείκτη, με τη μορφή μιας εύκολα αναγνωρίσιμης εκδήλωσης χρώματος (ιώδες) εκφράζει τις θερμοκρασιακές συνθήκες που έχει εκτεθεί το τρόφιμο σε όλη τα στάδια της ψυκτικής αλυσίδας, από τη στιγμή της παραγωγής του, κατά τη διανομή, τα ψυγεία των σουπερ μάρκετ, μέχρι να φτάσει στο ψυγείο του καταναλωτή. Το μικροβιακό ΤΠΙ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επικουρικά της ημερομηνίας ανάλωσης, ως μια "ζωντανή ημερομηνία λήξης", επισημαίνοντας τις περιπτώσεις της πιθανής θερμοκρασιακής κακομεταχείρισης του προϊόντος. Επιπλέον, θα μπορούσε να βρει εφαρμογή ως εργαλείο συστηματικής διαχείρισης της ψυκτικής αλυσίδας εντοπίζοντας τα αδύναμα σημεία της, καθώς και στη βελτιστοποίηση του συστήματος διαχείρισης των αποθεμάτων και μειώνοντας τα χαρακτηρισμένα ως ακατάλληλα για κατανάλωση προϊόντα, με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους της εταιρίας ή βιομηχανίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- Antônio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B. (2004). Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. *Genetics and Molecular Research* 3 (1), 85-91.
- Aranda, S., Montes-Borrego, M. and Landa, B. B. (2011). Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in Southern Spain. *Microbial Ecology*, 62 (2), 446–459.
- Audits International. (1999). U.S. Food Temperature Evaluation Design and Summary Pages.
- Bakalis, S., Giannakourou, M. C. and Taoukis, P. (2003). Effect of domestic storage and cooking conditions on the risk distribution in ready to cook meat products. *9th International Conference Engineering and Food*.
- Belitz, H.-D. and Grosch, W. (1987). *Food chemistry* (2nd edition). Berlin: Springer Verlag.
- Choi, S. Y., Yoon, K - H., Lee, J. I., and Mitchell, R. J. (2015). Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 465056.
- Cox, N. A. (1975). Isolation and Identification of a Genus, *Chromobacterium*, Not Previously Found on Processed Poultry. *Applied Microbiology*, 29 (6), 864.
- Dalgaard, P. (2000). Fresh and lightly preserved seafood. In C. M. D. Man, & A. A. Jones (Eds.), *Shelf life evaluation of foods* (pp.110-139). Gaithersburg, MD: Aspen Publishers.
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157 (2), 130-141.
- Durán, N., Justo, G. Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., Castro, G. R., Nakazato, G. (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, In Press.
- Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L. and Martins, D. (2007), Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48, 127–133.
- Ellouze, M. and Augustin J-C. (2010). Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 138 (1-2), 119-129.

- Ellouze, M., Pichaud, M., Bonaiti, C., Coroller, L., Couvert, O., Thuault, D., Vaillant R. (2008). Modelling pH evolution and lactic acid production in the growth medium of a lactic acid bacterium: application to set a biological TTI. *International Journal of Food Microbiology*, 128 (1), 101-107.
- Evans, J. (1992). Consumer handling of chilled foods: Perception and practice. *International Journal of Refrigeration*, 15 (5), 290–298.
- Evans, J. (2011). Effects of food and beverage storage, distribution, display and consumer handling on shelf life. In D. Kilcast and P. Subramaniam (Eds.), *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (pp. 273-302). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Evans, J. A., Stanton, J. I., Russell, S. L., James, S. J. (1991). Consumer Handling of Chilled Foods: A Survey of Time and Temperature Conditions. Unknown Publisher.
- Ferreira, C. V., Bos, C. L., Versteeg, H. H., Justo, G. Z., Durán, N. and Peppelenbosch, M. P. (2004). Molecular mechanism of violacein - mediated human leukemia cell death. *Blood Journal*, 104 (5), 1459–1464.
- Freshlab – Research Project (2005-2008). Integrated Approach to enable Traceability of the Cooling Chain of Fresh and Frozen Meat and Fish Products by means of Taylor-made Time/ Temperature Indicators.
- Fu, B. and Labuza, T. P. (1992). Considerations for the application of time-temperature integrators on food distribution. *Journal of Food Distribution Research*, 23 (1), 9-18.
- Fung, D. Y., (2010). Microbial hazards in food: food-borne infections and intoxications. In F. Toldrá (Ed.) *Handbook of Meat Processing* (pp. 481-500). Blackwell Publishing, USA.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. (2005). The Proteobacteria. Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd edition, vol. 2), Springer, New York.
- Ghebrehewet, S, Stevenson, L., (2003). Effectiveness of home-based food storage training: a community development approach. *International Food of Environmental Health Research*, 13, 169-174.
- Gill, C. O., Jones, T., LeBlanc, D. I., Rahn, K., Campbell, S., Holley, R.A., Stark, R. and Houde ,A. (2002). Temperatures and ages of packs of beef displayed at stores in Canada. *Meat Science*, 62 (2), 139-144.
- Gillis, M., De Ley, J., (2006). The Genera Chromobacterium and Janthinobacterium. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (3rd edition, Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, pp. 737-747), Springer.

