



**Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών των *Aspergillus*
και *Penicillium* sp. και παραγόντων που επηρεάζουν την
παραγωγή ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα**

Αναστασία Ε. Καπετανάκου

Διδακτορική διατριβή

ΑΘΗΝΑ 2012

**Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών των *Aspergillus* και
Penicillium sp. και παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή
ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα**

Αναστασία Ε. Καπετανάκου

ΑΘΗΝΑ 2012

Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων

Επίκουρος Καθηγητής Π.Ν. Σκανδάμης
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συμβουλευτική επιτροπή

Καθηγητής Σ. Γιαννιώτης
Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καθηγητής Γ-Ι. Νυχάς
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Λοιπά μέλη

Καθηγητής Κοντομηνάς Μ.
Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Χ. Δροσινός
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αναπληρωτής Καθηγητής Κ. Κουτσουμανής
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Επίκουρος Καθηγητής Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης
Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Copyright © 2012
Καπετανάκου Ε. Αναστασία
ALL RIGHTS RESERVED

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Ιερά Οδός 75, 11855
Αθήνα, Ελλάδα

στους δικούς μου ανθρώπους

“Καταλαβαίνει κανείς πως δουλεύει καλά, όταν κάθε περιστατικό, το πιο μικρό και ασήμαντο, της καθημερινής ζωής του και της σκέψης του, έρχεται, σαν μοναχό του, και βάζει ένα πετραδάκι στο πράγμα που φτιάνει.”

Γιώργος Σεφέρης

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθήνας με επιβλέποντα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να κάνω ότι αγαπάω, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές και οδηγίες του καθώς και για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νυχά Γ.-Ι. και τον Καθηγητή κ. Γιαννιώτη Σ. για τις συμβουλές και την καθοδήγηση.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Καθηγητή κ. Κοντομηνά Μ. από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δροσινό Ε.Χ. από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κουτσουμανή Κ. από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Τσιτσιγιάννη Δ.Ι. από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για τη συμμετοχή τους στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της διδακτορικής διατριβής μου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τα τρία μόνιμα μέλη του εργαστηρίου κ. Μαρία Γιαλιτάκη, κ. Μαρία Καπάνταη και κ. Σπύρο Παραμυθιώτη για το ενδιαφέρον τους και την τεχνική υποστήριξη στα όποια προβλήματα παρουσιάστηκαν.

Ευχαριστώ θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες, παλαιότερους και νεότερους, αλλά κυρίως την κ. Χαρά Μπέλεσση και τον κ. Σταύρο Μανιό για την αρμονική συνύπαρξη, την δημιουργική συνεργασία και τις ατελείωτες ώρες εργασίας και συζήτησης.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα κατά την εκπόνηση της διπλωματικής τους εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους τους φίλους μου που με στήριξαν και έδειχναν κατανόηση κάθε φορά που ο όγκος της δουλειάς με έκανε απλά να «χάνομαι».

Τέλος θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Βαγγέλη και Κατερίνα, και την αδερφή μου, Δήμητρα για την απεριόριστη αγάπη τους, τη συνεχή ενθάρρυνση και κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

AK

Περιεχόμενα

Πρόλογος		i
Summary		v
Ευρετήριο εικόνων		vii
Ευρετήριο σχημάτων		ix
Ευρετήριο πινάκων		xi
Ευρετήριο γραφημάτων		xv
Κεφάλαιο 1	Γενική εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 2	Υλικά και μέθοδοι	23
Κεφάλαιο 3	Συνδυαστική επίδραση διαφορετικών τιμών pH, a_w και θερμοκρασίας στην παραγωγή ΩΤΑ των <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> και <i>P. verrucosum</i>	35
Κεφάλαιο 4	Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου με βάση την επίδραση της μικροδομής (gel) υποστρώματος, της a_w , της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και στην παραγωγή ΩΤΑ από τον <i>A. carbonarius</i> και επικύρωση σε τρόφιμα διαφορετικού ιξώδους	49
Κεφάλαιο 5	Μελέτη της παραλλακτικότητας στην εκβλάστηση, την ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ μεμονωμένων σπόριων των <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> και <i>P. verrucosum</i> συναρτήσει του pH, της a_w και της θερμοκρασίας	71
Κεφάλαιο 6	Αναστολή της ανάπτυξης του <i>A. carbonarius</i> και μείωση της ΩΤΑ από την εφαρμογή μικτών καλλιεργείων βακτηρίων και ζυμών τεχνολογικής προέλευσης σε θρεπτικά υποστρώματα και ποτά	109
Κεφάλαιο 7	Σύγκριση της επίδρασης δύο εφαρμογών ενεργού συσκευασίας με αιθέριο έλαιο κανέλας στην ανάπτυξη του <i>A. carbonarius</i> και στην παραγωγή ΩΤΑ στη σάρκα και στο φλοιό μήλων και αχλαδιών	135
Κεφάλαιο 8	Γενικά συμπεράσματα	167
Βιβλιογραφία		171
Λίστα δημοσιεύσεων		197
Συντμήσεις		201

Πρόλογος

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την υγεία του ανθρώπου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ), η οποία παράγεται κυρίως από τα γένη *Aspergillus* και *Penicillium*. Η παρουσία ωχρατοξινογόνων μυκήτων και η ανίχνευση της ΩΤΑ αποτελεί ένα σημαντικό κίνδυνο της ασφάλειας των τροφίμων.

Καταρχάς, στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε μία βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τους κύριους ωχρατοξινογόνους μύκητες (*Aspergillus westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *Penicillium verrucosum*) και την ΩΤΑ, ενώ οι στόχοι που τέθηκαν προς διερεύνηση συνοψίζονται: α) στη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών οικολογικών παραγόντων όπως το pH, η ενεργότητα νερού (a_w), η μικροδομή (ενδογενείς παράγοντες), η θερμοκρασία (εξωγενής παράγοντας) και το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμίσματος (λοιποί σχετιζόμενοι παράγοντες) στην ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή ΩΤΑ, β) στην ανάπτυξη μοντέλων κινητικής και μοντέλων πιθανοτήτων στοχεύοντας στην πρόρρηση της ανάπτυξης των μυκήτων και της παραγωγής ΩΤΑ λαμβάνοντας υπόψη τους προαναφερθέντες παράγοντες και στην επικύρωση των αναπτυχθέντων μοντέλων σε διαφορετικά τρόφιμα, γ) στη συσχέτιση διαφορετικών μεθόδων εκτίμησης της ανάπτυξης των μυκήτων (ακτινωτή διάμετρος της αποικίας, ξηρή μυκηλιακή βιομάζα και πληθυσμός σπορίων) και της παραγωγής ΩΤΑ (ELISA και HPLC) και δ) στη μελέτη και ανεύρεση πιθανών βιολογικών (π.χ. χρήση μικροοργανισμών- μικτές καλλιέργειες βακτηρίων ή/ και ζυμών) ή εναλλακτικών μεθόδων (π.χ. χρήση αιθέριων ελαίων-δράση μέσω των πτητικών συστατικών και ενσωμάτωση σε εδώδιμες επικαλύψεις) στοχεύοντας στην αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων ή στη μείωση της ΩΤΑ.

Συγκεκριμένα, έχοντας ως αφετηρία τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές πληροφορίες για την οικολογία των ωχρατοξινογόνων μυκήτων και τις συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή της ΩΤΑ αλλά και τις προτεινόμενες μεθόδους για τη μελέτη του ελέγχου της παραγόμενης τοξίνης (**Κεφάλαια 1 και 2**), σχεδιάστηκε η παρούσα διδακτορική διατριβή. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία πραγματεύεται κυρίως την παραγωγή ΩΤΑ σε εργαστηριακά υποστρώματα. Αντίθετα, η μελέτη της επίδρασης της οικολογίας των τροφίμων (π.χ. ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, μικροδομή του τροφίμου, μικροβιακές αλληλεπιδράσεις) στην αύξηση των μυκήτων και στην παραγωγή ΩΤΑ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Παράλληλα με τη βοήθεια της μικροβιολογίας πρόρρησης δόθηκε η δυνατότητα να αναπτυχθούν μοντέλα (κινητικά ή στοχαστικά) ικανά να προβλέπουν παραμέτρους σχετιζόμενες με την ανάπτυξη των μυκήτων (π.χ. ρυθμός ανάπτυξης, χρόνος εμφάνισης της υψής του μύκητα) και την παραγωγή της ΩΤΑ (π.χ. ρυθμός παραγωγής, χρόνος κατά τον οποίο η τοξίνη καθίσταται ανιχνεύσιμη) σε συνάρτηση με τους προαναφερθέντες παράγοντες. Τέτοιου είδους προσεγγίσεις ενδέχεται να συμβάλουν επιπλέον στην ανεύρεση μεθόδων ελέγχου της παραγωγής

ΩΤΑ. Ως δευτερεύων στόχος αλλά εξίσου σημαντικός τέθηκε η διερεύνηση της εφαρμογής της πληρέστερης δυνατής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό τόσο βιολογικών μεθόδων στηριζόμενων σε μικροοργανισμούς τεχνολογικής σημασίας όσο και φυσικών αντιμικροβιακών (π.χ. αιθέρια έλαια) για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ωχρατοξινογόνων μυκήτων και τη μείωση της παραγωγής ΩΤΑ σε εργαστηριακά υποστρώματα (*in vitro*) με συνιστώσες, οικολογικούς παράγοντες και τη συγκέντρωση της αντιμικροβιακής ουσίας. Η μελέτη στα τρόφιμα έγινε με πειράματα ενοφθαλμισμού (challenge tests) μυκήτων σε προϊόντα που περιείχαν τη φυσική τους μικροχλωρίδα (*in situ*) συντηρούμενα σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πρωταρχικά λοιπόν (**Κεφάλαιο 3**), μελετήθηκε η *in vitro* επίδραση διαφορετικών συνδυασμών οικολογικών παραγόντων όπως το pH, η a_w , και η θερμοκρασία στην παραγωγή ΩΤΑ από τους μύκητες *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* με τη χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA έχοντας ως στόχο τον προσδιορισμό τόσο των άριστων όσο και των οριακών συνθηκών για την παραγωγή της τοξίνης. Εν συνεχεία, η ΩΤΑ προσδιορίστηκε σε αντιπροσωπευτικό αριθμό δειγμάτων με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Πραγματοποιήθηκε λοιπόν σύγκριση μεταξύ των δύο μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της ΩΤΑ, στοχεύοντας στην εκτίμηση της ακρίβειας και της αποδοτικότητας μίας ταχείας, χαμηλού κόστους αλλά ημι-ποσοτικής μεθόδου όπως η ELISA συγκριτικά με τη συμβατική μέθοδο της HPLC.

Ακολούθως, η έρευνα εστιάστηκε στο ανοιχτό ακόμη για τους ερευνητές ζήτημα της επίδρασης της μικροδομής του υποστρώματος (υγρό, ημίρρευστο, στερεό) και τον τρόπο που επηρεάζει την ανάπτυξη του *A. carbonarius* (είδος μύκητα που αναπτύσσεται σε διαφορετικής μικροδομής τρόφιμα) και την παραγωγή της ΩΤΑ συνδυαστικά και με άλλους οικολογικούς παράγοντες όπως το pH, την a_w , και την θερμοκρασία (**Κεφάλαιο 4**). Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά δεδομένα αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα ικανά να προβλέπουν τους ρυθμούς της ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής της ΩΤΑ συναρτήσει των προαναφερθέντων παραγόντων και επικυρώθηκαν σε τρόφιμα διαφορετικού ιξώδους (κρέμα, ζελέ και μαρμελάδα).

Συμπληρώνοντας το πρώτο πειραματικό σκέλος που αφορούσε τη μελέτη οικολογικών και μη παραγόντων που είναι ικανοί να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή της ΩΤΑ και δεδομένων των περιορισμένων βιβλιογραφικών πληροφοριών που υπάρχουν, ως προς μελέτη παράγων επιλέχθηκε το μέγεθος του αρχικού ενοφθαλμίσματος (**Κεφάλαιο 5**). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η κινητική εκβλάστησης μεμονωμένων σπορίων αλλά και ανάπτυξης και παραγωγής ΩΤΑ αποικιών προερχόμενων από μεμονωμένα σπόρια των μυκήτων *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε διαφορετικές συνθήκες pH, a_w και θερμοκρασίας. Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά δεδομένα, μοντελοποιήθηκαν ο χρόνος εμφάνισης της μυκηλιακής υφής και ο χρόνος κατά τον οποίο η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη με τη χρήση της προσομοίωσης Monte

Carlo. Η εκτίμηση της απόδοσης των αναπτυχθέντων μοντέλων πραγματοποιήθηκε στις ίδιες πειραματικές συνθήκες (θρεπτικό υπόστρωμα, pH, a_w και θερμοκρασία), ενώ χρησιμοποιήθηκε αρχικό ενοφθαλμισμα εύρους $1-10^5$ σπόρια.

Το δεύτερο και εξίσου βασικό σκέλος της παρούσας διδακτορικής διατριβής συνοψίζεται στην ανεύρεση μικρο(βιολογικών) μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης μυκήτων και μείωσης της παραγόμενης ΩΤΑ. Γι' αυτό το λόγο, στο παρόν κεφάλαιο (**Κεφάλαιο 6**) μελετήθηκε η ικανότητα μικτών καλλιιεργειών βακτηρίων και ζυμών τεχνολογικής σημασίας (μικροοργανισμοί που δύναται να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες ή προστατευτικές καλλιέργειες) να αναστέλουν την ανάπτυξη του *A. carbonarius* και να μειώνουν την ΩΤΑ υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ, pH, θερμοκρασία και μέγεθος του ενοφθαλμίσματος της εκάστοτε καλλιέργειας βακτηρίων ή ζυμών και μύκητα) τόσο σε θρεπτικά υποστρώματα όσο και σε ποτά (χυμός σταφυλιού, κρασί και μπύρα).

Το τελευταίο κεφάλαιο σχεδιάστηκε πειραματικά υπό το πρίσμα της ανεύρεσης εναλλακτικών μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα *A. carbonarius* και της παραγωγής ΩΤΑ με τη χρήση φυσικών αντιμικροβιακών (**Κεφάλαιο 7**). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου κανέλας κατά την εφαρμογή μέσω άμεσης (ενσωμάτωση σε εδώδιμες επικαλύψεις αλγινικού νατρίου) και έμμεσης επαφής (προσθήκη εμποτισμένου χαρτιού στη κύρια συσκευασία- δράση μέσω των πτητικών συστατικών) στη σάρκα και το φλοιό, μήλων και αχλαδιών, ενοφθαλμισμένων με τον *A. carbonarius* κατά τη συντήρησή τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες και υπό αερόβιες συνθήκες.

Οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής δύναται να συμβάλουν στην πληρέστερη κατανόηση των κινδύνων όπως την ανάπτυξη και την παραγωγή της ΩΤΑ των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum*, να ενισχύσουν τις ήδη υπάρχουσες στρατηγικές για την αντιμετώπισή τους και να αποτελέσουν έναυσμα για περαιτέρω μελέτη και έρευνα με στόχο την αποτελεσματική πρόληψή τους.

Λέξεις ευρετηρίασης: *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum*, ανάπτυξη μυκήτων, ωχρατοξίνη Α

Summary

Some filamentous fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* are of high impact for food safety due to their ability to produce a toxic secondary metabolite, ochratoxin A (OTA). OTA is well known for its carcinogenic, immunosuppressive and teratogenic properties. OTA has also been extensively documented as a contaminant of a wide variety of foods including cereals, green coffee, spices, nuts, dried fruits, beer, wine, grapes, and grape juice. Following, a literature review on OTA and existing knowledge of three main ochratoxigenic fungi (*Aspergillus westerdijkiae*, *A. carbonarius* and *Penicillium verrucosum*) the objectives of the present thesis were: i) to study the effect of different ecophysiological factors such as pH, a_w , microstructure (intrinsic factors), temperature (extrinsic factor), and initial inoculum level (implicit factors) on fungal growth and OTA production, ii) to develop kinetic or stochastic models by using the primary data in order to predict fungal growth and OTA production and validate the aforementioned models on different foodstuffs, iii) to correlate different evaluation methods regarding fungal growth (colony diameter, dry fungal biomass, and spores population) and OTA production (ELISA and HPLC analysis), and iv) to study potential biological (e.g., microorganisms- bacterial and yeast composites) or alternative methods (e.g., essential oils- vapor phase and enclosed in edible coatings) for fungal inhibition and OTA reduction.

At preliminary stage (**Chapter 3**), the potential of the ELISA method in the determination of the produced OTA by *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* and *P. verrucosum* in Malt Extract Agar at different pH (3.9, 5.1, 5.9 and 6.8), a_w (0.87, 0.93 and 0.99), and temperature (10, 15, 20, 25, 30 and 40°C) levels was evaluated, providing a rapid screening for the optimum and marginal conditions of OTA production. Moreover, selected samples were analyzed for OTA by HPLC in order to verify ELISA method. The knowledge of optimal and marginal levels of ecological factors in order to optimize post-harvest and storage of food products may significantly affect the production of OTA.

Following this screening, the study was focused on food microstructure (e.g., liquid, semi-liquid, solid) (expressed as % w/v gelatin) and how it may affect growth and OTA production of *A. carbonarius* in combination with factors such as a_w , pH and temperature (**Chapter 4**). The primary data were used in order to develop secondary (kinetic) models for growth and OTA production rates by *A. carbonarius*. Finally, the performance of the developed models was evaluated in food matrices of different viscosity such as jelly, custard and marmalade. The findings of this chapter may provide a basis for reliable assessment of the risk of fungal growth and OTA production in foods of different structural and rheological properties.

At a next step, germination, fungal growth and OTA production kinetics of *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* and *P. verrucosum* single spores were evaluated on Malt Extract Agar of different pH and a_w values, incubated at different temperatures (**Chapter 5**). Fungal growth was determined by

measuring the radial growth rate (*RGR*) and time-to-visible growth (*TTVG*) of colonies resulting from single spores, while OTA production from individual colonies was also tested. Monte Carlo simulations (10000 iterations) were used to model *TTVG* and time for OTA detection of various spore populations, assuming that spores behave independently. Simulations agreed well with validation data, suggesting that these findings may be used for risk assessment of OTA production based on the variability in responses of individual spores.

With respect to (micro)biological control, composites of yeast and bacterial isolates from fermented products were studied, in order to assess their ability to inhibit *A. carbonarius* growth and reduce OTA concentration in culture media and beverages (**Chapter 6**). The antagonistic effect of the above composites against *A. carbonarius* growth was studied in Synthetic Grape Medium of pH 3.5 and a_w 0.98, 0.95, 0.92 after incubation at 25°C. Different combinations of initial inocula of bacteria or yeast composites and fungi were used, in order to study antagonism between microorganisms. Regarding the OTA reduction experiment, different inocula of bacteria and yeast composites were inoculated in liquid media of different pH (3.0, 4.0, 5.0, and 6.1 or 6.5) and initial OTA concentration (50 and 100 ppb) and beverages e.g., grape juice, red wine, and beer to estimate the kinetics of OTA reduction. Fungal inhibition and OTA reduction were calculated in comparison to control samples. Such findings may assist in the control of *A. carbonarius* growth and OTA production in fermented foodstuffs by the use of proper strains of technological importance.

Finally, given that ochratoxigenic fungi contaminate fruits through damaged or wounded tissues and release toxin under improper storage conditions, essential oil (EO) of cinnamon was used as natural antimicrobial agent (**Chapter 7**). Skin (intentionally wounded by puncturing) and flesh of apples and pears were used as substrates for *A. carbonarius* growth and OTA production. The EO activity was estimated through direct (addition in alginate coatings) and indirect (volatile compounds of cinnamon EO) contact with the fruits. Samples without any treatment served as controls. All samples were stored at 15, 20 and 25°C. Fungal growth was estimated by colony diameter measurements and spores density (log spores/ g) on MEA, while OTA production was determined by HPLC.

The findings of the present PhD thesis may contribute to the better understanding of hazards such as growth and OTA production of *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* and *P. verrucosum*, to enforce the already existing prevention strategies and to deliver several new insights and tools (mathematical models) which may be useful for food safety management of fungal growth and OTA production by constituting also a fuel for further study and research.

Keywords: *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum*, fungal growth, ochratoxin A

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1.1. Χημική δομή των συχνότερα απαντώμενων μυκοτοξινών στα τρόφιμα (Murphy et al. 2006)	Σελ. 1
Εικόνα 1.2. Χημικές δομές της ομάδας των ωχρατοξινών (Anli et al. 2010)	Σελ. 3
Εικόνα 1.3. Το προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ΩΤΑ (Ringot et al. 2006)	Σελ. 5
Εικόνα 1.4. (α) Αναπτυσσόμενη κονιδιοφόρος, του μύκητα <i>Aspergillus nidulans</i> (ελεύθερα σπόρια επισημαίνονται με τόξα) και (β) Κύκλος αναπαραγωγής του <i>Penicillium chrysogenum</i> (Dantigny et al. 2005a)	Σελ. 9
Εικόνα 1.5. Καλλιέργεια ηλικίας 7 ημερών σε A. Czapek Yeast Autolysate Agar και B. Malt Extract Agar, C. Κονιδιοφόροι, E-F. Κονίδια του (α) <i>A. westerdijkiae</i> και του (β) <i>A. carbonarius</i> (κλίμακα: C-E. 10 μm και F. 1 μm) (http://www.mycobank.org , http://www.bcrc.firdi.org)	Σελ. 10
Εικόνα 1.6. Παρατήρηση της σταδιακής ανάπτυξης κονιδιοφόρων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του γένους <i>Aspergillus</i> (κλίμακα: 20 μm) (Fisher, 2002)	Σελ. 11
Εικόνα 1.7. Μορφολογικά στάδια του <i>Penicillium</i> sp. κατά τη δημιουργία κονιδιοφόρων (κλίμακα: 10 μm) (Roncal and Ugalde, 2003)	Σελ.12
Εικόνα 1.8. Βασική αρχή λειτουργίας της ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA (www.mycotoxins.org)	Σελ. 13
Εικόνα 1.9. Βασική αρχή λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας (www.mycotoxins.org) ..	Σελ. 14
Εικόνα 1.10. Μηχανισμοί δράσης των αιθερίων ελαίων και πιθανές περιοχές του βακτηριακού κυττάρου που μπορούν να πλήξουν (Burt, 2004)	Σελ. 20
Εικόνα 2.1. Οι μύκητες <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> και <i>P. verrucosum</i> σε θρεπτικό υπόστρωμα Malt Extract Agar μετά από επώαση 7 ημερών σε θερμοκρασία 25°C	Σελ. 25
Εικόνα 3.1. Μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης των (α) <i>A. westerdijkiae</i> και (β) <i>A. carbonarius</i> σε MEA (pH 5.1) με a_w 0.99, 0.93, 0.87 κατά την 30 ^η ημέρα επώασης στους 30°C.....	Σελ. 40
Εικόνα 4.1. Μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης του <i>A. carbonarius</i> σε (α) κρέμα και (β) ζελέ στους 20°C συναρτήσει του χρόνου συντήρησης	Σελ. 65
Εικόνα 5.1. Φωτογραφίες της αύξησης του μήκους του βλαστικού σωλήνα σπορίων του <i>A. westerdijkiae</i> σε MEA με pH 5.5 και a_w 0.99 και σε θερμοκρασία 30°C συναρτήσει του χρόνου επώασης	Σελ. 75
Εικόνα 5.2. Κάτοψη τρυβλίου Petri (12 x 12mm) με MEA (pH 3.5 ή 5.5 και a_w 0.99 ή 0.94) και των ενδεικτικών σημείων ενοφθαλμισμού των διαφορετικών συγκεντρώσεων ενοφθαλμίσματος των <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> και <i>P. verrucosum</i> για την εκτίμηση της απόδοσης του μοντέλου Monte Carlo ως προς την παράμετρο TTVG	Σελ. 81

- Εικόνα 5.3.** Διαφοροποιήσεις στο χρόνο εκβλάστησης και στο ρυθμό αύξησης του μήκους του βλαστικού σωλήνα σπορίων του *A. westerdijkiae* κατά την επώαση στους 15°C (α, β) και του *A. carbonarius* στους 30°C (γ) σε ΜΕΑ με pH 5.5 και a_w 0.99 **Σελ. 82**
- Εικόνα 5.4.** Ενδεικτικά παραδείγματα τρυβλίων Petri (12 x 12mm) με ΜΕΑ και τα σημεία ενοφθαλμισμού των διαφορετικών συγκεντρώσεων ενοφθαλμίσματος των (α) *A. westerdijkiae* και (β) *P.verrucosum* με στόχο την εκτίμηση της απόδοσης του μοντέλου Monte Carlo ως προς την παράμετρο *TTVG* **Σελ. 101**
- Εικόνα 6.1.** Οπτική παρατήρηση της ζώνης αναστολής του *A. carbonarius* (AC) λόγω της ανάπτυξης των μικτών καλλιιεργειών ζυμών (ΥΜ) (α, β, γ) και βακτηρίων (ΒΜ) (α_1 , β_1 , γ_1) (δεξιά τρυβλία) σε SGM (pH 3.5, a_w 0.98) συγκριτικά με τους μάρτυρες (ενοφθαλμισμός μόνο με *A. carbonarius*) (αριστερά τρυβλία) κατά την επώαση στους 25°C. Οι διαφορετικές αναλογίες του αρχικού ενοφθαλμίσματος ζυμών και βακτηρίων σε σχέση με τη συγκέντρωση σπορίων του μύκητα ήταν: (α, α_1) 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, (β, β_1) 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL και (γ, γ_1) 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL **Σελ. 121**
- Εικόνα 7.1.** Οπτική παρατήρηση της αναστολής της ανάπτυξης του *A. carbonarius* των ενοφθαλμισμένου στο φλοιό και στη σάρκα (α) μήλων και (β) αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (Control), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% κ.ό. (0.3% EFC), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) αιθέριου ελαίου κανέλας..... **Σελ. 144**
- Εικόνα 7.2.** Οπτική παρατήρηση της αναστολής της ανάπτυξης του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου στη σάρκα αχλαδιών με τη μέθοδο της διάχυσης των πτητικών συστατικών αιθέριου ελαίου κανέλας. (α) Μάρτυρας, (β) 0.3% (0.3% EC), και (γ) 0.9% (0.9% EC) αιθέριου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου **Σελ. 145**

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 1.1. Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδογενών, εξωγενών και λοιπών σχετιζόμενων παραγόντων στην τροφική αλυσίδα που δύναται να επηρεάσουν τη μίανση από μύκητες και την παραγωγή μυκοτοξινών (Sanchis and Magan, 2004)	Σελ. 17
Σχήμα 1.2. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες καμπύλες ανάπτυξης για μύκητες: (a) γραμμικό μοντέλο, (b) γραμμικό μοντέλο με φάση προσαρμογής και (c) σιγμοειδές μοντέλο (Garcia et al. 2009)	Σελ. 23
Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανακαλλιέργειας των μελετώμενων μυκήτων.....	Σελ. 27
Σχήμα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση των μικροβιολογικών αναλύσεων των μελετώμενων μικροοργανισμών	Σελ. 31
Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών συνθηκών (pH, a_w και θερμοκρασία) που μελετήθηκαν για την παραγωγή ΩΤΑ από τους <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A.carbonarius</i> και <i>P. verrucosum</i>	Σελ. 36
Σχήμα 4.1. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών συνθηκών (pH, a_w και % κ.ό. ζελατίνης) που μελετήθηκαν για την ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ του <i>A. carbonarius</i>	Σελ. 51
Σχήμα 5.1. Σχηματική απεικόνιση της στερεής μήτρας	Σελ. 74
Σχήμα 5.2. Πειραματική απεικόνιση της απομόνωσης μεμονωμένων σπορίων (Standaert et al. 2005).....	Σελ. 77
Σχήμα 6.1. Πειραματικός σχεδιασμός του <i>in vitro</i> πειράματος	Σελ. 114
Σχήμα 6.2. Πειραματικός σχεδιασμός του <i>in situ</i> πειράματος	Σελ. 117
Σχήμα 7.1. Πειραματική πορεία της προετοιμασίας, του ενοφθαλμισμού με τον <i>A. carbonarius</i> και της εμφάνισης των φρούτων σε διαλύματα αλγινικού νατρίου με και χωρίς αιθέριο έλαιο κανέλας.....	Σελ. 141

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1.1. Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες, τα είδη μυκήτων από τα οποία παράγονται και τα τρόφιμα στα οποία απαντώνται	Σελ. 2
Πίνακας 1.2. Μέση θανατηφόρος δόση (Median Lethal Dose 50%- LD ₅₀) και χρόνοι ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) της ΩΤΑ μετά από δια του στόματος λήψη (O'Brien and Dietrich, 2005)	Σελ. 6
Πίνακας 1.3. Μέγιστα επιτρεπτά όρια της ΩΤΑ (Commission Regulation, 2006)	Σελ. 8
Πίνακας 1.4. Ομαδοποίηση των κυριότερων μαθηματικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μυκήτων (Garcia et al. 2009)	Σελ. 24
Πίνακας 2.1. Τα στελέχη και η προέλευση των τριών ειδών μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή	Σελ. 25
Πίνακας 2.2. Τα στελέχη και η προέλευση των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή	Σελ. 26
Πίνακας 2.3. Τα στελέχη και η προέλευση των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή	Σελ. 26
Πίνακας 3.1. Βιβλιογραφικές αναφορές που ελήφθησαν υπόψη για τον καθορισμό του εύρους των παραμέτρων pH, a_w και θερμοκρασίας επώασης	Σελ. 37
Πίνακας 3.2. Ποσοστά ανάκτησης μετά τη φόρτιση θρεπτικών υποστρωμάτων MEA με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ	Σελ. 39
Πίνακας 3.3. Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της ΩΤΑ που προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους της ELISA και της HPLC για τους <i>A. westerdijkiae</i> και <i>A. carbonarius</i>	Σελ. 45
Πίνακας 4.1. Παραδείγματα τροφίμων σύμφωνα με τη μικροδομή τους (Wilson et al. 2002).....	Σελ. 50
Πίνακας 4.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τροφίμων που επιλέχθηκαν για την αξιολόγηση των αναπτυχθέντων μοντέλων της ανάπτυξης και της παραγωγής ΩΤΑ του <i>A. carbonarius</i>	Σελ. 52
Πίνακας 4.3. Ποσοστά ανάκτησης μετά τη φόρτιση θρεπτικών υποστρωμάτων και τροφίμων με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ	Σελ. 54
Πίνακας 4.4. Παράμετροι (ρυθμός ανάπτυξης- μ_{max} , χρόνος εμφάνισης της υφής του μύκητα- $TTVG$) που εκτιμήθηκαν μέσω της μοντελοποίησης της αύξησης της βιομάζας του <i>A. carbonarius</i> με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου του Baranyi	Σελ. 61
Πίνακας 4.5. Παράμετροι (ρυθμός παραγωγής ΩΤΑ- $\mu_{max \Omega TA}$, αθροιστική συγκέντρωση ΩΤΑ) που εκτιμήθηκαν μέσω της μοντελοποίησης της συγκέντρωσης ΩΤΑ του <i>A. carbonarius</i> με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου του Baranyi	Σελ. 62

Πίνακας 4.6. Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τα δευτερογενή πολυωνυμικά μοντέλα της τετραγωνικής ρίζας του μέγιστου ειδικού ρυθμού της ανάπτυξης και της παραγωγής ΩΤΑ του <i>A. carbonarius</i>	Σελ. 64
Πίνακας 5.1. Το εύρος της διαμέτρου κατά την οποία η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη ($d_{det\ \Omega TA}$) από μυκήλια προερχόμενα από μεμονωμένα σπόρια των <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> και <i>P. verrucosum</i> σε διαφορετικές συνθήκες a_w , pH και θερμοκρασίας	Σελ. 80
Πίνακας 5.2. Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των παραμέτρων κινητικής των μεμονωμένων σπορίων των <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> και <i>P. verrucosum</i> συναρτήσει της θερμοκρασίας, του pH και της a_w	Σελ. 86
Πίνακας 5.3. Προβλεφθείσες και παρατηρηθείσες τιμές της παραμέτρου <i>TTVG</i> (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για μεμονωμένα σπόρια	Σελ. 98
Πίνακας 5.4. Προβλεφθείσες και παρατηρηθείσες τιμές της παραμέτρου <i>TTVG</i> (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για N_0 1-100 σπόρια	Σελ. 99
Πίνακας 5.5. Προβλεφθείσες και παρατηρηθείσες τιμές της παραμέτρου $t_{det\ \Omega TA}$ (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για μεμονωμένα σπόρια	Σελ. 102
Πίνακας 5.6. Προβλεφθείσες τιμές της παραμέτρου $t_{det\ \Omega TA}$ (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για N_0 1-100 σπόρια	Σελ. 103
Πίνακας 6.1. Η κωδικοποίηση των μικτών καλλιεργειών των βακτηρίων και των ζυμών	Σελ. 111
Πίνακας 6.2 Σύσταση και βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ποτών	Σελ. 116
Πίνακας 6.3. Ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ μετά από φόρτιση των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων και των τριών τροφίμων με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ	Σελ. 119
Πίνακας 7.1. Ενδεικτικές αναφορές σχετικά με τη μελέτη της εφαρμογής εδώδιμων μεμβρανών ή επικαλύψεων με αντιμικροβιακούς παράγοντες στην ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών	Σελ. 136
Πίνακας 7.2. Ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ από τη φόρτιση των δύο φρούτων με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ	Σελ. 142
Πίνακας 7.3. Μεταβολές του pH μήλων και αχλαδιών ενοφθαλμισμένων με <i>A. carbonarius</i> στο φλοιό χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (C), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.....	Σελ. 150
Πίνακας 7.4. Μεταβολές του pH μήλων και αχλαδιών ενοφθαλμισμένων με <i>A. carbonarius</i> στη σάρκα χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (C), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) αιθερίου ελαίου κανέλας,	

συντηρούμενων στους 15 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων..... **Σελ. 151**

Πίνακας 7.5. Μεταβολές του pH μήλων και αχλαδιών ενοφθαλμισμένων με *A. carbonarius* στη σάρκα χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας), με 0.3% (0.3% EC), και 0.9 % (0.9% EC) αιθέριου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 155**

Ευρετήριο γραφημάτων

- Γράφημα 3.1.** Πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ των δειγμάτων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA **Σελ. 38**
- Γράφημα 3.2.** Πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ των δειγμάτων που αναλύθηκαν με την HPLC **Σελ. 39**
- Γράφημα 3.3.** Γραφική απεικόνιση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ (ppb) από τον *A. westerdijkiae* σε MEA συναρτήσει του pH, της a_w και σε θερμοκρασία επώασης 15°C (α), 20°C (β), 25°C (γ) και 30°C (δ), με τη μέθοδο της ELISA **Σελ. 42**
- Γράφημα 3.4.** Γραφική απεικόνιση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ (ppb) από τον *A. carbonarius* σε MEA συναρτήσει του pH, της a_w και σε θερμοκρασία επώασης 15°C (α), 20°C (β), 25°C (γ) και 30°C (δ), με τη μέθοδο της ELISA **Σελ. 43**
- Γράφημα 3.5.** Γραφική απεικόνιση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον *P. verrucosum* σε MEA συναρτήσει του pH, της a_w και σε θερμοκρασία επώασης 10°C (α), 15°C (β), 20°C (γ) και 25°C (δ), με τη μέθοδο της ELISA **Σελ. 44**
- Γράφημα 4.1.** Καμπύλες βαθμονόμησης (α) της κρέμας, (β) του ζελέ και της (γ) μαρμελάδας που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ **Σελ. 53**
- Γράφημα 4.2.** Καμπύλες συσχέτισης μεταξύ του ιξώδους και της % κ.ό. συγκέντρωσης ζελατίνης στα διαφορετικά μελετώμενα θρεπτικά υποστρώματα MEA με a_w 0.90, 0.94 και 0.99..... **Σελ. 56**
- Γράφημα 4.3.** Γραφική απεικόνιση της κινητικής (α) της αύξησης της βιομάζας και (β) της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* σε MEB (a_w 0.99) χρησιμοποιώντας 0% (-♦-), 5% (-■-), 10% (-▲-) και 20% κ.ό. (-x-) ζελατίνη ως πηκτικό παράγοντα και επώαση στους 15, 20 και 25°C..... **Σελ. 58**
- Γράφημα 4.4.** Γραφική απεικόνιση της κινητικής (α) της αύξησης της βιομάζας και (β) της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* σε MEB (a_w 0.94) χρησιμοποιώντας 0% (-♦-), 5% (-■-), 10% (-▲-) και 20% κ.ό. (-x-) ζελατίνη ως πηκτικό παράγοντα και επώαση στους 15, 20 και 25°C..... **Σελ. 59**
- Γράφημα 4.5.** Γραφική απεικόνιση της κινητικής (α) της αύξησης της βιομάζας και (β) της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* σε MEB (a_w 0.90) χρησιμοποιώντας 0% (-♦-), 5% (-■-), 10% (-▲-) και 20% κ.ό. (-x-) ζελατίνη ως πηκτικό παράγοντα και επώαση στους 15, 20 και 25°C..... **Σελ. 60**
- Γράφημα 4.6.** Γραφική απεικόνιση των προσαρμοσμένων καμπυλών των πολυωνυμικών μοντέλων της τετραγωνικής ρίζας: (α) του μέγιστου ειδικού ρυθμού της ανάπτυξης ($\sqrt{\mu_{\max}}$) και (β) του ρυθμού παραγωγής της ΩΤΑ ($\sqrt{\mu_{\max \Omega TA}}$) του *A. carbonarius* σε εργαστηριακά υποστρώματα διαφορετικής a_w

(0.99, 0.94 και 0.90), μικροδομής (0, 5, 10 και 20% κ.ό. ζελατίνη) και σε θερμοκρασίες επώασης 15 (—, -▲-), 20 (—, -●-) και 25°C (—, -■-) σε σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή **Σελ. 63**

Γράφημα 4.7. Οι μετρήσεις (πράσινες μπάρες) και προβλέψεις (γκρι μπάρες) για τους \sqrt{t}_{max} της (α) ανάπτυξης του *A. carbonarius* και της (β) παραγωγής ΩΤΑ σε κρέμα, ζελέ και μαρμελάδα κατά τη συντήρηση στους 20°C **Σελ. 66**

Γράφημα 5.1. Οι πρότυπες καμπύλες μεταξύ OD και πληθυσμού σπορίων των (α) *A. westerdijkiae*, (β) *A. carbonarius* και (γ) *P. verrucosum* **Σελ. 76**

Γράφημα 5.2. Μέσες τιμές του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε MEA διαφορετικής a_w (0.99 και 0.94), pH (3.5 και 5.5) και θερμοκρασίας (10, 15, 20, 25 και 30°C) συναρτήσει του χρόνου επώασης, με τη μέθοδο των συσκευών «gel cassettes» **Σελ. 84**

Γράφημα 5.3. Box plots των κατανομών (α) του ρυθμού ανάπτυξης του (*RGR*) και του (β) χρόνου εμφάνισης της υφής (*TTVG*) του *A. westerdijkiae* συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C) του pH (5.5 και 3.5) και της a_w (0.99 και 0.94), μελετώντας έως και 100 μεμονωμένα σπόρια..... **Σελ. 88**

Γράφημα 5.4. Box plots των κατανομών (α) του ρυθμού ανάπτυξης του (*RGR*) και του (β) χρόνου εμφάνισης της υφής (*TTVG*) του *A. carbonarius* συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C) του pH (5.5 και 3.5) και της a_w (0.99 και 0.94), μελετώντας έως και 100 μεμονωμένα σπόρια..... **Σελ. 89**

Γράφημα 5.5. Box plots των κατανομών (α) του ρυθμού ανάπτυξης του (*RGR*) και του (β) χρόνου εμφάνισης της υφής (*TTVG*) του *P. verrucosum* συναρτήσει της θερμοκρασίας (10, 15, 20 και 25°C) του pH (5.5 και 3.5) και της a_w (0.99 και 0.94), μελετώντας έως και 100 μεμονωμένα σπόρια..... **Σελ. 90**

Γράφημα 5.6. Ενδεικτικά παραδείγματα της αναλογικής σχέσης της σχετικής αθροιστικής συχνότητας του χρόνου εκβλάστησης (GT) και του *TTVG* των (α) *A. westerdijkiae* (30°C, pH 5.5 και a_w 0.99) και (β) *P. verrucosum* (10°C, pH 5.5 και a_w 0.99) **Σελ. 91**

Γράφημα 5.7. Διακύμανση στη συχνότητα της συγκέντρωσης της ΩΤΑ από τους *A. westerdijkiae* (α), *A. carbonarius* (β) και *P. verrucosum* (γ) ανεξάρτητα από τις μελετώμενες πειραματικές συνθήκες. Όρια νομοθεσίας 2-10 ppb (σύμφωνα με τον Καν. ΕΚ 1881/2006) **Σελ. 92**

Γράφημα 5.8. Διακύμανση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον *A. westerdijkiae*, συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C), της a_w (0.99 και 0.94), του pH (3.5 και 5.5) και του χρόνου επώασης **Σελ. 94**

Γράφημα 5.9. Διακύμανση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον <i>A. carbonarius</i> , συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C), της a_w (0.99 και 0.94), του pH (3.5 και 5.5) και του χρόνου επώασης	Σελ. 95
Γράφημα 5.10. Διακύμανση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον <i>P. verrucosum</i> , συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C), της a_w (0.99 και 0.94), του pH (3.5 και 5.5) και του χρόνου επώασης	Σελ. 96
Γράφημα 5.11. Επίδραση του μεγέθους του αρχικού ενοφθαλμίσματος των (α) <i>A.westerdijkiae</i> , (β) <i>A. carbonarius</i> και (γ) <i>P. verrucosum</i> στο χρόνο εμφάνισης της υφής (TTVG) κατά την ανάπτυξή τους σε MEA με pH 3.5 ή 5.5 και a_w 0.99 ή 0.94 και επώαση τους 10, 15, 20, 25°C και 30°C.....	Σελ. 100
Γράφημα 5.12. Ενδεικτικά παραδείγματα της γραμμικής συσχέτισης που παρατηρήθηκε μεταξύ του δεκαδικού λογαρίθμου του μεγέθους του αρχικού ενοφθαλμίσματος και του TTVG των (α) <i>A.westerdijkiae</i> , (β) <i>A. carbonarius</i> και (γ) <i>P. verrucosum</i> . Συνθήκες: pH 5.5 και a_w 0.94	Σελ. 101
Γράφημα 6.1. Ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Yeast medium με pH 6.5 και αρχική συγκέντρωση ΩΤΑ 100 rrb μετά από ενοφθαλμισμό με μεμονωμένα στελέχη ζυμών και επώαση στους 30°C για 2 ημέρες	Σελ. 112
Γράφημα 6.2. Οι πρότυπες καμπύλες των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων (α) Yeast Medium και (β) MRS που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ στο <i>in vitro</i> πείραμα	Σελ. 118
Γράφημα 6.3. Οι πρότυπες καμπύλες (α) του χυμού σταφυλιού, (β) του κόκκινου κρασιού και (γ) της μπύρας που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ στο <i>in situ</i> πείραμα	Σελ. 118
Γράφημα 6.4. Ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης του <i>A. carbonarius</i> σε SGM (pH 3.5; a_w 0.98, 0.95 και 0.92), μετά από ενοφθαλμισμό μικτών καλλιιεργειών ζυμών (YM1, YM2, YM3, YM4, 16YM) και επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Μελετήθηκαν διαφορετικές αναλογίες αρχικών ενοφθαλμισμάτων ζυμών και μύκητα: (α) 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, (β) 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL και (γ) 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL	Σελ. 120
Γράφημα 6.5. Γραφική απεικόνιση της αναστολής της ανάπτυξης του <i>A. carbonarius</i> συγκαλλιιεργούμενου με μικτές καλλιιεργειες ζυμών σε SGM (pH 3.5; a_w 0.98, 0.95 και 0.92) μετά από επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Οι διαφορετικές αναλογίες του αρχικού ενοφθαλμίσματος των ζυμών σε σχέση με τη συγκέντρωση σπορίων του μύκητα ήταν: (α) 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, (β) 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL και (γ) 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL	Σελ. 122
Γράφημα 6.6. Ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα με pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.1 ή 6.5) και αρχική συγκέντρωση ΩΤΑ, 50 (α, γ) και 100 rrb (β, δ) μετά από ενοφθαλμισμό με διαφορετικές μικτές καλλιιεργειες: (α, β) βακτηρίων (BM, SM, PdM, WM, LbM, 29BM) και (γ, δ)	

ζυμών (YM1, YM2, YM3, YM4, 16YM) και επώαση στους 30°C για 5 και 2 ημέρες αντίστοιχα..... **Σελ. 125**

Γράφημα 6.7. Επίδραση του αρχικού ενοφθαλμίσματος (10^3 cfu/mL- μπλε χρώματος μπάρες; 10^7 cfu/mL- κόκκινου χρώματος μπάρες) των μικτών καλλιιεργειών: (α, β) 29BM και (γ, δ) 16YM, στην ποσοστιαία μείωση της ΩΤΑ συναρτήσει του pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.1 ή 6.5) και της αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ, 50 (α, γ) και 100 ppb (β, δ) μετά από επώαση στους 30°C για 5 και 2 ημέρες αντίστοιχα **Σελ. 126**

Γράφημα 6.8. Κινητική της ποσοστιαίας μείωσης της ΩΤΑ σε: (α) χυμό σταφυλιού, (β) κόκκινο κρασί, και (γ) μπύρα αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ 100 ppb, ενοφθαλμισμένων με μικτή καλλιέργεια 10^7 cfu/mL 29BM και 16YM μετά από επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Μελετήθηκαν επίσης δείγματα μαρτύρων (τρόφιμα με προσθήκη ΩΤΑ αλλά χωρίς ενοφθαλμισμό με βακτήρια ή ζύμες)..... **Σελ. 128**

Γράφημα 7.1. Οι πρότυπες καμπύλες (α) του μήλου και (β) του αχλαδιού που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ **Σελ. 142**

Γράφημα 7.2. Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα μήλων χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-✕-) αιθέριου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο τουλάχιστον 10 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 146**

Γράφημα 7.3. Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-✕-) αιθέριου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο τουλάχιστον 10 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 147**

Γράφημα 7.4. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα μήλων χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-✕-) αιθέριου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 148**

Γράφημα 7.5. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο

έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-x-) αιθέριου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 149**

Γράφημα 7.6. Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου στη σάρκα (α) μήλων και (β) αχλαδιών χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με 0.3% (0.3% EC) (-■-), και 0.9% (0.9% EC) (-▲-) αιθέριου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 10 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 152**

Γράφημα 7.7. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του (α) *A. carbonarius* και της (β) Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στη σάρκα μήλων χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με 0.3% (0.3% EC) (-■-), και 0.9% (0.9% EC) (-▲-) αιθέριου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 153**

Γράφημα 7.8. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του (α) *A. carbonarius* και της (β) Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στη σάρκα αχλαδιών χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με 0.3% (0.3% EC) (-■-), και 0.9% (0.9% EC) (-▲-) αιθέριου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 154**

Γράφημα 7.9. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της παραγωγής ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα μήλων χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-x-) αιθέριου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 4 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 158**

Γράφημα 7.10. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της παραγωγής ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-x-) αιθέριου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 4 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 159**

Γράφημα 7.11. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της παραγωγής ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου στη σάρκα (α) μήλων και (β) αχλαδιών χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με 0.3% (0.3% EC) (-■-), και 0.9% (0.9% EC) (-▲-) αιθέριου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας

φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 4 ανεξάρτητων δειγμάτων **Σελ. 160**

Γράφημα 7.12. Ενδεικτικά παραδείγματα της συσχέτισης μεταξύ της ακτινωτής διαμέτρου του *A. carbonarius* και της συγκέντρωσης ΩΤΑ κατά τον ενοφθαλμισμό (α) του φλοιού και (β) της σάρκας αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-x-) αιθέριου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15 και 25°C **Σελ. 161**

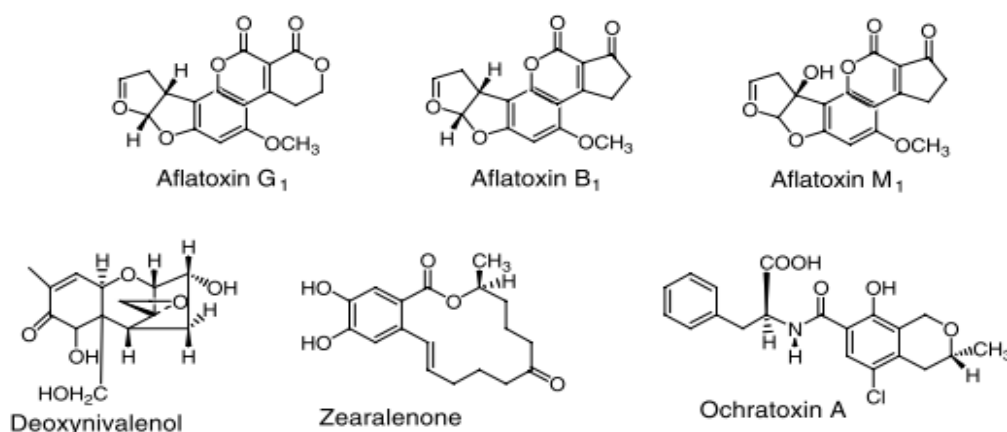
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Γενική εισαγωγή

1.1 Μυκοτοξίνες

Ο όρος μυκοτοξίνη είναι μία σύνθετη λέξη προερχόμενη από την ελληνική λέξη “μύκητας” και τη λατινική “toxicum” που σημαίνει δηλητήριο. Οι μυκοτοξίνες είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού (secondary metabolites) ορισμένων ειδών μυκήτων. Συγκεκριμένα, ως δευτερογενείς μεταβολίτες ορίζονται οι ουσίες, οι οποίες παράγονται μεν από τους μικροοργανισμούς κατά τη μεταβολική τους δραστηριότητα αλλά δεν είναι άμεσα χρήσιμες για την ανάπτυξή τους (Betina, 1994).

Οι μυκοτοξίνες παράγονται μετά την ολοκλήρωση της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης των μυκήτων (πρωτογενής μεταβολισμός). Τα ενδιάμεσα προϊόντα από τα πρωτογενή μεταβολικά μονοπάτια δεν χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του μύκητα αλλά συμμετέχουν στην εκδήλωση ασυνήθιστων μεταβολικών μονοπατιών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των τοξινών. Έχει καταγραφεί ότι οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες συσσωρεύονται κυρίως στα μεγαλύτερης ηλικίας τμήματα της αποικίας, ενώ μπορεί να παρατηρείται ταυτόχρονη ανάπτυξη των επάκριων τμημάτων των υφών του μύκητα (Filtenborg et al. 1996, Valero et al. 2006a).



Εικόνα 1.1. Χημική δομή των συχνότερα απαντώμενων μυκοτοξινών στα τρόφιμα (Murphy et al. 2006).

Μερικές από τις κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες (B₁, B₂, G₁, G₂ και M₁), η ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ), η ζεαραλενόνη, οι φουμονισίνες, η τριχοθεσίνη (Τ-2) και η πατουλίνη (Πίνακας 1.1). Οι περισσότερες από τις μυκοτοξίνες, κυρίως οι αφλατοξίνες και η ΩΤΑ, έχουν καρκινογόνο δράση (Steyn, 1995) (Εικόνα 1.1). Από χημικής πλευράς, οι μυκοτοξίνες συνιστούν ένα σύνολο ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους με ποικίλες δομές και βιολογικές δραστηριότητες. Έχουν κυρίως λιπόφιλο χαρακτήρα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στα λιπαρά τμήματα φυτών και ζώων.

Οι συνθήκες, οι οποίες προάγουν την παραγωγή των μυκοτοξινών είναι συνήθως περιορισμένες συγκριτικά με τις αντίστοιχες που επιτρέπουν την ανάπτυξη των τοξινογόνων μυκήτων. Παρόλα αυτά, τόσο η ανάπτυξη των μυκήτων όσο και η παραγωγή των μυκοτοξινών ευνοείται από διάφορους οικολογικούς ή μη παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, ο χρόνος επώασης, το pH, η δομή του υποστρώματος (υγρό- στερεό) (Häggblom 1982, Lillehoj and Elling 1983, Marquardt and Frohlich 1992, Filtenborg et al. 1996).

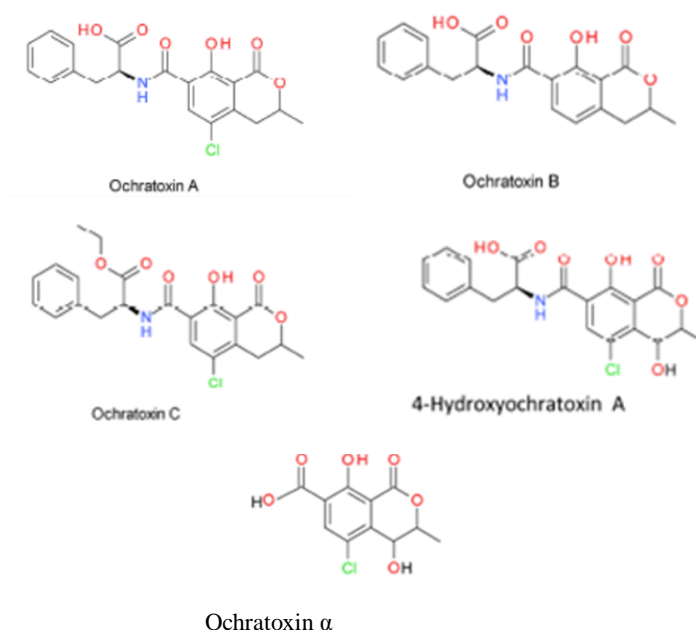
Πίνακας 1.1. Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες, τα είδη μυκήτων από τα οποία παράγονται και τα τρόφιμα στα οποία απαντώνται.

Μυκοτοξίνη	Είδος μύκητα	Τρόφιμα
Αφλατοξίνη B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i>	Καρύδια, δημητριακά, όσπρια, μπαχαρικά, σπόροι σόγιας, αποξηραμένα φρούτα
Αφλατοξίνη M ₁ , M ₂	Μεταβολικά προϊόντα των B ₁ , B ₂	Γάλα
Ωχρατοξίνη Α	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>A. carbonarius</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Σιτηρά, καφές, κρασί, μπίρα, αποξηραμένα φρούτα
Πατουλίνη	<i>Penicillium expansum</i> <i>Aspergillus clavatus</i>	Μήλα, δαμάσκηνα, ροδάκινα, αχλάδια, λαχανικά
Τριχοθεσίνες	<i>Fusarium sporotrichoides</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. verticilloides</i>	Σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι, βρώμη, σίκαλη
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium culmorum</i> <i>F. graminearum</i>	Καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι, ρύζι
Φουμονισίνες	<i>F. moniliforme</i> <i>F. proliferatum</i>	Καλαμπόκι, σιτηρά

1.2 Ωχρατοξίνη Α

1.2.1 Γενικά

Η ΩΤΑ απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1965 από τον *Aspergillus ochraceus* Wilh. στη Νότιο Αφρική (Van der Merwe et al. 1965). Μέσα στα επόμενα χρόνια, είδη του γένους *Penicillium* όπως ο μύκητας *Penicillium verrucosum* συνδέθηκαν με την παραγωγή της εν λόγω τοξίνης (Pitt 1987, Varga et al. 1996). Πρόσφατα, ο *Aspergillus carbonarius* ταυτοποιήθηκε ως η τρίτη κύρια πηγή της ΩΤΑ (Teren et al. 1996). Παρόλο που υπάρχουν αρκετά είδη ωχρατοξινών, η ΩΤΑ αποτελεί τη συχνότερα απαντώμενη και την ισχυρότερα τοξική μορφή (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Χημικές δομές της ομάδας των ωχρατοξινών (Anli et al. 2010).

Τα είδη μυκήτων που προαναφέρθηκαν είναι ικανά για ανάπτυξη σε διαφορετικές κλιματικές συνθήκες και υποστρώματα (τρόφιμα), με συνέπεια η παρουσία της ΩΤΑ να αποτελεί έναν κίνδυνο παγκόσμιας κλίμακας. Συγκεκριμένα, η ανίχνευση της τοξίνης σε ψυχρά κλίματα οφείλεται συνήθως στο μύκητα *P. verrucosum*, ενώ η εμφάνισή της σε προϊόντα που παράγονται σε θερμές και τροπικές περιοχές έχει συσχετιστεί με τα είδη του γένους *Aspergillus*. Η ΩΤΑ είναι δυνατόν να απομονωθεί από ένα ευρύ φάσμα τροφίμων. Σύμφωνα με δεδομένα που έχουν συλλεχθεί από ευρωπαϊκούς οργανισμούς, προϊόντα όπως τα σιτηρά, το κρασί, ο χυμός σταφυλιού, ο καφές και το χοιρινό αποτελούν τις κύριες πηγές της ΩΤΑ επί της συνολικής προσλαμβανόμενης ποσότητας της τοξίνης με 58%, 21%, 7%, 5%, και 3% αντίστοιχα (JECFA, 2001).

Μελέτες αναφέρουν τις νεφροτοξικές, τερατογόνες, ανοσοτοξικές, ηπατοτοξικές και νευροτοξικές ιδιότητές της ΩΤΑ (Schlatter et al. 1996, Petzinger and Zieger 2000). Πρόσφατα, η εν

λόγω τοξίνη καθορίστηκε ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (group 2B) (IARC, 1993). Επιπλέον, έχει συνδεθεί με την ανθρώπινη ασθένεια, Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια (Balkan Endemic Nephropathy- BEN), μία θανατηφόρα, χρόνια νεφρική ασθένεια που εμφανίζεται σε περιορισμένες περιοχές της Βουλγαρίας, της πρώην Γιουγκοσλαβίας και της Ρουμανίας. Τα πρώτα σημάδια της ασθένειας περιλαμβάνουν κόπωση, πονοκέφαλο, απώλεια σωματικού βάρους και ωχρό δέρμα. Συχνά συνοδεύεται από πρωτεϊνουρία και υπέρταση. Τα κύρια γνωρίσματά της είναι οι χρόνιες αλλοιώσεις στο φλοιό των νεφρών, ενώ σε προχωρημένο στάδιο, το σχήμα και το βάρος των νεφρών παρουσιάζει σημαντική μείωση (Marquardt and Frohlich 1992, Esser and Lemke 1996, Petzinger and Ziegler 2000). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η πρόσληψη παρόμοιων συγκεντρώσεων ΩΤΑ δεν έχει προκαλέσει την ασθένεια σε άλλες περιοχές της Ευρώπης (Jimenez et al. 1999, Blank et al. 2003, Atanasova et al. 2005).

Η τοξικότητα της ΩΤΑ και η επικινδυνότητά της για την ανθρώπινη υγεία έχει εκτιμηθεί από ευρωπαϊκούς και διεθνείς οργανισμούς καθορίζοντας τα μέγιστα επιτρεπτά όρια κατανάλωσης στα τρόφιμα (SCF 1998, JECFA 2001). Πολλές χώρες έχουν χρησιμοποιήσει τα όρια αυτά ως βάση για τη θέσπιση κανονισμών για τις μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις της ΩΤΑ ανά κατηγορία τροφίμου.

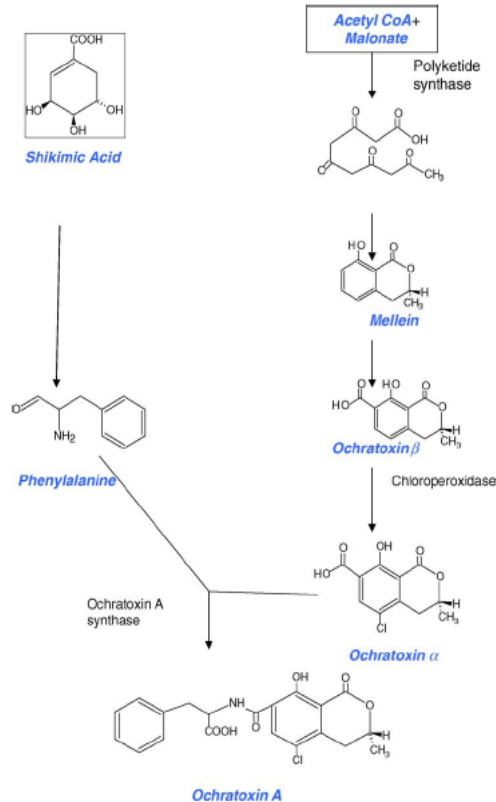
1.2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ΩΤΑ

Η ΩΤΑ (CAS No. 303-47-9) είναι μια χλωριωμένη ισοκουμαρινική ένωση με μοριακό τύπο $C_{20}H_{18}ClNO_6$ και μοριακό βάρος ίσο με $403.82 \text{ g mol}^{-1}$. Η πλήρης ονομασία που έχει δοθεί επίσημα από την IUPAC είναι L-φαινυλαλανίνη-N-[(5-χλωρο-3,4-διυδρο-8-υδροξυ-3-μεθυλ-1-οξο-1H-2-βενζοπυρεν-7-υλ)καρβοξυλ]-(R)-ισοκουμαρίνη (Esser and Lemke, 1996) (Εικόνα 1.2).

Η στερεή μορφή της ΩΤΑ είναι μία κρυσταλλική, άχρωμη ουσία, αδιάλυτη στο νερό. Είναι σταθερή κατά τη θερμική επεξεργασία και την υδρόλυση. Ως οξύ χαρακτηρίζεται από υψηλή διαλυτότητα σε πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως χλωροφόρμιο, αιθανόλη και μεθανόλη. Το σημείο τήξης είναι 90 και 171°C , όταν επανακρυσταλλοποιείται από βενζόλιο (περιεκτικότητα 1 mol βενζόλιο/ mol) ή ξυλόλιο αντίστοιχα (Betina, 1989). Η ΩΤΑ εμφανίζει μπλε και πράσινο φθορισμό στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η μέγιστη εκπομπή φθορισμού της τοξίνης παρουσιάζεται σε μήκος κύματος 467 nm και 428 nm , σε διάλυμα 96% και 100% αιθανόλης, αντίστοιχα. Επιπλέον, είναι ασταθής στο φως, ειδικά σε συνθήκες υψηλής υγρασίας, ενώ παρουσιάζει πολύ καλή σταθερότητα στο σκοτάδι σε διαλύματα αιθανόλης. Η ΩΤΑ έχει ασθενείς όξινες ιδιότητες. Οι τιμές pK_a κυμαίνονται σε εύρος $4.2-4.4$ και $7.0-7.3$, αντίστοιχα, για την ομάδα του καρβοξυλίου του τμήματος της φαινυλαλανίνης και την ομάδα του ισοκουμαρινικού μέρους (Valenta, 1998).

1.2.3 Βιοσύνθεση της ΩΤΑ

Δομικά η ΩΤΑ αποτελείται από ένα πολυκετίδιο (polyketide), το οποίο πιθανώς προέρχεται από μία ομάδα διυδροϊσοκουμαρίνης (dihydroisocoumarin) και συνδέεται μέσω πεπτιδικού δεσμού με το αμινοξύ L- φαινυλαλανίνη (L-phenylalanine). Παρόλο που το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της ΩΤΑ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι το τμήμα της φαινυλαλανίνης δημιουργείται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος (shikimate pathway) και το τμήμα της διυδροϊσοκουμαρίνης (dihydroisocoumarin) προέρχεται από το μονοπάτι του πεντακετιδίου (pentaketide pathway) (Huff and Hamilton 1979, Harris and Mantle 2001) (Εικόνα 1.3). Δεδομένης της μοριακής δομής της ΩΤΑ, είναι προφανές ότι πιθανώς απαιτείται ένας αριθμός ενζυμικών αντιδράσεων για τη βιοσύνθεσή της. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι μία πολυκετιδική συνθάση (polyketide synthase- PKS) απαιτείται για τη σύνθεση της πολυκετιδικής διυδροϊσοκουμαρίνης (polyketide dihydroisocoumarin), ενώ επιπλέον υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για τη συμμετοχή της πρώτης στην παραγωγή της ΩΤΑ (Harris and Mantle 2001, Moss 1996, 1998). Επιπλέον, η έκφραση γονιδίων (*pks genes*) που προάγουν τη σύνθεση της PKS έχει καταγραφεί ότι σχετίζεται με την παραγωγή ΩΤΑ από τον *A. ochraceus* (O'Callaghan et al. 2003), τον *A. carbonarius* (Gallo et al. 2009), τον *Penicillium nordicum* (*otapksPN*) (Karolewicz and Geisen, 2005) και τον *P. verrucosum* (*otapksPV*) (Geisen et al. 2006).



Εικόνα 1.3. Το προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ΩΤΑ (Ringot et al. 2006).

1.2.4 Απορρόφηση, μεταβολισμός και απέκκριση της ΩΤΑ

Η απορρόφησή της ΩΤΑ μετά την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου γίνεται από το γαστροεντερικό σύστημα και στη συνέχεια η τοξίνη περνά στον ορό του αίματος δεσμεύοντας τις πρωτεΐνες του. Ο χρόνος ημίσειας ζωής στον ορό του αίματος ανάμεσα στον άνθρωπο και στα ζώα παραλλάσσει σημαντικά και εξαρτάται από τη συγγένεια και τον βαθμό δέσμευσης των πρωτεϊνών (Πίνακας 1.2). Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημίσειας ζωής στον άνθρωπο δύναται να φτάσει μέχρι και τις 35 ημέρες. Η επαναπορρόφηση της τοξίνης λαμβάνει χώρα μέσω του ουροποιητικού συστήματος, της εντεροηπατικής κυκλοφορίας ή της ισχυρής δέσμευσης από την αλβουμίνη του ορού (Magan et al. 2004). Η συσσώρευση της τοξίνης γίνεται στο αίμα, στο ήπαρ και τους νεφρούς. Τα δύο τελευταία όργανα αποτελούν και τα κύρια μέρη που συμβαίνει η βιομετατροπή (biotransformation) της ΩΤΑ. Ο μεταβολισμός της ΩΤΑ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, ενώ οι υπάρχουσες πληροφορίες είναι αντικρουόμενες. Όσον αφορά την αποβολή της τοξίνης από τον οργανισμό γίνεται μέσω των οργάνων απέκκρισης (π.χ. του ουροποιητικού συστήματος).

Πίνακας 1.2. Μέση θανατηφόρος δόση (Median Lethal Dose 50%- LD_{50}) και χρόνοι ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) της ΩΤΑ μετά από δια του στόματος λήψη (O'Brien and Dietrich, 2005).

Είδος	LD_{50} (mg/kg σ.β.)	$t_{1/2}$	Βιβλιογραφικές αναφορές
Άνθρωπος	n.d.	35.5 ημέρες	Studer-Rorh et al. 2000
Πίθηκος	n.d.	21 ημέρες	Hagelberg et al. 1989
Χοίρος	1.0-6.0	72-120 ώρες	Galtier et al. 1981, Mortensen et al. 1983
Αρουραίος	20-30	55-120 ώρες	Galtier et al. 1981, Ballinger et al. 1986
Ποντίκι	48-58	40 ώρες	Fukui et al. 1987, Hagelberg et al. 1989

n.d.: no data (δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα)

σ.β.: σωματικό βάρος

1.2.5 Νομοθεσία

1.2.5.1 Γενικά

Η παρουσία υψηλής τοξικότητας των μυκοτοξινών συγκαταλέγοντας και την ΩΤΑ σε συνδυασμό με τη σημερινή ανάγκη για υγιεινά, ποιοτικά και κυρίως ασφαλή τρόφιμα έχει οδηγήσει τις εποπτικές αρχές που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων στον καθορισμό ανώτατων επιτρεπτών ορίων, στον εγχώριο ελλαδικό και στον διεθνή χώρο.

Οι μυκοτοξίνες αποτέλεσαν τα τελευταία χρόνια, τους κύριους ρυπαντές στο Σύστημα Ταχείας Προειδοποίησης για τα μη ασφαλή Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed-RASFF). Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούσαν στις αφλατοξίνες και δευτερευόντως στην

ΩΤΑ. Η παρουσία της ΩΤΑ αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αναδυόμενους διατροφικούς κινδύνους και είναι σημαντικό να ελέγχεται σε όλα τα στάδια (από το χωράφι μέχρι το τελικό προϊόν).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε μια σειρά νομοθετημάτων για την πρόληψη του προβλήματος των μυκοτοξινών και συγκεκριμένα της ΩΤΑ (<http://eur-lex.europa.eu>).

1. Κανονισμός 466/2001 για μυκοτοξίνες και βαρέα μέταλλα (Commission Regulation, 2001).
2. Κανονισμός 472/2002. Αποτελεί τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 για τον καθορισμό των μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα. Παράλληλα θεσπίστηκαν τα ανώτερα επιτρεπτά όρια ΩΤΑ σε δημητριακά, προϊόντα δημητριακών και σταφίδες (Commission Regulation, 2002).
3. Κανονισμός 683/2004 για αφλατοξίνες και ΩΤΑ σε βρεφικές και παιδικές τροφές. Αποτελεί τροποποίηση του (ΕΚ) αριθ. 472/2002 και καθορίζει τα επίπεδα της ΩΤΑ σε τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και νήπια. Σύμφωνα με αυτόν τον κανονισμό ως κυριότερες πηγές πρόσληψης της ΩΤΑ αναγνωρίζονται τα δημητριακά και τα προϊόντα δημητριακών (Commission Regulation, 2004).
4. Κανονισμός 123/2005 για ΩΤΑ σε οίνους. Με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ.123/2005 της Επιτροπής, της 26ης Ιανουαρίου 2005, γίνεται τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ.466/2001, καθορίζοντας ως νέο ανώτατο επιτρεπτό όριο της ΩΤΑ, τα 2 ppb για το κρασί, τον χυμό σταφυλιού και τα σταφύλια (Commission Regulation, 2005).
5. Κανονισμός 1881/2006. Με τον παραπάνω κανονισμό της επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 καθορίστηκαν νέα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ορισμένες ουσίες (ανάμεσά τους και η ΩΤΑ), οι οποίες επιμολύνουν τρόφιμα όπως τα δημητριακά, τα προϊόντα δημητριακών, τις σταφίδες, τον καφέ, το κρασί, τον χυμό σταφυλιών και τα τρόφιμα για βρέφη και μικρά παιδιά (Commission Regulation, 2006) (Πίνακας 1.3).
6. Κανονισμός 105/2010. Αποτελεί τροποποίηση του (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 και καθορίζει νέα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα της ΩΤΑ στα καρυκεύματα (30 ppb από 1.7.2010 έως 30.6.2012 και 15 ppb από 1.7.2012), στη ρίζα και στο εκχύλισμα γλυκόριζας (20 ppb και 80 ppb, αντίστοιχα) (Commission Regulation, 2010).

Αρχικά είχε προταθεί ως προσωρινή ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη 100 ng ΩΤΑ/kg σ.β. (σωματικού βάρους) (JECFA, 1996). Στις 4 Απριλίου 2006 όμως η ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority- EFSA) εξέδωσε επικαιροποιημένη επιστημονική γνώμη, λαμβάνοντας υπόψη τις νέες επιστημονικές πληροφορίες για την ΩΤΑ και έθεσε ένα ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (ΑΟΕΠ) ύψους 120 ng/kg σ.β.

Πίνακας 1.3. Μέγιστα επιτρεπτά όρια της ΩΤΑ (Commission Regulation, 2006).

Τρόφιμα	Μέγιστα επιτρεπτά όρια (ppb)
Μη μεταποιημένα δημητριακά	5.0
Όλα τα προϊόντα που παράγονται από τα μη μεταποιημένα δημητριακά, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων με βάση τα δημητριακά και των δημητριακών που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο	3.0
Σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή σταφίδα και σουλτανίνα)	10.0
Φρυγμένοι κόκκοι καφέ, φρυγμένος και αλεσμένος καφές	5.0
Διαλυτός καφές (στιγμαίος καφές)	10.0
Οίνοι (συμπεριλαμβανομένων των αφρωδών οίνων, εξαιρουμένων των οίνων λικέρ, των οίνων με αλκοολικό τίτλο <15% και ποτά που προέρχονται από ζύμωση φρούτων)	2.0
Αρωματισμένοι οίνοι, αρωματισμένα ποτά με βάση τον οίνο και αρωματισμένα κοκτέιλ αμπελοοινικών προϊόντων	2.0
Συμπυκνωμένος και μη- συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών, νέκταρ σταφυλιών, συμπυκνωμένο και μη- συμπυκνωμένο γλεύκος σταφυλιών	2.0
Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	0.5
Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	0.5
Ανώριμοι κόκκοι καφέ, αποξηραμένα φρούτα εξαιρούμενα της αμπέλου, μπύρα, κακάο και προϊόντα του κακάο, λικέρ, προϊόντα κρέατος, καρυκεύματα και γλυκόριζα	--

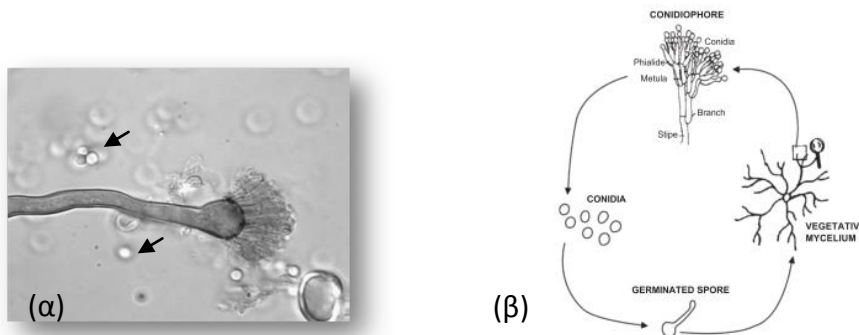
1.3 Ωχρατοξινογόνοι μύκητες

1.3.1 Γενικά

Οι μύκητες ευρύτερα, περιλαμβάνουν ευκαρυωτικούς, μη φωτοσυνθέτοντες, δηλαδή ετερότροφους οργανισμούς, οι οποίοι με εξαίρεση ορισμένες αμοιβαδοειδείς μορφές, δεν διαθέτουν μηχανισμούς αυτόνομης κίνησης. Διαβιούν ως παράσιτα ή ως σαπρόφυτα και αναπαράγονται αγενώς ή εγγενώς. Και οι δύο τρόποι αναπαραγωγής προϋποθέτουν τον σχηματισμό σπορίων (spores) ή κονιδίων (conidia) επί απλών ή σύνθετων κονιδιοφόρων (conidiophores) (Εικόνα 1.4). Η ανάπτυξη των μυκήτων περιλαμβάνει την εκβλάστηση των σπορίων

και την επέκταση των υφών (hyphae), σχηματίζοντας σε τελικό στάδιο το μυκήλιο (σύνολο των υφών) (mycelium) (Carlile and Watkinson 1994, Sautour et al. 2001). Η εκβλάστηση ξεκινά αυτόματα εφόσον το σπόριο βρεθεί σε κατάλληλες οικολογικές συνθήκες ή μετά από κάποια διαδικασία ενεργοποίησης όπως θερμικό σοκ ή χημική μεταχείριση (Paul et al. 1993). Η διαδικασία της εκβλάστησης χαρακτηρίζεται από τρία στάδια, την ενεργοποίηση (activation), τη διόγκωση (swelling) λόγω πρόσληψης νερού και τον σχηματισμό του βλαστικού σωλήνα (germ tube) (Dantigny et al. 2003). Συγκεκριμένα, το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη μετάβαση του σπορίου από τη λανθάνουσα στην ενεργή κατάσταση. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα διάστημα συνεχούς διόγκωσης του σπορίου, τόσο σε διάμετρο όσο και σε βιομάζα, ενώ μετά από συγκεκριμένο χρόνο αρχίζει να αναδύεται ο βλαστικός σωλήνας από το διογκωμένο πλέον σπόριο. Ένα σπόριο θεωρείται ότι εκβλάστησε όταν το μήκος του βλαστικού σωλήνα είναι ίσο ή μεγαλύτερο από τη μέγιστη διάσταση του διογκωμένου σπορίου (Dantigny et al. 2006) (Εικόνα 1.4). Από κάθε σπόριο μπορεί να προκύψει μία αποικία μύκητα (Gougouli et al. 2012).

Οι σημαντικές ομάδες μυκήτων διακρίνονται στους: Ζυγομύκητες (*Zygomycetes*, τάξη της υποδιαίρεσης *Eumycotina*), Ασκομύκητες (*Ascomycetes*, υποδιαίρεση *Ascomycotina*) και Δευτερομύκητες (*Deuteromycetes*, υποδιαίρεση *Deuteromycotina*). Οι Ασκομύκητες και οι Δευτερομύκητες, εν αντιθέσει με τους Ζυγομύκητες παρουσιάζουν χωρισμένο, με διαφράγματα (σέπτα- septa), μυκήλιο (Samson et al. 2000).



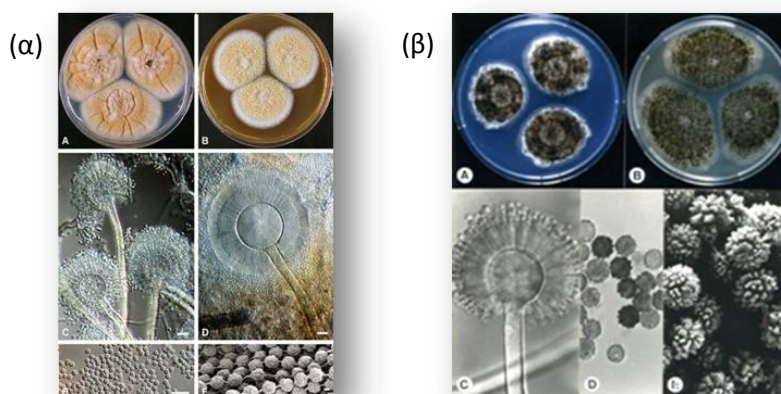
Εικόνα 1.4. (α) Αναπτυσσόμενη κονιδιοφόρος, του μύκητα *Aspergillus nidulans* (ελεύθερα σπόρια επισημαίνονται με τόξα) και (β) Κύκλος αναπαραγωγής του *Penicillium chrysogenum* (Dantigny et al. 2005a).

Γένη όπως *Aspergillus* και *Penicillium* (ανήκουν στους Ασκομύκητες) είναι κρίσιμης σημασίας για την αλλοίωση στα τρόφιμα. Όπως ήδη αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα τρία κύρια είδη μυκήτων που παράγουν την ΩΤΑ είναι οι *Aspergillus westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* (Amézqueta et al. 2012). Τα είδη αυτά διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στη φυσιολογία

όσο και την οικολογία, γεγονός το οποίο παραλλάσσει τις συνθήκες και τα τρόφιμα που δύναται να αναπτυχθούν.

1.3.2 *A. westerdijkiae*

Την τελευταία δεκαετία και με τη βοήθεια των μοριακών τεχνικών, η επιστημονική ομάδα του Frisvad (2004) κατάφερε να περιγράψει νέα είδη του γένους *Aspergillus* της υποδιαίρεσης *Circumdati*, ανάμεσά τους και τον μύκητα *A. westerdijkiae* Frisvad & Samson, ο οποίος μέχρι πρότινος ταυτιζόταν με τον *A. ochraceus* (Εικόνα 1.5α). Μέχρι σήμερα, η παρουσία του *A. westerdijkiae* έχει καταγραφεί σε καφέ (Leong et al. 2007, Noonim et al. 2008), σταφύλια (Diaz et al. 2009), σπόρους κακάο (Corpeti et al. 2010), πάπρικα, σιτηρά και καρύδια (Gil-Serna et al. 2011), παράγοντας μάλιστα πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις από τον *A.ochraceus*. Ο *A. westerdijkiae* είναι ένας μεσόφιλος, ξηροφιλικός μύκητας. Εν αντιθέσει με τον *A. ochraceus*, το είδος αυτό δεν αναπτύσσεται στους 37°C. Εξαιτίας της πρόσφατης ταξινόμησής του, οι διαθέσιμες πληροφορίες για την οικολογία και τις συνθήκες κατά τις οποίες παράγει ΩΤΑ είναι περιορισμένες.

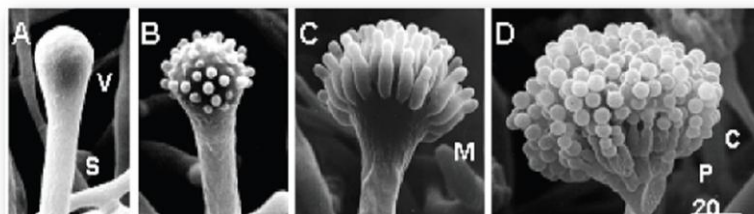


Εικόνα 1.5. Καλλιέργεια ηλικίας 7 ημερών σε *A. Czapek Yeast Autolysate Agar* και *B. Malt Extract Agar*, *C. Κονιδιοφόροι*, *E-F. Κονίδια* του (α) *A. westerdijkiae* και του (β) *A. carbonarius* (κλίμακα: *C-E. 10 μm* και *F. 1 μm*) (<http://www.mycobank.org>, <http://www.bcrc.firdi.org>).

1.3.3 *A. carbonarius*

Μέχρι πρόσφατα πολλές έρευνες στα τρόφιμα δεν διαχώριζαν τον *A. carbonarius* από τον *Aspergillus niger*. Τα δύο αυτά είδη έχουν πολλές ομοιότητες, με κύρια όμως μορφολογική διαφορά την ικανότητα του *A. carbonarius* για παραγωγή μεγαλύτερου μεγέθους σπορίων (Klich and Pitt, 1988). Έρευνες υποδεικνύουν ότι η άριστη ανάπτυξη παρουσιάζεται στους 25-35°C, ενώ δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες <15°C και >45°C (Battilany et al. 2003, Leong et al. 2006).

Η παραγωγή της ΩΤΑ ευνοείται στις υψηλές τιμές a_w , και παρόλο που δύναται να παραχθεί σε ευρύ θερμοκρασιακό φάσμα, οι μέγιστες συγκεντρώσεις παράγονται από τα περισσότερα στελέχη του *A. carbonarius* στους 20°C (Bellí et al. 2005). Επίσης, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι συγκεκριμένα στελέχη του *A. carbonarius* δεν παράγουν ΩΤΑ, αλλά σίγουρα ο ισχυρισμός αυτός απαιτεί περαιτέρω έρευνα (Bau et al. 2005).



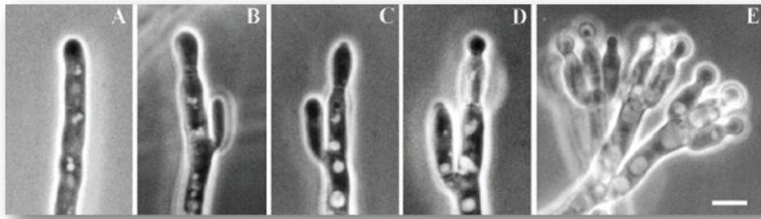
Εικόνα 1.6. Παρατήρηση της σταδιακής ανάπτυξης κονιδιοφόρων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του γένους *Aspergillus* (κλίμακα: 20 μm) (Fisher, 2002).

Ο *A. carbonarius* ανήκει στη κατηγορία των μαύρων ασπέργιλλων (black aspergilli) (Εικόνα 1.5β). Τα είδη αυτά, απομονώνονται συχνά σε τρόφιμα όπως φρέσκα και αποξηραμένα φρούτα, φιστίκια και κόκκους καφέ, κυρίως μετά τη συγκομιδή (Pitt and Hocking, 1997). Η συχνή παρουσία τους οφείλεται στην ταχύτατη ανάπτυξή τους και στην ανθεκτικότητά τους σε ευρύ φάσμα τιμών pH. Ο *A. carbonarius* θεωρείται ο κύριος μύκητας για τη μίανση και την παραγωγή ΩΤΑ στα σταφύλια, στα αποξηραμένα προϊόντα της αμπέλου και στο κρασί (Cabanes et al. 2002, Abarca et al. 2004) (Εικόνα 1.7). Πιο συγκεκριμένα έχει καταγραφεί ως το κυρίαρχο είδος στις σταφίδες με ποσοστό εμφάνισης 33-100% (El Halouat and Debevere 1997, Abarca et al. 2003, Magnoli et al. 2004). Σύμφωνα με τα στοιχεία των Tjamos et al. (2004), ελληνικά στελέχη του *A. carbonarius* που απομονώθηκαν σε κορινθιακή σταφίδα αποδείχθηκαν πολύ ισχυροί παραγωγείς της ΩΤΑ, με ποσοστό 78.35% εξ' αυτών, να παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις (> 25 ppb). Επιπλέον, τα είδη αυτά παρουσιάζουν μία ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στο φως του ήλιου και στην υπεριώδη ακτινοβολία.

