

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ &
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κελυφωτών φιστικιών
με στόχο τη μείωση της αφλατοξίνης**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μαρία Ν. Γεωργιάδου

Επιβλέπων:

Σταύρος Γιαννιώτης, Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κελυφωτών φιστικιών με
στόχο τη μείωση της αφλατοξίνης*

Μαρία Ν. Γεωργιάδου

Επιβλέπων:

Σταύρος Γιαννιώτης, Καθηγητής

Επιτροπή παρακολούθησης

Στ. Γιαννιώτης,	Καθηγητής
Μ. Κωμαΐτης,	Ομ. Καθηγητής
Επ. Παπλωματάς	Καθηγητής

Εξεταστική επιτροπή

Στ. Γιαννιώτης,	Καθηγητής
Μ. Κωμαΐτης,	Ομ. Καθηγητής
Επ. Παπλωματάς	Καθηγητής
Ελ. Δροσινός	Αν. Καθηγητής
Β. Ευαγγελίου	Επ. Καθηγήτρια
Ευστ. Πανάγου	Επ. Καθηγητής
Δ. Τσιτσιγιάννης	Επ. Καθηγητής

Στους δασκάλους,

*της φωλιάς και τ'ουρανού μου
της καρδιάς και του μυαλού μου
της σιωπής και της φωνής μου
της δύσης μου και της ανατολής μου.*

Στους δασκάλους,

του ταξιδιού μου.

Πρόλογος

Προσπαθώντας να γυρίσω στο χρόνο μηδέν της εμπλοκής μου με την αφλατοξίνη και τα κελυφωτά φιστίκια αναρωτιέμαι εάν μπορεί κανείς να τον χαρακτηρίσει μια δυστυχή ή μια ευτυχή συγκυρία. Σίγουρα, η ανίχνευση μιας τοξίνης, σε συγκέντρωση πολύ πάνω από τα νομοθετικά όρια, σε ένα ελληνικής παραγωγής προϊόν, γνωστό παγκοσμίως για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, ένα προϊόν Π.Ο.Π, αλλά πάνω απ' οτιδήποτε άλλο, ο καρπός «των παιδικών χρόνων και εικόνων» είναι μάλλον μια απρόσμενα δυστυχής συγκυρία, που ακόμα και η ικανοποίηση του επαγγελματικού χρέους και της ευθύνης απέναντι στον ανύποπτο καταναλωτή δεν είναι αρκετή να ισορροπήσει τη συναισθηματική «απάτη». Και τα ερωτήματα πολλά. Πώς...; Πού...; Πότε...; Γιατί...; Τα οποία δεν απαντιούνται με την απόδοση της ποινικής ευθύνης και των διοικητικών κυρώσεων. Ίσως όμως τελικά, μαζί με την ταφή τους στον ΧΥΤΑ Λιοσίων «θαφτούν» στη δημοσιογραφική προπέτεια και στη λήθη του μυαλού. Αλλά, αν υπάρξει και επόμενη φορά...; Κι αυτά τα ερωτηματικά απλώς θα παραμένουν. Αλλά κάπως έτσι μάλλον γεννιέται η αναζήτηση και η ανάγκη, που γεννούν τα κίνητρα για δημιουργία και αγώνα.

Η παρούσα διδακτορική έρευνα είναι μια προσπάθεια, ανάμεσα σε πολλές άλλες ερευνητικές εργασίες διεθνώς, να απαντηθούν τα ερωτήματα που προκύπτουν από το πρόβλημα της μόλυνσης των κελυφωτών φιστικιών με αφλατοξίνη. Λόγω της συνθετότητας του προβλήματος, όπως παρουσιάζεται στις επόμενες σελίδες είναι αναγκαίο να φωτιστεί πολύπλευρα το θέμα, ώστε να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά προς όφελος της παραγωγής και της υγείας των καταναλωτών. Η παρούσα διατριβή αποτελείται από 5 επιμέρους κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο, γίνεται μία γνωριμία με το προϊόν, από το δένδρο μέχρι την αποθήκη και το ράφι, ώστε να υπάρχει εξοικείωση και βαθύτερη κατανόηση των φαινομένων της μόλυνσης και των άλλων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που μελετώνται στα επόμενα κεφάλαια. Επίσης, γίνεται μια ανασκόπηση των διαθέσιμων βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με τις αφλατοξίνες και τα παθογόνα αίτιά τους, τους ασπέργιλλους, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή, η οποία επάγει μηχανισμούς παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, όπως είναι οι αφλατοξίνες. Παράλληλα περιγράφεται η στρατηγική αντιμετώπισης του προβλήματος σε διεθνές επίπεδο, τόσο σε προ-συλλεκτικό στάδιο, όσο και μετασυλλεκτικά, ώστε να χωροθετηθεί ο σκοπός και οι στόχοι της παρούσας εργασίας.

Το περιεχόμενο του δεύτερου, τρίτου και τέταρτου κεφαλαίου, αναφέρεται αναλυτικά στους επιμέρους στόχους της εργασίας, στους οποίους περιλαμβάνεται η μελέτη των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κελυφωτών φιστικιών, με σκοπό τη μείωση της αφλατοξίνης. Σε κάθε ένα από τα τρία αυτά κεφάλαια, δίδονται κάποια εισαγωγικά στοιχεία, τα οποία σχετίζονται είτε με τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είτε υποστηρίζουν τη σκοπιμότητα των αντικειμένων της επιμέρους μελέτης του κεφαλαίου. Στη συνέχεια, περιγράφεται η μεθοδολογία στην οποία βασίστηκε η μελέτη, τα αποτελέσματα και τα επιμέρους συμπεράσματα. Στο πλαίσιο αυτής της δομής, στο δεύτερο κεφάλαιο μελετάται το προφίλ των πτητικών ενώσεων, που παράγονται σε υγιή και μολυσμένα με αφλατοξίνη φιστίκια, στο τρίτο κεφάλαιο, οι χημικές ιδιότητες στις αντίστοιχες ομάδες και στο τέταρτο κεφάλαιο, μελετώνται οι φυσικές ιδιότητες του φιστικιού, όπως αυτές καθορίζονται από διάφορους παράγοντες στους κανονικούς, τυπικούς της ελληνικής ποικιλίας καρπούς και σε ελαττωματικούς, ποιοτικά υποβαθμισμένους, οι οποίοι, όπως τεκμηριώνεται παρακάτω είναι οι «συνήθεις ύποπτοι» για μόλυνση με αφλατοξίνη. Κοινός στόχος στη μελέτη αυτών των τριών κεφαλαίων ήταν να εντοπιστούν οι διαφορές που πιθανόν υπάρχουν, μεταξύ των υγιών και μολυσμένων καρπών, ώστε να αναγνωριστούν τα διακριτά εκείνα χαρακτηριστικά που θα χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μόλυνσης και εργαλεία διαλογής. Ο βαθμός επίτευξης αυτού του στόχου, οι επιφυλάξεις, τα όρια και οι περιορισμοί, αλλά και οι προτάσεις για τα επόμενα βήματα περιγράφονται στο πέμπτο κεφάλαιο, το οποίο περιλαμβάνει τα γενικά συμπεράσματα.