- Gogou, E., Katsaros, G., Derens, E., Alvarez, G., Taoukis, P. S. (2015). Cold chain database development and application as a tool for the cold chain management and food quality evaluation. *International Journal of Refrigeration*, 52, 109-121.
- Gram, L. and Dalgaard, P. (2002). Fish Spoilage bacteria - problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 262-266.
- Greer, G. G., Gill, C. O. and Dilts, B. D. (1994). Evaluation of the bacteriological consequences of the temperature regimes experienced by fresh chilled meat during retail display. *Food Research International*, 27 (4), 371-377.
- Hornung, C., Poehlein, A., Haack, F.S., Schmidt, M., Dierking, K., Pohlen, A., Schulenburg, H., Blokesch, M., Plener, L., Jung, K., Bonge, A., Krohn-Molt, I., Utpatel, C., Timmermann, G., Spieck, E., Pommerening-Röser, A., Bode, E., Bode, H.B., Daniel, R., Schmeisser, C., Streit, W.R. (2013). The *Janthinobacterium sp.* HH01 genome encodes a homologue of the *V. cholerae* CqsA and *L. pneumophila* LqsA autoinducer synthases. *PLoS One*, 8 (2), e55045.
- IIR (2008). RFID technologies for cold chain applications. In *4th Informatory Note on Refrigeration and Food*, Paris, France: International Institute of Refrigeration.
- James, S. (1996). The chill chain “from carcass to consumer”. *Meat Science*, 43 (S1), 203-216.
- James, S. and Evans, J. (1992). Consumer handling of chilled Foods: Temperature performance. *International Journal of Refrigeration*, 15 (5), 299-306.
- James, S. J. (2003). Chilled Storage-Attainment of Chilled Conditions. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd edition, pp. 1169 – 1175), Elsevier.
- James, S. J., Evans, J., James C. (2008). A review of the performance of domestic refrigerators. *Journal of Food Engineering*, 87, 2-10.
- Kerry, J. P, O'Grady, M. N., Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74 (1), 113-130, 52nd International Congress of Meat Science and Technology, Dublin, Ireland.
- Koburger, J. A. and May, S. O. (1982). Isolation of *Chromobacterium spp.* from foods, soil, and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (6), 1463–1465.
- Koutsoumanis, K. P. and Taoukis, P. (2005). Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (pp. 503-561). Cambridge, UK: Woodhead Publishing, Ltd.

- Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., Nychas, G.-J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25, 915-921.
- Koutsoumanis, K., Pavlis, A., Nychas, G.-J. E., Xanthiakos, K. (2010). Probabilistic model for *Listeria monocytogenes* growth during distribution, retail storage, and domestic storage of pasteurized milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (7), 2181-2191.
- Kramer, A. and Twigg, B. A. (1970). *Quality Control for the Food Industry*, AVI Pub. Co, Westport.
- Labuza, T. P. (1984). Application of chemical kinetics to deterioration of foods. *Journal of Chemical Education*, 61 (4), 348.
- Labuza, T. P. and Fu, B. (1993). Growth kinetics for shelf-life prediction: Theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 12 (3), 309-323.
- Laguerre, O., Derens, E. and Palagos, B. (2002). Study of domestic refrigerator temperature and analysis of factors affecting temperature: a French survey. *International Journal of Refrigeration*, 25, 653-659.
- Leon, L. L., Miranda, C. C., De Souza, A. O., Durán, N. (2001). Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (3), 449-50.
- Lincoln, S. P., Fermor, T. R. and Tindall B. J. (1999). *Janthinobacterium agaricidamnosum* sp. nov., a soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49 (4), 1577–1589.
- Lu, Y., Wang, L. Xue, Y., Zhang, C., Xing, X. – H., Lou, K., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, G., Bi, J., Su Z., (2009). Production of violet pigment by a newly isolated psychotropic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal*, 43 (2), 135-141.
- Maciel, V. B. V., Yoshida, C. M. P., Franco, T. T. (2012). Development of temperature indicator prototype: Cardpaper coated with chitosan intelligent films. *Journal of Food Engineering*, 111 (1), 21–27.
- Matragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. (2006). Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *Journal of Food Science*, 71 (6), 157-167.
- McMeekin, T. A., and Ross, T. (1996). Shelf life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 65-83.

- Muermans, M. L. T., Stekelenburg, F. K., Zwietering, M. H., Huis in 't Veld, J. H. J. (1993). Modelling of the microbiological quality of meat. *Food Control*, 4 (4), 216-221.
- Nychas, G.-J. E., Drosinos, E. H. (2014). Meat and Poultry | Spoilage of Meat. In C. Batt (Ed.) *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd edition, pp. 514-519).
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (pp. 461-502). Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C.C., Koutsoumanis, P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78 (1-2), 77–89.
- Pantanella, F., Berlutti, F., Sarli, S., Morea, C. and Scippa, S. (2006). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4): 992-999.
- Paramithiotis, S., Skandamis P. N., Nychas G.-J. E. (2009). Insights into Fresh Meat Spoilage. In F. Toldrá (Ed.), *Safety of Meat and Processed Meat* (pp. 55-82). Springer, New York.
- Pennanen, K., Focas, C., Kumpusalo-Sanna, V., Keskitalo-Vuokko, K., Matullat, I., Ellouze, M., Pentikäinen, S., Smolander, M., Korhonen, V. and Ollila, M. (2015). European Consumers' Perceptions of Time–Temperature Indicators. In *Food Packaging, Earthquake Engineering & Structural Dynamics*, 28, 303–323.
- Potter, N. N., Hotchkiss, J. H. (1995). *Food Science* (5th edition).
- Renier, J. J. and Morin, W. T. (1962). Time-Temperature indicators, Intl. Inst. Refrig. Bull. Annex, 1, 425-235.
- Rossolini, G. M., Condemi, M. A., Pantanella, F., Docquier, J. D., Amicosante, G. and Thaller, M.C. (2001) Metallo-β-lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45, 837–844.
- Sánchez, C., Braña, A. F., Méndez, C. and Salas, J. A. (2006), Reevaluation of the Violacein Biosynthetic Pathway and its Relationship to Indolocarbazole Biosynthesis. *ChemBioChem*, 7, 1231–1240.
- Selman, J. D., (1995). Time-temperature indicators. In M.L. Rooney (Ed.). *Active Food Packaging* (pp. 215-237), Springer US.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, Pr. and Genigeorgi, C. (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 171-177