1.3.4 *P. verrucosum*

Ο *P. verrucosum* αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασίας 0-31°C ενώ σε θερμοκρασία 20-25°C παρατηρείται η βέλτιστη παραγωγή ΩΤΑ σε σπόρους δημητριακών. Στους 5-10°C αναπτύσσεται κατά τη μακροπρόθεσμη αποθήκευση, εφόσον είναι ευνοϊκές και οι συνθήκες υγρασίας. Σε θερμοκρασία 37°C δεν παρατηρείται ανάπτυξη λόγω του ψυχρόφιλου χαρακτήρα του. Όλα τα στελέχη του *P. verrucosum* αναπτύσσονται πιο γρήγορα στους 25°C από τους 15°C, με άριστη ανάπτυξη σε a_w 0.98 και πρακτικά καμία ανάπτυξη σε a_w 0.80. Όσον αφορά το pH, ο συγκεκριμένος

μύκητας είναι δυνατόν να αναπτυχθεί σε εύρος από 2 έως 10 με βέλτιστη ανάπτυξη μεταξύ 6 με 7 (Pitt and Hocking, 1997).



Εικόνα 1.7. Μορφολογικά στάδια του *Penicillium* sp. κατά τη δημιουργία κονιδιοφόρων (κλίμακα: 10 μm) (Roncal and Ugalde, 2003).

Η βέλτιστη παραγωγή ΩΤΑ έχει παρατηρηθεί σε εύρος a_w 0.90-0.95. Η ελάχιστη a_w για την παραγωγή ΩΤΑ έχει καταγραφεί στο εύρος a_w 0.83-0.85 και εξαρτάται από τον χρόνο αποθήκευσης (Cairns-Fuller et al. 2005). Έχει παρατηρηθεί ότι η ΩΤΑ παράγεται σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος της ανάπτυξης του *P. verrucosum* (0-31°C). Σημαντικές ποσότητες τοξίνης είναι δυνατόν να παραχθούν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 4°C, και σε a_w 0.86 (Pitt and Hocking, 1997).

Ο *P. verrucosum*, λόγω της ψυχρόφιλης φύσης του, αποτελεί έναν επικίνδυνο παράγοντα που περιορίζεται κυρίως σε ψυχρά κλίματα. Ο *P. verrucosum* αποτελεί την κύρια πηγή μείανσης του σιταριού και του κριθαριού, κατά την ανεπαρκή αποξήρανσή τους. Ακόμα και βραχυπρόθεσμη αποθήκευση στο χωράφι και φυσική αποξήρανση είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ανάπτυξη από τον συγκεκριμένο μύκητα και συνεπώς στην παραγωγή της ΩΤΑ. Η συχνή του παρουσία στα σιτηρά συνεπάγεται την ανίχνευση της ΩΤΑ σε πολλά είδη προϊόντων των δημητριακών, κυρίως στο ψωμί και σε τρόφιμα βασισμένα στο αλεύρι (Larsen et al. 2001, Losito et al. 2004).

1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης της ΩΤΑ

1.4.1 Γενικά

Λόγω της ικανότητας της ΩΤΑ να ανιχνεύεται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, η εύρεση μίας αναλυτικής μεθόδου που να ενδείκνυται για κάθε τρόφιμο είναι δύσκολη. Λαμβάνοντας υπόψη τη βασική αρχή και τη διάρκεια της εκάστοτε εφαρμοζόμενης ανάλυσης, οι μέθοδοι ανίχνευσης της ΩΤΑ ταξινομούνται στις:

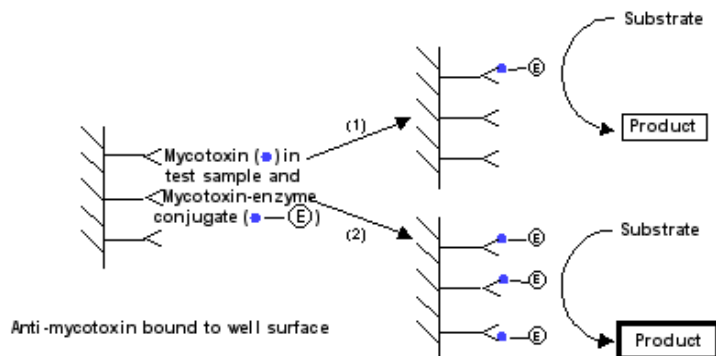
- i. χρωματογραφικές μεθόδους (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης- HPLC, Αέρια Χρωματογραφία- GC, Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας- TLC, Υγρή Χρωματογραφία- Φασματοσκοπία Μάζας- LC-MS/MS)
- ii. ταχείες μεθόδους (ανοσοενζυμικές- ELISA, Lateral Flow Device (LFD)).

Η ανάλυση της ΩΤΑ σε διαφορετικά τρόφιμα γίνεται κυρίως με επικυρωμένες μεθόδους βασισμένες στην υγρή χρωματογραφία με ανίχνευση φθορισμού (LC-FLD) και/ ή στην υγρή

χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (LC-MS) (Reinsch et al. 2005). Παρόλα αυτά, οι μέθοδοι αυτές απαιτούν εκτεταμένο καθαρισμό των εκχυλισμάτων, εκπαιδευμένο προσωπικό και κυρίως είναι χρονοβόρες και υψηλού κόστους (Sydenham et al. 1996, Pittet and Royer 2002). Εν αντιθέσει με τις συμβατικές, οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (immunoassay methods) αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για ταχύ και απλό έλεγχο τροφίμων ως προς την ανίχνευση της ΩΤΑ.

1.4.2 Ανοσοενζυμική μέθοδος- ELISA

Η αρχή της μεθόδου της ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) στηρίζεται στην ικανότητα αναγνώρισης και αντίδρασης μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον έλεγχο απουσίας ή παρουσίας της ΩΤΑ σε δείγματα τροφίμων, ενώ μπορεί να παρέχει και ημι-ποσοτική ένδειξη μέσω της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται. Με βάση τα αποτελέσματα, τα δείγματα που κρίνονται ύποπτα, επιβεβαιώνονται με κλασικές αναλυτικές τεχνικές.



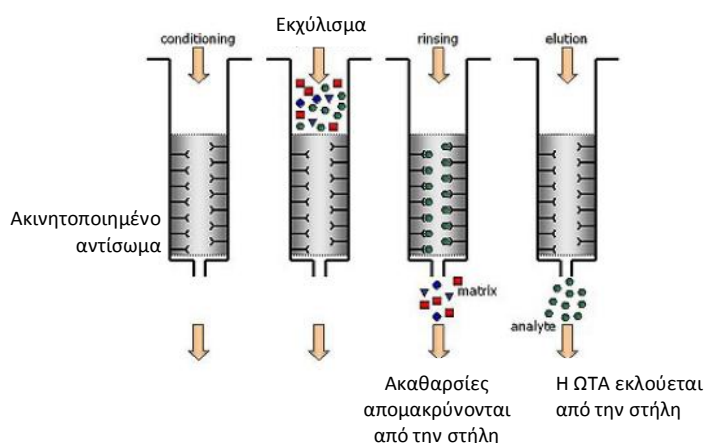
Εικόνα 1.8. Βασική αρχή λειτουργίας της ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA (www.mycotoxins.org).

Μία τυπική αλληλουχία αντιδράσεων που λαμβάνει χώρα σε μία ELISA είναι η ακόλουθη: (α) το δείγμα αναμειγνύεται με σύμπλοκο ομόλογου αντισώματος της ΩΤΑ και ενός ενζύμου (enzyme conjugate), (β) το μίγμα προστίθεται στα βοθρία (wells) που φέρουν επικάλυψη από ακινητοποιημένα αντιγόνα της προς ανάλυση ουσίας, (γ) η ποσότητα του συμπλόκου ΩΤΑ- ενζύμου που προσκολλάται στα ακινητοποιημένα αντιγόνα εξαρτάται από την ποσότητα της ελεύθερης ΩΤΑ στο δείγμα (όσο υψηλότερη είναι η ποσότητα της τοξίνης στο δείγμα, τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα του συμπλόκου και αντίστροφα) και (δ) η ενζυμική δραστηριότητα του προσκολλημένου συμπλόκου ΩΤΑ- ενζύμου καθορίζεται από την προσθήκη του χρωμογόνου (chromogen, substrate), έχοντας ως αποτέλεσμα ένα χρωμογόνο προϊόν, η συγκέντρωση του οποίου είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση της τοξίνης (Εικόνα 1.8).

1.4.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

1.4.3.1 Στήλες ανοσοσυγγένειας

Η χρήση των στηλών ανοσοσυγγένειας (Immunoaffinity Columns) έγινε ιδιαίτερα δημοφιλής τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της υψηλής εκλεκτικότητάς τους. Χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό και τη συμπύκνωση των μυκοτοξινών από πολύπλοκα δείγματα τροφίμων, πριν την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους με κλασικές αναλυτικές τεχνικές όπως HPLC, GC και TLC. Οι στήλες ανοσοσυγγένειας περιέχουν αντισώματα, τα οποία δεσμεύουν επιλεκτικά την τοξίνη από το εκχύλισμα του τροφίμου. Αφού πρώτα προηγηθεί προετοιμασία της στήλης (conditioning), στη συνέχεια εφαρμόζεται το δείγμα στη στήλη και η περιεχόμενη σε αυτό τοξίνη δεσμεύεται από το αντίστοιχο ακινητοποιημένο αντίσωμα. Από τη στιγμή που τα συστατικά της μήτρας δεν αλληλεπιδρούν με τα αντισώματα, αρκεί ένα στάδιο έκπλυσης για την απομάκρυνσή τους. Ακολουθεί το στάδιο της έκλυσης της τοξίνης. Οι συγκεκριμένες στήλες είναι εμπορικά διαθέσιμες, έχουν υψηλό κόστος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο μια φορά (<http://www.mycotoxins.org>) (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9. Βασική αρχή λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας (<http://www.mycotoxins.org>).

1.4.3.2 HPLC

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό επικαλυμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινούμενη φάση είναι υγρό. Τα μέρη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) αναλύονται εκτενώς παρακάτω:

i) Κινητή φάση (διαλύτης): Ο διαλύτης ή το μίγμα διαλυτών που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και να απαερώνεται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Στο σωλήνα τροφοδοσίας προσαρμόζεται ειδικό φίλτρο (2μm) που παρεμποδίζει τη μεταφορά σωματιδίων που μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα στην αντλία.

ii) Αντλία: Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης. Η αντλία είναι υψηλής πίεσης και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλουση, στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution) η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.

iii) Εισαγωγέας- θάλαμος έγχυσης του δείγματος: Η χωρητικότητα του θαλάμου κυμαίνεται από 1-500 μL . Η έγχυση του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα. Τα υλικά από τα οποία είναι κατασκευασμένος ο θάλαμος πρέπει να είναι αδρανή ως προς τη χρησιμοποιούμενη κινητή φάση. Η βαλβίδα στη θέση "πλήρωσης" συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση "εισαγωγής" εισάγει το δείγμα στη στήλη.

iv) Στήλη: Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξειδωτος χάλυβας. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης (2-3 mm) για να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά τη λειτουργία του συστήματος. Το μήκος της στήλης συνήθως κυμαίνεται από 25-30 cm. Η αποτελεσματικότητα μιας στήλης κρίνεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Μία στήλη μεγάλου μήκους ή μια σειρά στηλών θα έχει μεν μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών αλλά η διάρκεια του διαχωρισμού θα είναι μεγαλύτερη. Αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών μπορεί να επιτευχθεί με μείωση της διαμέτρου των κόκκων του πληρωτικού υλικού. Το μέγεθος των κόκκων πρέπει να είναι μικρό και ομοιόμορφο, ενώ το σχήμα σφαιρικό. Επίσης σημαντικός παράγοντας είναι η εσωτερική διάμετρος της στήλης. Σε μια στήλη μικρής εσωτερικής διαμέτρου, η ταχύτητα της κινητής φάσης είναι περίπου ίση στο κέντρο της στήλης και στα τοιχώματα της. Συνεπώς μια τέτοιου είδους στήλη απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος και κινητής φάσης, επιτρέποντας την εξοικονόμηση διαλύτη έως και 80%. Το υλικό πλήρωσης της στήλης, ως προς τη φύση του μπορεί να είναι: πορώδες (silica), μη πορώδες (pellicular) και σκληρή πηκτή με βάση το πολυστυρόλιο. Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνεται σε: κανονικής φάσης (normal phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών (υδατικών) ουσιών οι οποίες εκλούνται τελευταίες από τη στήλη και ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

v) Ανιχνευτής: Ανάλογα με τη φύση των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν, ως ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί φασματοφωτόμετρο, διαφορικό διαθλασίμετρο, ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός) ανιχνευτής και φθορισμόμετρο.

vi) Καταγραφέας: Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι εφοδιασμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή, ειδικό λογισμικό και εκτυπωτή με στόχο την παρουσίαση και την επεξεργασία του χρωματογραφήματος (Πολυσίου 1989, Χατζηιωάννου 1998, Ταραντίλης και Πολυσίου 2001).

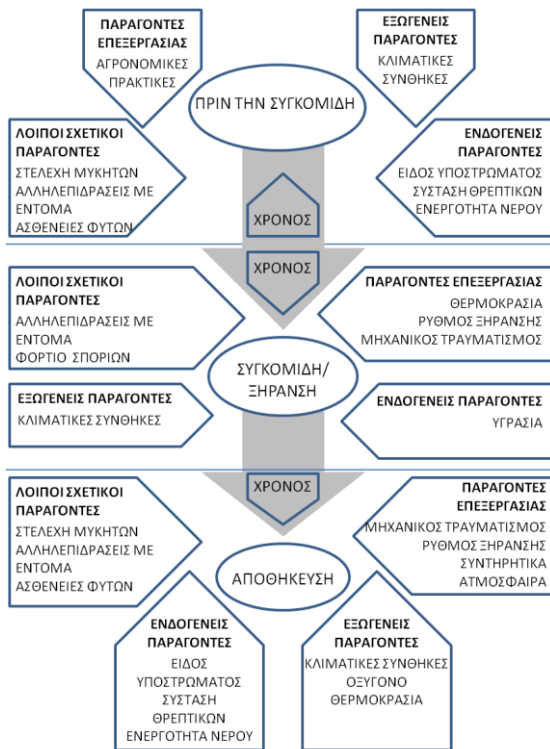
1.5 Μέθοδοι αναστολής των μυκήτων και μείωσης της ΩΤΑ

1.5.1 Γενικά

Οι ωχρατοξινογόνοι μύκητες και η ΩΤΑ μπορούν να εμφανιστούν πριν (pre-harvest), κατά τη διάρκεια (during harvest) και μετά το στάδιο της συγκομιδής (post-harvest). Γι' αυτό το λόγο, η εφαρμογή προληπτικών στρατηγικών με στόχο τόσο τη μείωση της εμφάνισης των μυκήτων όσο και την παραγωγή της ΩΤΑ κάτω από τα εκάστοτε υφιστάμενα νομοθετικά όρια κρίνεται απαραίτητη (Σχήμα 1.1). Η εφαρμογή μεθόδων πριν τη συγκομιδή στοχεύει στη μείωση της επιμόλυνσης από μύκητες εφαρμόζοντας τις κατάλληλες γεωργικές πρακτικές (Good Agricultural Practices). Κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, πρακτικές όπως καθαρά αγροτικά μηχανήματα και εξοπλισμοί, διαχωρισμός και απόρριψη τραυματισμένων ή υπερώριμων καρπών είναι απαραίτητες. Σύμφωνα με μελέτες, σοδειές που δεν έχουν συγκομιστεί έγκαιρα, παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά παρουσίας της εν λόγω τοξίνης. Η εφαρμογή μεθόδων στα δύο παραπάνω στάδια είναι αναγκαία ώστε να προληφθεί ή ακόμα και να εξαλειφθεί η παρουσία μυκήτων στα νωπά προϊόντα. Εφόσον παρ' όλες τις παρεμβατικές ενέργειες ο κίνδυνος παραμένει, τότε η ανάπτυξη των μυκήτων αλλά και η παραγωγή της ΩΤΑ πρέπει να ελεγχθεί μέσω μεθόδων αντιμετώπισης που θα λάβουν χώρα μετά τη συγκομιδή. Στο κρίσιμο αυτό στάδιο, ο έλεγχος κυρίως οικολογικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία και η υγρασία είναι απαραίτητος. Πριν την εφαρμογή οποιασδήποτε εναλλακτικής μεθόδου π.χ. μείωση της ΩΤΑ, πρέπει να μελετάται εάν τα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου είναι ικανά να αναστείλουν τον μύκητα (fungal decontamination) ή να μειώσουν την τοξίνη (OTA detoxification). Εφόσον οι προληπτικές ενέργειες δεν είναι επαρκείς, πρέπει να εφαρμοστούν μέθοδοι αναστολής της παραγωγής της ΩΤΑ ή/ και μείωσης της ΩΤΑ για να παρεμποδιστεί η εισαγωγή της στην τροφική αλυσίδα. Υπάρχει μία πληθώρα διαφορετικών μεθόδων μείωσης της ΩΤΑ αλλά η χρήση τους προς το παρόν παραμένει περιορισμένη λόγω της συχνής αρνητικής επίδρασης τόσο στην υγεία του ανθρώπου όσο και στις οργανοληπτικές και διατροφικές ιδιότητες του προϊόντος (Amézqueta et al. 2009, Kabak and Dobson 2009).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η παρουσία μυκήτων δεν συνεπάγεται απαραίτητα την παραγωγή ΩΤΑ μιας και για να παραχθεί η εν λόγω τοξίνη πρέπει να συνυπάρχουν συγκεκριμένες ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, διαθεσιμότητας σε οξυγόνο ή σε θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, η ΩΤΑ είναι δυνατόν να ανιχνευθεί χωρίς να έχει παρατηρηθεί εμφανής παρουσία μύκητα εφόσον διάφορες χημικές ή περιβαλλοντικές αλλαγές είναι δυνατόν να απενεργοποιήσουν

τα σπόρια και να διαρρήξουν τις μυκηλιακές υφές χωρίς να μειώσουν την τοξίνη (Gimeno, 2000). Έτσι λοιπόν πρόκειται για μία αμφίδρομη σχέση που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε περιπτώσεις ανάπτυξης και εφαρμογής μεθόδων για την αναστολή των ωχρατοξινογόνων μυκήτων ή για τη μείωση της ΩΤΑ.



Σχήμα 1.1. Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδογενών, εξωγενών και λοιπών σχετιζόμενων παραγόντων στην τροφική αλυσίδα που δύναται να επηρεάσουν τη μίανση από μύκητες και την παραγωγή μυκοτοξινών (Sanchis and Magan, 2004).

Η ομάδα των Amézqueta et al. (2009) σε πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση συνόψισε και κατέταξε τις στρατηγικές αναστολής της ανάπτυξης των μυκήτων και μείωσης της ΩΤΑ ανάλογα με τον τύπο χειρισμού σε: α) φυσικές, β) χημικές και γ) (μικρο)βιολογικές. Ο κύριος στόχος των μεθόδων αυτών είναι η μείωση ή η εξάλειψή της ΩΤΑ μέσω διάσπασης, μετάλλαξης ή προσρόφησης (FAO/WHO/UNEP, 1999).

1.5.1.1 Φυσικές μέθοδοι

Ανάμεσα στις φυσικές μεθόδους αναστολής των μυκήτων και μείωσης των μυκοτοξινών συγκαταλέγονται ο μηχανικός διαχωρισμός, η αποφλοίωση και η έκπλυση των σπόρων με διαλύματα αλάτων. Επιπλέον, αποτελεσματική μέθοδος θεωρείται και η ακτινοβολήση είτε με ακτίνες γάμμα, υπέρυθρες ή μικροκύματα. Σύμφωνα με μελέτες, η χρήση θερμικών επεξεργασιών

δεν είναι ικανή για ολοκληρωτική εξάλειψη της ΩΤΑ (Boudra et al. 1995). Αντίθετα, ο συνδυασμός κατάψυξης (-20°C), απόψυξης (26°C), υπεριώδους και γάμμα ακτινοβολίας είναι ικανός να ελαττώσει σημαντικά τη σπορογονία των μυκήτων. Επίσης, έχει καταγραφεί ότι η χρήση μόνο ακτινοβολίας γάμμα είναι δυνατόν να μειώσει ή να εξαλείψει την ΩΤΑ (Deberghes et al. 1993, Aziz et al. 2004).

1.5.1.2 Χημικές μέθοδοι

Ο χημικός έλεγχος αφορά κυρίως στη μείωση της ΩΤΑ και ορίζεται ως η εφαρμογή χημικών ουσιών, οι οποίες είτε έχουν την ικανότητα να προσροφούν είτε να εκχυλίζουν την τοξίνη από το εκάστοτε τρόφιμο. Συγκεκριμένα, παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη διάλυση του κρασιού (wine fining agents) όπως το καζεϊνικό κάλιο (potassium caseinate) ή ο ενεργός άνθρακας (activated carbon) έχουν δείξει μεν ικανοποιητική προσροφητική δράση, μειώνοντας την ΩΤΑ έως και 82%, επιδρώντας όμως αρνητικά στην ποιότητα του κρασιού (Castellari et al. 2001). Η ομάδα των Tangni et al. (2005) ανέπτυξε μία νέα μη διαλυτή φυτική ίνα, ικανή να απορροφά την ΩΤΑ σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα αλλά και κατά τη ζυθοποίηση. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, τροποποιημένοι ζεόλιθοι έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα για τη μείωση της τοξίνης στα τρόφιμα, αποτελώντας πολλά υποσχόμενες προσροφητικές ουσίες (Schall et al. 2002, Daković et al. 2003, Tomašević-Čanović et al. 2003, Daković et al. 2005). Η εφαρμογή μυκητοκτόνων, φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων έχει δείξει σημαντική δράση στη μείωση της ΩΤΑ (έως και 90%) (Varga and Kozakiewicz 2006, Bellí et al. 2007, Valero et al. 2007). Έρευνα των Amézqueta et al. (2009) έδειξε ότι περισσότερο από το 98% της ΩΤΑ μπορεί να μειωθεί με τη χρήση αλκαλικών ουσιών στο κακάο. Άλλοι ερευνητές, αναφέρουν ως αποτελεσματική μέθοδο την εφαρμογή όζοντος (McKenzie et al. 1997, Denvir et al. 1999).

Παρόλη την ικανοποιητική μείωση της τοξίνης με τη χρήση χημικών ουσιών, η εφαρμογή τους σε επίπεδο *in vivo* δεν είναι, προς το παρόν, δυνατή λόγω της υψηλής τοξικότητάς τους αλλά και της πιθανής δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών μυκήτων (Hollomon et al. 1997, De Costa and Bezerra 2009). Γι' αυτόν το λόγο, έχουν νομοθετηθεί αυστηροί ευρωπαϊκοί κανονισμοί όσον αφορά στη χρήση τους, καθορίζοντας τα μέγιστα υπολειμματικά επίπεδα σε μία πληθώρα τροφίμων (Commission Regulation, 2008).

1.5.1.3 Μικροβιολογικές μέθοδοι

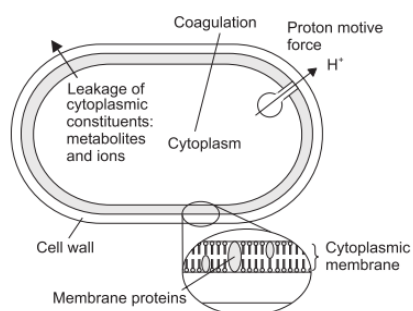
Ως βιολογικός έλεγχος ορίζεται η χρήση ζώντων ανταγωνιστικών παραγόντων με σκοπό τον έλεγχο παθογόνων μικροοργανισμών και πιθανών τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών τους (Wilson and Wisniewski, 1989). Η παραπάνω προσέγγιση θεωρείται από την επιστημονική κοινότητα ως μία

αξιόπιστη λύση. Επιπλέον, αποτελεί μία προσιτή πρόταση όσον αφορά στον έλεγχο της ανάπτυξης των μυκήτων σε τρόφιμα όπως σταφύλια, κρασί και παρόμοια προϊόντα, βοηθώντας τη μείωση των αγροχημικών υπολειμμάτων (Cabras and Angioni, 2000). Την τελευταία δεκαετία, οι ερευνητές στρέφουν ιδιαίτερα το ενδιαφέρον τους ως προς την εφαρμογή των (μικρο)βιολογικών μεθόδων για τον έλεγχο της ΩΤΑ στα τρόφιμα. Μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, ζύμες ή μη τοξινογόνοι μύκητες έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να αναστέλουν την ανάπτυξη ωχρατοξινογόνων μυκήτων ή να μειώνουν την τοξίνη κάτω από τα όρια που έχουν θεσπιστεί από τη νομοθεσία (2-80 ppb) (Varga et al. 2000, Moruno et al. 2005, Bleve et al. 2006, Commission Regulation 2006, Del Prete et al. 2007, Commission Regulation 2010). Συγκεκριμένα, *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus* (Varga et al. 2000, Varga et al. 2005, Fuchs et al. 2008) αλλά και μύκητες των γενών *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Phaffia*, *Penicillium* και *Rhizopus* (Abrunhosa et al. 2002, Varga et al. 2005, Péteri et al. 2007) μειώνουν την ΩΤΑ σε ποσοστό μέχρι και 95%. Σύμφωνα με τον Magnusson και τους συνεργάτες του (2003), οι μηχανισμοί που μπορούν να ερμηνεύσουν την αντιμικροβιακή δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η παραγωγή οργανικών οξέων, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και η παραγωγή ανταγωνιστικών ουσιών. Όσον αφορά στο μηχανισμό δράσης των ζυμών, πιθανολογείται ότι σχετίζεται κυρίως με τον ανταγωνισμό (Spadaro and Gullino, 2004), τον παρασιτισμό και την παραγωγή ουσιών που δρουν παρεμποδιστικά για την ανάπτυξη των μυκήτων (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006).

1.5.1.4 Εναλλακτικές μέθοδοι

Λαμβάνοντας υπόψη πιθανούς περιορισμούς στην εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων και την τάση των τελευταίων χρόνων για οικολογικούς τρόπους αντιμετώπισης των κινδύνων που εμφανίζονται στα τρόφιμα, μελετάται όλο και ευρύτερα η χρήση εναλλακτικών φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών όπως τα αιθέρια έλαια και οι αντιοξειδωτικές ουσίες (Cairns- Fuller and Magan 2003, Fanelli et al. 2003, Hope et al. 2003, 2005). Η αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων έχει συσχετιστεί με τη συγκέντρωσή τους, τη μέθοδο εφαρμογής και τις δραστικές τους ομάδες (Smith-Palmer et al. 2001). Ενδεικτικά, έρευνες υποδεικνύουν ότι αιθέρια έλαια όπως της κανέλας, του γαρίφαλου, της δάφνης και της ρίγανης δύναται να αναστείλουν την ανάπτυξη τοξινογόνων μυκήτων όπως είδη των *Fusarium* sp., *P. verrucosum*, *A. westerdijkiae* και την παραγωγή της αφλατοξίνης Β₁ και της ΩΤΑ ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Velluti et al. 2003, 2004, Aldred et al. 2008, Bluma et al. 2008). Παρ' όλη την ισχυρή δράση που έχουν οι συγκεκριμένες αντιμικροβιακές ουσίες, κύριο μειονέκτημα για την εφαρμογή τους αποτελεί το υψηλό τους κόστος.

Οι κυριότεροι μηχανισμοί που έχουν συσχετιστεί με την δράση των αιθερίων ελαίων είναι η αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος (Thoroski et al. 1989, Helander et al. 1998), η φθορά και η καθίζηση των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης (Ultee et al. 1999, 2000), η απώλεια του κυτταρικού περιεχομένου (Helander et al. 1998, Cox et al. 2000, Lambert et al. 2001) και η πήξη του κυτταροπλάσματος (Gustafson et al. 1998) (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10. Μηχανισμοί δράσης των αιθερίων ελαίων και πιθανές περιοχές του βακτηριακού κυττάρου που μπορούν να πλήξουν (Burt, 2004).

1.6 Μοντέλα πρόρρησης

1.6.1 Γενικά

Η μικροβιολογία πρόρρησης (predictive microbiology) αποτελεί μία εναλλακτική λύση για την ανάπτυξη ταχέων μεθόδων προσδιορισμού της μικροβιακής ποιότητας των τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση μαθηματικών μοντέλων ως εργαλείο πρόβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών κυρίως των βακτηρίων, υπό διαφορετικές συνθήκες, έχει μελετηθεί εκτενώς συγκριτικά με τους μύκητες. Η ερευνητική ομάδα των Gibson and Hocking (1997) αναφέρει ότι το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη δυσκολία ποσοτικοποίησης της ανάπτυξης των μυκήτων. Συγκεκριμένα, εν αντιθέσει με τα βακτήρια που αναπαράγονται με διαίρεση και αναπτύσσονται ομοιογενώς σε υγρά υποστρώματα ή ακινητοποιούνται σε στερεά, οι μύκητες αναπτύσσονται τρισδιάστατα (Dantigny et al. 2005a). Περαιτέρω διαφοροποίηση είναι, ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων (cfu/g ή mL) αυξάνεται εκθετικά και η λογαριθμική μετατροπή των πληθυσμών (log cfu/g ή mL) καθιστά εύκολη τη μοντελοποίησή της συναρτήσει του χρόνου. Αντίθετα, η καμπύλη ανάπτυξης των μυκήτων συναρτήσει του χρόνου είναι κυρίως γραμμική (Σχήμα 1.2). Η εφαρμογή των μοντέλων πρόρρησης είναι δυνατόν να παρέχει προβλέψεις για τον χρόνο εμφάνισης της υφής, τον ρυθμό ανάπτυξης του μύκητα ή της παραγωγής της ΩΤΑ και τις μέγιστες συγκεντρώσεις της τοξίνης υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Από τη σκοπιά της ασφάλειας, η μεταβλητή που έχει νόημα να μοντελοποιηθεί είναι η μυκοτοξίνη και όχι παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του μύκητα. Παρόλα αυτά,

υπάρχουν αρκετά μειονεκτήματα σε αυτήν την προοπτική όπως το αυξημένο χρονικό και οικονομικό κόστος που απαιτεί η ανάλυση των μυκοτοξινών, η αυξημένη παραλλακτικότητα μιας και ένα στέλεχος σε δεδομένο υπόστρωμα δύναται να συνθέσει παραπάνω της μίας μυκοτοξίνης αλλά κυρίως οι περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με την καμπύλη αύξησης των παραγόμενων συγκεντρώσεων των μυκοτοξινών και τη σχέση μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού (Le Bars 1988, Pitt 1993). Γι' αυτό το λόγο, τα μοντέλα που υφίστανται στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών είναι περιορισμένα (Marín et al. 1999, Baert et al. 2007). Παρόλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της ανίχνευσης μυκοτοξινών στα τρόφιμα για την υγεία του καταναλωτή, η ανάπτυξη μοντέλων πρόρρησης για τον προσδιορισμό τους έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον.

1.6.2 Κατάταξη μοντέλων

Η ποσοτική μικροβιολογία εφαρμόζει μαθηματικά μοντέλα, τα οποία προβλέπουν τη μικροβιακή συμπεριφορά και επιτρέπουν την εκτίμηση κινδύνων σχετιζόμενων με τη μικροβιολογία τροφίμων (Nauta, 2002). Υπάρχουν δύο τύποι: α) τα μοντέλα κινητικής (deterministic or kinetic models) και β) τα στοχαστικά μοντέλα ή μοντέλα πιθανοτήτων (stochastic or probabilistic models). Παρόλη την ευρεία εφαρμογή των κινητικών μοντέλων (παρέχουν σημειακές εκτιμήσεις π.χ. των μικροβιακών πληθυσμών, του βάρους της βιομάζας των μυκήτων) στη διαχείριση της ασφάλειας των τροφίμων, η χρήση τους έχει αμφισβητηθεί, λόγω του υψηλού επιπέδου παραλλακτικότητας που χαρακτηρίζει τις παραμέτρους που προσδιορίζουν στη μικροβιακή δυναμική (Nicolai and Van Impe 1996, Poschet et al. 2003) αλλά και την περιορισμένη εφαρμογή τους σε οριακές συνθήκες ανάπτυξης/μη ανάπτυξης (growth/no growth). Αντίθετα, τα στοχαστικά μοντέλα (π.χ. προσομοίωση Monte Carlo) λαμβάνουν υπόψη αυτήν την παραλλακτικότητα με τη χρήση κατανομών για τις ανεξάρτητες μεταβλητές, παρέχοντας τις προβλέψεις επίσης με τη μορφή κατανομών αντί για σημειακές εκτιμήσεις (Gibson and Hocking 1997, Poschet et al. 2003, Brul et al. 2007, Koutsoumanis et al. 2010).

Τα μοντέλα κινητικής μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή. Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται τα κυριότερα μαθηματικά μοντέλα σύμφωνα με το σχήμα κατάταξης που έχει προταθεί από τους Garcia et al. (2009).

1.6.2.1 Πρωτογενή μοντέλα

Τα πρωτογενή μοντέλα περιγράφουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών συναρτήσει του χρόνου. Χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης όπως τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης, τον χρόνο προσαρμογής, τον μέγιστο παραγόμενο πληθυσμό σπορίων ή

κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση, μοντέλα τα οποία αναπτύχθηκαν για τα βακτήρια, να εφαρμόζονται και για τους μύκητες. Παρόλα αυτά, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μια σημαντική παράμετρος, η εκβλάστηση των σπορίων (Prandini et al. 2009). Η ανάπτυξη των μυκήτων περιλαμβάνει την εκβλάστηση και την επέκταση των υφών, οι οποίες σχηματίζουν το μυκήλιο (Dantigny et al. 2005a). Γι' αυτόν το λόγο στην περίπτωση των μυκήτων, τα πρωτογενή μοντέλα κατατάσσονται στα μοντέλα εκβλάστησης (germination models), ανάπτυξης (growth models), και αδρανοποίησης (inactivation models) (Soboleva et al. 2000).

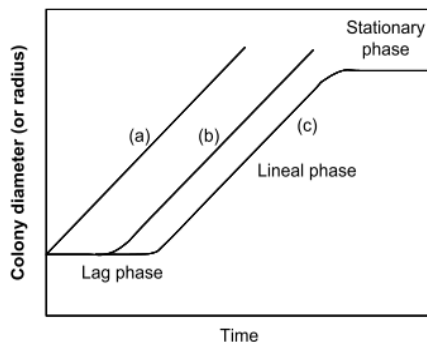
α. Μοντέλα εκβλάστησης

Όσον αφορά στα μοντέλα εκβλάστησης υπάρχουν περιορισμένες μελέτες μιας και είναι δύσκολο να παραχθούν επαρκή και αναπαραγώγιμα δεδομένα (Dantigny, 2007). Παρόλα αυτά, οι περισσότερες από τις υπάρχουσες μελέτες χρησιμοποιούν την εξίσωση Gompertz (Pardo et al. 2005, Judet et al. 2008) και το μοντέλο Logistic (Dantigny et al. 2002, 2005a, 2006, Judet et al. 2008) για τη μοντελοποίηση της κινητικής αύξησης του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων. Κατά τη σύγκριση της απόδοσης των δύο προαναφερθέντων μοντέλων, οι Dantigny et al. (2007), βασιζόμενοι στο συντελεστή RMSE (Root Mean Squared Error), κατέληξαν ότι η προσαρμογή των δεδομένων και στα δύο μοντέλα ήταν εξίσου καλή. Ο χρόνος εκβλάστησης (απαιτούμενος χρόνος για το 50% των ζώντων σπορίων να εκβλασάνουν) εκτιμήθηκε με μεγαλύτερη ακρίβεια από το μοντέλο Logistic, εν αντιθέσει με τη φάση προσαρμογής που εκτιμήθηκε ακριβέστερα από το εξίσωση Gompertz.

β. Μοντέλα ανάπτυξης

Μετά το πέρας της εκβλάστησης, οι υφές επεκτείνονται σχηματίζοντας το μυκήλιο και μακροσκοπικά εμφανείς αποικίες. Παρόλο που η ανάπτυξη των μυκήτων δύναται να εκτιμηθεί και με την καταμέτρηση των σπορίων, η πιο διαδεδομένη μέθοδος με στόχο τη μοντελοποίηση της ανάπτυξης είναι η μέτρηση της ακτινωτής διαμέτρου της αποικίας, μιας και είναι ευκολότερο να παραχθούν πολλαπλά δεδομένα. Επίσης, η περιεκτικότητα σε εργοστερόλη και η συγκέντρωση σπορίων/g ή mL έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της ανάπτυξης των μυκήτων κυρίως σε υγρά υποστρώματα (Vindeløvn and Arneborg, 2002, Marín et al. 2008). Στην περίπτωση στερεών υποστρωμάτων παρακολουθείται η μεταβολή της ακτινωτής διαμέτρου της αποικίας, η οποία υπό ευνοϊκές συνθήκες έχει τη μορφή μιας γραμμικής συσχέτισης (διάμετρος αποικία-χρόνος) με ή χωρίς φάση προσαρμογής (Σχήμα 1.2(a) και (b)). Σε συνθήκες κοντά στις βέλτιστες, έχει καταγραφεί η εμφάνιση στατικής φάσης κατά την οποία σταματά η ανάπτυξη του μύκητα (Σχήμα 1.2(c)).

Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα πρωτογενή μοντέλα ανάπτυξης είναι το γραμμικό, η εξίσωση Gompertz (Zwietering et al. 1990) και το μοντέλο των Baranyi and Roberts (1994).



Σχήμα 1.2. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες καμπύλες ανάπτυξης για μύκητες: (a) γραμμικό μοντέλο, (b) γραμμικό μοντέλο με φάση προσαρμογής και (c) σιγμοειδές μοντέλο (Garcia et al. 2009).

γ. Μοντέλα αδρανοποίησης

Η μοντελοποίηση της αδρανοποίησης των спорίων των μυκήτων στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες ακολουθεί μία γραμμική προσέγγιση, σύμφωνα με την κλασική πρωτοβάθμια εξίσωση (Baggerman and Samson 1988, Fujikawa and Itoh 1996):

$$dN/ dt = -k_i N \quad (1.6)$$

όπου N : ο αριθμός των ζώντων спорίων (σπόρια/ g ή mL)

k_i : η σταθερά του ρυθμού της δράσης (s^{-1})

1.6.2.2 Δευτερογενή μοντέλα

Όπως ήδη προαναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, η ανάπτυξη των μυκήτων στα τρόφιμα επηρεάζεται από πολλαπλούς οικολογικούς παράγοντες όπως το pH, η a_w , η θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά, ο χρόνος συντήρησης κ.ά. Τα δευτερογενή μοντέλα περιγράφουν την επίδραση των παραγόντων αυτών στις μεταβλητές παραμέτρους που σχετίζονται με την εκβλάστηση, την ανάπτυξη και την παραγωγή των μυκοτοξινών (π.χ. μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης- μ_{max}), οι οποίες προσδιορίζονται από τα πρωτογενή μοντέλα. Τα πιο συχνά εφαρμοζόμενα δευτερογενή μοντέλα για τους μύκητες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4.

1.6.2.3 Τριτογενή μοντέλα

Τα τριτογενή μοντέλα συνδυάζουν πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα με φιλικά προς τον χρήστη πακέτα λογισμικών με αποτέλεσμα οι τελικοί χρήστες τέτοιων συστημάτων να μην απαιτείται να έχουν γνώσεις των τεχνικών της μικροβιολογίας πρόρρησης.

Πίνακας 1.4. Ομαδοποίηση των κυριότερων μαθηματικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μυκήτων (Garcia et al. 2009).

Πρωτογενή	Δευτερογενή	Τριτογενή
Γραμμικό μοντέλο	Ratkowski (Ratkowski et al. 1983)	USDA Pathogen (USDA, 2003)
Εξίσωση Gompertz (Zwietering et al. 1990)	Μοντέλο Arrhenius- Εξίσωση Davey (Davey, 1989)	ComBase (www.combase.cc)
Μοντέλο Baranyi (Baranyi and Roberts, 1994)	Μοντέλο Rosso (Rosso et al. 1993) Μοντέλο Gibson (Gibson et al. 1994) Πολυωνυμικό μοντέλο Μοντέλα βασισμένα στο Gamma Concept (Zwietering et al. 1996)	Psomas et al. 2011 Psomas et al. In Press

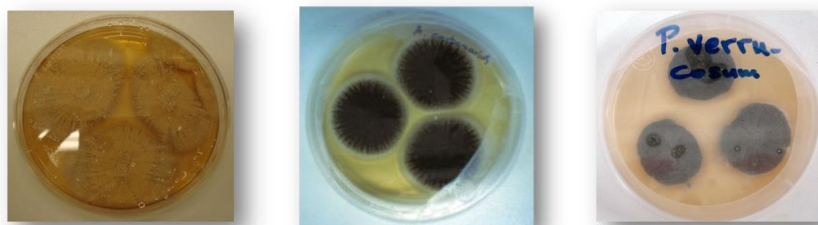
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Υλικά και μέθοδοι

2.1 Μικροοργανισμοί

2.1.1 Μύκητες

Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ενοφθαλισμού στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν οι *A. westerdijkiae* (= *A. ochraceus* IBT 21991), *A. carbonarius* και *P. verrucosum* (Εικόνα 2.1) (Κεφάλαια 3, 4, 5, 6, 7). Η επιλογή των συγκεκριμένων ειδών έγινε τόσο λόγω της συχνής τους παρουσίας στα τρόφιμα όσο και της αναφοράς τους ως οι κύριοι ωχρατοξινογόνοι μύκητες (Sweeney and Dobson 1998, Hocking et al. 2007). Τα στελέχη, το τρόφιμο από το οποίο απομονώθηκαν και η προέλευση των τριών ειδών μυκήτων αναφέρονται στον Πίνακα 2.1.



Εικόνα 2.1. Οι μύκητες *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε θρεπτικό υπόστρωμα Malt Extract Agar μετά από επώαση 7 ημερών σε θερμοκρασία 25°C.

Πίνακας 2.1. Τα στελέχη και η προέλευση των τριών ειδών μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

	<i>A. westerdijkiae</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>P. verrucosum</i>
Στέλεχος	IBT 21991	ATHUM 5659	OTA/11
Απομόνωση	Δημητριακά	Σταφύλια	Σιτάρι
Προέλευση	Danish Technical University Δανία	Faculty of Biology Αθήνα	National Food Administration Σουηδία

2.1.2 Βακτήρια- Ζύμες

Τα στελέχη των ζυμών και των βακτηρίων ελήφθησαν από τη μικροβιακή συλλογή των εργαστηρίων της Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, αντίστοιχα, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθήνας (Πίνακες 2.2 και 2.3) (Κεφάλαιο 6). Όλα τα στελέχη κωδικοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε 20% γλυκερόλη στους -20°C.

Πίνακας 2.2. Τα στελέχη και η προέλευση των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Είδη βακτηρίων (αριθμός στελεχών)	Κωδικός	Απομόνωση (αναφορά)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (7)	BM	Άνηθος, Βασιλικός, Ζυμάρι (μη δημοσιευμένα δεδομένα)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (6)	PdM	Αλεύρι, Ξινό ζυμάρι, Ζυμάρι (Paramithiotis et al. 2010)
<i>Streptococcus salivarius</i> (6)	SM	Ξινό ζυμάρι, Ζυμάρι (μη δημοσιευμένα δεδομένα)
<i>Weissella cibaria</i> (8)	WM	Αλεύρι, Ξινό ζυμάρι, Ζυμάρι (μη δημοσιευμένα δεδομένα)
<i>Lactobacillus sakei</i> (1)	LbM	Ζυμούμενα αλλαντικά (Drosinos et al. 2007)
<i>Lactobacillus casei</i> (1)		Ζυμούμενα αλλαντικά (Drosinos et al. 2007)

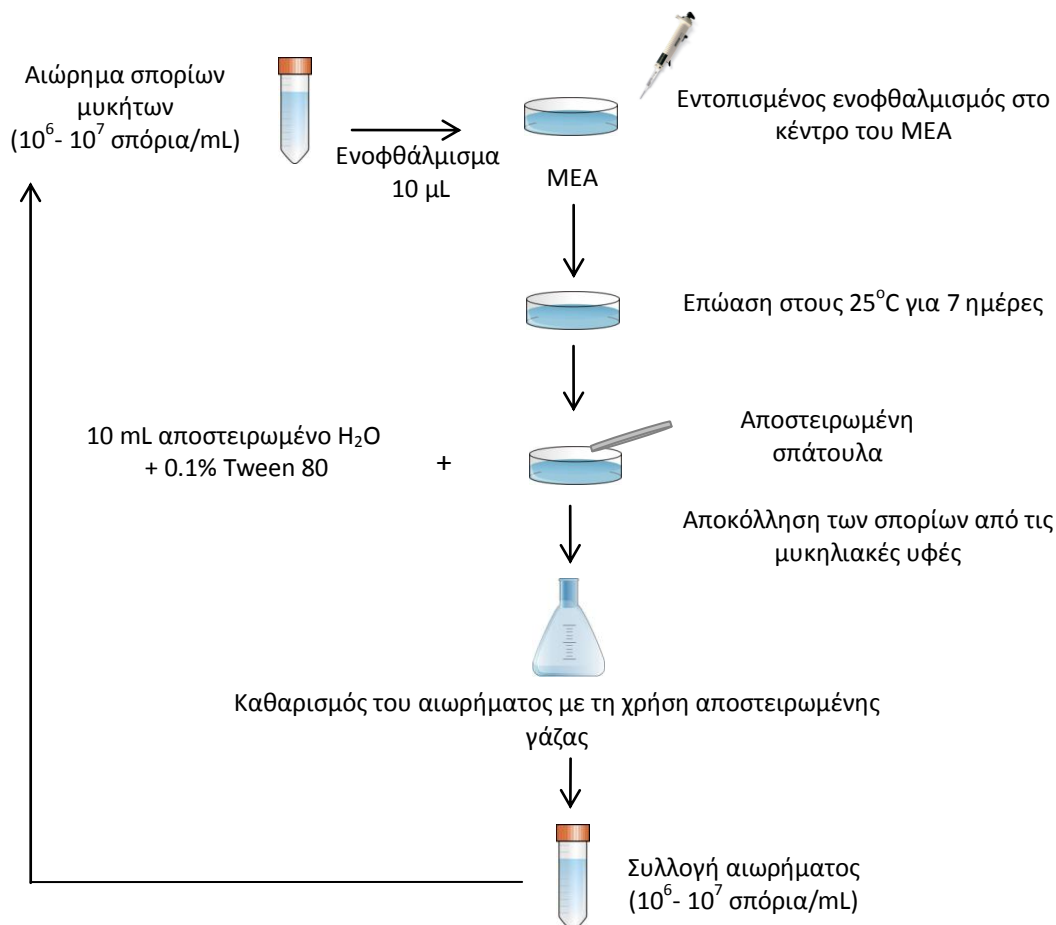
Πίνακας 2.3. Τα στελέχη και η προέλευση των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. * AZ: Αρχή της ζύμωσης, MZ: Μέση της ζύμωσης, TZ: Τέλος της ζύμωσης.

Είδη ζυμών	Κωδικός	Απομόνωση (Nisiotou et al. 2007)	Στάδιο απομόνωσης*
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	YM1	Λημνιό	AZ, MZ
<i>Kluyveromyces dobzhankii</i>		Μοσχοφίλερο	MZ
<i>Pichia fermentas</i>		Μαυρολιάτης	AZ, MZ
<i>Issatchekia occidentalis</i>		Σέφκα	AZ, MZ
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	YM2	Μαυρολιάτης	AZ
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		Σέφκα	AZ, MZ
<i>Issatchenkia terricola</i>		Μοσχοφίλερο	AZ, MZ
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		Μαυρολιάτης	AZ, MZ, TZ
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	YM3	Μοσχοφίλερο	AZ, MZ, TZ
<i>Kazachstania hellenica</i> (2 στελέχη)		Μαυρολιάτης, Σέφκα	MZ, TZ
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>		Λημνιό	AZ, MZ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YM4	Σέφκα, Μοσχοφίλερο	MZ, TZ
<i>Pichia guilliermondii</i>		Μαυρολιάτης	AZ, MZ
<i>Lachencea thermotolerans</i>		Λημνιό	AZ
<i>Issatchenkia orientalis</i>		Μαυρολιάτης	AZ, MZ, TZ

2.2 Αναζωογόνηση και προετοιμασία ενοφθαλισμάτων

2.2.1 Μύκητες

Τα αιωρήματα των спорίων αποθηκεύονταν μακροχρόνια σε 20% γλυκερόλη στους -20°C και ανακαλλιεργούνταν ανά 6 μήνες. Στην περίπτωση βραχυπρόθεσμων πειραμάτων, οι αποικίες των μυκήτων συντηρούνταν σε τρυβλία με Malt Extract Agar (MEA) (Lab M Ltd, Lancashire, UK) ($\text{pH } 5.4 \pm 0.2$ και $a_w 0.99$) σε θερμοκρασία $2-4^{\circ}\text{C}$ και ανακαλλιεργούνταν μία φορά την εβδομάδα στοχεύοντας στη διατήρηση της ζωτικότητας των спорίων. Η ανακαλλιέργεια του εκάστοτε μύκητα πραγματοποιήθηκε αρχικά με την προσθήκη όγκου 10 mL διαλύματος αποστειρωμένου νερού με 0.1% διαβρεχτικό Tween 80 (απαραίτητο για τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης νερού-спорίων) σε τρυβλία MEA με ανεπτυγμένο μυκήλιο ηλικίας 7 ημερών μετά από επώαση στους 25°C . Με τη βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας πραγματοποιήθηκε η αποκόλληση των спорίων. Ακολούθησε διήθηση του αιωρήματος με τη χρήση τριών στρώσεων αποστειρωμένης χειρουργικής γάζας (Aseptia, Athens, Greece) στοχεύοντας στην κατακράτηση των μυκηλιακών υφών και συλλογή των спорίων. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, η συγκέντρωση στο αιώρημα είναι περίπου 10^6-10^7 спорία/mL (Parra and Magan, 2004) (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανακαλλιέργειας των μελετώμενων μυκήτων.

Για την προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος του εκάστοτε είδους μύκητα, ακολούθησε φυγοκέντριση (3000g, 4°C, 15 λεπτά). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η προκύπτουσα βιομάζα (σπόρια) επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα (0.8% αλάτι + 0.15% πεπτόνη) (Maximum Recovery Diluent- MRD, pH 7.4) (Lab M Ltd, Lancashire, UK). Το στάδιο του καθαρισμού επαναλήφθηκε εις διπλούν. Το τελευταίο αυτό αιώρημα σπορίων αποτελούσε το αρχικό ενοφθάμισμα. Σε κάθε πείραμα, η εκτίμηση της συγκέντρωσης του αρχικού ενοφθαλμίσματος γινόταν με την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία MEA μετά από δεκαδικές αραιώσεις. Τα αρχικά ενοφθαλμίσματα χρησιμοποιούνταν άμεσα μιας και τα σπόρια διογκώνονται και μπαίνουν γρηγορότερα στη διαδικασία της εκβλάστησης από τη στιγμή που θα βρεθούν σε υδατικό διάλυμα.

2.2.2 Βακτήρια- Ζύμες

Οι μικροοργανισμοί αποθηκεύονταν μακροχρόνια σε 20% γλυκερόλη στους -20°C και ανακαλλιεργούνταν ανά 6 μήνες. Στην περίπτωση βραχυχρόνιων πειραμάτων συντηρούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με κεκλιμένο άγαρ στους 4°C και ανανεώνονταν κάθε μήνα στοχεύοντας στη διατήρηση της ζωτικότητάς τους. Η αναζωογόνηση πραγματοποιήθηκε με τη λήψη μίας αποικίας από καθαρή καλλιέργεια με μικροβιολογικό κρίκο και μεταφορά, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε 10 mL υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων Yeast Medium (YM) και de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) για τις ζύμες και τα βακτήρια αντίστοιχα (βλ. 2.3 (δ)). Ακολούθησε επώαση των μεμονωμένων στελεχών των ζυμών (στους 25°C για 24 ώρες) και των βακτηρίων (στους 30°C για 24 ώρες) και στη συνέχεια φυγοκέντριση (3000g, 4°C, 15 λεπτά). Το υπερκείμενο κάθε στελέχους απορρίφθηκε και η προκύπτουσα βιομάζα (ίζημα) επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα MRD. Το στάδιο του καθαρισμού επαναλήφθηκε εις διπλούν. Το τελευταίο αυτό αιώρημα κυττάρων αποτελούσε το αρχικό ενοφθάμισμα. Σε κάθε πείραμα, η εκτίμηση της συγκέντρωσης του αρχικού ενοφθαλμίσματος γινόταν με την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων μετά από δεκαδικές αραιώσεις.

2.3 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής ήταν:

(α) MEA

- Το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε στις τιμές 3.9, 5.1, 5.9, 6.8 με τη χρήση διαλυμάτων 12 N HCl ή 10 N NaOH. Η αρχική a_w του υποστρώματος ρυθμίστηκε σε 0.87, 0.93, 0.99 με την προσθήκη 20%, 10%, 0% κ.ό NaCl αντίστοιχα (**Κεφάλαιο 3**). Η αποστείρωση έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

- Το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε στις τιμές 3.5 ή 5.5 με τη χρήση διαλύματος 12 N HCl. Η αρχική a_w του υποστρώματος ρυθμίστηκε σε 0.99 ή 0.94 με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων γλυκερόλης (**Κεφάλαιο 5**). Η αποστείρωση έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

(β) Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Malt Extract Broth (MEB) (Lab M Ltd, Lancashire, UK) (pH 5.4 ± 0.2, a_w 0.99) διπλής ισχύος (double strength) προσθέτοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ζελατίνης (0, 5, 10 και 20% κ.ό.) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (**Κεφάλαιο 4**). Ο όρος διπλή ισχύς αναφέρεται στην προσθήκη διπλάσιου βάρους MEB από την αναλογία που προτείνεται από τον παρασκευαστή του υλικού για έναν ορισμένο όγκο νερού. Η προσθήκη της ζελατίνης έγινε σε μικρές δόσεις γραμμαρίων κάτω από σταθερή ανάδευση και θέρμανση (60°C) ώστε να διασφαλιστεί η επαρκής διάλυσή της στο νερό επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα ομοιογένεια στο θρεπτικό υλικό. Κατά την ανάδευση προσέχθηκε να μην παραχθεί αφρός. Τα μελετώμενα επίπεδα της a_w ήταν 0.90, 0.94 και 0.99. Οι απαραίτητες ποσότητες γλυκερόλης προστέθηκαν τόσο για τη ρύθμιση της a_w στα παραπάνω αρχικά επίπεδα αλλά και για την εξισορρόπηση διαφορών στην a_w λόγω της προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων ζελατίνης. Το pH του υλικού προσαρμόστηκε στο 5.5 με τη χρήση 12 N HCl. Η αποστείρωση έγινε στους 115°C για 10 λεπτά (σύμφωνα με την εταιρία παρασκευής της ζελατίνης) και ίσες ποσότητες κατανεμήθηκαν σε τρυβλία Petri και κωνικές φιάλες. Όλα τα θρεπτικά υλικά που περιείχαν ζελατίνη αποθηκεύτηκαν για περίπου 20 λεπτά στους 10°C με στόχο να επιταχυνθεί η πήξη.

(γ) Synthetic Grape Medium agar (SGM) (**Κεφάλαιο 6**). Δύο τύποι του SGM παρασκευάστηκαν, με προσθήκη 0.7 και 2.5% κ.ό. άγαρ. Και τα δύο θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν με τη προσθήκη: D(+)-γλυκόζης, 70 g; D(-)-φρουκτόζης, 30 g; L(-)-τρυγικού οξέος, 7 g; L(-)-μηλικού οξέος, 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.67 g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.67 g; KH_2PO_4 , 1.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75 g; NaCl, 0.15 g; CaCl_2 , 0.15 g; CuCl_2 , 0.0015 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.021 g; ZnSO_4 , 0.0075 g; (+) ένυδρης κατεχίνης, 0.05 g, σε 1000 mL απεσταγμένου νερού. Το pH του SGM ρυθμίστηκε σε 3.5 με τη προσθήκη κατάλληλης ποσότητας 2 N KOH (Tassou et al. 2009). Η a_w των θρεπτικών υποστρωμάτων τροποποιήθηκε σε 0.92, 0.95 και 0.98 με τη προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων γλυκερόλης. Η αποστείρωση έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

(δ) Υγρά θρεπτικά υποστρώματα YM (αρχικές συνθήκες: pH 6.5, a_w 0.99) και MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) (αρχικές συνθήκες: pH 6.1, a_w 0.99) (**Κεφάλαιο 6**). Το YM παρασκευάστηκε προσθέτοντας 0.3 g Malt extract (Merck, Darmstadt, Germany), 0.3 g Yeast extract (Lab M Limited, United Kingdom), 0.5 g πεπτόνης (Merck, Darmstadt, Germany), 1 g γλυκόζης (Riedel de Haan AG, Germany) σε 100 mL απεσταγμένο νερό. Το pH και των δύο υλικών ρυθμίστηκε στις τιμές 3.0, 4.0, και 5.0 προσθέτοντας 6N HCl. Η αποστείρωση έγινε στους 121°C για 15 λεπτά.

Στις περιπτώσεις που η ρύθμιση της a_w έγινε με τη προσθήκη γλυκερόλης, ελήφθη υπόψη η ουδέτερη συμπεριφορά της στο μεταβολισμό των μυκήτων. Οι αρχικές τιμές της a_w , του pH και του ιξώδους (μ , Pa s) των θρεπτικών υλικών μετρήθηκαν μετά την αποστείρωση με τη χρήση ψηφιακού ενεργόμετρου νερού (Hygrolab rotronic, Basserdorf, Switzerland), πεχάμετρου (pH 526, Metrohm Ltd, Switzerland) και ιξωδόμετρου Haake VT 500 (Thermo Fisher Scientific Inc.), αντιστοίχως.

2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις

2.4.1 Μύκητες

Η ανάπτυξη των μυκήτων προσδιορίστηκε με τρεις διαφορετικές μεθόδους, τη μεταβολή του βάρους της βιομάζας της αποικίας (g/ τρυβλίο), της ακτινωτής διαμέτρου της αποικίας (cm) και του πληθυσμού των σπορίων. Συγκεκριμένα:

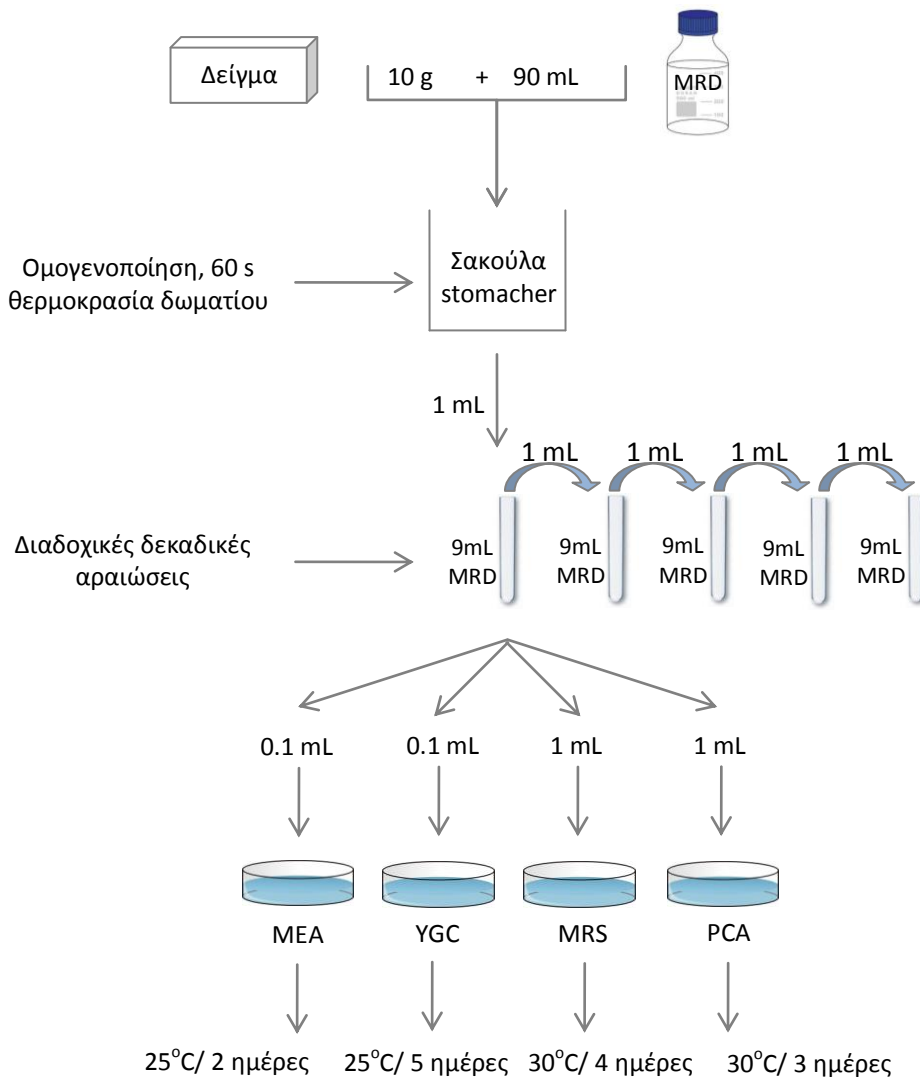
α) Ξηρή βιομάζα του μύκητα (dry fungal biomass, g) (**Κεφάλαιο 4**): Πριν τον ενοφθαλμισμό με τον *A. carbonarius*, στείρες εξειδικευμένες μεμβράνες από σελοφάν, διαμέτρου 8.5 cm (P400, Cannings Ltd, Bristol) τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των θρεπτικών υλικών (σε τρυβλία Petri) και των τροφίμων. Σύμφωνα με μελέτες, αυτές οι μεμβράνες επιτρέπουν στο μύκητα την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών από το υπόστρωμα, χωρίς να επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξής του (Ramos et al. 1999). Κατά τη δειγματοληψία, οι αποικίες του μύκητα ελήφθησαν ολόκληρες καθώς διαχωρίστηκαν από τα υποστρώματα (εργαστηριακά και τρόφιμα) με τη βοήθεια των μεμβρανών. Ακολούθησε ξήρανση στους 105°C για 2.5 ώρες και τα δείγματα αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου, ζυγίστηκαν ώστε να καταγραφεί η βιομάζα του μύκητα (Pasanen et al. 1999).

β) Ακτινωτή διάμετρος της αποικίας του μύκητα (colony diameter, cm) (**Κεφάλαιο 5, 6, 7**): Σε τακτά χρονικά διαστήματα, γινόταν καταγραφή της ακτινωτής διαμέτρου της αποικίας (σε σχήμα σταυρού) με τη χρήση χάρακα. Ο μέσος όρος των δύο αυτών μετρήσεων αποτελούσε τη μέση διάμετρο της αποικίας σε κάθε δειγματοληψία.

γ) Πληθυσμός των σπορίων (Spores population, LOG σπόρια/ g ή mL) (**Κεφάλαιο 7**): Ποσότητα 0.1 mL δείγματος από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος που έχει προετοιμαστεί σύμφωνα με την § 2.4.2 ενοφθαλμιζόταν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα MEA. Ακολουθούσε επώαση στους 25°C για 48 ώρες και καταμέτρηση του πληθυσμού των σπορίων (Σχήμα 2.2).

2.4.2 Βακτήρια- Ζύμες-Ολική μεσόφιλη χλωρίδα

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο της μετασποράς. Συγκεκριμένα, τα δείγματα ζυγίζονταν ασηπτικά σε στείρες σακούλες (BagMixer, Interscience, France) με αντίστοιχο όγκο διαλύματος MRD και ομογενοποιήθηκαν για 60 s, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Σχήμα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση των μικροβιολογικών αναλύσεων των μελετώμενων μικροοργανισμών.

Ακολούθησε παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1 mL δείγματος προηγούμενης αραιώσης σε 9 mL MRD. Οι κατάλληλες, κατά περίπτωση, δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιούνταν για τον ενοφθαλμισμό διπλής σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα (Σχήμα 2.2). Συγκεκριμένα:

α) ΟΜΧ: Ποσότητα 1 mL δείγματος από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμιζόταν με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA) (Lab M Limited, United Kingdom). Ακολουθούσε επώαση στους 30°C για 3 ημέρες και καταμέτρηση όλων των αποικιών.

β) Βακτήρια: Ποσότητα 1 mL δείγματος από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμιζόταν με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό

υπόστρωμα MRS agar (διπλή στρώση υλικού) σε αναερόβιες συνθήκες. Ακολουθούσε επώαση στους 25°C για 3-4 ημέρες και καταμέτρηση των χαρακτηριστικών αποικιών.

γ) Ζύμες: Ποσότητα 0.1 mL δείγματος από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμιζόταν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα Yeast Extract Glucose Chloramphenicol agar (YGC) (Biolife, Italy). Ακολουθούσε επώαση στους 25°C για 5 ημέρες και καταμέτρηση όλων των χαρακτηριστικών αποικιών.

Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου για καταμέτρηση έγινε σύμφωνα με τη συνθήκη, οι αποικίες να βρίσκονται εντός του εύρους 30-300 (Meynel and Meynel, 1970). Στην περίπτωση που τα τρυβλία περιείχαν πολύ μεγάλο αριθμό αποικιών, η καταμέτρηση έγινε με τον διαχωρισμό των τρυβλίων σε ίσα μέρη. Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των μικροοργανισμών ανά g ή mL τροφίμου, ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιάζόταν με την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε.

2.5 Φυσικοχημικές αναλύσεις

2.5.1 Προσδιορισμός pH

Σε κάθε δείγμα τροφίμου μετρήθηκε η τιμή του pH με τη χρήση ψηφιακού πεχάμετρου (pH 526, Metrohm Ltd, Switzerland). Συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα λαμβανόταν ο μέσος όρος τριών τιμών pH.

2.5.2 Ανίχνευση-ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ

2.5.2.1 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ (**Κεφάλαιο 3**). Σε κάθε δειγματοληψία, λάμβανε χώρα εκχύλιση της ΩΤΑ από ολόκληρο το περιεχόμενο του τρυβλίου (θρεπτικό υπόστρωμα + βιομάζα μύκητα). Συγκεκριμένα, κάθε δείγμα ζυγιζόταν και ακολουθούσε ομογενοποίηση με τετραπλάσιο όγκο διαλύματος εκχύλισης (80% μεθανόλη) σε ομογενοποιητή (Waring, New Hartford, UK) για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα ώστε να επιτευχθεί η εκχύλιση της ΩΤΑ. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός των εκχυλισμάτων με φίλτρο Whatman No 1. Τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 2-8°C όπως όριζε το πρωτόκολλο της ELISA μέχρι την ανάλυσή τους (Veratox, Quantitative Ochratoxin Test της Neogen Europe Ltd).

Το συγκεκριμένο τεστ αποτελεί μία ανταγωνιστική ELISA με δομή μικρών βοθρίων (wells) με σκοπό την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ σε συγκεντρώσεις ppb. Τα βοθρία είναι επιστρωμένα με αντιγόνα, ικανά να αναγνωρίζουν την τοξίνη. Το τεστ περιέχει επίσης, σύμπλεγμα

ομόλογου αντισώματος της ΩΤΑ και ενός ενζύμου (enzyme conjugate), ενζυμικό υπόστρωμα ή χρωμογόνο (substrate- chromogen), αντιδραστήριο λήξης της αντίδρασης (stop reagent) καθώς και πρότυπα διαλύματα με γνωστή περιεκτικότητα σε ΩΤΑ (0, 2, 5, 10, 25 ppb) για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης που θα επιτρέψει την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ. Δείγματα και πρότυπα προστίθενται στα βοθρία ανάμειξης (χωρίς αντιγόνο) και στη συνέχεια, προστίθεται το σύμπλοκο ΩΤΑ-ενζύμου. Ίσοι όγκοι από τα μίγματα μεταφέρονται στα βοθρία με τα ακινητοποιημένα αντιγόνα και ακολουθεί δεκάλεπτη επώαση. Πραγματοποιείται έκπλυση με απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθούν όλα τα μη προσδεδεμένα στοιχεία. Το ενζυμικό υπόστρωμα προστίθεται στα βοθρία ώστε να προκαλέσει χρωματική αλλαγή. Κατά τη διάρκεια της επόμενης δεκάλεπτης επώασης, αναπτύσσεται μπλε χρώμα σε αναλογία με την ποσότητα του συμπλόκου ΩΤΑ-ενζύμου έναντι της ελεύθερης τοξίνης. Όσο περισσότερο σύμπλοκο έχει προσδεθεί, τόσο περισσότερο μπλε χρώμα αναπτύσσεται, υποδεικνύοντας μικρότερη παρουσία της ΩΤΑ.

Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση των αγνώστων δειγμάτων σε φωτόμετρο (Tecan Microplate Reader) εφαρμόζοντας φίλτρο μήκους κύματος 650 nm, όπως ορίζεται από το πρωτόκολλο της εταιρείας. Όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ΩΤΑ χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων από κάθε δείγμα συνυπολογίζοντας την αραίωση που πραγματοποιήθηκε κατά την προετοιμασία του δείγματος (εκχύλισης της ΩΤΑ) και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της ΩΤΑ είναι 1 και 2 ppb αντίστοιχα.

2.5.2.2 Ανάλυση HPLC

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ, καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής, έγινε με τη χρήση της HPLC (**Κεφάλαια 3, 4, 5, 6, 7**). Η προετοιμασία των δειγμάτων και η εκχύλιση της ΩΤΑ πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε στην § 2.5.2.1. Ακολούθησε επιπλέον στάδιο καθαρισμού με φίλτρα Glass acrodisc (0.22 μm) εξειδικευμένα για δείγματα που προορίζονται για ανάλυση με HPLC. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα ο καθαρισμός και η συμπύκνωση των δειγμάτων με τη χρήση στηλών ανοσοσυγγένειας (OchraStar™, Romer Labs Pte Ltd, Singapore). Συγκεκριμένα, όγκος 2 mL από κάθε δείγμα αραιώθηκε με την προσθήκη 22 mL από διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4). Οι στήλες ανοσοσυγγένειας εφαρμόστηκαν σε σύστημα εκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Extraction-SPE) (Sigma-Aldrich Co) και τα δείγματα πέρασαν από τις στήλες με ροή 1-3 mL/λεπτό. Στη συνέχεια, ακολούθησε έκπλυση της στήλης εις διπλούν με 10 mL διαλύματος PBS. Η έκπλυση της ΩΤΑ πραγματοποιείται με την προσθήκη 2 mL

διαλύματος υψηλής καθαρότητας μεθανόλης: οξικού οξέος (98:2). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -18°C μέχρι την ανάλυση στην HPLC.

Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ με την HPLC πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τροποποιημένο πρωτόκολλο της ερευνητικής ομάδας του Möller and Nyberg (2003). Συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε υπό ισοκρατικές συνθήκες με ροή της κινητής φάσης 1 mL/λεπτό σε αναλογία νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ: 49/49/2, χρησιμοποιώντας ανιχνευτή φθορισμού μεταβλητού μήκους κύματος (LaChrom Hitachi, L-7485, Merck, Germany), (k_{exc} 333 nm, k_{em} 460 nm) και μία αναλυτική στήλη C18 (Resteck Pinnacle II, 250×4.6 nm, 4 μm). Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος ήταν συνδεδεμένη με υποδοχή όγκου 100 μL . Η ολοκλήρωση των κορυφών έγινε με τη χρήση λογισμικού Peak Simple 2.7.7. Υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες, ο χρόνος έκλυσης (retention time) της ΩΤΑ ήταν στα 9.5 λεπτά.

Κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες για τα θρεπτικά υποστρώματα ή/και τα τρόφιμα παρασκευάζοντας διαλύματα αναφοράς, διαφορετικών συγκεντρώσεων, ξεκινώντας από πυκνό διάλυμα της ΩΤΑ (10.15 mg/mL, Biopure, Romer Labs, Austria). Τα δείγματα, τα οποία είχαν συγκεντρώσεις εκτός της καμπύλης βαθμονόμησης, αραιώθηκαν με κινητή φάση. Κάθε δείγμα αναλυόταν εις τριπλούν. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ΩΤΑ χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των εμβαδών (area) που λαμβάνονταν μετά από αυτόματη ολοκλήρωση της κορυφής της ΩΤΑ συνυπολογίζοντας την αραιώση που πραγματοποιήθηκε κατά την προετοιμασία του δείγματος (εκχύλιση της ΩΤΑ), τη συμπύκνωση από τις στήλες ανοσοσυγγένειας και χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε για κάθε υπόστρωμα (θρεπτικό ή τρόφιμο). Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του υποστρώματος αλλά και η αξιοπιστία της μεθόδου προσδιορίστηκαν τα ποσοστά ανάκτησης (recovery) στα εκάστοτε θρεπτικά υποστρώματα ή/ και τρόφιμα μετά από προσθήκη γνωστών όγκων ΩΤΑ ώστε να επιτευχθούν διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις συγκεντρώσεων τοξίνης. Το ποσοστό της ανάκτησης υπολογίζεται από τη σχέση $(C2/ C1) \times 100$, όπου C1 η αρχική προστιθέμενη και C2 η μετρούμενη συγκέντρωση του δείγματος σε ΩΤΑ. Περισσότερες πληροφορίες για τις πρότυπες καμπύλες και τα ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ αναφέρονται σε κάθε κεφάλαιο χωριστά.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Η εκβλάστηση των σπορίων, η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή της ΩΤΑ εκτιμήθηκε με μονομεταβλητή ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος SPSS, Version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις υπολογίστηκαν και πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διακύμανσης για τις ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αλληλεπιδράσεις τους. Οι διαφορές χαρακτηρίζονται σημαντικές σε επίπεδο 95% (Κεφάλαια 3, 5, 6, 7).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Συνδυαστική επίδραση διαφορετικών τιμών pH, a_w και θερμοκρασίας στην παραγωγή ΩΤΑ των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum*

Kapetanakou et al. 2009, Food Control, Vol. 20, p. 725-732

3.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή της ΩΤΑ επηρεάζεται από ενδογενείς (π.χ. η υγρασία, το pH, τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος), εξωγενείς (π.χ. θερμοκρασία) (Häggbloom, 1982) και άλλους σχετικούς παράγοντες (implicit) όπως η ενδογενής μικροχλωρίδα (Marquardt and Frohlich, 1992). Επιπρόσθετα, είδη του γένους *Aspergillus* έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε μεγάλη ποικιλία κλιμάτων και τροφίμων επιβειβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ευρεία παρουσία της ΩΤΑ (Jorgensen, 2005). Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω πληροφορίες, ο καθορισμός του εύρους των κύριων οικολογικών συνθηκών αλλά και των τροφίμων που υποστηρίζουν την παραγωγή ΩΤΑ από τα προαναφερθέντα στελέχη κρίνεται σημαντικός για την ασφάλεια των τροφίμων.

Σημαντικός αριθμός ερευνών έχει μελετήσει τη συνδυαστική επίδραση της a_w και της θερμοκρασίας επώασης στην παραγωγή της ΩΤΑ από τους μύκητες *A. ochraceus* (συγγενές είδος με τον *A. westerdijkiae*) και *A. carbonarius* τόσο σε εργαστηριακά υποστρώματα (*in vitro*) (Esteban et al. 2006, Tassou et al. 2007, Valero et al. 2006b), όσο και σε τρόφιμα (*in situ*) (Romero et al. 2007). Παρόλα αυτά, περιορισμένες είναι οι πληροφορίες για την επίδραση του pH αλλά και η συγκριτική εκτίμηση της παραγωγής ΩΤΑ από τα τρία κύρια ωχρατοξινογόνα είδη μυκήτων.

Λόγω της συχνής παρουσίας της ΩΤΑ σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τη ποσοτικοποίησή της. Οι συνθήκες εκχύλισης και καθαρισμού των δειγμάτων διαφοροποιούνται ανάλογα με το εκάστοτε τρόφιμο που μελετάται. Όπως προαναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η ανάλυση της ΩΤΑ πραγματοποιείται κυρίως με HPLC και δευτερευόντως αρκετοί ερευνητές επικεντρώνονται στην εφαρμογή μεθόδων βασισμένων στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ή στην υγρή χρωματογραφία- φασματοσκοπία μάζας (LC-MS/MS) (Berthiller et al. 2007, Köller et al. 2006). Παρόλο που οι συμβατικές χρωματογραφικές τεχνικές είναι ακριβείς και αξιόπιστες, βασικό τους μειονέκτημα αποτελεί η χρονοβόρος διαδικασία της προετοιμασίας των δειγμάτων και ο εξοπλισμός υψηλού κόστους. Αντίθετα, ταχείες, αυτοματοποιημένες και χαμηλού κόστους μέθοδοι όπως οι ανοσοενζυμικές π.χ.

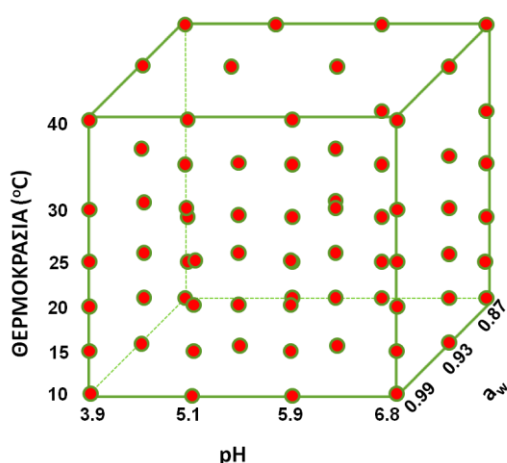
ELISA, είναι δυνατόν να είναι το ίδιο αξιόπιστες κατά τη μελέτη της απόκρισης στελεχών μυκήτων σε διαφορετικές συνθήκες, κατάλληλες για παραγωγή ΩΤΑ. Θα ήταν λοιπόν εξαιρετικά ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν τέτοιου είδους εναλλακτικές μέθοδοι μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ σε διαφορετικά τρόφιμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν: (α) η *in vitro* εκτίμηση της επίδρασης διαφορετικών συνδυασμών οικολογικών παραγόντων (ευνοϊκών και οριακών) όπως pH, a_w και θερμοκρασία στην παραγωγή ΩΤΑ των μυκήτων *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* με τη χρήση ELISA (β) η εκτίμηση της απόδοσης της ELISA, ως μία γρήγορη μέθοδο ανίχνευσης της ΩΤΑ συγκριτικά με μία συμβατική μέθοδο όπως η HPLC.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στο παρόν κεφάλαιο, σχεδιάστηκε ένα πολυπαραγοντικό πείραμα στοχεύοντας στον προσδιορισμό της ικανότητας των προαναφερθέντων ειδών μυκήτων για παραγωγή ΩΤΑ σε MEA με τέσσερις τιμές pH (3.9-6.8) και τρεις τιμές a_w (0.87, 0.93 και 0.99), κατά την επώαση σε έξι θερμοκρασίες (10-40°C), με αποτέλεσμα να μελετηθούν 72 διαφορετικοί πειραματικοί συνδυασμοί (Σχήμα 3.1). Η επιλογή του εύρους των τιμών των οικολογικών παραγόντων έγινε λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές (Πίνακας 3.1). Η ανάπτυξη των μυκήτων επιβεβαιώθηκε με οπτική παρατήρηση της αύξησης της ακτινωτής διαμέτρου της αποικίας, ενώ η ΩΤΑ προσδιορίστηκε με τη χρήση των μεθόδων ELISA και HPLC. Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. Όλες οι πειραματικές περιπτώσεις διεξήχθησαν τουλάχιστον εις διπλούν ($n=4$).



Σχήμα 3.1. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών συνθηκών (pH, a_w και θερμοκρασία) που μελετήθηκαν για την παραγωγή ΩΤΑ από τους *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum*.

Πίνακας 3.1. Βιβλιογραφικές αναφορές που ελήφθησαν υπόψη για τον καθορισμό του εύρους των παραμέτρων pH, a_w και θερμοκρασίας επώασης.

Μύκητας	T (°C)	pH	a_w	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>A. carbonarius</i>	15- 37	4.2	0.90- 0.99	Belli et al. 2004, 2005
<i>A. niger</i>				
<i>A. carbonarius</i>	15, 30	2- 10	0.78- 0.99	Esteban et al. 2006
<i>A. niger</i>				
<i>A. carbonarius</i>	20, 30	> 4.5	0.92, 0.97	Valero et al. 2006a
<i>A. ochraceus</i>	10- 30	4.2- 4.5	0.92- 0.97	Pardo et al. 2005
<i>A. ochraceus</i>	5- 40	3.5- 5.5	0.70- 0.95	Suarez-Quiroz et al. 2004
<i>P. verrucosum</i>	10- 25	---	0.75- 0.99	Cairns-Fuller et al. 2005

3.2.2 Επιλογή και ανακαλλιέργεια των μυκήτων

Οι μύκητες που επιλέχθηκαν στο παρόν κεφάλαιο ήταν οι *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* (βλ. Κεφ. 2, § 2.1.1). Η αναζωογόνηση των μυκήτων και η συλλογή των σπορίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην § 2.2.1.

3.2.3 Παρασκευή υποστρωμάτων

Η παρασκευή των διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων MEA έγινε σύμφωνα με την § 2.3α.