Ευχαριστίες

Το ταξίδι αυτό έτσι ξεκίνησε και μαζί του η ευτυχής συγκυρία. Η επιστροφή στον πανεπιστημιακό χώρο και στους δασκάλους, που μας όρκισαν «...να διάγω βίον αληθινού επιστήμονος...». Η πύλη του Πανεπιστήμιου άνοιξε αρχικά στο ισόγειο Χασιώτη, στην πόρτα του Καθηγητή Σταύρου Γιαννιώτη. Του δασκάλου που μου έμαθε ότι η απάντηση είναι το επόμενο ερώτημα κι έτσι το «ταξίδι» στη γνώση και στην εμπειρία δεν τελειώνει ποτέ. Δεν το είπε ποτέ. Το έδειχνε και το δείχνει. Ο ανυπότακτος ενθουσιασμός του ερευνητή κι η απaráμιλλη αγάπη του για το διδακτικό έργο μετέτρεπαν το φόβο και το δισταγμό σε δύναμη και χαμόγελο. Επιβλέπων ευήκοος. Δίπλα και μακριά. Καθοδήγηση και εμπιστοσύνη. Έμπνευση και σεβασμός. Η εισαγωγή κι ο επίλογος σ' αυτό το έργο, που δεν τελειώνει εδώ.

Η αλήθεια είναι ότι η πρώτη σκέψη μιας διδακτορικής έρευνας στο θέμα της αφλατοξίνης στα κελυφωτά φιστίκια μπήκε στο «σπίτι» των πράσινων ασπεργίλλων, στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α. και συγκεκριμένα από τον Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά, σε μια ασήμαντη στιγμή που κανείς άλλος δε θυμάται. Τον ευχαριστώ για την προτροπή, την εμπιστοσύνη, αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε μαζί με τον Δρ. Τσιτσιγιάννη να εργαστώ δίπλα στον Dr Peter Cotty και τους συνεργάτες του, στο εργαστήριο «Aflatoxin reduction in crops» στην Αριζόνα και μου χάρισαν μία από τις πιο δυνατές εμπειρίες στο ταξίδι αυτό. Θέλω ωστόσο να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Δρ Δημήτρη Τσιτσιγιάννη, «το Google μου στους ασπέργιλλους», για την αμέριστη κι αγόγγυστη συμπαράστασή του σε κάθε δύσκολη «αναγνώριση», όπως επίσης τους «παλιούς» (Σταύρο, Σοφία, Φωτεινή, Γιάννη, Κατερίνα) και «νέους» του εργαστηρίου του (Μαρία, Μιχάλης), για την απίθανη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια.

Κι αν η αφλατοξίνη ήταν η «χημεία» του έργου, ο Καθηγητής Μιχάλης Κωμαΐτης, δάσκαλός μου «απ' τα παλιά», ήταν ο σύμβουλος. Τον ευχαριστώ για το απλόχερο «μοίρασμα» της εμπειρίας και της γνώσης του. Ωστόσο, καμμία «αεριο-χρωματογραφική» αναφορά της παρούσης διατριβής δε θα υπήρχε, χωρίς τη στήριξη της Δρ. Χρυσανγής Γαρδέλη, την οποία ευχαριστώ ιδιαίτερος για το χρόνο και την επίπονη εργασία στο κομμάτι των ταυτοποιήσεων. Η ολοκλήρωση των αναλύσεων δεν θα ήταν πραγματικότητα, χωρίς τους «GC-specialists», τον Δρ. Θανάση Μαλλούχο από το Εργ. Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων του Γ.Π.Α. και τον Βασίλη Ηλιόπουλο του Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γ.Π.Α., οι οποίοι τόσες φορές έδωσαν λύση στα «χρωματογραφικά» μου αδιέξοδα.

Ιδιαίτερος επίσης θέλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Κυριακή Σωτηράκογλου, η οποία με οδήγησε να δω τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων «με άλλο μάτι». Η βοήθειά της στην πολυμεταβλητή προσέγγιση ήταν πολύτιμη και μου άνοιξε νέους δρόμους. Επίσης, η συμβολή του Αναπλ. Καθηγητή Σεραφείμ Παπανικολάου, καθώς και της Δρ. Αφροδίτης Χατζηφράγκου από το Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γ.Π.Α. ήταν πολύτιμη και τους ευχαριστώ γιατί «δανείστηκα» την εμπειρία τους στις αναλύσεις των λιπαρών οξέων.

Η ευτυχής αυτή συγκυρία, έδωσε κι άλλες «καλές πραμάτειες». Δασκάλους συνοδοιπόρους, οι οποίοι ανεξάρτητα από το βαθμό εμπλοκής τους στο τεχνικό - πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής ήταν και είναι εμπνευστές και συμπαράστατες. Το ταξίδι θα ήταν «μικρό» και «λίγο» χωρίς τον Αναπλ. Καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο, τον οποίο ευχαριστώ, διότι μου πρόσφερε την «καθαρή ματιά» του

και με έπεισε για την αξία στο «μακρύ» και στο «πολύ». Ευχαριστώ επίσης τον Επ. Καθηγητή Ευστάθιο Πανάγου, όχι μόνο για την τεχνική του βοήθεια στα μικροβιολογικά, αλλά και για τις «φιλοσοφικές» προσεγγίσεις των ερευνητικών αποτελεσμάτων, συζητήσεις για «μετά τα φυσικά...». Ο Δρ. Παντελής Νατσκούλης, μέσα από την ερευνητική εμπειρία του έκανε τα «διαλείμματά μας» στον ήλιο, ταχύρρυθμα σεμινάρια μυκητολογίας. Τον ευχαριστώ για το ενδιαφέρον και την υποστήριξη μέχρι και τις τελευταίες δύσκολες στιγμές.

Η καθημερινότητα στο εργαστήριο θα ήταν πολύ δύσκολη χωρίς την πολύχρονη εμπειρία της Νίκης Προξενιά, η οποία μου έδειξε την έρευνα του «πάγκου» και της «λευκής ποδιάς». Την ευχαριστώ για την όμορφη «αγκαλιά». Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τον Μανώλη Αναγνωσταρά, συνεργάτη και φίλο, τον οποίο ευχαριστώ για την ενθάρρυνση, τη συνεργασία και όλες τις κουβέντες σ'ένα διάδρομο «50 βημάτων». Η αρχή, η μέση και το τέλος του ταξιδιού είχαν έναν συνταξιδιώτη, τον συνυποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Δήμου. Τον ευχαριστώ για τις στιγμές, τις σκέψεις, τις ιδέες και τις αγωνίες που μοιραστήκαμε μαζί.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φοιτητές του εργαστηρίου μας, οι οποίοι στο πλαίσιο της πτυχιακής διατριβής τους υποστήριξαν πειραματικά την παρούσα έρευνα και «μάθαμε» μαζί. Την Ανθή, τον Δημήτρη, την Ανδρομάχη, το Φώτη και την Έλενα. Αλλά και τα παιδιά που «μαθαίνουμε» μαζί και που η υποστήριξή τους την τελευταία «δύσκολη» περίοδο της διατριβής ήταν πολύ συγκινητική: τη Φλώρα, τη Ράνια, την Ανδριάννα, τη Ναταλία, την Αγγελική, τον Παναγιώτη και τη Μαρία.