- Simon, J., Kassianenko, A., Oggel, J. (2005). Issues in Time and Temperature Abuse of Refrigerated Foods. *Food Safety magazine, Process Control*.
- Singh, R. P. (2000). Scientific principles of shelf life evaluation. In C.M.D. Man and A. A. Jones (Eds), *Shelf-life Evaluation of Foods* (2nd edition), Gaithersberg, USA: Aspen Publishers
- Singh, R. P. and Wells, J. H. (1987). Monitoring quality changes in stored frozen strawberries with time temperature indicators. *International Journal of Refrigeration*, 10 (5), 296-300.
- Singh, T. K. and Cadwallade, K. R. (2003). The Shelf Life of Foods: An Overview. *ACS Symposium Series*, 836
- Taoukis, P. S. (2001). Modelling the use of time-temperature indicators in distribution and stock rotation. In L.M.M Tijskens, M.L.A.T.M. Hertog & B.M. Nicolai (Eds.), *Food Process Modelling* (pp. 402-432), Washington DC, USA: CRC Press.
- Taoukis, P. S. (2010). Commercialization of time-temperature integrators for foods. In C. J. Doona, K. Kustin and F. E. Feeherry (Eds.) *Case studies in novel food processing technologies, Innovations in Processing, Packaging, and Predictive Modelling* (pp.351-366), Woodhead Publishing Ltd.
- 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, 783–788.
- Taoukis, P. S. and Labuza, T. P. (1996). Summary: Integrative concepts. In O.R. Fennema (Ed.) *Food Chemistry* (pp. 1013-1042). New York: Marcel Dekker Inc.
- Taoukis, P. S. and Labuza, T. P. (2003). Time-temperature indicators (TTIs). In R. Ahvenainen, (Ed.) *Novel Food Packaging Techniques* (pp. 103-126), Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Tsironi, T., Stamatiou, A., Giannoglou, M., Velliou, E., Taoukis, P. S., (2011). Predictive modelling and selection of Time Temperature Integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 44 (4), 1156-1163.
- Vaikousi, H., Biliaderis, C. G. and Koutsoumanis, K. P. (2008). Development of a Microbial Time/Temperature Indicator Prototype for Monitoring the Microbiological Quality of Chilled Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (10), 3242–3250.
- Valdes, N., Soto, P., Cottet, L., Alarcon, P., Gonzalez, A., Castillo, A., Tello, M. (2015). Draft genome sequence of *Janthinobacterium lividum* strain MTR reveals its mechanism of capnophilic behavior. *Standards in Genomic Sciences*, 10, 110.

- Van Boekel, M. A. J. S. (1996), Statistical Aspects of Kinetic Modeling for Food Science Problems. *Journal of Food Science*, 61, 477–486.
- Wang, H., Wang, F., Zhu, X., Yana, Y., Yu, X., Jiangb, P., Xing, X-H., (2012). Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 148-155.
- Woolfe, M. L. (2000). Temperature monitoring and measurement. In M. Stringer (Author), C. Dennis (Author) *Chilled Foods: A Comprehensive Guide* (2nd edition, pp. 99-131), Woodhead Publishing.
- Yan, S., Huaweia, C., Liminb, Z., Fazhenga, R., Ludac, Z., Hengtaod, Z. (2008). Development and characterization of a new amylase type time–temperature indicator. *Food Control*, 19 (3), 315-319.
- Yang, L. H., Xiong, H., Lee, O. O., Qi, S.-H. and Qian, P.-Y. (2007). Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (6), 625–630.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Μπαλατσούρας Δ. Γ. (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Έμβρυο.
- Νυχάς Γ. Ι., Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Σημειώσεις Μικροβιολογίας Τροφίμων Ι.
- Ταούκης Π. (2010). Έξυπνη Συσκευασία: Διαδραστικός Έλεγχος ποιότητας προϊόντος στην αλυσίδα τροφίμων. Ημερίδα "Νέες Τάσεις στο χώρο της Χημείας Τροφίμων", Μάρτιος 2010.
- Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β. (2009). Επιστήμη και Μηχανική Διεργασιών Τροφίμων. Επιστήμη και Μηχανική Βιολογικών Συστημάτων και Προϊόντων, Σημειώσεις από τις παραδόσεις, Ε.Μ. Πολυτεχνείο.
- Τζια Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β. (2009). Επιστήμη και μηχανική τροφίμων: συστατικά – ιδιότητες – ποιότητα – μικροβιολογία – ρεολογία – συσκευασία. Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων, Σημειώσεις από τις παραδόσεις, Ε.Μ. Πολυτεχνείο.
- Τούλη Α. (2013). Έξυπνη συσκευασία: Μελέτη και εφαρμογή χρονο-θερμοκρασιακών δεικτών (TTI) στη ψυκτική αλυσίδα καταψυγμένων θαλασσιών. Διπλωματική εργασία.

Ιστοσελίδες

- European Food Safety Authority (EFSA) - <http://www.efsa.europa.eu/>
- U.S. Food and Drug Administration (FDA) - <http://www.fda.gov/>
- VITSAB International - <http://vitsab.com/>
- Freshpoint Company - <http://www.freshpoint-tti.com/>