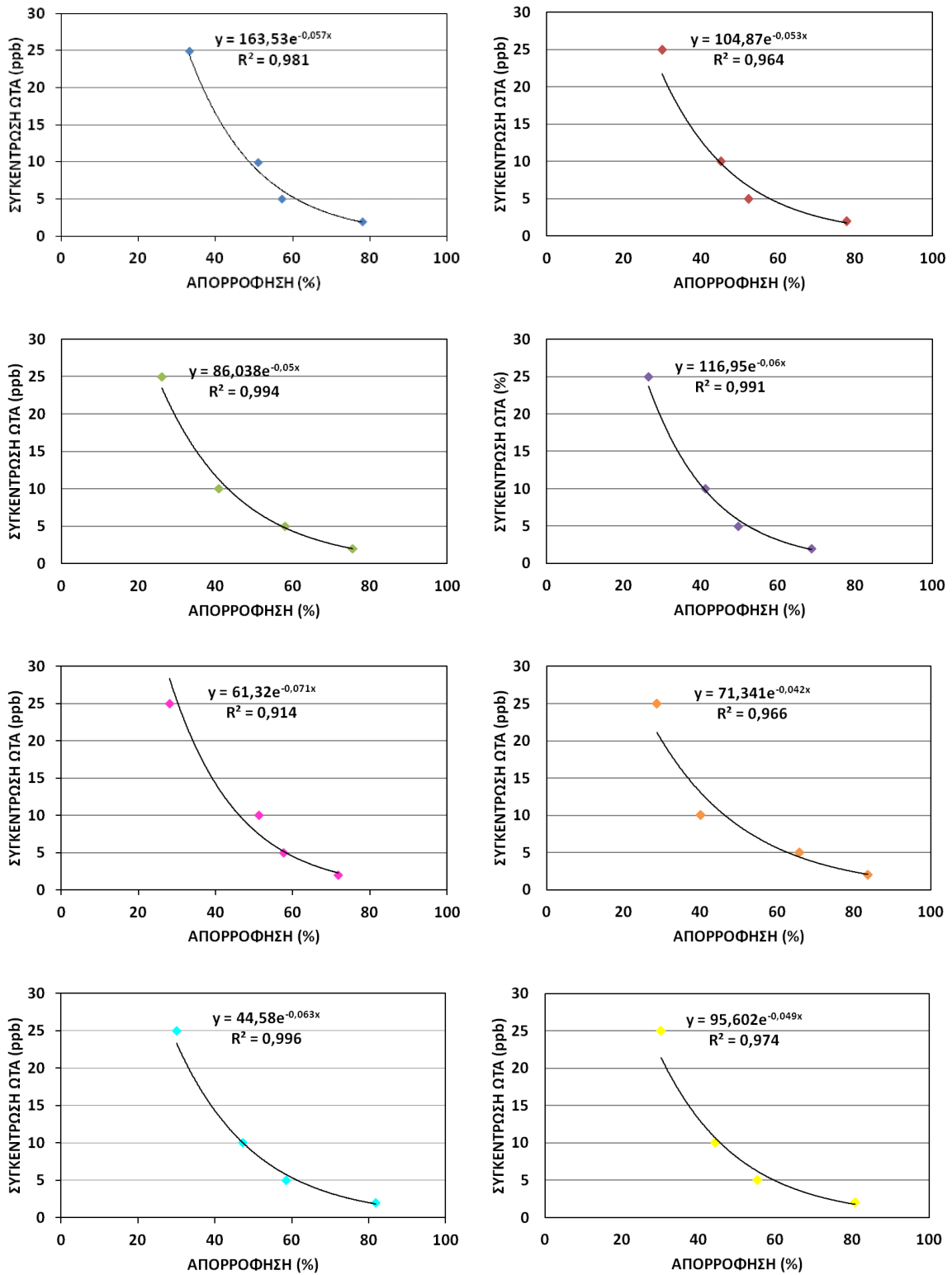
3.2.4 Ενοφθαλμισμός και συνθήκες επώασης

Ποσότητα 10 mL αιωρήματος σπορίων (αρχικό ενοφθάλμισμα 10^3 σπόρια/g) από κάθε μύκητα ενοφθαλμίστηκε στο κέντρο και την επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος όλων των συνδυασμών pH x a_w (Cairns-Fuller et al. 2005). Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 10, 15, 20, 25, 30 και 40°C για 30 ημέρες.

3.2.5 Μέθοδος μέτρησης ΩΤΑ

3.2.5.1 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

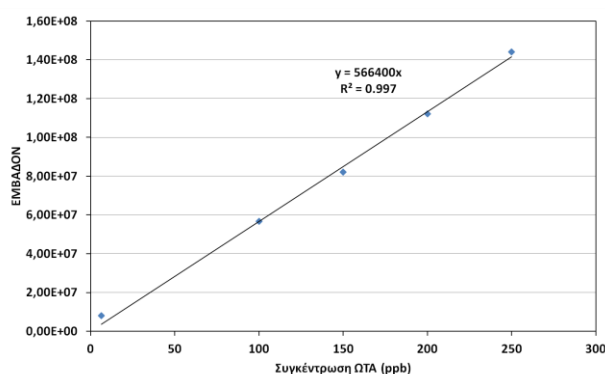
Η εκχύλιση της ΩΤΑ, η ανάλυση των δειγμάτων και η ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ έγινε σύμφωνα με την § 2.5.2.1. Οι συγκεντρώσεις της ΩΤΑ των αγνώστων δειγμάτων προσδιορίστηκαν με τη χρήση πρότυπων καμπυλών, οι οποίες κατασκευάστηκαν από τη μέτρηση των απορροφήσεων των διαλυμάτων αναφοράς που περιείχε το τεστ (Γράφημα 3.1).



Γράφημα 3.1. Πρότυπες καμπύλες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ των δειγμάτων που αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA.

3.2.5.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης- HPLC

Αντιπροσωπευτικός αριθμός δειγμάτων (~10%), τα οποία παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις ΩΤΑ και συγκεκριμένα εκτός του εύρους ποσοτικοποίησης της πρότυπης καμπύλης της ELISA (2-25 ppb), αναλύθηκαν και με τη χρήση HPLC, στοχεύοντας στη διερεύνηση της αξιοπιστίας της μεθόδου ELISA και δευτερευόντως, στη μελέτη πιθανής συσχέτισης μεταξύ των δύο εφαρμοζόμενων μεθόδων. Η εκχύλιση της ΩΤΑ, η ανάλυση των δειγμάτων και η ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ έγινε σύμφωνα με την § 2.5.2.2.



Γράφημα 3.2. Πρότυπη καμπύλη η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ των δειγμάτων που αναλύθηκαν με την HPLC.

Πίνακας 3.2. Ποσοστά ανάκτησης μετά τη φόρτιση θρεπτικών υποστρωμάτων MEA με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ.

	Malt Extract agar				
	ELISA		HPLC		
ΩΤΑ (ppb)	50	100	10	100	500
Ανάκτηση (%)	84.1	92.3	108.9	80.9	89.5

3.2.6 Στατιστική ανάλυση

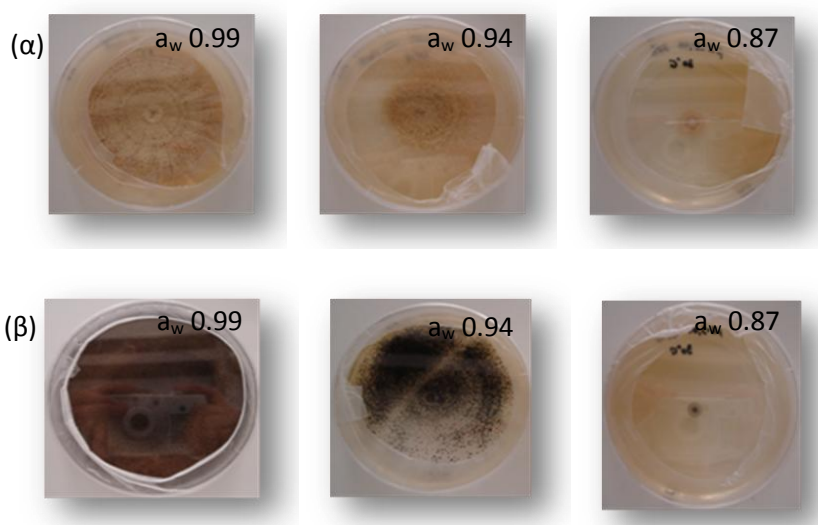
Η στατιστική ανάλυση της παραγωγής ΩΤΑ έγινε σύμφωνα με την § 2.6.

3.2 Αποτελέσματα

3.3.1 Προσδιορισμός της ΩΤΑ με τη μέθοδο ELISA

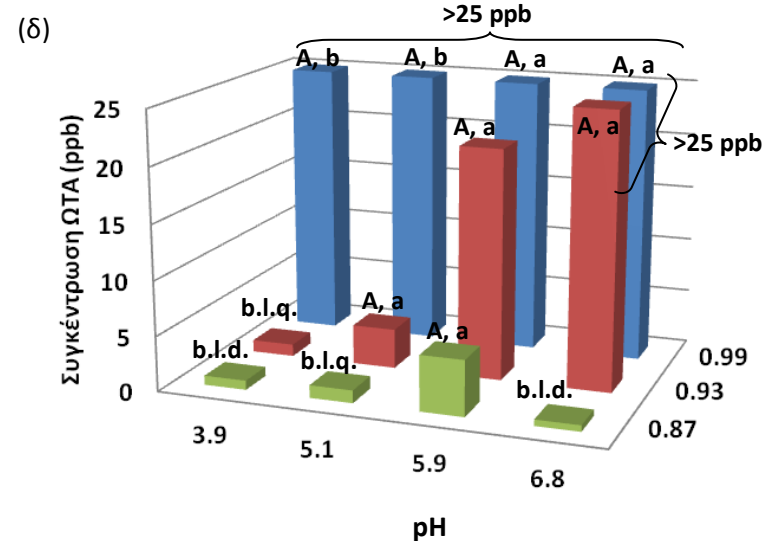
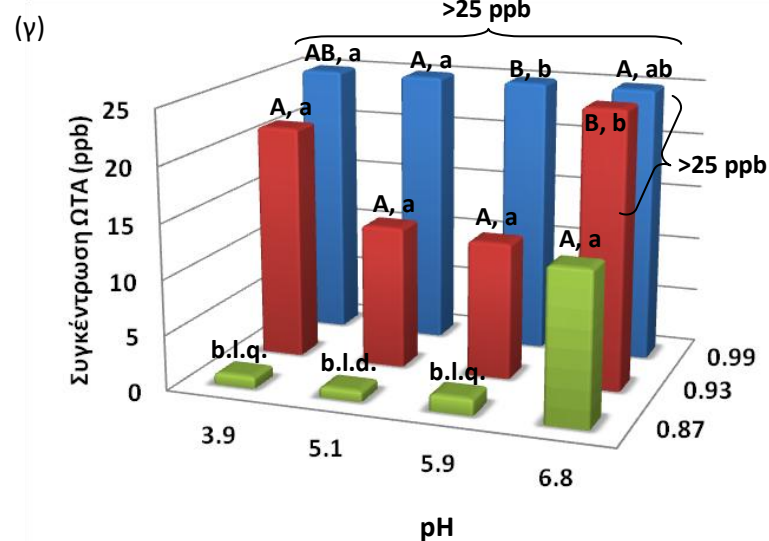
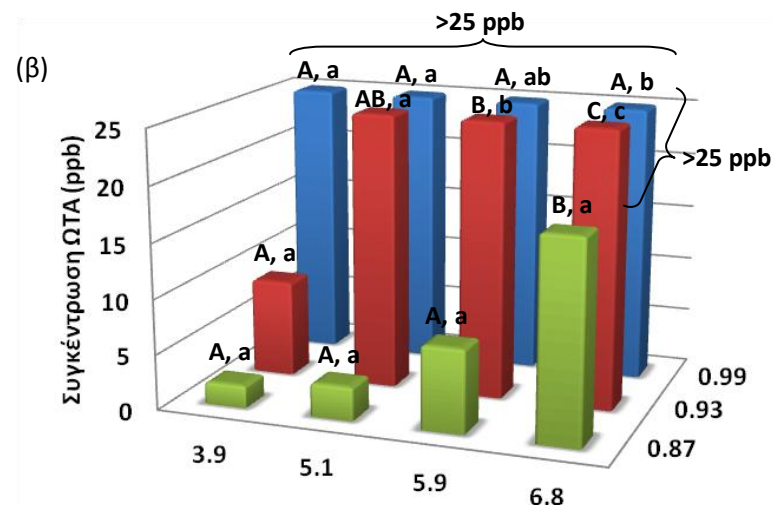
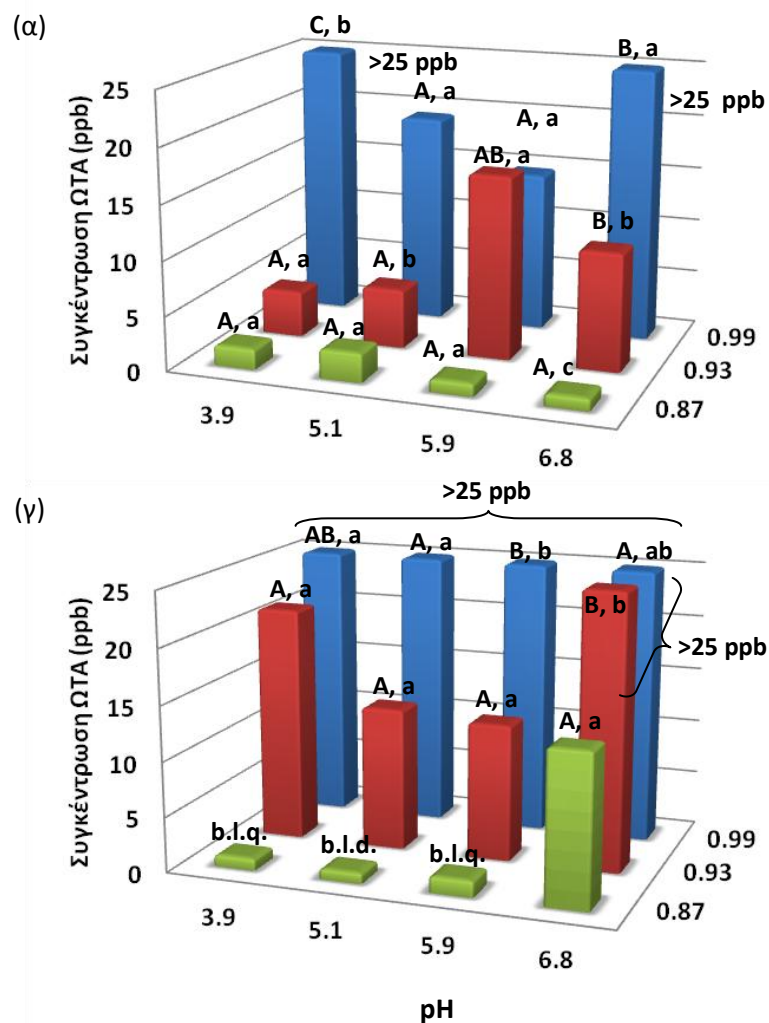
Τα αποτελέσματα των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ των τριών ειδών μυκήτων με τη μέθοδο ELISA παρουσιάζονται με τη μορφή τρισδιάστατων γραφημάτων (Γραφήματα 3.3, 3.4 και 3.5).

Η παραγωγή ΩΤΑ από τους *A. westerdijkiae* και *A. carbonarius* σε θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ επηρεάστηκε σημαντικά από τη θερμοκρασία, την a_w και τις αλληλεπιδράσεις $a_w \times \text{pH}$ ($p < 0.05$), εν αντιθέσει με τον παράγοντα pH. Όσον αφορά στον *P. verrucosum*, η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι το pH, η a_w αλλά και ο συνδυασμός $a_w \times \text{pH}$ δεν επηρέασαν στατιστικώς σημαντικά την παραγωγή ΩΤΑ ($p > 0.05$). Η μέγιστη παραγωγή της ΩΤΑ παρουσιάστηκε σε a_w 0.99, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία, το pH και το είδος του μύκητα (Γραφήματα 3.3, 3.4 και 3.5). Τα ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ στο θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ κυμαίνονταν στο εύρος 84-93% (Πίνακας 3.2). Όσον αφορά τον *A. carbonarius*, στην a_w 0.87 δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μύκητα και παραγωγή της ΩΤΑ σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες (Εικόνα 3.1γ, Γράφημα 3.4α-δ). Αντίθετα, το pH δεν είχε κάποια συγκεκριμένη επίδραση στην παραγωγή της ΩΤΑ ($p > 0.05$; Γραφήματα 3.3, 3.4 και 3.5). Τα δύο είδη του *Aspergillus* sp. δεν αναπτύχθηκαν (εμφάνιση μυκηλιακών υφών) και συνεπώς δεν παρήγαγαν ΩΤΑ στις θερμοκρασίες των 10 και 40°C, σε όλες τις τιμές pH και a_w . Σε ορισμένες περιπτώσεις (κυρίως στην a_w 0.87), παρόλο που ο *A. westerdijkiae* αναπτύχθηκε, τα παραγόμενα επίπεδα της ΩΤΑ ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (< 1 ppb) και ποσοτικοποίησης (< 2 ppb) μετά από 30 ημέρες επώασης (Εικόνα 3.1α, Γράφημα 3.3γ και δ). Παρόμοια συμπεριφορά έδειξε και ο *A. carbonarius* σε a_w 0.93 και θερμοκρασίες επώασης 20 και 30°C (Γράφημα 3.4β και δ). Επίσης πρέπει να επισημανθεί ότι η συγκέντρωση της ΩΤΑ ήταν μεγαλύτερη του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης της ELISA (25 ppb) κυρίως όταν εφαρμόζονταν ήπιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, οι τιμές της ΩΤΑ εκτός του ορίου ποσοτικοποίησης (> 25 ppb) καταγράφηκαν σε a_w 0.99, ή σε θερμοκρασίες εύρους 20-30°C. Οι πραγματικές τιμές σε αυτές τις περιπτώσεις θεωρούνται ανακριβείς μιας και είναι εκτός της πρότυπης καμπύλης και γι' αυτό το λόγο δεν παρουσιάζονται.

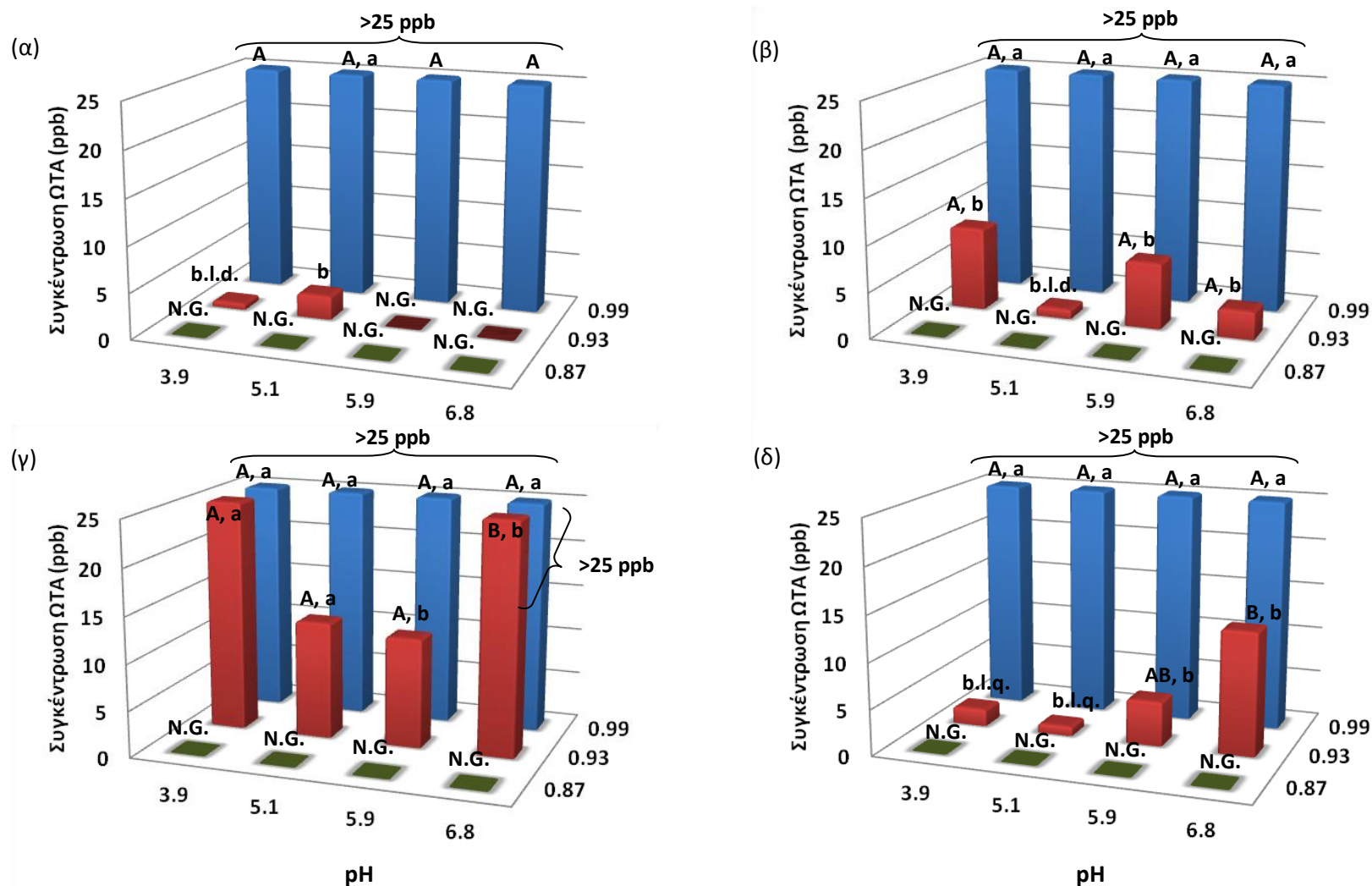


Εικόνα 3.1. Μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης των (α) *A. westerdijkiae* και (β) *A. carbonarius* σε ΜΕΑ (pH 5.1) με a_w 0.99, 0.93, 0.87 κατά την 30^η ημέρα επώασης στους 30°C.

Τα δύο είδη του γένους *Aspergillus* παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες ΩΤΑ συγκριτικά με τον *P. verrucosum*. Οι παραγόμενες συγκεντρώσεις της ΩΤΑ από τον *P. verrucosum* ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις εκτός του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του τεστ. Πλήρης αναστολή στην ανάπτυξη του μύκητα παρατηρήθηκε μόνο στους 10°C στις τιμές pH 5.9 και 6.8. Να επισημανθεί ότι δεν παρουσιάζεται η γραφική παράσταση στους 30°C όπου παρόλο που ο μύκητας αναπτυσσόταν φυσιολογικά, μετά από ένα χρονικό διάστημα σταματούσε και ακολουθούσε αποκόλληση της αποικίας από το υπόστρωμα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε σε όλους τους συνδυασμούς a_w και pH.

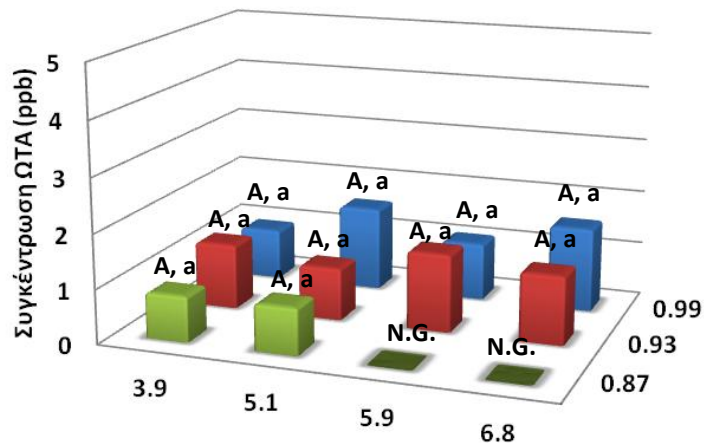


Γράφημα 3.3. Γραφική απεικόνιση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ (ppb) από τον *A. westerdijkiae* σε ΜΕΑ συναρτήσει του pH, της a_w και σε θερμοκρασία επώασης 15°C (α), 20°C (β), 25°C (γ) και 30°C (δ), με τη μέθοδο της ELISA. *b.l.d.: κάτω από το όριο ανίχνευσης (1 ppb), b.l.q.: κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης (2 ppb). Στήλες της ΩΤΑ με κοινό κεφαλαίο γράμμα για το ίδιο pH δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p>0.05$). Στήλες της ΩΤΑ διαφορετικών τιμών a_w με κοινό μικρό γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p>0.05$).

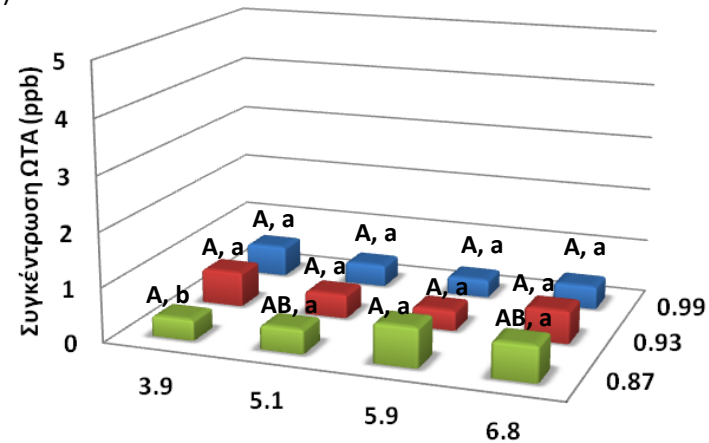


Γράφημα 3.4. Γραφική απεικόνιση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ (ppb) από τον *A. carbonarius* σε ΜΕΑ συναρτήσει του pH, της a_w και σε θερμοκρασία επώασης 15°C (α), 20°C (β), 25°C (γ) και 30°C (δ), με τη μέθοδο της ELISA. *N.G.: μη εμφανής μυκηλιακή υφή, b.l.q.: κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης (2 ppb). Στήλες της ΩΤΑ με κοινό κεφαλαίο γράμμα για το ίδιο pH δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p>0.05$). Στήλες της ΩΤΑ διαφορετικών τιμών a_w με κοινό μικρό γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p>0.05$).

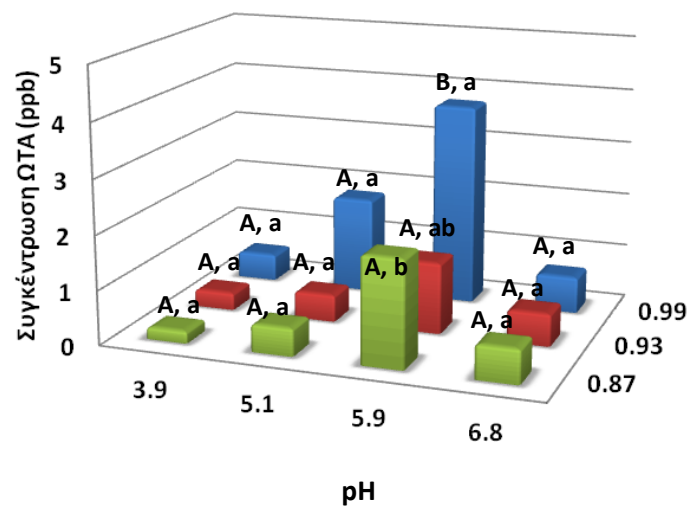
(α)



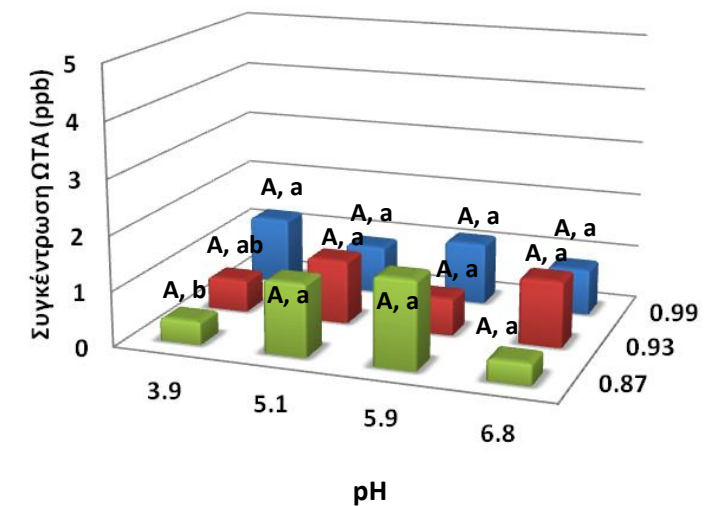
(β)



(γ)



(δ)



Γράφημα 3.5. Γραφική απεικόνιση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον *P. verrucosum* σε ΜΕΑ συναρτήσει του pH, της a_w και σε θερμοκρασία επώασης 10°C (α), 15°C (β), 20°C (γ) και 25°C (δ), με τη μέθοδο της ELISA. * N.G.: μη εμφανής μυκηλιακή υφή. Στήλες της ΩΤΑ με κοινό κεφαλαίο γράμμα για το ίδιο pH δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p>0.05$). Στήλες της ΩΤΑ διαφορετικών τιμών a_w με κοινό μικρό γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p>0.05$).

3.3.2 Επιβεβαίωση της μεθόδου ELISA με τη χρήση HPLC

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη την αδυναμία της ELISA για ποσοτική εκτίμηση πάνω από το ανώτερο όριο μεθόδου, επιλέχθηκε αντιπροσωπευτικός αριθμός δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις της ΩΤΑ >25 ppb και μελετήθηκαν περαιτέρω για τον ακριβή προσδιορισμό της παραγόμενης ΩΤΑ με τη χρήση HPLC. Όσον αφορά στον *P. verrucosum*, ελήφθησαν υπόψη μόνο οι τιμές από τη μέθοδο ELISA μιας και οι τιμές της παραχθείσας ΩΤΑ ήταν εντός του εύρους ποσοτικοποίησης του τεστ. Για κάθε είδος μύκητα του γένους *Aspergillus* επιλέχθηκε περίπου το 10% των δειγμάτων όπου η ΩΤΑ προσδιορίστηκε και με τη χρήση HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις της ΩΤΑ πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης της ELISA διέφεραν μεταξύ των δύο ειδών του γένους *Aspergillus*. Συγκεκριμένα, οι παραχθείσες συγκεντρώσεις της ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* υπέδειξαν γραμμική συσχέτιση μεταξύ ELISA και HPLC (R^2 0.932) (Πίνακας 3.3). Αντίθετα, η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων παραγωγής της ΩΤΑ από τον *A. westerdijkiae* που προσδιορίστηκε με την ELISA και την HPLC δεν ήταν ικανοποιητική (R^2 0.561). Επιπλέον στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι τιμές της ΩΤΑ που προσδιορίστηκαν με την HPLC ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με την ELISA.

Πίνακας 3.3. Συσχέτιση των συγκεντρώσεων της ΩΤΑ που προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους της ELISA και της HPLC για τους *A. westerdijkiae* και *A. carbonarius*.

Μύκητας	pH	a _w	Θερμοκρασία (°C)	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΩΤΑ (ppb)		R ²
				ELISA	HPLC	
<i>A. westerdijkiae</i>	3.9	0.99	15	111	1740	0.561
	5.1	0.99	15	36	3	
	5.1	0.99	20	59	3	
	5.9	0.99	20	158	1580	
	3.9	0.99	25	135	1460	
	5.1	0.99	25	94	3	
	3.9	0.99	30	81	23	
	5.9	0.99	30	204	2710	
	6.8	0.99	30	200	1110	
	3.9	0.99	30	272	2180	
<i>A. carbonarius</i>	5.1	0.99	15	100	1080	0.932
	6.8	0.99	15	211	1920	
	5.1	0.99	20	137	1200	
	3.9	0.99	25	412	2860	
	5.1	0.99	25	233	1700	
	5.9	0.99	25	168	1150	
	5.1	0.99	30	309	2200	
	3.9	0.99	30	118	988	

3.4 Συζήτηση

Οικολογικοί παράγοντες όπως η a_w και η θερμοκρασία επέδρασαν σημαντικά στην παραγωγή της ΩΤΑ από τους *A. westerdijkiae* και *A. carbonarius* (Valero et al. 2006b). Στην παρούσα μελέτη, και τα δύο είδη του γένους *Aspergillus* παρήγαγαν υψηλές συγκεντρώσεις ΩΤΑ (>25 ppb) στις περισσότερες μελετώμενες περιπτώσεις, ενισχύοντας την άποψη ότι αποτελούν ισχυρούς παραγωγούς της εν λόγω τοξίνης. Σε γενικές γραμμές, η απόκριση των δύο ειδών *Aspergillus* στις διαφορετικές οικολογικές συνθήκες ήταν παρόμοια. Στις υψηλές τιμές της a_w παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή ΩΤΑ, ενώ η μείωση της διαθεσιμότητας σε νερό επέφερε ταυτόχρονη μείωση και στην παραγόμενη ΩΤΑ (Belli et al. 2005). Επιπλέον, το pH δεν έδειξε συγκεκριμένη επίδραση στην παραγωγή της ΩΤΑ και στα τρία είδη μυκήτων. Λόγω των περιορισμένων πληροφοριών που αφορούν στην επίδραση του pH, στην παραγωγή της ΩΤΑ, η δυνατότητα να συγκριθούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με προηγούμενες μελέτες είναι περιορισμένη. Η μέγιστη παραγωγή ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* στο θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ παρατηρήθηκε στους 25°C και a_w 0.99. Παρόμοια, η ομάδα του Mitchell (2003) αναφέρουν τη μέγιστη παραγωγή ΩΤΑ στους 25°C και σε υψηλές τιμές a_w (π.χ. 0.98), ενώ οι Tassou et al. (2007) αναφέρουν τις μέγιστες ποσότητες ΩΤΑ στη θερμοκρασία των 20°C και a_w 0.96. Αντίθετα, ο *A. westerdijkiae* παρήγαγε τα μέγιστα επίπεδα ΩΤΑ σε χαμηλότερη θερμοκρασία (20°C) και a_w 0.99. Η ερευνητική ομάδα των Pardo et al. (2004a, 2004b) κατέγραψαν τη μέγιστη παραγωγή ΩΤΑ από τον *A. ochraceus* (συγγενές είδος με τον *A. westerdijkiae*) στους 30°C και a_w 0.99. Όσο για τον *P. verrucosum*, η μέγιστη παραγωγή της ΩΤΑ παρουσιάστηκε στους 20°C και a_w 0.99. Ο Cairns-Fuller και οι συνεργάτες του (2005) μελέτησαν το ίδιο στέλεχος (OTA/11) με την παρούσα μελέτη και κατέληξαν ότι η μέγιστη παραγωγή ΩΤΑ λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 25°C και a_w 0.95. Τέτοιες διαφοροποιήσεις είναι δυνατόν να συσχετίζονται με διάφορους παράγοντες όπως το στέλεχος του μύκητα και το εκάστοτε χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα (Pardo et al. 2006a). Ο *P. verrucosum* ανάμεσα στα τρία είδη που μελετήθηκαν ήταν αυτό που παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές παραγωγής ΩΤΑ. Παρόλα αυτά επισημαίνεται από πολλούς ερευνητές ως ο κυριότερος ωχρατοξινογόνος μύκητας στα ψυχρά κλίματα και σε προϊόντα χαμηλής a_w και κυρίως σιτηρά (Lund and Frisvad 2003, Lindblat et al. 2004).

Η a_w επηρέασε περισσότερο τον *A. carbonarius* συγκριτικά με τον *A. westerdijkiae* και τον *P. verrucosum*. Η χαμηλότερη τιμή της a_w που μελετήθηκε (0.87), πιθανόν αποτελεί την ελάχιστη a_w τόσο για την ανάπτυξη όσο και την παραγωγή της ΩΤΑ του *A. carbonarius*. Το παραπάνω αποτέλεσμα είναι συναφές με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι χαμηλές τιμές a_w (<0.87) είναι δυνατόν να είναι περιοριστικές για την ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ σχεδόν σε όλα τα στελέχη του *A. carbonarius* (Esteban et al. 2006, Romero et al. 2007). Αντιθέτως, ο μύκητας *A. westerdijkiae* παρήγαγε ΩΤΑ σε a_w 0.93 ανεξαρτήτως από το pH. Επιπλέον, οι παραγόμενες

συγκεντρώσεις της ΩΤΑ από τον *A. westerdijkiae* σε a_w 0.93 ήταν εκτός της αξιοπιστίας της πρότυπης καμπύλης (π.χ. >25 ppb). Τόσο υψηλά επίπεδα ΩΤΑ παρατηρήθηκαν από τον *A. carbonarius* μόνο σε ευνοϊκές συνθήκες (π.χ. a_w 0.99 και 25°C). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η a_w είναι αποτελεσματικότερο εμπόδιο για τον *A. carbonarius* συγκριτικά με τον *A. westerdijkiae* και τον *P. verrucosum*. Και τα δύο είδη του γένους *Aspergillus* δεν παρήγαγαν ΩΤΑ στις θερμοκρασίες επώασης 10 και 40°C, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με άλλες μελέτες, κατά τις οποίες παρατηρήθηκε παραγωγή της τοξίνης στους 40°C για τον *A. carbonarius* (Valero et al. 2005). Τέτοιου είδους διαφοροποιήσεις μεταξύ των ερευνών μπορεί να οφείλεται στη χρήση διαφορετικών στελεχών του *A. carbonarius* (Esteban et al. 2006). Παρόλα αυτά, η απουσία της ΩΤΑ σε όλους τους συνδυασμούς pH/ a_w στους 10°C συμφωνεί με τα ευρήματα των Mitchell et al. (2003), οι οποίοι παρατήρησαν ότι πολλά στελέχη του *A. carbonarius* δεν αναπτύχθηκαν σε αυτή τη θερμοκρασία. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας προτείνουν ότι η μέθοδος της ELISA δύναται να αποτελέσει μία αξιόπιστη και γρήγορη μέθοδο για την ανίχνευση της ΩΤΑ παραγόμενης από είδη του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* σε περιοριστικές συνθήκες για την ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, τέτοιου είδους παρατηρήσεις που αφορούν στην ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα είναι δυνατόν να είναι αντιπροσωπευτικές για τρόφιμα στα οποία δεν έγινε επαρκής ξήρανση όπως αποξηραμένα φρούτα και σταφίδες. Παρόλα αυτά επιπρόσθετη μελέτη της παραγωγής ΩΤΑ από τους συγκεκριμένους μύκητες σε τρόφιμα είναι απαραίτητη ώστε να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στα εργαστηριακά υποστρώματα.

Οι μετρήσεις με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πραγματοποιήθηκαν μόνο για τα δύο είδη του γένους *Aspergillus*. Για τον *A. carbonarius* βρέθηκε γραμμική σχέση ανάμεσα στις μετρήσεις των δύο μεθόδων με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εναλλακτική χρήση των δύο μεθόδων (Esti et al. 2012). Η γραμμική αυτή σχέση μεταξύ των δύο μεθόδων υποδεικνύει ότι ένα ημι-ποσοτικό τεστ όπως η ELISA μπορεί να είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την ανίχνευση ΩΤΑ σε επιπρόσθετα υποστρώματα από αυτά για τα οποία έχει σχεδιαστεί και προτείνει το πρωτόκολλο της εταιρείας. Το παραπάνω συμπέρασμα ενισχύεται από τα υψηλά ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ από το θρεπτικό υπόστρωμα MEA. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η μέθοδος της ELISA έχει χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα στον ποσοτικό προσδιορισμό της ΩΤΑ σε άλλα υποστρώματα εκτός των τροφίμων όπως ορός ανθρώπινου αίματος (Köller et al. 2006). Ένα πιθανό συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από τη συσχέτιση αυτή, το οποίο όμως απαιτεί αναμφίβολα περαιτέρω έρευνα, είναι ότι ένα τεστ σχεδιασμένο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ΩΤΑ σε τρόφιμα μπορεί να λειτουργήσει αξιόπιστα ως προς την ανίχνευση

(ποιοτικός προσδιορισμός) και την εκτίμηση της τάξης μεγέθους (ημι-ποσοτικός προσδιορισμός) και σε άλλα υποστρώματα υπό διαφορετικές συνθήκες pH και a_w .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου με βάση την επίδραση της μικροδομής (gel) υποστρώματος, της a_w και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και στην παραγωγή ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* και επικύρωση σε τρόφιμα διαφορετικού ιξώδους

Kapetanakou et al. 2011, Food microbiology, Vol. 28, p. 727-735

4.1 Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, τα είδη του γένους *Aspergillus* υποδιαίρεση *Nigri* συσχετίστηκαν με την παραγωγή της ΩΤΑ (Abarca et al. 1994). Έχει βρεθεί ότι ο μύκητας *A. carbonarius* που ανήκει σε αυτήν την ομάδα είναι ικανός να αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος pH (2-10) και a_w (0.90-0.99) (Bellí et al. 2005, Esteban et al. 2005). Πολυάριθμες μελέτες αναφέρουν ότι σημαντικός αριθμός στελεχών του *A. carbonarius* (75-100%) παράγει ΩΤΑ (Bellí et al. 2005, Romero et al. 2005). Επιπλέον, αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση ενδογενών (π.χ. pH, a_w) και εξωγενών (π.χ. θερμοκρασία) οικολογικών παραγόντων στην ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ του *A. carbonarius* (Leong et al. 2006, Marín et al. 2006, Kapetanakou et al. 2009). Ανάμεσα στους ενδογενείς παράγοντες, οι ιδιότητες της μικροδομής (microstructure) του εκάστοτε τροφίμου (π.χ. υγρό, ημίρρευστο ή στερεό) είναι ευρύτερα γνωστό ότι δύναται να επηρεάσουν την πιθανότητα αλλά και τον ρυθμό της μικροβιακής αύξησης. Παρόλο που η επίδραση της μικροδομής έχει μελετηθεί εκτεταμένα για την ανάπτυξη βακτηρίων και ζυμών, οι διαθέσιμες πληροφορίες για τη μικροδομή του τροφίμου και τον τρόπο που επιδρά στην ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή της ΩΤΑ είναι περιορισμένες. Λαμβάνοντας υπόψη, επίσης, την πολυπλοκότητα των τροφίμων και το γεγονός ότι η πλειονότητα των υφιστάμενων μελετών στηρίζεται σε δεδομένα που έχουν ληφθεί από *in vitro* πειράματα σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα, η ενσωμάτωση των επιπρόσθετων ιδιοτήτων των τροφίμων όπως η μικροδομή σε έναν πειραματικό σχεδιασμό είναι απαραίτητη ώστε να μοντελοποιηθεί επαρκώς το περιβάλλον ενός τροφίμου.

Η ποσοτικοποίηση των μικροβιακών αντιδράσεων στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες πραγματοποιείται με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων. Επί το πλείστον, οι υπάρχουσες μελέτες περιγράφουν μοντέλα σχετιζόμενα με την ανάπτυξη βακτηρίων, σε αντίθεση με τους μύκητες που έχουν λάβει λιγότερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, ο Dantigny με τους συνεργάτες του (2005a) υπέδειξε ότι αυτή η έλλειψη σε πληροφορίες μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα των βακτηρίων να αναπαράγονται με διαίρεση (fission), και να αναπτύσσονται ομοιογενώς σε υγρά

Θρεπτικά μέσα ή σε στερεές επιφάνειες (άγαρ), ενώ οι μυκηλιακές υφές διεισδύουν αναπτυσσόμενες και στις τρεις διαστάσεις του εκάστοτε θρεπτικού υποστρώματος ή τροφίμου. Επιπλέον, η πρόρρηση της αθροιστικής συγκέντρωσης των μυκοτοξινών (mycotoxin accumulation) και ειδικά της ΩΤΑ στα τρόφιμα είναι επίσης ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον πεδίο λόγω της ποικιλίας των παραγόντων που επιδρούν στην παραγωγή τους όπως η θερμοκρασία, η a_w , οι φυσικοί αναστολείς (π.χ. τα αιθέρια έλαια), το στέλεχος του μύκητα κ.ά. (Tassou et al. 2007). Οι προβλέψεις της ανάπτυξης των μυκήτων και της παραγωγής της ΩΤΑ σε πρωτογενή και μεταποιημένα προϊόντα δύναται να είναι χρήσιμη στον έλεγχο της ΩΤΑ στα τρόφιμα.

Πίνακας 4.1. Παραδείγματα τροφίμων με διαφορετική μικροδομή (Wilson et al. 2002).

Μικροδομή	Παραδείγματα
Υγρά (Liquid)	Σούπες, χυμοί (με αιωρούμενα σωματίδια)
Γαλακτώματα νερού σε έλαιο (water-in-oil)	Βούτυρο, μαργαρίνη
Γαλακτώματα ελαίου σε νερό (oil-in-water)	Κρέμα γάλακτος, γάλα
Πηκτή (Gel)	Μαγιονέζα, Ρâté, ζελέ, μυζήθρα
Πηκτό γαλάκτωμα (Gelled emulsion)	Τυρί από πλήρες γάλα, αλλαντικά
Επιφάνειες- Στερεά (Surface)	Λαχανικά, κρέας

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, το παρόν κεφάλαιο στοχεύει: (α) στη διερεύνηση της ανάπτυξης του *A. carbonarius* και της παραγωγής της ΩΤΑ σε εργαστηριακά υποστρώματα διαφορετικής μικροδομής (εκφραζόμενης σε συγκεντρώσεις ζελατίνης) και a_w , κατά τη διάρκεια της επώασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες, (β) στην ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων ικανών για την πρόρρηση του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* και (γ) στην εκτίμηση της προρρητικής ικανότητας των αναπτυχθέντων μοντέλων γενικής χρήσεως (*in vitro*) σε τρόφιμα (*in situ*) διαφορετικού ιξώδους.

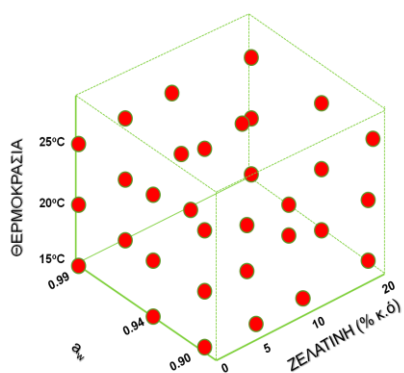
4.2 Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στο παρόν κεφάλαιο, σχεδιάστηκε ένα πολυπαραγοντικό πείραμα στοχεύοντας στον προσδιορισμό της ανάπτυξης του *A. carbonarius* και της παραγωγής ΩΤΑ από τον ίδιο μύκητα σε Malt Extract Broth με τρεις τιμές a_w (0.90, 0.94 και 0.99) και τέσσερις συγκεντρώσεις ζελατίνης (0, 5, 10 και 20% κ.ό.), κατά την επώαση σε τρεις θερμοκρασίες (15, 20 και 25°C), με αποτέλεσμα να μελετηθούν 36 διαφορετικοί πειραματικοί συνδυασμοί (Σχήμα 4.1). Η επιλογή των θερμοκρασιών έγινε αφενός διότι ο εν λόγω μύκητας αναπτύσσεται κυρίως στο προαναφερθέν θερμοκρασιακό εύρος και αφετέρου διασφαλίζεται η πήξη των μελετώμενων θρεπτικών υποστρωμάτων, μιας και η

Θερμοκρασία τήξης της ζελατίνης είναι 30°C. Όλο το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε pH 5.5. Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. Όλες οι πειραματικές περιπτώσεις επαναλήφθηκαν τουλάχιστον εις διπλούν.

Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά δεδομένα αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα πρόρρησης των ρυθμών ανάπτυξης του μύκητα και παραγωγής της ΩΤΑ συναρτήσει των προαναφερθέντων οικολογικών παραγόντων και αξιολογήθηκαν ως προς την προρρητική τους ικανότητα σε τρόφιμα διαφορετικού ιξώδους (viscosity, μ), κρέμα, ζελέ και μαρμελάδα, τα οποία συντηρήθηκαν στους 20°C.



Σχήμα 4.1. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών συνθηκών (pH, a_w και % κ.ό. ζελατίνης) που μελετήθηκαν για την ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ του *A. carbonarius*.

4.2.2 Επιλογή και ανακαλλιέργεια των μυκήτων

Ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το κεφάλαιο ήταν ο *A. carbonarius* (βλ. Κεφ. 2, § 2.1.1). Δεδομένης της ικανότητας του συγκεκριμένου είδους να αναπτύσσεται και να παράγει ΩΤΑ σε τρόφιμα με διαφορετικά ρεολογικά χαρακτηριστικά π.χ. κρασί (υγρό), μούστο (ημίρρευτο) και αποξηραμένα προϊόντα της αμπέλου ή σταφύλι (στερεό), κρίνεται αναγκαία η κατανόηση της επίδρασης της μικροδομής κατά την ανάπτυξή του. Η αναζωογόνηση του μύκητα και η συλλογή των σποριών έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην § 2.2.1.

4.2.3 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

4.2.3.1 Εργαστηριακά υποστρώματα

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΒ προσθέτοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ζελατίνης (0, 5, 10 και 20% κ.ό.). Τα θρεπτικά υλικά αποστειρώθηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής της εταιρίας (βλ. Κεφ. 2, § 2.3β). Η αποστείρωση δεν μετέβαλε την υφή των υποστρωμάτων που περιείχαν ζελατίνη. Η ζελατίνη επιλέχθηκε ως πηκτικός παράγοντας μιας και θεωρείται ως η καταλληλότερη ουσία για την προσομοίωση των μικροδομικών ιδιοτήτων των τροφίμων (Mertens et al. 2009). Επιπλέον λόγω αποτέλεσε η ευρεία

χρήση της ως εμπορικό συστατικό των τροφίμων όπως γαλακτοκομικά, γλυκά, προϊόντα κρέατος, προϊόντα ζαχαροπλαστικής και αρτοποιίας (GMIA, 2001).

4.2.3.2 Τρόφιμα

Κρέμα (pH 6.9 και a_w 0.98), ζελέ (pH 3.5 και a_w 0.97) και μαρμελάδα (pH 4.4 και a_w 0.92) του εμπορίου χρησιμοποιήθηκαν για το *in situ* πείραμα. Τα παραπάνω προϊόντα επιλέχθηκαν στοχεύοντας στην εκτίμηση της συμπεριφοράς της ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ σε τρόφιμα αλλά και στη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις προβλέψεις των μοντέλων στα εργαστηριακά υποστρώματα. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα τρόφιμα επιλέχθηκαν έτσι ώστε οι τιμές των κύριων ενδογενών παραγόντων που σχετίζονται με τη μικροδομή και τις ρεολογικές ιδιότητες όπως το ιξώδες (εκφραζόμενο σε συγκεντρώσεις ζελατίνης όπως περιγράφεται στην § 2.4) αλλά και η a_w να είναι εντός των ορίων αξιοπιστίας των αναπτυχθέντων μοντέλων στα θρεπτικά υποστρώματα. Σύμφωνα με την εμπορική ετικέτα, κανένα από τα τρόφιμα δεν περιείχε συντηρητικά. Το ζελέ προμηθεύτηκε σε μορφή σκόνης και παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας υπό ασηπτικές συνθήκες και ίσες ποσότητες κατανεμήθηκαν σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 9 cm) και κωνικές φιάλες για την εκτίμηση της ανάπτυξης του μύκητα και τη παραγωγή της ΩΤΑ, αντίστοιχα. Τα δείγματα ζελέ αποθηκεύτηκαν για περίπου 20 λεπτά στους 10°C ώστε να επιταχυνθεί η πήξη. Τα δείγματα της κρέμας και της μαρμελάδας χρησιμοποιήθηκαν στην εμπορική τους συσκευασία. Το pH των δειγμάτων του ζελέ και της μαρμελάδας ρυθμίστηκε στο 5.5 με την προσθήκη διαλύματος NaOH. Η ρύθμιση του pH έγινε καταρχήν ώστε να εμπίπτει στο εύρος της αξιοπιστίας των αναπτυχθέντων μοντέλων αλλά και για να διασφαλιστεί η ανάπτυξη του μύκητα, η οποία δεν θα ήταν πιθανή λόγω του χαμηλού αρχικού pH των συγκεκριμένων προϊόντων. Τόσο το ιξώδες όσο και η a_w μετρήθηκαν μετά την προσθήκη του διαλύματος NaOH λόγω της ενδεχόμενης επίδρασης της ρύθμισης του pH στις μικροδομικές ιδιότητες των 2 τροφίμων. Μακροσκοπικά, η εμφάνιση και των δύο προϊόντων δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την αύξηση του pH. Τα δείγματα ζελέ αποθηκεύτηκαν για περίπου 20 λεπτά στους 10°C ώστε να επιταχυνθεί η πήξη.

Πίνακας 4.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τροφίμων που επιλέχθηκαν για την αξιολόγηση των αναπτυχθέντων μοντέλων της ανάπτυξης και της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius*.

	Τρόφιμα		
	Κρέμα	Ζελέ	Μαρμελάδα
pH	6.5	3.5	4.2
a_w	0.98	0.97	0.92
Ιξώδες (Pa s) *	5.51	1.75	1.63

* Το ιξώδες μετρήθηκε στους 20°C.

4.2.4 Συνθήκες ενοφθαλμισμού και επώασης

Μετά την τοποθέτηση των μεμβρανών (βλ. Κεφ. 2, § 2.4.1α), κατάλληλη ποσότητα όγκου από το αιώρημα των 10^7 σπορίων/ mL ενοφθαλμίστηκε στο κέντρο και στην επιφάνεια τόσο στα εργαστηριακά υποστρώματα όσο και στα τρόφιμα, ώστε να επιτευχθεί αρχική συγκέντρωση σπορίων 10^3 ανά mL ή g υποστρώματος ή τροφίμου. Τα δείγματα του *in vitro* πειράματος επώαστηκαν στους 15, 20 και 25°C, ενώ τα τρόφιμα συντηρήθηκαν στους 20°C. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε τακτά χρονικά διαστήματα.

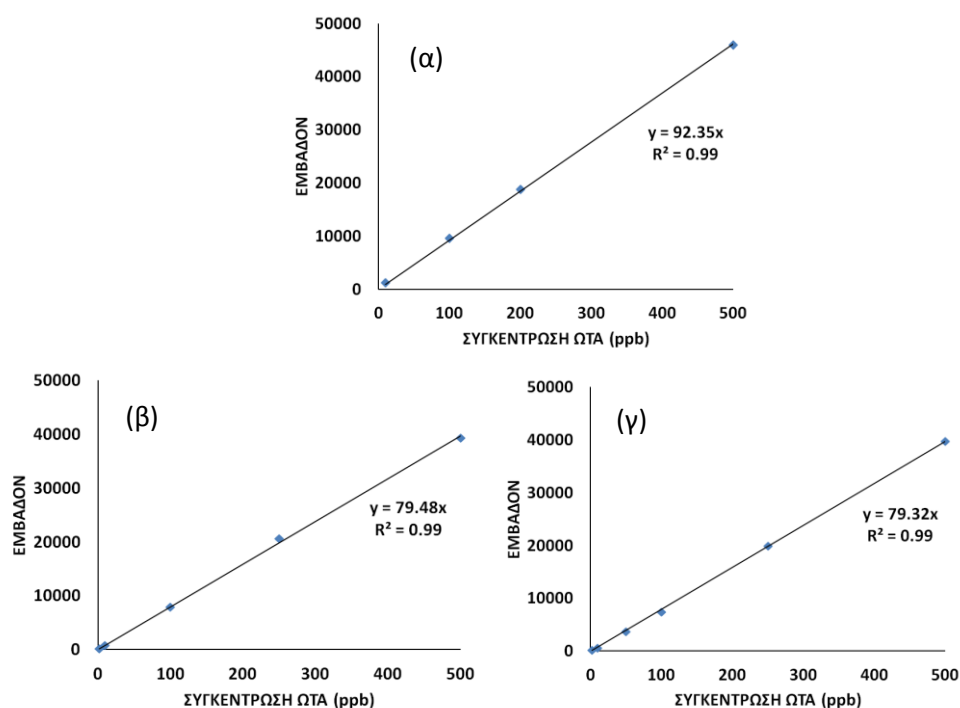
4.2.5 Μετρήσεις

4.2.5.1 Ανάπτυξη του μύκητα

Η ανάπτυξη του μύκητα εκτιμήθηκε με τη μέθοδο προσδιορισμού του βάρους της βιομάζας της αποικίας (βλ. Κεφ. 2, § 2.4.1α).

4.2.5.2 Ανίχνευση- ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ

Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην § 2.5.2.1 με την τροποποίηση της χρήσης ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας (Ultra Turrax, Heidolph Instruments, Germany) για 6 λεπτά ($26 \cdot 10^3$ rpm). Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε αρχικά με διήθηση και στη συνέχεια με τη χρήση στηλών ανοσοσυγγένειας σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας (βλ. § 2.5.2.2).



Γράφημα 4.1. Καμπύλες βαθμονόμησης (α) της κρέμας, (β) του ζελέ και της (γ) μαρμελάδας που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ.

Πίνακας 4.3. Ποσοστά ανάκτησης μετά τη φόρτιση θρεπτικών υποστρωμάτων και τροφίμων με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ.

	Ζελατίνη				Τρόφιμα					
	0% κ.ό.		20% κ.ό.		Κρέμα		Ζελέ		Μαρμελάδα	
ΩΤΑ (ppb)	50	500	50	500	10	500	10	500	10	500
Ανάκτηση (%)	105.4	97.5	88.9	82.9	104.1	95.5	87.1	81.8	93.2	82.6

Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ έγινε με τη χρήση HPLC σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.5.2.2.

4.2.6 Ανάπτυξη και εκτίμηση της απόδοσης των μοντέλων πρόρρησης

4.2.6.1 Πρωτογενές μοντέλο

Όσον αφορά την επεξεργασία και μοντελοποίηση των πρωτογενών δεδομένων ακολουθήθηκε μια κλασική προσέγγιση δύο σταδίων. Καταρχήν, τα πειραματικά δεδομένα από τη χρήση ζελατίνης στα εργαστηριακά υποστρώματα προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο του Baranyi (Baranyi et al. 1993, Baranyi and Roberts 1994), με το πρόγραμμα DMFit (www.ifr.ac.uk/Safety/DMfit/default.html) στοχεύοντας να προσδιοριστούν οι παράμετροι όπως ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης της βιομάζας του μύκητα (maximum specific biomass growth rate μ_{\max} , g ημέρα⁻¹) και ο χρόνος εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (time to visible fungal growth *TTVG*, ημέρες) (Marín et al. 2008). Το πρωτογενές μοντέλο του Baranyi εφαρμόστηκε επίσης και για την εκτίμηση παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την κινητική της παραγωγής της τοξίνης όπως ο ρυθμός παραγωγής της ΩΤΑ ($\mu_{\max \text{ ΩΤΑ}}$, ppm ημέρα⁻¹) και η αθροιστική παραγόμενη συγκέντρωση της τοξίνης (total toxin accumulation, ppm). Η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων έγινε με την εφαρμογή του μοντέλου του Baranyi, μη λαμβάνοντας όμως υπόψη τις τιμές της βιομάζας και της ΩΤΑ που αποτέλεσαν το πλατό της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα και παραγωγής της ΩΤΑ αντίστοιχα, σε όλες τις συνθήκες, μιας και πιθανώς πρόκειται για πλασματικές μετρήσεις λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών και χώρου (Γραφήματα 4.3, 4.4 και 4.5).

4.2.6.2 Δευτερογενές μοντέλο

α. Πολυωνυμικό μοντέλο

Οι τετραγωνικές ρίζες των εκτιμώμενων ρυθμών ανάπτυξης του μύκητα και παραγωγής της ΩΤΑ ($\sqrt{\mu_{\max}}$ και $\sqrt{\mu_{\max \text{ ΩΤΑ}}}$) εφαρμόστηκαν περαιτέρω σε δευτερογενή πολυωνυμικά μοντέλα. Η μετατροπή με τη χρήση τετραγωνικής ρίζας (square root transformation) επιλέχθηκε ανάμεσα στη λογαριθμική (logarithmic) και τη μη χρήση μετατροπής (no transformation) με στόχο τη μείωση της

διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο καλύτερη προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων. Η έκφραση του πολυωνυμικού μοντέλου είναι:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_4 X_1 X_2 + \alpha_5 X_1 X_3 + \alpha_6 X_2 X_3 + \alpha_7 X_1^2 + \alpha_8 X_2^2 + \alpha_9 X_3^2 \quad (4.1)$$

όπου $\alpha_0, \alpha_1, \dots, \alpha_9$ είναι οι σταθερές που πρόκειται να προσδιοριστούν από το μοντέλο, X_1, X_2, X_3 οι ανεξάρτητες μεταβλητές (independent or input variables) (a_w , θερμοκρασία και % ζελατίνης) και Y οι εξαρτημένες μεταβλητές, $\sqrt{\mu_{\max}}$ και $\sqrt{\mu_{\max} \Omega_{TA}}$. Η παραπάνω εξίσωση προσαρμόστηκε στα δεδομένα της ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής της ΩΤΑ με τη χρήση μη γραμμικής διαδικασίας (built-in nonlinear procedure) του προγράμματος STATISTICA (Version 8, Stat Soft, Paris, France). Επίσης προσδιορίστηκαν οι μη στατιστικώς σημαντικές παράμετροι. Πραγματοποιήθηκε επίσης, σταδιακή παλινδρόμηση (stepwise regression) χωρίς όμως να επιδείξει καλύτερα αποτελέσματα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Η συσχέτιση μεταξύ των αναπτυχθέντων μοντέλων και των πειραματικών δεδομένων εκτιμήθηκε γραφικά και από τους συντελεστές R^2 και RMSE (Root Mean Square Error).

β. Μοντέλο Gimenez and Dalgaard

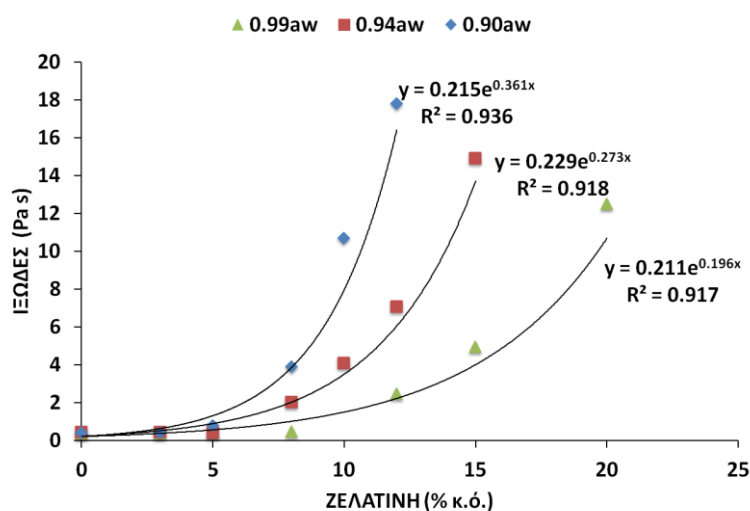
Εκτιμήθηκε επίσης το μοντέλο των Gimenez and Dalgaard (2004) για την επαρκή προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων και τον προσδιορισμό των ρυθμών ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ:

$$\sqrt{\mu_{\max}} = a(T - T_{\min}) \sqrt{a_w - a_{w \min}} \sqrt{\frac{Gel_{\max} - Gel}{Gel_{\max} - Gel_{opt}}} \quad (4.2)$$

όπου a είναι ένας αδιάστατος συντελεστής, T_{\min} και $a_{w \min}$ είναι οι θεωρητικά ελάχιστες τιμές της θερμοκρασίας και της a_w αντίστοιχα, που επιτρέπουν την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της ΩΤΑ. Παρομοίως, ο όρος Gel_{\max} είναι η μέγιστη συγκέντρωση ζελατίνης, η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της ΩΤΑ, ενώ ο όρος Gel_{opt} είναι η βέλτιστη συγκέντρωση ζελατίνης, η οποία θεωρήθηκε ίση με το 0, με βάση τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας έρευνας. Το παραπάνω μοντέλο δεν έδειξε καλή συμφωνία μεταξύ προβλέψεων και πειραματικών δεδομένων πιθανώς λόγω του περιορισμένου εύρους της θερμοκρασίας και της a_w που εξετάστηκε. Οι τιμές R^2 ήταν 0.802 και 0.713 για τον ρυθμό ανάπτυξης και παραγωγής της ΩΤΑ, αντίστοιχα. Γι' αυτόν το λόγο, στον παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολυωνυμικής προσαρμογής. Παρόλα αυτά, η εξίσωση (4.2) υπέδειξε ως T_{\min} τους 7.2°C και $a_{w \min}$ στην τιμή 0.885 αλλά και ως μέγιστο αποδεκτό ποσοστό ζελατίνης για την ανάπτυξη του μύκητα το 31%, θεωρητικές τιμές που θα μπορούσαν να θεωρηθούν ικανοποιητικές.

4.2.6.3 Εκτίμηση της απόδοσης των αναπτυχθέντων μοντέλων

Το ιξώδες των εργαστηριακών υποστρωμάτων (υγρά και περιέχοντα ζελατίνη) μετρήθηκε με ψηφιακό ιξωδόμετρο στους 20°C, θερμοκρασία στην οποία συντηρήθηκαν τα τρόφιμα (model food matrices) που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή δεδομένων με στόχο την εκτίμηση της απόδοσης των μοντέλων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η προσθήκη της γλυκερόλης για τη ρύθμιση της a_w θα είχε πιθανή θετική επίδραση στο ιξώδες των θρεπτικών υποστρωμάτων, κατασκευάστηκαν καμπύλες συσχέτισης, εκθετικής μορφής, μεταξύ ιξώδους και % κ.ό. ζελατίνης (Γράφημα 4.2). Το ιξώδες της κρέμας, του ζελέ και της μαρμελάδας στους 20°C ήταν 5.51, 1.75 και 1.62 Pa s αντίστοιχα, το οποίο βρίσκεται εντός του εύρους αξιοπιστίας των καμπυλών συσχέτισης (Γράφημα 4.2). Οι μετρούμενες τιμές του ιξώδους των τροφίμων με τη βοήθεια των εκθετικών συναρτήσεων μετατράπηκαν σε ποσοστά ζελατίνης. Στη συνέχεια, τα εκτιμώμενα ποσοστά ζελατίνης εισήχθησαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές στα αναπτυχθέντα μοντέλα του ρυθμού ανάπτυξης του μύκητα (μ_{\max}) και της παραγωγής ΩΤΑ ($\mu_{\max, \Omega TA}$). Οι τετραγωνικές ρίζες των μέγιστων ρυθμών ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ εκτιμήθηκαν σε κάθε τρόφιμο συλλέγοντας δεδομένα κινητικής παρόμοια με τα εργαστηριακά υποστρώματα και προσαρμόζοντας το μοντέλο του Baranyi σε αυτά τα δεδομένα. Αυτές οι τιμές συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες προβλέψεις των μοντέλων για τις ίδιες τιμές a_w και ποσοστά ζελατίνης στους 20°C ώστε να εκτιμηθεί η απόδοση των αναπτυχθέντων μοντέλων.



Γράφημα 4.2. Καμπύλες συσχέτισης μεταξύ του ιξώδους και της % κ.ό. συγκέντρωσης ζελατίνης στα διαφορετικά μελετώμενα θρεπτικά υποστρώματα ΜΕΑ με a_w 0.90, 0.94 και 0.99 και θερμοκρασία 20°C.

4.3 Αποτελέσματα

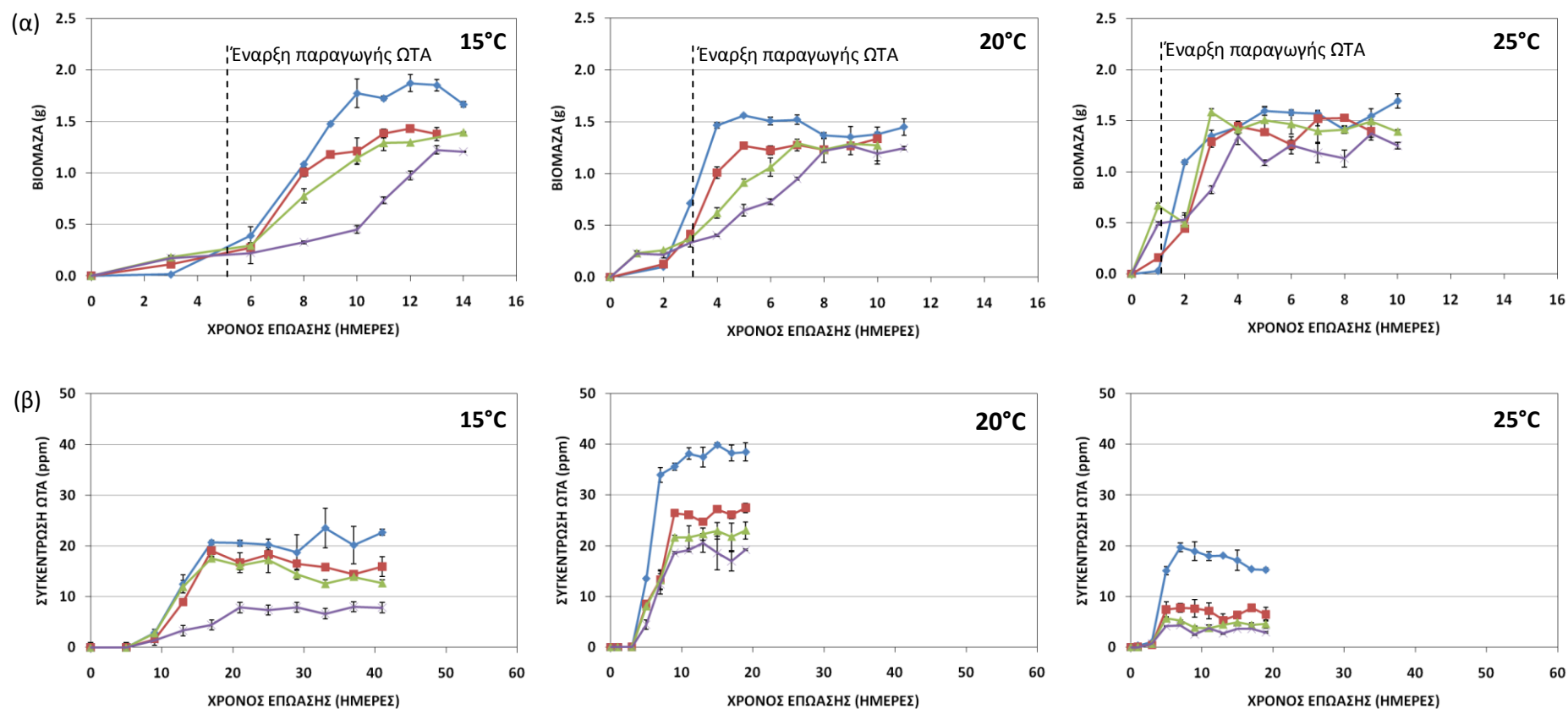
4.3.1 Πειράματα κινητικής και ανάπτυξη μοντέλων πρόρρησης

Όσον αφορά την επίδραση της μικροδομής, η μέγιστη ποσότητα της βιομάζας (g/τρυβλίο) (Γραφήματα 4.3α, 4.4α, 4.5α) και της ΩΤΑ (ppm) (Γραφήματα 4.3β, 4.4β, 4.5β) από τον *A. carbonarius* παρατηρήθηκαν στο 0%, και ακολούθως από το 5, 10, και 20% κ.ό. ζελατίνη, σε όλες τις θερμοκρασίες και τις a_w που μελετήθηκαν. Οι τιμές των ν_{\max} για την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της ΩΤΑ μειώθηκε καθώς η συγκέντρωση της ζελατίνης αυξανόταν (Γραφήματα 4.6α, β). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα Γραφήματα 4.5α και β η προαναφερθείσα επίδραση της ζελατίνης στους ν_{\max} και $\nu_{\max \Omega TA}$ ήταν παρόμοια, σε όλες τις θερμοκρασίες. Επιπλέον, η επίδραση της μικροδομής στην ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ αλλά και στην αθροιστική παραγόμενη συγκέντρωση του *A. carbonarius* ήταν λιγότερο εμφανής καθώς η a_w μειωνόταν (Γραφήματα 4.6α, β και Πίνακας 4.5). Η μέγιστη τιμή του $\sqrt{\nu_{\max}}$ της βιομάζας του μύκητα ήταν στους 25°C, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της ζελατίνης και την τιμή της a_w . Ακολούθως μικρότερες τιμές παρατηρήθηκαν στους 20 και 15°C (Γράφημα 4.6α). Αντίθετα, ο μέγιστος ρυθμός της παραγωγής της ΩΤΑ ήταν σε θερμοκρασία 20°C και ο χαμηλότερος στους 15°C (Γράφημα 4.6β). Οι μέγιστες τιμές των ν_{\max} και $\nu_{\max \Omega TA}$ του *A. carbonarius* παρατηρήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα χωρίς ζελατίνη, σε a_w 0.99 και 25 και 20°C αντίστοιχα.

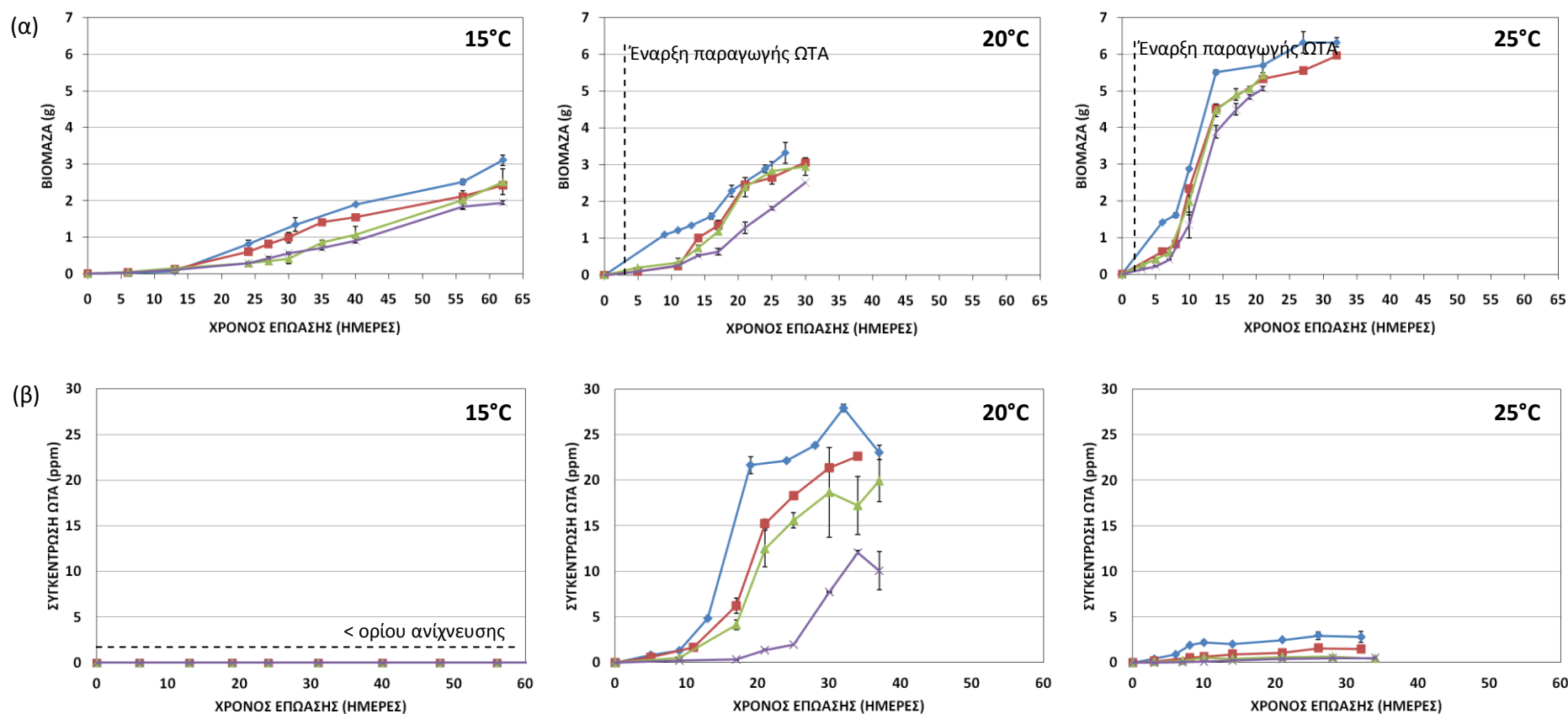
Όσον αφορά στην επίδραση της ενεργότητας νερού, οι μέγιστες ποσότητες της παραγόμενης βιομάζας παρατηρήθηκαν σε a_w 0.94, σε όλες τις θερμοκρασίες και τις συγκεντρώσεις ζελατίνης (Γραφήματα 4.3α, 4.4α, 4.5α) ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε κατά τη μείωση της a_w (Γράφημα 4.6α). Ο ρυθμός παραγωγής της ΩΤΑ και η συνολική παραγόμενη ΩΤΑ ακολούθησε τη σειρά a_w 0.99 > 0.94 > 0.90 (Γράφημα 4.6α και Πίνακας 4.5). Σε a_w 0.99, ανιχνεύσιμη συγκέντρωση της ΩΤΑ παρατηρήθηκε πρώτη φορά την 5^η, 3^η και 1^η ημέρα στους 15, 20 και 25°C αντίστοιχα, ενώ σε a_w 0.94, η ΩΤΑ έφτασε σε ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά από 3 και 1 ημέρες επώασης στους 20 και 25°C, αντίστοιχα. Στο συνδυασμό συνθηκών 15°C και a_w 0.90, δεν παρατηρήθηκε εμφανής μυκηλιακή υφή ανεξάρτητα από τις μελετώμενες συγκεντρώσεις ζελατίνης. Δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ σε συνδυασμό συνθηκών 15°C και $a_w \leq 0.94$ σε όλες τις συγκεντρώσεις ζελατίνης (Γραφήματα 4.4β, 4.5β).

Η επίδραση της ζελατίνης στον *TTVG* ήταν λιγότερο εμφανής κοντά στη βέλτιστη θερμοκρασία των 25°C, σε όλες τις μελετώμενες τιμές a_w (Πίνακας 4.4). Επιπρόσθετα, ο *TTVG* έδειξε υψηλότερες τιμές σε a_w 0.94 σε όλες τις θερμοκρασίες, μεταξύ 0-8, 2-22 και κάτω από όριο ανίχνευσης στις 12 ημέρες επώασης, σε a_w 0.99, 0.94 και 0.90, αντίστοιχα (Πίνακας 4.4).

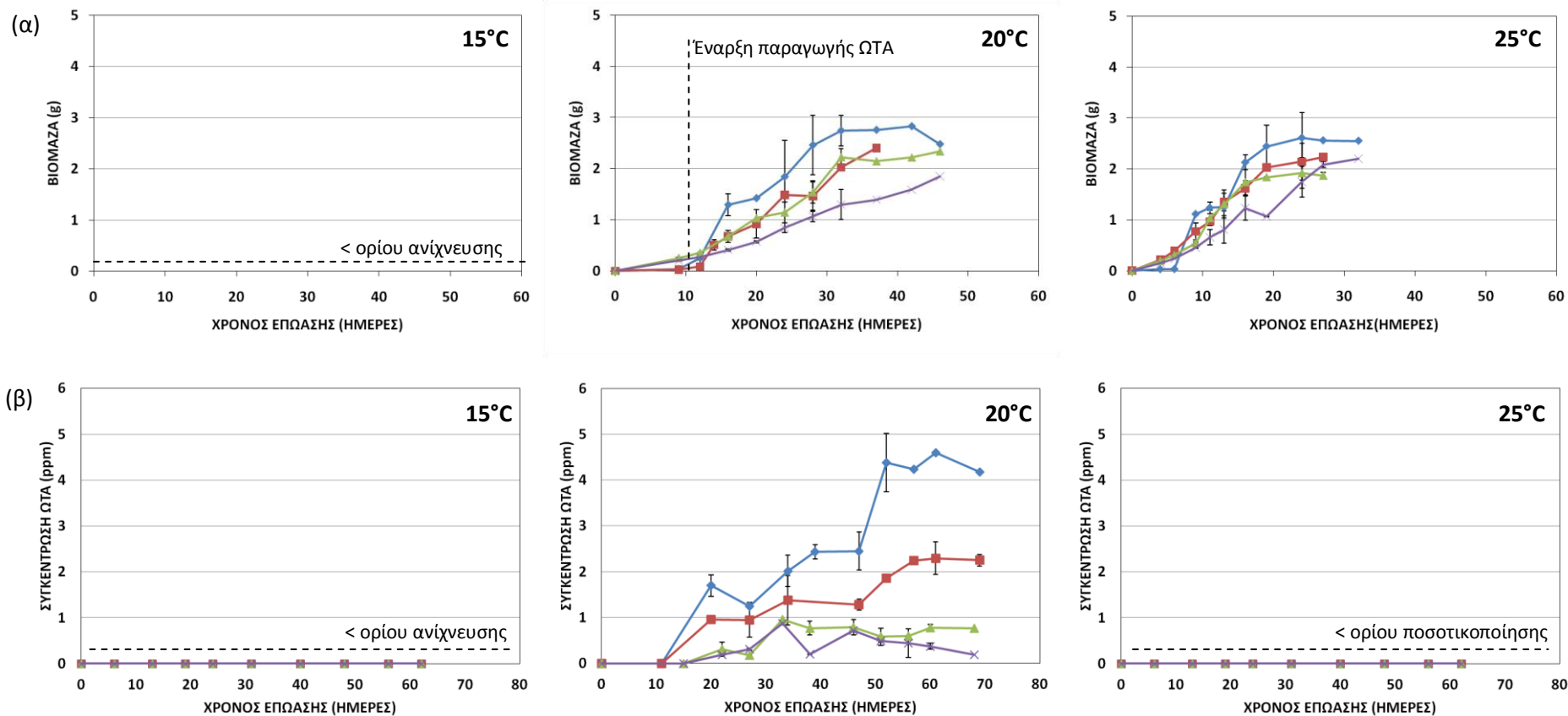
Η συσχέτιση μεταξύ πειραματικών δεδομένων και προβλέψεων των μοντέλων για τον ρυθμό της ανάπτυξης (R^2 0.89) και παραγωγής της ΩΤΑ (R^2 0.87) ήταν ικανοποιητική (Πίνακας 4.6).



Γράφημα 4.3. Γραφική απεικόνιση της κινητικής (α) της αύξησης της βιομάζας και (β) της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* σε ΜΕΒ (a_w 0.99) χρησιμοποιώντας 0% (- ◆-), 5% (- ■-), 10% (- ▲-) και 20% κ.ό. (- ×-) ζελατίνη ως πηκτικό παράγοντα και επώαση στους 15, 20 και 25°C.



Γράφημα 4.4. Γραφική απεικόνιση της κινητικής (α) της αύξησης της βιομάζας και (β) της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* σε ΜΕΒ (a_w 0.94) χρησιμοποιώντας 0% (-♦-), 5% (-■-), 10% (-▲-) και 20% κ.ό. (-×-) ζελατίνη ως πηκτικό παράγοντα και επώαση στους 15, 20 και 25°C.



Γράφημα 4.5. Γραφική απεικόνιση της κινητικής (α) της αύξησης της βιομάζας και (β) της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* σε ΜΕΒ (a_w 0.90) χρησιμοποιώντας 0% (-♦-), 5% (-■-), 10% (-▲-) και 20% κ.ό. (-×-) ζελατίνη ως πηκτικό παράγοντα και επώαση στους 15, 20 και 25°C.