Η παραπάνω προσπάθεια δε θα μπορούσε να υλοποιηθεί χωρίς τους συνεργάτες μου έξω από το Πανεπιστήμιο, τους οποίους ιδιαίτερος ευχαριστώ. Πιο συγκεκριμένα, τους ανθρώπους από τον Αγρ. Συνεταιρισμό Φιστικοπαραγωγών Αιγίνης και τον Πρόεδρο του Αγροτικού Συλλόγου Αίγινας, Νίκο Αλυφαντή και την αδελφή του Ελένη, οι οποίοι, εκτός από τα δείγματα κελυφωτών φιστικιών που μας προμήθευαν, μου «έδωσαν» τα μάτια και την καλλιεργητική τους εμπειρία. Επίσης, τη συνάδελφο γεωπόνο και φίλη Αθανασία Χατζηπέρη, που όλα αυτά τα χρόνια μοιραζόμενοι το ίδιο πάθος και την ίδια ευαισθησία, με υποστήριξε στην «έξωθεν καλή μαρτυρία», ως γέφυρα της επιστήμης και της πράξης. Θα ήθελα να εκφράσω επίσης την ευγνωμοσύνη μου στο συνάδελφο, συμφοιτητή και «συνοδοιπόρο γεωπόνο» Γιώργο Χιντζόγλου για την «τεχνική επιμέλεια» της διατριβής, καθώς και το φίλο του, ζωγράφο Νίκο Βαβάτση, δημιουργό του εξώφυλλου, του ανθρώπου που τις τρεις γραμμές σκέψεις και εικόνες του μυαλού, τις ζωντάνεψε με χρώμα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους «δικούς» μου ανθρώπους, για την υπομονή, ανοχή, την αμέριστη πρακτική και ηθική συμπαράσταση. Χρήστο, Σπύρο, Αγγελική, Ιωάννα, Ρούλα, Ανδροκλή, Νικόλα, Φραντζέσκο, Αλέξανδρε, Μυρτώ, μπαμπά και μαμά, σας ευχαριστώ.

Υ.Γ.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο των Υποτροφιών Μεταπτυχιακών Σπουδών Εσωτερικού, ως υποψήφια υπότροφος, του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ), μετά την επιτυχή μου συμμετοχή στους σχετικούς διαγωνισμούς.

Περίληψη

Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων της ομάδας *Aspergillus section Flavi* και μολύνουν διάφορα είδη τροφίμων, μεταξύ αυτών και τα κελυφωτά φιστίκια. Εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα, καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο δράση στον άνθρωπο και τα ζώα. Μία καλή πρακτική που εφαρμόζεται ως προληπτικό μέτρο για τη μείωση της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης σε μια παρτίδα είναι ο διαχωρισμός των ελαττωματικών καρπών, με αυτόματα μηχανικά συστήματα ή χειροδιαλογή. Ωστόσο, η διαλογή αυτή δε βασίζεται σε δείκτες μόλυνσης, χαρακτηριστικούς της παρουσίας της αφλατοξίνης, με αποτέλεσμα οι απορρίψεις παρτίδων κελυφωτών φιστικιών λόγω υπέρβασης των νομοθετικών ορίων αφλατοξίνης, να αποτελεί το πιο συχνό πρόβλημα στα σημεία εισαγωγής. Συνεπώς, η αναζήτηση των κατάλληλων εργαλείων διαλογής των μολυσμένων με αφλατοξίνη φιστικιών αποτελεί το βασικό σκοπό της παρούσας εργασίας. Η βασική ιδέα στηρίζεται στο ότι τα αποτελέσματα της μόλυνσης και της παρουσίας της αφλατοξίνης, πιθανόν να αποτυπώνονται στο τρόφιμο μέσω μεταβολών στις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, με τέτοιο τρόπο και σε τέτοιο βαθμό, ώστε να γίνονται αντιληπτές. Προς αυτή την κατεύθυνση μελετήθηκαν συγκριτικά, τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά υγιών, μολυσμένων με αφλατοξίνη και ελαττωματικών καρπών, ώστε να προσδιοριστούν οι τυχόν διακριτές διαφορές και να διερευνηθεί η δυνατότητα χρήσης τους, ως «δείκτες» διαλογής.

Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε το πτητικό προφίλ των κελυφωτών φιστικιών σε τέσσερις ομάδες δειγμάτων: υγιή, μολυσμένα με αφλατοξίνη με φυσικό και τεχνητό τρόπο και με μη-τοξικογόνα στελέχη της ομάδας *Aspergillus sc Flavi*. Οι αναλύσεις των πτητικών πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της HS-SPME και ανάλυση σε GC-FID και GC-MS, ενώ η μέτρηση της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης στα μολυσμένα δείγματα έγινε με HPLC. Αντίστοιχα, μελετήθηκαν τα χημικά χαρακτηριστικά (πρωτεΐνη, τέφρα, λίπος, λιπαρά οξέα, πτητικές ουσίες) των κελυφωτών φιστικιών σε τρεις ομάδες δειγμάτων: υγιή, μολυσμένα με αφλατοξίνη και ελαττωματικά. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, τέφρα και λίπος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις σχετικές επίσημες μεθόδους του AOAC, ενώ η ανάλυση των λιπαρών υλών πραγματοποιήθηκε σε αεριοχρωματογράφο (GC-FID), αφού είχε προηγηθεί η μετατροπή τους στους αντίστοιχους μεθυλ-εστέρες. Η μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων εστιάστηκε στην κατασκευή της ισόθερμης καμπύλης υγρασίας ολόκληρου του καρπού με κέλυφος

ακολουθώντας τη βαρυμετρική μέθοδο, στην αποτύπωση των τυπικών φυσικών χαρακτηριστικών των κελυφωτών φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης» (σχήμα, μέγεθος, μάζα, όγκος, πυκνότητα, υγρασία, χρώμα, θερμική αγωγιμότητα, υφή) σε συνάρτηση με την υγρασία του καρπού και στον προσδιορισμό τους σε ελαττωματικούς καρπούς. Το μέγεθος και το σχήμα του καρπού προσδιορίστηκε βάσει των χαρακτηριστικών του διαστάσεων και των σχετικών εξισώσεων που περιγράφονται στη βιβλιογραφία. Ο προσδιορισμός της μάζας έγινε σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας, ενώ για τον υπολογισμό του όγκου και της πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκτόπισης στερεού με τη χρήση μικρών γυάλινων σφαιριδίων. Για τη μέτρηση της υγρασίας ακολουθήθηκε η επίσημη μέθοδος AOAC 925.40. Το χρώμα του κελύφους μετρήθηκε με χρωματόμετρο Minolta και η θερμική αγωγιμότητα του σπέρματος του φιστικιού με αγωγιμόμετρο. Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων της υφής, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Instron σε δοκιμή διάτρησης στο σπέρμα του φιστικιού. Η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων βασίστηκε στην πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση (ανάλυση σε συστάδες, ανάλυση κύριων συνιστωσών και διακριτική ανάλυση), ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητα ταξινόμησης και διαχωρισμού των υγιών φιστικιών από τα μολυσμένα και ελαττωματικά, βάσει των διαφορών που προέκυψαν από τη μελέτη των χαρακτηριστικών τους. Η μέθοδος της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα κριτήριο (One-way ANOVA), οι δοκιμές Tukey και LSD εφαρμόστηκαν για να διερευνηθεί αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές των χαρακτηριστικών που μετρήθηκαν μεταξύ και εντός των ομάδων των δειγμάτων. Οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό λογισμικό πακέτο STATGRAPHICS® Centurion XV.II.

Από τη μελέτη του πτητικού προφίλ απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 72 πτητικές ουσίες συνολικά, με χαρακτηριστική την παρουσία αλκοολών, κετονών, αλδευδών, εστέρων, υδρογονανθράκων και μονοτερπενίων. Οι ενώσεις οι οποίες σχετίζονταν κυρίως με τα μολυσμένα δείγματα ήταν οι C-8 αλκοόλες-κετόνες-αλδεύδες, ορισμένα σεσκιτερπένα και οι ουσίες, 1-πεντανόλη, 1-επτανόλη, επτανάλη, 2-επτενάλη, 2-δεκενάλη, βενζαλδεύδη και βενζακεταλδεύδη. Όσον αφορά το χημικό προφίλ, δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υγιών, των μολυσμένων και των ελαττωματικών φιστικιών, συγκρίνοντας κάθε ένα επιμέρους χημικό χαρακτηριστικό, με εξαίρεση την περιεκτικότητα σε ολικό λίπος, του οποίου η εκατοστιαία περιεκτικότητα ήταν ελαφρώς μειωμένη στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα και σε μια κατηγορία ελαττωματικών φιστικιών. Επισημάνθηκε επίσης, μια τάση αύξησης της περιεκτικότητας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα, όσο και στα

ελαττωματικά. Προσδιορίζοντας το εύρος της τιμής της κάθε φυσικής ιδιότητας στους κανονικούς καρπούς καθορίστηκαν τα κριτήρια αποδοχής για τη διαλογή διαφόρων κατηγοριών ελαττωματικών καρπών. Ωστόσο, εφαρμόζοντας πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση των δεδομένων, τα δείγματα των υγιών φιστικιών διαχωρίστηκαν σαφώς από τα μολυσμένα και ελαττωματικά φιστίκια χρησιμοποιώντας ως δείκτες μόλυνσης είτε τις παραπάνω πτητικές ενώσεις είτε το σύνολο των χημικών ιδιοτήτων που μετρήθηκαν, με το προφίλ των λιπαρών οξέων να αποτελεί την κύρια αιτία της υπάρχουσας παραλλακτικότητας. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο συνδυασμός της παρουσίας κάποιων πτητικών ενώσεων με το προφίλ των λιπαρών οξέων, θα μπορούσε να αποτελεί ένα ενδεχόμενο κριτήριο ή δείκτη διαχωρισμού των υγιών από τα μολυσμένα με αφλατοξίνη και δευτερευόντως από τα ελαττωματικά φιστίκια.

Επιστημονικό Πεδίο: Επιστήμη Τροφίμων

Λέξεις – κλειδιά: κελυφωτά φιστίκια, αφλατοξίνη, *Aspergillus*, φυσικές ιδιότητες, χημικές ιδιότητες, πτητικά, διαλογή

Study of the physical and chemical characteristics of pistachios with the aim of aflatoxin reduction

Abstract

Aflatoxins are the most prominent group of mycotoxins that derive from several species of fungi of the *Aspergillus* section *Flavi* group and contaminate several agricultural commodities, among them the pistachio nuts. They are considered as highly toxic compounds with carcinogenic and mutagenic effect in humans and animals. Hand or mechanical sorting of off-standard, low-quality nuts is currently applied as a preventive practice targeting in reducing aflatoxin concentration within legal limits in a lot of pistachio nuts. However, the efficacy of this measure is in doubt due to the fact that it is not based in sorting tools that are directly related with the presence of aflatoxin. This results in a high number of border rejections of lots with pistachio nuts during import in EU. The aim of the present thesis was to find suitable sorting tools for the separation of aflatoxin contaminated pistachio nuts. The principal concept was based upon the fact that contamination process and aflatoxin production affect the physical and the chemical characteristics of the substrate and alter its profile in a way that the resulting deviations can be detected. For this purpose, the physical and chemical properties of healthy, aflatoxin contaminated and off-standard pistachios were evaluated, in order to determine any distinguishable properties which would be a useful tool for the identification and rejection of aflatoxin contaminated and off-standard pistachios after harvest.

The volatile profile of healthy, aflatoxin contaminated (naturally or artificially) and artificially contaminated pistachios with non-toxigenic strains of *Aspergillus* sc *Flavi* was determined. The volatiles were isolated by the HS-SPME method and determined by GC-FID and GC-MS, whereas aflatoxin was quantified by HPLC. Accordingly, some chemical characteristics such as protein, ash, fat content and fatty acids profile were determined in healthy, aflatoxin contaminated and off-standard pistachios. Protein, ash and fat contents were measured according to the standard AOAC methods and fatty acids were determined by trans-esterification into their corresponding fatty acid methyl-esters and measured using GC analysis. The evaluation of the physical properties was initially focused on obtaining the adsorption isotherm of whole shelled nut according to the official gravimetric method. Next, some geometrical (size, shape), gravimetric (mass, volume, density), thermal (thermal conductivity), optical (color) and texture (puncture test) properties were studied, as a function of moisture content of the nut. Finally, the

values for some the above mentioned properties were quantified for the local variety of pistachios «Aegina» and for several types of off-standard pistachios. The geometrical properties were defined by their characteristic dimensions and then calculated using available equations. Mass was measured in an analytical balance, while the solid displacement method was used for the determination of the apparent volume and density. Water content was measured according to the relevant AOAC method. Shell color parameters were quantified using a Minolta colorimeter and the thermal conductivity of the pistachio kernel was measured with a conductivity probe. A penetration test was conducted with an Instron Testing Machine in order to evaluate the texture parameters of the kernel of the nut. Multivariate statistical analysis, such as cluster analysis, principal component and discriminant analysis were performed to identify the groups of pistachio samples with similar volatile and chemical profile and see whether it is possible to separate the healthy samples from the contaminated and off-standard samples. One-way ANOVA was performed to determine if the mean for each physical or chemical tested property (univariate tests) was significantly different for healthy, aflatoxin contaminated and off-standard pistachios (among groups) and also, to compare the mean values of each property tested among samples of each group (within group). The respective means were compared using Tukey or LSD test at $p \leq 0.05$ at the 95% confidence limits. STATGRAPHICS® Centurion XV.II software was used to carry out all analyses.