Πίνακας 4.4. Παράμετροι (ρυθμός ανάπτυξης- μ_{max} , χρόνος εμφάνισης της μυκηλιακής υφής- TTVG) που εκτιμήθηκαν μέσω της μοντελοποίησης της αύξησης της βιομάζας του *A. carbonarius* με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου του Baranyi.

a_w	Θ (°C)	Ζελατίνη (% κ.ό)	μ_{max} (g ημέρα ⁻¹)	TTVG (ημέρα)	
0.99	15	0	0.396 ± 0.054	5.12 ± 0.48	
		5	0.342 ± 0.012	5.37 ± 0.08	
		10	0.224 ± 0.024	4.64 ± 0.37	
		20	0.189 ± 0.011	7.99 ± 0.15	
	20	0	0.993 ± 0.103	2.31 ± 0.10	
		5	0.610 ± 0.022	2.41 ± 0.04	
		10	0.227 ± 0.007	1.28 ± 0.12	
		20	0.168 ± 0.015	1.22 ± 0.33	
	25	0	1.413 ± 0.103	1.22 ± 0.04	
		5	0.927 ± 0.037	1.62 ± 0.01	
		10	0.453 ± 0.053	1.68e ⁻⁰⁹ ± 6.68e ⁻¹¹	
		20	0.311 ± 0.040	1.74e ⁻⁰⁹ ± 2.51e ⁻¹⁰	
	0.94	15	0	0.059 ± 0.001	10.31 ± 0.96
			5	0.047 ± 0.001	9.89 ± 0.98
			10	0.060 ± 0.009	21.75 ± 1.43
			20	0.046 ± 0.000	19.17 ± 0.33
20		0	0.129 ± 0.009	1.83 ± 0.55	
		5	0.182 ± 0.057	8.78 ± 1.95	
		10	0.229 ± 0.075	11.18 ± 2.06	
		20	0.130 ± 0.002	11.87 ± 0.12	
25		0	0.706 ± 0.030	5.85 ± 0.09	
		5	0.621 ± 0.029	6.72 ± 0.23	
		10	0.640 ± 0.030	7.20 ± 0.22	
		20	0.527 ± 0.061	6.94 ± 0.25	
0.90	15	0	b.l.d.	b.l.d.	
		5	b.l.d.	b.l.d.	
		10	b.l.d.	b.l.d.	
		20	b.l.d.	b.l.d.	
	20	0	0.143 ± 0.025	9.25 ± 0.11	
		5	0.103 ± 0.010	12.32 ± 2.29	
		10	0.093 ± 0.002	10.40 ± 1.33	
		20	0.059 ± 0.006	10.32 ± 1.24	
	25	0	0.221 ± 0.010	5.60 ± 1.67	
		5	0.126 ± 0.005	3.58 ± 1.62	
		10	0.138 ± 0.016	4.66 ± 1.21	
		20	0.080 ± 0.005	3.18 ± 1.76	

b.l.d.: κάτω από το όριο ανίχνευσης

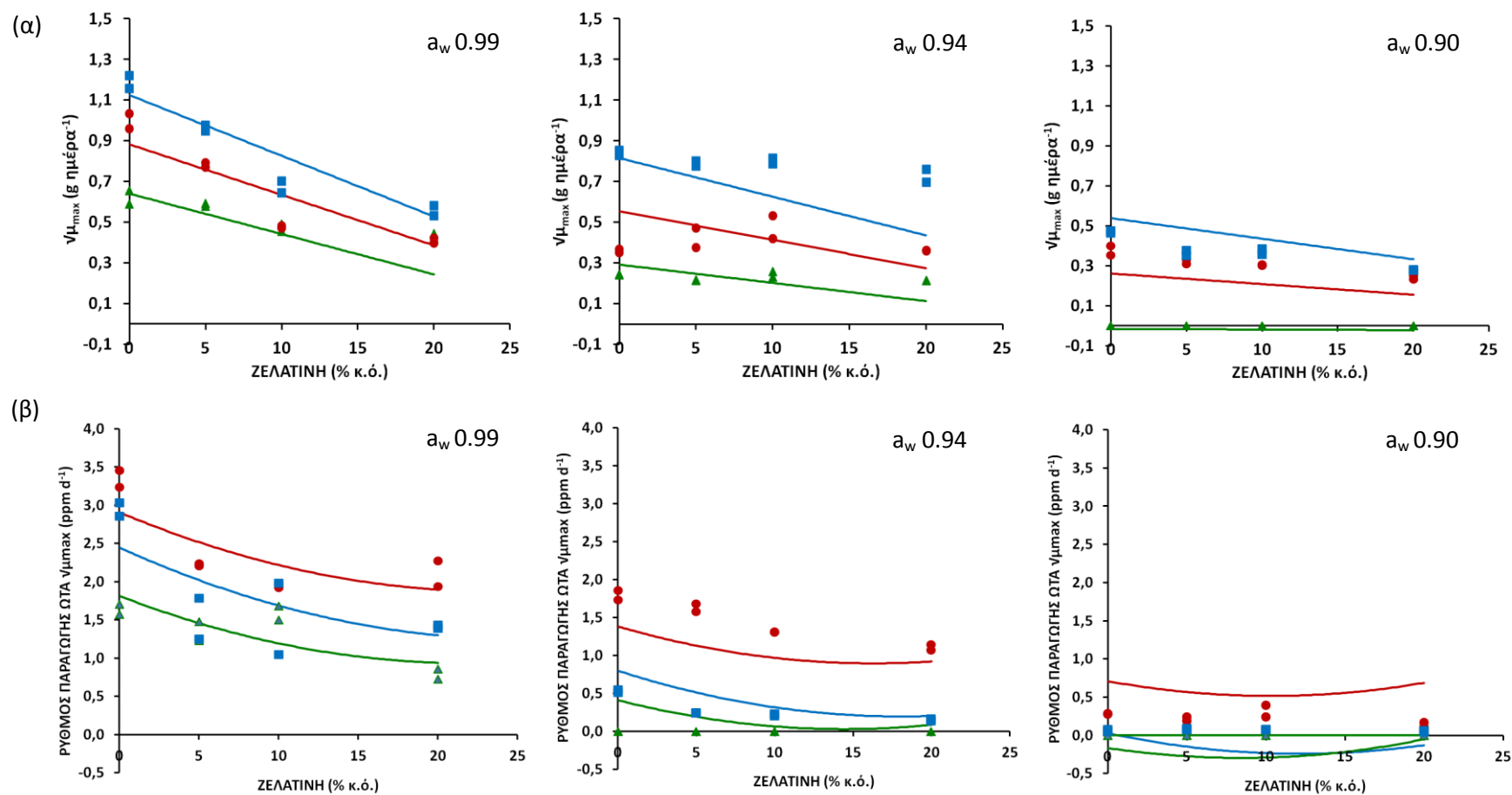
b.l.q.: κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης

Πίνακας 4.5. Παράμετροι (ρυθμός παραγωγής ΩΤΑ- $\mu_{\max \Omega\text{TA}}$, αθροιστική συγκέντρωση ΩΤΑ) που εκτιμήθηκαν μέσω της μοντελοποίησης της συγκέντρωσης ΩΤΑ του *A. carbonarius* με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου του Baranyi.

a_w	Θ (°C)	Ζελατίνη (% κ.ό.)	$\mu_{\max \Omega\text{TA}}$ (ppm ημέρα ⁻¹)	Αθροιστική συγκέντρωση ΩΤΑ (ppm)
0.99	15	0	2.685 ± 0.299	21.483 ± 1.126
		5	1.843 ± 0.468	16.681 ± 0.414
		10	2.457 ± 0.350	14.630 ± 0.192
		20	0.629 ± 0.146	7.618 ± 0.365
	20	0	11.212 ± 1.027	37.987 ± 0.284
		5	4.942 ± 0.073	26.483 ± 0.327
		10	3.798 ± 0.155	23.357 ± 1.375
		20	4.466 ± 0.992	19.021 ± 0.982
	25	0	8.677 ± 0.730	17.485 ± 0.474
		5	2.375 ± 1.132	5.725 ± 1.406
		10	1.793 ± 0.977	4.579 ± 0.215
		20	1.998 ± 0.094	3.446 ± 0.033
0.94	15	0	b.l.d.	b.l.d.
		5	b.l.d.	b.l.d.
		10	b.l.d.	b.l.d.
		20	b.l.d.	b.l.d.
	20	0	3.223 ± 0.316	23.010 ± 0.198
		5	2.669 ± 0.240	22.185 ± 0.290
		10	1.717 ± 0.010	18.080 ± 4.200
		20	1.231 ± 0.107	12.625 ± 0.785
	25	0	0.281 ± 0.027	2.898 ± 0.494
		5	0.058 ± 0.002	3.286 ± 2.306
		10	0.046 ± 0.009	0.588 ± 0.055
		20	0.023 ± 0.005	0.510 ± 0.080
0.90	15	0	b.l.d.	b.l.d.
		5	b.l.d.	b.l.d.
		10	b.l.d.	b.l.d.
		20	b.l.d.	b.l.d.
	20	0	0.079 ± 0.001	4.710 ± 0.166
		5	0.007 ± 0.000	2.305 ± 0.044
		10	0.350 ± 0.155	0.799 ± 0.031
		20	0.230 ± 0.116	0.775 ± 0.025
	25	0	b.l.q.	b.l.q.
		5	b.l.q.	b.l.q.
		10	b.l.q.	b.l.q.
		20	b.l.q.	b.l.q.

b.l.d.: below limit detection (κάτω από το όριο ανίχνευσης)

b.l.q.: below limit quantification (κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης)



Γράφημα 4.6. Γραφική απεικόνιση των προσαρμοσμένων καμπυλών των πολυωνυμικών μοντέλων της τετραγωνικής ρίζας: (α) του μέγιστου ειδικού ρυθμού της ανάπτυξης ($\nu_{\mu_{max}}$) και (β) του ρυθμού παραγωγής της ΩΤΑ ($\nu_{\mu_{max}\ \Omega TA}$) του *A. carbonarius* σε εργαστηριακά υποστρώματα διαφορετικής a_w (0.99, 0.94 και 0.90), μικροδομής (0, 5, 10 και 20% κ.ό. ζελατίνη) και σε θερμοκρασίες επώασης 15 (—, -▲-), 20 (—, -●-) και 25°C (—, -■-) σε σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή.

Πίνακας 4.6. Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τα δευτερογενή πολυωνυμικά μοντέλα της τετραγωνικής ρίζας του μέγιστου ειδικού ρυθμού της ανάπτυξης και της παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius*.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΑ $\sqrt{\mu_{\max}}$ (g ημέρα ⁻¹)		ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΩΤΑ $\sqrt{\mu_{\max \Omega TA}}$ (ppm ημέρα ⁻¹)	
	ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ± ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	<i>P-value</i>	ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ± ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	<i>P-value</i>
b	-15.801 ± 4.269	0.000	109.956 ± 38.072	0.005
T	0.126 ± 0.083	0.133	0.828 ± 0.284	0.004
Gel	0.21 ± 0.041	0.000	0.484 ± 0.141	0.001
a _w	24.011 ± 8.539	0.031	-272.346 ± 80.009	0.001
T*Gel	-0.001 ± 0.000	0.004	-0.001 ± 0.001	0.304
T*a _w	-0.078 ± 0.077	0.313	0.485 ± 0.264	0.071
Gel*a _w	-0.217 ± 0.043	0.000	-0.550 ± 0.145	0.000
T*T	0.000 ± 0.001	0.993	-0.031 ± 0.034	0.000
Gel*Gel	0.000 ± 0.000	0.179	0.002 ± 0.000	0.045
a _w *a _w	-8.223 ± 4.429	0.068	151.888 ± 42.195	0.000
R ²	0.899		0.887	
RMSE	0.098		0.337	

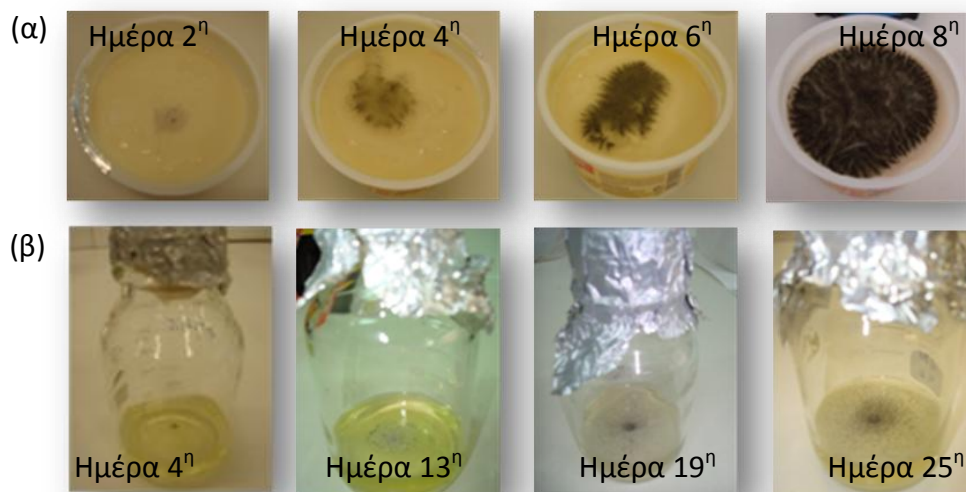
Οι τιμές-*p* (< 0.05) με έντονη γραφή χαρακτηρίζουν τις στατιστικώς σημαντικές παραμέτρους

R²: Συντελεστής παραλλακτικότητας (coefficient of variation).

RMSE: Root Mean Square Error.

4.3.2 Εκτίμηση της απόδοσης των αναπτυχθέντων μοντέλων

Τρόφιμα όπως κρέμα, ζελέ και μαρμελάδα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της απόδοσης των αναπτυχθέντων μοντέλων (Εικόνα 4.1). Την 0η ημέρα, τα τρόφιμα μελετήθηκαν για την παρουσία ΩΤΑ χωρίς να ανιχνευτεί τοξίνη. Τα ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ στη κρέμα, τον ζελέ και τη μαρμελάδα ήταν στο εύρος 96-104%, 82-87% και 83-93% αντίστοιχα (Πίνακας 4.3).

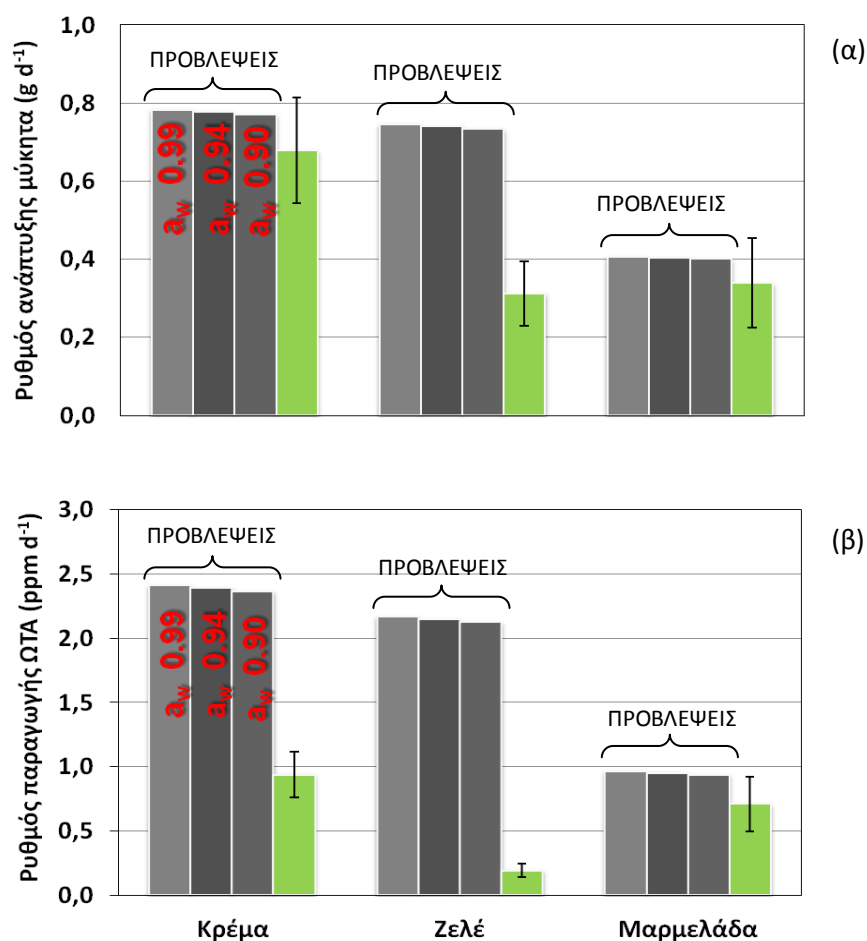


Εικόνα 4.1. Μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης του *A. carbonarius* σε (α) κρέμα και (β) ζελέ στους 20°C συναρτήσει του χρόνου συντήρησης.

Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση της γλυκερόλης στο ιξώδες των εργαστηριακών υποστρωμάτων (Γράφημα 4.2), οι παρατηρήσεις στα τρόφιμα συγκρίθηκαν με τις προβλέψεις των μοντέλων για τα επίπεδα ζελατίνης τα οποία υπολογίστηκαν από τις καμπύλες συσχέτισης του ιξώδους και του ποσοστού ζελατίνης (% κ.ό.) για όλες τις διαφορετικές τιμές a_w . Σύμφωνα με το γράφημα 4.7, οι προβλέψεις των μοντέλων για τους ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγής ΩΤΑ δεν διαφοροποιήθηκε με τη συγκέντρωση ζελατίνης ανάμεσα στις διαφορετικές τιμές a_w . Επίσης, το γράφημα 4.7 δείχνει ότι η γλυκερόλη δεν επηρεάζει το ιξώδες των προϊόντων που μελετήθηκαν. Γι' αυτόν το λόγο, οι τιμές ζελατίνης που υπολογίστηκαν από τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών (ιξώδες και % κ.ό. ζελατίνη) και οι προβλέψεις των μοντέλων ήταν παρόμοιες.

Όσον αφορά την απόδοση των αναπτυχθέντων μοντέλων, οι προβλέψεις για την ανάπτυξη του μύκητα ήταν πιο ακριβείς συγκριτικά με τις αντίστοιχες για τον ρυθμό παραγωγής της ΩΤΑ. Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις στη κρέμα και στη μαρμελάδα έδειξαν καλή συσχέτιση με τις προβλέψεις του μοντέλου για την ανάπτυξη του μύκητα. Αντίθετα οι προβλέψεις του μοντέλου για τον ρυθμό παραγωγής της ΩΤΑ ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές που

καταγράφηκαν σε όλα τα τρόφιμα εκτός από την μαρμελάδα. Επιπρόσθετα, οι προβλέψεις και των δύο μοντέλων στο ζελέ ήταν αξιοσημείωτα υψηλότερες από τις μετρήσεις (Γράφημα 4.7).



Γράφημα 4.7. Οι μετρήσεις (πράσινα ραβδογράμματα) και προβλέψεις (γκρι ραβδογράμματα) για τους $\sqrt{\mu_{max}}$ της (α) ανάπτυξης του *A. carbonarius* και της (β) παραγωγής ΩΤΑ σε κρέμα, ζελέ και μαρμελάδα κατά τη συντήρηση στους 20°C.

4.4 Συζήτηση

4.4.1 Πειράματα κινητικής

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός a_w , θερμοκρασίας και συγκέντρωσης της ζελατίνης επηρέασαν σημαντικά τους ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius*. Συγκεκριμένα, η ευνοϊκότερη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του εν λόγω μύκητα ήταν οι 25°C, ενώ ο μέγιστος ρυθμός αύξησης και οι μέγιστες τιμές της παραγόμενης ΩΤΑ παρατηρήθηκαν στους 20°C, σε όλες τις μελετηθείσες τιμές a_w (Marín et al. 2006, Mateo et al. 2009). Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις στην παρούσα μελέτη, άλλες έρευνες αναφέρουν τους 25°C ως τη θερμοκρασία που παρατηρείται η μέγιστη παραγωγή της ΩΤΑ (Mitchell et al. 2003). Τέτοιου είδους διαφορές

μπορούν να αποδοθούν σε διαφοροποιήσεις στις πειραματικές συνθήκες (π.χ. πηκτικός παράγοντας), το χρησιμοποιούμενο στέλεχος του μύκητα και το θρεπτικό υποστρώμα. Παρόλο που δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ στη θερμοκρασία 15°C και σε a_w 0.94, η ανάπτυξη του μύκητα ήταν μακροσκοπικά εμφανής, υποδεικνύοντας ότι οι συνθήκες που επιτρέπουν την ανάπτυξη του *A. carbonarius* είναι ευρύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες που ανιχνεύεται η τοξίνη (Tassou et al. 2009). Η μείωση της a_w επέφερε μείωση των ρυθμών ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ, σε όλες τις μελετώμενες συγκεντρώσεις ζελατίνης και θερμοκρασίες. Άλλες μελέτες επίσης προτείνουν ότι οι χαμηλές τιμές της a_w (της τάξης 0.94) είναι δυνατόν να περιορίσουν την ανάπτυξη και της παραγωγή της ΩΤΑ για μεγάλο αριθμό στελεχών του *A. carbonarius*, κυρίως όταν δρουν παράλληλα με άλλους οικολογικούς παράγοντες (Romero et al. 2007).

Η αύξηση της συγκέντρωσης ζελατίνης επέφερε μείωση των ρυθμών ανάπτυξης και παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* αλλά και της μέγιστης παραγόμενης τοξίνης σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις, υποδεικνύοντας ότι η μικροδομή του υποστρώματος επηρεάζει το συγκεκριμένο μύκητα. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης για τους ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγής ΩΤΑ του *A. carbonarius* σε ποσοστό ζελατίνης 10-20% κ.ό. συμφωνούν με έρευνες, οι οποίες μελέτησαν την κινητική παραγωγής της ΩΤΑ για παρόμοιες συνθήκες (a_w και pH) αλλά χρησιμοποιώντας διαφορετικό πηκτικό παράγοντα όπως άγαρ σε χαμηλότερο ποσοστό (1.5% κ.ό.), μιας και το άγαρ χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να παράγει εξίσου αποτελεσματικά συνεκτικές με τη ζελατίνη σε πολύ μικρότερες όμως συγκεντρώσεις (Marin et al. 2006). Επιπλέον, πρόσφατα οι Huang et al. (2009), οι οποίοι μελέτησαν τη συνδυαστική επίδραση της a_w (0.90 και 0.95) και της μικροδομής χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις άγαρ (1.5-7.5% κ.β.) και ενοφθαλμίζοντας επιφανειακά με *Aspergillus flavus* και *A. niger*, έδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ επέφερε μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης των μυκήτων επισημαίνοντας ότι η επίδραση της μικροδομής μπορεί να είναι ανεξάρτητη του είδους του πηκτικού παράγοντα. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των Atwi et al. (2007, 2008) και Theys et al. (2008) οι οποίοι μελέτησαν *in vitro* την επίδραση της μικροδομής στην ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιογόνων βακτηρίων όπως *Listeria innocua*, *Lactococcus lactis* και *Salmonella* Typhimurium, υποδεικνύοντας ότι η απουσία ζελατίνης αύξησε το ρυθμό ανάπτυξης. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω πληροφορίες, είναι προφανές ότι οι μικροοργανισμοί που καλλιεργούνται σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η μικροδομή επιδρά στους ρυθμούς ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ είναι δυνατόν να σχετίζεται με την επίδραση της μικροδομής στη κατανομή του νερού, στη διάχυση του O_2 , στη διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά ως αποτέλεσμα διάχυσης αυτών εντός του υποστρώματος ή στη διάχυση αντιμικροβιακών ουσιών, όπως οργανικά οξέα, και

την κινητικότητα των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, μελέτες αναφέρουν ότι οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε στερεά υποστρώματα ακινητοποιούνται και εξαναγκάζονται να αναπτυχθούν σε περιορισμένο χώρο με τη μορφή αποικιών (Wilson et al. 2002, Theys et al. 2008). Η ακινητοποίηση αυτή είναι δυνατόν να προκαλέσει τοπικές αλλαγές στο μικρο-περιβάλλον (π.χ. συσσώρευση τοξικών μεταβολικών προϊόντων, τοπική εξάντληση του οξυγόνου ή των θρεπτικών συστατικών), προκαλώντας επιπρόσθετη καταπόνηση με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Brocklehurst et al. 1997, Noriega et al. 2007). Λαμβάνοντας υπόψη την τελευταία ερμηνεία και το γεγονός ότι οι μύκητες είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί, η μείωση της διαθεσιμότητας σε οξυγόνο είναι από τους πιο πιθανούς παράγοντες για την αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα. Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι στην παρούσα μελέτη, η ανάπτυξη του μύκητα, όπως ήταν αναμενόμενο, έλαβε χώρα στην επιφάνεια των θρεπτικών υλικών και πιθανόν σε ένα μικρό βάθος κάτω από την επιφάνειά τους ανάλογα με τις ρεολογικές ιδιότητες του κάθε υποστρώματος, λόγω της εμπεριεχόμενης συγκέντρωσης ζελατίνης. Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο μπορεί να υποθεθεί ότι η ανάπτυξη επηρεάζεται από τη συνδυαστική και ταυτόχρονη δράση της διαθεσιμότητας σε οξυγόνο, της διάχυσης των θρεπτικών και της κινητικότητας των μυκηλιακών υφών υποβοηθούμενων από τη μικροδομή της επιφάνειας του εκάστοτε τροφίμου. Η επιλογή ενός τέτοιου οικοσυστήματος έγινε ώστε να προσομοιάζεται το ενδεχόμενο επιμόλυνσης των τροφίμων στην επιφάνειά τους. Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με την ευρεία μελέτη της ανάπτυξης των ακινητοποιημένων μικροοργανισμών σε υψηλού ιξώδους προϊόντα ή γαλακτώματα, το παρόν υπόστρωμα-μοντέλο για τη μικροβιακή ανάπτυξη είναι μοναδικό, γενικό (generic) σύστημα, το οποίο απαιτεί εκτεταμένη έρευνα ώστε να ταυτοποιηθούν οι κρίσιμες ρεολογικές παράμετροι, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη μικροδομή διαφορετικών τροφίμων και οι οποίες δύναται να συμπεριληφθούν ως ανεξάρτητες μεταβλητές σε μοντέλα πρόρρησης της μικροβιακής αύξησης. Γι' αυτόν το λόγο, είναι απαραίτητη περαιτέρω μελέτη στο πεδίο της μικροδομής, ώστε να αποσαφηνιστούν επαρκώς οι μηχανισμοί που επηρεάζουν την ανάπτυξη μυκήτων σε τρόφιμα με διαφορετικές ρεολογικές ιδιότητες.

4.4.2 Ανάπτυξη μοντέλων πρόρρησης

Η συνδυαστική επίδραση της συγκέντρωσης ζελατίνης, της a_w και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* μοντελοποιήθηκε με τη χρήση μίας δευτέρου βαθμού πολυωνυμικής συνάρτησης, η οποία αποτελεί μία κλασική προσέγγιση (Gibson et al. 1994, Valik et al. 1999, Valik and Pieckova 2001). Και τα δύο αναπτυχθέντα μοντέλα, για την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της ΩΤΑ, αντίστοιχα, έδειξαν ότι η επίδραση της μικροδομής ήταν λιγότερο σημαντική όσο η διαθεσιμότητα σε νερό μειωνόταν και η θερμοκρασία

πλησίαζε κοντά στις βέλτιστες τιμές (Γραφήματα 4.6α, β). Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύεται και από το γεγονός ότι ο όρος GeI^2 δεν ήταν στατιστικώς σημαντικός (σύμφωνα με το μοντέλο για την ανάπτυξη του μύκητα), υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει παραβολική συσχέτιση μεταξύ % κ.ό. ζελατίνης και ρυθμού ανάπτυξης. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με προηγούμενες έρευνες κρίνεται δύσκολη λόγω του περιορισμένου αριθμού ερευνών που έχουν ασχοληθεί με την εφαρμογή μοντέλων πρόρρησης στην επίδραση της μικροδομής στους μύκητες. Παρόλα αυτά, η συνδυαστική επίδραση της μικροδομής και των άλλων παραμέτρων της παρούσας μελέτης είναι συγκρίσιμη με αυτή που προέβλεψαν παρόμοια μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για την επίδραση της μικροδομής σε βακτήρια. Σύμφωνα με τις καμπύλες του δευτερογενούς μοντέλου των Theys et al. (2008), η επίδραση της ζελατίνης επέδρασε ανασταλτικά στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Typhimurium* και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση της ανασταλτικής δράσης αυξανόμενου του ποσοστού της ζελατίνης από 0%, 1% και 5% κ.ό.. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι τα αναπτυχθέντα μοντέλα έδειξαν ότι σε ήπιες συνθήκες a_w και θερμοκρασίας παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των v_{\max} και $v_{\max \Omega TA}$ κατά την προσθήκη διαφορετικών ποσοστών ζελατίνης (Brocklehurst et al. 1997, Wilson et al. 2002).

4.4.3 Εκτίμηση της απόδοσης των αναπτυχθέντων μοντέλων πρόρρησης

Η εκτίμηση των μοντέλων που αναπτύχθηκαν στο παρόν κεφάλαιο έγινε σε σύγκριση με παρατηρήσεις που ελήφθησαν κατά την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της ΩΤΑ σε τρία τρόφιμα διαφορετικής μικροδομής, στοχεύοντας στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της γενικευμένης αυτής, προρρητικής, *in vitro* προσέγγισης κατά την εφαρμογή της *in situ* (Jagannath and Tsuchido, 2003). Παρόλο που στο Γράφημα 4.2 φαίνεται ότι η προσθήκη γλυκερόλης αυξάνει το ιξώδες, η σύγκριση μεταξύ παρατηρήσεων και προβλέψεων του μοντέλου έδειξε ότι οι προβλέψεις δεν επηρεάστηκαν στατιστικώς σημαντικά από τη χρήση των διαφορετικών εξισώσεων, οι οποίες περιγράφουν τη συσχέτιση του ιξώδους και του % κ.ό. ζελατίνης για τις μελετώμενες τιμές a_w . Σύμφωνα με τις καμπύλες συσχέτισης % κ.ό. ζελατίνης και ιξώδους (Γράφημα 4.2), αυτό συνέβη μιας και οι τιμές του ιξώδους των τριών τροφίμων (Πίνακας 4.2) δε διέφεραν σημαντικά ως προς την a_w και πρακτικά στα ιξώδη αυτά (χαμηλές τιμές) η a_w δεν επηρέαζε τη σχέση ζελατίνης-ιξώδους. Συνεπώς η προσθήκη της γλυκερόλης δεν επηρέασε την εκτίμηση και των δύο μοντέλων.

Δεδομένης της πολυπλοκότητας των μελετηθέντων τροφίμων και της πιθανής ποικιλομορφίας στις ιδιότητες της μικροδομής, μοντέλα σαν τα αναπτυχθέντα στο παρόν κεφάλαιο είναι δυνατόν να εφαρμοστούν σε μία ευρεία ποικιλία προϊόντων με διαφορετικές ρεολογικές ιδιότητες και να συσχετιστούν με την παραγωγή της ΩΤΑ από μύκητες. Οι προβλέψεις του v_{\max} συμφώνησαν με τα πειραματικά δεδομένα στη κρέμα και στη μαρμελάδα, ενώ οι προβλέψεις για τον $v_{\max \Omega TA}$ έδειξαν

χαμηλή ακρίβεια συγκριτικά με τις παρατηρήσεις σε όλα τα μελετώμενα τρόφιμα, εκτός από τη μαρμελάδα. Επιπλέον, οι προβλέψεις για το ζελέ και από τα δύο μοντέλα έδειξαν χαμηλή συσχέτιση συγκριτικά με τις μετρήσεις. Σύμφωνα με την ετικέτα του προϊόντος, η σκόνη ζελέ περιείχε συστατικά χαμηλής διατροφικής αξίας, υποδεικνύοντας μια πιθανή ερμηνεία για τις χαμηλές τιμές των πειραματικών δεδομένων σε σχέση με τις προβλέψεις. Εναλλακτική ερμηνεία για τις παρατηρηθείσες διαφορές μπορεί να είναι οι διαφοροποιήσεις στους ενδογενείς παράγοντες (π.χ. πορώδες και ιξώδες) και στα θρεπτικά συστατικά μεταξύ εργαστηριακών υποστρωμάτων και τροφίμων. Επιπλέον, παρόλο που η κρέμα είχε υψηλότερο ιξώδες από το ζελέ και τη μαρμελάδα στους 20°C, έδειξε υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης του μύκητα και παραγωγής της ΩΤΑ συγκριτικά με το ζελέ και τη μαρμελάδα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η κρέμα είναι ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό. Σύμφωνα με μελέτες λοιπόν, η μικροβιακή ανάπτυξη σε γαλακτώματα περιεκτικότητας σε έλαιο λιγότερο από 80% κ.ό. θεωρείται τυπικά πλαγκτονική (Brocklehurst et al. 1995, Parker et al. 1995), γεγονός που εξηγεί τόσο τους υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και παραγωγής όσο και τις υψηλές συγκεντρώσεις ΩΤΑ. Σε γενικές γραμμές, οι προβλέψεις του μοντέλου για τον v_{\max} έδειξαν καλή συσχέτιση με τα πειραματικά δεδομένα για τα δύο από τα τρία τρόφιμα που μελετήθηκαν, υποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την ασφάλεια των τροφίμων, μιας και ο έλεγχος της ανάπτυξης του μύκητα αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο πρόληψης της παραγωγής της ΩΤΑ. Αντίθετα, οι προβλέψεις του μοντέλου για τον $v_{\max \text{ ΩΤΑ}}$ ήταν κοντά στα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα στην περίπτωση της μαρμελάδας. Η προρρητική ικανότητα του μοντέλου που σχετίζεται με το ρυθμό παραγωγής της ΩΤΑ ήταν μικρότερη συγκριτικά με το μοντέλο του ρυθμού της ανάπτυξης υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη παράμετρος ίσως είναι δυσκολότερο να μοντελοποιηθεί. Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός των πληροφοριών που παρέχονται από τα δύο αναπτυχθέντα μοντέλα δύναται να βοηθήσει στην ελαχιστοποίηση των παραγόμενων ποσοτήτων της ΩΤΑ στα τρόφιμα. Επιπλέον, κρίνοντας από τις υψηλές συγκεντρώσεις της παραγόμενης ΩΤΑ (>> το μέγιστο όριο της νομοθεσίας) τόσο στα εργαστηριακά υποστρώματα όσο και στα τρόφιμα, η μοντελοποίηση της μέγιστης παραγωγής της ΩΤΑ είναι πιθανόν επουσιώδους σημασίας για την ασφάλεια των τροφίμων. Αντίθετα, η μοντελοποίηση του ρυθμού της παραγωγής της ΩΤΑ μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο του κινδύνου, ανεξάρτητα από την παραλλακτικότητα των συγκεντρώσεων της ΩΤΑ σε διαφορετικά τρόφιμα και τη σχετική νομοθεσία για τα μέγιστα ανεκτά επίπεδα της ΩΤΑ στα τρόφιμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Μελέτη της παραλλακτικότητας στην εκβλάστηση, την ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ μεμονωμένων σπόριων των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* συναρτήσει του pH, της a_w και της θερμοκρασίας

5.1 Εισαγωγή

Οι περισσότερες έρευνες που μελετούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, αλλοιογόνων ή παθογόνων, χρησιμοποιούν κυρίως υψηλούς πληθυσμούς ($\geq 10^3$ σπόρια/g ή cfu/g) ως μία στρατηγική αξιολόγησης του χειρότερου δυνατού σεναρίου (worst case scenario). Ωστόσο, η επιμόλυνση των τροφίμων σε χαμηλά επίπεδα (π.χ. 1-10 σπόρια/g ή cfu/g) αποτελεί μάλλον ένα ρεαλιστικότερο σενάριο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα η ασφάλεια ενός τροφίμου να έχει στοχαστικό (stochastic) αντί σημειακό (deterministic) χαρακτήρα. Αυτό συμβαίνει διότι τα μεμονωμένα κύτταρα ή σπόρια έχουν σημαντική παραλλακτικότητα τόσο στην πιθανότητα και την κινητική αύξησης/εκβλάστησής τους όσο και στη δυναμική παραγωγής τοξικών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων και των μυκοτοξινών. Μεμονωμένα κύτταρα βακτηρίων π.χ. *Listeria monocytogenes* έχουν μελετηθεί ως προς τη διακύμανση του χρόνου διπλασιασμού (generation time) και της φάσης προσαρμογής σε διαφορετικές συνθήκες (Francois et al. 2003, 2005, 2006). Ωστόσο, ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία, όσον αφορά στην παραλλακτικότητα τόσο στην εκβλάστηση όσο και την ανάπτυξη μεμονωμένων σπορίων μυκήτων και ιδιαίτερα στην παραγωγή μυκοτοξινών όπως της ΩΤΑ (Samarundo et al. 2007, Baert et al. 2008, Gougouli et al. 2011).

Η ανάπτυξη των μυκήτων περιλαμβάνει δύο φάσεις: την εκβλάστηση των σπορίων και την επιμήκυνση των υφών ώστε να σχηματιστεί η νηματώδης αποικία (Sautour et al. 2001). Κατά τη διαδικασία της εκβλάστησης, τα σπόρια μεταβαίνουν από τη λανθάνουσα φάση σε χαμηλή και στη συνέχεια σε υψηλή μεταβολική δραστηριότητα, εφόσον βρεθούν είτε σε ευνοϊκές συνθήκες είτε σε συνθήκες καταπόνησης (Paul et al. 1993). Μέχρι σήμερα η έρευνα έχει κυρίως εστιαστεί στην ανεύρεση μεθόδων αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης, ενώ περιορισμένες είναι οι πληροφορίες σχετικά με την εκβλάστηση των σπορίων και την επίδραση που μπορεί να έχει στην ανάπτυξη του εκάστοτε μύκητα (Dantigny et al. 2005b, Judet et al. 2008). Παρόλα αυτά, υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ των δύο φάσεων, μιας και επικρατεί η άποψη ότι η διακύμανση του

χρόνου εμφάνισης και του ρυθμού αύξησης του βλαστικού σωλήνα (germ tube) του εκάστοτε σπορίου απεικονίζεται στο χρόνο μέχρι η υφή του μύκητα να γίνει μακροσκοπικά εμφανής αλλά και μετέπειτα στην αύξηση της διαμέτρου της αποικίας.

Η ποσοτική μικροβιολογία εφαρμόζει μαθηματικά μοντέλα, τα οποία προβλέπουν τη μικροβιακή συμπεριφορά και επιτρέπουν την εκτίμηση κινδύνων σχετιζόμενων με τη μικροβιολογία τροφίμων (Nauta, 2002). Υπάρχουν δύο τύποι μοντέλων: α) τα κινητικά σημειακά μοντέλα (deterministic models) και τα στοχαστικά μοντέλα (stochastic models) που περιγράφουν τη μικροβιακή απόκριση με κατανομές πιθανοτήτων. Παρόλη την ευρεία εφαρμογή των κινητικών μοντέλων, τα οποία παρέχουν σημειακές εκτιμήσεις π.χ. των μικροβιακών πληθυσμών, του βάρους της βιομάζας των μυκήτων, στη διαχείριση της ασφάλειας των τροφίμων, η εφαρμογή τους χρίζει βελτιστοποίησης ή/ και επικαιροποίησης ως προς τη συμπεριφορά μεμονωμένων κυττάρων/σπορίων (individual-based modeling), λόγω του υψηλού επιπέδου παραλλακτικότητας που χαρακτηρίζει τις παραμέτρους που προσδιορίζουν στη μικροβιακή δυναμική μεμονωμένων κυττάρων (Nicolai and Van Impe 1996, Poschet et al. 2003). Αντίθετα, τα στοχαστικά μοντέλα λαμβάνουν υπόψη αυτήν την παραλλακτικότητα με τη χρήση κατανομών τόσο για τις ανεξάρτητες όσο και τις εξαρτημένες μεταβλητές, παρέχοντας επίσης τις προβλέψεις με τη μορφή κατανομών αντί για σημειακές εκτιμήσεις (Poschet et al. 2003, Koutsoumanis et al. 2010). Με αυτόν τον τρόπο γεφυρώνεται η αβεβαιότητα και η παραλλακτικότητα μεμονωμένων κυττάρων/σπορίων σε μικρο-περιβάλλον με τη βεβαιότητα και φαινομενική σταθερότητα μεγάλων μικροβιακών πληθυσμών σε μακρο-περιβάλλον (quantal microbiology; Bridson and Gould 2000)

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι στόχοι του παρόντος κεφαλαίου ήταν: (α) η εκτίμηση της κινητικής εκβλάστησης και ανάπτυξης μεμονωμένων σπορίων και παραγωγής της ΩΤΑ αποικιών προερχόμενων από μεμονωμένα σπόρια των μυκήτων *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε διαφορετικές συνθήκες pH, a_w και θερμοκρασίας, (β) η μοντελοποίηση του TTVG και του χρόνου κατά τον οποίο η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη με τη χρήση της προσομοίωσης Monte Carlo και (γ) η εκτίμηση της απόδοσης των μοντέλου του TTVG σε εργαστηριακό υπόστρωμα υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (pH, a_w και θερμοκρασία) και αρχικό ενοφθάλμισμα εύρους $1-10^5$ σπόρια.

5.2 Υλικά και μέθοδοι

5.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στο παρόν κεφάλαιο, σχεδιάστηκε ένα πολυπαραγοντικό πείραμα στοχεύοντας καταρχήν στην εκτίμηση της κινητικής του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων, της ανάπτυξης μεμονωμένων σπορίων και της παραγωγής ΩΤΑ από αποικίες προερχόμενες από μεμονωμένα σπόρια των

μυκήτων *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε διαφορετικές συνθήκες pH (3.5 και 5.5), a_w (0.99 και 0.94) και θερμοκρασίας (10, 15, 20, 25 και 30°C). Ως δευτερεύων στόχος τέθηκε, η μοντελοποίηση του *TTVG* (ημέρες) και του χρόνου κατά τον οποίο η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη ($t_{det\ ΩΤΑ}$) (ημέρες) ξεκινώντας από μεμονωμένα ή από πληθυσμό 1-100 σπορίων με τη χρήση της προσομοίωσης Monte Carlo και η εκτίμηση των αναπτυχθέντων μοντέλων.

Η ανάπτυξη των τριών ειδών μυκήτων παρατηρήθηκε βάσει της μεταβολής της διαμέτρου του μύκητα κατά τη διάρκεια της συντήρησης (τουλάχιστον 100 ανεξάρτητα σπόρια/ πειραματική συνθήκη) (n=80-100). Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της τοξίνης προσδιορίστηκε σε 6-8 ανεξάρτητα δείγματα (μυκήλια προερχόμενα από μεμονωμένα σπόρια) ανά δειγματοληψία (n= 6-8).

5.2.2 Επιλογή και ανακαλλιέργεια των μυκήτων

Οι μύκητες που επιλέχθηκαν για το παρόν κεφάλαιο ήταν οι *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* (βλ. Κεφ. 2, § 2.1.1). Η αναζωογόνηση των μυκήτων και η συλλογή των σπορίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην § 2.2.1.

5.2.3 Παρασκευή υποστρωμάτων

Η παρασκευή των διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων ΜΕΑ έγινε σύμφωνα με την § 2.3α.

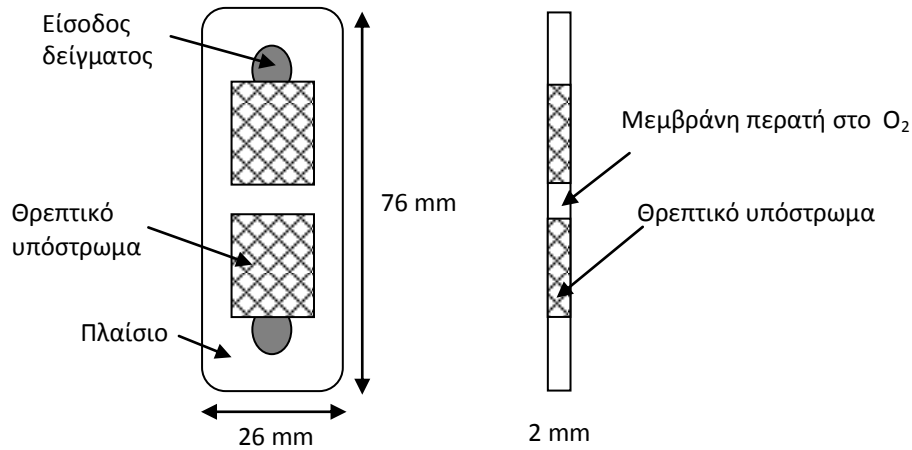
5.2.4 Συλλογή μικροσκοπικών δεδομένων των μεμονωμένων σπορίων

5.2.4.1 Προετοιμασία στερεής μήτρας

Οι συσκευές αυτές (gel cassettes) αποτελούνται από ένα πλαίσιο (κασέτα) πολυμερισμένου οξικού οξέος πάχους 2 mm εξωτερικών διαστάσεων 76 x 26 mm, και δύο αντιδιαμετρικές τετράγωνες διατομές διαστάσεων 15 x 15 mm η καθεμία. Κάθε συσκευή τυλίχθηκε με ελαστικό φύλλο πολυβινυλοχλωριδίου (polyvinyl chloride-PVC) πάχους 15 μm, το οποίο θερμοκολλήθηκε και αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση η μεμβράνη PVC εκτάθηκε εκατέρωθεν του πλαστικού πλαισίου και εφάρμοσε απόλυτα στην πλαστική επιφάνεια (Σχήμα 5.1) (Brocklehurst et al. 1995).

Όγκος 0.6 mL από ΜΕΑ με pH 3.5 ή 5.5 και a_w 0.99 ή 0.94 προστέθηκε ασηπτικά στις συσκευές μέσα από ειδικές οπές που έγιναν στη μεμβράνη. Οι συσκευές παρέμειναν για μικρό χρονικό διάστημα ώστε να στερεοποιηθεί το θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, οι μύκητες ενοφθαλμίστηκαν εγχέοντας ασηπτικά 10 μL αιωρήματος σπορίων μέσα από τις ίδιες οπές. Η αρχική συγκέντρωση για κάθε μύκητα ήταν 10^3 - 10^4 σπόρια/mL. Οι ενοφθαλμισμένες συσκευές παρέμειναν για 5-10 λεπτά σε ειδικά πλαίσια ανοξείδωτου χάλυβα ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη εξάπλωση του

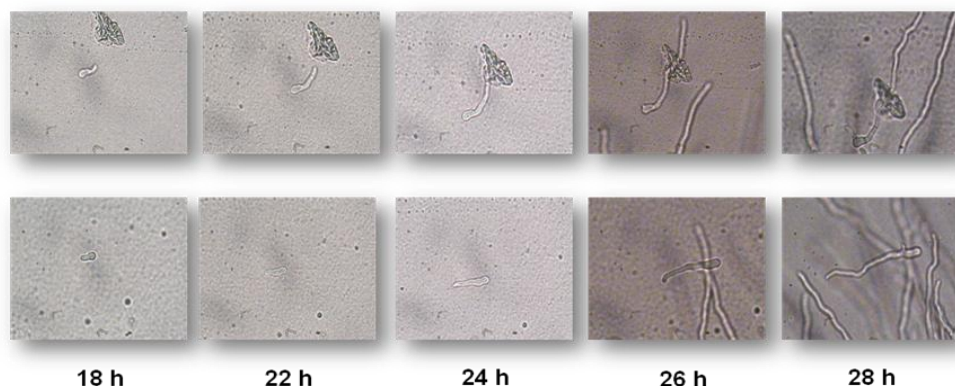
ενοφθαλμίσματος. Ακολούθησε επώαση στους 15, 20, 25, 30°C για τα δύο είδη *Aspergillus* sp. ενώ στους 10, 15, 20, 25°C για τον *P. verrucosum*. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και διπλές συσκευές χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πειραματική συνθήκη.



Σχήμα 5.1. Σχηματική απεικόνιση της στερεής μήτρας.

5.2.4.2 Μικροσκοπική παρατήρηση των συσκευών «gel cassettes»

Σε τακτά χρονικά διαστήματα οι συσκευές απομακρύνονταν από τους κλιβάνους επώασης και ακολουθούσε μικροσκοπική παρατήρηση. Επιλέγονταν για παρατήρηση οπτικά πεδία που περιείχαν 5-20 ακινητοποιημένα μεμονωμένα σπόρια. Σε κάθε συσκευή μελετήθηκαν 10 οπτικά πεδία. Τα ίδια οπτικά πεδία παρατηρούνταν καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης. Συνολικά εξετάστηκαν περισσότερα από 200 μεμονωμένα σπόρια ανά συσκευή για κάθε πειραματική συνθήκη. Θεωρήθηκε ότι τα σπόρια είχαν εκβλαστήσει όταν το μήκος του βλαστικού σωλήνα ήταν ίσο ή μεγαλύτερο από τη μέγιστη διάσταση του εκάστοτε διογκωμένου σπορίου (Dantigny et al. 2006). Ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης (pH, a_w και θερμοκρασία), ελήφθησαν ψηφιακές φωτογραφίες χρησιμοποιώντας τον 40x αντικειμενικό φακό εστίασης του μικροσκοπίου καταγράφοντας την ποσοστιαία αύξηση των εκβλαστηθέντων ανεξάρτητων σπορίων σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνα 5.1). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με ψηφιακή κάμερα υψηλής ευκρίνειας SSC-DC50AP (Sony Corp., Tokyo, Japan). Το ποσοστό των εκβλαστηθέντων σπορίων υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση: $P(\%) = (N_{\text{εκβλαστηθέντων σπορίων}} / N_{\text{συνολικών σπορίων}}) * 100$ (Dantigny et al. 2006).

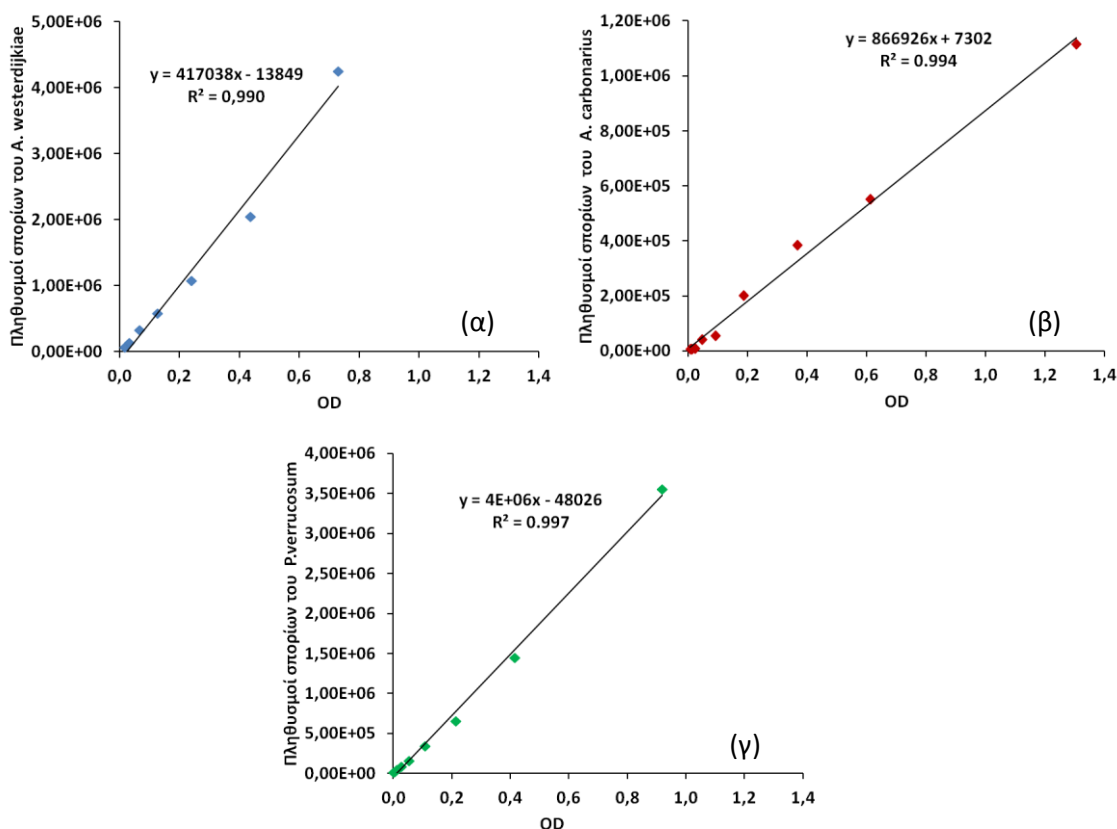


Εικόνα 5.1. Φωτογραφίες της αύξησης του μήκους του βλαστικού σωλήνα σπορίων του *A. westerdijkiae* σε MEA με pH 5.5 και a_w 0.99 και σε θερμοκρασία 30°C συναρτήσει του χρόνου επώασης.

5.2.5 Συλλογή μακροσκοπικών δεδομένων των μεμονωμένων σπορίων

5.2.5.1 Πρότυπες καμπύλες

Μετά από διπλή ανακαλλιέργεια των μυκήτων και την πρόσληψη των αιωρημάτων των σπορίων σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην § 2.2.1 πραγματοποιήθηκαν δυαδικές αραιώσεις σε MEB σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (microtitre plate). Σε κάθε βοθρίο από την πρώτη στήλη της πλάκας, προστέθηκε όγκος ενοφθαλμίσματος 200 μ L σε 200 μ L διαλύματος MEB. Από κάθε ένα βοθρίο αυτής της στήλης, 200 μ L παρελήφθησαν με πολυκάναλη πιπέτα (multichannel pipette) για να προετοιμαστεί η επόμενη αραιώση. Η διαδικασία αυτή έγινε συνολικά για τις 11 στήλες της εκάστοτε πλάκας. Η συγκέντρωση των σπορίων σε κάθε δυαδική αραιώση προσδιορίστηκε εφαρμόζοντας διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MEB και εξαπλώνοντας 0.1 μ L σε MEA (48 ώρες στους 25°C). Πριν τις μικροβιολογικές αναλύσεις, προσδιορίστηκε η οπτική πυκνότητα (OD) στα 600 nm με τη χρήση Bioscreen microplate reader 2.1.1 (Bioscreen C, Finland). Οι μετρήσεις διορθώθηκαν με τη χρήση τυφλού, το οποίο περιείχε μόνο MEB (12^η στήλη της πλάκας μικροτιτλοδότησης). Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε μύκητα τρεις ανεξάρτητες φορές.



Γράφημα 5.1. Οι πρότυπες καμπύλες μεταξύ OD και πληθυσμού спорίων των (α) *A. westerdijkiae*, (β) *A. carbonarius* και (γ) *P. verrucosum*.

5.2.5.2 Απομόνωση των μεμονωμένων спорίων- Ενοφθαλμισμός

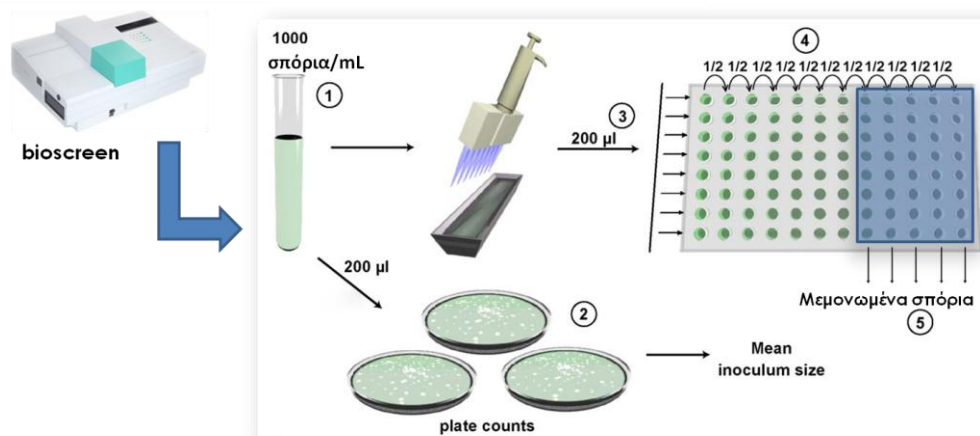
Μεμονωμένα σπόρια και των τριών ειδών μυκήτων ελήφθησαν με τη μέθοδο των δυαδικών αραιώσεων σε πλάκες μικροτιτλοδότησης, με βάση πρότυπες καμπύλες, οι οποίες συσχετίζουν την OD με τον πληθυσμό των спорίων (§ 5.2.5.1) (Francois et al. 2003).

Μετά από διπλή ανακαλλιέργεια των μυκήτων και την παραλαβή των αιωρημάτων των спорίων σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.2.1, η συγκέντρωση των спорίων καθορίστηκε 10^6 σπόρια/mL με τη χρήση της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης για κάθε μύκητα (Γράφημα 5.1). Η παραπάνω συγκέντρωση αραιώθηκε περαιτέρω με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις μέχρι 10^3 σπόρια/mL. Από την τελευταία συγκέντρωση, 200 μL προστέθηκαν στην πρώτη στήλη της πλάκας, στην οποία σε κάθε βοθρίο είχε προστεθεί όγκος 200 μL διαλύματος ΜΕΒ. Από κάθε ένα βοθρίο της πρώτης στήλης, 200 μL παρελήφθησαν με πολυκάναλη πιπέτα για να προετοιμαστεί η επόμενη αραιώση. Η διαδικασία αυτή έγινε συνολικά και για τις 12 στήλες της εκάστοτε πλάκας. Η συγκέντρωση των спорίων σε κάθε βοθρίο καταμετρήθηκε με την εξάπλωση όλου του περιεχόμενου όγκου (200 μL) σε τρυβλία ΜΕΑ. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 48 ώρες. Τα παραπάνω επαναλήφθηκαν αρκετές φορές για να εξεταστεί η

επαναληψιμότητα της μεθόδου. Σύμφωνα με τον παρόν πρωτόκολλο, στις τελευταίες πέντε στήλες της πλάκας η πιθανότητα απομόνωσης μεμονωμένου sporίου ήταν 80% (Francois et al. 2003). Το πρωτόκολλο περιγράφεται σχηματικά στο Σχήμα 5.2.

10^6 σπόρια/mL

Καμπύλη βαθμονόμησης: OD (400nm)-Σπόρια



Σχήμα 5.2. Πειραματική απεικόνιση της απομόνωσης μεμονωμένων sporίων (Standaert et al. 2005).

Όσον αφορά το κυρίως πείραμα, ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε εξάπλωση του περιεχομένου των κελιών της 8^{ης} στήλης, τα οποία σύμφωνα με το πρωτόκολλο είχαν τη μεγαλύτερη πιθανότητα (>90%, σύμφωνα με κατανομή Poisson) να περιέχουν από 1-3 σπόρια και τη μικρότερη για μηδενικό πληθυσμό sporίων, σε τρυβλία MEA με pH 3.5 ή 5.5 και a_w 0.99 ή 0.94. Ακολούθησε επώαση στους 15, 20, 25, 30°C για τα δύο είδη *Aspergillus* sp. ενώ στους 10, 15, 20, 25°C για τον *P. verrucosum*.

5.2.6 Μετρήσεις

α. Ανάπτυξη του μύκητα

Η ανάπτυξη παρατηρήθηκε βάσει της μεταβολής της ακτινωτής διαμέτρου των αποικιών που σχηματίστηκαν από μεμονωμένα σπόρια και των τριών ειδών μυκήτων κατά τη διάρκεια της επώασης (συνολικά εξετασθέντα 80-100 σπόρια/ πειραματική συνθήκη) (βλ. Κεφ. 2, § 2.4.1β).

β. Ανίχνευση- ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ με HPLC- FLD

Η εκχύλιση της ΩΤΑ, ο καθαρισμός και η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.5.2.2. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της τοξίνης

προσδιορίστηκε σε 6-8 μυκήλια/ δειγματοληψία. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για το θρεπτικό υπόστρωμα MEA στο εύρος 0-250 ppb.

5.2.7 Ανάλυση δεδομένων

Τα πειραματικά δεδομένα από τη μεταβολή της διαμέτρου επεξεργάστηκαν με τη χρήση του μοντέλου του Baranyi (Baranyi et al. 1993, Baranyi and Roberts 1994) με το πρόγραμμα DMFit προσδιορίζοντας τις παραμέτρους κινητικής της ανάπτυξης των μεμονωμένων σπορίων. Συγκεκριμένα, για κάθε μεμονωμένο σπόριο προσδιορίστηκε, σε κάθε πειραματική συνθήκη, ο χρόνος εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (time to visible growth, *TTVG*, ημέρες) και ρυθμός ανάπτυξης της διαμέτρου της αποικίας (radial growth rate, *RGR*, cm/ημέρα). Επιπλέον, προσδιορίστηκε η διάμετρος κατά την οποία η ΩΤΑ καθίσταται για πρώτη φορά ανιχνεύσιμη ($d_{det\ OTA}$). Οι προαναφερθείσες παράμετροι για όλες τις συνθήκες παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.1 και 5.2.

Οι κατανομές Gamma, Normal, Logistic και Weibull προσαρμόστηκαν στις παραμέτρους της ανάπτυξης (*TTVG* και *RGR*) των τριών ειδών μυκήτων με τη χρήση του λογισμικού @Risk 4.5 (Palisade Corporation, Newfield, New York, USA). Οι προαναφερθείσες κατανομές επιλέχθηκαν μιας και έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε άλλες μελέτες, κυρίως όμως σε βακτήρια. Οι κατανομές Gamma και Logistic είναι παρόμοιες με την κατανομή Normal με τη διαφορά ότι είναι πιο οξείες. Πραγματοποιήθηκε κατάταξη των κατανομών ανάλογα με την προσαρμοστικότητα τους στα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιώντας τα στατιστικά τεστ, Chi-squared (χ^2) και Anderson-Darling (*A-D*). Το τεστ χ^2 είναι ένα γενικό στατιστικό τεστ για την προσαρμοστικότητα, ενώ το *A-D* δίνει κυρίως έμφαση στα όρια («άκρα» ή «ουρές»; tails) της κατανομής. Η τιμή *p*, η οποία παρέχεται από το τεστ είναι ένας δείκτης ο οποίος όσο αυξάνει (>0.05) δείχνει ότι τα πρωτογενή δεδομένα δεν παρεκκλίνουν ουσιαστικά από τις προσαρμοσμένες κατανομές (Munoz et al. 2010).

5.2.8 Μοντέλο Monte Carlo

Η προσομοίωση Monte Carlo (10000 δοκιμές) χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση του *TTVG* και του χρόνου στον οποίο η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη (time-to-ochratoxin detection, $t_{det\ OTA}$), λαμβάνοντας υπόψη έναν σημαντικό αριθμό μεμονωμένων σπορίων (1-100 σπόρια), και κάνοντας την παραδοχή ότι τα σπόρια συμπεριφέρονται ανεξάρτητα.

Ο χρόνος έως ότου η ΩΤΑ να γίνει ανιχνεύσιμη προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση (Métris et al. 2003):

$$t_{det\ OTA} = TTVG + \frac{d_{det\ OTA} - d_0}{RGR} \quad (5.1)$$

όπου, $TTVG$ και RGR είναι οι κατανομές, στις οποίες τα δεδομένα από τα πειράματα με τα μεμονωμένα σπόρια προσαρμόστηκαν καλύτερα, d_0 (cm) είναι η αρχική διάμετρος η οποία είναι η ελάχιστη διάμετρος κατά την οποία έγινε ανιχνεύσιμη η μυκηλιακή υφή (σταθερή τιμή) και $d_{det\ OTA}$ (cm) είναι η διάμετρος κατά την οποία η ΩΤΑ ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η κατανομή της τελευταίας παραμέτρου υποτέθηκε ότι είναι ομοιόμορφη, μιας και στις περισσότερες περιπτώσεις το εύρος των διαμέτρων ήταν εντός των ορίων του σφάλματος (Πίνακα 5.1). Όσον αφορά την παράμετρο RGR , οι κατανομές της σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Γραφήματα 5.5, 5.7, 5.9) δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τις διαφορετικές συνθήκες που μελετήθηκαν. Συνεπώς, έγινε η παραδοχή ότι ο όρος $t_{det\ OTA}$ επηρεάζεται κυρίως από τον $TTVG$. Στην περίπτωση περισσότερων του ενός σπορίου και λαμβάνοντας υπόψη ότι τα διαφορετικά σπόρια συμπεριφέρονται ανεξάρτητα, η παράμετρος $TTVG$ προσδιορίστηκε από τον τύπο (Métris et al. 2003):

$$TTVG_{N_0} = -\frac{1}{RGR} \times \ln\left(\frac{\sum e^{-RGR \times TTVG}}{N_0}\right) \quad (5.2)$$

όπου ο όρος μέσα στην παρένθεση συνδέεται με τη φυσιολογική κατάσταση των σπορίων σύμφωνα με τους Métris et al. (2006). Για πληθυσμούς που αποτελούνται από N_0 σπόρια, η φυσιολογική κατάσταση καθορίζεται ως:

$$a(N_0) = e^{-RGR \times TTVG(N_0)} \quad (5.3)$$

Ο όρος $TTVG(N_0)$ δείχνει ότι ο χρόνος μέχρι η μυκηλιακή υφή να γίνει μακροσκοπικά εμφανής εξαρτάται από τον αρχικό αριθμό των σπορίων N_0 . Η φυσιολογική κατάσταση του πληθυσμού των σπορίων N_0 είναι ίση με τον αριθμητικό μέσο των φυσιολογικών καταστάσεων των μεμονωμένων σπορίων:

$$a(N_0) = \sum_{i=1}^{N_0} a_i / N_0 \quad (5.4)$$

Ο όρος μέσα στην παρένθεση στην εξίσωση (5.2) προσδιορίστηκε πειραματικά χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις (5.3) και (5.4) για μεμονωμένα σπόρια. Μετά τον υπολογισμό του όρου $TTVG(N_0)$, η εξίσωση (5.1) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της παραμέτρου $t_{det\ OTA}$ για πληθυσμό σπορίων N_0 ($t_{det\ OTA/N_0}$) (π.χ. 1-100 σπόρια) αντικαθιστώντας τον όρο $TTVG$ με $TTVG_{N_0}$ και υποθέτοντας ότι τα σπόρια συμπεριφέρονται ανεξάρτητα.

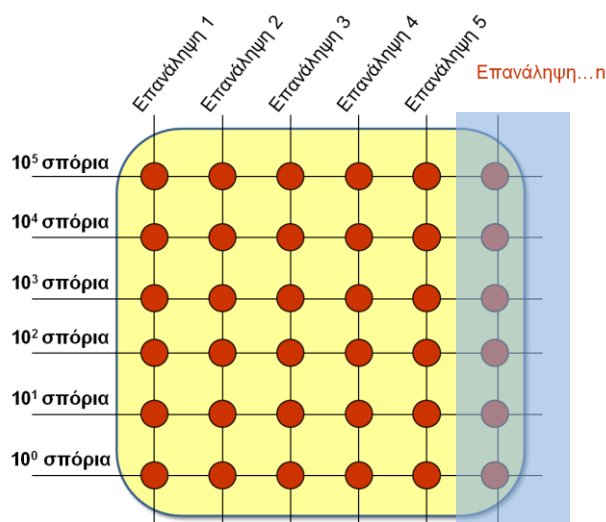
Πίνακας 5.1. Το εύρος της διαμέτρου κατά την οποία η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη ($d_{det \text{ ΩΤΑ}}$) από μυκήλια προερχόμενα από μεμονωμένα σπόρια των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε διαφορετικές συνθήκες a_w , pH και θερμοκρασίας.

Μύκητας	Θερμοκρασία (°C)	Συνθήκες ανάπτυξης		$d_{det \text{ ΩΤΑ}}$ (cm) ^a	
		a_w	pH		
<i>A. westerdijkiae</i>	15	0.99	3.5	1.0-2.5	
			5.5	2.5-4.0	
		0.94	3.5	1.5-3.0	
			5.5	3.5-5.0	
		20	0.99	3.5	2.5-4.0
				5.5	8.0-9.0
	0.94	3.5	3.0-4.5		
		5.5	> 9.0		
	25	0.99	3.5	1.5-3.0	
			5.5	7.5-9.0	
			0.94	3.5	2.0-3.5
	30	0.99	3.5	2.0-3.5	
5.5			2.5-4.0		
0.94			3.5	2.5-4.0	
<i>A. carbonarius</i>	15	0.99	3.5	1.8-2.2	
			5.5	0.9-1.2	
		0.94	3.5 ^b	N.D.	
	20	0.99	3.5	3.0-3.2	
			5.5	3.1-3.7	
			0.94	3.5	5.0-5.4
	25	0.99	3.5	3.1-3.8	
			5.5	6.6-7.4	
			0.94	3.5	3.8-4.2
	30	0.99	3.5	> 9.0	
			5.5	6.8-7.4	
			0.94	3.5	5.0-5.4
<i>P. verrucosum</i>	10	0.99	3.5	5.8-7.0	
			5.5	1.0-2.5	
		0.94	3.5 ^b	2.5-4.0	
	15	0.99	3.5	N.D.	
			5.5	0.5-2.0	
			0.94	3.5	2.5-4.0
	20	0.99	3.5	1.0-2.5	
			5.5	1.0-2.5	
			0.94	3.5	2.5-4.0
	25	0.99	3.5	6.0-7.5	
			5.5	7.0-8.5	
			0.94	3.5	2.5-4.0
25	0.99	3.5	5.5-7.0		
		5.5	7.0-8.5		
		0.94	3.5 ^c	7.0-8.5	
			5.5	N.G.	
			5.5	8.0-9.0	

^a Η διάμετρος κατά την οποία η ΩΤΑ καθίσταται ίση ή μεγαλύτερη των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, 0.4-0.5 και 0.9-1.0 ppb αντίστοιχα, ^b Δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ, ^c Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *P. verrucosum*

5.2.9 Εκτίμηση της απόδοσης του μοντέλου Monte Carlo

Η εκτίμηση της απόδοσης του μοντέλου Monte Carlo ως προς την παράμετρο *TTVG* πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri τετράγωνου σχήματος (12 x 12mm), τα οποία περιείχαν ΜΕΑ. Οι τιμές των pH και a_w ήταν ίδιες με το αρχικό πείραμα (pH 3.5 ή 5.5 και a_w 0.99 ή 0.94). Μετά από διπλή ανακαλλιέργεια των μυκήτων και την παραλαβή των αιωρημάτων των σπορίων σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.2.1, η συγκέντρωση των σπορίων καθορίστηκε 10^6 σπόρια/mL με τη χρήση της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης και στη συνέχεια με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων προετοιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ενοφθαλμισμάτων. Όγκος 10 μ L από κάθε διαφορετική αραιώση (από 10^1 έως 10^6 σπόρια/mL) ενοφθαλμίστηκε σε διαφορετικά σημεία, στην επιφάνεια του τρυβλίου, έτσι ώστε να μελετηθούν μεγέθη αρχικών ενοφθαλμισμάτων από 1 έως 10^5 σπόρια ανά σημείο ενοφθαλμισμού. Κάθε σειρά αντιπροσώπευε επαναλήψεις της ίδιας συγκέντρωσης (τουλάχιστον 5) (Εικόνα 5.2). Ακολούθησε επώαση στους 15, 20, 25 και 30°C για τα δύο είδη *Aspergillus* sp. ενώ στους 10, 15, 20 και 25°C για τον *P. verrucosum*. Τα τρυβλία απομακρύνονταν από την επώαση σε τακτά χρονικά διαστήματα και καταγράφηκε ο χρόνος που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά μυκηλιακή υφή. Επίσης, το παραπάνω πείραμα παρείχε πληροφορίες σχετικά με την επίδραση του μεγέθους του αρχικού ενοφθαλμίσματος (1 έως 10^5 σπόρια) των τριών μυκήτων στην παράμετρο *TTVG*, ανάλογα με τις συνθήκες επώασης.

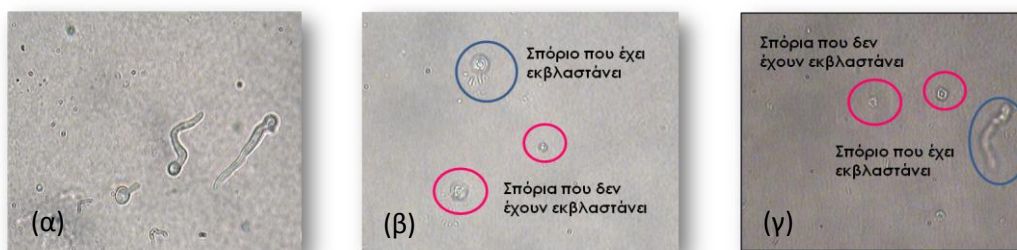


Εικόνα 5.2. Κάτοψη τρυβλίου Petri (12 x 12mm) με ΜΕΑ (pH 3.5 ή 5.5 και a_w 0.99 ή 0.94) και των ενδεικτικών σημείων ενοφθαλμισμού των διαφορετικών συγκεντρώσεων ενοφθαλμίσματος των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* για την εκτίμηση της απόδοσης του μοντέλου Monte Carlo ως προς την παράμετρο *TTVG*.

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Συλλογή μικροσκοπικών δεδομένων των μεμονωμένων σπορίων

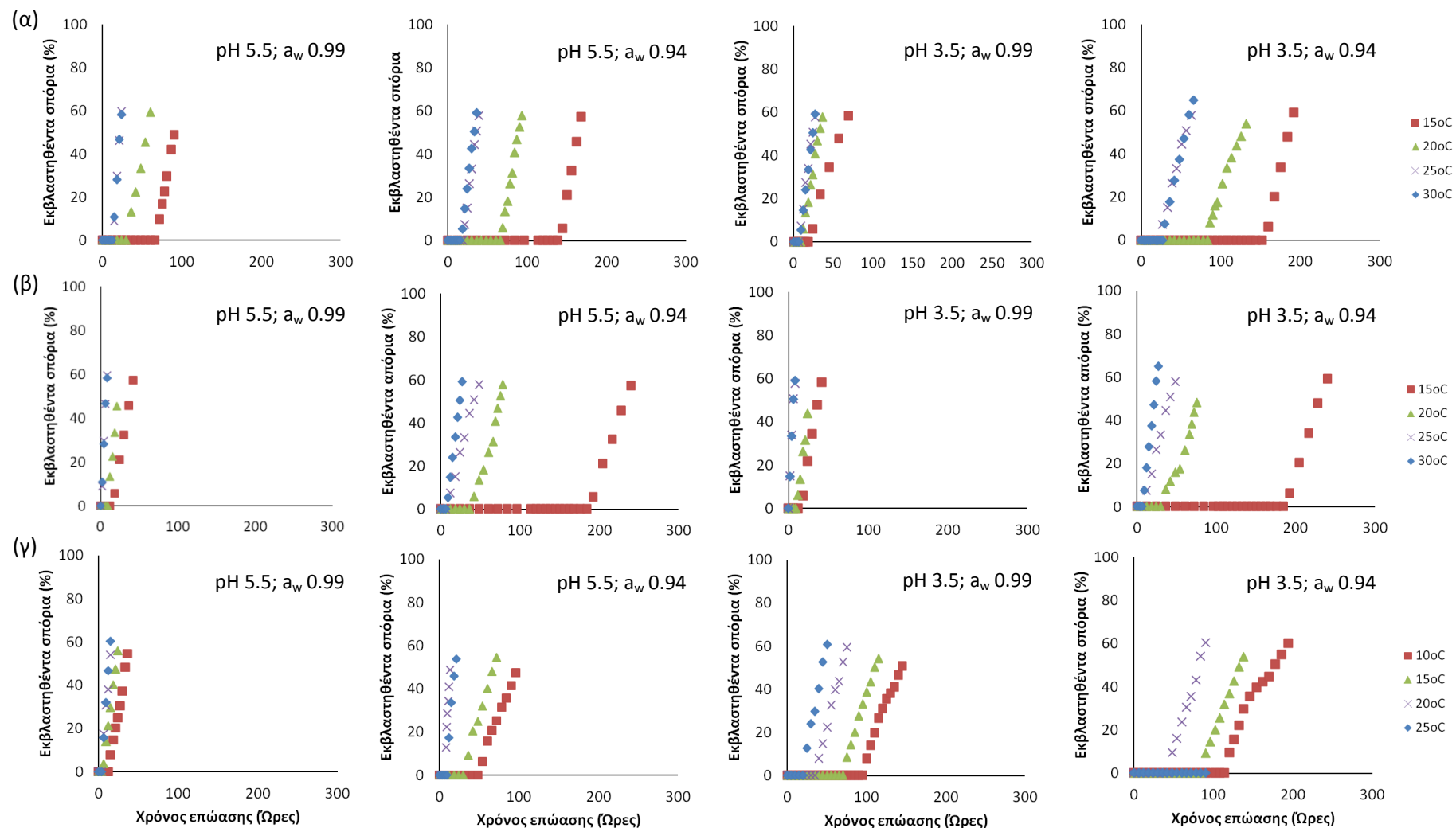
Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι ο ρυθμός και ο χρόνος αύξησης του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων, επηρεάζονται σημαντικά από το pH, τη θερμοκρασία και την a_w ($p < 0.05$). Παρόλα αυτά, ο χρόνος επηρεάστηκε καθοριστικότερα συγκριτικά με το ρυθμό αύξησης του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων. Η επίδραση των οικολογικών παραγόντων διέφερε ανάλογα με το είδος του μύκητα. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του *P. verrucosum* και του *A. carbonarius*, ο χρόνος κατά τον οποίο ξεκινά το ποσοστό των εκβλαστηθέντων σπορίων να αυξάνει, αύξανε με τη μείωση του pH, της θερμοκρασίας και της a_w (Γράφημα 5.2β και γ). Ο χρόνος αύξησης του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων του *A. westerdijkiae*, στην a_w 0.99, ήταν μικρότερος στο pH 3.5 σε σχέση με το 5.5, σε όλες τις θερμοκρασίες. Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα στη χαμηλή a_w (Γράφημα 5.2α). Στην περίπτωση του *P. verrucosum*, ο βέλτιστος συνδυασμός για την εκβλάστηση των σπορίων ήταν pH 5.5 και a_w 0.99, ενώ σε pH 3.5 και a_w 0.94 παρατηρήθηκε ο μεγαλύτερος χρόνος και ο μικρότερος ρυθμός αύξησης του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων, σε όλες τις θερμοκρασίες επώασης (Γράφημα 5.2γ). Ο βέλτιστος συνδυασμός των οικολογικών παραγόντων για τον *A. westerdijkiae* ήταν pH 3.5 και a_w 0.99. Στο συνδυασμό pH 3.5, a_w 0.94 και θερμοκρασία 25°C δεν εκβλάστησε κανένα από τα μεμονωμένα σπόρια του *P. verrucosum*, στα διαφορετικά οπτικά πεδία. Επιπλέον, σύμφωνα με τις καμπύλες που περιγράφουν την ποσοστιαία μεταβολή των εκβλαστηθέντων σπορίων των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* συναρτήσει του χρόνου επώασης παρατηρήθηκε ότι δεν εκβλάστησε 100% των παρατηρηθέντων σπορίων σε καμία από τις συνθήκες που μελετήθηκαν (Γράφημα 5.2).



Εικόνα 5.3. Διαφοροποιήσεις στο χρόνο εκβλάστησης και στο ρυθμό αύξησης του μήκους του βλαστικού σωλήνα σπορίων του *A. westerdijkiae* κατά την επώαση στους 15°C (α, β) και του *A. carbonarius* στους 30°C (γ) σε MEA με pH 5.5 και a_w 0.99.

Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση των μεμονωμένων σπορίων ελήφθησαν φωτογραφίες ώστε να αποτυπωθεί και οπτικά η διακύμανση τόσο στο χρόνο όσο και στο ρυθμό εκβλάστησης ανάμεσα στον πληθυσμό των μεμονωμένων σπορίων στο ίδιο οπτικό πεδίο. Καταγράφηκε λοιπόν σημαντική διακύμανση και στις δύο παραμέτρους μεταξύ των μεμονωμένων σπορίων που

παρατηρήθηκαν στον ίδιο οπτικό πεδίο και τις ίδιες πειραματικές συνθήκες, η οποία ήταν ευρύτερη υπό συνθήκες καταπόνησης. Ενδεικτικά παραδείγματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.3.



Γράφημα 5.2. Μέσες τιμές του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε MEA διαφορετικής a_w (0.99 και 0.94), pH (3.5 και 5.5) και θερμοκρασίας (10, 15, 20, 25 και 30°C) συναρτήσει του χρόνου επώασης, με τη μέθοδο των συσκευών «gel cassettes».

5.3.2 Συλλογή μακροσκοπικών δεδομένων

5.3.2.1 Ανάπτυξη των μυκήτων από μεμονωμένα σπόρια

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι οικολογικές παράμετροι (θερμοκρασία, pH και a_w) επηρέασαν σημαντικά ($p < 0.05$) τόσο το ρυθμό ανάπτυξης της αποικίας (*RGR*) όσο και το χρόνο εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (*TTVG*), και των τριών ειδών μυκήτων. Συγκεκριμένα, ο μέσος ρυθμός αύξησης της διαμέτρου της αποικίας του *A. westerdijkiae* μειωνόταν, μειούμενου του pH, ενώ η a_w επέδρασε καθοριστικά σε θερμοκρασίες $\geq 20^\circ\text{C}$ (Πίνακας 5.2, Γράφημα 5.3). Η a_w επηρέασε καθοριστικότερα τον *TTVG* συγκριτικά με τον *RGR* για το συγκεκριμένο είδος μύκητα. Η προσδιορισθείσα παράμετρος *TTVG* ήταν μεγαλύτερη στις χαμηλές τιμές θερμοκρασίας και a_w . Όσον αφορά στον *A. carbonarius*, η μέση τιμή του *RGR* δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις διαφορετικές συνθήκες, εν αντιθέσει με τη μέση τιμή του *TTVG*, η οποία παρουσίασε υστέρηση καθώς μειωνόταν η θερμοκρασία και η a_w (Γράφημα 5.4). Το pH δεν επηρέασε σημαντικά τις παραμέτρους κινητικής του παραπάνω μύκητα. Στην περίπτωση του *P. verrucosum* η μέση τιμή του *RGR* μειωνόταν και του *TTVG* αυξανόταν με τη μείωση της θερμοκρασίας, του pH και της a_w (συνθήκες καταπόνησης) (Πίνακας 5.2, Γράφημα 5.5). Ανάμεσα στους τρεις μύκητες, οι μέγιστες τιμές του μέσου *RGR* ακολούθησαν τη σειρά: *A. carbonarius* > *A. westerdijkiae* > *P. verrucosum* (Πίνακας 5.2).

Η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της a_w στην κατανομή των παραμέτρων *RGR* και *TTVG* των μεμονωμένων σπορίων των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* παρουσιάζεται με τη μορφή κατανομών Box plots στα Γραφήματα 5.3, 5.4, 5.5. Οι κατανομές κατασκευάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος STATISTICA (Version 10.0). Όσον αφορά στην επίδραση των οικολογικών παραγόντων στη διακύμανση, παρατηρήθηκε ότι οι κατανομές της παραμέτρου *TTVG* (Γραφήματα 5.3β, 5.4β, 5.5β), ήταν ευρύτερες από τις αντίστοιχες της *RGR* (Γραφήματα 5.3α, 5.4α, 5.5α) και για τα τρία είδη μυκήτων. Τη μικρότερη διακύμανση τόσο στην παράμετρο *RGR* όσο και στην αντίστοιχη του *TTVG* παρουσίασε ο μύκητας *A. carbonarius* σε όλες τις πειραματικές περιπτώσεις. Επίσης, οι κατανομές των παραμέτρων *RGR* και *TTVG* ήταν ευρύτερες κοντά σε συνθήκες καταπόνησης (π.χ. pH 3.5, a_w 0.94 και 15°C ή 10°C για τον *A. westerdijkiae* ή τον *P. verrucosum* αντίστοιχα) συγκριτικά με τις βέλτιστες συνθήκες (π.χ. pH 5.5 και a_w 0.99 για τον *A. westerdijkiae* και τον *P. verrucosum*).