Seventy two volatile compounds were identified almost equally distributed among the above studied groups of the volatile profile. The predominant chemical compounds were monoterpenes, alcohols, ketones, aldehydes, esters and hydrocarbons. Even though the general volatile profile was similar among groups, some differences were detected between healthy and contaminated group of samples. All eight carbon (C-8) alcohols, ketones and aldehydes, sesquiterpenes, as well as the chemical compounds 1-pentanol, 1-heptanol and the aldehydes heptanal, 2-heptenal, 2-decenal, benzaldehyde and benzeneacetaldehyde were mainly isolated from contaminated samples suggesting that they were related to the presence of the causative fungi. No statistically significant differences among healthy, aflatoxin contaminated and off-standard pistachio kernels in protein and ash content as well as in fatty acid composition were found. On the contrary, the fat content of both off-standard and aflatoxin contaminated pistachios was lower than that of healthy pistachios. Additionally, a differentiation in the saturation level of the fatty acids was observed among groups, with the contaminated and off-standard samples showing a trend towards increasing unsaturation.

The standard values for the above mentioned properties were established for the local variety of pistachios «Aegina» and the sorting criteria based on size, shape, weight and color that can be used to separate several types of off-standard pistachios were quantified. When the multivariate statistical approach was applied combining either the characteristic volatile patterns or the chemical profile of each group, a clear separation of the healthy samples was achieved. The statistical results also showed that the fatty acid composition was the main cause of variability among chemical properties. This evidence, as well as the key volatiles that were detected, provide potential tools for distinguishing aflatoxin contaminated samples.

Scientific field: Food Science

Keywords: pistachio, aflatoxin, *Aspergillus*, physical property, chemical property, volatiles, sorting

Πίνακας περιεχομένων

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
Περιεχόμενα.....	1
1.1. Τα κελυφωτά φιστίκια.....	3
1.1.1. Καταγωγή και ιστορία της φιστικιάς	3
1.1.2. Οικονομικά στοιχεία παραγωγής	4
1.1.3. Βοτανική ταξινόμηση, μορφολογία, βιολογία	6
1.1.4. Η καλλιέργεια της φιστικιάς	9
1.1.5. Συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση.....	13
1.1.6. Χρήση – Θρεπτική αξία	17
1.2. Οι αφλατοξίνες	19
1.2.1. Ιστορικά – Στατιστικά στοιχεία	19
1.2.2. Παθογόνα αίτια	19
1.2.3. Φυσικές και χημικές ιδιότητες αφλατοξινών	20
1.2.4. Επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων	22
1.2.5. Νομοθεσία.....	23
1.2.6. Οικονομικές επιπτώσεις από τη μόλυνση με αφλατοξίνες	24
1.3. Οι ασπέργιλλοι	27
1.3.1. Οι μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i>	27
1.3.1.1. Ιστορικά στοιχεία	27
1.3.1.2. <i>Μορφολογία</i>	27
1.3.1.3. <i>Οικολογία – Χρήσεις</i>	28
1.3.2. Η ομάδα <i>Aspergillus section Flavi</i>	29
1.3.2.1. <i>Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των ειδών εντός της ομάδας Flavi</i>	29
1.3.2.2. <i>Κύκλος ασθένειας και επιδημιολογία του μύκητα Aspergillus flavus</i>	32
1.3.2.3. <i>Γονιδιωματική του μύκητα A. flavus</i>	34

1.3.2.4.	<i>Βιοσύνθεση αφλατοξίνης.....</i>	35
1.3.2.5.	<i>Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης.....</i>	37
1.4.	Στρατηγική αντιμετώπισης αφλατοξινών	39
1.4.1.	Έλεγχος του προβλήματος πριν τη συγκομιδή.....	39
1.4.1.1.	<i>Προληπτικά μέτρα</i>	39
1.4.1.2.	<i>Δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών</i>	39
1.4.1.3.	<i>Βιολογική καταπολέμηση.....</i>	40
1.4.2.	Έλεγχος του προβλήματος μετασυλλεκτικά	41
1.4.2.1.	<i>Προληπτικά μέτρα</i>	41
1.4.2.2.	<i>Διαλογή</i>	42
1.4.2.3.	<i>Διεργασίες αποτοξικοποίησης και μεταβολισμού των αφλατοξινών.....</i>	46
1.5.	Σκοποί και στόχοι της διατριβής.....	48
1.6.	Βιβλιογραφία	50
1.6.1.	Ελληνική βιβλιογραφία.....	50
1.6.2.	Διεθνής βιβλιογραφία.....	50
Κεφάλαιο 2. Μελέτη του πτητικού προφίλ υγιών και μολυσμένων με αφλατοξίνη		
κελυφωτών φιστικιών		
61		
	Περιεχόμενα.....	61
2.1.	Εισαγωγή	63
2.1.1.	Οι πτητικές ουσίες των μυκήτων	63
2.1.2.	Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης των πτητικών ουσιών.....	66
2.1.2.1.	<i>Διεργασίες απομόνωσης και εκχύλισης.....</i>	66
2.1.2.2.	<i>Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME).....</i>	68
2.1.2.3.	<i>Αέρια Χρωματογραφία – Φασματοσκοπία Μαζών (GC-MS)</i>	71
2.1.3.	Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης	73
2.2.	Υλικά και Μέθοδοι	75
2.2.1.	Δειγματοληψία και χειρισμός των φιστικιών	75

2.2.2.	Τεχνική μόλυνσης με στελέχη του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i>	75
2.2.3.	Ανάλυση αφλατοξίνης	79
2.2.3.1.	Προετοιμασία – Εκχύλιση - Καθαρισμός δειγμάτων.....	79
2.2.3.2.	Ανάλυση στην HPLC	80
2.2.3.3.	Καμπύλες βαθμονόμησης αφλατοξινών.....	81
2.2.3.4.	Δοκιμές ανάκτησης	81
2.2.4.	Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία	83
2.2.5.	Απομόνωση και συγκέντρωση των πτητικών με HS-SPME.....	84
2.2.6.	Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ουσιών	85
2.2.7.	Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC)	86
2.2.7.1.	Προσδιορισμός πτητικών με GC-FID.....	86
2.2.7.2.	Ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων με GC-MS	86
2.2.8.	Στατιστική επεξεργασία	87
2.3.	Αποτελέσματα και συζήτηση	89
2.3.1.	Μέτρηση αφλατοξίνης	89
2.3.2.	Το πτητικό προφίλ	92
2.3.2.1.	Το γενικό πτητικό προφίλ.....	92
2.3.2.2.	Το πτητικό προφίλ των δειγμάτων της ομάδας των υγιών (H).....	98
2.3.2.3.	Το πτητικό προφίλ των μολυσμένων από τις ομάδες NC, AC, ANT..	100
2.3.3.	Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.....	104
2.3.3.1.	Ανάλυση σε συστάδες (Cluster Analysis – CA).....	104
2.3.3.2.	Διακριτική ανάλυση (DA).....	104
2.4.	Συμπεράσματα.....	109
2.5.	Βιβλιογραφία	111
2.5.1.	Ελληνική βιβλιογραφία.....	111
2.5.2.	Διεθνής βιβλιογραφία	111