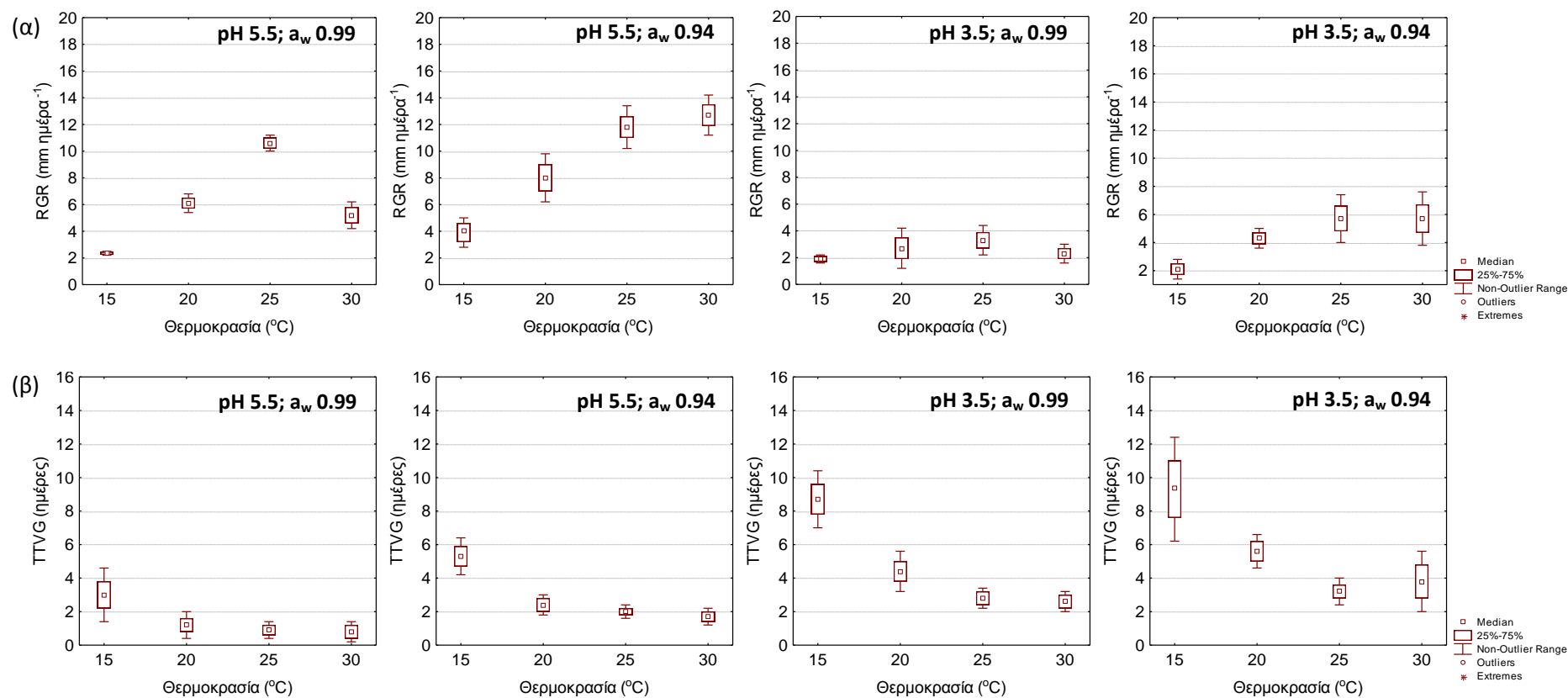
Κατά τη σύγκριση των κατανομών του χρόνου εκβλάστησης (Germination Time; *GT*) και του *TTVG*, παρατηρήθηκε αναλογική συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων. Η προαναφερθείσα σχέση παρατηρήθηκε σε όλες τις πειραματικές συνθήκες και τα είδη μυκήτων. Ενδεικτικά παραδείγματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 5.6. Επιπλέον, ο *TTVG* όπως ήταν αναμενόμενο έπεται του *GT* και η μεταξύ τους υστέρηση εκφράζει πιθανόν το χρόνο επιμήκυνσης του βλαστικού σωλήνα.

Πίνακας 5.2. Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των παραμέτρων κινητικής των μεμονωμένων σπορίων των *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* συναρτήσει της θερμοκρασίας, του pH και της a_w .

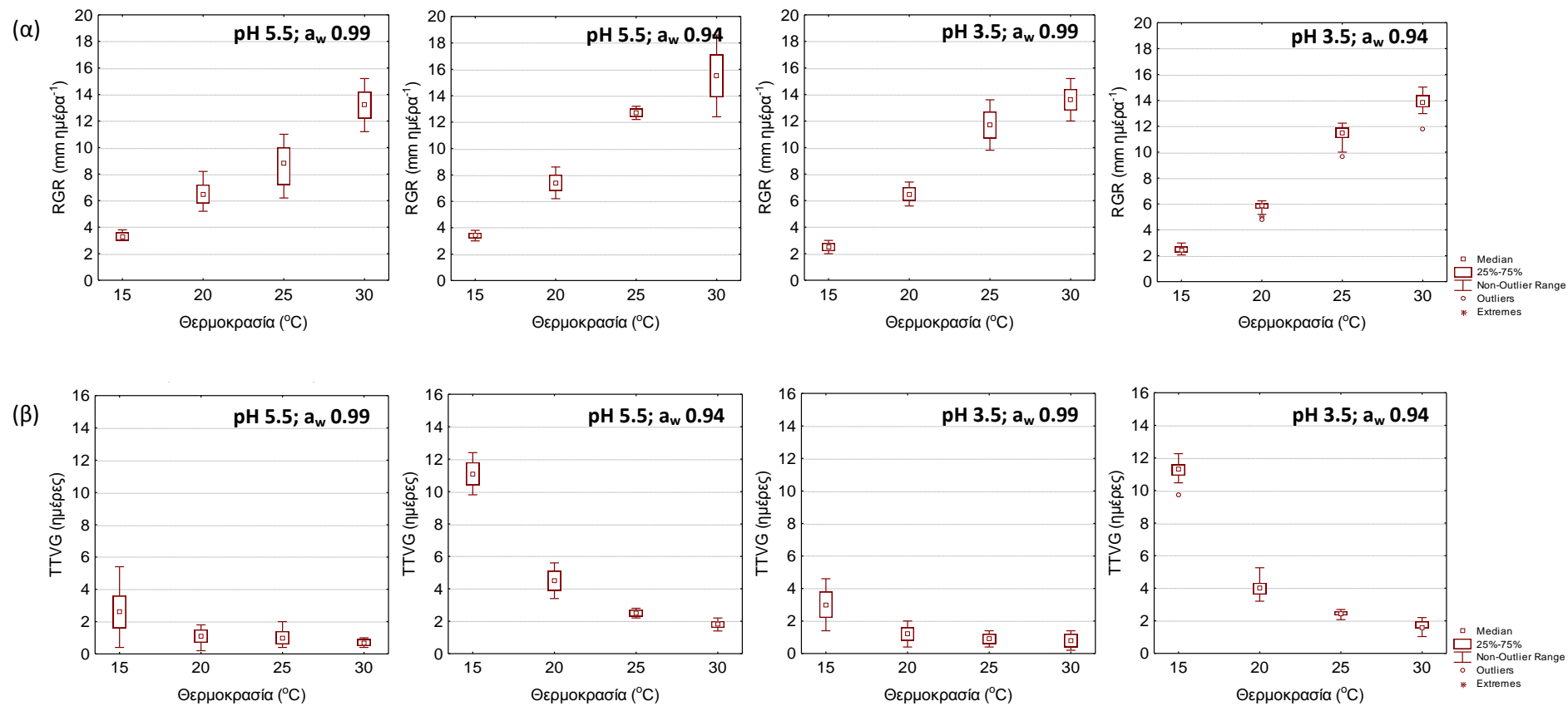
Μύκητας	Θ (°C)	Συνθήκες ανάπτυξης		Παράμετροι κινητικής		
		a_w	pH	RGR (cm ημέρα ⁻¹)	TTVG (ημέρες)	α_0
<i>A. westerdijkiae</i>	15	0.99	3.5	1.8 ± 0.2	5.4 ± 0.5	3.8 ± 0.7
			5.5	2.3 ± 0.1	5.0 ± 0.4	3.2 ± 0.3
		0.94	3.5	2.1 ± 0.3	9.1 ± 1.6	1.6 ± 0.9
	20	0.99	5.5	3.7 ± 0.3	8.3 ± 0.8	0.5 ± 0.3
			3.5	3.0 ± 0.7	2.8 ± 0.5	4.5 ± 1.5
		0.94	5.5	5.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.4
	25	0.99	3.5	4.3 ± 0.3	5.4 ± 0.4	1.0 ± 0.3
			5.5	7.2 ± 0.7	4.3 ± 0.6	0.5 ± 0.2
		0.94	3.5	2.9 ± 0.5	1.4 ± 0.5	6.6 ± 1.3
	30	0.99	5.5	10.8 ± 0.3	2.1 ± 0.2	1.1 ± 0.3
			3.5	5.9 ± 0.8	3.3 ± 0.4	1.6 ± 0.7
		0.94	5.5	11.7 ± 1.0	2.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2
<i>A. carbonarius</i>	15	0.99	3.5	2.1 ± 0.3	2.5 ± 0.6	6.0 ± 1.1
			5.5	5.1 ± 0.5	1.5 ± 0.2	4.6 ± 0.8
		0.94	3.5	6.2 ± 0.9	3.1 ± 0.6	1.6 ± 0.8
	20	0.99	5.5	12.2 ± 1.0	2.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2
			3.5	2.4 ± 0.2	2.7 ± 0.7	5.3 ± 1.2
		0.94	5.5	2.5 ± 0.3	2.5 ± 0.9	5.5 ± 1.6
	25	0.99	3.5	3.2 ± 0.2	11.3 ± 0.6	0.3 ± 0.1
			5.5	6.4 ± 0.5	1.2 ± 0.4	4.9 ± 1.5
		0.94	5.5	6.0 ± 0.5	1.2 ± 0.3	5.0 ± 1.1
	30	0.99	3.5	6.4 ± 0.5	1.2 ± 0.4	4.9 ± 1.6
			5.5	7.4 ± 0.4	4.1 ± 0.5	0.5 ± 0.2
		0.94	3.5	11.7 ± 1.0	0.6 ± 0.2	5.0 ± 1.3
<i>P. verrucosum</i>	10	0.99	5.5	9.5 ± 1.0	0.6 ± 0.2	5.8 ± 1.3
			3.5	13.9 ± 0.7	0.6 ± 0.2	4.8 ± 1.4
		0.94	5.5	12.7 ± 0.3	2.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
	15	0.99	3.5	14.0 ± 0.7	0.6 ± 0.2	4.7 ± 1.1
			5.5	12.4 ± 1.0	0.5 ± 0.1	5.3 ± 1.0
		0.94	3.5	16.0 ± 2.2	1.7 ± 0.2	0.8 ± 0.4
	20	0.99	5.5	15.7 ± 1.2	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.4
			3.5	2.0 ± 0.2	7.3 ± 0.9	2.4 ± 0.6
		0.94	5.5	2.6 ± 0.3	4.1 ± 0.7	3.5 ± 0.9
	25	0.99	3.5 ^a	0.7 ± 0.1	10.9 ± 2.0	4.7 ± 0.9
			5.5	0.7 ± 0.3	7.7 ± 2.2	6.1 ± 2.0
		0.94	3.5	1.9 ± 0.5	3.5 ± 1.0	5.4 ± 1.4
25	0.99	5.5	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.8 ± 0.5	
		3.5	1.2 ± 0.1	7.9 ± 0.7	3.9 ± 0.8	
	0.94	5.5	3.0 ± 0.2	7.4 ± 0.6	1.1 ± 0.4	
25	0.99	3.5	3.8 ± 0.3	2.7 ± 0.5	3.7 ± 0.8	
		5.5	5.3 ± 0.3	1.6 ± 0.1	4.3 ± 0.5	
	0.94	3.5	1.3 ± 0.2	5.0 ± 0.8	5.2 ± 0.5	
25	0.99	5.5	4.3 ± 0.5	4.5 ± 0.6	1.5 ± 0.3	
		3.5	5.1 ± 0.3	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.4	
	0.94	5.5	4.7 ± 0.9	1.4 ± 0.5	5.2 ± 1.2	
			3.5 ^b	N.G.	N.G.	N.G.
			5.5	5.8 ± 0.8	2.8 ± 0.3	2.1 ± 0.6

^a Δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ, ^b Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *P. verrucosum*

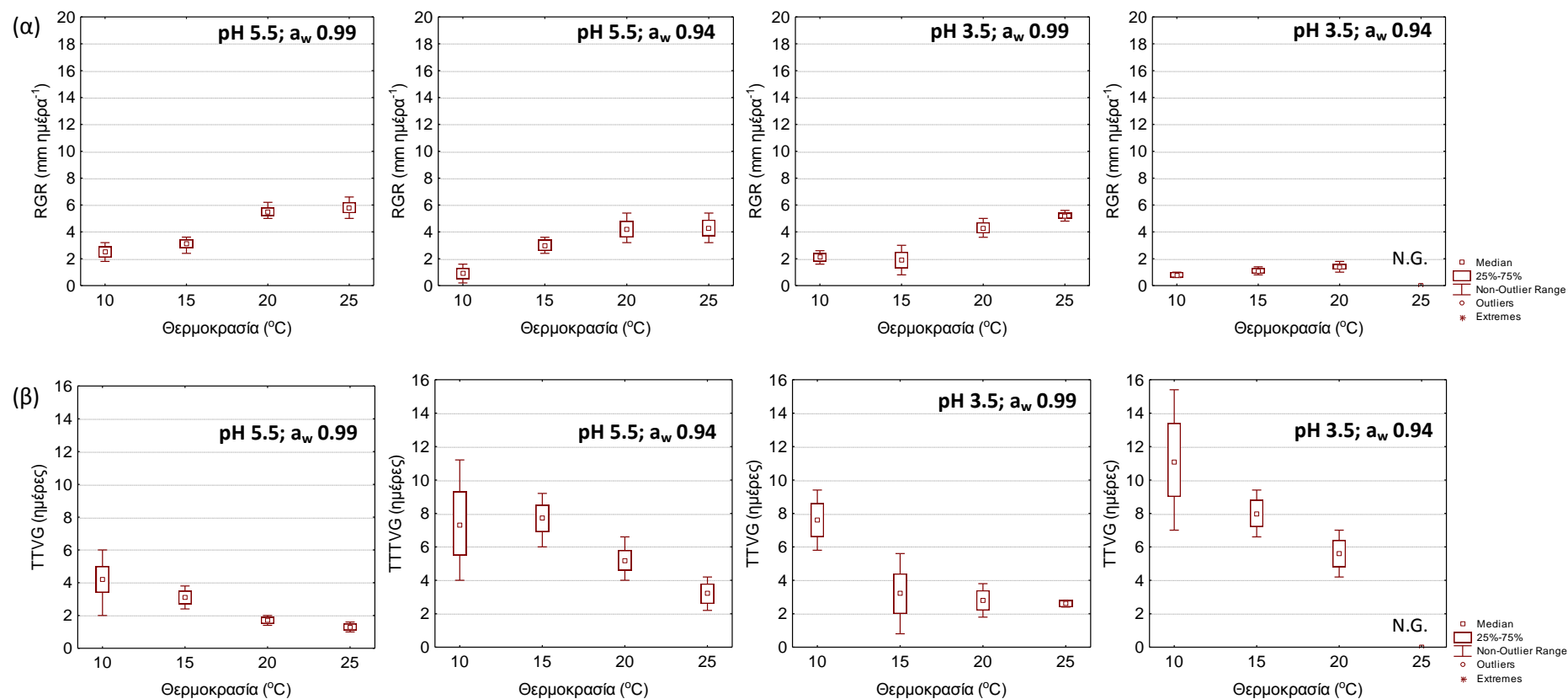
Οι κατανομές Gamma, Normal, Logistic και Weibull προσαρμόστηκαν στις παραμέτρους της κινητικής της ανάπτυξης (*RGR* και *TTVG*) των τριών ειδών μυκήτων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι η κατανομή Gamma δεν ήταν κατάλληλη σε καμία από τις πειραματικές περιπτώσεις. Αντίθετα, η κατανομή Weibull προσαρμόστηκε ικανοποιητικά στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ οι κατανομές Normal και Logistic είχαν το μεγαλύτερο ποσοστό προσαρμογής στα πειραματικά δεδομένα (100%). Η κατανομή Logistic είχε καλύτερη απόδοση συγκριτικά με την κατανομή Normal. Συγκεκριμένα, η Logistic έδειξε υψηλό ποσοστό τιμών $p > 0.05$ και χαμηλό ποσοστό με $p < 0.05$, συγκριτικά με την κατανομή Normal. Γι' αυτό το λόγο, η κατανομή Logistic επιλέχθηκε για την περιγραφή της διακύμανσης των παραμέτρων *TTVG* και *RGR* των μεμονωμένων σποριών. Όσον αφορά την παράμετρο α_0 , η κατανομή Gamma προσαρμόστηκε σε ένα μέρος των πειραματικών δεδομένων. Οι κατανομές Normal και Logistic ήταν μεν ικανές να περιγράψουν τις τιμές α_0 από τα πειραματικά δεδομένα αλλά η Weibull αποδείχθηκε η καταλληλότερη για την περιγραφή της φυσιολογικής κατάστασης (α_0). Υπό συνθήκες καταπόνησης π.χ. χαμηλές τιμές pH ή a_w , μόνο οι Normal και Logistic μπορούσαν επαρκώς να προσαρμοστούν σε όλα τα πειραματικά δεδομένα. Το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι κατανομές γίνονταν ευρύτερες στις περιπτώσεις που οι μύκητες έπρεπε να προσαρμοστούν σε συνθήκες καταπόνησης, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα μεγάλη παραλλακτικότητα.



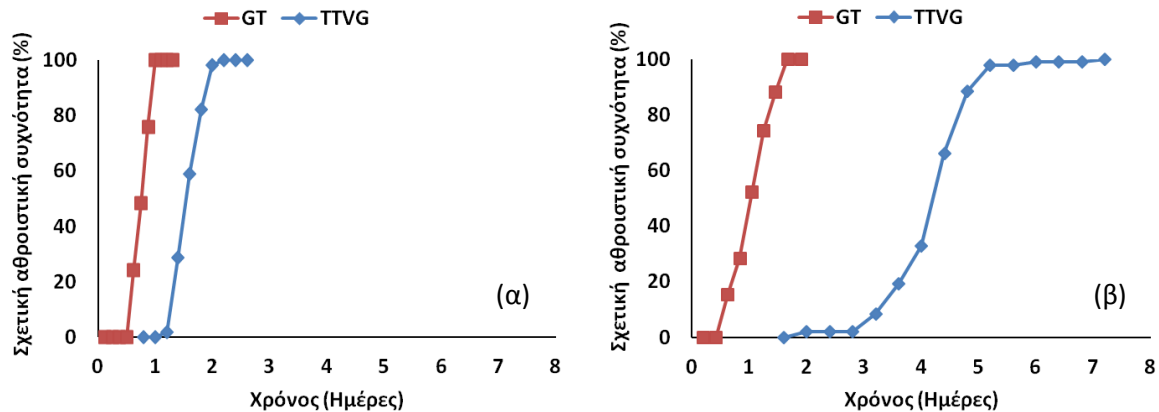
Γράφημα 5.3. Box plots των κατανομών (α) του ρυθμού ανάπτυξης του (RGR) και του (β) χρόνου εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (TTVG) του *A. westerdijkiae* συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C) του pH (5.5 και 3.5) και της a_w (0.99 και 0.94), μελετώντας έως και 100 μεμονωμένα σπόρια.



Γράφημα 5.4. Box plots των κατανομών (α) του ρυθμού ανάπτυξης του (RGR) και του (β) χρόνου εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (TTVG) του *A. carbonarius* συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C) του pH (5.5 και 3.5) και της a_w (0.99 και 0.94), μελετώντας έως και 100 μεμονωμένα σπόρια.



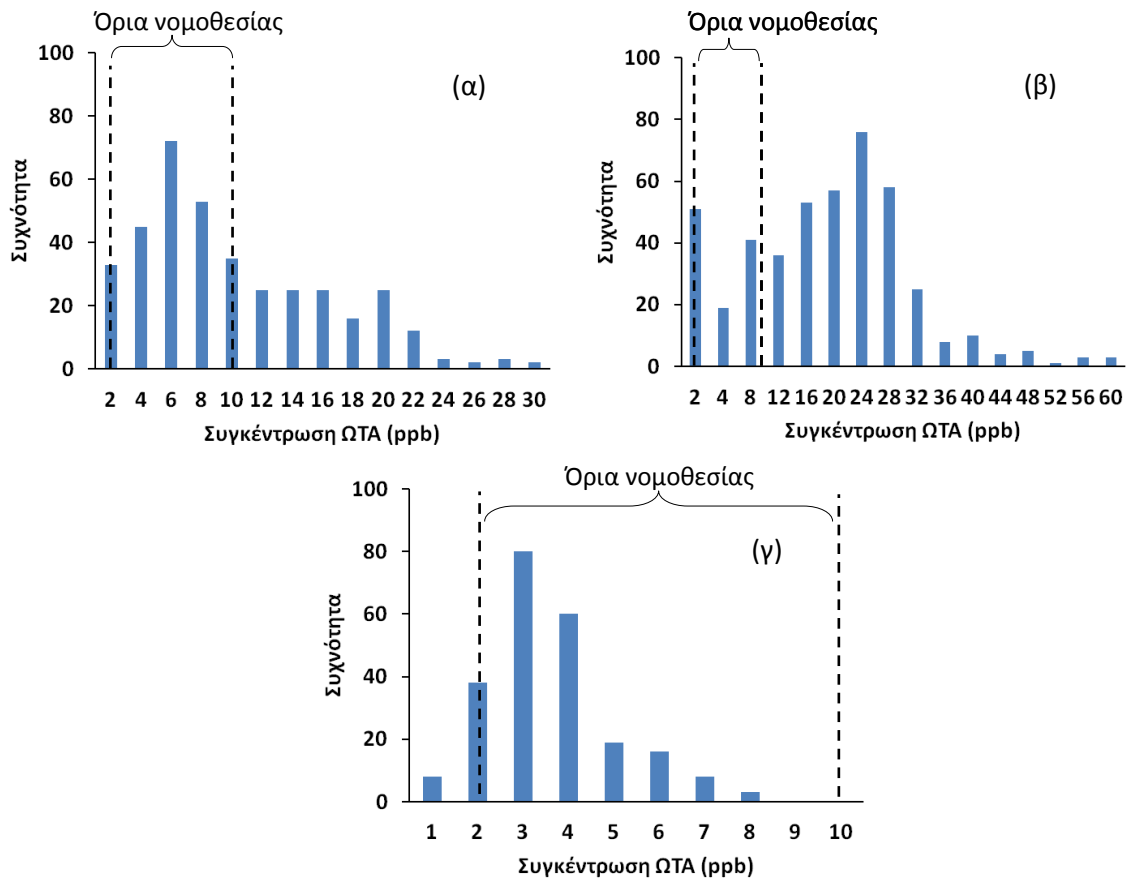
Γράφημα 5.5. Box plots των κατανομών (α) του ρυθμού ανάπτυξης του (RGR) και του (β) χρόνου εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (TTVG) του *P. verrucosum* συναρτήσει της θερμοκρασίας (10, 15, 20 και 25°C) του pH (5.5 και 3.5) και της a_w (0.99 και 0.94), μελετώντας έως και 100 μεμονωμένα σπόρια. N.G.: Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *P. verrucosum*.



Γράφημα 5.6. Ενδεικτικά παραδείγματα της αναλογικής σχέσης της σχετικής αθροιστικής συχνότητας του χρόνου εκβλάστησης (GT) και του TTVG των (α) *A. westerdijkiae* (30°C, pH 5.5 και a_w 0.99) και (β) *P. verrucosum* (10°C, pH 5.5 και a_w 0.99).

5.3.2.2 Παραγωγή της ΩΤΑ από αποικίες μεμονωμένων σπορίων

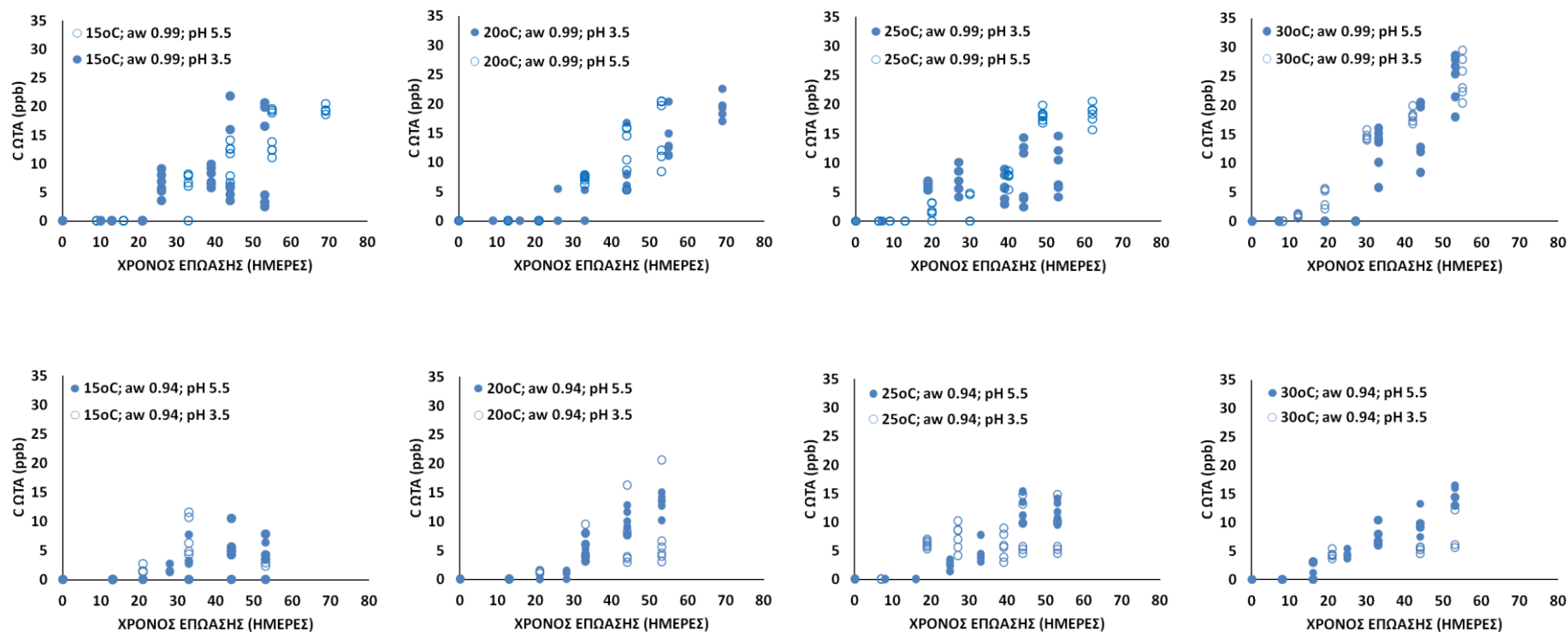
Τα επίπεδα της ΩΤΑ από αποικίες, οι οποίες προέρχονταν από μεμονωμένα σπόρια των τριών ειδών μυκήτων κυμάνθηκαν γύρω από το ανώτερο και κατώτερο όριο της νομοθεσίας (2-10 ppb, Καν. ΕΚ 1881/2006) για τρόφιμα που ανιχνεύονται οι συγκεκριμένοι μύκητες, ανεξάρτητα από τις μελετώμενες πειραματικές συνθήκες (Γράφημα 5.7). Ο ισχυρότερα ωχρατοξινογόνος μύκητας ήταν ο *A. carbonarius* (≤ 60 ppb), ακολούθησε ο *A. westerdijkiae* (≤ 30 ppb), ενώ τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις παρήγαγε ο *P. verrucosum* (≤ 8 ppb). Σύμφωνα με το Γράφημα 5.7, η μεγαλύτερη συχνότητα σε συγκεντρώσεις ΩΤΑ από τον *A. westerdijkiae* παρατηρήθηκε εντός των νομοθετικών ορίων (30-70%). Στην περίπτωση του *P. verrucosum*, το εύρος των παραγόμενων συγκεντρώσεων της τοξίνης ήταν από 1 έως 8 ppb ενώ σε πολλές περιπτώσεις δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ (Γράφημα 5.10). Εν αντιθέσει με τους δύο προηγούμενους μύκητες, η υψηλότερη συχνότητα (60-80%) των συγκεντρώσεων της ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* ήταν εκτός των νομοθετικών ορίων.



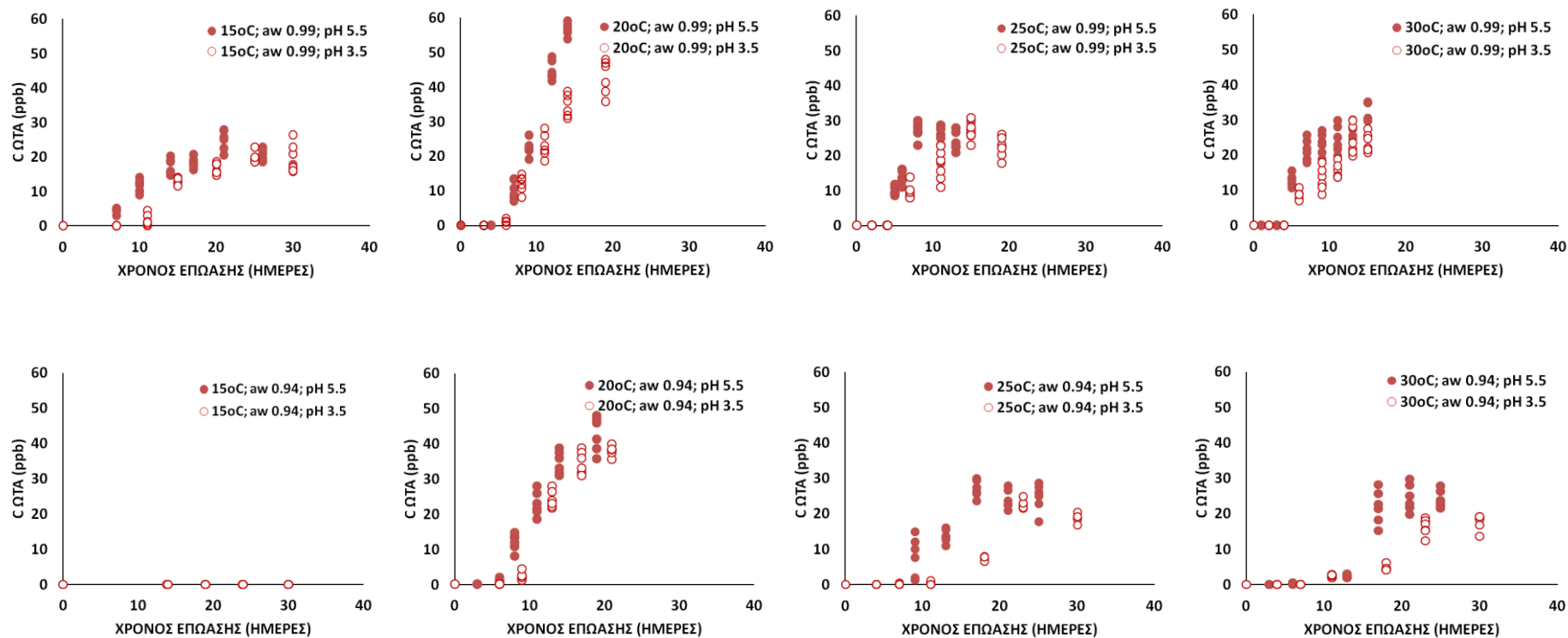
Γράφημα 5.7. Διακύμανση στη συχνότητα της συγκέντρωσης της ΩΤΑ από τους *A. westerdijkiae* (α), *A. carbonarius* (β) και *P. verrucosum* (γ) ανεξάρτητα από τις μελετώμενες πειραματικές συνθήκες. Όρια νομοθεσίας 2-10 ppb (σύμφωνα με τον Καν. ΕΚ 1881/2006).

Στα Γραφήματα 5.8, 5.9 και 5.10 παρουσιάζεται η διακύμανση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον *A. westerdijkiae*, τον *A. carbonarius* και τον *P. verrucosum* συναρτήσει της θερμοκρασίας, της a_w , του pH και του χρόνου επώασης. Και οι τρεις μύκητες παρουσίασαν σημαντική διακύμανση στις παραγόμενες συγκεντρώσεις ΩΤΑ, ανάμεσα στα διαφορετικά δείγματα και τις διαφορετικές συνθήκες. Ο *P. verrucosum* υπέδειξε τη μεγαλύτερη διακύμανση, εντός του εύρους των νομοθετικών ορίων για την ΩΤΑ, καταγράφοντας μάλιστα περιπτώσεις που κατά την ίδια δειγματοληψία υπήρχαν δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκε και δεν ανιχνεύτηκε τοξίνη π.χ. κατά την 35^η ημέρα στο συνδυασμό 10°C, a_w 0.94, pH 5.5 ή κατά την 47^η ημέρα στο συνδυασμό 25°C, a_w 0.99, pH 5.5 (Γράφημα 5.10). Στο συνδυασμό pH 3.5, a_w 0.94 και θερμοκρασία 15°C δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ σε καμία από τις αποικίες που προέρχονταν από τα μεμονωμένα σπόρια του *A. carbonarius*. Η διακύμανση της παραγωγής της ΩΤΑ από αποικίες, οι οποίες προέρχονταν από μεμονωμένα σπόρια αυξήθηκε σημαντικά σε συνθήκες καταπόνησης π.χ. a_w 0.94, pH 3.5 και 20°C ή 15°C για τον *A. westerdijkiae* ή *P. verrucosum*, αντίστοιχα.

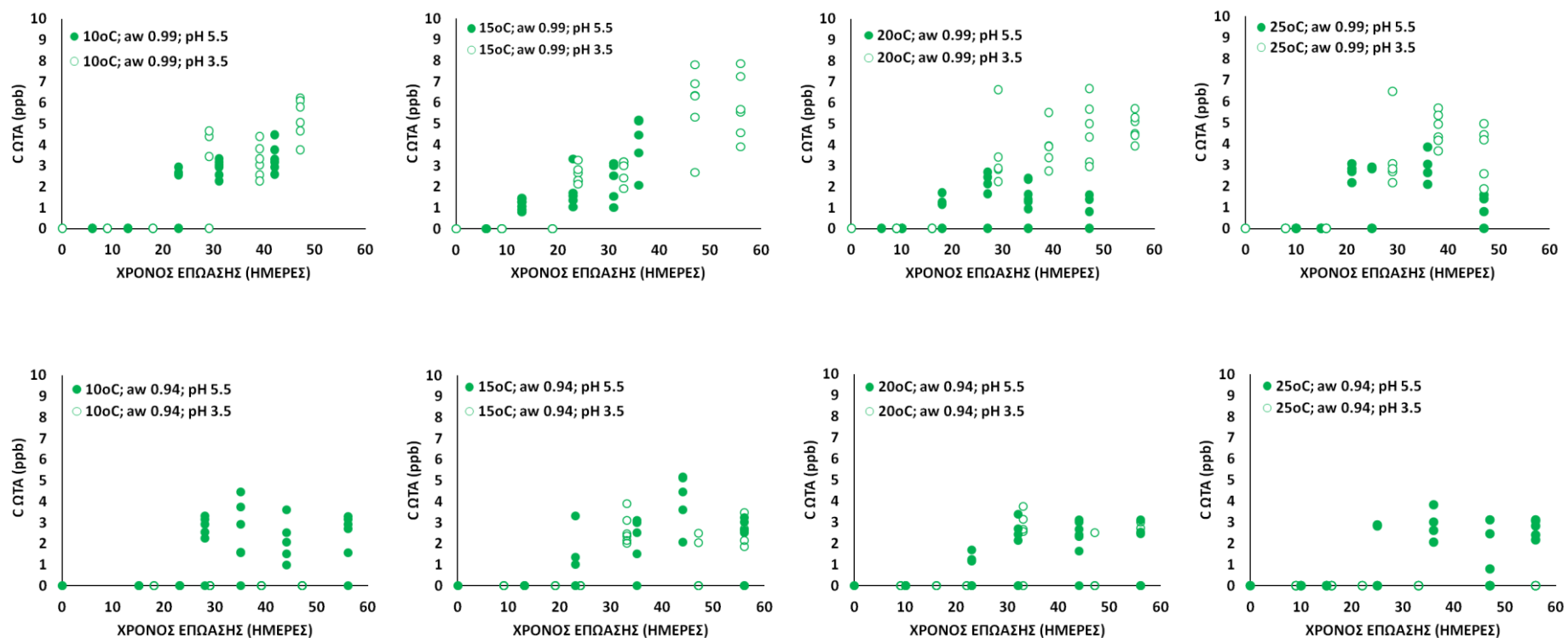
Σημαντική παράμετρος αποδείχθηκε και η διάμετρος κατά την οποία η ΩΤΑ καθίσταται για πρώτη φορά ανιχνεύσιμη ($d_{det\ OTA}$). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η $d_{det\ OTA}$ ήταν μικρότερη σε συνθήκες καταπόνησης. Συγκεκριμένα, η $d_{det\ OTA}$ του *A. westerdijkiae* κατά την ανάπτυξη του σε συνθήκες 15°C, a_w 0.94, pH 3.5 είχε εύρος 1.5-3.0 cm, ενώ στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, a_w και pH 5.5, η τιμή της $d_{det\ OTA}$ ήταν 3.5-5.0 cm. Παρόμοια ήταν η τάση και στα άλλα δύο είδη μυκήτων (Πίνακας 5.1).



Γράφημα 5.8. Διακύμανση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον *A. westerdijkiae*, συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C), της a_w (0.99 και 0.94), του pH (3.5 και 5.5) και του χρόνου επώασης.



Γράφημα 5.9. Διακύμανση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον *A. carbonarius*, συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C), της a_w (0.99 και 0.94), του pH (3.5 και 5.5) και του χρόνου επώασης.



Γράφημα 5.10. Διακύμανση των παραγόμενων συγκεντρώσεων ΩΤΑ από τον *P. verrucosum*, συναρτήσει της θερμοκρασίας (15, 20, 25 και 30°C), της a_w (0.99 και 0.94), του pH (3.5 και 5.5) και του χρόνου επώασης.

5.3.3 Ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου Monte Carlo με βάση τα δεδομένα αύξησης από μεμονωμένα σπόρια

Η προσομοίωση Monte Carlo χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση των κατανομών των παραμέτρων σχετιζόμενων με την ανάπτυξη και την παραγωγή της ΩΤΑ. Η συγκεκριμένη μελέτη παρείχε πληροφορίες για την παραλλακτικότητα και την κατανομή του $TTVG$ για κάθε μεμονωμένο σπόριο και του χρόνου στον οποίο η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη από μικρήλιο ($t_{det\ \Omega TA}$) που προήλθε από μεμονωμένο σπόριο (Πίνακες 5.3, 5.4, 5.5, 5.6). Όπως προαναφέρθηκε και στην παράγραφο 5.3.2.1, η κατανομή Logistic λόγω της καλής απόδοσης της επιλέχθηκε περαιτέρω στην περιγραφή της διακύμανσης των παραμέτρων $TTVG$ και RGR των μεμονωμένων σπορίων. Η μοντελοποίηση των παραμέτρων επιλέχθηκε να γίνει με στοχαστικά μοντέλα όπως η προσομοίωση Monte Carlo, συγκριτικά με τα κινητικά μοντέλα, ώστε να ληφθεί υπόψη και η παραλλακτικότητα των μεμονωμένων σπορίων. Συγκεκριμένα, τα στοχαστικά μοντέλα στην παρούσα μελέτη μπορούν να προβλέψουν με ποσοστό εμπιστοσύνης 95% και τις δύο προαναφερθείσες παραμέτρους σε κάθε διαφορετική συνθήκη.

Οι Πίνακες 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 δείχνουν τη σύγκριση μεταξύ των παρατηρήσεων και των προβλέψεων (μέσες τιμές) για τις παραμέτρους $TTVG$ και $t_{det\ \Omega TA}$, στις διαφορετικές συνθήκες επώασης. Οι προβλέψεις του Monte Carlo για τις παραμέτρους $TTVG$ και $t_{det\ \Omega TA}$ έδειξαν ικανοποιητική συμφωνία με τις αντίστοιχες τιμές με βάση τα πειραματικά δεδομένα σε ΜΕΑ, σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Οι προβλέψεις για την παράμετρο $TTVG$ ήταν πιο ακριβείς συγκριτικά με τις αντίστοιχες για τον $t_{det\ \Omega TA}$, τόσο για τα μεμονωμένα σπόρια όσο και για αρχικούς πληθυσμούς N_0 1-100 σπόρια. Οι προβλέψεις και των δύο παραμέτρων ήταν πολύ κοντά ή σε ορισμένες περιπτώσεις λίγο υψηλότερες από τις παρατηρήσεις. Παρόλα αυτά, ακόμα και στις περιπτώσεις μη ικανοποιητικής συμφωνίας μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων, οι παρατηρηθείσες τιμές ήταν εντός ή πολύ κοντά στο εύρος της προβλεφθείσας κατανομής μεταξύ των ποσοστιμορίων 5 και 95% (Πίνακες 5.3, 5.4, 5.5, 5.6).

Το πείραμα της επικύρωσης του μοντέλου Monte Carlo παρείχε πληροφορίες και για την επίδραση του μεγέθους ενοφθαλμίσματος στην παράμετρο $TTVG$ των τριών μικρήτων. Συγκεκριμένα, στα χαμηλά επίπεδα αρχικού ενοφθαλμίσματος (1-100 σπόρια) παρατηρήθηκαν έως και 3 φορές μεγαλύτερες τιμές $TTVG$ συγκριτικά με τα ενοφθαλμίσματα υψηλής συγκέντρωσης (10^4 - 10^5 σπόρια) στις ίδιες συνθήκες επώασης (Γράφημα 5.11). Αξιοσημείωτη ήταν η γραμμική σχέση που καταγράφηκε μεταξύ του $TTVG$ και του δεκαδικού λογάριθμου του μεγέθους του ενοφθαλμίσματος (Γράφημα 5.12). Επιπλέον, η γραμμή τάσης είχε μεγαλύτερη κλίση κοντά σε συνθήκες καταπόνησης. Παρόλα αυτά, εξαιρουμένων των περιπτώσεων κοντά στις οριακές συνθήκες για ανάπτυξη π.χ. a_w 0.94 και χαμηλές τιμές θερμοκρασίας, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του αρχικού πληθυσμού στον $TTVG$.

Πίνακας 5.3. Προβλεφθείσες και παρατηρηθείσες τιμές της παραμέτρου TTVG (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για μεμονωμένα σπόρια.

Μύκητας	Θ (°C)	Συνθήκες ανάπτυξης		Κατανομή			
		a _w	pH	Μέσος όρος τιμών		5%	95%
				Παρατηρήσεις	Προβλέψεις		
<i>A. westerdijkiae</i>	15	0.99	3.5	4.4	5.4	4.3	6.6
				5.5	3.9	5.0	4.2
		0.94	3.5	9.5	9.1	5.8	12.5
				5.5	6.9	8.3	6.9
	20	0.99	3.5	2.1	2.9	1.9	3.8
				5.5	2.0	2.3	1.9
		0.94	3.5	4.0	5.4	4.5	6.3
				5.5	3.4	4.2	3.0
	25	0.99	3.5	2.0	1.5	0.4	2.2
				5.5	1.9	2.1	1.6
		0.94	3.5	3.0	3.3	2.5	4.1
				5.5	2.7	2.6	2.0
30	0.99	3.5	2.1	2.4	1.2	3.7	
			5.5	1.8	1.5	1.0	2.0
	0.94	3.5	2.7	3.1	2.0	4.2	
			5.5	2.6	2.4	1.9	2.9
<i>A. carbonarius</i>	15	0.99	3.5	3.5	2.7	1.4	3.9
				5.5	3.4	2.5	0.9
		0.94	3.5	11.5	11.3	10.4	12.2
				5.5	10.8	11.3	10.4
	20	0.99	3.5	2.1	1.2	0.5	1.8
				5.5	2.1	1.2	0.7
		0.94	3.5	3.4	4.0	3.2	4.8
				5.5	3.1	4.1	3.4
	25	0.99	3.5	1.0	0.6	0.3	0.9
				5.5	1.2	0.6	0.3
		0.94	3.5	2.8	2.4	2.2	2.7
				5.5	2.6	2.5	2.2
30	0.99	3.5	0.8	0.6	0.3	0.8	
			5.5	0.7	0.5	0.3	0.8
	0.94	3.5	2.1	1.7	1.2	2.2	
			5.5	1.9	1.6	1.3	2.0
<i>P. verrucosum</i>	10	0.99	3.5	6.2	7.3	5.3	9.3
				5.5	4.0	4.2	2.9
		0.94	3.5 ^a	9.9	10.9	6.8	15.0
				5.5	7.8	7.7	3.1
	15	0.99	3.5	3.1	3.5	1.5	5.5
				5.5	2.9	3.2	2.6
		0.94	3.5	6.2	7.9	6.4	9.4
				5.5	5.3	7.4	6.3
	20	0.99	3.5	2.7	2.7	1.7	3.6
				5.5	2.1	1.6	1.3
		0.94	3.5	3.8	4.9	3.4	6.5
				5.5	3.4	4.4	3.4
25	0.99	3.5	2.6	2.5	2.2	2.8	
			5.5	1.9	1.3	0.5	2.2
	0.94	3.5 ^b	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	
			5.5	2.7	2.8	2.2	3.4

^a Δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ

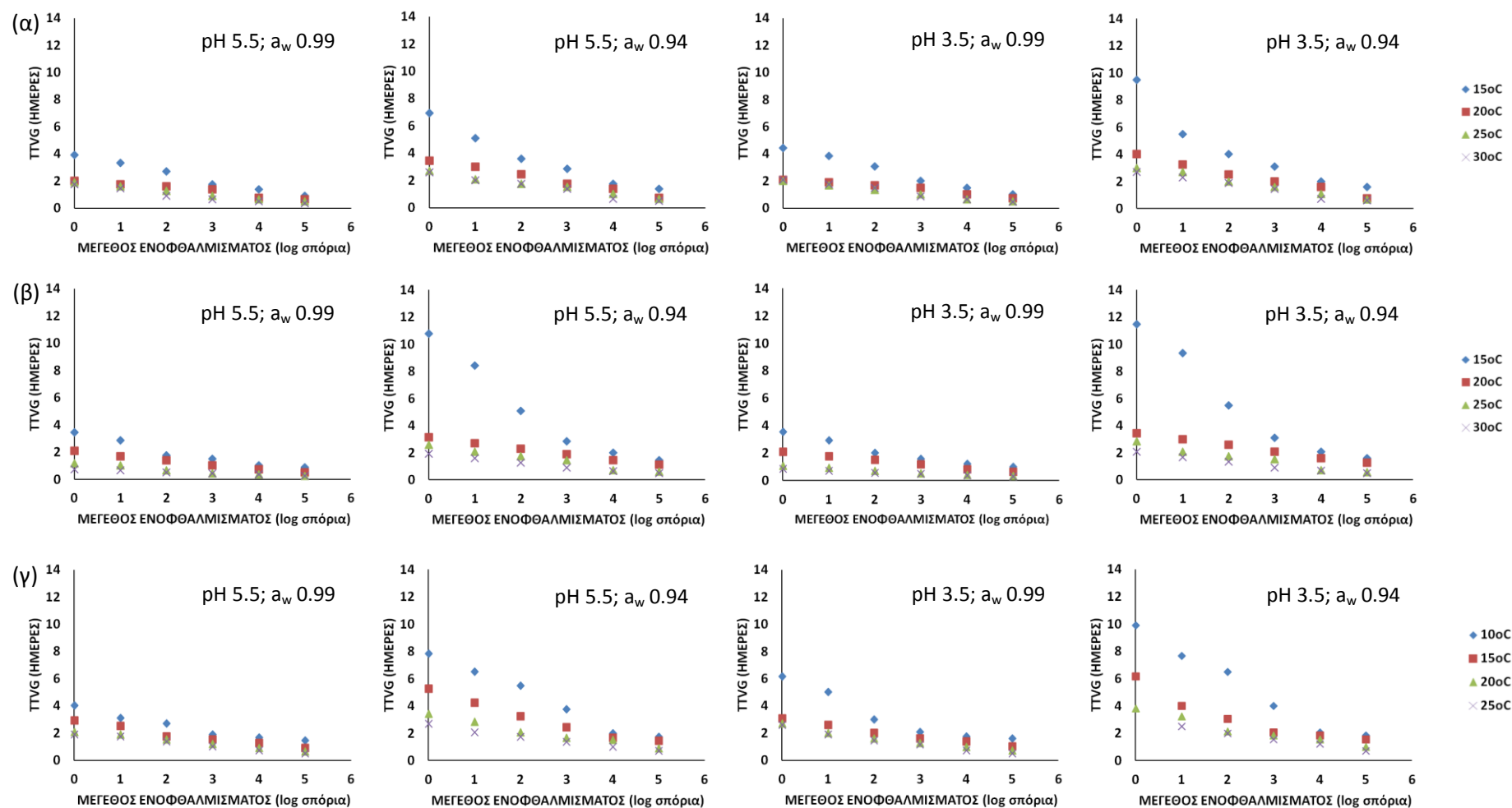
^b Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *P. verrucosum*

Πίνακας 5.4. Προβλεφθείσες και παρατηρηθείσες τιμές της παραμέτρου TVG (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για N_0 1-100 σπόρια.

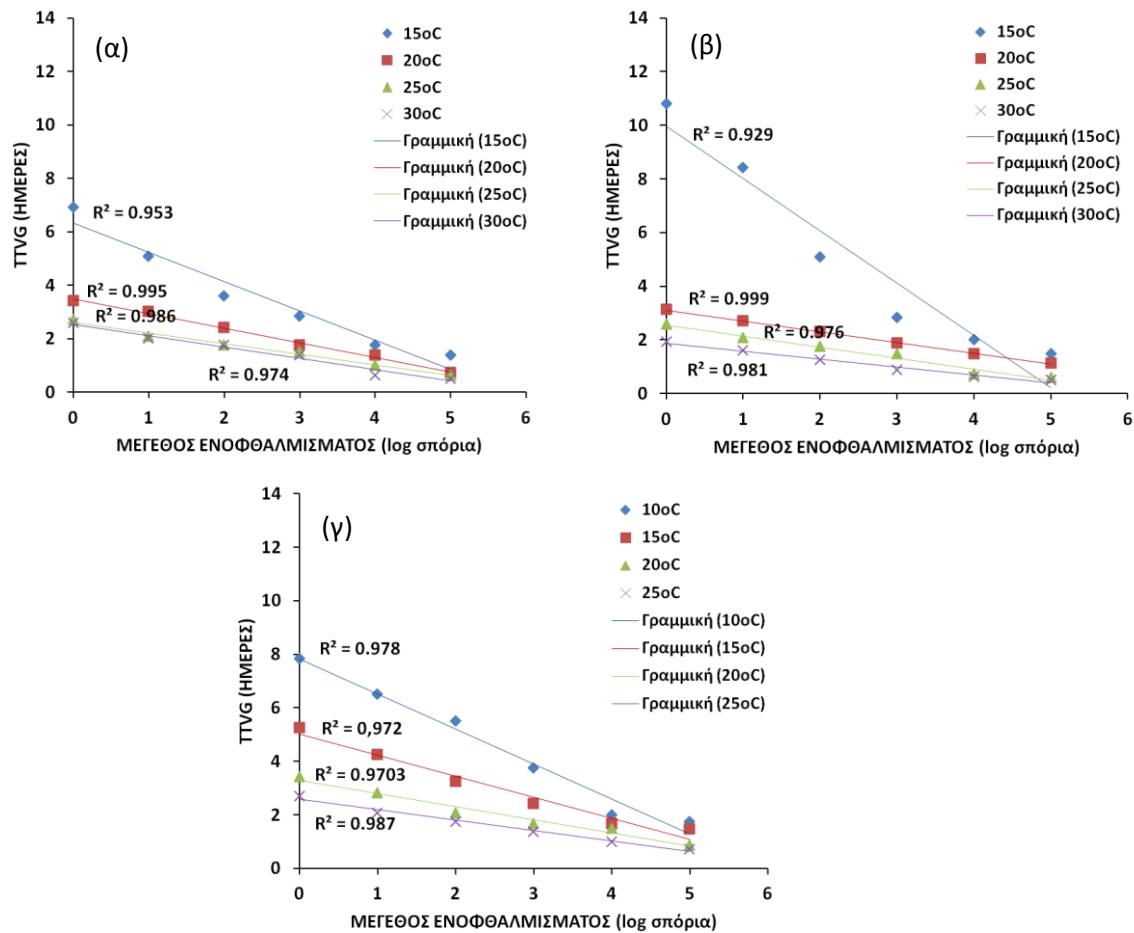
Μύκητας	θ ($^{\circ}\text{C}$)	Συνθήκες ανάπτυξης		Κατανομή			
		a_w	pH	Μέσος όρος τιμών		5%	95%
				Παρατηρήσεις	Προβλέψεις		
<i>A. westerdijkiae</i>	15	0.99	3.5	3.1	2.4	1.6	3.2
			5.5	2.7	2.2	1.8	2.5
		0.94	3.5	4.0	4.0	2.2	6.0
			5.5	3.6	3.7	2.5	5.2
	20	0.99	3.5	1.7	1.2	0.4	2.1
			5.5	1.6	1.0	0.8	1.2
		0.94	3.5	2.5	2.4	1.9	2.9
			5.5	2.4	1.9	1.4	2.6
	25	0.99	3.5	1.3	0.7	0.2	1.3
			5.5	1.3	0.9	0.7	1.1
		0.94	3.5	2.0	1.5	0.9	2.1
			5.5	2.1	1.1	0.9	1.4
30	0.99	3.5	1.5	1.1	0.5	1.9	
		5.5	0.9	0.7	0.4	1.0	
	0.94	3.5	1.9	1.4	0.8	2.3	
		5.5	1.8	1.0	0.8	1.3	
<i>A. carbonarius</i>	15	0.99	3.5	2.0	1.2	0.5	2.0
			5.5	1.8	1.2	0.4	2.3
		0.94	3.5	5.5	5.0	3.8	6.5
			5.5	5.1	4.9	4.3	5.7
	20	0.99	3.5	1.5	0.5	0.2	1.0
			5.5	1.4	0.5	0.3	0.8
		0.94	3.5	2.6	1.7	1.4	2.2
			5.5	2.3	1.8	1.4	2.3
	25	0.99	3.5	0.7	0.3	0.1	0.5
			5.5	0.6	0.2	0.0	0.4
		0.94	3.5	1.8	1.1	0.9	1.3
			5.5	1.8	1.1	0.9	1.2
30	0.99	3.5	0.5	0.2	0.1	0.4	
		5.5	0.5	0.2	0.1	0.3	
	0.94	3.5	1.3	0.7	0.5	1.0	
		5.5	1.3	0.7	0.5	1.0	
<i>P. verrucosum</i>	10	0.99	3.5	3.0	3.2	2.2	4.5
			5.5	2.7	1.8	1.1	2.7
		0.94	3.5 ^a	6.5	4.8	2.7	7.6
			5.5	5.5	2.1	0.4	4.9
	15	0.99	3.5	2.0	1.4	0.5	2.5
			5.5	1.8	1.4	1.0	1.7
		0.94	3.5	3.1	3.4	2.2	4.6
			5.5	3.3	3.2	2.4	4.1
	20	0.99	3.5	1.6	1.2	0.8	1.7
			5.5	1.5	0.7	0.6	0.9
		0.94	3.5	2.2	2.2	1.6	3.1
			5.5	2.1	2.0	1.5	2.6
25	0.99	3.5	1.5	1.1	0.9	1.3	
		5.5	1.4	0.7	0.3	1.2	
	0.94	3.5 ^b	2.0	N.G.	N.G.	N.G.	
		5.5	1.8	1.2	0.8	1.5	

^a Δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ

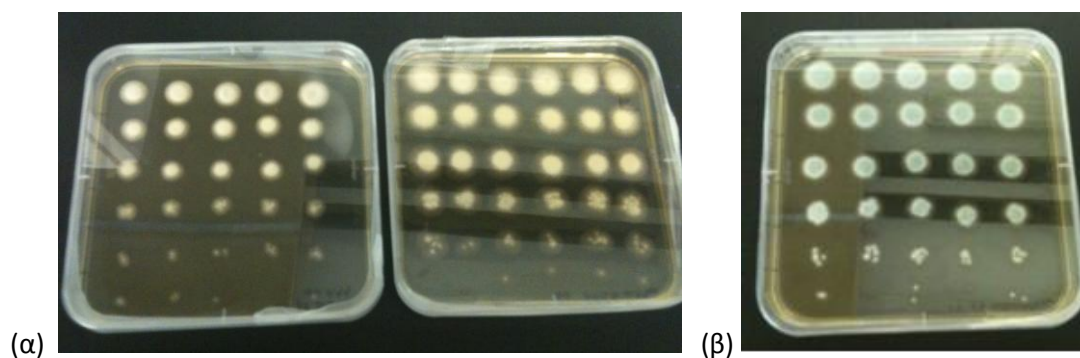
^b Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *P. verrucosum*



Γράφημα 5.11. Επίδραση του μεγέθους του αρχικού ενοφθαλμίσματος των (α) *A. westerdijkiae*, (β) *A. carbonarius* και (γ) *P. verrucosum* στο χρόνο εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (TTVG) κατά την ανάπτυξή τους σε ΜΕΑ με pH 3.5 ή 5.5 και a_w 0.99 ή 0.94 και επώαση τους 10, 15, 20, 25°C και 30°C.



Γράφημα 5.12. Ενδεικτικά παραδείγματα της γραμμικής συσχέτισης που παρατηρήθηκε μεταξύ του δεκαδικού λογαρίθμου του μεγέθους του αρχικού ενοφθαλμίσματος και του TTVG των (α) *A. westerdijkiae*, (β) *A. carbonarius* και (γ) *P. verrucosum*. Συνθήκες: pH 5.5 και α_w 0.94.



Εικόνα 5.4. Ενδεικτικά παραδείγματα τρυβλίων Petri (12 x 12mm) με MEA και των σημείων ενοφθαλμισμού των διαφορετικών συγκεντρώσεων ενοφθαλμίσματος των (α) *A. westerdijkiae* και (β) *P. verrucosum* με στόχο την εκτίμηση της απόδοσης του μοντέλου Monte Carlo ως προς την παράμετρο TTVG.

Πίνακας 5.5. Προβλεφθείσες και παρατηρηθείσες τιμές της παραμέτρου $t_{det\ OTA}$ (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για μεμονωμένα σπόρια.

Μύκητας	θ (°C)	Συνθήκες ανάπτυξης		Κατανομή				
		a_w	pH	Μέσος όρος τιμών		5%	95%	
				Παρατηρήσεις	Προβλέψεις			
<i>A. westerdijkiae</i>	15	0.99	3.5	20-22	15.5	11.3	20.0	
			5.5	24-26	19.2	16.1	22.4	
		0.94	3.5	20-21	19.7	15.1	24.8	
			5.5	22-24	19.9	17.3	22.8	
		20	0.99	3.5	22-25	13.8	9.9	19.4
				5.5	26-33	17.2	15.7	18.8
	0.94	3.5	19-21	14.1	12.2	16.0		
		5.5	25-28	17.9	15.6	20.5		
	25	0.99	3.5	8-11	9.6	6.5	13.6	
			5.5	14-16	9.7	8.9	10.5	
		0.94	3.5	10-12	8.1	6.4	10.0	
			5.5	19-20	10.9	9.7	12.3	
		30	0.99	3.5	26-28	15.8	11.4	21.2
				5.5	9-10	7.9	6.3	9.8
	0.94	3.5	8-11	8.4	6.6	10.5		
		5.5	10-17	5.9	5.1	6.7		
	<i>A. carbonarius</i>	15	0.99	3.5	7-10	7.9	4.8	11.2
				5.5	2-6	3.6	1.8	5.5
0.94			3.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
			5.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
20			0.99	3.5	4-5	3.9	2.6	5.3
				5.5	5-6	2.8	1.9	3.8
0.94		3.5	8-10	8.8	7.3	10.3		
		5.5	7-8	6.5	5.3	7.7		
25		0.99	3.5	5-6	2.5	1.8	3.3	
			5.5	4-5	2.2	1.5	2.8	
		0.94	3.5	8-10	10.0	9.1	10.9	
			5.5	5-6	6.0	5.2	6.8	
		30	0.99	3.5	4-5	3.1	2.6	3.7
				5.5	3-4	1.9	1.3	2.6
0.94		3.5	8-10	7.4	6.5	8.2		
		5.5	4-5	5.5	4.7	6.4		
<i>P. verrucosum</i>		10	0.99	3.5	16-22	16.3	12.3	20.8
				5.5	19-21	16.9	13.5	20.6
	0.94		3.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
			5.5	24-25	18.3	11.3	26.0	
	15		0.99	3.5	20-22	19.2	13.7	25.7
				5.5	8-11	8.7	6.5	11.1
	0.94	3.5	25-30	22.5	16.5	29.2		
		5.5	19-21	18.2	15.6	21.1		
	20	0.99	3.5	18-21	20.5	17.8	23.4	
			5.5	16-18	16.2	14.5	18.1	
		0.94	3.5	27-31	29.6	22.3	38.4	
			5.5	20-22	19.2	16.3	22.6	
		25	0.99	3.5	22-25	17.5	15.8	19.4
				5.5	16-18	18.6	13.4	26.5
	0.94	3.5	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.		
		5.5	16-24	17.7	15.3	20.5		

Πίνακας 5.6. Προβλεφθείσες τιμές της παραμέτρου $t_{det\ OTA}$ (ημέρες) από την προσομοίωση Monte Carlo για N_0 1-100 σπόρια.

Μύκητας	Θ ($^{\circ}\text{C}$)	Συνθήκες ανάπτυξης		Κατανομή		
		a_w	pH	Μέσος όρος	5%	95%
<i>A. westerdijkiae</i>	15	0.99	3.5	12.4	8.2	17.1
			5.5	16.4	13.3	19.5
		0.94	3.5	14.6	10.2	19.8
			5.5	15.3	12.4	18.5
	20	0.99	3.5	12.2	8.0	18.2
			5.5	16.0	14.4	17.6
		0.94	3.5	11.1	9.2	13.1
			5.5	15.5	13.3	18.2
	25	0.99	3.5	8.8	5.6	13.0
			5.5	8.6	7.8	9.4
		0.94	3.5	6.2	4.5	8.4
			5.5	9.4	8.2	10.9
30	0.99	3.5	14.4	10.0	20.0	
		5.5	7.1	5.4	9.0	
	0.94	3.5	6.7	4.8	9.0	
		5.5	4.5	3.8	5.4	
<i>A. carbonarius</i>	15	0.99	3.5	6.4	3.4	9.6
			5.5	2.3	1.1	3.8
		0.94	3.5	N.D.	N.D.	N.D.
			5.5	N.D.	N.D.	N.D.
	20	0.99	3.5	3.3	2.1	4.6
			5.5	2.2	1.4	3.1
		0.94	3.5	6.5	5.1	7.9
			5.5	4.2	3.1	5.3
	25	0.99	3.5	2.2	1.5	2.9
			5.5	1.8	1.2	2.5
		0.94	3.5	8.6	7.7	9.6
			5.5	4.6	3.9	5.4
30	0.99	3.5	2.8	2.4	3.3	
		5.5	1.6	1.1	2.2	
	0.94	3.5	6.4	5.7	7.1	
		5.5	4.6	3.8	5.4	
<i>P. verrucosum</i>	10	0.99	3.5	12.3	8.1	17.0
			5.5	14.5	11.1	18.4
		0.94	3.5 ^a	N.D.	N.D.	N.D.
			5.5	12.7	6.2	20.0
	15	0.99	3.5	17.1	11.3	23.7
			5.5	6.9	4.7	9.3
		0.94	3.5	18.1	11.8	25.0
			5.5	14.0	11.2	17.1
	20	0.99	3.5	19.0	16.3	22.1
			5.5	15.3	13.6	17.2
		0.94	3.5	26.9	19.5	36.0
			5.5	16.7	13.7	20.5
25	0.99	3.5	16.1	14.4	18.1	
		5.5	17.9	12.5	26.0	
	0.94	3.5 ^b	N.G.	N.G.	N.G.	
		5.5	16.1	13.6	19.0	

^a Δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ

^b Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *P. verrucosum*

5.4 Συζήτηση

Η επίδραση του μεγέθους του ενοφθαλμίσματος στην εκβλάστηση, την ανάπτυξη και την παραγωγή ΩΤΑ δεν έχει μελετηθεί τόσο όσο άλλοι ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες διαθέσιμες έρευνες έχουν μελετήσει τη μυκηλιακή ανάπτυξη ξεκινώντας από μεγάλο αριθμό σπορίων π.χ. $>10^3$ σπόρια/ g ή mL τροφίμου (Cupperts et al. 1997, Lahlali et al. 2005, 2006, Baert et al. 2007, Nevarez et al. 2009, Gougouli and Koutsoumanis 2010). Στην πράξη όμως η μείωση των τροφίμων από μύκητες όπως προαναφέρθηκε και στην εισαγωγή, συμβαίνει από χαμηλούς πληθυσμούς σπορίων ή ακόμα και από μεμονωμένα σπόρια. Ο παράγων, αρχικό μέγεθος ενοφθαλμίσματος, είναι εξαιρετικά σημαντικός και απαραίτητος κατά τη μοντελοποίηση παραμέτρων σχετιζόμενων με την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή της ΩΤΑ (Dantigny and Nanguy 2009, Sautour et al. 2003).

Η φάση της εκβλάστησης θεωρείται εξαιρετικά σημαντική μιας και, η αλλοίωση και η απόρριψη των προϊόντων από μύκητες ξεκινά από τη στιγμή της εμφάνισης ορατής μυκηλιακής υφής (Dantigny et al. 2005a). Είναι ευρύτερα γνωστό ότι τα σπόρια δεν εκβλαστάνουν ταυτόχρονα, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη μιας και καταγράφηκαν περιπτώσεις που στο ίδιο οπτικό πεδίο υπήρχαν σπόρια που είχαν και δεν είχαν εκβλαστήσει (Εικόνα 5.2). Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της a_w στο χρόνο και το ρυθμό αύξησης του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων. Η επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων, διέφερε ανάμεσα στα τρία είδη μυκήτων. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των *A. carbonarius* και *P.verrucosum*, ο χρόνος κατά τον οποίο ξεκινά το ποσοστό των εκβλαστηθέντων σπορίων να αυξάνει ήταν μεγαλύτερος με τη μείωση του pH, της θερμοκρασίας και της a_w . Αντίθετα, ο χρόνος αύξησης του ποσοστού των εκβλαστηθέντων σπορίων του *A. westerdijkiae*, ήταν μικρότερος στο pH 3.5, σε όλες τις θερμοκρασίες. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες κατέγραψαν την καθοριστική επίδραση αβιοτικών παραγόντων σε στελέχη του *Penicillium* sp. και του *A. ochraceus* (Marín et al. 1998, Pardo et al. 2004c). Ανάμεσα στους τρεις παράγοντες, καθοριστικότερη ήταν η επίδραση της a_w και κυρίως στην περίπτωση του *A. carbonarius*. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία και με άλλες έρευνες, οι οποίες αναφέρουν ότι μείωση της a_w συνεπάγεται μείωση του μέσου ρυθμού αύξησης του βλαστικού σωλήνα και αύξηση του μέσου χρόνου εκβλάστησης (germination time), μιας και αναστέλλεται το στάδιο της διόγκωσης του σπορίου λόγω περιορισμένης πρόσληψης νερού (Charlang and Horowitz 1971, Pascual 1998). Στο συνδυασμό pH 3.5, a_w 0.94 και θερμοκρασία 25°C δεν εκβλάστησε κανένα από τα μεμονωμένα σπόρια του *P.verrucosum* που παρατηρήθηκαν στα διαφορετικά οπτικά πεδία. Σύμφωνα με τους Pardo et al. (2006b), ως ελάχιστη τιμή a_w καταγράφηκε η 0.80. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σε καμία από τις συνθήκες που μελετήθηκαν, δεν εκβλάστησε όλος ο παρατηρούμενος πληθυσμός σπορίων (100%). Παρόμοια

ήταν τα ευρήματα και των Judet et al. (2008), κυρίως όμως σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης για τον *P. chrysogenum*. Αντίθετα, σύμφωνα με τις καμπύλες της ποσοστιαίας αύξησης των εκβλαστηθέντων σπορίων των *P. chrysogenum*, *Penicillium expansum* και *A. niger* συναρτήσκει του χρόνου επώασης, 100% του πληθυσμού των σπορίων εκβλάστησε, ανεξάρτητα από τις μελετώμενες συνθήκες (Dantigny et al. 2005b, Gougouli et al. 2011). Τέτοιου είδους διαφοροποιήσεις μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική μέθοδο λήψης του παρασκευάσματος για μικροσκοπική παρατήρηση των σπορίων αλλά και στα διαφορετικά είδη μυκήτων. Δεδομένου ότι η εκβλάστηση των σπορίων είναι το πρώτο στάδιο της αποίκησης των μυκήτων, εάν οι συνθήκες της a_w , του pH και της θερμοκρασίας είναι κοντά στα όρια καταπόνησης του εκάστοτε είδους μύκητα, είναι ένα σημαντικό βήμα πρόληψης της ανάπτυξης και κατά συνέπεια της παραγωγής ΩΤΑ.

Όσον αφορά στην ανάπτυξη, η χρήση χαμηλού αρχικού ενοφθαλμίσματος σε επίπεδο ενός σπορίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της διακύμανσης και των δύο παραμέτρων της ανάπτυξης, *RGR* και *TTVG*, και για τα τρία είδη μυκήτων. Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδεικνύει τη σημαντικότητα των πολλαπλών επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ώστε να καθοριστούν επιτυχώς οι παράμετροι της ανάπτυξης, υπό διαφορετικές συνθήκες. Η διακύμανση αυτή έχει παρατηρηθεί και κατά τον προσδιορισμό της φάσης προσαρμογής σε βακτήρια (Robinson et al. 2001, Francois et al. 2006). Επιπλέον, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η διακύμανση των *RGR* και *TTVG* μεμονωμένων σπορίων ήταν μεγαλύτερη σε οριακές συνθήκες για την ανάπτυξη (π.χ. χαμηλές τιμές θερμοκρασίας και a_w για τα δύο είδη *Aspergillus* sp.), υποδεικνύοντας ότι κάθε μεμονωμένο σπόριο αντιλαμβάνεται και αντιδρά διαφορετικά στις εκάστοτε συνθήκες καταπόνησης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Baert et al. (2008) κατά τη μελέτη της ανάπτυξης του *P. expansum* σε μήλα αλλά και οι Garcia et al. (2010) σε *in vitro* μελέτη του *A. carbonarius*. Επίσης, σύμφωνα με τους Samarundo et al. (2007), η κατανομή της φάσης προσαρμογής (lag time-αντίστοιχη του *TTVG*) μεμονωμένων σπορίων του *A. flavus* και του *Fusarium verticillioides* ήταν ευρύτερη κοντά σε οριακές συνθήκες ανάπτυξης. Ανάμεσα στα τρία είδη μυκήτων, τη μικρότερη διακύμανση, τόσο στον *RGR* όσο και στον *TTVG*, παρουσίασε ο *A. carbonarius*. Πιθανή ερμηνεία μπορεί να είναι ότι το εύρος των τιμών των οικολογικών παραγόντων που μελετήθηκαν δεν αποτελούν ισχυρή καταπόνηση για την ανάπτυξή του συγκριτικά με τα άλλα δύο είδη μυκήτων. Δεδομένου ότι οι κατανομές της παραμέτρου *TTVG*, ήταν ευρύτερες από τις αντίστοιχες της *RGR* και για τα τρία είδη μυκήτων, η διακύμανση του *TTVG* πιθανόν να σχετίζεται αναλογικά, με τη διακύμανση των χρόνων εκβλάστησης και του ρυθμού αύξησης των εκβλαστήσεων του εκάστοτε μεμονωμένου σπορίου. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από τα αποτελέσματα της παρόντος κεφαλαίου αλλά και από άλλες βιβλιογραφικές αναφορές (Dantigny et al. 2005a, Pardo et al. 2006b).

Επιπλέον, το μέγεθος του αρχικού ενοφθαλμίσματος στην παρούσα έρευνα είχε σημαντική επίδραση στον *TTVG* των τριών μυκήτων. Συγκεκριμένα, καταγράφηκε αύξηση του *TTVG* με τη μείωση του αρχικού ενοφθαλμίσματος ανεξάρτητα από τις μελετώμενες συνθήκες. Το παραπάνω αποτέλεσμα έχει επισημανθεί και για τους μύκητες *Mucor racemosus*, *P. expansum*, *A. carbonarius* και *P. chrysogenum* σε θρεπτικά υποστρώματα και τρόφιμα (Dantigny et al. 2002, Sautour et al. 2003, Baert et al. 2008, Garcia et al. 2010). Αξιοσημείωτο ήταν επίσης, ότι παρατηρήθηκε γραμμική σχέση μεταξύ του *TTVG* και του δεκαδικού λογάριθμου του μεγέθους του ενοφθαλμίσματος, παρατηρώντας μεγαλύτερη κλίση κοντά σε συνθήκες καταπόνησης (González et al. 1987). Παρόμοια γραμμική σχέση ανάμεσα όμως στο φυσικό λογάριθμο της φάσης προσαρμογής και στο δεκαδικό λογάριθμο του μεγέθους του ενοφθαλμίσματος αναφέρουν και οι Gougouli et al. (2012) για διαφορετικά είδη των γενών *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* και *Mucor*. Τέτοιες πιθανές συσχετίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του *TTVG* με μαθηματικό τρόπο, λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος του αρχικού ενοφθαλμίσματος και τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες.

Τα επίπεδα της ΩΤΑ από αποικίες, οι οποίες προέρχονταν από μεμονωμένα σπόρια και των τριών ειδών μυκήτων κυμάνθηκαν πάνω και κάτω από τα όρια της νομοθεσίας, ανεξάρτητα από τις μελετώμενες πειραματικές συνθήκες (2-10 ppb, Καν. ΕΚ 1881/2006), υποδεικνύοντας ότι ο κίνδυνος της ΩΤΑ παραμένει ακόμα και στην περίπτωση επιμόλυνσης με χαμηλό αρχικό ενοφθαλμισμό σποριών όπως της τάξης του ενός σπορίου. Ο μύκητας *P. verrucosum* παρήγαγε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ συγκριτικά με τα είδη του γένους *Aspergillus*, αποτέλεσμα το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες της παρούσας ομάδας χρησιμοποιώντας όμως υψηλότερο αρχικό πληθυσμό (Karpetanakou et al. 2009). Επιπλέον, κατά τη μελέτη των *A. westerdijkiae* και *P. verrucosum* καταγράφηκαν περιπτώσεις που κατά την ίδια δειγματοληψία υπήρχαν δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκε και άλλα που δεν ανιχνεύτηκε τοξίνη. Λαμβάνοντας υπόψη το παραπάνω αποτέλεσμα, μπορεί να υποτεθεί ότι ασφαλή και επισφαλής προϊόντα δύναται να βρεθούν στην ίδια παρτίδα υπό τις ίδιες συνθήκες μεταχείρισης και αποθήκευσης. Σημαντική παράμετρος αποδείχθηκε και η διάμετρος κατά την οποία η ΩΤΑ καθίσταται για πρώτη φορά ανιχνεύσιμη ($d_{det\ ΩΤΑ}$). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η $d_{det\ ΩΤΑ}$ ήταν μικρότερη σε συνθήκες καταπόνησης και για τα τρία είδη μυκήτων, υποδεικνύοντας την πιθανότητα ενεργοποίησης μηχανισμών σχετιζόμενων με την παραγωγή ΩΤΑ υπό συνθήκες συνδυαστικής θερμοκρασιακής, όξινης και ωσμωτικής καταπόνησης με στόχο την επιβίωση.

Οι παράμετροι *TTVG* και $t_{det\ ΩΤΑ}$ επιλέχθηκαν για μοντελοποίηση, μιας και θεωρήθηκαν οι καταλληλότερες για να παρέχουν μία πρώτη εκτίμηση των κινδύνων της ανάπτυξης των μυκήτων και της παραγωγής της ΩΤΑ, αντίστοιχα. Η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και της a_w στις προαναφερθέντες παραμέτρους μοντελοποιήθηκε με τη χρήση της προσομοίωσης Monte Carlo.

Αυτό το στοχαστικό μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την περιγραφή της επίδρασης στη κινητική της ανάπτυξης των βακτηρίων (Poschet et al. 2004, Standaert et al. 2005). Βασικό πλεονέκτημα των στοχαστικών μοντέλων είναι ότι λαμβάνουν υπόψη την παραλλακτικότητα μεταξύ των διαφορετικών σπορίων, μιας και οι ανεξάρτητες μεταβλητές που εισάγονται στο μοντέλο έχουν τη μορφή κατανομών, αλλά και οι προβλέψεις παρέχονται με την ίδια μορφή (Poschet et al. 2003, Koutsoumanis et al. 2010). Η εκτίμηση των μοντέλων Monte Carlo που αναπτύχθηκαν στο παρόν κεφάλαιο έγινε σε σύγκριση με πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν κατά τη χρήση διαφορετικών ενοφθαλμισμάτων (1 έως 10^5 σπόρια) σε ΜΕΑ στις ίδιες συνθήκες pH, a_w και θερμοκρασίας με αυτές των πειραμάτων με μεμονωμένα σπόρια. Οι μέσες τιμές των προβλέψεων των προσδιορισθείσων παραμέτρων από τα αναπτυχθέντα μοντέλα παρουσίασαν ικανοποιητική συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα, τόσο σε αρχικό ενοφθάλμισμα ενός σπορίου όσο και N_0 1-100 σπορίων. Οι μέσες προβλέψεις για την παράμετρο $TTVG$ ήταν πιο ακριβείς συγκριτικά με τις αντίστοιχες για τον $t_{det\ OTA}$, επισημαίνοντας τη δυσκολία της μοντελοποίησης παραμέτρων που σχετίζονται με την παραγωγή της ΩΤΑ. Παρόλα αυτά, οι παρατηρήσεις ήταν σχεδόν σε όλες τις πειραματικές περιπτώσεις εντός ή πολύ κοντά στο εύρος αξιοπιστίας της εκάστοτε προβλεφθείσας κατανομής, δηλαδή μεταξύ των ποσοστιμορίων 5 και 95%. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν καλή απόδοση των αναπτυχθέντων μοντέλων, λαμβάνοντας υπόψη τη σημαντική παράμετρο της παραλλακτικότητας στη συμπεριφορά των μεμονωμένων σπορίων (Dantigny et al. 2006, Samarundo et al. 2007). Μοντέλα με καλή απόδοση σαν τα προαναφερθέντα είναι δυνατόν να αναπτύξουν ή να ενισχύσουν στρατηγικές για τον έλεγχο της ανάπτυξης των ωχρατοξινογόνων μυκήτων και της παραγωγής της ΩΤΑ. Επιπλέον, η γνώση των παραμέτρων αυτών καθιστά εύκολη την απόρριψη ή την ανάκληση προϊόντων πριν ενταχθούν στην τροφική αλυσίδα, διασφαλίζοντας την υγεία του καταναλωτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Αναστολή της ανάπτυξης του *A. carbonarius* και μείωση της ΩΤΑ από την εφαρμογή μικτών καλλιεργειών βακτηρίων και ζυμών τεχνολογικής προέλευσης σε θρεπτικά υποστρώματα και ποτά

Karpetanakou et al. 2012, International Journal of Food Microbiology, Vol. 152, p. 91-99

6.1 Εισαγωγή

Οι ζύμες και τα βακτήρια (κυρίως τα οξυγαλακτικά), έχουν χαρακτηριστεί ως εξαιρετικής δυναμικής μικροβιακοί παράγοντες κατά την εφαρμογή τους με στόχο τη μείωση της ΩΤΑ (biocontrol agents). Η ιδιότητά τους αυτή οφείλεται κυρίως σε χαρακτηριστικά όπως: α) οι απλές διατροφικές απαιτήσεις, β) η ικανότητά τους να αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια ζυμωτικών διαδικασιών, γ) η παραγωγή μη τοξικών μεταβολιτών για τον άνθρωπο και δ) η ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν σε μεγάλο εύρος οικολογικών συνθηκών είτε ως μέρος της ενδογενούς χλωρίδας είτε προστιθέμενοι ως εναρκτήριες (starter cultures) ή προστατευτικές καλλιέργειες (protective cultures) (Wilson and Wisniewski 1989, Dalié et al. 2010).

Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί εξαιρετικά μεγάλος αριθμός μεμονωμένων στελεχών από βακτήρια και ζύμες, συσχετιζόμενων με ζυμώσεις τροφίμων, υποδεικνύοντας την παρεμποδιστική τους δράση έναντι ωχρατοξινογόνων μυκήτων ή την ικανότητά τους για μείωση της ΩΤΑ (Piotrowska and Zakowska 2005, Cecchini et al. 2006, Masoud and Høj Kaltoft 2006, Fuchs et al. 2008). Παρόλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι εναρκτήριες καλλιέργειες, υπάρχουσες ενδογενώς ή προστιθέμενες εξωγενώς, περιέχουν συχνά παραπάνω από ένα είδος ή στέλεχος, κρίνεται αναγκαία η μελέτη των μικροοργανισμών σε μικτές καλλιέργειες. Δεδομένου ότι τέτοιου είδους πληροφορίες είναι περιορισμένες στη βιβλιογραφία αλλά ταυτόχρονα απαραίτητες για τη διασαφήνιση, εάν η ικανότητα μικτών καλλιεργειών ειδών ή στελεχών να αναστείλουν την ανάπτυξη μυκήτων ή να μειώσουν την ΩΤΑ είναι αποτέλεσμα αθροιστικής ή ανταγωνιστικής συμπεριφοράς μεταξύ των ειδών ή των στελεχών.

Επιπλέον, η επίδραση παραγόντων όπως το pH, η a_w , η αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ, και η αρχική συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος (cfu/mL ή g τροφίμου) στη δυναμική των μικροοργανισμών για αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων και για μείωση της ΩΤΑ τόσο σε εργαστηριακά υποστρώματα όσο και σε τρόφιμα δεν έχει μελετηθεί επαρκώς (Bejaoui et al. 2004, Cecchini et al. 2006, Fuchs et al. 2008). Η γνώση της επίδρασης των προαναφερθέντων οικολογικών

παραγόντων στους εκάστοτε χρησιμοποιούμενους μικροοργανισμούς για τον έλεγχο της ΩΤΑ κρίνεται απαραίτητη εφόσον τέτοιες πληροφορίες μπορούν να φανούν χρήσιμες στην πρόληψη της ανάπτυξης των μυκήτων και της παραγωγής ΩΤΑ στο πολύπλοκο περιβάλλον των ζυμούμενων τροφίμων (π.χ. κρασί, μύρα, κ.ά.).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι στόχοι αυτού του κεφαλαίου ήταν η εκτίμηση (α) της ανταγωνιστικής δραστηριότητας μικτών καλλιιεργειών ζυμών και βακτηρίων τεχνολογικής προέλευσης στην ανάπτυξη του μύκητα *A. carbonarius* σε συνάρτηση με την a_w και διαφορετικούς συνδυασμούς αρχικών ενοφθαλμισμάτων μεταξύ μικτών καλλιιεργειών βακτηρίων ή ζυμών και μύκητα (κύτταρα έναντι σπορίων) και (β) της ικανότητας των προαναφερθείσων μικτών καλλιιεργειών για μείωση διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων της ΩΤΑ, χαμηλού ή υψηλού αρχικού ενοφθαλμίσματος κυττάρων, σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα διαφορετικού pH αλλά και σε ποτά όπως χυμός σταφυλιού, κόκκινο κρασί και μύρα.

6.1 Υλικά και μέθοδοι

6.1.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Αρχικά, εξετάσθηκε η ανταγωνιστική δράση μικτών καλλιιεργειών ζυμών και βακτηρίων τεχνολογικής μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη του μύκητα *A. carbonarius* σε συνάρτηση με τιμές a_w (0.98, 0.95 και 0.92) και διαφορετικούς συνδυασμούς αρχικών ενοφθαλμισμάτων μεταξύ βακτηρίων ή ζυμών και μύκητα (10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL και 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL) κατά την επώαση στους 25°C. Η παράμετρος αυτή μελετήθηκε με στόχο να εκτιμηθεί η ικανότητα των μικτών καλλιιεργειών να αναστείλουν τον *A. carbonarius* υπό διαφορετικές συνθήκες ανταγωνισμού.

Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η ικανότητα των προαναφερθείσων μικτών καλλιιεργειών ζυμών και βακτηρίων για μείωση δύο διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων της ΩΤΑ (50 και 100 ppb), σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα 4 διαφορετικών τιμών pH (3.0, 4.0, 5.0 & 6.1 ή 6.5) και 2 συγκεντρώσεις αρχικού ενοφθαλμίσματος κυττάρων (επώαση στους 30°C) αλλά και σε προϊόντα όπως χυμό σταφυλιού, κόκκινο κρασί και μύρα κατά τη συντήρησή τους στους 20°C. Οι συγκεντρώσεις της ΩΤΑ επιλέχθηκαν να είναι κοντά στην τάξη μεγέθους που ορίζει η νομοθεσία (2-80 ppb) (Commission Regulation 2006, Commission Regulation 2010). Κάθε πειραματική περίπτωση έγινε τουλάχιστον εις διπλούν ενώ πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα (n= 4-6).

Πίνακας 6.1. Η κωδικοποίηση των μικτών καλλιιεργειών των βακτηρίων και των ζυμών.

Είδη βακτηρίων	Κωδικός	Είδη ζυμών	Κωδικός
<i>Bacillus thuringiensis</i> (7)	BM	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Kluyveromyces dobzhankii</i> <i>Pichia fermentas</i> <i>Issatchekia occidentalis</i>	YM1
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (6)	PdM	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Issatchenkia terricola</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	YM2
<i>Streptococcus salivarius</i> (6)	SM	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Kazachstania hellenica</i> (2 στελέχη) <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	YM3
<i>Weissella cibaria</i> (8)	WM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Lachencea thermotolerans</i> <i>Issatchenkia orientalis</i>	YM4
<i>Lactobacillus sakei</i> (1) <i>Lactobacillus casei</i> (1)	LbM		
Όλα τα είδη βακτηρίων	29BM	Όλα τα είδη ζυμών	16YM

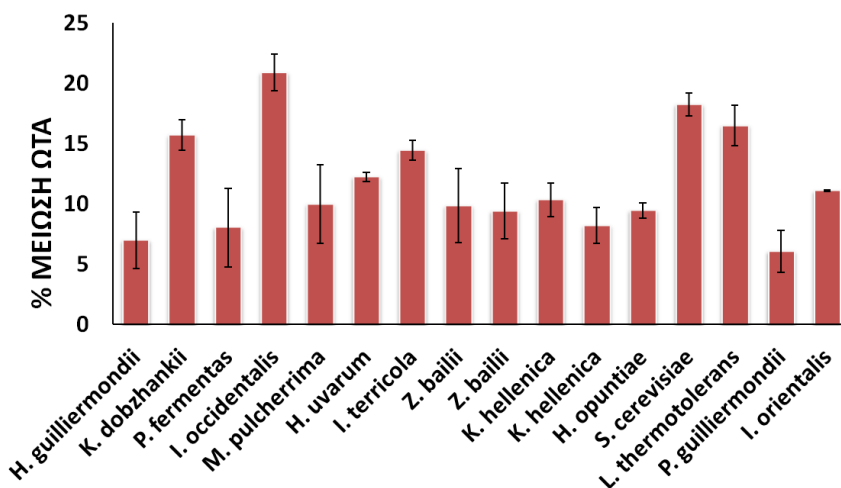
6.1.2 Επιλογή και ανακαλλιέργεια των μικροοργανισμών

α. Βακτήρια- Ζύμες

Είκοσι-εννέα (29) στελέχη βακτηρίων απομονώθηκαν από διαφορετικά προϊόντα ζωικής και φυτικής προέλευσης όπως αλλαντικά ζύμωσης, προζύμι, αλεύρι, γλυκάνισο, βασιλικό, ενώ δεκαέξι (16) στελέχη ζυμών απομονώθηκαν από διαφορετικές ποικιλίες κρασιού (βλ. Κεφ. 2.1, § 2.1.2, Πίνακας 2.2). Η αναζωογόνηση του εκάστοτε στελέχους των ζυμών και των βακτηρίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην § 2.2.2.

Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι κατά τον ενοφθαλμισμό με μεμονωμένα είδη ή στελέχη βακτηρίων και ζυμών η μείωση της ΩΤΑ ήταν 7-22% (Γράφημα 6.1). Λαμβάνοντας υπόψη ότι στις περισσότερες περιπτώσεις οι εναρκτήριες καλλιέργειες (στελέχη, που περιέχονται στην ενδογενή χλωρίδα ή προστίθενται εξωγενώς) αποτελούνται από περισσότερα του ενός είδους, αποφασίστηκε τα βακτήρια και οι ζύμες να μελετηθούν σε μικτές καλλιέργειες των 2-8 στελεχών και σε μικτή καλλιέργεια όλων των στελεχών ανά κατηγορία μικροοργανισμού (π.χ. 16YM και 29BM) (Maragkoudakis et al. 2009, Vermeiren et al. 2004). Συγκεκριμένα, τα στελέχη βακτηρίων και ζυμών χωρίστηκαν σε 5 (BM, PdM, SM, WM, LbM) και 4 (YM1, YM2, YM3, YM4) μικτές καλλιέργειες αντίστοιχα (Πίνακας 6.1). Τα βακτήρια ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με το γένος. Όσον αφορά τις ζύμες, η σύνθεση των μικτών καλλιιεργειών, επιλέχθηκε με βάση τα αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Οι παρατηρήσεις από τη μελέτη της Nisiotou et al. (2007) ελήφθησαν υπόψη για να αποφασιστεί ποιες μικτές καλλιέργειες θα μελετηθούν αλλά και

κάθε μίγμα να περιέχει στελέχη ή είδη απομονωμένα από διαφορετικές ποικιλίες κρασιού όπως Σέφκα, Μοσχοφίλερο, Μαυρολιάτης, και Λημνιό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (αρχή, μέση, τέλος) (Drosinos et al. 2007, Nisiotou et al. 2007, Paramithiotis et al. 2010) (βλ. Κεφ. 2.1, § 2.1.2, Πίνακας 2.2).



Γράφημα 6.1. Ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα *Yeast medium* με pH 6.5 και αρχική συγκέντρωση ΩΤΑ 100 ppb μετά από ενοφθαλμισμό με μεμονωμένα στελέχη ζυμών και επώαση στους 30°C για 2 ημέρες.

β. Μύκητας

Ο μύκητας που επιλέχθηκε να μελετηθεί στο παρόν κεφάλαιο ήταν ο *A. carbonarius* (Κεφ. 2.1, § 2.1.1). Η αναζωογόνηση του μύκητα και η συλλογή των σπορίων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην § 2.2.1.

6.1.3 Μελέτη της αναστολής του *A. carbonarius*

Η αναστολή του *A. carbonarius* μελετήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα Synthetic Grape Medium (SGM) (βλ. Κεφ. 2, § 2.3γ). Το υλικό αυτό, επιλέχθηκε μιας και προσομοιάζει επαρκώς τον αυθεντικό χυμό σταφυλιού αλλά και διασφαλίζει την ποσοτικοποίηση της αναστολής του μύκητα από μικτές καλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες (π.χ. οξύτητα, ιονική ισχύς, συγκέντρωση υδρογονανθράκων κ.ά.). Επιπρόσθετο πλεονέκτημα του SGM είναι ότι καθιστά ευκολότερη την παρατήρηση της ζώνης αναστολής που σχηματίζεται από τις ακινητοποιημένες αποικίες των βακτηρίων και των ζυμών με αποτέλεσμα την ακριβή ποσοτικοποίηση της αναστολής του μύκητα (διάμετρος αποικίας- colony diameter) σε σχέση με ένα θολό, φυσικό υπόστρωμα όπως ο χυμός σταφυλιού (Belli et al. 2005, Tassou et al. 2009).

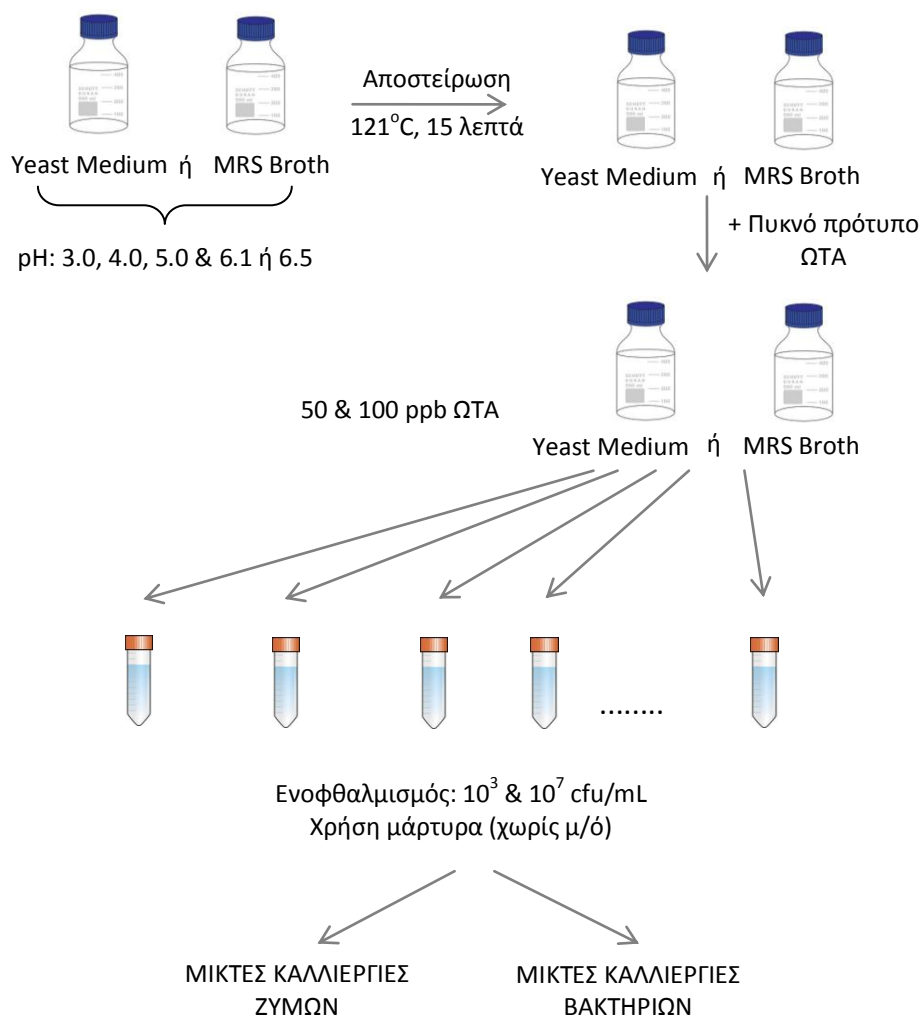
Έξι mL από το SGM με 0.7% άγαρ και 1 mL από κάθε μικτή καλλιέργεια ζυμών ή βακτηρίων αναμίχθηκαν και στη συνέχεια ακολούθησε επιφανειακή επίστρωση (pour) σε 15 mL του στερεοποιημένου υλικού SGM (2.5% άγαρ) (Bleve et al. 2006). Οι διαφορές στην a_w από την προσθήκη των αιωρημάτων των μικτών καλλιεργειών των ζυμών και των βακτηρίων καταγράφηκαν σε προκαταρκτικά πειράματα και ελήφθησαν υπόψη ώστε να εξισορροπηθούν με την προσθήκη των απαραίτητων ποσοτήτων γλυκερόλης. Ακολούθως, συγκεκριμένες ποσότητες αιωρήματος σπορίων του *A. carbonarius* ενοφθαλμίστηκαν στο κέντρο και την επιφάνεια του άγαρ. Οι τρεις διαφορετικοί συνδυασμοί των αρχικών ενοφθαλμισμάτων των μικτών καλλιεργειών βακτηρίων ή ζυμών και του *A. carbonarius* που μελετήθηκαν ήταν, 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL, και 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL. Ο όγκος του ενοφθαλμίσματος του *A. carbonarius* ήταν πολύ μικρός ώστε να μη προκληθούν αλλαγές στην τιμή της a_w του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, 22 μ L από 10^5 σπόρια/mL MRD και 10^8 σπόρια/mL MRD (συμπυκνωμένο ενοφθάλμισμα) χρησιμοποιήθηκαν ώστε να παρασκευαστούν οι συγκεντρώσεις 10^2 και 10^5 σπόρια/mL SGM αντίστοιχα. Δείγματα, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν μόνο με τον εν λόγω μύκητα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν για 5 ημέρες στους 25°C. Σύμφωνα με μελέτες, η θερμοκρασία των 25°C θεωρείται η ευνοϊκότερη για την ανάπτυξη του στελέχους *A. carbonarius* ATHUM 5659 (Tassou et al. 2009, Karetanakou et al. 2010). Η αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα προσδιορίστηκε μετά το πέρας της επώασης, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{ Αναστολή} = 1 - \frac{\text{Διάμετρος του μύκητα σε SGM με μικροοργανισμούς}}{\text{Διάμετρος του μύκητα σε SGM χωρίς μικροοργανισμούς}} \times 100 \quad (6.1)$$

6.1.4 Μελέτη της μείωση της ΩΤΑ

α. Θρεπτικά υποστρώματα

Το δυναμικό των μικτών καλλιεργειών των ζυμών και των βακτηρίων για μείωση της ΩΤΑ προσδιορίστηκε στα υγρά θρεπτικά υλικά YM και MRS αντίστοιχα (βλ. Κεφ. 2, § 2.3 (δ)). Δεδομένου ότι διαφορετικά είδη μυκήτων είναι δυνατόν να παράγουν ΩΤΑ σε διαφορετικά τρόφιμα, π.χ. ο *A. carbonarius* στο κρασί και στο χυμό σταφυλιού και οι *Penicillium verrucosum* ή *A. westerdijkiae* στα σιτηρά και κατά συνέπεια σε ποτά όπως η μπύρα, προτιμήθηκε να προστεθεί η ΩΤΑ στα υγρά θρεπτικά υποστρώματα αντί να ενοφθαλμιστούν μύκητες ικανοί να παράγουν την εν λόγω τοξίνη. Συγκεκριμένα, μετά την αποστείρωση, ο απαραίτητος όγκος θρεπτικών υλικών ενοφθαλμίστηκε με πυκνό διάλυμα της ΩΤΑ, ώστε να παραχθούν δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις τοξίνης, 50 και 100 ppb. Πέντε mL από τα δύο θρεπτικά υποστρώματα μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε αποστειρωμένους, πλαστικούς περιέκτες των 15 mL.



Σχήμα 6.1. Πειραματικός σχεδιασμός του *in vitro* πειράματος.

Κάθε είδος από τα 29 βακτήρια και τις 16 ζύμες ανανεώθηκαν ξεχωριστά, φυγοκεντρήθηκαν, καθαρίστηκαν εις διπλούν και επαναιωρήθηκαν σε MRD (βλ. Κεφ. 2, § 2.2.2). Μετά την επαναιώριση, οι μικτές καλλιέργειες παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους Πίνακες 6.1 χρησιμοποιώντας ίσους όγκους από κάθε είδος ή στέλεχος. Πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις ώστε να παρασκευαστεί ένα χαμηλό (10^3 cfu/mL) και ένα υψηλό (10^7 cfu/mL) αρχικό ενοφθάλμισμα, με στόχο να μελετηθεί εάν η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων των ζυμών και των βακτηρίων δύναται να επηρεάσει την ικανότητά τους για μείωση της ΩΤΑ. Τα αιωρήματα των μικτών καλλιεργειών ζυμών και βακτηρίων φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου και τα κύτταρα τελικά επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα διαφορετικών τιμών pH εμπλουτισμένων με ΩΤΑ (50 και 100 ppb). Ο ενοφθαλμισμός των θρεπτικών υποστρωμάτων που περιείχαν τοξίνη, δεν έγινε με την προσθήκη όγκου ενοφθαλμίσματος ώστε να μην αραιωθεί η τελική συγκέντρωση της ΩΤΑ. Η επώαση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους 30°C, θερμοκρασία ευνοϊκή και για τα δύο είδη

μικροοργανισμών. Η διάρκεια της επώασης καθορίστηκε από προκαταρκτικά πειράματα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), τα οποία υπέδειξαν ότι η μέγιστη μείωση της ΩΤΑ παρουσιάστηκε την 2^η ημέρα για τις ζύμες και την 5^η ημέρα για τα βακτήρια. Δείγματα τα οποία περιείχαν 50 ή 100 rpb ΩΤΑ, αλλά χωρίς μικροοργανισμούς (ζύμες ή βακτήρια) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στοχεύοντας στον υπολογισμό του ποσοστού μείωσης της ΩΤΑ. Αντίθετα οι αρνητικοί μάρτυρες περιείχαν μικροοργανισμούς χωρίς όμως την παρουσία ΩΤΑ ώστε να μετράται και να επαληθεύεται η αρχική συγκέντρωση κυττάρων σε κάθε περίπτωση (cfu/mL).

β. Ποτά

Σε όγκους ποτών (200 mL) όπως χυμός σταφυλιού (pH 3.3 και a_w 0.96), κόκκινο κρασί (pH 3.6 και a_w 0.96) και μπύρα (pH 4.4 και a_w 0.97) του εμπορίου προστέθηκαν περίπου 2 mL από πυκνό διάλυμα ΩΤΑ, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 100 rpb ΩΤΑ (Πίνακας 5.3). Η επιλογή των ποτών έγινε κυρίως λόγω της συχνής ανίχνευσης ΩΤΑ αλλά και της ευρείας κατανάλωσής τους. Συγκεκριμένα, ο χυμός σταφυλιού αποτελεί ένα προϊόν ειδικής κατηγορίας μιας και καταναλώνεται ευρέως από παιδιά. Γι' αυτόν το λόγο είναι σημαντικό να βρεθούν τρόποι μείωσης της πιθανής εμφάνισης της ΩΤΑ στο προαναφερθέν προϊόν. Ορισμένα από τα είδη που μελετήθηκαν π.χ. ο *Pediococcus pentosaceus*, οι δύο *Lactobacilli*, οι *Streptococcus* sp. και ο *Saccharomyces cerevisiae* έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως προστατευτικές καλλιέργειες (protective cultures) ζυμούμενων (π.χ. κρασί και μπύρα) ή μη τροφίμων (π.χ. χυμός σταφυλιού) (Vermeiren et al. 2004, Legras et al. 2007, Magagkoudakis et al. 2009). Αυτού του είδους τα βακτήρια ή οι ζύμες έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα κατά αλλοιογόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς να μεταβάλουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου (Gaggia et al. 2011). Όλα τα προϊόντα δεν παστεριώθηκαν ώστε να μελετηθεί και ο ρόλος της ενδογενούς μικροχλωρίδας. Σε κάθε ποτό, προστέθηκε η μικτή καλλιέργεια 16YM ή 29BM σε επίπεδο 10^7 cfu/mL. Η προετοιμασία των ενοφθαλμισμάτων και η προσθήκη τους στα ποτά πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παράγραφο § 6.1.4α. Ένας αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή τρόφιμο στο οποίο έχει γίνει προσθήκη ΩΤΑ αλλά χωρίς μικροοργανισμούς, χρησιμοποιήθηκε για να διασφαλιστεί ότι η μείωση της ΩΤΑ οφείλεται στους μικροοργανισμούς που ενοφθαλμίστηκαν και όχι στην εκάστοτε ενδογενή μικροχλωρίδα των τροφίμων.

Δεδομένου ότι οι ωχρατοξινογόνοι μύκητες εμφανίζονται κυρίως είτε στο χωράφι (πριν την συγκομιδή, pre-harvest) είτε κατά την αποθήκευση (μετά τη συγκομιδή, post-harvest), η ΩΤΑ αποτελεί πρόβλημα πρωταρχικά στις πρώτες ύλες (Hocking et al. 2007, Duarte et al. 2010). Παρόλα αυτά, η ΩΤΑ είναι δυνατόν να ανιχνευθεί κατά τη ζύμωση για την παραγωγή του κρασιού ή της μπύρας και κατά την αποθήκευση των τελικών προϊόντων (Mateo et al. 2007). Υποθέτοντας ότι οι πρώτες ύλες όπως τα σταφύλια ή το κριθάρι έχουν επιμολυνθεί από ωχρατοξινογόνους μύκητες και

ότι μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση (κρασί), την επεξεργασία (χυμός σταφυλιού), ή τη ζυθοποίηση (μπύρα), οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις της ΩΤΑ στα τελικά προϊόντα ήταν πάνω από τα όρια της νομοθεσίας, οι ζύμες και τα βακτήρια προστέθηκαν στα τελικά προϊόντα ως προστατευτικές καλλιέργειες, ώστε να εκτιμηθεί εάν είναι δυνατόν να μειώσουν πιθανή προ-υπάρχουσα τοξίνη, κατά την αποθήκευση των προϊόντων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα τρία τρόφιμα συνήθως συντηρούνται σε συνθήκες περιβάλλοντος πριν το άνοιγμα της συσκευασίας, μάρτυρες και ενοφθαλμισμένα δείγματα συντηρήθηκαν στους 25°C. Επιπλέον στόχος ήταν η εκτίμηση της πιθανότητας οι προτεινόμενες μικτές καλλιέργειες να είναι αποτελεσματικές στη μείωση της ΩΤΑ υπό τις άριστες συνθήκες και στη συνέχεια περαιτέρω έρευνες δύναται να ακολουθήσουν για βελτιστοποίηση του χρόνου και της θερμοκρασίας της αποθήκευσης, που θα αποφέρουν τη μέγιστη μείωση της τοξίνης.

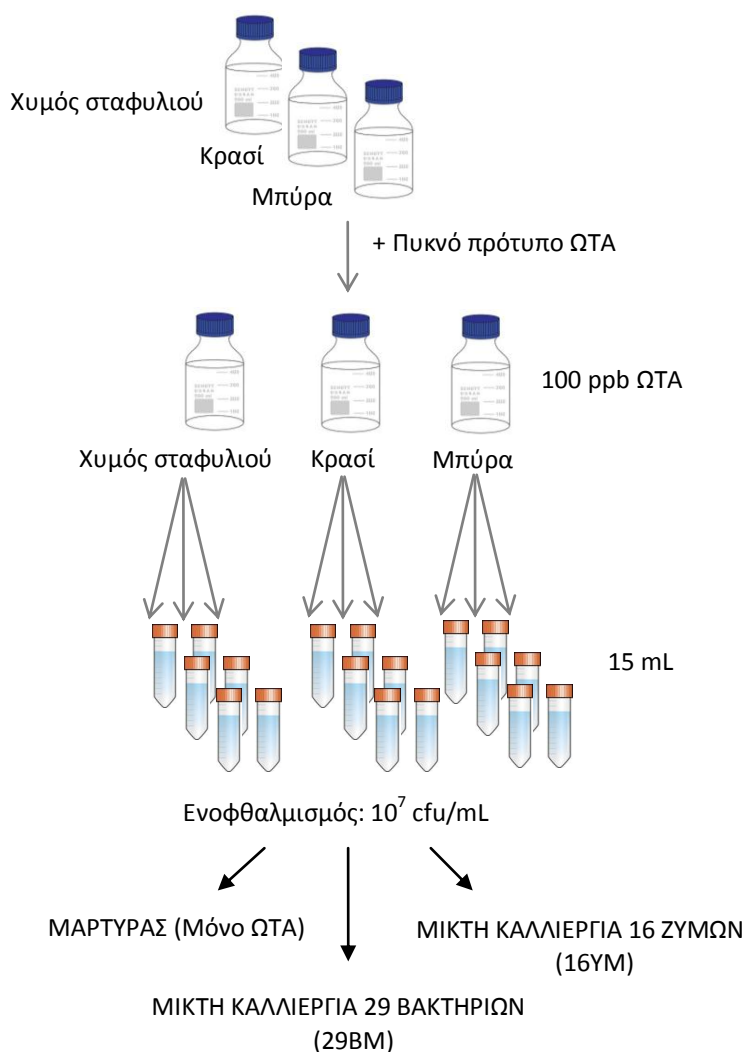
Πίνακας 6.2. Σύσταση και βασικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ποτών.

* Ποτά	Συστατικά	pH	a _w	Αλκοόλη (% κ.ό.)
Χυμός σταφυλιού	Νερό, χυμός σταφυλιού (20%), ζάχαρη, κιτρικό οξύ	3.3	0.96	--
Κόκκινο κρασί	--	3.6	0.96	12
Μπύρα	Νερό, κριθάρι, βύνη, λυκίσκος, μαγιά	4.4	0.97	5

* Χωρίς συντηρητικά

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν την 0^η, 2^η, και 5^η ημέρα. Όλα τα πειράματα έγιναν εις διπλούν και τουλάχιστον δύο δείγματα πραγματοποιήθηκαν για κάθε επανάληψη. Το ποσοστό μείωσης της ΩΤΑ υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$\% \text{ Μείωση } \Omega\text{T}\text{A} = 1 - \frac{C_{\Omega\text{T}\text{A}} \text{ δείγματος}}{C_{\Omega\text{T}\text{A}} \text{ μάρτυρα}} \times 100 \quad (6.2)$$

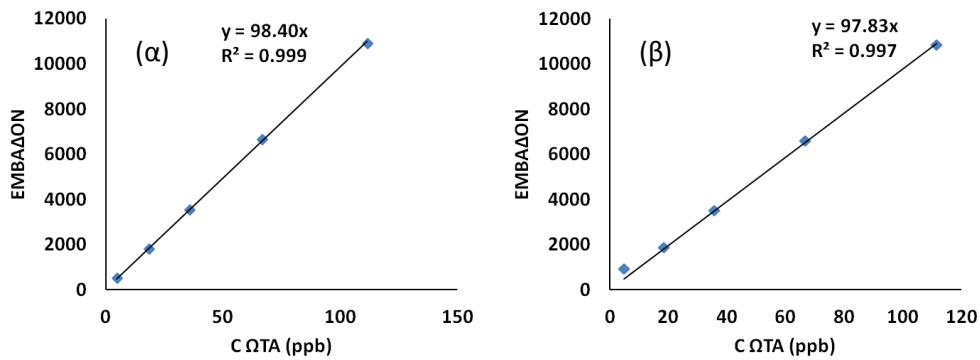


Θερμοκρασία επώασης: 25°C
 Ημέρες δειγματοληψίας: 0^η, 2^η, 5^η

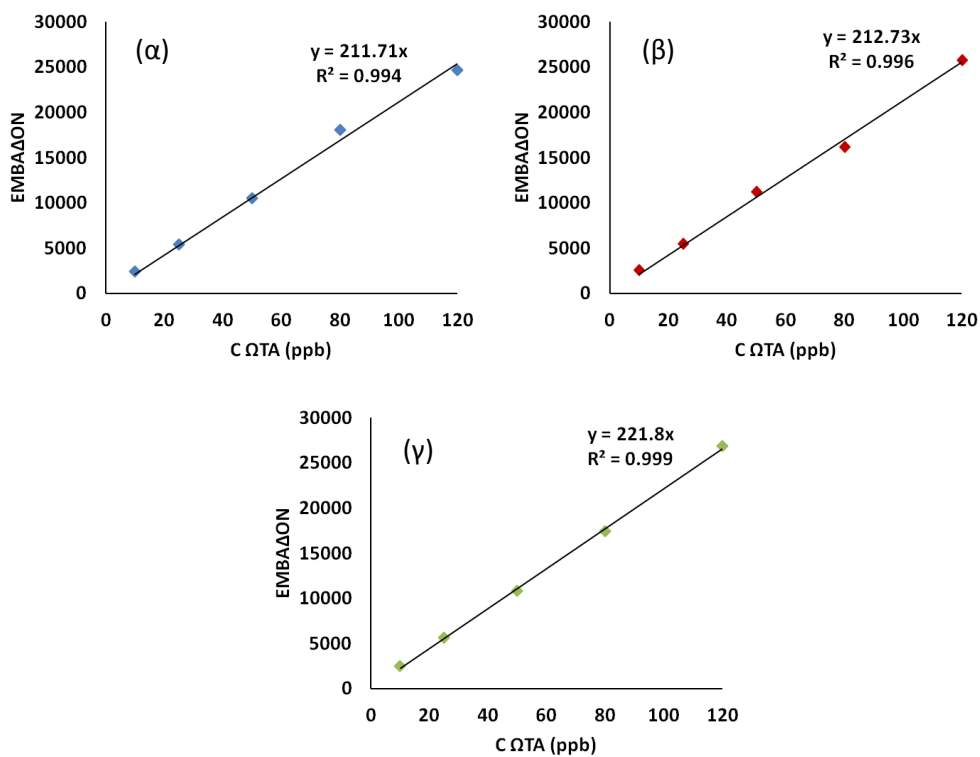
Σχήμα 6.2. Πειραματικός σχεδιασμός του *in situ* πειράματος.

6.1.5 Ανίχνευση της ΩΤΑ με HPLC- FLD

Μετά το πέρας της επώασης, όλα τα δείγματα (υγρά θρεπτικά υποστρώματα και ποτά) φυγοκεντρήθηκαν (3000g, 4°C, 20 λεπτά) και τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν για τον προσδιορισμό της ΩΤΑ. Και στα δύο πειράματα, η εκχύλιση της ΩΤΑ και ο καθαρισμός των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.5.2.1. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ έγινε με τη χρήση HPLC σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.5.2.2. Κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες τόσο για τα θρεπτικά υποστρώματα όσο και για τα ποτά στο εύρος 0-120 ppb (Γραφήματα 6.2, 6.3).



Γράφημα 6.2. Οι πρότυπες καμπύλες των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων (α) *Yeast Medium* και (β) *MRS* που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ στο *in vitro* πείραμα.



Γράφημα 6.3. Οι πρότυπες καμπύλες (α) του χυμού σταφυλιού, (β) του κόκκινου κρασιού και (γ) της μέγυρας που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ στο *in situ* πείραμα.

Πίνακας 6.3. Ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ μετά από φόρτιση των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων και των τριών τροφίμων με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ.

	Ανάκτηση (%)			
	Συγκέντρωση ΩΤΑ (ppb)			
	5	10	50	80
Yeast Medium	112.9		87.7	
MRS	106.6		91.9	
Χυμός σταφυλιού		114.4		106.5
Κόκκινο κρασί		118.7		95.0
Μπύρα		111.6		98.2

6.1.6 Μετρήσεις pH, a_w και Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας

Την 0η ημέρα, 1 mL από κάθε δείγμα τροφίμου (μάρτυρες και ενοφθαλμισμένα) χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση του αρχικού ενοφθαλμίσματος και της ενδογενούς μικροχλωρίδας κάθε ποτού. Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του pH και της ΟΜΧ των τροφίμων. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο της μετασποράς σύμφωνα με την παράγραφο § 2.4.2α.

6.1.7 Στατιστική ανάλυση

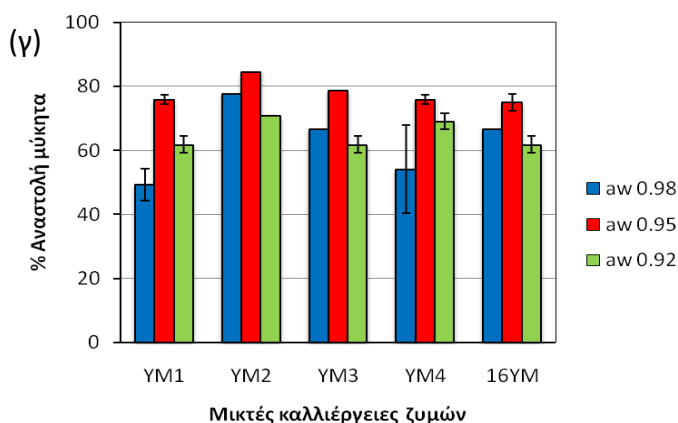
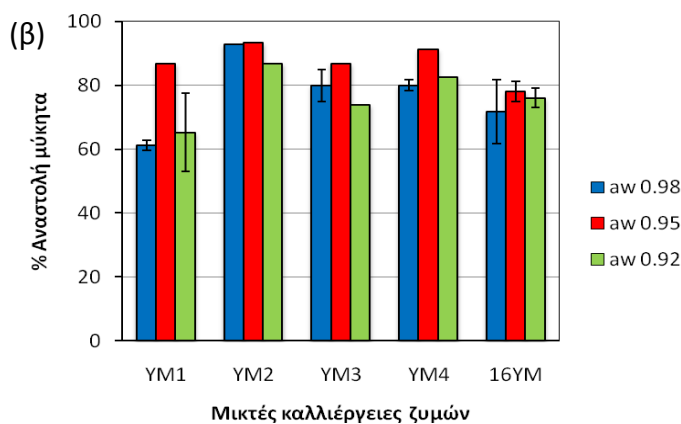
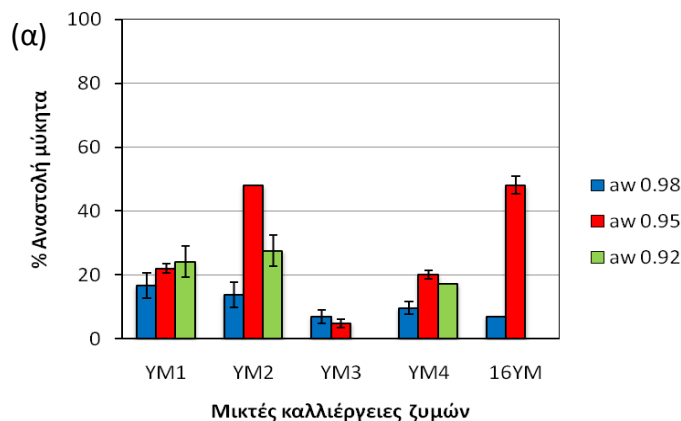
Η στατιστική ανάλυση της αναστολής της ανάπτυξης του *A. carbonarius* και της μείωσης της ΩΤΑ έγινε σύμφωνα με την § 2.6.

6.2 Αποτελέσματα

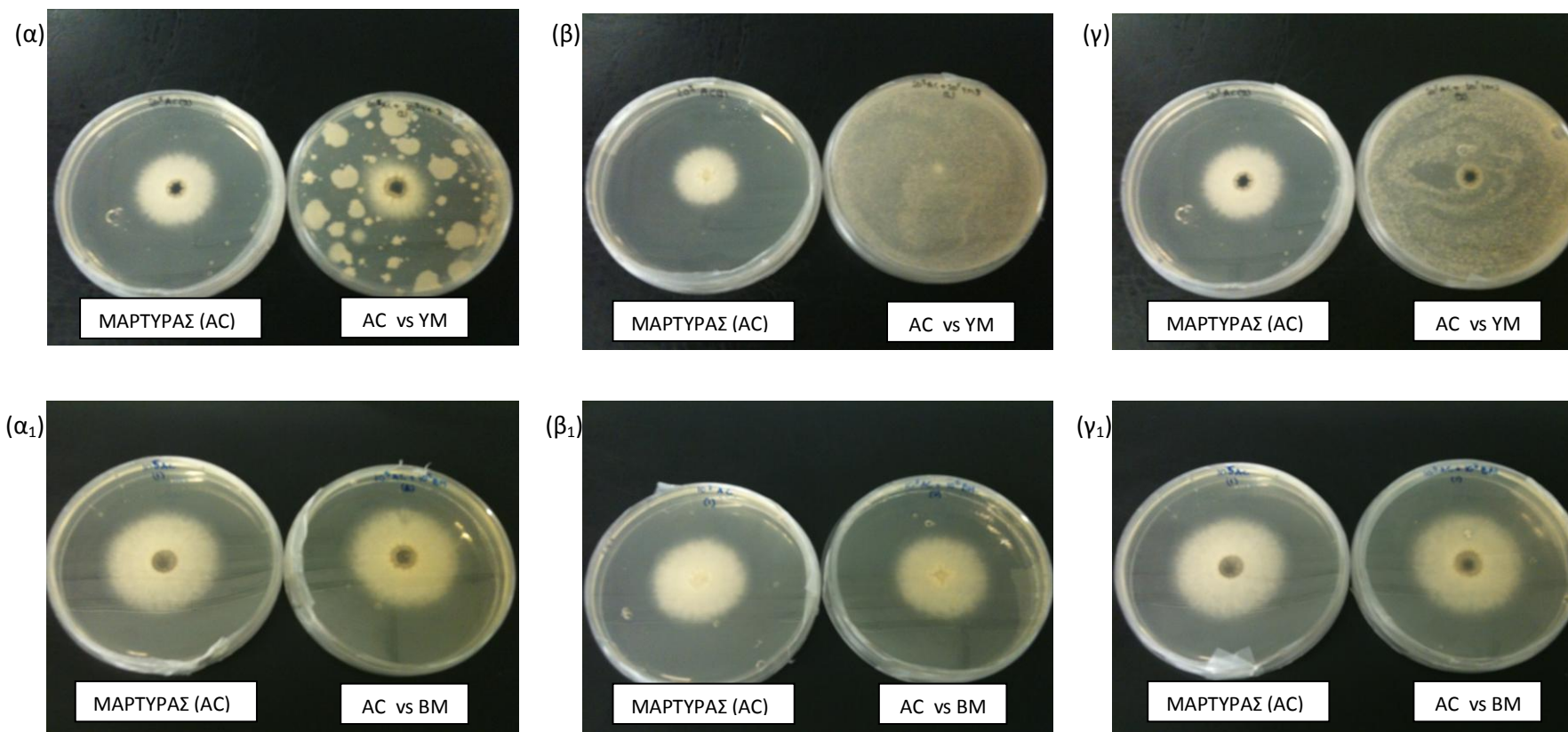
6.2.1 Αναστολή μύκητα

Το χαμηλό pH του SGM (pH 3.5) δεν επέτρεψε στις μικτές καλλιέργειες των βακτηρίων να αναπτυχθούν και να αναστείλουν την ανάπτυξη του *A. carbonarius*. Λόγω της τελευταίας παρατήρησης η μελέτη της αναστολής του εν λόγω μύκητα επικεντρώθηκε στις μικτές καλλιέργειες των ζυμών. Η ανάπτυξη του μύκητα παρεμποδίστηκε από τους συνδυασμούς αρχικών ενοφθαλμισμάτων ζυμών/*A. carbonarius* σύμφωνα με τη σειρά: 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL (61-93%) > 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL (49-85%) > 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL (0-48%), ανεξαρτήτως της μικτής καλλιέργειας των ζυμών (Γράφημα 6.4). Η μέγιστη αναστολή του μύκητα παρατηρήθηκε στην a_w 0.95, από σχεδόν όλες τις μικτές καλλιέργειες ζυμών και τους συνδυασμούς των αρχικών ενοφθαλμισμάτων ζυμών/μύκητα. Επιπλέον, ο ρυθμός ανάπτυξης του *A. carbonarius* μειωνόταν και ο *TTVG* αυξανόταν με τη μείωση της a_w του υποστρώματος σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις (Γράφημα 6.5). Οι μακροσκοπικές (οπτικές) παρατηρήσεις υπέδειξαν ότι στο χαμηλό ενοφθάλμισμα των μικτών καλλιεργειών των ζυμών (10^2 cfu/mL), οι αποικίες εμφανίστηκαν μεμονωμένα (Εικόνα

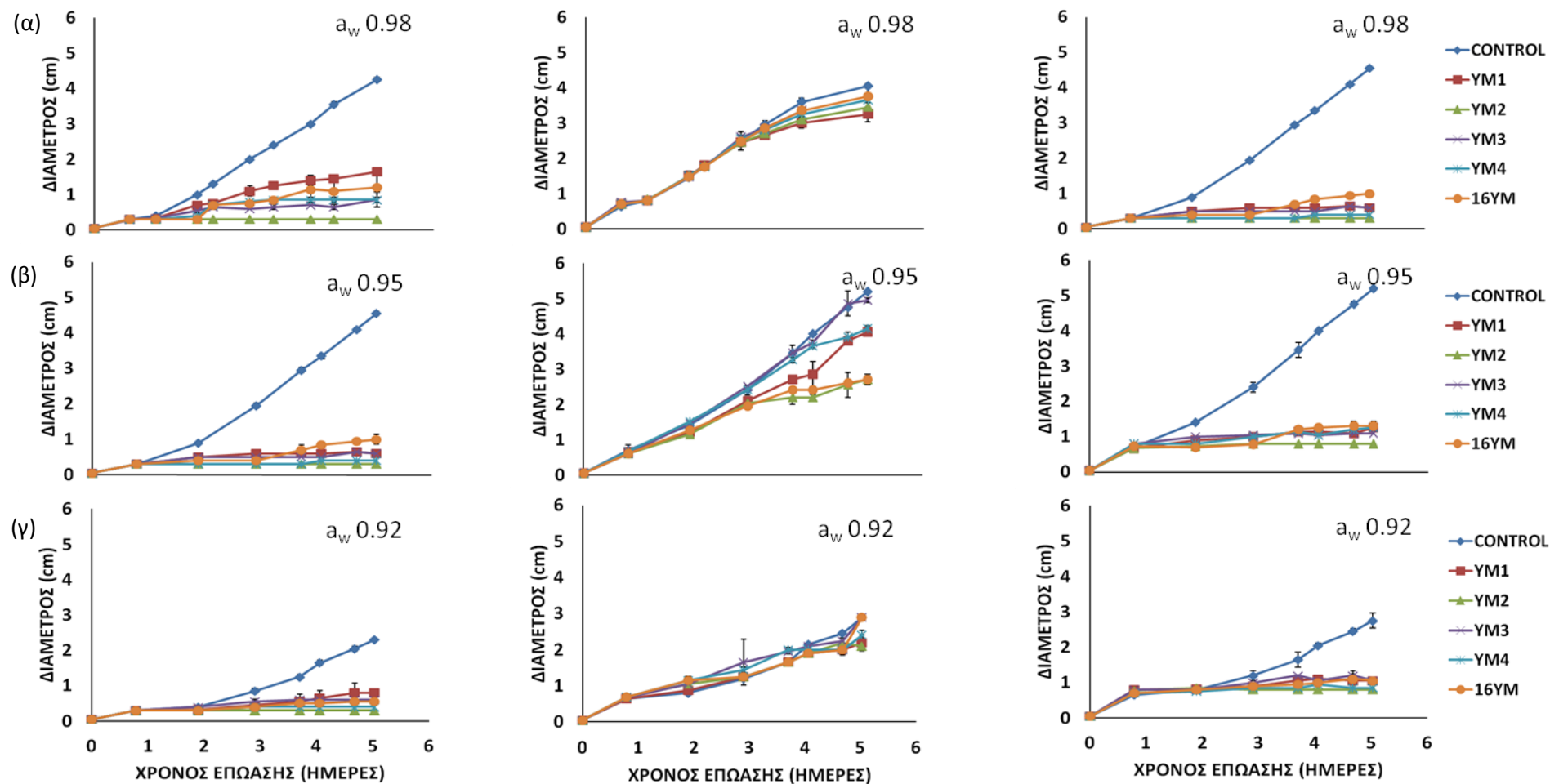
6.1), ενώ στα υψηλά επίπεδα ενοφθαλισμάτων (10^5 cfu/mL), αμέτρητος αριθμός αποικιών σχημάτιζαν μία ενιαία στρώση στην επιφάνεια του άγαρ, σχηματίζοντας κατά συνέπεια μία ξεκάθαρη ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα (Εικόνα 6.1β και γ).



Γράφημα 6.4. Ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης του *A. carbonarius* σε SGM (pH 3.5; a_w 0.98, 0.95 και 0.92), μετά από ενοφθαλισμό μικτών καλλιεργειών ζυμών (YM1, YM2, YM3, YM4, 16YM) και επώαση στους $25^\circ C$ για 5 ημέρες. Μελετήθηκαν διαφορετικές αναλογίες αρχικών ενοφθαλισμάτων ζυμών και μύκητα: (α) 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, (β) 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL και (γ) 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL.



Εικόνα 6.1. Οπτική παρατήρηση της ζώνης αναστολής του *A. carbonarius* (AC) λόγω της ανάπτυξης των μικτών καλλιεργειών ζυμών (YM) (α , β , γ) και βακτηρίων (BM) (α_1 , β_1 , γ_1) (δεξιά τρυβλία) σε SGM (pH 3.5, a_w 0.98) συγκριτικά με τους μάρτυρες (ενοφθαλμισμός μόνο με *A. carbonarius*) (αριστερά τρυβλία) κατά την επώαση στους $25^\circ C$. Οι διαφορετικές αναλογίες του αρχικού ενοφθαλμίσματος ζυμών και βακτηρίων σε σχέση με τη συγκέντρωση σπορίων του μύκητα ήταν: (α , α_1) 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, (β , β_1) 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL και (γ , γ_1) 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL.



Γράφημα 6.5. Γραφική απεικόνιση της αναστολής της ανάπτυξης του *A. carbonarius* συγκαλλιεργούμενου με μικτές καλλιέργειες ζυμών σε SGM (pH 3.5; a_w 0.98, 0.95 και 0.92) μετά από επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Οι διαφορετικές αναλογίες του αρχικού ενοφθαλμίσματος των ζυμών σε σχέση με τη συγκέντρωση σποριών του μύκητα ήταν: (α) 10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, (β) 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL και (γ) 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL.

6.2.2 Μείωση της ΩΤΑ

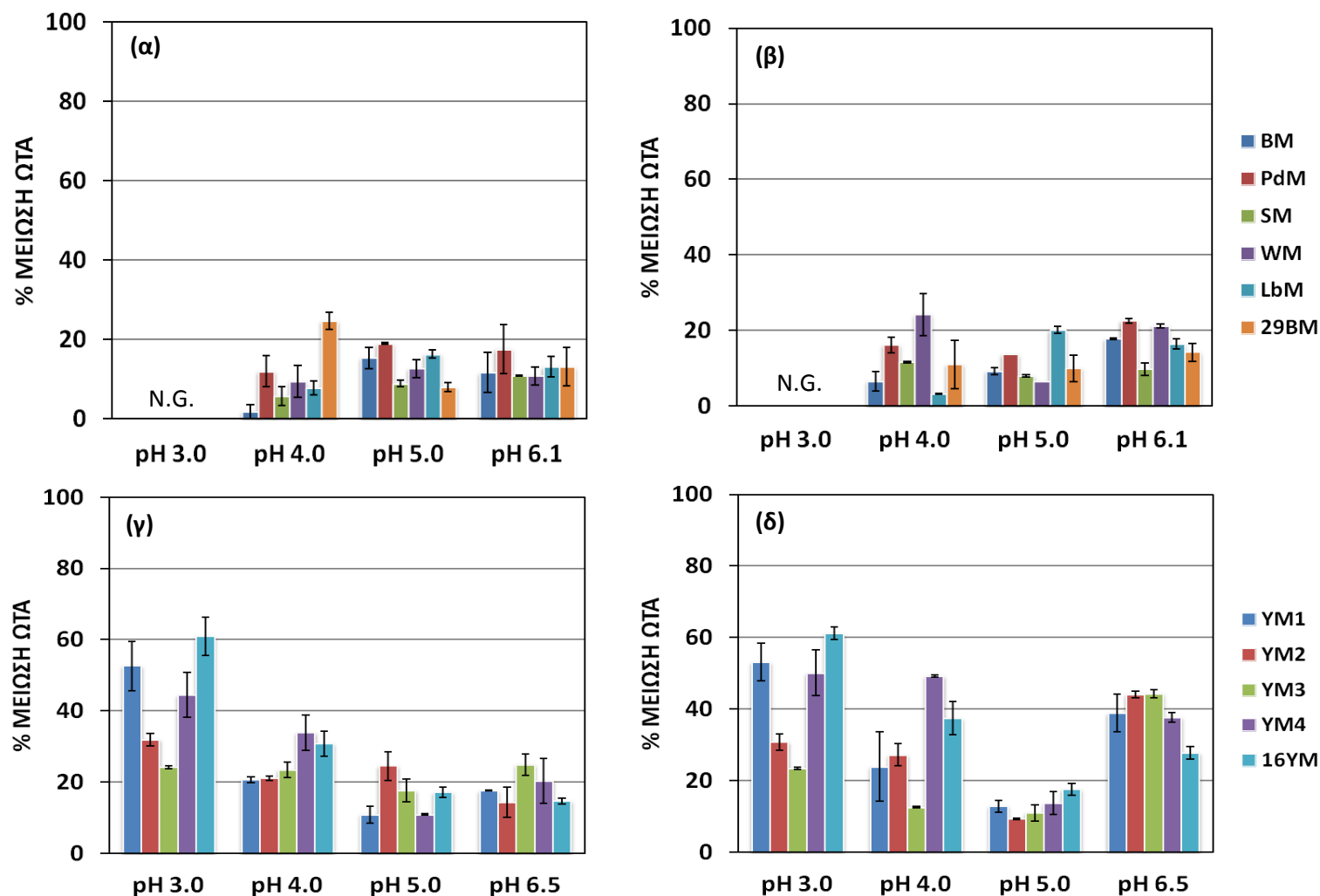
α. Θρεπτικά υποστρώματα

Σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα, η ποσότητα της ΩΤΑ η οποία ανακτήθηκε από τη βιομάζα ήταν αμελητέα συγκριτικά με τις ποσότητες που ανακτήθηκαν από το υπερκείμενο των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων μετά τη φυγοκέντριση (τα δεδομένα δεν παρατίθενται). Τα ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ στα υγρά θρεπτικά υποστρώματα MRS και YM ήταν 92-107% και 88-113%, αντίστοιχα (Πίνακας 6.3). Τα στελέχη βακτηρίων υπέδειξαν χαμηλή ικανότητα για μείωση της τοξίνης, κυμαινόμενη από 2 έως 25% σε όλους τους μελετώμενους συνδυασμούς των pH και αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ (Γραφήματα 6.6α και β). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η ικανότητα των μικτών καλλιέργειών των βακτηρίων για μείωση της ΩΤΑ επηρεάστηκε ελάχιστα από την αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ ($p=0.04$). Αντίθετα, παράγοντες όπως το pH, το είδος της μικτής καλλιέργειας των βακτηρίων και όλες οι αλληλεπιδράσεις τους επηρέασαν σημαντικά τη μείωση της ΩΤΑ ($p<0.05$). Συγκεκριμένα, η αύξηση του pH του θρεπτικού υλικού, στο οποίο ενοφθαλμίστηκαν οι μικτές καλλιέργειες των στελεχών των *Bacillus thuringiensis* (BM), *Pediococcus pentosaceus* (PdM) και *Lactobacillus* sp. (LbM), υπέδειξαν μία μικρή αλλά σημαντική αύξηση στη μείωση της ΩΤΑ (έως και 25%), ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ. Στο pH 3.0, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη από καμία από τις μελετώμενες μικτές καλλιέργειες βακτηρίων και επομένως δεν καταγράφηκε παραγωγή τοξίνης (Γραφήματα 6.6α και β).

Αντίθετα με τα βακτήρια, οι μικτές καλλιέργειες ζυμών παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ (έως και 65%) (Γραφήματα 6.6γ και δ). Τα μέγιστα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ παρατηρήθηκαν από τις μικτές καλλιέργειες YM1 (~53%), YM4 (~44-50%) και 16YM (~61-65%) στο pH 3.0, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ. Επιπλέον, η μείωση της ΩΤΑ επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος της μικτής καλλιέργειας των ζυμών, την αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ στο θρεπτικό υπόστρωμα, το pH και όλες τις αλληλεπιδράσεις τους ($p<0.05$). Τα επίπεδα μείωσης της ΩΤΑ αυξήθηκαν με τη μείωση του pH του θρεπτικού υλικού, σε όλες σχεδόν τις μικτές καλλιέργειες ζυμών (εκτός από τις YM2 και YM3). Σχετικά με την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της ΩΤΑ στη μείωση της τοξίνης, τα ποσοστά ανάμεσα στα δύο μελετώμενα επίπεδα ήταν παρόμοια, σε όλα τα pH εκτός από το pH 6.5, όπου όλες οι μικτές καλλιέργειες έδειξαν υψηλότερα ποσοστά μείωσης στην αρχική συγκέντρωση των 100 prb σε σχέση με τα αντίστοιχα των 50 prb.

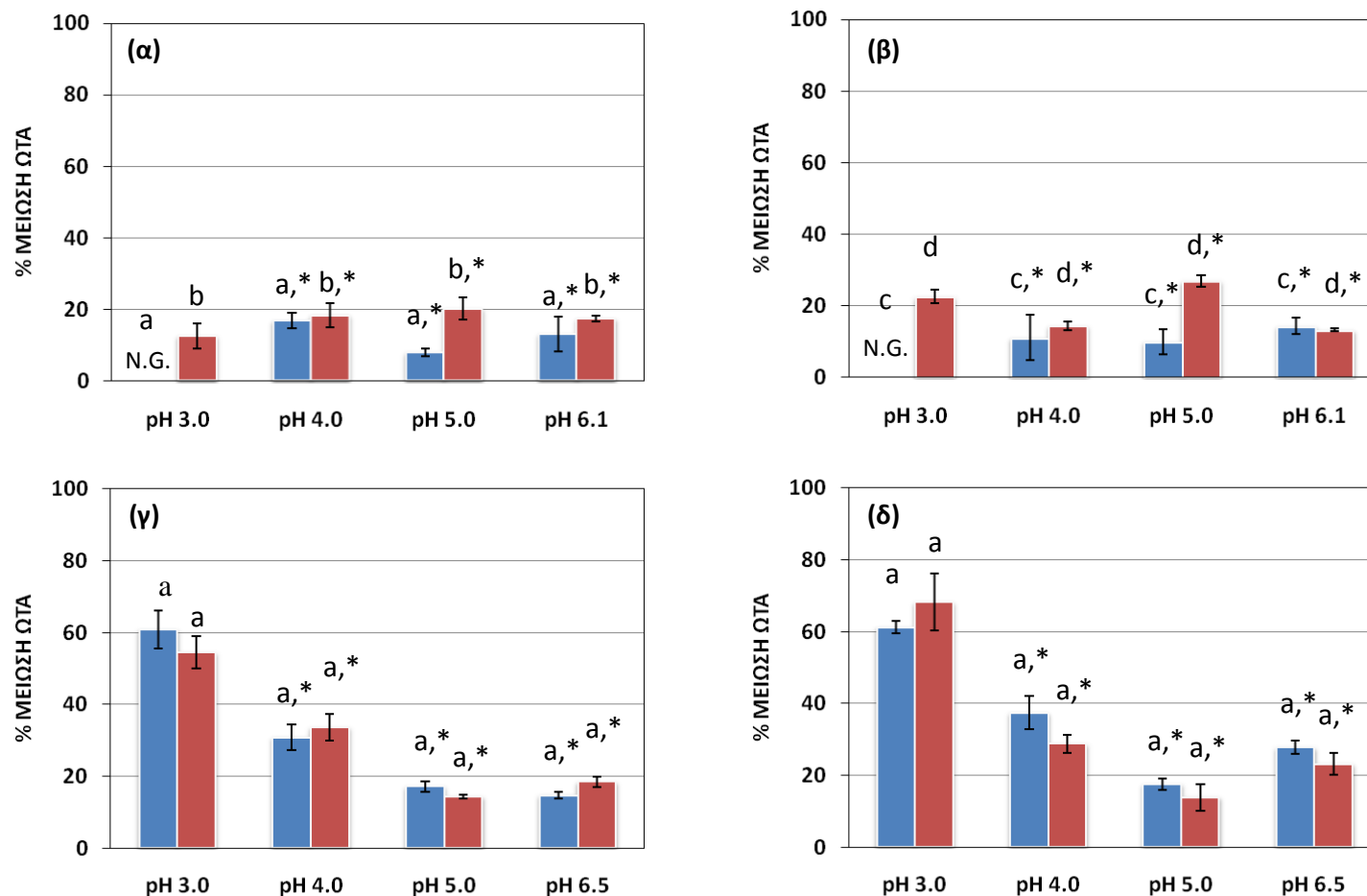
Δύο αρχικά επίπεδα ενοφθαλμισμάτων ζυμών ή βακτηρίων, 10^3 και 10^7 cfu/mL, μελετήθηκαν με στόχο την εκτίμηση της επίδρασης του αρχικού πληθυσμού κυττάρων των εν λόγω μικροοργανισμών στη μείωση της ΩΤΑ. Σε αυτό το μέρος μελετήθηκαν οι μικτές καλλιέργειες των 16 ζυμών (16YM) και των 29 βακτηρίων (29BM). Η μικτή καλλιέργεια 16YM έδειξε μεγαλύτερη ικανότητα για μείωση της ΩΤΑ (14-68%) σε σχέση με την αντίστοιχη των 29 στελεχών βακτηρίων (8-

27%) (Γράφημα 6.7). Όσον αφορά στις μικτές καλλιέργειες των ζυμών, τα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ αυξάνονταν με τη μείωση του pH του θρεπτικού υλικού, πετυχαίνοντας το μέγιστο ποσοστό μείωσης στο pH 3.0. Το τελευταίο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στα δύο επίπεδα αρχικού ενοφθαλμίσματος (10^3 και 10^7 cfu/mL). Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων του 16ΥΜ δεν έδειξε σημαντική επίδραση στη μείωση της ΩΤΑ, ενώ οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στο εύρος της τυπικής απόκλισης (Σχήμα 6.7γ και δ). Αντιθέτως, η συγκέντρωση των 10^7 cfu/mL για την μικτή καλλιέργεια 29BM έδειξε, σε ορισμένες περιπτώσεις, σημαντικά ισχυρότερη ικανότητα (2 έως 3-πλάσια) για μείωση, π.χ. στο pH 5.0, σε σχέση με το χαμηλό ενοφθαλμισμό (10^3 cfu/mL) (Γραφήματα 6.7α και β).



Γράφημα 6.6. Ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα με pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.1 ή 6.5) και αρχική συγκέντρωση ΩΤΑ, 50 (α, γ) και 100 rrb (β, δ) μετά από ενοφθαλμισμό με διαφορετικές μικτές καλλιέργειες: (α, β) βακτηρίων (BM, SM, PdM, WM, LbM, 29BM) και (γ, δ) ζυμών (YM1, YM2, YM3, YM4, 16YM) και επώαση στους 30°C για 5 και 2 ημέρες αντίστοιχα.

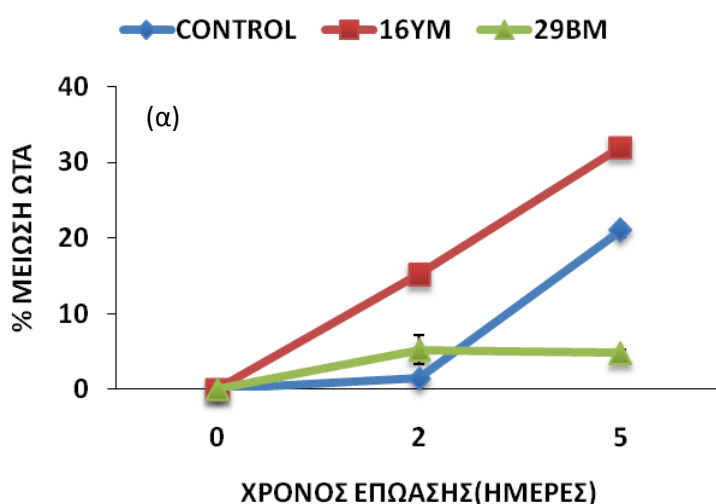
N.G.: δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηρίων ή ζυμών

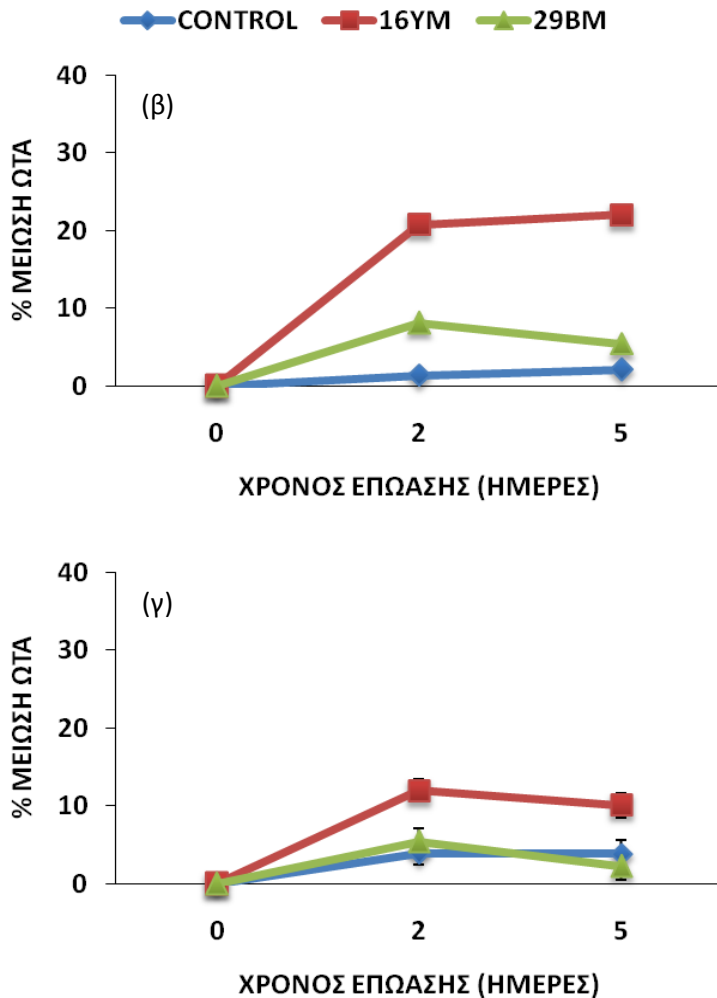


Γράφημα 6.7. Επίδραση του αρχικού ενοφθαλμίσματος (10^3 cfu/mL- μπλε χρώματος μπάρες; 10^7 cfu/mL- κόκκινου χρώματος μπάρες) των μικτών καλλιιεργειών: (α, β) 29BM και (γ, δ) 16YM, στην ποσοστιαία μείωση της ΩΤΑ συναρτήσεως του pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.1 ή 6.5) και της αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ, 50 (α, γ) και 100 ppb (β, δ) μετά από επώαση στους 30°C για 5 και 2 ημέρες αντίστοιχα. Οι μπάρες με ίδιο γράμμα για το ίδιο pH ή την ίδια αρχική συγκέντρωση ΩΤΑ δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p > 0.05$). Το αστέρι (*) υποδεικνύει τις σημαντικές στατιστικές διαφορές συγκριτικά με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν pH 3.0 (*: $p \leq 0.05$). N.G.: δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηρίων ή ζυμών

β. Ποτά

Ανάμεσα στα τρία τρόφιμα που μελετήθηκαν, η μέγιστη μείωση της ΩΤΑ παρατηρήθηκε στο χυμό σταφυλιού (έως και 32%) ενώ ακολούθησαν το κόκκινο κρασί (έως και 22%) και η μπύρα (έως και 12%) (Γράφημα 6.8). Τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης παρουσίασε η μικτή καλλιέργεια των 16 ζυμών συγκριτικά με την αντίστοιχη των 29 βακτηρίων (2-8% μείωση της ΩΤΑ), σε όλα τα τρόφιμα. Το παραπάνω αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης στα θρεπτικά υποστρώματα. Η μείωση της ΩΤΑ στους μάρτυρες ήταν αμελητέα στο κρασί και στη μπύρα (1-4%), ενώ στην περίπτωση του χυμού σταφυλιού, τα αντίστοιχα ποσοστά μείωσης ήταν αξιοσημείωτα ($\geq 21\%$). Το τελευταίο παρουσίασε ποσοστά μείωσης παρόμοιας τάξης μεγέθους με τα αντίστοιχα που παρατηρήθηκαν κατά την εφαρμογή της μικτής καλλιέργειας 16ΥΜ (15-32%). Τα ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ από το χυμό σταφυλιού, το κόκκινο κρασί και τη μπύρα ήταν 107-114%, 95-119%, και 98-112% αντίστοιχα. Επίσης, η a_w όλων των τροφίμων κυμάνθηκε μεταξύ 0.95-0.97 κατά τη διάρκεια της επώασης, ενώ το pH μεταξύ 3.3-3.5, 3.5-3.6 και 4.4-4.5 για το χυμό σταφυλιού, το κόκκινο κρασί και τη μπύρα, αντιστοίχως. Όσον αφορά τον αρχικό πληθυσμό της ενδογενούς μικροχλωρίδας, στο χυμό σταφυλιού ήταν περίπου 10^4 cfu/mL, ενώ $< 10^2$ cfu/mL στο κόκκινο κρασί και τη μπύρα. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, ο μέγιστος πληθυσμός ΟΜΧ ήταν 10^6 - 10^7 cfu/mL για το χυμό σταφυλιού και τη μπύρα, ενώ 10^4 cfu/mL για το κόκκινο κρασί. Οι πληθυσμοί των ενοφθαλμισμένων δειγμάτων με μικτές καλλιέργειες των ζυμών και των βακτηρίων παρέμειναν σταθεροί 7.0 ± 0.5 log cfu/mL για όλα τα ποτά κατά τη διάρκεια της συντήρησης των 5 ημερών.





Γράφημα 6.8. Κινητική της ποσοστιαίας μείωσης της ΩΤΑ σε: (α) χυμό σταφυλιού, (β) κόκκινο κρασί, και (γ) μπύρα αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ 100 ρrb, ενοφθαλμισμένων με μικτή καλλιέργεια 10^7 cfu/mL 29BM και 16YM μετά από επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Μελετήθηκαν επίσης δείγματα μαρτύρων (τρόφιμα με προσθήκη ΩΤΑ αλλά χωρίς ενοφθαλμισμό με βακτήρια ή ζύμες).

6.3 Συζήτηση

6.3.1 Αναστολή μύκητα

Η αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων χρησιμοποιώντας μη τοξικούς ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς όπως στελέχη ή είδη βακτηρίων ή ζυμών είναι μία πιθανώς χρήσιμη και αποτελεσματική βιολογική μέθοδος για τον έλεγχο της παρουσίας των μυκήτων στα τρόφιμα. Σημαντικός αριθμός από βιβλιογραφικές μελέτες έχει δείξει ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων που μελετήθηκαν και στην παρούσα μελέτη, είναι δυνατόν να αναστείλουν την ανάπτυξη μυκήτων. Συγκεκριμένα, μελέτες αναφέρουν ότι είδη οξυγαλακτικών όπως *Lactobacillus rhamnosus* και *L. plantarum* ή *Pediococcus pentosaceus* και *Weissella cibaria* προκάλεσαν ξεκάθαρες ζώνες αναστολής στον *Penicillium expansum* ή τον *P. nordicum* αντίστοιχα

(Rouse et al. 2008, Schillinger et al. 2010). Επιπλέον, το είδος *Bacillus licheniformis* έχει αποδειχθεί κατάλληλο για αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα *A. westerdijkiae* (Petchkongkaew et al. 2008). Παρόλα αυτά, τα βακτήρια που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν αποδείχτηκαν ισχυροί αναστολείς του *A. carbonarius*, παρόλο που η πλειοψηφία τους ανήκει στην κατηγορία των προβιοτικών μικροοργανισμών (Gaggia et al. 2011). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η κατάλληλη επιλογή βακτηρίων ή ζυμών είναι δυνατόν να οδηγήσει σε επιτυχή έλεγχο της ανάπτυξης των μυκήτων, βελτιώνοντας το χρόνο ζωής και αυξάνοντας την ασφάλεια προϊόντων όπως τα ζυμούμενα τρόφιμα. Παρόλα αυτά, ο περιορισμένος αριθμός τους ήταν η αιτία της μελέτης μικροοργανισμών με προστατευτικές ιδιότητες στην παρούσα έρευνα (Gourama and Bullerman, 1995). Τέτοιου είδους διαφορές μεταξύ μελετών είναι δυνατόν να αποδοθούν σε παράγοντες όπως η ποικιλομορφία των στελεχών (strain diversity), η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε θρεπτικά συστατικά και το pH. Δεδομένου ότι το SGM είναι ένα θρεπτικό υπόστρωμα «πλούσιο» σε θρεπτικά συστατικά, μία πιθανή ερμηνεία για την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με προηγούμενες μπορεί να είναι το χαμηλό του pH (3.5), μιας και οι εμφανείς αποικίες των βακτηρίων στα τρυβλία με το SGM ήταν περιορισμένες. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από τα αποτελέσματα των μετρήσεων με βάση την OD, στα οποία όλες οι μικτές καλλιέργειες των βακτηρίων ενοφθαλμίστηκαν (αρχικό ενοφθάλμισμα 3 log cfu/mL) σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS με τιμές pH 3, 4, 5, 6.1. Όλες οι καλλιέργειες βακτηρίων είχαν ως ελάχιστο pH, ικανό για ανάπτυξη γύρω στο 3.5, εκτός από τη μικτή καλλιέργεια του *Lactobacillus* sp., όπου η ανάπτυξη άρχιζε σε σημαντικά υψηλότερες τιμές pH γύρω στο 4.5 (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Λαμβάνοντας υπόψη επίσης ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν, απομονώθηκαν από τρόφιμα με pH υψηλότερά από 4.5-5.0, τόσο χαμηλή τιμή pH δύναται να προκαλέσει επιπρόσθετη καταπόνηση. Αντίθετα, η προσαρμογή των μελετηθέντων ειδών ζυμών ήταν ευκολότερη μιας και οι τιμές pH του κρασιού είναι κοντά σε αυτό του SGM. Η ευαισθησία των μικτών καλλιεργειών βακτηρίων στο χαμηλό pH, καθιστά εξαιρετικά περιοριστική την εφαρμογή τους, π.χ. σε όξινα τρόφιμα, με στόχο την αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων. Παρόλα αυτά, περαιτέρω μελέτη σε υψηλότερες τιμές pH και σε άλλα θρεπτικά υποστρώματα μπορεί να είναι χρήσιμη.

Αντίθετα από τα βακτήρια, σχεδόν όλες οι μικτές καλλιέργειες ζυμών ανέστειλαν την ανάπτυξη του *A. carbonarius*, σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η αποτελεσματικότερη παρεμποδιστική δράση παρατηρήθηκε σε a_w 0.95, ανεξάρτητα από τον τύπο της μικτής καλλιέργειας των ζυμών και το συνδυασμό των αρχικών συγκεντρώσεων ενοφθαλμισμάτων των ζυμών/ μύκητα. Σημαντικές διαφορές έχουν καταγραφεί, επίσης, στο βαθμό της ικανότητας για αναστολή του μύκητα ανάμεσα στους τύπους των μικτών καλλιεργειών των ζυμών. Παρόλα αυτά, η θετική επίδραση των συγκεκριμένων μικτών

καλλιιεργειών στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα είναι σύμφωνη με προηγούμενες έρευνες, οι οποίες μελέτησαν την παρεμποδιστική δράση είτε μεμονωμένων ειδών ζυμών όπως τα είδη *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia orientalis* και *I. terricola* στην ανάπτυξη του *A. carbonarius* ή μικτών καλλιιεργειών των *Pichia anomala*, *P. kluyveri* και *Hanseniaspora uvarum* στην ανάπτυξη του *A. ochraceus* (Bleve et al. 2006, Masoud and Høj Kaltoft 2006). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων των ζυμών από 10^2 σε 10^5 cfu/mL συνεπάγεται ταυτόχρονη αύξηση στην παρεμποδιστική δράση της ανάπτυξης του *A. carbonarius* (από 0-48% σε 49-93%), υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός ελάχιστου επιπέδου ενοφθαλμίσματος ζυμών, το οποίο είναι ικανό για αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα. Διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει την ανταγωνιστική δραστηριότητα μεταξύ ζυμών και μυκήτων με την ανάγκη για χώρο, για πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ή με την προσκόλληση των κυττάρων στις μυκηλιακές υφές (Spradaro et al. 2002, 2004). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν την προσθήκη μικτών καλλιιεργειών ζυμών ως αξιόπιστη μέθοδο για την αναστολή της ανάπτυξης του *A. carbonarius* σε τρόφιμα χαμηλού pH (3.5) και a_w εντός του εύρους 0.92-0.98, όπως χυμούς, μούστο, κρασί.

6.3.2 Μείωση της ΩΤΑ

Οι μικτές καλλιιεργειες των βακτηρίων έδειξαν εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ (2-25%) σε όλους τους συνδυασμούς pH και αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συναφή με τις παρατηρήσεις στο *in vitro* πείραμα της ομάδας του Del Prete (2007), οι οποίοι μελέτησαν την ικανότητα 15 στελεχών από 5 είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων για μείωση της ΩΤΑ, καταγράφοντας ποσοστά μείωσης 8-28%. Αντίθετα, σύμφωνα με τους Mateo et al. (2010), δέκα στελέχη του *Oenococcus oeni* μείωσαν την ΩΤΑ κατά 50-70%, ενώ οι Fuchs et al. (2008) αναφέρουν ποσοστά μείωσης > 98% μετά από εφαρμογή του *Lactobacillus acidophilus* σε υγρό υπόστρωμα MRS και επώαση για 4 ώρες στους 37°C. Οι διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα ανάμεσα σε διαφορετικές έρευνες είναι δυνατόν να σχετίζονται τόσο με την ποικιλομορφία των στελεχών όσο και με την πηγή απομόνωσης, υποδεικνύοντας ότι η επιλογή των στελεχών των βακτηρίων που θα χρησιμοποιηθούν σε μία μικτή καλλιιεργεια για τη μείωση της ΩΤΑ είναι ένα κρίσιμο θέμα.

Αντίθετα με προηγούμενες έρευνες που υποδεικνύουν ότι τα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ αυξάνονται όσο χαμηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ (Fuchs et al. 2008, Mateo et al. 2010), στην παρούσα μελέτη η αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ δεν επέδειξε κάποια ξεκάθαρη επίδραση στην ποσοστιαία μείωση της ΩΤΑ, ανεξάρτητα από το pH και τον τύπο της μικτής καλλιιεργειας βακτηρίων που μελετήθηκε. Επίσης, στο pH 3.0 δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε καμία από τις μελετώμενες μικτές καλλιιεργειες βακτηρίων πιθανόν λόγω της ισχυρής καταπόνησης από το χαμηλό pH. Όσον αφορά στην επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης κυττάρων των βακτηρίων στη

μείωση της ΩΤΑ, το υψηλό ενοφθάλμισμα (10^7 cfu/mL) έδειξε μεγαλύτερη ικανότητα για μείωση της ΩΤΑ σε σχέση με το 10^3 cfu/mL (Fuchs et al. 2008). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, εφόσον χρησιμοποιηθούν οι εν λόγω μικτές καλλιέργειες βακτηρίων προτείνεται η ταυτόχρονη εφαρμογή και άλλων μεθόδων μείωσης όπως φυσικές ή χημικές στοχεύοντας στην αύξηση της αποτελεσματικότητας για τη μείωση της ΩΤΑ.

Αντίθετα με τη χαμηλή ικανότητα των βακτηρίων για μείωση της ΩΤΑ, όλες οι μικτές καλλιέργειες των ζυμών απεδείχθησαν ικανές για μείωση της τοξίνης μέχρι και 68%. Η παραπάνω τάξη μεγέθους συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Cecchini et al. (2006), οι οποίοι μελέτησαν τη μείωση της ΩΤΑ κατά την αλκοολική ζύμωση επιτυγχάνοντας ποσοστά μέχρι και 70%. Η μείωση του pH του θρεπτικού υλικού επέφερε μειώσεις μεγαλύτερης τάξης μεγέθους, παρουσιάζοντας τα μέγιστα ποσοστά στο pH 3.0, σχεδόν σε όλες τις μικτές καλλιέργειες ζυμών που μελετήθηκαν. Η παραπάνω παρατήρηση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της άγριας φύσης των μελετώμενων ζυμών, η οποία τους δίνει την ικανότητα να αναπτύσσονται σε τόσο χαμηλές τιμές pH. Στο *in vitro* πείραμα, οι μέγιστες μειώσεις της ΩΤΑ παρατηρήθηκαν από τις μικτές καλλιέργειες YM1, YM4 και 16YM σε pH 3.0. Ορισμένα από τα μελετώμενα είδη ζυμών π.χ. *Zygosaccharomyces bailii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Kazachstania hellenica* και ειδικότερα μικτές καλλιέργειες αυτών εξετάζονται πρώτη φορά για την ικανότητά τους να μειώνουν την ΩΤΑ, ενώ άλλα όπως *S. cerevisiae* έχουν μελετηθεί ευρέως για το δυναμικό μείωσης μυκοτοξινών όπως αφλατοξίνες, ΩΤΑ και ζεαραλενόνη (Santin et al. 2003, Yiannikouris et al. 2003). Τα υψηλά ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ υποδεικνύουν ότι η προσθήκη μικτών καλλιεργειών ζυμών μπορεί να αποτελέσει μία αποτελεσματική μέθοδο για τη μείωση της ΩΤΑ σε υποστρώματα που έχουν εύρος pH 3.0-6.5. Παρόλα αυτά, περαιτέρω μελέτη κρίνεται αναγκαία για τη διασαφήνιση της επίδρασης παραγόντων όπως η a_w και η θερμοκρασία στη μείωση της ΩΤΑ.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ στα τρόφιμα ήταν χαμηλότερα συγκριτικά με τα αντίστοιχα στα θρεπτικά υποστρώματα στις ίδιες συνθήκες pH, αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ και αρχικού επιπέδου ενοφθαλμίσματος. Τέτοιου είδους διαφορές είναι δυνατόν να σχετίζονται με την επίδραση ενδογενών ιδιοτήτων του τροφίμου όπως a_w , μικροδομή, θρεπτικά συστατικά, οι οποίες δεν είναι δυνατόν να ληφθούν υπόψη σε ένα πείραμα που πραγματοποιείται σε εργαστηριακά υποστρώματα. Παρόλα αυτά, η μικτή καλλιέργεια των 16 ζυμών έδειξε μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ (15-32%) σε σχέση με την αντίστοιχη των 29 στελεχών βακτηρίων (2-8%), ανεξάρτητα από το μελετώμενο τρόφιμο. Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από το μέρος με τα εργαστηριακά υποστρώματα. Οι μάρτυρες του κρασιού και της μπύρας δεν παρουσίασαν καμία μείωση στην ΩΤΑ κατά τη διάρκεια της επώασης, ενώ ο αντίστοιχος μάρτυρας του χυμού σταφυλιού έδειξε αξιοσημείωτη μείωση της τάξης του 20% υποδεικνύοντας ότι κάποια είδη που ανήκουν στην ενδογενή μικροχλωρίδα είχαν

επίσης την ικανότητα να μειώνουν την τοξίνη. Παρόλο που η επίδραση της ενδογενούς μικροχλωρίδας θα μπορούσε να εξαλειφθεί πραγματοποιώντας το πείραμα σε «στείρα» τρόφιμα, αυτή η μέθοδος δεν θα ανταποκρινόταν στην πραγματικότητα. Η μείωση της ΩΤΑ στα τρόφιμα ακολούθησε τη σειρά: χυμός σταφυλιού (έως και 32%) > κόκκινο κρασί (έως και 22%) > μύρα (έως και 12%). Το χαμηλό pH του χυμού σταφυλιού και του κρασιού (3.3-3.6) συγκριτικά με τη μύρα (4.4) μπορεί να θεωρηθεί μία πιθανή αιτία για τις παραπάνω διαφορές στα ποσοστά μείωσης. Παρόμοια με τα παρόντα αποτελέσματα, οι Bejaoui et al. (2004) έδειξαν ότι μεμονωμένη εφαρμογή στελεχών των *Saccharomyces bayanus* και *S. cerevisiae* μπορεί επίσης να προκαλέσει μείωση της ΩΤΑ σε φυσικούς και συνθετικούς χυμούς σταφυλιού. Παρόλο που τα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ στα τρόφιμα ήταν σημαντικά μικρότερα από τα αντίστοιχα στα θρεπτικά υποστρώματα, τέτοιου είδους ευρήματα μπορεί να φανούν χρήσιμα για την ανάπτυξη στρατηγικών ελέγχου της ΩΤΑ στο τελικό προϊόν.

Μέχρι σήμερα δεν έχει δοθεί κάποια σαφής ερμηνεία για το μηχανισμό της μείωσης της ΩΤΑ όταν συγκαλλιεργούνται τοξινογόνοι μύκητες με άλλους μικροοργανισμούς. Παρόλα αυτά οι θεωρίες που κυριαρχούν σχετίζονται με την απορρόφηση της ΩΤΑ στην επιφάνεια του κυττάρου ή την αποικοδόμησή της σε λιγότερο τοξικά προϊόντα όπως η ωχρατοξίνη α (ΩΤα). Στην παρούσα μελέτη, ο καθαρισμός των δειγμάτων με στήλες ανοσοσυγγένειας πριν την ανάλυση καθιστά δύσκολη την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το μηχανισμό μείωσης της ΩΤΑ. Οι στήλες αυτές είναι εξειδικευμένες να δεσμεύουν μόνο την ΩΤΑ, ελαχιστοποιώντας κάθε περίπτωση για ανίχνευση άλλων προϊόντων αποικοδόμησης. Παρόλα αυτά, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι βακτήρια των γενών *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Bacillus* ή μη τοξικά στελέχη των *A. niger* χρησιμοποιούμενα ως πηγές του ενζύμου καρβοξυπεπτιδάση Α (carboxypeptidase A) που αποτελεί την κύρια αιτία της αποικοδόμησης της ΩΤΑ σε ΩΤα (Varga et al. 2005, Péteri et al. 2007, Fuchs et al. 2008). Άλλοι μελετητές υποδεικνύουν ότι η αποικοδόμηση της ΩΤΑ δύναται να επιτευχθεί και από λιπάσες ή μεταλλοένζυμα (Stander et al. 2000, Abrunhosa et al. 2007). Λαμβάνοντας υπόψη το μηχανισμό μείωσης της ΩΤΑ, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την ικανότητα διάφορων μικροοργανισμών να δεσμεύουν ισχυρά την τοξίνη είτε ενδο- είτε εξωκυτταρικά (Ringot et al. 2005, Meca et al. 2010). Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα λιπίδια είναι ικανά να σχηματίσουν εύκολα και προσβάσιμα σημεία για την εξασφάλιση της απορρόφησης της ΩΤΑ (Santos et al. 2000, Huwig et al. 2001). Όσον αφορά τις ζύμες ως βιολογικούς παράγοντες ελέγχου της ΩΤΑ, οι μαννοπρωτεΐνες (mannoproteins) έχουν το σημαντικότερο ρόλο στην απορρόφηση της ΩΤΑ, μιας και ελέγχουν το πορώδες του κυτταρικού τοιχώματος (De Nobel et al. 1990, Nunez et al. 2008). Επίσης, οι Piotrowska και Zakowska (2005), μελέτησαν τη δυναμική για μείωση της ΩΤΑ από στελέχη οξυγαλακτικών και υπέδειξαν ότι η ελαχιστοποίηση της τοξίνης σχετίστηκε με μηχανισμό δέσμευσής της στη βακτηριακή βιομάζα. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω μελέτες και

δεδομένων των περιορισμών λόγω της χρήσης των στηλών ανοσοσυγγένειας, περαιτέρω μελέτη κρίνεται απαραίτητη ώστε να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη μείωση της ΩΤΑ. Τέτοιου είδους πληροφορίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως επιστημονική βάση για την ανάπτυξη μιας μοριακής προσέγγισης για τη μείωση της ΩΤΑ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Σύγκριση της επίδρασης δύο εφαρμογών ενεργού συσκευασίας με αιθέριο έλαιο κανέλας στην ανάπτυξη του *A. carbonarius* και στην παραγωγή ΩΤΑ στη σάρκα και στο φλοιό μήλων και αχλαδιών

7.1 Εισαγωγή

Τα φρούτα λόγω του χαμηλού pH, της υψηλής υγρασίας και της πλούσιας σύστασής τους σε θρεπτικά συστατικά (κυρίως σάκχαρα) είναι εξαιρετικά ευπαθή στην προσβολή από αλλοιογόνους και παθογόνους μύκητες, με αποτέλεσμα το προϊόν να καθίσταται ακατάλληλο για κατανάλωση κυρίως λόγω σήψης αλλά και πιθανής παραγωγής μυκοτοξινών (Varma and Verma 1987, Logrieco et al. 2003). Δεδομένου ότι ο ωχρατοξινογόνος μύκητας *A. carbonarius* έχει απομονωθεί αλλά και η ΩΤΑ έχει ανιχνευθεί σε φρούτα της κατηγορίας των μηλοειδών, η μελέτη πιθανών μεθόδων περιορισμού της παρουσίας του εν λόγω μύκητα και της τοξίνης που παράγει, καθίσταται σημαντική (Aziz et al. 2002, Drusch and Ragab 2003, Al-Hindi et al. 2011).