Κεφάλαιο 3. Μελέτη των χημικών ιδιοτήτων σε υγιή, ελαττωματικά και μολυσμένα με αφλατοξίνη κελυφωτά φιστίκια.....	116
Περιεχόμενα.....	116
3.1. Εισαγωγή	118
3.1.1. Ελαττωματικοί καρποί.....	118
3.1.1.1. Περιγραφή – Αίτια εμφάνισης ελαττωματικών καρπών.....	118
3.1.1.2. Το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του ενδοσπερμίου.....	122
3.1.1.3. Η παρουσία αφλατοξίνης στους ελαττωματικούς καρπούς	124
3.1.2. Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης	126
3.2. Υλικά και Μέθοδοι	128
3.2.1. Δειγματοληψία και χειρισμός των φιστικιών	128
3.2.2. Τεχνητή μόλυνση και ανάλυση αφλατοξίνης	128
3.2.3. Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεϊνών	130
3.2.4. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε τέφρα.....	134
3.2.5. Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικού λίπους.....	135
3.2.6. Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων	136
3.2.6.1. Μετεστεροποίηση των λιπαρών υλών.....	136
3.2.6.2. Ανάλυση σε αεριοχρωματογράφο (GC)	138
3.2.7. Στατιστική επεξεργασία.....	138
3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	140
3.3.1. Μέτρηση αφλατοξίνης.....	140
3.3.2. Μετρήσεις χημικών ιδιοτήτων.....	141
3.3.2.1. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και τέφρα.....	141
3.3.2.2. Περιεκτικότητα σε ολικό λίπος	142
3.3.2.3. Ανάλυση λιπαρών οξέων	148
3.3.3. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.....	151
3.3.3.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA).....	151
3.3.3.2. Διακριτική Ανάλυση (DA).....	153

3.4.	Συμπεράσματα.....	156
3.5.	Βιβλιογραφία	158
3.5.1.	Ελληνική βιβλιογραφία.....	158
3.5.2.	Διεθνής βιβλιογραφία	158
Κεφάλαιο 4. Μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων σε κανονικά και ελαττωματικά		
κελυφωτά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».....		
		161
	Περιεχόμενα.....	161
4.1.	Εισαγωγή	163
4.1.1.	Οι φυσικές ιδιότητες των τροφίμων.....	163
4.1.2.	Γεωμετρικές ιδιότητες.....	163
4.1.3.	Βάρος, όγκος, πυκνότητα.....	166
4.1.4.	Θερμικές ιδιότητες - Θερμική αγωγιμότητα (k)	169
4.1.5.	Οπτικές ιδιότητες	173
4.1.5.1.	<i>Χρώμα - Ορισμοί.....</i>	<i>173</i>
4.1.5.2.	<i>Μέτρηση του χρώματος</i>	<i>175</i>
4.1.5.3.	<i>Χρωματικά μοντέλα</i>	<i>177</i>
4.1.6.	Ρεολογικές ιδιότητες στερεών τροφίμων.....	181
4.1.6.1.	<i>Υφή.....</i>	<i>181</i>
4.1.6.2.	<i>Δοκιμές αξιολόγησης της υφής</i>	<i>181</i>
4.1.6.3.	<i>Ανάλυση διαγράμματος δύναμης - παραμόρφωσης.....</i>	<i>186</i>
4.1.7.	Ενεργότητα νερού (a_w).....	188
4.1.7.1.	<i>Θεωρία - Ορισμοί.....</i>	<i>188</i>
4.1.7.2.	<i>Ισόθερμες καμπύλες υγρασίας.....</i>	<i>190</i>
4.1.7.3.	<i>Ταξινόμηση ισόθερμων καμπυλών υγρασίας</i>	<i>194</i>
4.1.7.4.	<i>Μέθοδοι προσδιορισμού της a_w – Μαθηματικά μοντέλα.....</i>	<i>195</i>
4.1.8.	Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης	198
4.2.	Υλικά και Μέθοδοι	200

4.2.1.	Δειγματοληψία και χειρισμός των καρπών – Πειραματικός σχεδιασμός.	200
4.2.2.	Προσδιορισμός ισόθερμης καμπύλης προσρόφησης.....	203
4.2.3.	Μέτρηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών	205
4.2.4.	Μέτρηση μάζας, όγκου (V_{app}), πυκνότητας (ρ_{app})	207
4.2.5.	Μέτρηση του χρώματος.....	207
4.2.6.	Μέτρηση της υφής	208
4.2.7.	Προσδιορισμός του συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας (k).....	209
4.2.8.	Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία	209
4.2.9.	Στατιστική επεξεργασία.....	210
4.3.	Αποτελέσματα και συζήτηση	211
4.3.1.	Ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης.....	211
4.3.2.	Οι φυσικές ιδιότητες σε συνάρτηση με την υγρασία του καρπού	213
4.3.3.	Τα φυσικά χαρακτηριστικά σε κανονικά και ελαττωματικά φιστίκια.....	218
4.4.	Συμπεράσματα.....	224
4.5.	Βιβλιογραφία	226
4.5.1.	Ελληνική βιβλιογραφία.....	226
4.5.2.	Διεθνής βιβλιογραφία	226
Κεφάλαιο 5.	Γενικά συμπεράσματα - Προτάσεις.....	230
	Περιεχόμενα.....	230
5.1.	Γενικά συμπεράσματα	231
5.2.	Προτάσεις	235
Παράρτημα I.	Μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων σε κανονικά και ελαττωματικά κελυφωτά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».....	237
Παράρτημα II.	Χρωματογραφήματα (GC) από τις αναλύσεις των πτητικών	250
Παράρτημα III.	Χρωματογραφήματα (GC) από τις αναλύσεις των λιπαρών οξέων....	275
Βιογραφικό σημείωμα.....		275