Τα αιθέρια έλαια (essential oils) είναι ευρύτερα γνωστά για τις αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές τους ιδιότητες (Burt, 2004). Ανάμεσα στα πιο συχνά εφαρμοζόμενα στα τρόφιμα είναι το αιθέριο έλαιο κανέλας. Χρησιμοποιείται ως πρόσθετο και αρωματικό και έχει χαρακτηριστεί διεθνώς ως «Γενικώς Αναγνωρισμένο ως Ασφαλές» συστατικό (*General Recognized as Safe- GRAS*). Συγκεκριμένα, η αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση του συνοψίζεται κυρίως σε πτητικές ουσίες όπως η κινναμωμική αλδεΐδη (trans-cinnamaldehyde) (σε ποσοστό 65-75%), ευγενόλη (σε ποσοστό 4-7%), η λιναλοόλη (linalool) και άλλα τερπένια. Η δραστηριότητα του αιθερίου ελαίου κανέλας στην αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές τόσο σε εργαστηριακά υποστρώματα όσο και σε τρόφιμα (Delespaul et al. 2000, Chang et al. 2001, Kim et al. 2004).

Η ενεργός συσκευασία (active packaging) είναι μια καινοτόμος συσκευασία, η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας, της ασφάλειας και της συσκευασίας τροφίμων, στοχεύοντας στην ικανοποίηση των απαιτήσεων του καταναλωτή για φρέσκα και ασφαλή προϊόντα (Scannell et al. 2000). Η ενεργός συσκευασία αλληλεπιδρά με το προϊόν ή με τον υπερκείμενο χώρο (headspace) μεταξύ συσκευασίας και τροφίμου ώστε να περιοριστεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και να επιβραδυνθούν οι διαδικασίες υποβάθμισης της ποιότητας (Appendini and Hochkiss, 2002). Οι

εφαρμογές της ενεργού συσκευασίας περιλαμβάνουν τη χρήση προσροφητών του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα ώστε να μεταβάλλεται η συγκέντρωση των αερίων, τη χρήση συσκευών που απελευθερώνουν αρωματικές ουσίες στο προϊόν και την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων στη συσκευασία για τον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης (Vermeiren et al. 1999). Μία συγκεκριμένη εφαρμογή όσον αφορά στις αντιμικροβιακές ουσίες είναι η ενσωμάτωση στη συσκευασία αιθερίων ελαίων (Nielsen and Rios, 2000).

Πίνακας 7.1. Ενδεικτικές αναφορές σχετικά με τη μελέτη της εφαρμογής εδώδιμων μεμβρανών ή επικαλύψεων με αντιμικροβιακούς παράγοντες στην ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών.

Μικροοργανισμός	Εδώδιμη μεμβράνη + αντιμικροβιακός παράγοντας	Βιβλιογραφική πηγή
OMX	Αλγινικό ασβέστιο + σορβικό κάλιο	Mitrakas et al. 2008
<i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. aureus</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Lb. plantarum</i>	Σόγια + αιθέριο έλαιο ρίγανης, θυμάρι	Emiroğlu et. 2010
<i>L. monocytogenes</i>	Χιτοζάνη, καζεΐνη + εκχυλίσματα φυτών	Ponce et al. 2008
<i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>S. enterica</i>	Άμυλο + εκχύλισμα πράσινου τσαγιού	Chiu and Lai, 2010
<i>L. monocytogenes</i>	Αλγινικό άλας + νισίνη, σορβικό κάλιο	Juck et al. 2010
OMX	Αλγινικό άλας + νισίνη, κανέλα	Lu et al. 2010
<i>P. italicum</i>	Χιτοζάνη + αιθέριο έλαιο περγαμόντο	Sánchez-González et al. 2010
<i>Aspergillus</i> sp.	Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη + σορβικό κάλιο	Sayanjali et al. 2011

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται περιπτώσεις όπου διαφορετικοί τρόποι εφαρμογής των αιθερίων ελαίων επιφέρουν διαφορετικό αντιμικροβιακό αποτέλεσμα (Pandit and Shelef, 1994). Μεταξύ αυτών, μια μοντέρνα, οικολογική και οικονομική μέθοδος εφαρμογής των αιθερίων ελαίων είναι η ενσωμάτωσή τους σε μεμβράνες ή η προσθήκη τους σε υδατικά διαλύματα εδώδιμων ουσιών όπως η πρωτεΐνη τυρογάλακτος, η χιτοζάνη, τα αλγινικά άλατα κ.ά. Τα αλγινικά, τα οποία απομονώνονται από καφέ άλγη της τάξης Phaeophyceae (κυρίως *Laminaria*) είναι άλατα του αλγινικού οξέος και χρησιμοποιούνται ως εδώδιμες επικαλύψεις (edible coatings) και μεμβράνες (edible films) λόγω των μοναδικών κολλοειδών ιδιοτήτων τους και της δυνατότητάς τους να σχηματίζουν ισχυρές πηκτές ή αδιάλυτα πολυμερή αντιδρώντας με δι- και τρισθενή κατιόντα, όπως

το ασβέστιο και το νάτριο (Rhim, 2004). Οι μεμβράνες ή οι επικαλύψεις που προέρχονται από αλγινικά άλατα αυξάνουν το χρόνο ζωής και βελτιώνουν την ποιότητα των τροφίμων, μιας και αποτελούν εμπόδια στη μεταφορά της υγρασίας, στη διαθεσιμότητα σε οξυγόνο, στην οξείδωση των λιπιδίων και στην απώλεια του αρώματος (Kester and Fennema, 1986). Αρκετές έρευνες έχουν μελετήσει την πιθανή εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών ή επικαλύψεων σε τρόφιμα για την αναστολή αλλοιογόνων και παθογόνων βακτηρίων (Mitrakas et al. 2008, Juck et al. 2010). Ωστόσο, ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία για την επίδρασή τους στην ανάπτυξη των μυκήτων και ιδιαίτερα στην παραγωγή μυκοτοξινών όπως της ΩΤΑ κατά την εφαρμογή τους σε τρόφιμα (Sánchez-González et al. 2010, Sayanjali et al. 2011) (Πίνακας 7.1).

Εν αντιθέσει με την προαναφερθείσα εναλλακτική μέθοδο εφαρμογής των αιθερίων ελαίων, υπάρχουν και οι κλασικές όπως η προσθήκη του αιθερίου ελαίου στη συσκευασία χωρίς να υφίσταται επαφή με το τρόφιμο. Στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιείται σταδιακή απελευθέρωση των πτητικών συστατικών στον αέριο χώρο της συσκευασίας κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η εν λόγω μέθοδος είναι εξαιρετικά απλή και έχει χαμηλό οργανοληπτικό αντίκτυπο στο τρόφιμο. Παρόλα αυτά, κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η δράση των πτητικών συστατικών στη μικροβιακή χλωρίδα δεν λαμβάνει χώρα το ίδιο γρήγορα και αποτελεσματικά όπως στην περίπτωση της άμεσης επαφής του συμπυκνωμένου αιθερίου ελαίου, απαιτώντας μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιμικροβιακού παράγοντα. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, παρόλο που η μέθοδος αυτή έχει μελετηθεί ως προς τη δραστηριότητά της σε πληθώρα μικροοργανισμών (ζύμες, μύκητες και βακτήρια), έχει εφαρμοστεί κυρίως σε εργαστηριακά υποστρώματα (Matan et al. 2006, Goñi et al. 2009). Επιπλέον, οι δύο μέθοδοι εφαρμογής του αιθερίου ελαίου κανέλας (ενσωμάτωση σε εδώδιμες μεμβράνες + διάχυση πτητικών ουσιών) έχουν μελετηθεί ανεξάρτητα με αποτέλεσμα να λείπει η πληροφορία που αφορά στη σύγκριση των δύο μεθόδων.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, και δεδομένου ότι ωχρατοξινογόνοι μύκητες συχνά προσβάλουν τα φρούτα διαμέσου μωλωπισμένων και τραυματισμένων ιστών, παράγοντας ΩΤΑ υπό ανεπαρκείς συνθήκες αποθήκευσης, στόχος του παρόντος κεφαλαίου ήταν η μελέτη διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθερίου ελαίου κανέλας μέσω δύο μεθόδων εφαρμογής, των εδώδιμων επικαλύψεων αλγινικού νατρίου και της πτητικότητας των δραστικών συστατικών, στη σάρκα και στο φλοιό, μήλων και αχλαδιών για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *A. carbonarius* και της παραγωγής ΩΤΑ κατά τη συντήρησή τους σε αερόβιες συνθήκες και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

7.2 Υλικά και μέθοδοι

7.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στο παρόν κεφάλαιο, σχεδιάστηκε ένα πολυπαραγοντικό πείραμα στοχεύοντας στην εκτίμηση της εφαρμογής διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθερίου ελαίου κανέλας μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων εφαρμογής: α) με ενσωμάτωση σε εδώδιμες επικαλύψεις αλγινικού νατρίου (άμεση επαφή) (0.3 και 0.9% κ.ό. αιθερίου ελαίου κανέλας) και β) με προσθήκη στη συσκευασία με εμποτισμένο χαρτί (έμμεση επαφή) (0.3 και 0.9% αιθερίου ελαίου κανέλας/δείγμα σάρκας φρούτου) στη σάρκα και στο φλοιό, μήλων και αχλαδιών για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *A. carbonarius* και της παραγωγής ΩΤΑ. Όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 15, 20 και 25°C. Η ενσωμάτωση της θερμοκρασίας στον πειραματικό σχεδιασμό ως μεταβλητή είναι μεγάλης σημασίας στο παρόν κεφάλαιο, μιας και η θερμοκρασία αναμένεται να επηρεάσει σημαντικά τόσο την πτητικότητα του αιθερίου ελαίου όσο και τη διαπερατότητα της μεμβράνης του αλγινικού νατρίου. Επιπλέον, ο εν λόγω μύκητας αναπτύσσεται κυρίως στο θερμοκρασιακό εύρος που επιλέχθηκε για μελέτη.

Η ανάπτυξη του *A. carbonarius* παρατηρήθηκε βάσει των μεταβολών του πληθυσμού των σποριών (2 ανεξάρτητα δείγματα/ δειγματοληψία) (n=2), αλλά και της μεταβολής της διαμέτρου του μύκητα κατά τη διάρκεια της συντήρησης (τουλάχιστον 10 ανεξάρτητα δείγματα/ πειραματική συνθήκη) (n=10). Δεδομένου ότι είναι ευρύτερα αποδεκτό ότι οι μύκητες αναπτύσσονται τρισδιάστατα, επιλέχθηκε να μελετηθεί και η λογαριθμική μεταβολή των πληθυσμών των σποριών, μιας και οι μετρήσεις με βάση τη διάμετρο της αποικίας αποδίδουν την ανάπτυξη σε δύο διαστάσεις. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της τοξίνης προσδιορίστηκε σε 4 ανεξάρτητα δείγματα ανά δειγματοληψία (n=4). Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα.

7.2.2 Επιλογή και ανακαλλιέργεια του μύκητα

Ο μύκητας που επιλέχθηκε να μελετηθεί στο παρόν κεφάλαιο ήταν ο *A. carbonarius* μιας και έχει απομονωθεί αλλά και η ΩΤΑ έχει ανιχνευθεί σε φρούτα της κατηγορίας των μηλοειδών (Aziz et al. 2002, Drusch and Ragab 2003, Al-Hindi et al. 2011) (βλ. Κεφ. 2.1, § 2.1.1). Η αναζωογόνηση του μύκητα και η συλλογή των σποριών έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην § 2.2.1.

7.2.3 Προετοιμασία φρούτων

Μήλα (*Malus domestica* ποικιλία Στάρκιν) και αχλάδια (*Pyrus communis* ποικιλία Κρυστάλλια) αποτέλεσαν τα προς μελέτη φρούτα. Στοχεύοντας στην ελαχιστοποίηση της παραλλακτικότητας στο σχήμα των δειγμάτων, φρούτα ίδιας παρτίδας χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Τα φρούτα επιλέχθηκαν ώστε να μην έχουν μώλωπες ή αμυχές. Μετά το στάδιο της διαλογής, ακολούθησε καθαρισμός του φλοιού με 70% αιθανόλη και τεμαχισμός στο ήμισυ και σε σχήμα ροδέλας (με

εγκάρσια τομή ολόκληρου του φρούτου) πάχους 1 cm με ειδικό οικιακό εργαλείο ώστε να μελετηθεί η ανάπτυξη του μύκητα στο φλοιό και στη σάρκα αντίστοιχα. Αμυχές διαμέτρου 0.5 cm έγιναν τόσο στο φλοιό όσο και στη σάρκα προσομοιάζοντας πιθανές εστίες επιμόλυνσης από το συγκεκριμένο μύκητα. Η επιλογή της μελέτης της ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ στο φλοιό και στη σάρκα έγινε λαμβάνοντας υπόψη ότι το ίδιο φρούτο μπορεί να αποτελέσει δύο διαφορετικά εν δυνάμει υποστρώματα για το μύκητα. Ο χειρισμός και η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες. Κατά το πείραμα των εδώδιμων επικαλύψεων, η δράση του αιθερίου ελαίου στην ανάπτυξη και την παραγωγή της ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* μελετήθηκε τόσο στη σάρκα όσο και στο φλοιό, ενώ στην περίπτωση της μελέτης της δράσης του αιθερίου ελαίου μέσω της διάχυσης των πτητικών ουσιών μελετήθηκε μόνο στη σάρκα. Η επιλογή έγινε κυρίως με βάση πιθανούς τρόπους συσκευασίας που μπορούν να προταθούν για κάθε μέθοδο εφαρμογής.

7.2.4 Αιθέριο έλαιο

Το αιθέριο έλαιο κανέλας (CAS No 8015-91-6) χρησιμοποιήθηκε στο παρόν κεφάλαιο. Το συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο προέρχεται από το φυτό της κανέλας το οποίο φέρει το λατινικό όνομα *Cinnamom zeylandicum* και ανήκει στην οικογένεια *Lauraceae*.

7.2.5 Μέθοδοι εφαρμογής του αιθερίου ελαίου κανέλας

7.2.5.1 Διάχυση των πτητικών ουσιών- Ενοφθαλμισμός

Ο ενοφθαλμισμός των δειγμάτων με το μύκητα *A. carbonarius* (10^2 σπόρια/g φρούτου) έγινε με εναπόθεση του ενοφθαλμίσματος στην επιφάνεια και κοντά στο κέντρο κάθε τεμαχίου φρούτου. Ο παράγων, αιθέριο έλαιο μελετήθηκε σε δύο σειρές δειγμάτων: μία σειρά που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (C) (τα δείγματα συσκευάστηκαν χωρίς αιθέριο έλαιο) και μία σειρά δειγμάτων συσκευασμένων σε τρυβλία Petri στο εσωτερικό των οποίων προστέθηκε χαρτί Whatman No. 6 καθορισμένων διαστάσεων, το οποίο εμποτίστηκε με καθαρό αιθέριο έλαιο κανέλας. Το εμποτισμένο χαρτί κολλήθηκε στο καπάκι του τρυβλίου με ταινία διπλής όψης, χωρίς να έρχεται σε επαφή με το φρούτο. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 0.3 (0.3% EC) και 0.9% (0.9% EC) αιθερίου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου. Κατά τη μελέτη μικρότερων συγκεντρώσεων αιθερίου ελαίου κανέλας (π.χ. 0.1%), ώστε να υπάρχει αντιστοιχία με το ποσοστό του ελαίου που είναι ενσωματωμένο στην εδώδιμη επικάλυψη, δεν παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 15, 20 και 25°C.

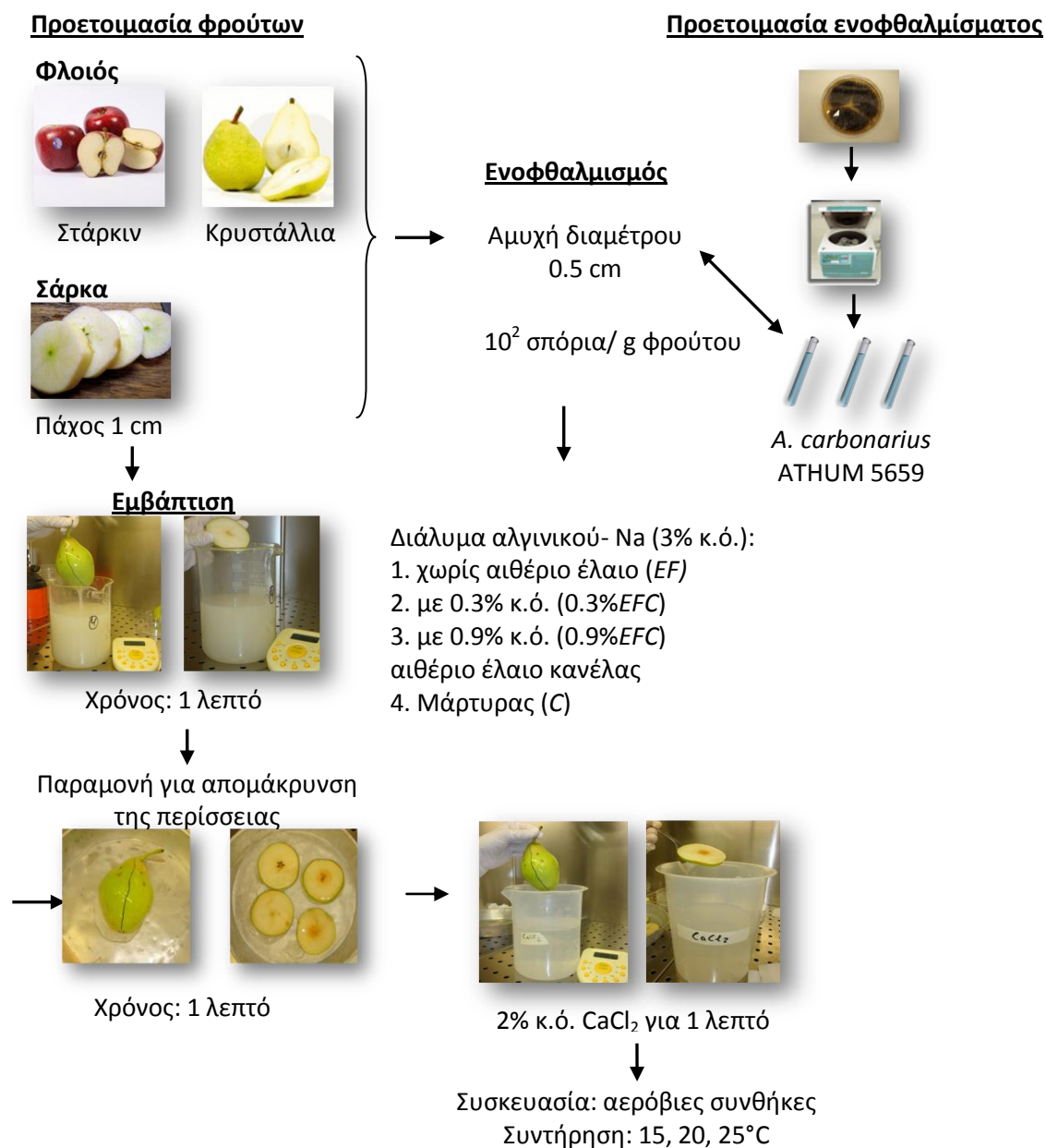
7.2.5.2 Ενσωμάτωση σε εδώδιμες επικαλύψεις

α. Προετοιμασία διαλυμάτων αλγινικού νατρίου

Τα διαλύματα αλγινικού νατρίου παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τροποποιημένη μέθοδο των Mitrakas et al. (2008). Συγκεκριμένα, σκόνη αλγινικού νατρίου (3 g) προστέθηκε σε 100 mL αποστειρωμένου νερού σε μικρές δόσεις γραμμαρίων υπό σταθερή ανάδευση και θέρμανση (60°C) ώστε να διασφαλιστεί επαρκώς η διάλυσή της επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα την ομοιογένεια του διαλύματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 1 mL γλυκερόλης (πλαστικοποιητής) ώστε να αυξηθεί η ευκαμψία και η ανθεκτικότητα της μεμβράνης. Η χρήση πλαστικοποιητή επηρεάζει τη δυνατότητα της μεμβράνης να προσροφά υγρασία και συνήθως αυξάνει τη διαπερατότητά της σε οξυγόνο (McHugh and Krochta 1994, Sothornvit and Krochta 2000, Han and Gennadios 2005). Το αιθέριο έλαιο κανέλας ενσωματώθηκε στο διάλυμα αλγινικού νατρίου (3% κ.ό.) σε συγκέντρωση 0.3 (0.3% EFC) και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) με τη χρήση ομογενοποιητή υψηλής ταχύτητας για 3 λεπτά στην υψηλότερη ταχύτητα ($26 \cdot 10^3$ rpm). Στην πραγματικότητα, η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ανά γραμμάριο φρούτου ήταν πολύ μικρότερη. Κατά τη μελέτη μικρότερων συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου κανέλας (π.χ. 0.1% κ.ό.), δεν παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν προετοιμάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες.

β. Ενοφθαλμισμός

Όσον αφορά στο φλοιό, τα φρούτα ενοφθαλμίστηκαν με το μύκητα *A. carbonarius* (10^2 σπόρια/g φρούτου) στα σημεία των τομών, ενώ στην περίπτωση της σάρκας το ενοφθάλμισμα εναποτέθηκε στην επιφάνεια και κοντά στο κέντρο κάθε τεμαχίου φρούτου. Μετά από παραμονή των δειγμάτων για προσκόλληση του ενοφθαλμίσματος (4°C για 15 λεπτά), ακολούθησε εμβάπτιση σε διάλυμα αλγινικού νατρίου χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) και με αιθέριο έλαιο κανέλας 0.3% EFC και 0.9% EFC για 1 λεπτό. Τα δείγματα παρέμειναν σε επιφάνειες από αλουμίνιο για 1 λεπτό ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος αλγινικού νατρίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επιπλέον εμβάπτιση των δειγμάτων σε 2% κ.ό. CaCl₂ για 1 λεπτό ώστε να σχηματιστεί η επικάλυψη. Ενοφθαλμισμένα δείγματα μήλων και αχλαδιών (φλοιός και σάρκα) χωρίς επικάλυψη χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (C) (Σχήμα 7.1). Όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 15, 20 και 25°C.



Σχήμα 7.1. Πειραματική πορεία της προετοιμασίας, του ενοφθαλμισμού με τον *A. carbonarius* και της εμβάπτισης των φρούτων σε διαλύματα αλγινικού νατρίου με και χωρίς αιθέριο έλαιο κανέλας.

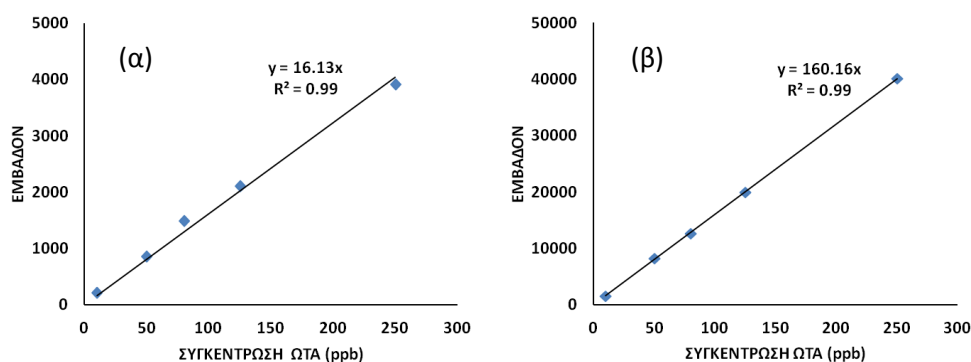
7.2.6 Μετρήσεις

7.2.6.1 Ανάπτυξη του μύκητα

Η ανάπτυξη παρατηρήθηκε βάσει της μεταβολής της διαμέτρου του μύκητα και του πληθυσμού των σπορίων κατά τη διάρκεια της συντήρησης (βλ. Κεφ. 2, § 2.4.1β και γ). Πραγματοποιήθηκε επίσης περιοδική καταμέτρηση του πληθυσμού της ΟΜΧ και μέτρηση των μεταβολών του pH. Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο της μετασποράς σύμφωνα με την παράγραφο § 2.4.2α.

7.2.6.2 Ανίχνευση- ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ

Η εκχύλιση της ΩΤΑ και ο καθαρισμός των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.5.2.1. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ έγινε με τη χρήση HPLC σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο § 2.5.2.2. Κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες τόσο για τα μήλα όσο και για τα αχλάδια στο εύρος 0-250 ppb (Γράφημα 7.1).



Γράφημα 7.1. Οι πρότυπες καμπύλες (α) του μήλου και (β) του αχλαδιού που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της ΩΤΑ.

Πίνακας 7.2. Ποσοστά ανάκτησης της ΩΤΑ από τη φόρτιση των δύο φρούτων με γνωστές συγκεντρώσεις ΩΤΑ.

	Ανάκτηση (%)	
	Συγκέντρωση ΩΤΑ (ppb)	
	10	250
Μήλα	118.4	96.9
Αχλάδια	92.4	100.2

7.2.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση της ανάπτυξης του μύκητα και της παραγωγής της ΩΤΑ έγινε σύμφωνα με την § 2.6.

7.3 Αποτελέσματα

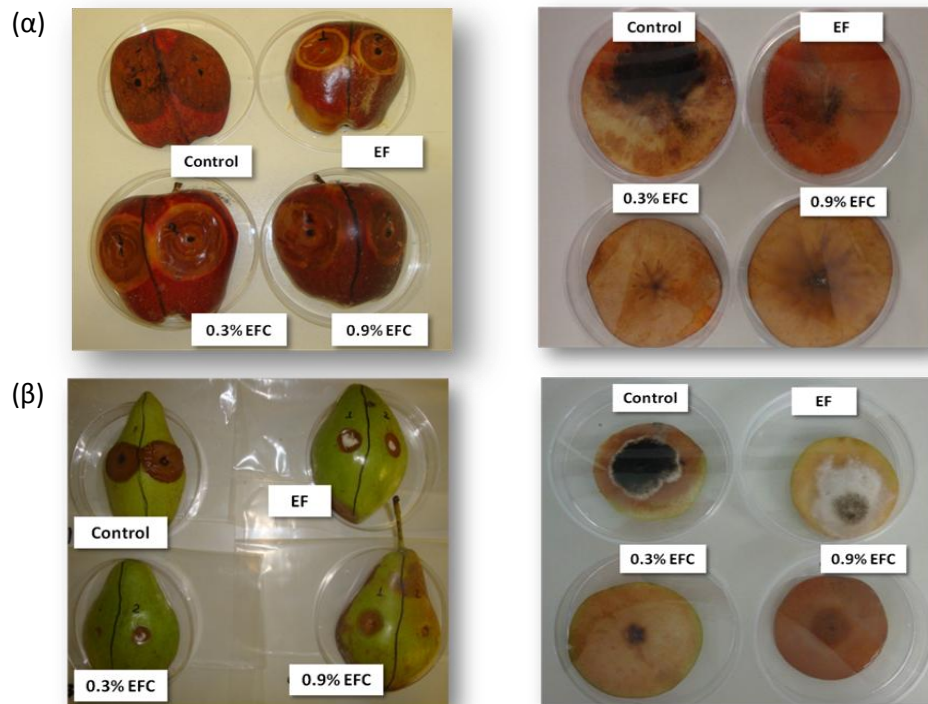
7.3.1 Ανάπτυξη του μύκητα

Παράγοντες όπως η συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου, το σημείο ενοφθαλμισμού, το είδος του φρούτου και η θερμοκρασία επηρέασαν σημαντικά ($p < 0.05$) την ανάπτυξη του μύκητα και στις δύο εφαρμογές του αιθερίου ελαίου κανέλας. Όπως αναφέρθηκε η εκτίμηση της ανάπτυξης του μύκητα έγινε τόσο βάσει της μεταβολής της διαμέτρου όσο και της λογαριθμικής αύξησης των σπορίων.

Όσον αφορά στις εδώδιμες επικαλύψεις, η λογαριθμική αύξηση του μύκητα ανεστάλη καθώς η συγκέντρωση της κανέλας αυξανόταν από 0 (μάρτυρας με ή χωρίς εδώδιμη επικάλυψη) σε 0.9%, σε όλες τις μελετηθείσες θερμοκρασίες και στα δύο φρούτα. Η παραπάνω τάση παρατηρήθηκε και κατά τη μέθοδο διάχυσης των πτητικών ουσιών του αιθερίου ελαίου κανέλας. Συγκεκριμένα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις (0.9% *EFC* και 0.9% *EC*) τόσο κατά την άμεση (εδώδιμες επικαλύψεις) (Γραφήματα 7.2, 7.3, 7.4, 7.5) όσο και κατά την έμμεση επαφή (πτητικά συστατικά) (Γραφήματα 7.6, 7.7, 7.8) του αιθερίου ελαίου στο τρόφιμο ήταν οι δραστικότερες και με τους δύο τρόπους παρακολούθησης της ανάπτυξης. Στην περίπτωση των εδώδιμων επικαλύψεων, η συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου κανέλας ήταν αποτελεσματικότερη κατά τον ενοφθαλμισμό στη σάρκα συγκριτικά με το φλοιό, επιτυγχάνοντας πλήρη αναστολή της αύξησης του μύκητα (δεν παρατηρήθηκε εμφανής μυκηλιακή υφή) σε όλες τις θερμοκρασίες επώασης και στα δύο φρούτα. Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και κατά την παρακολούθηση της διαμέτρου της αποικίας του μύκητα. Επιπλέον, κατά τον ενοφθαλμισμό των αχλαδιών στη σάρκα, εκτός από τη συγκέντρωση 0.9% *EFC* και η 0.3% *EFC* αποδείχθηκε αποτελεσματική για πλήρη αναστολή (100%) της ανάπτυξης του μύκητα. Κατά την παρατήρηση της μεταβολής της διαμέτρου, η ανάπτυξη του μύκητα ακολούθησε τη σειρά Μάρτυρας > *EF* > 0.3% *EFC* ≥ 0.9% *EFC* σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από τη σάρκα στους 20 και 25°C όπου οι μεγαλύτερες τιμές διαμέτρου παρατηρήθηκαν στα δείγματα φρούτων με *EF*. Επιπλέον, κατά τη μελέτη της λογαριθμικής μεταβολής των πληθυσμών των спорίων, η εφαρμογή της επικάλυψης χωρίς αιθέριο έλαιο δεν έδειξε ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα τόσο κατά τον ενοφθαλμισμό στη σάρκα όσο και στο φλοιό και στα δύο φρούτα. Όσον αφορά στη δεύτερη μέθοδο εφαρμογής του αιθερίου ελαίου μέσω της δράσης των πτητικών συστατικών, η συγκέντρωση 0.3% *EC* έδειξε ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα της τάξης των 2-3log και στα δύο φρούτα στους 15°C, εν αντιθέσει με τους 20 και 25 όπου η δράση της εν λόγω συγκέντρωσης στην ανάπτυξη δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p > 0.05$). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και με τους δύο τρόπους εκτίμησης της ανάπτυξης (Γραφήματα 7.6, 7.7, 7.8). Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα ήταν οι 25°C (Γραφήματα 7.2-7.8).

Κατά τη σύγκριση των δύο φρούτων, ο ρυθμός της αύξησης της διαμέτρου του *A. carbonarius* στα αχλάδια ήταν γρηγορότερος και η έκταση της спорιογονίας πιο έντονη συγκριτικά με τα μήλα σε όλες τις πειραματικές περιπτώσεις και με τους δύο τρόπους εφαρμογής (Γραφήματα 7.2, 7.4, 7.6). Το παραπάνω αποτέλεσμα ενισχύεται και από τις μεταβολές του pH. Η επίδραση των διαφορετικών μεταχειρίσεων στις τιμές του pH των μήλων και των αχλαδιών παρουσιάζονται στους Πίνακες 7.3, 7.4 και 7.5. Η αρχική τιμή του pH των μήλων και των αχλαδιών ήταν 4.5-4.9 και 4.3-4.9 αντίστοιχα. Κατά τη συντήρηση, παρατηρήθηκε ταχύτερη μείωση των τιμών του pH στα αχλάδια σε

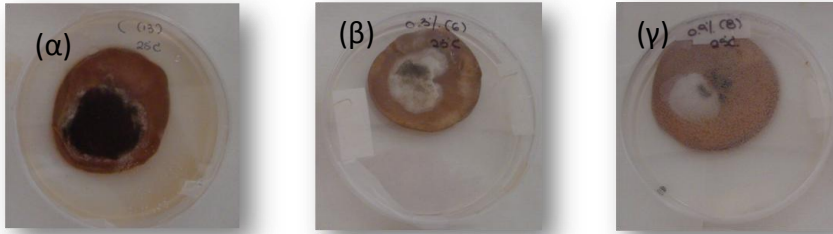
σχέση με τα μήλα τόσο κατά τον ενοφθαλμισμό στο φλοιό όσο και στη σάρκα, υποδεικνύοντας την πρόοδο της αλλοίωσης τόσο από τον ενοφθαλμισμένο μύκητα αλλά και βακτήρια και ζύμες της ενδογενούς χλωρίδας. Επίσης, τα φρούτα, τα οποία είχαν επικάλυψη με αιθέριο έλαιο παρουσίασαν τη μικρότερη μείωση του pH συγκριτικά με τους μάρτυρες. Το φαινόμενο αυτό ενισχύθηκε αυξανόμενης της θερμοκρασίας συντήρησης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της μελέτης της δράσης του αιθερίου ελαίου μέσω της διάχυσης των πτητικών δραστικών ουσιών (Πίνακας 7.5).



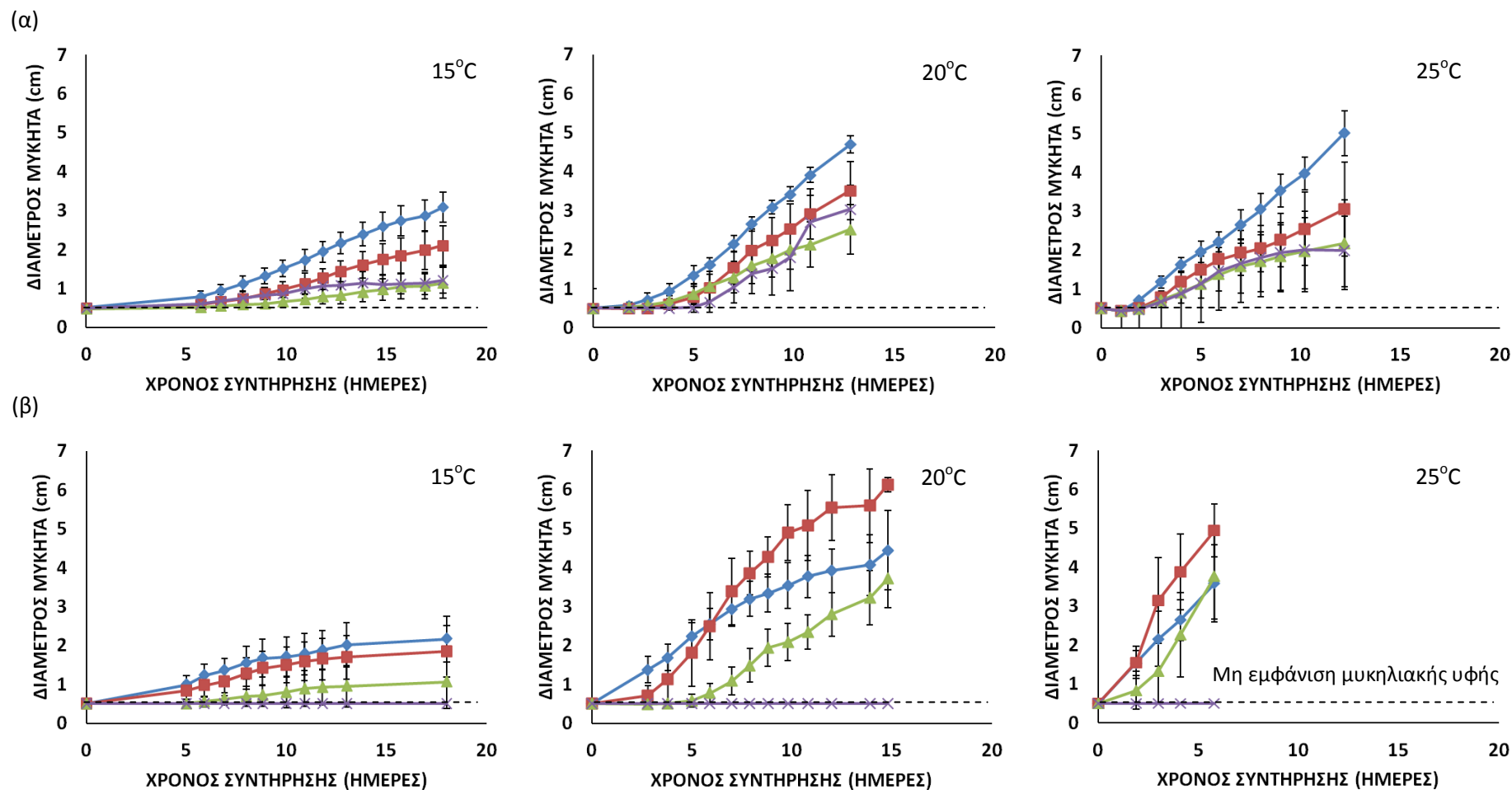
Εικόνα 7.1. Οπτική παρατήρηση της μυκηλιακής ανάπτυξης του *A. carbonarius* των ενοφθαλμισμένου στο φλοιό και στη σάρκα (α) μήλων και (β) αχλαδιών χωρίς edώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (Control), με edώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF), με edώδιμη επικάλυψη 0.3% κ.ό. (0.3% EFC), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) αιθερίου ελαίου κανέλας.

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική παρατήρηση των φρούτων στοχεύοντας στην παρακολούθηση της επίδρασης του αιθερίου ελαίου στις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Στην περίπτωση των edώδιμων επικαλύψεων και το φλοιό, τα αποτελέσματα στην εμφάνιση ήταν θετικά μιας και τα φρούτα απέκτησαν στιλπνότητα, ενώ το άρωμα της κανέλας ακόμα και στην υψηλή συγκέντρωση (0.9% κ.ό.) ήταν ήπιο και ευχάριστο (Εικόνα 7.1). Όσον αφορά στη σάρκα, κατά την εφαρμογή της υψηλής συγκέντρωσης του αιθερίου ελαίου κανέλας, η οποία αποτέλεσε και την αποτελεσματικότερη, παρατηρήθηκε έντονη

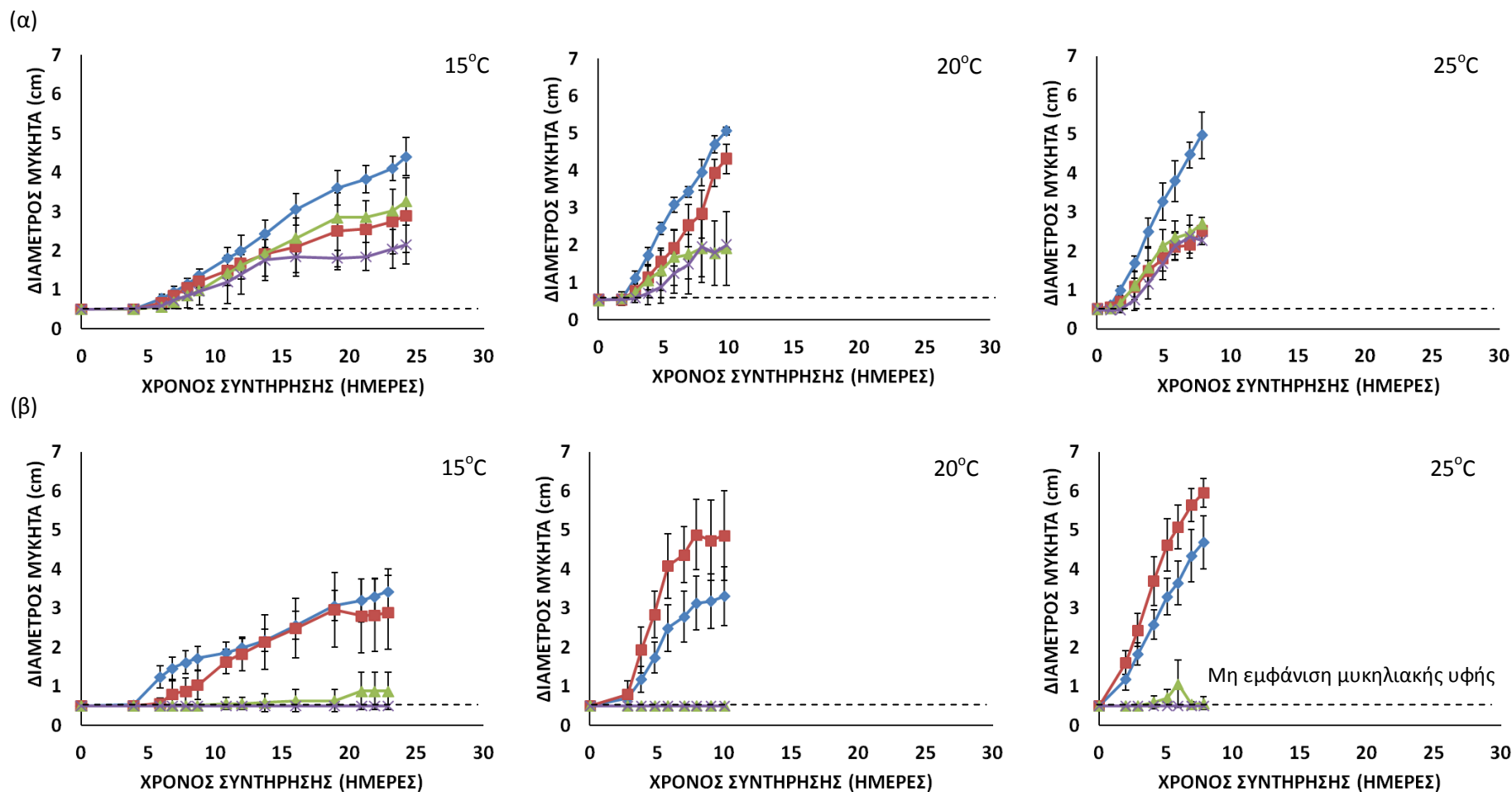
αμαύρωση (Εικόνες 7.1 και 7.2). Η παραπάνω παρατήρηση καταγράφηκε και με τους δύο τρόπους εφαρμογής του αιθερίου ελαίου.



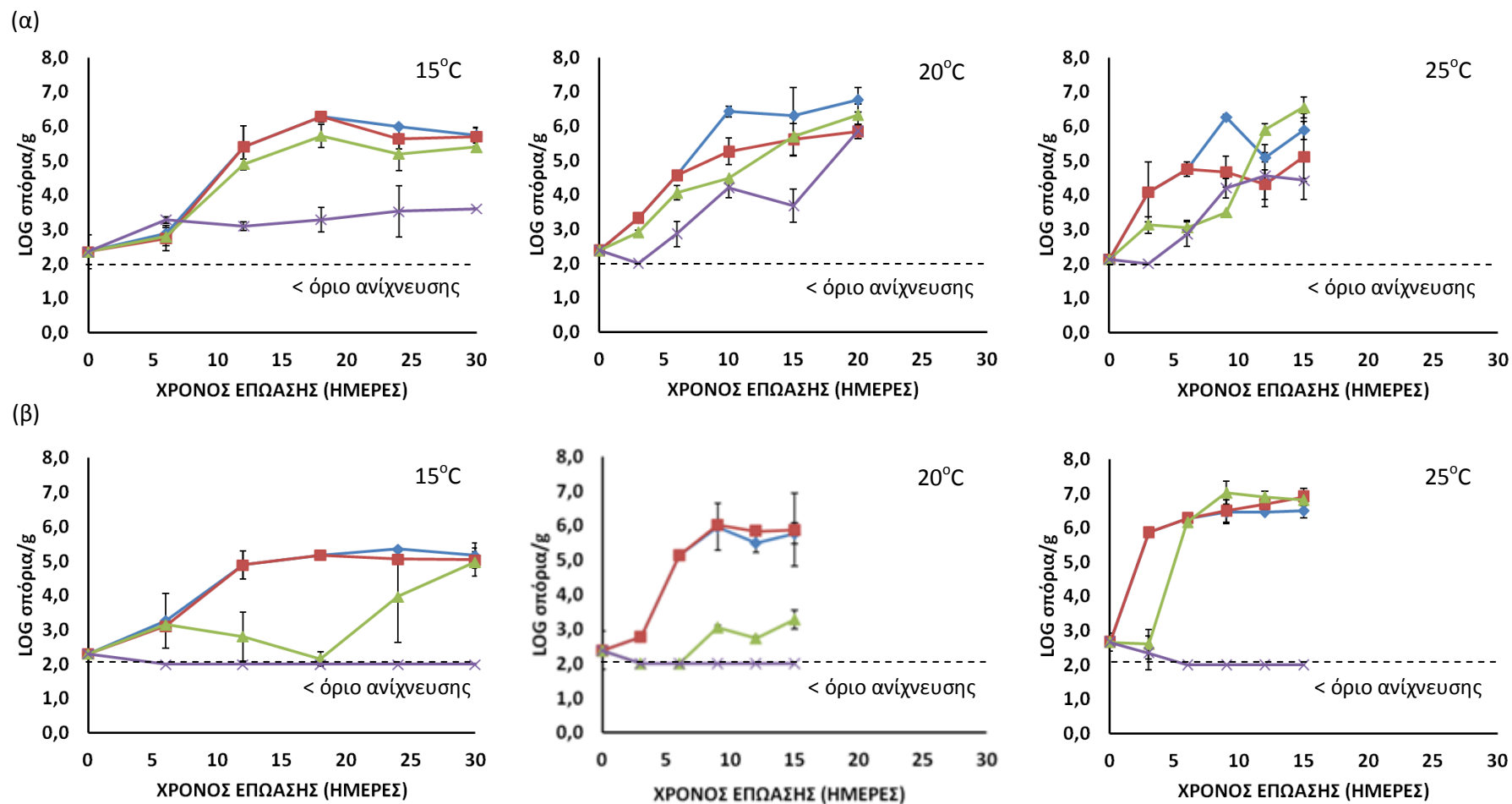
Εικόνα 7.2. Οπτική παρατήρηση της αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου στη σάρκα αχλαδιών με τη μέθοδο της διάχυσης των πτητικών συστατικών αιθερίου ελαίου κανέλας. (α) Μάρτυρας, (β) 0.3% (0.3% EC), και (γ) 0.9% (0.9% EC) αιθερίου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου.



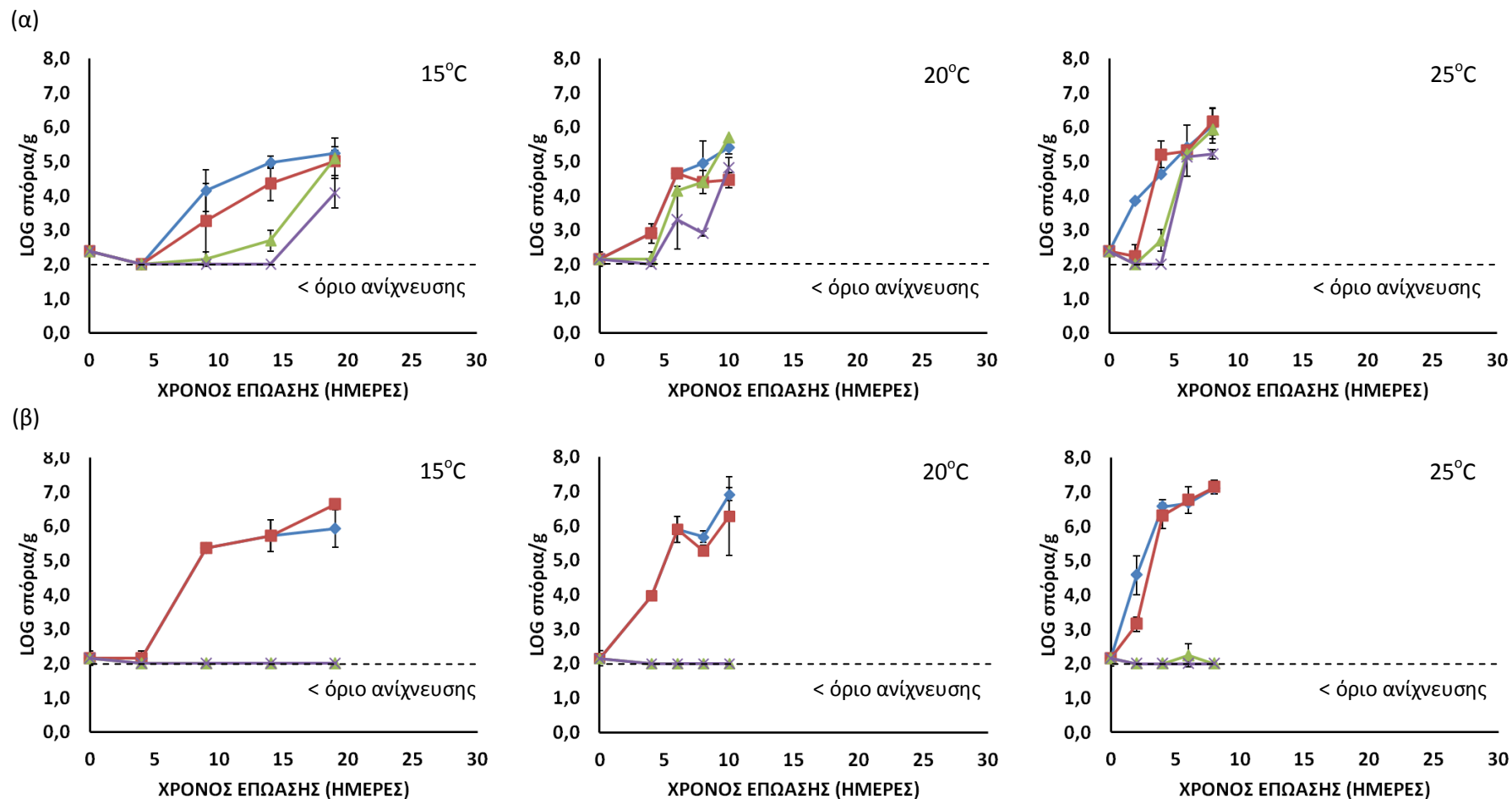
Γράφημα 7.2. Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα μήλων χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-×-) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο τουλάχιστον 10 ανεξάρτητων δειγμάτων.



Γράφημα 7.3. Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (- ◆-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (- ■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (- ▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (- ✕-) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο τουλάχιστον 10 ανεξάρτητων δειγμάτων.



Γράφημα 7.4. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα μήλων χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-x-) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.



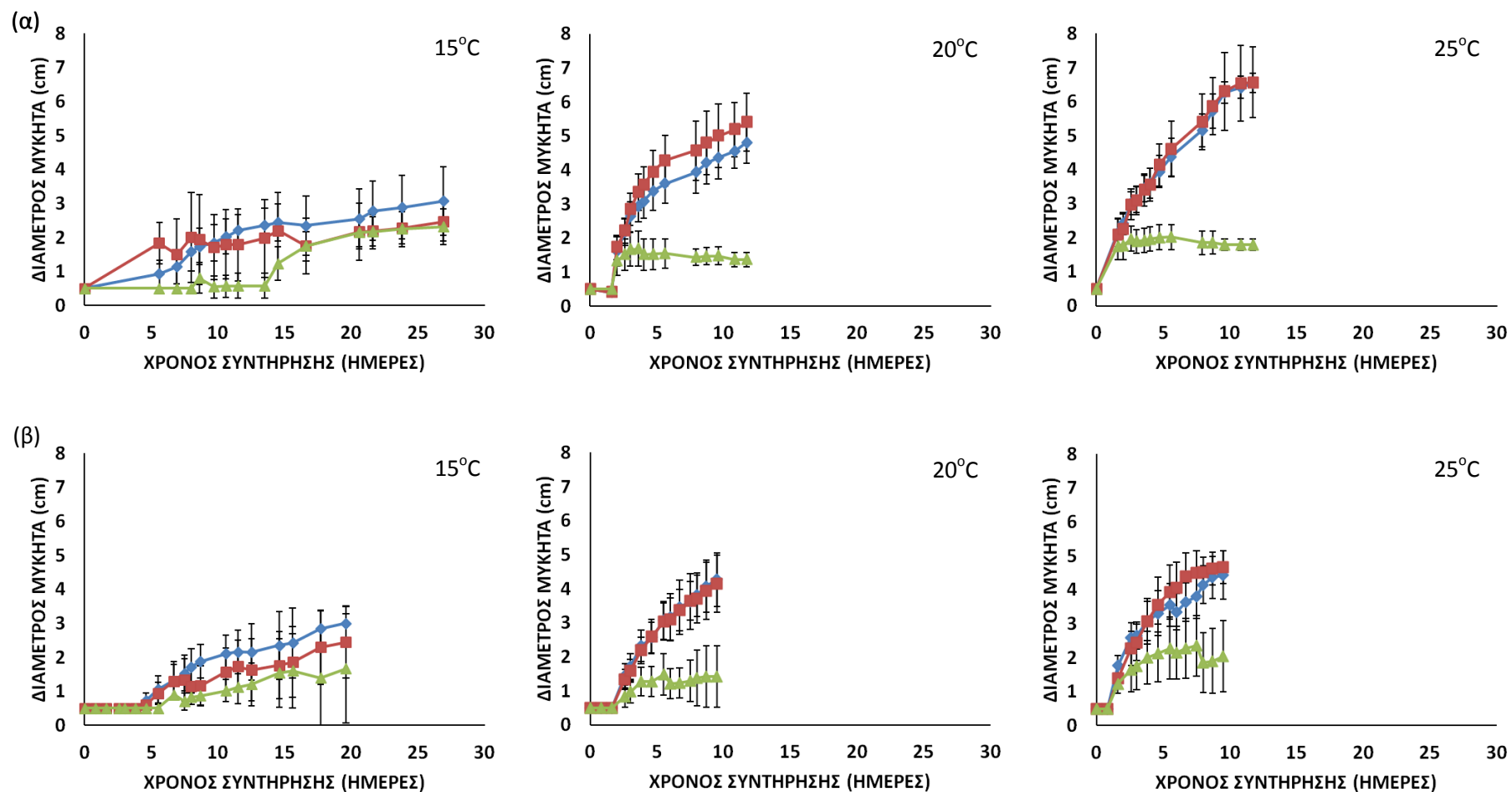
Γράφημα 7.5. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-×-) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.

Πίνακας 7.3. Μεταβολές του pH μήλων και αχλαδιών ενοφθαλμισμένων με *A. carbonarius* στο φλοιό χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (C), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.

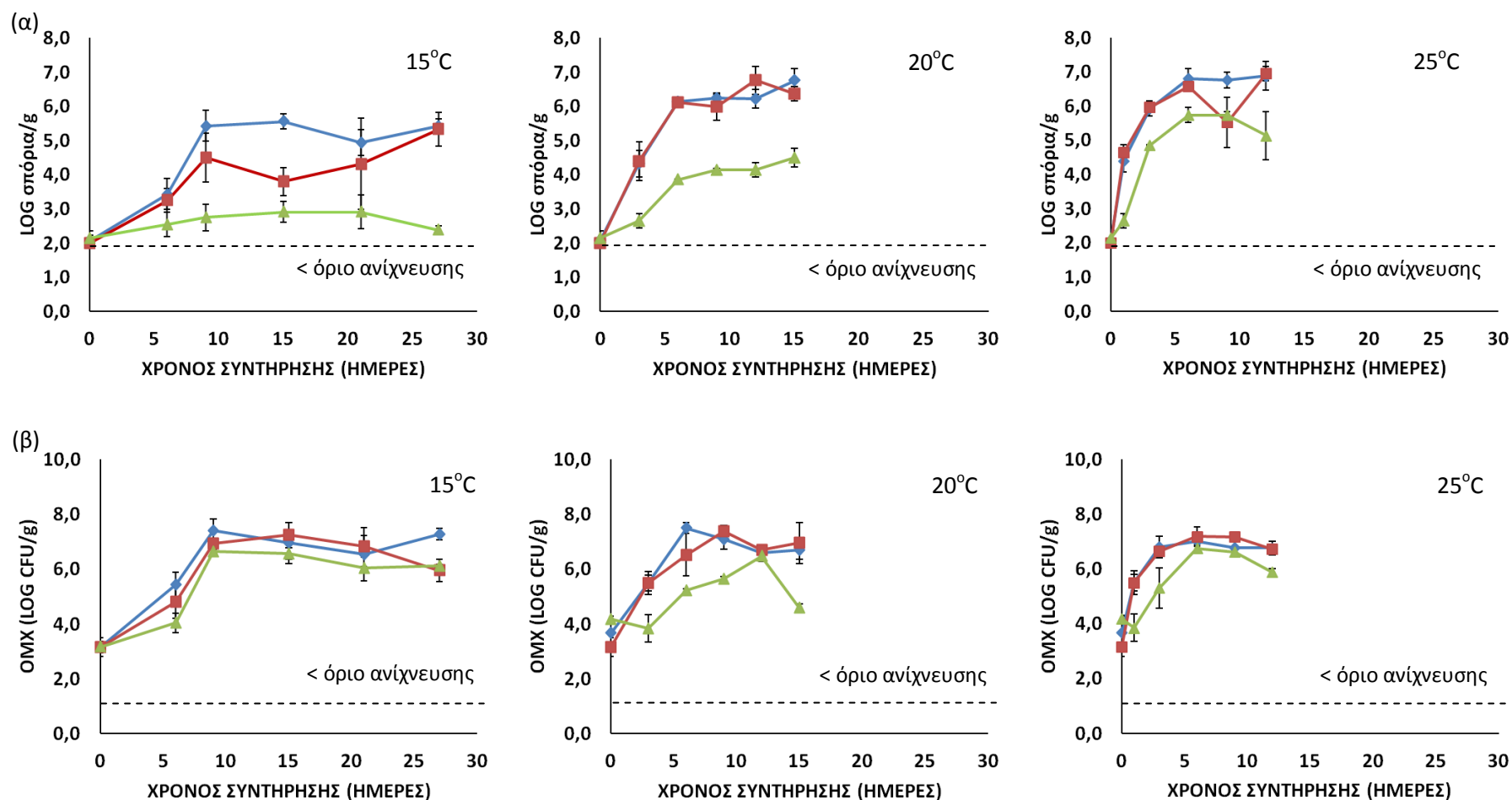
Θερμοκρασία (°C)		Ημέρες	C	EF	0.3% EFC	0.9% EFC	
15	Μήλα	0	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	
		6	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.0	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.0	
		12	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1	
		18	3.5 ± 0.0	3.7 ± 0.0	4.4 ± 0.0	4.2 ± 0.1	
		24	3.4 ± 0.0	3.9 ± 0.0	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.0	
		30	3.4 ± 0.0	3.6 ± 0.0	4.1 ± 0.0	4.4 ± 0.1	
	Αχλάδια	0	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	
		4	4.9 ± 0.0	4.2 ± 0.0	4.8 ± 0.0	4.7 ± 0.1	
		9	4.4 ± 0.0	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.6 ± 0.1	
		14	4.2 ± 0.0	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	
		19	3.7 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.8 ± 0.2	
	25	Μήλα	0	4.5 ± 0.0	4.5 ± 0.0	4.5 ± 0.0	4.5 ± 0.0
			3	4.4 ± 0.0	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.0	4.5 ± 0.0
			6	4.1 ± 0.0	4.3 ± 0.0	4.4 ± 0.0	4.3 ± 0.0
			9	3.5 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.3 ± 0.0	4.3 ± 0.1
12			3.4 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.0	4.5 ± 0.2	
15			3.3 ± 0.1	3.9 ± 0.2	3.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	
Αχλάδια		0	4.3 ± 0.0	4.3 ± 0.0	4.3 ± 0.0	4.3 ± 0.0	
		2	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.0	4.7 ± 0.1	4.9 ± 0.1	
		4	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	5.0 ± 0.1	
		6	3.8 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.1 ± 0.1	
		8	3.9 ± 0.1	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.0	4.1 ± 0.0	

Πίνακας 7.4. Μεταβολές του pH μήλων και αχλαδιών ενοφθαλμισμένων με *A. carbonarius* στη σάρκα χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (C), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.

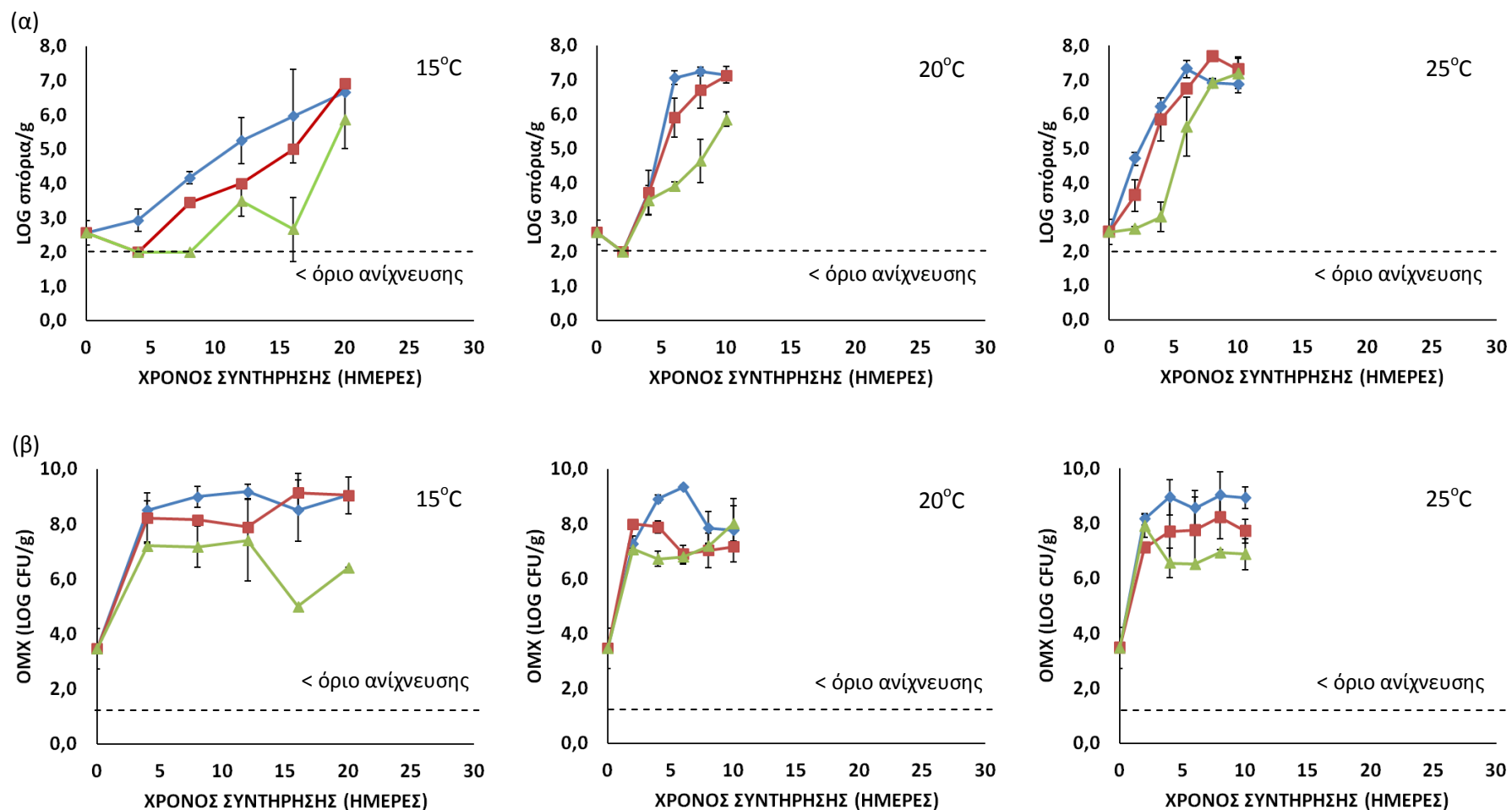
Θερμοκρασία (°C)		Ημέρες	C	EF	0.3% EFC	0.9% EFC	
15	Μήλα	0	4.9 ± 0.0	4.9 ± 0.0	4.9 ± 0.0	4.9 ± 0.0	
		6	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.0	
		12	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.9 ± 0.4	
		18	3.3 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.1	4.5 ± 0.0	
		24	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.0	4.4 ± 0.0	
		30	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2	4.3 ± 0.5	
	Αχλάδια	0	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	
		4	4.6 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.2	
		9	4.1 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.8 ± 0.4	4.8 ± 0.0	
		14	4.1 ± 0.3	3.7 ± 0.1	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.1	
		19	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.4	4.9 ± 0.4	4.9 ± 0.1	
	25	Μήλα	0	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1
			3	4.3 ± 0.0	4.5 ± 0.5	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.0
			6	3.8 ± 0.0	3.4 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1
9			3.4 ± 0.0	3.1 ± 0.4	3.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1	
12			3.2 ± 0.0	3.3 ± 0.0	2.9 ± 0.1	4.6 ± 0.2	
15			3.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	4.4 ± 0.1	
Αχλάδια		0	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	
		2	4.7 ± 0.0	4.5 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.4 ± 0.3	
		4	3.7 ± 0.0	3.8 ± 0.3	4.7 ± 0.5	5.3 ± 0.5	
		6	3.9 ± 0.4	3.4 ± 0.5	5.1 ± 0.7	5.2 ± 0.1	
		8	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.5	4.9 ± 0.0	4.7 ± 0.2	



Γράφημα 7.6. Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της διαμέτρου του *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου στη σάρκα (α) μήλων και (β) αχλαδιών χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (- ◆-), με 0.3% (0.3% EC) (- ■-), και 0.9% (0.9% EC) (- ▲-) αιθερίου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 10 ανεξάρτητων δειγμάτων.



Γράφημα 7.7. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του (α) *A. carbonarius* και της (β) Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στη σάρκα μήλων χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (- ◆-), με 0.3% (0.3% EC) (- ■-), και 0.9% (0.9% EC) (- ▲-) αιθερίου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.



Γράφημα 7.8. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της λογαριθμικής ανάπτυξης του (α) *A. carbonarius* και της (β) Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στη σάρκα αχλαδιών χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με 0.3% (0.3% EC) (-■-), και 0.9% (0.9% EC) (-▲-) αιθερίου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.

Πίνακας 7.5. Μεταβολές του pH μήλων και αχλαδιών ενοφθαλμισμένων με *A. carbonarius* στη σάρκα χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας), με 0.3% (0.3% EC), και 0.9 % (0.9% EC) αιθερίου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 2 ανεξάρτητων δειγμάτων.

Θερμοκρασία (°C)		Ημέρες	C	0.3 EFC	0.9 EFC	
15	Μήλα	0	4.6 ± 0.3	4.9 ± 0.0	4.3 ± 0.0	
		6	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	
		9	3.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.3	
		15	3.7 ± 0.2	3.4 ± 0.0	4.1 ± 0.2	
		21	3.5 ± 0.1	3.8 ± 0.2	4.4 ± 0.0	
		27	3.9 ± 0.4	3.4 ± 0.1	3.7 ± 0.5	
		Αχλάδια	0	4.9 ± 0.0	4.9 ± 0.0	4.9 ± 0.0
	4		4.6 ± 0.1	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.1	
	8		4.3 ± 0.6	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.3	
	12		4.4 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.3 ± 0.5	
	16		4.3 ± 0.9	3.8 ± 0.2	4.8 ± 0.4	
	20		4.3 ± 0.9	3.8 ± 0.2	4.5 ± 0.4	
	25		Μήλα	0	4.6 ± 0.3	4.9 ± 0.0
		3		3.8 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1
6		3.3 ± 0.1		3.3 ± 0.2	3.6 ± 0.0	
9		3.3 ± 0.2		4.0 ± 0.3	3.5 ± 0.1	
12		2.9 ± 0.1		3.0 ± 0.1	3.7 ± 0.0	
Αχλάδια		0	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	
		2	4.7 ± 0.0	4.5 ± 0.2	4.8 ± 0.1	
		4	3.7 ± 0.0	3.8 ± 0.3	4.7 ± 0.5	
		6	3.9 ± 0.4	3.4 ± 0.5	5.1 ± 0.7	
		8	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.5	4.9 ± 0.0	
		10	3.0 ± 0.2	3.3 ± 0.5	5.0 ± 0.0	

7.3.2 Παραγωγή ΩΤΑ

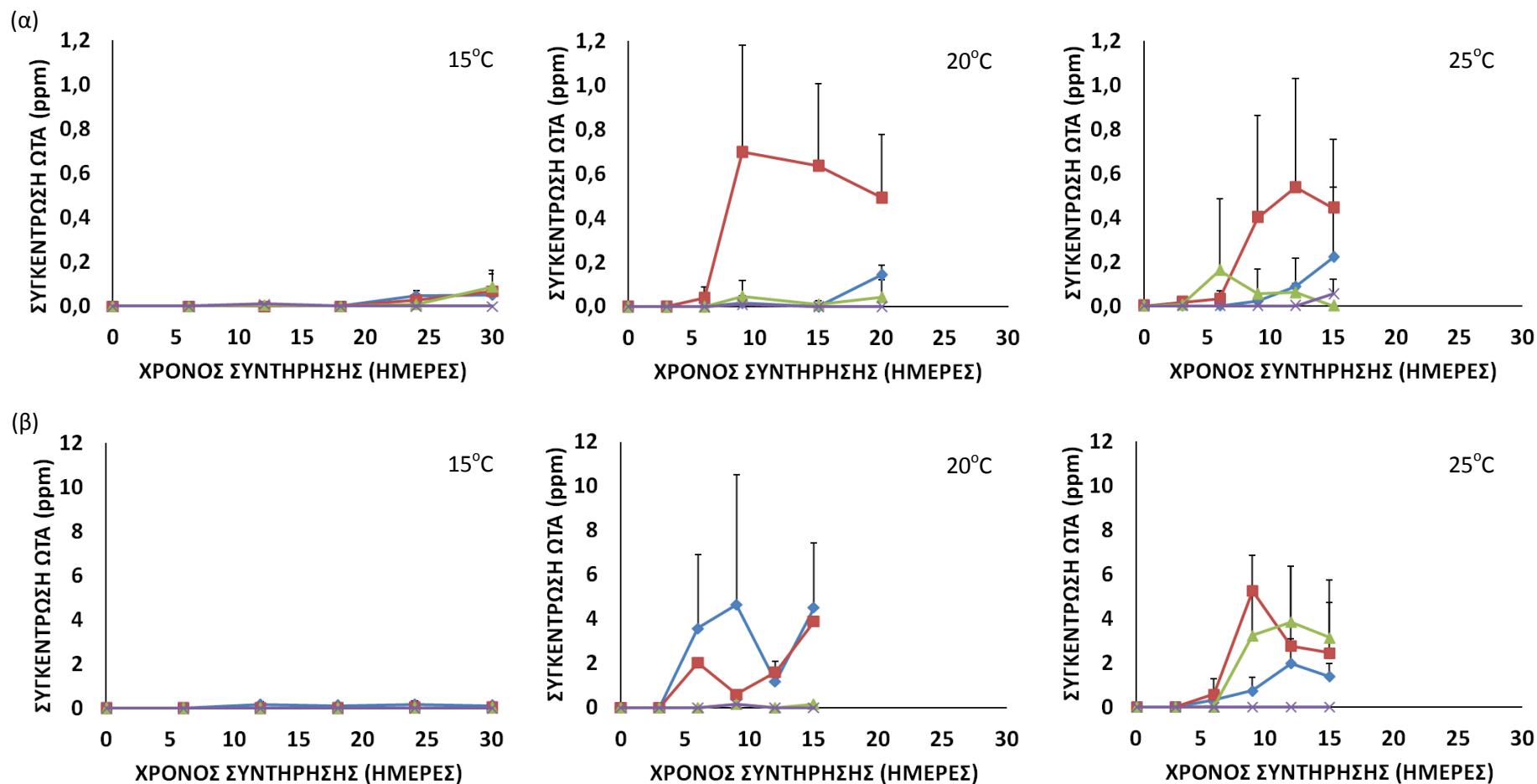
Παράγοντες όπως η συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου, το σημείο ενοφθαλμισμού, το είδος του φρούτου και η θερμοκρασία επηρέασαν σημαντικά ($p < 0.05$) την παραγωγή της ΩΤΑ κατά την εφαρμογή και των δύο μεθόδων. Τα ποσοστά ανάκτησης της τοξίνης στα μήλα και τα αχλάδια ήταν 97-118% και 93-100%, αντίστοιχα. Στην περίπτωση της εφαρμογής των εδώδιμων επικαλύψεων, στους 15°C και κυρίως στην περίπτωση του ενοφθαλμισμού της σάρκας και των δύο φρούτων, τα επίπεδα της ΩΤΑ ακολούθησαν τη σειρά $C > EF > 0.3\% EFC > 0.9\% EFC$. Αντίθετα, στους 20 και 25°C, στα δείγματα με επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο κανέλας, EF παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ συγκριτικά με το μάρτυρα, τόσο στη σάρκα όσο και στο φλοιό (Γραφήματα 7.9, 7.10). Στην περίπτωση της έμμεσης επαφής (διάχυση πτητικών ουσιών) του αιθερίου ελαίου, ο μάρτυρας (π.χ. στα αχλάδια την 10 ημέρα, ~ 1.5 ppm) έδειξε σχεδόν σε όλες τις πειραματικές περιπτώσεις, τις υψηλότερες μέσες συγκεντρώσεις ΩΤΑ, στη συνέχεια τα δείγματα με 0.3% κανέλα (~ 0.5 ppm) και τελικά τα αντίστοιχα με 0.9% (κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου) (Γράφημα 7.11β). Ανάμεσα στις συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου που μελετήθηκαν, τα δείγματα με 0.9% είχαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας, είδος φρούτου, σημείου ενοφθαλμισμού (σάρκα ή φλοιός) και μεθόδου εφαρμογής. Σε πολλές πειραματικές περιπτώσεις μάλιστα δεν ανιχνεύθηκε ΩΤΑ, π.χ. κατά τη συντήρηση των δειγμάτων 0.9% EFC ή 0.3% EFC και 0.9% EFC , της σάρκας μήλου ή αχλαδιού στους 20 και 25°C, αντίστοιχα (Γραφήματα 7.9 και 7.10). Στη θερμοκρασία των 20°C παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ και ακολούθησαν οι 25 και οι 15°C (Γραφήματα 7.9, 7.10 και 7.11). Το παραπάνω αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις. Οι διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις ΩΤΑ λόγω των μεταχειρίσεων με αιθέριο έλαιο σε σχέση με τους μάρτυρες ήταν καθοριστικότερη κοντά στη βέλτιστη θερμοκρασία των 20°C (Γραφήματα 7.9, 7.10 και 7.11).

Κατά της εφαρμογή του αιθερίου ελαίου με τις εδώδιμες επικαλύψεις παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή ΩΤΑ (της τάξης 5-10πλάσια) στη σάρκα σε σχέση με το φλοιό και στα δύο φρούτα (Γραφήματα 7.9 και 7.10). Όσον αφορά στη σύγκριση των δύο φρούτων, η παραγωγή της ΩΤΑ έδειξε διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με το σημείο ενοφθαλμισμού του μύκητα. Συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή των εδώδιμων επικαλύψεων παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή ΩΤΑ στο φλοιό των αχλαδιών, συγκριτικά με το φλοιό των μήλων, ενώ κατά τη μελέτη της σάρκας, στα μήλα ανιχνεύθηκε πολλαπλάσια συγκέντρωση ΩΤΑ σε σχέση με τα αχλάδια. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα στην περίπτωση της εφαρμογής της μεθόδου διάχυσης των πτητικών ουσιών του αιθερίου ελαίου στη σάρκα μήλων και αχλαδιών (Γραφήματα 7.11).

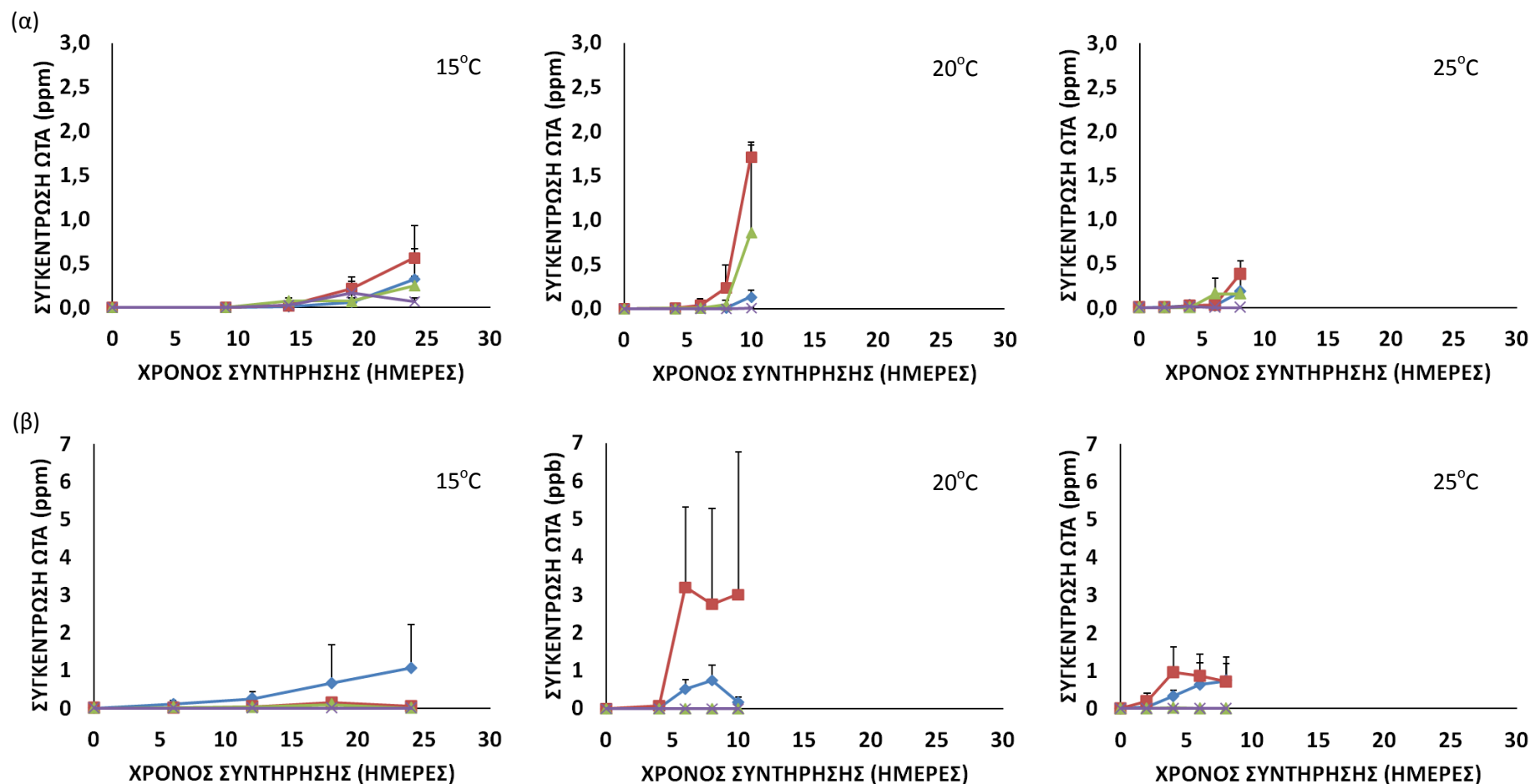
Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι σε πολλές περιπτώσεις και με τις δύο μεθόδους εφαρμογής, αν και η ΩΤΑ ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης π.χ. στα δείγματα 0.3% EFC που ενοφθαλμίστηκαν

στη σάρκα του μήλου στους 15°C (Γράφημα 7.9), υπήρχε εμφανής ανάπτυξη του μύκητα (Γραφήματα 7.2 και 7.4).

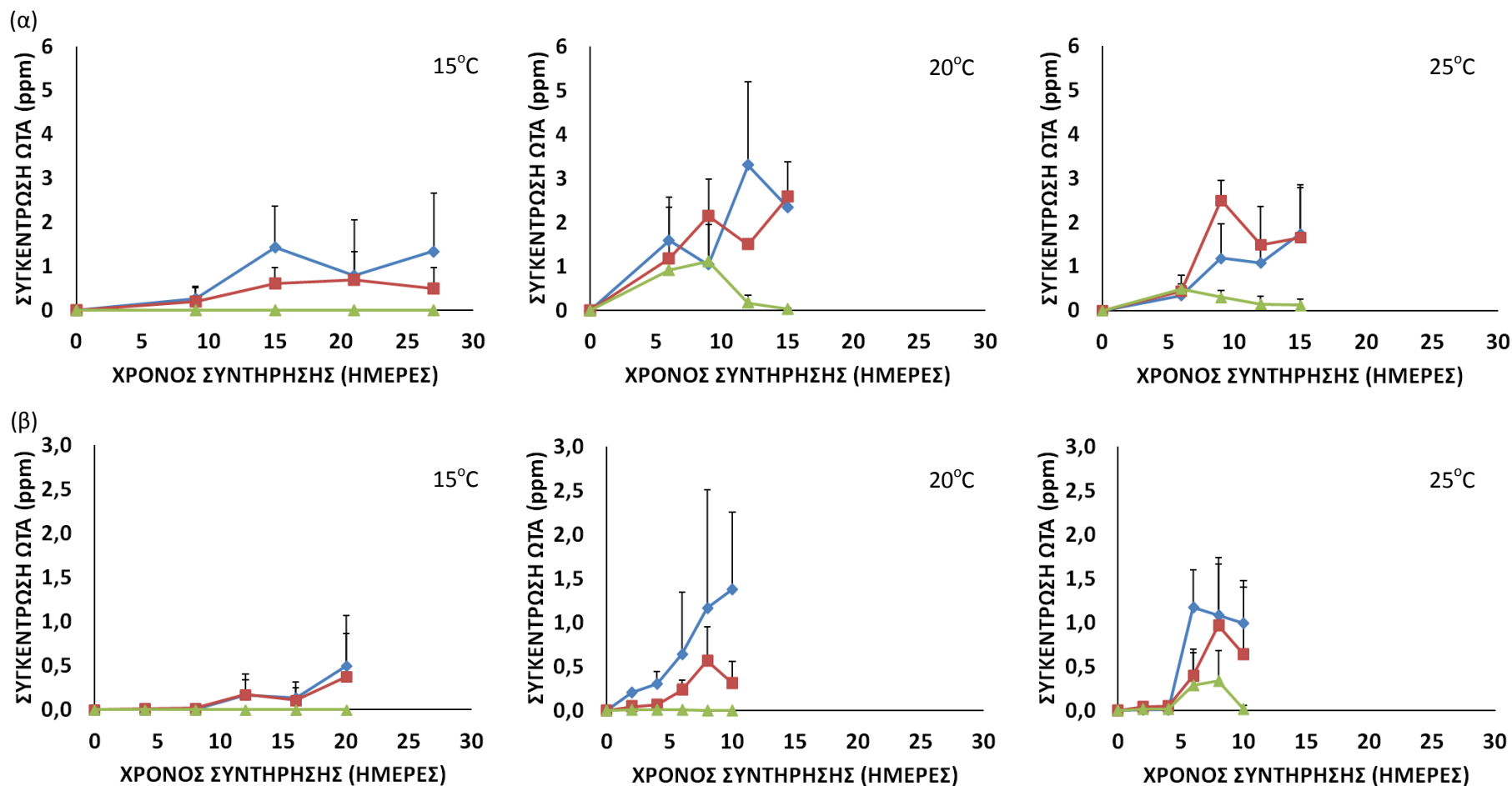
Στα δείγματα των φρούτων πριν την ανάλυση της ΩΤΑ, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση της διαμέτρου της αποικίας του μύκητα ώστε να μελετηθεί εάν υπάρχει πιθανή συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων (Γράφημα 7.12). Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τα αποτελέσματα, στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι αυξανόμενης της διαμέτρου, αυξάνεται και η συγκέντρωση της παραγόμενης ΩΤΑ, τόσο στο φλοιό όσο και στη σάρκα, ανεξάρτητα της μεταχείρισης (με ή χωρίς αιθέριο έλαιο). Επιπλέον, υπήρχαν περιπτώσεις (π.χ. φλοιός/ 0.9% EFC/ 25°C) κατά τις οποίες παρόλο που αυξήθηκε η διάμετρος του μύκητα δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ΩΤΑ. Αξιοσημείωτο ήταν επίσης, ότι σε αποικίες διαφορετικής ακτινωτής διαμέτρου παρατηρήθηκαν παρόμοιες συγκεντρώσεις ΩΤΑ.