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.	Παραγωγή φιστικιών παγκοσμίως (τόνοι).	σελ. 5
Πίνακας 2.	Οι κυριότερες ασθένειες της φιστικιάς στην Ελλάδα.	σελ. 11
Πίνακας 3.	Οι κυριότεροι εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα.	σελ. 12
Πίνακας 4.	Χημική σύσταση φιστικιών και θρεπτική αξία.	σελ. 18
Πίνακας 5.	Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης» (Καν.1263/96).	σελ. 18
Πίνακας 6.	Αριθμός προειδοποιήσεων για επικίνδυνο φορτίο λόγω παρουσίας μυκοτοξινών, από το 2004 έως το 2013.	σελ. 25
Πίνακας 7.	Αριθμός προειδοποιήσεων για τις μυκοτοξίνες ανά κατηγορία προϊόντος.	σελ. 26
Πίνακας 8.	Περιγραφή των δειγμάτων αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του πτητικού προφίλ.	σελ. 76
Πίνακας 9.	Τιμές ανάκτησης (%) των αφλατοξινών B ₁ , G ₁ , B ₂ και G ₂ σε τεχνητά μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα κελυφωτών φιστικιών.	σελ. 82
Πίνακας 10.	Συγκέντρωση αφλατοξίνης σε δείγματα κελυφωτού φιστικιού από τις ομάδες των μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων NC και AC.	σελ. 91
Πίνακας 11.	Μέτρησης συγκέντρωσης αφλατοξίνης σε δείγμα κελυφωτού φιστικιού μολυσμένο με το αφλατοξικογόνο στέλεχος Δ.1-3 AF-2.	σελ. 92
Πίνακας 12.	Οι πτητικές ουσίες που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα κελυφωτού φιστικιού από όλες τις ομάδες, ταξινομημένες ανά χημική τάξη.	σελ. 96
Πίνακας 13.	Αποτελέσματα μέτρησης της υγρασίας των δειγμάτων και συσχέτιση με τον αριθμό των πτητικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.	σελ. 98
Πίνακας 14.	Περιγραφή των δειγμάτων αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των χημικών χαρακτηριστικών.	σελ.129
Πίνακας 15.	Συγκέντρωση αφλατοξίνης σε δείγματα κελυφωτού φιστικιού από την ομάδα των μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων (C), όπως μετρήθηκαν με ανάλυση HPLC.	σελ.145
Πίνακας 16.	Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χημικών ιδιοτήτων σε υγρή (H), μολυσμένα (C) και ελαττωματικά (D) φιστίκια.	σελ.146
Πίνακας 17.	Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χημικών ιδιοτήτων σε υγρή φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ.147

Πίνακας 18.	Ταξινόμηση των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την υφή ενός τροφίμου.	σελ.182
Πίνακας 19.	Μορφές δέσμευσης του νερού μέσα στα τρόφιμα και οι σχετικές ενέργειες δέσμευσης.	σελ.189
Πίνακας 20.	Τα βασικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων ισόθερμων καμπυλών ρόφησης, με βάση το μοντέλο ταξινόμησης των Blahovec & Yanniotis (2009).	σελ.196
Πίνακας 21.	Τα μαθηματικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για την περιγραφή των ισόθερμων καμπυλών υγρασίας χρησιμοποιώντας (α) δύο (β) τρεις και (γ) τέσσερις παραμέτρους.	σελ.197
Πίνακας 22.	Περιγραφή των δειγμάτων αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των φυσικών χαρακτηριστικών.	σελ.201
Πίνακας 23.	Κατάλογος των φυσικών χαρακτηριστικών που προσδιορίστηκαν σε κάθε ομάδα και υποκατηγορία δειγμάτων.	σελ.203
Πίνακας 24.	Τιμές της περιεκτικότητας της υγρασίας (Mc), όπως προσδιορίστηκαν πειραματικά και υπολογίστηκαν θεωρητικά βάσει του μοντέλου GAB.	σελ.212
Πίνακας 25.	Γραμμικές εξισώσεις των φυσικών χαρακτηριστικών συναρτήσει της περιεκτικότητας σε υγρασία (Mc).	σελ.215
Πίνακας 26.	Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των φυσικών χαρακτηριστικών, σε κανονικά και ελαττωματικά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ.222
Πίνακας 27.	Στατιστική συγκριτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, από τις μετρήσεις των φυσικών χαρακτηριστικών σε κανονικά και ελαττωματικά κελυφωτά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ.223

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.	(α) Το δέντρο της τσικουδιάς (<i>Pistacia terebinthus</i> , L.). (β) Ταξιανθία φιστικιάς	σελ. 8
Σχήμα 2.	Μορφολογία του καρπού φιστικιάς. Σχέδιο με βάση το πρωτότυπο του Θ. Μουλούλη.	σελ. 8
Σχήμα 3.	Στάδια ανάπτυξης του σπέρματος του φιστικιού σε επιμήκη (επάνω σειρά) και κάθετη (κάτω σειρά) τομή.	σελ. 9
Σχήμα 4.	(α) Συγκομιδή φιστικιάς με ράβδισμα των δένδρων (Αίγινα, Αύγουστος 2010). (β) Αποφλοιώση κελυφωτού φιστικιού σε ηλεκτροκίνητο μηχάνημα με νερό.	σελ. 14
Σχήμα 5.	Ανάμιξη φιστικιών με άλμη και κιτρικό οξύ και ψήσιμο στο φούρνο με κυλιόμενο ιμάντα. (Αγροτικός Συνεταιρισμός Φιστικοπαραγωγών Αίγινας).	σελ. 15
Σχήμα 6.	Διάγραμμα ροής από την επεξεργασία φιστικιών Αιγίνης. Στοιχεία από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Φιστικοπαραγωγών Αίγινας.	σελ. 16
Σχήμα 7.	Χημικοί τύποι αφλατοξινών B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ .	σελ. 21
Σχήμα 8.	Απορρίψεις φορτίων με τρόφιμα, στα σημεία εισόδου της ΕΕ, ανά κατηγορία κινδύνου (Στοιχεία 2009 – RASFF).	σελ. 25
Σχήμα 9.	Κονιδιοφόρος του μύκητα του γένους <i>Aspergillus</i> με φιαλίδια (α) σε μία σειρά και (β) σε δύο σειρές, (γ) απεικόνιση κονιδιοφόρου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.	σελ. 28
Σχήμα 10.	Απεικόνιση των αγενών σπορίων (κονίδια) (α) του <i>Aspergillus parasiticus</i> και (β) του <i>Aspergillus flavus</i> , με σαφείς τις διαφορές στο σχήμα και την υφή και (γ) κονιδιακή κεφαλή του <i>Aspergillus parasiticus</i> .	σελ. 30
Σχήμα 11.	(α) Διαχωρισμός των ειδών <i>A. flavus</i> και <i>A. parasiticus</i> στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα AFPA. (β) Ανάπτυξη <i>A. flavus</i> σε CCA.	σελ. 31
Σχήμα 12.	(α) Καλλιέργειες <i>A. flavus</i> και (β) <i>A. parasiticus</i> όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα CZ και 5-2 άγαρ.	σελ. 31
Σχήμα 13.	Δέσμη γονιδίων αφλατοξίνης (afatoxin cluster) στον <i>A. flavus</i> .	σελ. 35
Σχήμα 14.	Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των αφλατοξινών.	σελ. 37
Σχήμα 15.	Επίδραση της θερμοκρασίας (T °C) και της ενεργότητας νερού (a _w) στην ανάπτυξη και παραγωγή αφλατοξίνης.	σελ. 38