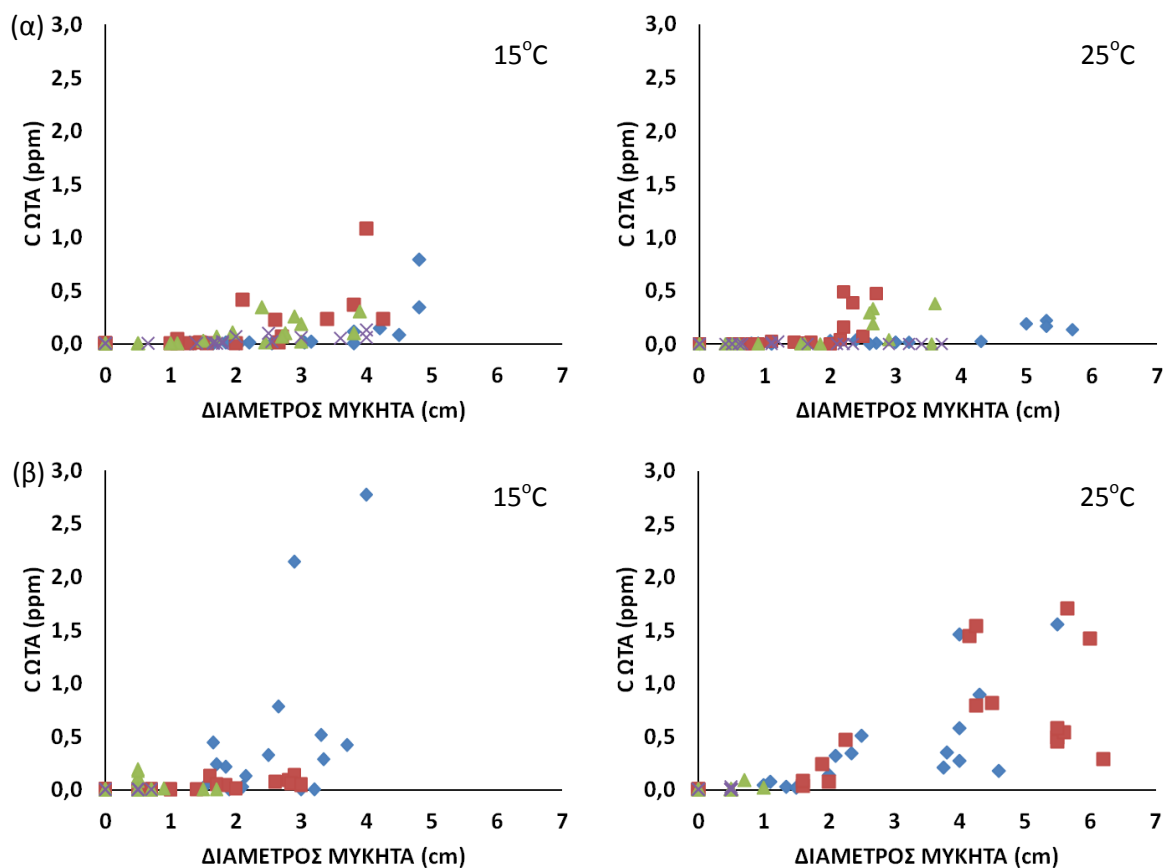
Γράφημα 7.9. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της παραγωγής ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα μήλων χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-×-) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 4 ανεξάρτητων δειγμάτων.



Γράφημα 7.10. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της παραγωγής ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου (α) στο φλοιό και (β) στη σάρκα αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-×-) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 4 ανεξάρτητων δειγμάτων.



Γράφημα 7.11. Γραφική απεικόνιση της κινητικής της παραγωγής ΩΤΑ από τον *A. carbonarius* ενοφθαλμισμένου στη σάρκα (α) μήλων και (β) αχλαδιών χωρίς αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με 0.3% (0.3% EC) (-■-), και 0.9% (0.9% EC) (-▲-) αιθερίου ελαίου κανέλας ανά δείγμα σάρκας φρούτου, συντηρούμενων στους 15, 20 και 25°C. Οι τιμές αναφέρονται στο μέσο όρο 4 ανεξάρτητων δειγμάτων.



Γράφημα 7.12. Ενδεικτικά παραδείγματα της συσχέτισης μεταξύ της ακτινωτής διαμέτρου του *A. carbonarius* και της συγκέντρωσης ΩΤΑ κατά τον ενοφθαλισμό (α) του φλοιού και (β) της σάρκας αχλαδιών χωρίς εδώδιμη επικάλυψη και αιθέριο έλαιο (μάρτυρας) (-♦-), με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) (-■-), με εδώδιμη επικάλυψη 0.3% (0.3% EFC) (-▲-), και 0.9% κ.ό. (0.9% EFC) (-x-) αιθερίου ελαίου κανέλας, συντηρούμενων στους 15 και 25°C.

7.4 Συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή εδώδιμων επικαλύψεων εμπλουτισμένων με αιθέριο έλαιο κανέλας δύναται να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του μύκητα *A. carbonarius* κατά τον ενοφθαλισμό τόσο στο φλοιό όσο και στη σάρκα μήλων και αχλαδιών. Παρόμοια συμπεριφορά, με μικρότερη αντιμυκητιακή δράση επέδειξε και η εφαρμογή του αιθερίου ελαίου στη κύρια συσκευασία, στηριζόμενη στη διάχυση των δραστικών πτητικών ουσιών στην επιφάνεια του φρούτου, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε πολλαπλάσια συγκέντρωση αιθερίου ελαίου κανέλας. Οι προαναφερθείσες παρατηρήσεις συσχετίζονται με τη συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου. Για παράδειγμα σύμφωνα με τις δύο μεθόδους εκτίμησης της ανάπτυξης του μύκητα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου (0.9% EFC και 0.9% EC), παρεμπόδισαν μερικώς (π.χ. στο πείραμα διάχυσης των πτητικών ουσιών) ή ανέστειλαν πλήρως (100%) (στο πείραμα με εδώδιμες επικαλύψεις) την ανάπτυξη του μύκητα. Η πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα (μη

εμφανής μυκηλιακή υφή) παρατηρήθηκε κατά τον ενοφθαλμισμό του μύκητα στη σάρκα και των δύο φρούτων. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες πληροφορίες στη βιβλιογραφία, η κανέλα ως αιθέριο έλαιο, έχει κυρίως μυκητοστατική και όχι μυκητοκτόνο δράση (Wang et al. 2005, López-Malo et al. 2007). Παρόλα αυτά υπό συνθήκες καταπόνησης και υψηλές συγκεντρώσεις, το εν λόγω φυσικό αντιμικροβιακό μπορεί να αποτελέσει ικανό μυκητοκτόνο, όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές πληροφορίες διαθέσιμες στη βιβλιογραφία, για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθερίων ελαίων ενσωματωμένων σε «ενεργή συσκευασία», η χρήση αιθερίου ελαίου κανέλας έχει μελετηθεί ελάχιστα, περιορίζοντας τη δυνατότητα για σύγκριση με τα παρόντα αποτελέσματα (Nielsen and Rios, 2000). Συγκεκριμένα, η επιστημονική ομάδα του Lu (2010) έδειξε ότι η εφαρμογή αλγινικού ασβεστίου με αιθέριο έλαιο κανέλας δύναται να αναστείλει την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών και να διατηρήσει την ποιότητα φιλέτων ιχθυηρών. Παρόμοια αποτελέσματα, όσον αφορά στην αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων από την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών, έχουν καταγραφεί σε φρεσκοτεμαχισμένα μήλα, φέτες ζαμπόν και λουκάνικα (Oussalah et al. 2007, Raybaudi-Massilia et al. 2008). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα κατά την εφαρμογή της επικάλυψης χωρίς αιθέριο έλαιο, EF, σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Sánchez-González et al. (2010), μελετώντας την επίδραση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης με αιθέριο έλαιο περγαμόντο στην ανάπτυξη του *Penicillium italicum*.

Όσον αφορά την επίδραση του αιθερίου ελαίου κανέλας μέσω της διάχυσης των πτητικών συστατικών που απελευθερώνονται στο εσωτερικό της συσκευασίας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική αναστέλλοντας την ανάπτυξη του μύκητα. Όπως ήδη προαναφέρθηκε και σε αυτήν τη μέθοδο η ανάπτυξη του μύκητα ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση. Συγκεκριμένα αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αιθερίου ελαίου, η αναστολή της ανάπτυξης (διάμετρος της αποικίας + λογαριθμική μεταβολή των σπορίων) ήταν μεγαλύτερη. Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται από πληθώρα μελετών με *in vitro* ή *in situ* πειράματα εφαρμογής διαφορετικών εδώδιμων μεμβρανών ή επικαλύψεων και αιθερίων ελαίων (Pranoto et al. 2005, Seydim and Sarikus 2006, Emiroğlu et al. 2010). Συγκεκριμένα, η παρεμποδιστική δράση της κανέλας έχει καταγραφεί σε διαφορετικά είδη μυκήτων όπως *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium commune*, *P. corylophilum*, *P. discolor*, *P. palitans*, *P. polonicum*, *P. roqueforti*, *P. solitum* και *Fusarium proliferatum* αλλά και Gram- θετικά ή Gram- αρνητικά βακτήρια κατά την έκθεσή τους στο αιθέριο έλαιο με απευθείας εφαρμογή στην επιφάνεια του προϊόντος ή με προσθήκη εμποτισμένου χαρτιού στο εσωτερικό της συσκευασίας (Nielsen and Rios 2000, Velluti et al. 2003, Wang et al. 2005, López- Malo et al. 2007, Tzortzakis 2007, Goñi et al. 2009). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, και οι δύο μέθοδοι εφαρμογής του αιθερίου ελαίου κανέλας

για συγκεκριμένες συγκεντρώσεις κρίνονται επαρκείς όσον αφορά στην αντιμυκητιακή δράση στη σάρκα και στο φλοιό, μήλων και αχλαδιών.

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μύκητα ήταν οι 25°C, ανεξάρτητα από τη μεταχείριση με ή χωρίς αιθέριο έλαιο κανέλας και τη μέθοδο εφαρμογής, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Marín et al. 2006, Mateo et al. 2009, Karetanakou et al. 2011). Σύμφωνα με τη μέθοδο καταμέτρησης των σπορίων, μειούμενης της θερμοκρασίας συντήρησης, η επίδραση του αιθερίου ελαίου της κανέλας ενισχύθηκε, υποδεικνύοντας αποτελεσματικότερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *A. carbonarius* συγκριτικά με τους μάρτυρες. Η παρατήρηση αυτή πιθανόν να είναι ένα συνδυαστικό αποτέλεσμα της αυξημένης πτητικότητας των αιθερίων ελαίων στις υψηλές θερμοκρασίες και της θερμοφιλικής φύσης του εν λόγω μύκητα (θεωρία των εμποδίων). Η παραπάνω παρατήρηση, δεν επιβεβαιώθηκε κατά την παρακολούθηση της μεταβολής της διαμέτρου του μύκητα.

Η μέγιστη παραγωγή της ΩΤΑ, παρατηρήθηκε στους 20°C σε όλες τις πειραματικές περιπτώσεις και στις δύο μεθόδους εφαρμογής του αιθερίου ελαίου κανέλας, αποτέλεσμα που έχει καταγραφεί και σε προηγούμενες μελέτες τόσο σε τρόφιμα όσο και σε εργαστηριακά υποστρώματα (Marín et al. 2006, Mateo et al. 2009, Karetanakou et al. 2009, 2011). Όσον αφορά στο πείραμα με την εφαρμογή του αιθερίου ελαίου με εδώδιμες επικαλύψεις, στους 15°C και κυρίως στην περίπτωση ενοφθαλμισμού της σάρκας των φρούτων, τα επίπεδα της ΩΤΑ ακολούθησαν τη σειρά $C > EF > 0.3\% EFC > 0.9\% EFC$. Αντίθετα στις υψηλότερες θερμοκρασίες (20 και 25°C), στο μάρτυρα παρατηρήθηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ συγκριτικά με τα δείγματα *EF* και *0.3\% EFC*, πιθανόν λόγω απώλειας της επιφανειακής υγρασίας. Το παραπάνω αποτέλεσμα ενισχύεται και από τη μακροσκοπική παρατήρηση των φρούτων όπου τα δείγματα που αποτελούσαν τους μάρτυρες έδειχναν αφυδατωμένα συγκριτικά με τα δείγματα *EF* και *0.3\% EFC* στις υψηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με αρκετές έρευνες, η a_w περιορίζει καθοριστικά την παραγωγή της ΩΤΑ (Tassou et al. 2007). Επίσης, δεδομένου ότι η διαπερατότητα της μεμβράνης είναι μεγαλύτερη σε υψηλές θερμοκρασίες, η μεταφορά του αιθερίου ελαίου τόσο προς το τρόφιμο (αντιμυκητιακή δράση) όσο και προς το περιβάλλον (απώλεια πτητικών ουσιών) αναμένεται αυξημένη. Η μεγαλύτερη παραγωγή ΩΤΑ παρατηρήθηκε όταν ο μύκητας ενοφθαλμίστηκε στη σάρκα συγκριτικά με το φλοιό σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες και στα δύο φρούτα. Στην περίπτωση της έμμεσης επαφής (πτητικές ουσίες) του αιθερίου ελαίου, η παραγωγή της ΩΤΑ συνοψίζεται στη σειρά $\text{Μάρτυρας} > 0.3\% EC > 0.9\% EC$. Παρόλο που αρκετές έρευνες έχουν μελετήσει την επίδραση των αιθερίων ελαίων στην παραγωγή των μυκοτοξινών, η πραγματική σύγκριση δεν μπορεί να γίνει μιας και ο τρόπος εφαρμογής του αντιμικροβιακού παράγοντα διαφέρει. Συγκεκριμένα, οι Aldred et al. (2008) πρότειναν τον έλεγχο της ανάπτυξης και της παραγωγής της ΩΤΑ από τους *A. westerdijkiae* και *P.*

verrucosum με ψεκασμό αιθερίων ελαίων (ανάμεσά τους και η κανέλα) σε σπόρους σιταριού. Εκτός της κανέλας και άλλα αιθέρια έλαια όπως ο βασιλικός, η μέντα, η ρίγανη, η δάφνη και το γαρύφαλλο έχουν μελετηθεί και έχει αποδειχθεί η δραστηριότητά τους στον έλεγχο της παραγωγής ΩΤΑ (Basílico and Basílico, 1999, Aldred et al. 2008). Επιπλέον, τα πειραματικά δεδομένα της ΩΤΑ έδειξαν μεγάλη παραλλακτικότητα ανάμεσα στα δείγματα (μεγάλες τυπικές αποκλίσεις), συγκριτικά με την ανάπτυξη του μύκητα, παρατήρηση που ενισχύει τη δυσκολία της μελέτης ενός δευτερογενούς μεταβολίτη και συγκεκριμένα στο περίπλοκο περιβάλλον ενός τροφίμου.

Κατά τη σύγκριση των δύο φρούτων, η παραγωγή της ΩΤΑ έδειξε διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με το σημείο ενοφθαλισμού του μύκητα. Συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή με τις εδώδιμες επικαλύψεις παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή ΩΤΑ στο φλοιό των αχλαδιών, συγκριτικά με τα μήλα. Η παραπάνω παρατήρηση πιθανόν να οφείλεται στη σκληρότητα του φλοιού των μήλων, με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερη ενέργεια για διάσπαση του ιστού ώστε να παραλάβει ο μύκητας τα θρεπτικά συστατικά, να προαχθεί η ανάπτυξή του και να παράγει την τοξίνη. Αντίθετα, κατά τη μελέτη της σάρκας, στα μήλα ανιχνεύθηκε πολλαπλάσια συγκέντρωση ΩΤΑ, αποτέλεσμα που πιθανόν να σχετίζεται με τη μεγαλύτερη διαθεσιμότητα τόσο σε επιφάνεια όσο και θρεπτικά συστατικά σε σχέση με τα αχλάδια. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα κατά τη σύγκριση της παραγόμενης ΩΤΑ, στην περίπτωση της εφαρμογής της μεθόδου των πτητικών του αιθερίου ελαίου, στη σάρκα μήλων και αχλαδιών.

Αξιοσημείωτο επίσης είναι το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις αν και η ΩΤΑ ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης π.χ. στα δείγματα 0.3% EFC που ενοφθαλμίστηκαν στη σάρκα του μήλου στους 15°C, υπήρχε εμφανής ανάπτυξη του μύκητα, υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη του αιθερίου ελαίου παρεμπόδισε την παραγωγή της ΩΤΑ περισσότερο από την αύξηση του μύκητα. Το παραπάνω παρατηρήθηκε και με τις δύο μεθόδους εφαρμογής του αιθερίου ελαίου. Επίσης, στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν περιπτώσεις όπου παρόλο που η ανάπτυξη του μύκητα παρεμποδίστηκε σημαντικά με την εφαρμογή 0.3% κ.ό. αιθερίου ελαίου κανέλας, η παραγωγή της τοξίνης ενισχύθηκε. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η ομάδα του Hore et al. (2005). Σύμφωνα με αρκετούς ερευνητές, η αναστολή της ανάπτυξης και της παραγωγής της ΩΤΑ δεν συνυπάρχουν απαραίτητα. Πιο συγκεκριμένα, η αναστολή της ανάπτυξης με την εφαρμογή αιθερίων ελαίων δεν συνεπάγεται υποχρεωτικά και μείωση στην παραγωγή της εκάστοτε παραγόμενης μυκοτοξίνης. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Magan et al. (2002), οι οποίοι παρατήρησαν ότι σε συνθήκες κοντά στις βέλτιστες, η εφαρμογή μυκητοκτόνων είναι δυνατόν να διεγείρει την παραγωγή μιας άλλης όμως μυκοτοξίνης, της δεσοξυνιβαλενόλης (deoxyhivalenol, DON) από τον *F. culmorum* σε σπόρους σιταριού. Ως πιθανή ερμηνεία προτείνεται ότι συνδυαστικές καταπονήσεις είναι δυνατόν να διεγείρουν την παραγωγή των μυκοτοξινών λειτουργώντας ως

μηχανισμοί άμυνας (Magan and Aldred, 2007). Τέτοιου είδους πειραματικές παρατηρήσεις πρέπει να καταγράφονται και να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη, μιας και υποδεικνύουν ότι πρόκειται για δύο ανεξάρτητους κινδύνους (ανάπτυξη μύκητα + ΩΤΑ), οι οποίοι πιθανόν να χρειάζονται διαφορετική διαχείριση.

Κατά τη σύγκριση των δύο εφαρμοζόμενων μεθόδων στην ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή της ΩΤΑ, αποτελεσματικότερη αποδείχθηκε η μέθοδος των εδώδιμων επικαλύψεων απαιτώντας μικρότερες συγκεντρώσεις αιθερίου ελαίου κανέλας σε σχέση με τη μέθοδο των πτητικών ουσιών. Αποτέλεσμα που έχει καταγραφεί και από την ομάδα των Matan et al. 2006. Παρόλα αυτά, κάθε μέθοδος έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Συγκεκριμένα, η έμμεση επαφή μέσω των πτητικών ουσιών του αιθερίου ελαίου, ως μέθοδος πλεονεκτεί λόγω της περιορισμένης επίδρασης στη γεύση και στο άρωμα του προϊόντος. Όπως είναι αναμενόμενο, με αυτήν την εφαρμογή απελευθερώνονται σταδιακά οι πτητικές ουσίες έως ότου επέλθει κορεσμός στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας. Η απελευθέρωσή τους εντός της συσκευασίας ενισχύεται από την αύξηση της θερμοκρασίας και της υγρασίας και μειώνεται κατά τη συντήρηση, ανάλογα με την περατότητα της συσκευασίας και τη διάρκεια της συντήρησης. Αντίθετα, στην περίπτωση των εδώδιμων επικαλύψεων παρατηρήθηκε μεν ότι απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση αιθερίου ελαίου συγκριτικά με τη μέθοδο της έμμεσης επαφής μέσω των πτητικών ουσιών για να επιτευχθεί ακόμα και πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα ή της παραγωγής ΩΤΑ αλλά η δράση στη μακροσκοπική εικόνα του φρούτου, κυρίως στην περίπτωση της σάρκας, είναι έντονη προκαλώντας στο 90% των δειγμάτων αμαύρωση. Γι' αυτό το λόγο απαιτείται περαιτέρω μελέτη ώστε να προσδιορισθεί η ελάχιστη συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου που θα καθιστά το προϊόν ασφαλές αλλά και ποιοτικά αποδεκτό.

Παρόλο που οι αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων και των δραστικών συστατικών τους έχει μελετηθεί ευρύτατα (Nychas, 1995), ο μηχανισμός δράσης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (Lambert et al. 2001). Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό των διαφορετικών χημικών ουσιών των δραστικών ομάδων που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια, δεν είναι δυνατόν η αντιμικροβιακή ή αντιμυκητιακή δράση να συνοψιστεί σε έναν μηχανισμό (Skandamis et al. 2001, Carson et al. 2002). Συγκεκριμένα, στο αιθέριο έλαιο της κανέλας όπου η κινναμωμική αλδεΐδη και η ευγενόλη (κύριες δραστικές ουσίες) θεωρούνται υπεύθυνες για την ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των μυκήτων σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου με ενεργά ένζυμα με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους επιδρώντας έτσι στη βιοσύνθεση των μυκοτοξινών (Bullerman et al. 1977, Juglal et al. 2002). Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός της αδρανισμού των μυκήτων από την κινναμωμική αλδεΐδη δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Έχει προταθεί ότι η δραστικότητα των αιθερίων ελαίων είναι αποτέλεσμα κυρίως συνεργιστικής ή συσσωρευτικής

δράσης μεταξύ των μεμονωμένων δραστικών ουσιών του εκάστοτε αιθερίου ελαίου. Απαιτούνται όμως περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δράσης των αιθερίων ελαίων ώστε να θεωρηθεί ότι πρόκειται για πιθανό συνεργιστικό φαινόμενο (Paster et al. 1994). Ενδεικτικά, οι κυριότεροι μηχανισμοί που έχουν συσχετιστεί ευρύτερα με τη δράση των αιθερίων ελαίων είναι η αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος (Helander et al. 1998), η φθορά της κυτταρικής μεμβράνης (Ultee et al. 2000), η καθίζηση των πρωτεϊνών της μεμβράνης (Ultee et al. 1999), η απώλεια του κυτταρικού περιεχόμενου (Cox et al. 2000, Lambert et al. 2001) και η πήξη του κυτοπλάσματος (Gustafson et al. 1998). Επιπλέον, η αντιμικροβιακή ή αντιμυκητιακή δράση των αιθερίων ελαίων και ποιο σημείο του κυττάρου αποτελεί το «στόχο» εξαρτάται και από τη μέθοδο εφαρμογής. Συγκεκριμένα, κατά την επαφή τους με το τρόφιμο (π.χ. εδώδιμες μεμβράνες ή επικαλύψεις) οφείλεται κυρίως στη δραστικότητα πτητικών και μη ουσιών του αιθερίου ελαίου. Στην περίπτωση όμως της εφαρμογής των αιθερίων ελαίων μέσω της αέριας φάσης, επέρχεται ισορροπία ανάμεσα στα πτητικά συστατικά (υδρόφιλα και υδρόφοβα) που απελευθερώνονται στον υπερκείμενο χώρο (headspace), ενώ μέρος των υδρόφιλων μη πτητικών απορροφώνται από το θρεπτικό υπόστρωμα ή το τρόφιμο. Οι χημικά δραστικές ουσίες των αιθερίων ελαίων είναι κυρίως υδρόφοβες και συσσωρεύονται σε λιπόφιλες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας δομικές και λειτουργικές βλάβες (Sikkema et al. 1995, Cox et al. 2000, Lambert et al. 2001).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Γενικά συμπεράσματα

Όπως αναφέρθηκε στον πρόλογο, η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο καταρχήν τη διερεύνηση της επίδρασης οικολογικών παραγόντων όπως το pH, η θερμοκρασία, η a_w , η μικροδομή και η αρχική συγκέντρωση ενοφθαλμίσματος, στην ανάπτυξη τριών ειδών ωχρατοξινογόνων μυκήτων, του *A. westerdijkiae*, του *A. carbonarius* και του *P. verrucosum*, και την παραγωγή της τοξίνης. Παράλληλα με τη βοήθεια της μικροβιολογίας πρόρρησης αναπτύχθηκαν μοντέλα ικανά να προβλέπουν παραμέτρους της μυκηλιακής ανάπτυξης (π.χ. ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα, χρόνος εμφάνισης της μυκηλιακής υφής) και της παραγωγής της ΩΤΑ (π.χ. ρυθμός παραγωγής, μέγιστη παραγόμενη ΩΤΑ) σε συνάρτηση με τους προαναφερθέντες παράγοντες. Αποτυπώθηκε επίσης, η παραλλακτικότητα της συμπεριφοράς μεμονωμένων σπορίων ως προσομοίωση της συμπεριφοράς πολύ μικρού αριθμού σπορίων των μυκήτων, τα οποία δύνανται να επιμολύνουν τρόφιμα στη καθημερινή πρακτική. Ως δευτερεύων στόχος αλλά εξίσου σημαντικός τέθηκε η διερεύνηση της εφαρμογής της πληρέστερης δυνατής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό τόσο βιολογικών μεθόδων στηριζόμενων σε μικροοργανισμούς τεχνολογικής σημασίας όσο και φυσικών αντιμικροβιακών (αιθέρια έλαια) για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ωχρατοξινογόνων μυκήτων και τον έλεγχο της παραγωγής ΩΤΑ σε εργαστηριακά υποστρώματα (*in vitro*) με συνιστώσες τους προαναφερθέντες οικολογικούς παράγοντες και τη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα. Η μελέτη στα τρόφιμα έγινε με πειράματα ενοφθαλμισμού (challenge tests) μυκήτων σε τρόφιμα που περιείχαν τη φυσική τους μικροχλωρίδα (*in situ*) συντηρούμενα σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Συγκεκριμένα, κατά το πρώτο πειραματικό κεφάλαιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής (**Κεφάλαιο 3**) επιλέχθηκαν προς μελέτη οι τρεις κυριότεροι οικολογικοί παράγοντες (pH, a_w και θερμοκρασία) που είναι δυνατόν να επηρεάσουν την παραγωγή της ΩΤΑ από τους *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα λοιπόν συμπεραίνεται ότι οι συνδυασμοί των τριών οικολογικών παραγόντων επιδρούν διαφορετικά σε κάθε έναν από τους μελετώμενους μύκητες. Συγκεκριμένα, ο *P. verrucosum* παρήγαγε τις μικρότερες συγκεντρώσεις ΩΤΑ, ενώ ο *A. carbonarius* ήταν ο ισχυρότερα ωχρατοξινογόνος μύκητας, παράγοντας τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η a_w δύναται να αποτελέσει ικανό εμπόδιο για την ανάπτυξη του

A. carbonarius και κατά συνέπεια την παραγωγή της ΩΤΑ, σε αντίθεση με τα άλλα δύο είδη μυκήτων. Όσον αφορά το pH φαίνεται να μην έχει καθορισμένη επίδραση καθώς παρατηρήθηκε παραγωγή τοξίνης σε όλο το μελετώμενο εύρος. Κατά τη σύγκριση των δύο μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της ΩΤΑ, από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η ELISA, παρόλο που πρόκειται για μία ταχεία και ημι-ποσοτική μέθοδο ανίχνευσης της ΩΤΑ, η οποία εμπορικά προτείνεται από τις παρασκευάστριες εταιρείες για συγκεκριμένα τρόφιμα, μπορεί να αποτελέσει μία αξιόπιστη μέθοδο και στην περίπτωση της χρήσης της για ταχύ ημι-ποσοτικό προσδιορισμό της ΩΤΑ από τα συγκεκριμένα είδη μυκήτων κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ και διαφορετικές οικολογικές συνθήκες. Περαιτέρω έρευνα στο πεδίο την εκτίμησης της παραγωγής της ΩΤΑ από τους προαναφερθέντες μύκητες σε τρόφιμα διαφορετικών ενδογενών ή εξωγενών ιδιοτήτων (π.χ. pH, a_w , μικροδομή και ενδογενή χλωρίδα) δύναται να ενισχύσει σημαντικά τα παρόντα ευρήματα και να συνεισφέρει στον αποτελεσματικό έλεγχο της ΩΤΑ υπό συνθήκες ελλιπούς ξήρανσης ή/και αποθήκευσης.

Στο επόμενο κεφάλαιο (**Κεφάλαιο 4**), μελετήθηκε η επίδραση της μικροδομής του τροφίμου (υγρό, ημίρρευστο, στερεό) στη συμπεριφορά των μυκήτων, προσομοιάζοντας τα υποστρώματα διαφορετικής δομής/υφής στα οποία μπορούν να βρεθούν σπόρια των υπό εξέταση μυκήτων. Επιλέχθηκε ο *A. carbonarius*, ως ο μύκητας με τη μεγαλύτερη πιθανότητα, εκ των τριών υπό εξέταση μυκήτων, να βρεθεί σε υγρά (π.χ. χυμός), ημι-στερεά (π.χ. μούστος) και στερεά (π.χ. σταφύλι) υποστρώματα. Μελετήθηκε η ανάπτυξη και η παραγωγή ΩΤΑ σε εργαστηριακά υποστρώματα διαφορετικής μικροδομής (διαφορετικά ποσοστά ζελατίνης- 0, 5, 10 και 20% κ.ό.) και a_w (0.99, 0.94 και 0.90) κατά την επώασή τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες (15, 20 και 25°C). Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά δεδομένα πρόρρησης αναπτύχθηκαν γενικευμένα (generic) μοντέλα ικανά να προβλέπουν παραμέτρους της μυκηλιακής ανάπτυξης και της παραγωγής της ΩΤΑ σε συνάρτηση με τους προαναφερθέντες παράγοντες. Διαπιστώθηκε ότι στα υψηλά ποσοστά ζελατίνης π.χ. 20 % κ.ό. (υψηλό ιξώδες) η ανάπτυξη του *A. carbonarius* και η παραγωγή της ΩΤΑ αναστέλλεται σημαντικά. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επίδραση της μικροδομής είναι πιο εμφανής σε ευνοϊκές τιμές a_w και θερμοκρασίας. Όσον αφορά στα μοντέλα πρόρρησης που αναπτύχθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά δεδομένα της ανάπτυξης του μύκητα, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι αποτελούν αποτελεσματική και αξιόπιστη μέθοδο για την εκτίμηση, την πρόρρηση και τον έλεγχο της παρουσίας του *A. carbonarius* σε τρόφιμα διαφορετικής μικροδομής και a_w , τα οποία συντηρούνται και αποθηκεύονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Αντίθετα, η μοντελοποίηση του ρυθμού παραγωγής ΩΤΑ αποδείχθηκε δυσκολότερη. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, περαιτέρω έρευνα θεωρείται απαραίτητη τόσο για τη βελτίωση όσο και τη διεύρυνση των ήδη αναπτυχθέντων μοντέλων της παρούσας μελέτης ενσωματώνοντας με αυτόν τον τρόπο

περισσότερους οικολογικούς παράγοντες όπως π.χ. pH, διαθεσιμότητα οξυγόνου, συντηρητικά, πηκτικό παράγοντα. Επίσης, κρίνεται σκόπιμο να εφαρμοστεί μία πολυμεταβλητή προσέγγιση ταυτοποίησης των κυριότερων ρεολογικών και άλλων μεταβλητών των τροφίμων, που αντιπροσωπεύουν τη δομή των τροφίμων και έχουν κυρίαρχο ρόλο στη μικροβιακή συμπεριφορά. Τέτοιας φύσης δεδομένα θα συμβάλλουν μεταξύ άλλων και στην αποτίμηση του κινδύνου της παρουσίας του μύκητα και της παραγωγής ΩΤΑ σε διαφορετικά τρόφιμα.

Δεδομένου ότι η επιμόλυνση των τροφίμων λαμβάνει χώρα με μικρό αριθμό κυττάρων/σπορίων και έχει αποδειχθεί ότι τα μεμονωμένα σπόρια ενός ομοιογενούς πληθυσμού εμφανίζουν εξατομικευμένη φυσιολογία, άρα και συμπεριφορά, κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος στην ανάπτυξη των μυκήτων (**Κεφάλαιο 5**). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η κινητική εκβλάστησης μεμονωμένων σπορίων αλλά και ανάπτυξης και παραγωγής της ΩΤΑ, αποικιών προερχόμενων από μεμονωμένα σπόρια των μυκήτων *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *P. verrucosum* σε διαφορετικές συνθήκες pH, a_w και θερμοκρασίας. Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά δεδομένα μοντελοποιήθηκαν και εκτιμήθηκαν οι παράμετροι i) χρόνος εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (TTVG) (ημέρες) και ii) χρόνος κατά τον οποίο η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη ($t_{det\ OTA}$) με τη χρήση της προσομοίωσης Monte Carlo. Συγκεκριμένα, και οι τρεις οικολογικοί παράγοντες επηρέασαν σημαντικά τις κατανομές του RGR και του TTVG. Επιπλέον, το εύρος των κατανομών του RGR και TTVG ήταν μεγαλύτερο σε οριακές συνθήκες για την ανάπτυξη των τριών ειδών μυκήτων. Η στοχαστική προσέγγιση που αναπτύχθηκε στο παρόν κεφάλαιο περιέγραψε ικανοποιητικά την παραλλακτικότητα των παραμέτρων TTVG και $t_{det\ OTA}$ για αρχικό ενοφθάλμισμα μεμονωμένων και 1-100 σπορίων και για τα τρία είδη μυκήτων συναρτήσει του pH, a_w και θερμοκρασίας. Δεδομένης λοιπόν της ικανοποιητικής συμφωνίας μεταξύ μέσων προβλέψεων και πειραματικών μετρήσεων, παράμετροι όπως οι TTVG και $t_{det\ OTA}$ μεμονωμένων σπορίων είναι δυνατόν να προβλεφθούν από στοχαστικά μοντέλα, ενισχύοντας τα υπάρχοντα δεδομένα για την εκτίμηση του πραγματικού κινδύνου της ΩΤΑ. Παρόλα αυτά κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω έρευνα στοχεύοντας στην εκτίμηση και την ενίσχυση της απόδοσης του μοντέλου με μελέτες επικύρωσης σε τρόφιμα.

Το δεύτερο και εξίσου βασικό σκέλος της παρούσας διδακτορικής διατριβής συνοψίζεται στην ανεύρεση εναλλακτικών μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης των ωχρατοξινογόνων μυκήτων ή/ και μείωσης της παραγωγής ΩΤΑ. Συγκεκριμένα, στο παρόν κεφάλαιο (**Κεφάλαιο 6**) επιλέχθηκαν μικτές καλλιέργειες βακτηρίων και ζυμών, η δράση των οποίων εναντίον του *A. carbonarius* μελετήθηκε σε θρεπτικά υποστρώματα και τρόφιμα. Οι πειραματικοί παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν η αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ, το pH και το αρχικό ενοφθάλμισμα της εκάστοτε καλλιέργειας βακτηρίων και ζυμών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα μέγιστα ποσοστά αναστολής της ανάπτυξης του *A.*

carbonarius και μείωσης της ΩΤΑ παρατηρήθηκαν κατά την προσθήκη μικτών καλλιεργειών ζυμών σε σχέση με τις αντίστοιχες των βακτηρίων, τόσο κατά τη μελέτη σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα όσο και σε ποτά όπως χυμός σταφυλιού, κρασί και μύρα. Επιπλέον, παράγοντες όπως η a_w , το pH, η αρχική συγκέντρωση της ΩΤΑ αλλά και των κυττάρων δύνανται να επηρεάσουν σημαντικά την αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα και τη μείωση της ΩΤΑ, γι' αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη. Με βάση τα παραπάνω, περαιτέρω μελέτη κρίνεται απαραίτητη με στόχο την αποσαφήνιση των μηχανισμών, οι οποίοι σχετίζονται με την ανταγωνιστική δράση των ζυμών στον *A. carbonarius* και τη μείωση της ΩΤΑ. Τέτοιου είδους πληροφορίες είναι δυνατόν να είναι χρήσιμες για τον έλεγχο των κινδύνων που σχετίζονται με την παρουσία του μύκητα *A. carbonarius* και την παραγωγή της ΩΤΑ, διασφαλίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την υγεία του καταναλωτή.

Το τελευταίο κεφάλαιο (**Κεφάλαιο 7**) σχεδιάστηκε πειραματικά υπό το πρίσμα της ανεύρεσης εναλλακτικών μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης του μύκητα *A. carbonarius* και της παραγωγής ΩΤΑ. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δράση αιθερίου ελαίου κανέλας κατά την εφαρμογή του μέσω άμεσης (εδώδιμες επικαλύψεις) και έμμεσης επαφής (πηκτικά συστατικά) στη σάρκα και στο φλοιό μήλων και αχλαδιών, ενοφθαλισμένων με τον *A. carbonarius*. Συγκεκριμένα, παρόλο που το αιθέριο έλαιο κανέλας είναι δυνατόν να αποτελέσει ικανό εμπόδιο για την ανάπτυξη του *A. carbonarius* και την παραγωγή ΩΤΑ σε μήλα και αχλάδια και με τους δύο τρόπους εφαρμογής, η αναστολή τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην παραγωγή της ΩΤΑ ήταν δραστικότερη στην περίπτωση των εδώδιμων επικαλύψεων. Η δραστικότερη συγκέντρωση αιθερίου ελαίου κανέλας αποδείχθηκε η 0.9% (εδώδιμες επικαλύψεις και πηκτικά συστατικά) κατά τον ενοφθαλισμό τόσο στη σάρκα όσο και στο φλοιό. Σε αντίθεση με την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, η συγκεκριμένη συγκέντρωση σύμφωνα με τις μακροσκοπικές μεμονωμένες παρατηρήσεις, επέδρασε αρνητικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες των φρούτων, με κύριο χαρακτηριστικό την αμαύρωση της σάρκας. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω αλλά και την επικινδυνότητα του εν λόγω μύκητα λόγω της ευρείας και συχνής του παρουσίας αλλά και της ικανότητάς του για παραγωγή ΩΤΑ, ως μελλοντικοί στόχοι έχουν τεθεί η μελέτη περισσότερων συγκεντρώσεων αιθερίου ελαίου κανέλας, στοχεύοντας στη βελτιστοποίηση της μεθόδου, εξασφαλίζοντας το δίπτυχο ασφάλεια και ποιότητα. Επιπλέον, πρέπει να μελετηθούν άλλα βιοπολυμερή όπως χιτοζάνη, πρωτεΐνες τυρογάλακτος και άλλα φυσικά αντιμικροβιακά.

Βιβλιογραφία

A. Ελληνική

- Πολυσίου Μ.Γ., 1989. Μαθήματα οργανικής στερεοχημείας και ενόργανης ανάλυσης. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Ταραντίλης Π., και Πολυσίου Μ.Γ., 2001. Ενόργανη ανάλυση. Πανεπιστημιακές σημειώσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Χατζηωάννου Θ.Π., 1998. Ενόργανη ανάλυση. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

B. Ξενόγλωσση

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2650-2652.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castella, G., Cabanes, F.J., 2003. Contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal Food Protection* 66, 504-506.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J., Cabañes, F.J., 2004. Taxonomy and significance of black aspergilla. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 33-49.
- Abrunhosa, L., Serra, R., and Venâncio, A. 2002. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7493-7496.
- Abrunhosa, L., and Venâncio, E. A., 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. *Biotechnological Letters* 29, 1909-1914.
- Aldred, D., Cairns-Fuller, V., Magan, N., 2008. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. *Journal of Stored Products Research* 44, 341-346.
- Al-Hindi, R., Al-Najada, A., Mohamed, S., 2011. Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: Screening of plant cell wall degrading enzymes. *African Journal of Microbiology Research* 5, 443-448.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A., 2009. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20, 326-333.
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., Guiraud, J.P., 2012. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control* 26, 259-268.
- Anli, E., and Merts Alkis, I., 2010. Ochratoxin A and brewing technology: A review. *Journal of the Institute of brewing* 116 (1), 23-32.

- Antwi, M., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., Geeraerd, A.H., 2007. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and co-culture. *International Journal of Food Microbiology* 120, 71-84.
- Antwi, M., Theys, T.E., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., Geeraerd, A.H., 2008. Validation of a model for growth of *Lactococcus lactis* and *Listeria innocua* in a structured gel system: effect of monopotassium phosphate. *International Journal of Food Microbiology* 125, 309-329.
- Appendini, P., and Hochkiss, J.H., 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 113-126.
- Atanasova, S.Y., von Ahsen, N., Toncheva, D.I., Dimitrov, T.G., Oellerich, M., Armstrong, V.W., 2005. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 among patients with Balkan endemic nephropathy (BEN). *Clinical Biochemistry* 38, 223-228.
- Aziz, N.H., Moussa, L.A.A., and Far, F.M.E., 2004. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. *Journal of Food Safety* 24, 109-127.
- Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M.M., Rajkovic, A., Verlinden, B., Nicolai, B., Debevere, J., De Meulenaer, B., 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 119, 170-181.
- Baert, K., Devlieghere, F., Bo, L., Debevere, J., De Meulenaer B., 2008. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. *Food Microbiology* 25, 212-217.
- Baggerman, W.I., and Samson, R.A., 1988. Heat resistance of fungal spores. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S. (Eds.), *Introduction to Food-Borne Fungi*, third ed. Centralbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
- Ballinger, M.B., Phillips, T.D., Kubena, L.F., 1986. Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin a in the pregnant rat. *Journal of Food Safety* 8, 11-24.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10, 43-59.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Basílico, M.Z., and Basílico, J.C., 1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology* 9, 238-241.
- Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Bertuzzi, T., Barbano, C., 2003. Growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* section Nigri isolates from Italian grapes. *Aspects of Applied Biology* 68, 175-180.

- Bau, M., Castella, G., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J., 2005. DNA-based characterization of ochratoxin A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Research in Microbiology* 156, 375-381.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1038-1044.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2004. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section Nigri strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38, 72-77.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marín, S., 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology* 98, 839-844.
- Bellí, N., Marín, S., Argilés, E., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2007. Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Food Protection* 70, 157-163.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119, 33-37.
- Betina, V., 1989. *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier, Amsterdam.
- Betina, V., 1994. Alkaloids. In: *Bioactive secondary metabolite of microorganisms*. Chapter 8, p 136-144.
- Blank, R., Rolfs, J.P., Suedekum, K.H., Frohlich, A.A., Marquardt, R.R., Wolfram, S., 2003. Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood levels and excretion of the mycotoxin in sheep. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51, 6899-6905.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108, 204-209.
- Bluma, R.V., and Etcheverry, M.G., 2008. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology* 25, 324-334.
- Boudra, H., Le Bars, P., Le Bars, J., 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1156-1158.
- Bridson, E.Y., and Gould, G.W., 2000. Quantal Microbiology. *Letters of Applied Microbiology* 30, 95-98.

- Brocklehurst, T.F., Parker, M.L., Gunning, P.A., Coleman, H.P., Robins, M.M., 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II. Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *Journal of Applied Microbiology* 78, 609-615.
- Brocklehurst, T. F, Mitchell, G. A. and Smith, A. C., 1997. A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology* 14, 303-311.
- Brul, S., van Gerwen, S., Zwietering, M., 2007. *Modelling microorganisms in food*. Cambridge, Woodhead.
- Bullerman, L.B., Lieu, F.Y., Seier, S.A., 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science* 42, 637-646.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Cabanes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castella, G., Minguez, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology* 79, 213-215.
- Cabras, P., and Angioni, A., 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 967-973.
- Cairns-Fuller V., and Magan, N., 2003. Impact of essential oils on growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* on a wheat-based substrate. In *Advances in Stored Product Protection*. Eds. P.Credland, D.M. Armitage, C.H. Bell, P.M. Cogan. CABI International, 479-485.
- Cairns-Fuller, V., Aldred D., Magan, N., 2005. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1215-1221.
- Carlile, M., and Watkison, S., 1994. *The fungi*, Academic Press, London.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assay and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemother* 46, 1914-1920.
- Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G.P., Galassi S., 2001. Removal of Ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49 (8), 3917-3921.
- Cecchini, F., Morassut, M., Moruno, E. G., Di Stefano, R., 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology* 23, 411-417.
- Chang, S.T., Chen, P.F., Chang, S.C., 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 123-127.

- Charlang, G.W., Horowitz, N.H., 1971. Germination and growth of *Neurospora* at low water activities. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 68, 260-262.
- Chiu, P., and Lai, L., 2010. Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsoa leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. International Journal of Food Microbiology 139, 23-30.
- Commission Regulation, 2001. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union 77-113.
- Commission Regulation, 2002. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002. Official Journal of the European Union 75, 18-20.
- Commission Regulation, 2004. Commission Regulation (EC) No 2004/683 of 13 April 2004 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards aflatoxins and ochratoxin A in foods for infants and young children (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union 106, 3-5.
- Commission Regulation, 2005. Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. Official Journal of the European Union 25, 3-5.
- Commission Regulation, 2006. Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting the levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union 364, 5-24.
- Commission Regulation, 2008. EC No 299/2008 amending Regulation EC No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin, as regards the implementing powers conferred on the Commission. Official Journal of the European Union 97, 67-71 (Brussels).
- Commission Regulation, 2010. EC No 105/2010 amending Regulation EC No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A, Official Journal of the European Union L 35, 7-8.
- Coppeti, M.V., Pereira, J.L., Yamanaka, B.T., Pitt, J.I., Taniwaki, M.H., 2010. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. International Journal of Food Microbiology 143, 414-419.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology 88, 170-175.

- Cuppers, H.G.A.M., Oomes, S., Brul, S., 1997. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3764-3769.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Rottinghaus, G.E., Dondur, V., and Mašić, A., 2003. Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30, 157-165.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Dondur, V., Rottinghaus, G.E., Medaković, V., Zarić, S., 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46, 20-25.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F., 2010. Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food Control* 21, 370-380.
- Dantigny, P., Soares Mansur, C., Sautour, M., Tchobanov, I., Bensoussan, M., 2002. Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. *Letters of Applied Microbiology* 35, 395-398.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., 2003. Predictive mycology: some definitions. *Cryptogamie. Mycologie* 24, 377-383.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., 2005a. Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology* 100, 187-196.
- Dantigny, P., Tchobanov, I., Bensoussan, M., Zwietering, M.H., 2005b. Modeling the effect of ethanol vapour on the germination time of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Food Protection* 68, 1203-1207.
- Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., Roussos, S., 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: a workshop report. *International Journal of Food Microbiology* 108, 286-291.
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., Magan, N., 2007. Mould germination: data treatment and modelling. *International Journal of Food Microbiology* 114, 17-24.
- Dantigny, P., and Nanguy, S.P.M., 2009. Significance of physiological state of fungal spores. *International Journal of Food Microbiology* 134, 16-20.
- Davey, K.R., 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of Applied Microbiology* 5, 483-488.
- De Costa, P., Bezerra, P., 2009. *Fungicides: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Nova Biomedical, Waltham.
- De Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., van den Ende, H., 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 491-499.

- Deberghes, P., Deffieux, G., Gharbi, A., Betbeder, A.M., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J.F., and Creppy, E.E., 1993. Detoxification de l'ochratoxine A par des moyens physiques, chimiques et enzymatiques. *Human Ochratoxicosis and its Pathologies* 231, 75-82.
- Del Prete, V., Rodriguez, H., Carrascosa, A.V., de las Rivas, B., Garcia-Moruno, E., Munoz, R., 2007. *In vitro* removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 70, 2155-2160.
- Delespaul, Q., Billerbeck, V.G.D., Roques, C.G., Michel, G., Vinuales, C.M., Bessiere, J.M., 2000. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research* 12, 256-266.
- Denvir, A.J., McKenzie, K.S., Rogers, T.D., Miller, D.R., Hitchens, G.D., Andrews, C.C., 1999. Ozone treatment of agricultural products such as grains, nuts or vegetables to destroy mycotoxins and aflatoxins. Patent number: WO9939723- A2 (1999/08/12).
- Diaz, G.A., Torres, R., Vega, M., Latorre, B.A., 2009. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology* 133, 195-199.
- Drosinos, E.H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., Metaxopoulos, I., 2007. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology* 24, 260-270.
- Drusch, S., and Ragab, W., 2003. Mycotoxins in Fruits, Fruit Juices, and Dried Fruits. *Journal of Food Protection* 66, 1514-1527.
- Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M., 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology* 27, 187-198.
- El Halouat, A., and Debevere, J.M., 1997. Molds and yeast isolated from hydrated prunes and raisins having different water activities. *Sciences des Aliments* 17, 539-545.
- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K., 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47, 25-35.
- Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K., Candoğan K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science* 86, 283-288.
- Esser, K., and Lemke, P.A., 1996. *The Mycota IV, Human and Animal Relationships*, Springer.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J., 2005. Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. *Journal of Food Protection* 68 (7), 1435-1440.

- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J., 2006. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology* 23, 634-640.
- Esti, M., Benucci, I., Liburdi, K., Acciaro, G., 2012. Monitoring of ochratoxin A fate during alcoholic fermentation of wine-must. *Food Control* 27, 53-56.
- Fanelli, C., Taddei, F., Trionfetti Nisini, P., Jestoi, M., Ricelli, A., Visconti, A., Fabbri, A.A. 2003. Use of resveratrol and BHA to control growth and mycotoxin production in wheat and maize seeds. *Aspects of Applied Biology* 68, 63-71.
- FAO/WHO/UNEP, 1999. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP Concept. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference On Mycotoxins, 8b, 1-13. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco8b.pdf> (accession date: 2012/06/25).
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33, 85-102.
- Fischer, R., 2002. Conidiation in *Aspergillus nidulans*. In *Molecular Biology of Fungal Development* (Osiewacz, H. D., ed.), Marcel Dekker, New York, U.S.A.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2003. Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Letters in Applied Microbiology* 37, 26-30.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 100, 41-53.
- Francois, K., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Nadal, P., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2006. Single cell variability of *L. monocytogenes* grown on liver pâté and cooked ham at 7°C: comparing challenge test data to predictive simulations. *Journal of Applied Microbiology* 100, 800-812.
- Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A., 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50, 23-43.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmüller, S., 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1398-1407.
- Fujikawa, H., and Itoh, T., 1996. Tailing of thermal inactivation curve of *Aspergillus niger* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 10, 3745-3749.

- Fukui, Y., Hoshino, K., Kameyama, Y., Yasui, T., Toda, C., Nagano, H., 1987. Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food and Chemical Toxicology* 25, 17-24.
- Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., and Biavati, B., 2011. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 22, S58-S66.
- Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas A., Dobson, A.D.W., Mulè G., 2009. Characterisation of a *pkx* gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 129, 8-15.
- Galtier, P., Alvinerie, M., Charpentreau, J.L., 1981. The Pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology* 19 (6), 735-738.
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín, S., 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology* 26 (8), 757-769.
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín, S., 2010. Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. *Food Microbiology* 27, 909-917.
- Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Karolewicz, A., 2006. A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Residues* 22, 134-141.
- Gibson, A., Baranyi, J., Pitt, J., Eyles, M., Roberts, A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419-431.
- Gibson, A.M., and Hocking, A.D., 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology* 8, 353-358.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2011. Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control* 22, 343-345.
- Gimenez, B., and Dalgaard, P., 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 96, 96-109.
- Gimeno, A., 2000. Micotoxinas, introducción. XVII Congreso centroamericano y del Caribe de avicultura. Available at: <http://www.engormix.com> (accession date: 2012/06/25).
- GMIA, 2001. Gelatin Information, News, History and More. <http://www.gelatin-gmia.com>. Retrieved 2012/06/25.

- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry* 116, 982-989.
- González, H.H.L., Resnik, S.L., Vaamonde, G., 1987. Influence of inoculum size on growth rate and lag phase of fungi isolate from Argentine corn. *International Journal of Food Microbiology* 4, 111-117.
- Gougouli, M., and Koutsoumanis, K.P., 2010. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology* 140, 254-262.
- Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., Koutsoumanis, K.P., 2011. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. *Food Microbiology* 28, 1453-1462.
- Gougouli, M., and Koutsoumanis, K.P., 2012. Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology* 152, 153-161.
- Gourama H., Bullerman L. B., 1995. Antimycotic and antiaflatoxigenic effect of lactic acid bacteria: A Review. *Journal of Food Protection* 57, 1275-1280.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R., 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26, 194-198.
- Hagelberg, S., Hult, K., Fuchs, R., 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology* 9, 91-96.
- Hägglom, P.E., 1982. Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: Effect of fungal growth, time, temperature and inoculum size. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1205-1207.
- Han, J. H. and Gennadios, A., 2005. Edible films and coatings: A review. In: *Innovations in Food Packaging*, Ch. 15, pp. 239–262. Han, J. H., Ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Harris, J.P., Mantle, P.G., 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* 58, 709-716.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3590-3595.
- Hocking, A.D., Leong, S.L., Kazi, B.A., Emmett, R.W., Scott, E.S., 2007. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International Journal of Food Microbiology* 119, 84-88.
- Hollomon, D.W., Butters, J.A., Kendall, S.J., 1997. Mechanism of resistance to fungicides. In: Volkert, S., Butters, J.A. (Eds.), *Molecular mechanisms of resistance to agro-chemicals*.

- Hope, R., Jestoi, M., Magan, N. 2003. Multi-target environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oils and antioxidants. In Advances in Stored Product Protection. Eds. P.Credland, D.M. Armitage, C.H. Bell, P.M. Cogan. CABI International, 486-492.
- Hope, R., Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N., 2005. Use of antioxidants and essential oils for controlling mycotoxins in grain. BCPC Crop Science and Technology 5B, 429-436.
- Huang, Y., Chapman, B., Wilson, M., Hocking, A. D., 2009. Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. International Journal of Food Microbiology 133, 179-185.
- Huff, W.E., Hamilton, P.B., 1979. Mycotoxins- their biosynthesis in fungi: ochratoxins- metabolites of combined pathways. Journal of Food Protection 42, 815-820.
- Huwang, A., Freimund, S., Kappeli O., Dutler H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbent. Toxicology Letters 122, 179-188.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: World Health Organization 56, 489-521.
- Jagannath, A., and Tsuchido, T., 2003. Validation of a polynomial regression model: the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in milk. Letters in Applied Microbiology 37, 399-404.
- Jimenez, A.M., Lopez de Cerain, A., Gonzalez-Penas, E., Bello, J., 1999. A high-performance liquid-chromatographic method for the determination of ochratoxin A in human plasma. Chromatographia 50, 457-460.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA), 1996. Ochratoxin A. In: Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Food Additives Series 35, 363-376.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA), 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Fumonisin, WHO Food Additives Series 47, 103-279.
- Jorgensen, K., 2005. Occurrence of ochartoxin A in commodities and processed food- A review of EU occurrence data. Food Additives and Contaminants (Suppl.1), 26-30.
- Juck, G., Neetoo, H., Chen, H., 2010. Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. International Journal of Food Microbiology 142, 302-308.
- Judet, D., Bensoussan, M., Perrier-Cornet, J.-M., Dantigny, P., 2008. Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity. Food Microbiology 25, 902-907.

- Julgal, S., Govinden, R., and Odhav, B., 2002. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin producing fungi. Research note. *Journal of Food Protection*, 65 (4), 683-687.
- Kabak, B., and Dobson, A.D.W., 2009. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Protection* 72, 2006-2016.
- Kapetanakou, A. E., Panagou, E. Z., Gialitaki, M., Drosinos, E. H., Skandamis P. N., 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Control* 20, 725-732.
- Kapetanakou, A.E., Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2011. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* *in vitro* and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food microbiology* 28, 727-735.
- Karolewicz, A., Geisen, R., 2005. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 588-595.
- Kester, J.J., and Fennema, O.R., 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology* 40 (12), 47-59.
- Kim, H.O., Park, S.W., Park, H.D., 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiology* 21, 105-110.
- Klich, M.A., and Pitt, J.I., 1988. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Teleomorphs. CSIRO Division of Food Science and Technology, Sydney, Australia.
- Köller, G., Wichmann, G., Kampczyk, U. R., Popp, P., Herbarth, O., 2006. Comparison of ELISA and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection in the analysis of Ochratoxin A in low volumes of human blood serum. *Journal of Chromatography B* 840, 94-98.
- 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, 2181-2191.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 103, 315-322.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H., 2006. *in vitro* effects of water activity, temperature and solutes on the growth rate of *P. italicum* Wehmer and *P. digitatum* Sacc. *Journal of Applied Microbiology* 101, 628-636.

- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462.
- Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedsgaard, J., 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3630-3635.
- Le Bars, J., 1988. Toxigenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms system. In: Multon, D.L. (Ed.), *Preservation and Storage of Grain, Seeds and Their By-products*. Lavoisier Publishing, New York, 347-366.
- Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology* 16, 2091-2102.
- Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2006. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology* 110, 209-216.
- Leong, S.L., Hien, L.T., An, N.T., Trang, N.T., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2007. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology* 45, 301-306.
- Lillehoj, E.S., and Elling, F., 1983. Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agriculturae Scandinavica* 33, 113-128.
- Lindblat, M., Johnsson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R., Olsen, M., 2004. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *Journal of Applied Microbiology* 97, 609-616.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G., 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109, 645-667.
- López-Malo, A., Barreto-Valdivieso, J., Palou, E., San Martín, F., 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control* 18, 1358-1362.
- Losito, I., Monaci, L., Palmesano, F., Tantillo, G., 2004. Determination of ochratoxin A in meat products by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionisation sequential mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 1965-1971.
- Lu, F., Ding, Y., Ye, X., Liu, D., 2010. Cinnamon and nisin in alginate-calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT-Food Science and Technology* 43, 1331-1335.
- Lund, F., and Frisvad, J.C., 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1117-1123.

- Magan, N., Hope, R., Colleate, A., Baxter, E.S., 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108, 685-690.
- Magan, N., Sanchis, V., Aldred, D., 2004. Role of spoilage fungi in seed deterioration. In: Aurora, D.K. (Ed.), *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Marcell Dekker, 311-323. Chapter 28.
- Magan, N., and Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131-139.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C.A.R., 2004. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology* 39, 326-331.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. and Schnürer, J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, 129-135.
- Maragkoudakis, P.A., Mountzouris, K.C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M.D., Tsakalidou, E., 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 219-226.
- Marín, R., Sanchis, V., Sáenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N., 1998. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology* 84, 25-36.
- Marín, S., Magan, N., Bellí, N., Ramos, A.J., Canela, R., Sanchis, V., 1999. Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 51, 159-167.
- Marín, S., Bellí, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A.J., Ghorbel, A., Sanchis, V., 2006. Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. *Food Microbiology and Safety* 71, 196-200.
- Marín, S., Cuevas, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2008. Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium. *International Journal of Food Microbiology* 121, 139-149.
- Marquardt, R.R., and Frohlich, A.A., 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* 70, 3968-3988.

- Masoud, W., and Høj Kaltoft, C., 2006. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology* 106, 229-234.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M., 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107, 180-185.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E.M., Mateo, F., Jimenez, M., 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology* 119, 79-83.
- Mateo, F., Gadea, R., Medina, A., Mateo, R., Jimenez M., 2009. Predictive assessment of ochratoxin A accumulation in grape juice based-medium by *Aspergillus carbonarius* using neural networks. *Journal of Applied Microbiology* 107, 915-927.
- Mateo, E.M., Mateo, F., Valle-Algarra, F.M., Pardo, I., Jimenez, M., 2010. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control* 21, 23-28.
- McHugh, T.H., and Krochta, J.M., 1994. Milk-protein-based edible films and coatings. *Food Technology* 48 (1), 97-103.
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology* 35, 807-820.
- Meca, G., Blaiotta, G., Ritieni, A., 2010. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* 21, 579-583.
- Mertens, L., Geeraerd, A.H., Dang, T.D.T., Vermeulen, A., Serneels, K., Van Derlinden, E., Cappuyns, A.M., Moldenaers, P., Debevere, J., Devlieghere, F., Van Impe J.F., 2009. Design of an experimental viscoelastic food model system for studying *Zygosaccharomyces bailii* spoilage in acidic sauces. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (22), 7060-7069.
- Métris, A., George, S.M., Peck, M.W., Baranyi, J., 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods* 55, 821-827.
- Métris, A., George, S.M., Baranyi, J., 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6674-6679.
- Meynel, G.G., and Meynel, E., 1970. *Theory and practice in experimental bacteriology*. 2nd Cambridge University Press.

- Mitchell, D., Aldred, D., Magan, N., 2003. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. *Aspects of Applied Biology* 68, 109-116.
- Mitrakas, G.E., Koutsoumanis, K.P., Lazarides, H.N., 2008. Impact of edible coating with or without antimicrobial agent on microbial growth during osmotic dehydration and refrigerated storage of a model plant material. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 550-555.
- Möller, T.E., and Nyberg, M., 2003. Ochratoxin A in raisins and currants: basic extraction procedure used in two small marketing surveys of the occurrence and control of the heterogeneity of the toxins in samples, *Food Additives and Contaminants* 20 (11), 1072-1076.
- Mortensen, H.P., Hald, B., Madsen, A., 1983. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs: 5. Ochratoxin A in pig blood. *Acta Agriculturae Scandinavica* 33 (3), 235-239.
- Moruno, G., Sanlorenzo E. C., Boccaccino B., Di Stefano R., 2005. Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 73-76.
- Moss, M.O., 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 13 (Suppl.), 5-9.
- Moss, M.O., 1998. Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 84 (Suppl.), 62-76.
- Munoz, M., Guevara, L., Palop, A. and Fernandez, P.S. 2010. Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sub-lethal heat and recovery conditions. *Food Microbiology* 27, 468-475.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M., 2006. Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science* 71, 51-65.
- Nauta, M.J., 2002. Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *International Journal of Food Microbiology* 73, 297-304.
- Nevarez, L., Vasseur, V., Le Madec, A., Le Bras, M.A., Coroller, L., Leguérinel, I., Barbier, G., 2009. Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. *International Journal of Food Microbiology* 130, 166-171.
- Nicolai, B.M., Van Impe, J.F., 1996. Predictive food microbiology: a probabilistic approach. *Mathematics and Computers in Simulation* 42, 287-292.
- Nielsen, P. V., and Rios, R., 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from species and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology* 60, 219-229.

- Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.-J.E., 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6705-6713.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2008. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions in Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 128, 197-202.
- Noriega, E., Laca, A., Diaz, M., 2007. Modelling of diffusion-limited growth to predict listeria distribution in structured model foods. *Journal of Food Engineering* 87, 247-256.
- Nunez, Y.P., Pueyo, E., Carrascosa, A.V., Martinez-Rodriguez, A.J., 2008. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system. *Journal of Food Protection* 71, 1496-1499.
- Nychas, G.J.E., 1995. Natural antimicrobials from plants, In: *New methods of food preservation*. ed. Gould G.W. pp.58-89. Blackie Academic and Professional, London.
- O'Brien, E., and Dietrich, D.R., 2005. Ochratoxin A: The Continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology* 35, 33-60.
- O'Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, A.D.W., 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149, 3485-3491.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2007. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. *Journal of food protection* 70(4):901-908.
- Pandit, V.A., and Shelef, L.A., 1994. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology* 11, 57-63.
- Paramithiotis, S., Tsiastiotou, S., Drosinos, E.H., 2010. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece; Peloponnesus and Thessaly. *European Food Research and Technology* 231, 883-890.
- Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004a. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology* 22, 383-389.
- Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004b. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology* 95, 79-88.

- Pardo, E., Marín, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004c. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiology* 21, 267-274.
- Pardo, E., Ramos, A.J., Sanchis, V. and S. Marín. 2005. Modelling of the effects of water activity and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International Journal of Food Microbiology* 98, 1-9.
- Pardo, E., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marín, S., 2006a. Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*. *Food Microbiology* 23, 351-358.
- Pardo, E., Malet, M., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2006b. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. *International Journal of Food Microbiology* 106, 25-31.
- Parker, M.L., Brocklehurst, T.F., Gunning, P.A., Coleman, H.P., Robins, M.M., 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: Methods for investigating the form of growth of bacteria in model oil-in-water emulsions and dairy cream. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 601-608.
- Parra, R., and Magan, N., 2004. Modelling the combined effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds, *Journal of Applied Microbiology* 97, 429-438.
- Pasanen, A.L., Yli-Pietila, K., Pasanen, P., Kalliokoski, P., Tarhanen, J., 1999. Ergosterol content in various fungal species and bio-contaminated building materials. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 138-142.
- Pascual, S., 1998. Studies on production and ecophysiology of fungal antagonists for improved biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Monilia laxa*. Ph.D. Thesis. Institute of BioSciences and Technology, Cranfield University, UK.
- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven, B., 1994. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection* 58, 81-85.
- Paul, G.C., Kent, C.A., Thomas, C.R., 1993. Variability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 11-23.
- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck P., Lebrihi A., 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1495-1502.
- Péteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C., Varga, J., 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology* 24, 205-210.

- Petzinger, E., and Ziegler, K., 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 23, 91-98.
- Piotrowska, M., and Zakowska, Z., 2005. The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology* 54, 279-286.
- Pitt, J.I., 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 535-539.
- Pitt, R.E., 1993. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *Journal of Food Protection* 2, 139-146.
- Pitt, J.I., and Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food spoilage*, second edition, New York.
- Pittet A, and Royer D., 2002. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 mg/kg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 243-247.
- Ponce, A.G., Roura, S.I., del Vallea, C. E., Moreira, M. R., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology* 49, 294-300.
- Poschet, F., Geeraerd, A.H., Scheerlinck, N., Nicolai, B.M., Van Impe, J.F., 2003. Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. *Food Microbiology* 20, 285-295.
- Poschet, F., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Scheerlink, N., Nicolai, J.F., Van Impe, J.F., 2004. Sensitivity analysis of microbial growth parameter distributions with respect of data quality and quantity by using Monte Carlo analysis. *Mathematics and Computers in Simulation* 65 (3), 231-243.
- Prandini, A., Sigolo, A., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G. 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology* 47, 927-931.
- Pranoto, Y., Salokhe, V.M., Rakshit, S.K., 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International* 38, 267-272.
- Psomas, A.N., Nychas, G.-J., Haroutounian, S.A., Panagiotis N. Skandamis, 2011. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. *Computers and Electronics in Agriculture* 76, 119-129.
- Psomas, A.N., Nychas, G.-J., Haroutounian, S.A., Panagiotis N. Skandamis, In Press. LabBase: development and validation of an innovative food microbial growth responses database. *Computers and Electronics in Agriculture*.

- Ramos, A.J., Magan, N., Sanchis, V., 1999. Osmotic and matric potential effects on growth, sclerotia and partitioning of polyols and sugars in colonies and spores of *Aspergillus ochraceus*. *Mycological Residues* 103 (2), 141-147.
- Ratkowsky, D., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire bio-kinetic temperature range. *Journal of Bacteriology* 154, 1222-1226.
- Raybaudi-Massilia, R.M., Rojas-Graü, M.A., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., 2008. Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples. *Journal of Food Protection* 71, 1150-61.
- Reinsch, M., Töpfer, A., Lehmann, A., Nehls, I., 2005. Determination of ochratoxin A in wine by liquid chromatography tandem mass spectrometry after combined anion-exchange/reversed-phase clean-up. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 1592-159.
- Rhim, J-W., 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 37, 323-30.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Oriol, E., Larondelle, Y., 2005. Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry* 40, 3008-3016.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* 159, 18-46.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 70, 163-173.
- Romero, S.M., Comerio, R.M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G., Fernández Pinto, V., 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 104, 43-49.
- Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Vaamonde G., 2007. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology* 115, 140-143.
- Roncal, T., and Ugalde, U., 2003. Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology* 154, 539-546.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology* 162, 447-463.

- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., van Sinderen, D., 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* 104, 915-923.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Debevere, J., 2007. Growth kinetics of cultures from single spores of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* on yellow dent corn meal. *Food Microbiology* 24, 336-345.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 2000. Introduction to Food and Airborne Fungi (6th edition), CBS press.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2010. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers* 82, 277-283.
- Sanchis, V., and Magan N, 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan N, Olsen M (eds), *Mycotoxins in food*. pp. 174-189.
- Santin, E., Paulillo, A.C., Maiorka, A., Satiko, L., Nakaghi, O., Macari, M., Fischer da Silva, A.V., Alessi, C., 2003. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *International Journal of Poultry Science* 2, 341-344.
- Santos, A., Marquina, D., Leal, J.A. and Peinado, J.M., 2000. (1,3,6)-b-D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranefaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1809-1813.
- Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., 2001. Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. *Letters of Applied Microbiology* 32, 131-134.
- Sautour, M., Dantigny, P., Guilhem, M.-C., Bensoussan, M., 2003. Influence of inoculum preparation on the growth of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1034-1038.
- Sayanjali, S., Ghanbarzadeh, B., Ghiassifar, S., 2011. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. *LWT-Food Science and Technology* 44, 1133-1138.
- Scannell, AG.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W., Arendt, E.K., 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin®. *International Journal of Food Microbiology* 60, 241-249.
- SCF, 1998. Opinion on ochratoxin A. Expressed on 17 September 1998, the Scientific Committee on Food, the European Commission.
- Schall, N., Simmler-Hübenthal, H., Süd-Chemie, A.G., 2002. Use of activated layered silicates for the adsorption of mycotoxins. Patent number: WO0240150.

- Schillinger, U., Varela Villarreal, J., 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* 21, 107-111.
- Schlatter, C. H., Struder-Rohr, J., Rasonyi, T. H., 1996. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. 13, 43-44.
- Seydim A.C. and Sarikus G., 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* 39, 639-644.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., and Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology reviews* 59, 201-222.
- Skandamis, P., and Nychas, G-J., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1011-22.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology* 18, 463-470.
- Soboleva, T.K., Pleasants, A.B., Le Roux, G., 2000. Predictive microbiology and food safety. *International Journal of Food Microbiology* 57, 183-192.
- Sothornvit, R., and Krochta, J.M., 2000. Effect of whey protein molecular weight on film water vapor permeability and solubility. *Journal of Food Science* 65, 700-703.
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M.L., 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology* 24, 123-134.
- Spadaro, D., and Gullino, M.L., 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91, 185-194.
- Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Bernaerts, K., Francois, K., Devlieghere, F., Debevere, J., Van Impe, J.F., 2005. Obtaining single cells: analysis and evaluation of an experimental protocol by means of a simulation model. *International Journal of Food Microbiology* 100, 55-66.
- Stander, M.A., Bornscheuer, U.T., Henke, E., Steyn, P.S., 2000. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 5736-5739.
- Steyn, P., 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters* 82/83, 843-851.
- Studer-Rohr, J., Schlatter, J., Schlatter, C., and Dietrich, D. R. 2000. Intra individual variation in plasma levels and kinetic parameters of ochratoxin A in humans. *Archives of Toxicology* 74, 499-520.

- Suarez-Quiroz, M.L., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P., 2004. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiology* 21, 629-634.
- Sweeney, M.J., and Dobson, A.D.W., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43, 141-158.
- Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenström, S., Snijman, P.W., Van Schalkwyk, D.J., 1996. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 79 (3), 688-96.
- Tangni, E.K., Simonis, J., Larondelle, Y. and De Meeus, D.A.L., Decontaminating and detoxifying liquid food media, especially beer, using insoluble vegetable fibers to adsorb mycotoxins. Patent number: WO2005007794-A1, (2005/01/27).
- Tassou, C.C., Natskoulis, P.I., Panagou, E.Z., Spiropoulos, A.E., Magan, N., 2007. Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. *Journal of Food Protection* 70, 2884-2888.
- Tassou, C.C., Natskoulis, P.I., Magan, N., Panagou, E.Z., 2009. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production boundaries of two *Aspergillus carbonarius* isolates on a simulated grape juice medium. *Journal of Applied Microbiology* 107, 257-268.
- Teren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevei, F., 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134, 171-176.
- Theys, T.E., Geeraerd, A.H., Verhulst, A., Poot, K., Van Bree, I., Devlieghere, F., Moldenaers, P., Wilson, D., Brocklehurst, T., Van Impe, J.F., 2008. Effect of pH, water activity and gel microstructure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology* 128, 67-77.
- Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C., 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52 (6), 399-403.
- Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D.F., Papageorgiou, I., Tjamos, E.C., 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: Population composition, Ochratoxin A production and chemical control. *Journal of Phytopathology* 152, 250-255.
- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G. E., Matijašević, S., Djuricić, M., 2003. Surfactant modified zeolites-new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials* 61, 173-180.
- Tzortzakis, N.G., 2009. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 97-102.

- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10), 4606-4610.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174 (4), 233-238.
- USDA, 2003. Pathogen Modelling Program, Version 7.0. U.S. Dept. of Agriculture, A.R.S., Eastern Regional research Center.
- Valenta, H., 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in Valero, F., Marin, S., Ramos, A. J., Sanchis, V., 2005. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology* 41, 196-201.
- Valero, A., Marin, S., Ramos, A. J., Sanchis, V., 2005. Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology* 41, 196-201.
- Valero, A., Farre, J. R., Sanchis, V., Ramos, A. J., Marin, S., 2006a. Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures. *Food Microbiology* 23, 753-756.
- Valero, A., Farre, J. R., Sanchis, V., Ramos, A. J., Marin, S., 2006b. Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* at different temperatures and a_w . *International Journal of Food Microbiology* 110, 160-164.
- Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., Sanchís, V., 2007. Effect of pre-harvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. *Letters in Applied Microbiology* 45, 194-199.
- Valik, L., Baranyi, J., Görner, F., 1999. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology* 47, 141-146.
- Valik, L. and Pieckova, E., 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *International Journal of Food Microbiology* 63, 11-17.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., Theron, J. J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wihl. *Nature* 205, 1112-1113.
- Varga, J., Kevei, F., Rinyu, E., Teren, J., and Kozakiewicz, Z., 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4461-4464.
- Varga, J., Rigó, K., Téren, J., 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology* 59, 1-7.
- Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, J., & Vagvolgyi, C. 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 321-328.

- Varga, J. and Kozakiewicz, Z., 2006. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology* 17, 72-81.
- Varma, S.K., and Verma, R.A., 1987. Aflatoxin B₁ in orange (*Citrus reticulata*) juice by isolates of *Aspergillus flavus* Link. *Mycopathologia* 97, 101-104.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J., Marín, S., 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 89, 145-154.
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology* 21, 649-656.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Beest, M.V., Kruijf, N.de., Debevere, J., 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology* 10, 77-86.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology* 96, 149-164.
- Vindeløv, J., and Arneborg, N., 2002. Effects of temperature, water activity, and syrup film composition on the growth of *Wallemia sebi*: development and assessment of model predicting growth lags in syrup agar and crystalline sugar. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1652-1657.
- Wang, S., Chen, P., Chang, S., 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 96, 813-818.
- Wilson, C.L., and Wisniewski, M.E., 1989. Biological control of post harvest diseases of fruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27, 425-441.
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T., Van Impe, J. F., 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73, 275-289.
- Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C.-G., François, J., Bertin, G., Jouany, J.-P., 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnology Letters* 25, 783-789.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1990. Modelling of bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.

Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Notermans, S., 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the time of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.

Λίστα δημοσιεύσεων

Έγκριτα περιοδικά

- Mandala I., **Kapetanakou A.**, Kostaropoulos A., 2008. Physical properties of breads containing hydrocolloids stored at low temperature. II. Effect of freezing. *Food Hydrocolloids*, 22 (8), 1443-1451.
- Kapetanakou, A.E.**, Panagou, E.Z., Gialitaki, M., Drosinos, E. H., Skandamis P.N., 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Control* 20, 725-732.
- Kapetanakou, A.E.**, Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2011. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius in vitro* and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food microbiology* 28, 727-735.
- Kapetanakou, A.E.**, Kollias, J.N., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2012. Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *International Journal of Food Microbiology* 152, 91-99.

Παγκόσμια συνέδρια

- Kapetanakou A.**, Kiskini A., Karabela D., Mandala I., 2006. Effect of gluten on bread structural and textural characteristics. IUFOST Congress Nantes, France , September 17-21 2006 (*abstract accepted for poster presentation*).
- Mandala I., **Kapetanakou A.**, Karabela D., Kostaropoulos A., Saravacos G., 2006. Quality characteristics of cold and frozen stored breads. Effect of different pre-treatments and hydrocolloid addition. IFT, Orlando, USA (*abstract accepted for poster presentation*).
- Mandala I., **Kapetanakou A.**, Karabela D., Kostaropoulos A., 2006. Quality characteristics of low temperature stored breads containing hydrocolloids - Effect of freezing and cold storage. 4th International Symposium on Food Rheology and Structure, Zurich, Switzerland (*abstract accepted for oral presentation*).
- Kapetanakou, A.E.**, Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2009. Development of a model describing the effect of temperature and (gel) structure on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in liquid media and evaluation in foods of different viscosity. 6th

International Conference on Predictive Microbiology in Foods, Washington D.C., USA, September 8-12th 2009 (*abstract accepted for oral presentation*).

Manios, S.G., Ketsatis, S., **Kapetanakou, A.E.**, Gounadaki, A.S., and Skandamis, P.N., 2009. Assessment and modeling of the microbial spoilage of four traditional Greek appetizers. 96th Annual meeting of Association of Food Protection (IAFP), Grapevine, Texas, July 12-15th 2009 (*abstract accepted for oral presentation*).

Kapetanakou, A.E., Lioliou, E., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2010. *In vitro* and *in situ* detoxification of Ochratoxin A by yeasts and bacteria of technological importance. 22th International ICFMH Symposium Food Micro, Copenhagen, Denmark, 30th August- 3rd September 2010 (*abstract accepted for oral presentation*).

Belessi, C.-I., Poucha, S., Gounadaki, A.S., Manios, S., **Kapetanakou, A.E.**, and Skandamis P.N., 2010. Evaluation of the hygienic level of Greek dairy plants. 22th International ICFMH Symposium Food Micro, Copenhagen, Denmark, 30th August- 3rd September 2010 (*abstract accepted for poster presentation*).

Kapetanakou, A.E., Ampavi, A., Yanniotis, S., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2011. Modeling of growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* and evaluation in food matrices: effect of (gel) microstructure, water activity, and temperature. ICEF, Athens, Greece, 22-26 May 2011 (*abstract accepted for oral presentation*).

Kapetanakou, A.E., Drosinos, E.H., Mataragas, M., Skandamis, P.N., 2011. From single spores to mycelium: variability of *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium verrucosum* growth and ochratoxin A production. 7th International Conference on Predictive Microbiology in Foods, Dublin, Ireland, 12-15 September 2011 (*abstract accepted for poster presentation*).

Kapetanakou, A.E., Drosinos, E.H., Skandamis, P.N., 2011. Variability in growth and Ochratoxin A production by single spores of *Aspergillus westerdijkiae*, *A. carbonarius* and *Penicillium verrucosum* in response to pH, a_w and temperature. Annual meeting of Association of Food Protection (IAFP), Milwaukee, USA, 31 July-3 August 2011 (*abstract accepted for poster presentation*).

Kapetanakou, A.E., Nestora, S., Evageliou, V., Skandamis P.N., 2012. Effect of sodium alginate coatings containing cinnamon essential oil on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on fresh apples and pears. Annual meeting of Association of Food Protection (IAFP), Rhode Island, USA, 22-25th July (*abstract accepted for poster presentation*).

Ελληνικά συνέδρια

- Καπετανάκου Α.Ε.,** Γαλιτάκη Μ., Μπασαλέκου Μ., Δροσινός Ε.Χ., Σκανδάμης Π.Ν., 2007. Προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών παραγωγής ωχρατοξίνης Α των *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* και *Penicillium verrucosum*. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (προφορική παρουσίαση).
- Καπετανάκου Α.Ε.,** Αμπάβη Α., Γιαννιώτης Σ., Δροσινός Ε.Χ., Σκανδάμης Π.Ν., 2009. Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου με βάση την επίδραση της θερμοκρασίας και της μικροδομής (gel) υποστρώματος στην παραγωγή ωχρατοξίνης Α από *Aspergillus carbonarius* και επικύρωση σε τρόφιμα διαφορετικού ιξώδους. 3^ο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας, 15-17 Οκτωβρίου, Ρέθυμνο (poster).
- Καπετανάκου Α.Ε.,** Λιόλιου Ε., Δροσινός Ε.Χ., και Σκανδάμης Π. Ν., 2009. Μείωση της ωχρατοξίνης Α από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας. 3^ο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας, 15-17 Οκτωβρίου, Ρέθυμνο (προφορική παρουσίαση).
- Καπετανάκου Α.Ε.,** Αμπάβη Α., Γιαννιώτης Σ., Δροσινός Ε.Χ., Σκανδάμης Π.Ν., 2010. Μοντελοποίηση της συνδυαστικής επίδρασης της μικροδομής, της ενεργότητας νερού και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του *Aspergillus carbonarius* και στην παραγωγή της ωχρατοξίνης Α. ΔΕΔΥΤ 2010, 4-6 Ιουνίου, Θεσσαλονίκη (προφορική παρουσίαση).
- Καπετανάκου Α.Ε.,** Νέστορα Σ., Ευαγγελίου Β., Σκανδάμης Π.Ν., 2011. Επίδραση εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου με αιθέριο έλαιο κανέλας στην ανάπτυξη του *Aspergillus carbonarius* και στην παραγωγή ωχρατοξίνης Α σε μήλα και αχλάδια. ΕΚΕ, 10-13 Νοεμβρίου, Θεσσαλονίκη (προφορική παρουσίαση).
- Καπετανάκου Α.Ε.,** Ματαράγκας Μ., Δροσινός Ε.Χ., Σκανδάμης Π.Ν., 2011. Μελέτη της παραλλακτικότητας στην ανάπτυξη και την παραγωγή ωχρατοξίνης Α μεμονωμένων σπόρων των *Aspergillus westerdijkiae*, *A. carbonarius* και *Penicillium verrucosum* συναρτήσει του pH, της a_w και της T. ΕΚΕ, 10-13 Νοεμβρίου, Θεσσαλονίκη (προφορική παρουσίαση).

Συντμήσεις

ΩΤΑ: ωχρατοξίνη Α

ΩΤα: ωχρατοξίνη α

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

HCL: Υδροχλωρικό οξύ

NaOH: Καυστικό νάτριο

MEA: Malt Extract Agar

MEB: Malt Extract Broth

MRD: Maximum Recovery Diluent

MRS: de Man, Rogosa and Sharpe

YM: Yeast Medium

SGM: Synthetic Grape Medium

PCA: Plate Count Agar

YGC: Yeast Glucose Chloramphenicol

PBS: Phosphate Buffered Saline

a_w : ενεργότητα νερού

μ : ιξώδες (Pa s)

μ_{max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης της βιομάζας του μύκητα ($g \text{ ημέρα}^{-1}$)

$\mu_{max \Omega TA}$: ρυθμός παραγωγής της ΩΤΑ ($ppm \text{ ημέρα}^{-1}$)

RGR (Radial Growth Rate): Ρυθμός ανάπτυξης της διαμέτρου του μύκητα ($mm \text{ ημέρα}^{-1}$)

TTVG (Time-To-Visible Growth): Χρόνος εμφάνισης της μυκηλιακής υφής (ημέρες)

$t_{det \Omega TA}$: Χρόνος κατά τον οποίο η ΩΤΑ καθίσταται ανιχνεύσιμη (ημέρες)

$d_{det \Omega TA}$: Διάμετρος κατά την οποία η ΩΤΑ καθίσταται για πρώτη φορά ανιχνεύσιμη

b.l.d. (below of detection limit): κάτω από το όριο ανίχνευσης

b.l.q. (below of quantification limit): κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης

OD (Optical Density): οπτική πυκνότητα

OMX: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