Σχήμα 16.	Φιστίκια με το σύμπτωμα των νεκρωτικών κηλίδων και η αντίστοιχη απεικόνιση σε σύστημα σάρωσης ακτίνων X.	σελ. 45
Σχήμα 17.	Συνοπτική απεικόνιση των κυριότερων μεταβολικών μονοπατιών βιοσύνθεσης των πτητικών ουσιών από μύκητες.	σελ. 65
Σχήμα 18.	Λειτουργία και μέρη της συσκευής της μεθόδου SPME.	σελ. 68
Σχήμα 19.	Σχηματική παράσταση σύνδεσης αεριοχρωματογράφου-φασματογράφου μαζών.	σελ. 72
Σχήμα 20.	Τεχνητά επιμολυσμένο δείγμα κελυφωτού φιστικιού (α) πριν την επώαση (β) μετά την επώαση.	σελ. 78
Σχήμα 21.	Διάγραμμα ροής της μεθόδου προσδιορισμού αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια.	σελ. 79
Σχήμα 22.	Στάδια προετοιμασίας και καθαρισμού των δειγμάτων πριν την εισαγωγή του στην HPLC.	σελ. 80
Σχήμα 23.	Καμπύλη βαθμονόμησης για τις αφλατοξίνες B ₁ , G ₁ και B ₂ , G ₂ .	σελ. 82
Σχήμα 24.	HPLC χρωματογραφήματα από την ανάλυση του πρότυπου διαλύματος αφλατοξίνης.	σελ. 83
Σχήμα 25.	Εκχύλιση πτητικών συστατικών με HS-SPME.	σελ. 84
Σχήμα 26.	Εισαγωγή της ίνας στον αέριο χρωματογράφο (GC-FID) και εκρόφηση των πτητικών συστατικών.	σελ. 85
Σχήμα 27.	HPLC χρωματογράφημα από την ανάλυση αφλατοξίνης στο δείγμα NC-1.	σελ. 90
Σχήμα 28.	Σκληρότητα του στελέχους Δ.1-3 AF2 του μύκητα <i>A. flavus</i> , όπως αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα 5/2 άγαρ.	σελ. 91
Σχήμα 29.	Συγκριτική απεικόνιση των GC χρωματογραφημάτων από τη δοκιμή επίδρασης της διαδικασίας της τεχνητής μόλυνσης στο πτητικό προφίλ του δείγματος H-4.	σελ. 95
Σχήμα 30.	Απεικόνιση του χρωματογραφήματος από την ανάλυση του δείγματος H-1 σε αέριο χρωματογράφο (GC-FID).	σελ. 99
Σχήμα 31.	Απεικόνιση του χρωματογραφήματος από την ανάλυση του δείγματος AC-2 σε αέριο χρωματογράφο (GC-FID).	σελ. 101
Σχήμα 32.	Βιοσυνθετικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού στους μύκητες.	σελ. 103
Σχήμα 33.	Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά συστάδες (CA) σε μορφή δενδρογράμματος.	σελ. 105
Σχήμα 34.	Διάγραμμα απεικόνισης των δύο γραμμικών διακριτικών συναρτήσεων (D1 και D2) μετά την ανάλυση DA.	σελ. 106

Σχήμα 35.	Διάγραμμα απεικόνισης των δύο γραμμικών διακριτικών συναρτήσεων (D1 και D2).	σελ. 108
Σχήμα 36.	(α) Άσπερμοι (κούφιοι) καρποί. (β) Καρποί με πρόωρο σχίσσιμο. (γ) Καρποί με διάφορες παραμορφώσεις του κελύφους.	σελ. 120 σελ. 120 σελ. 120
Σχήμα 37.	Οι πιο συχνές κατηγορίες ελαττωματικών καρπών που απαντώνται κατά τη διαλογή του κελυφωτού φιστικιού, μετά το στάδιο της ξήρανσης.	σελ. 121
Σχήμα 38.	Ταξικαρπία με το σύμπτωμα της ξήρανσης της κορυφής.	σελ. 123
Σχήμα 39.	Απεικόνιση καρπών με νέκρωση του ενδοσπερμίου.	σελ. 123
Σχήμα 40.	(α) Έντομο της τάξης των Ημιπτέρων (β) Απεικόνιση της ακίδας του σιλέτου από τα στοματικά μόρια των εντόμων	σελ. 124
Σχήμα 41.	Υφές (επάνω αριστερά) και ασκοσπόρια (δεξιά) από την απομόνωση του μύκητα <i>Nematospora coryli</i> , από ελληνικά φιστίκια.	σελ. 124
Σχήμα 42.	Οι πέντε υπο-κατηγορίες δειγμάτων της ομάδας των ελαττωματικών καρπών.	σελ. 130
Σχήμα 43.	Συσκευή υγρής καύσης (εφοδιασμένη με διάταξη απαγωγής αερίων) Velp Scientifica (Du6).	σελ. 131
Σχήμα 44.	Συσκευή απόσταξης Kjeltac™ 8100 Distillation Unit, 220V/50Hz, με ρυθμιζόμενο πρόγραμμα.	σελ. 132
Σχήμα 45.	Απεικόνιση της μεταβολής του χρώματος του $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$ κατά την τιτλοδότηση με HCl.	σελ. 133
Σχήμα 46.	(α) Φούρνος αποτέφρωσης Vulcan 3-550 NEY (β) Τοποθέτηση των χωνευτηρίων καύσης σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο (P_2O_5).	σελ. 134
Σχήμα 47.	Συσκευή ημισυνεχούς εκχύλισης Soxhlet.	σελ. 136
Σχήμα 48.	HPLC χρωματογράφημα από την ανάλυση αφλατοξίνης στο δείγμα C.5-E.	σελ. 140
Σχήμα 49.	Απεικόνιση της παραλλακτικότητας των δειγμάτων από την ομάδα των υγιών (H).	σελ. 147
Σχήμα 50.	Η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε λίπος των φιστικιών, όπως μετρήθηκε στα υγιή δείγματα και στα αντίστοιχά τους τεχνητά μολυσμένα δείγματα.	σελ. 148

Σχήμα 51.	Χρωματογράφημα ανάλυσης (α) του δείγματος Η.4-Κ και (β) του τεχνητά μολυσμένου δείγματος C.2-Κ.	σελ. 150
Σχήμα 52.	Διάγραμμα απεικόνισης των δύο πρώτων συνιστωσών από την PCA, με βάση το συντελεστή στάθμισης για κάθε μεταβλητή (χημική ιδιότητα) που αναλύθηκε.	σελ. 153
Σχήμα 53.	Διάγραμμα απεικόνισης της DA, βασισμένη στις 19 μεταβλητές πρόβλεψης, οι οποίες αντιστοιχούν στις χημικές ιδιότητες που προσδιορίστηκαν.	σελ. 155
Σχήμα 54.	Απεικόνιση του διαχωρισμού των 31 δειγμάτων (παρατηρήσεις) στις ομάδες.	σελ. 155
Σχήμα 55.	Πυκνόμετρο για τη μέτρηση του όγκου στερεού τροφίμου με τη μέθοδο εκτόπισης υγρού.	σελ. 167
Σχήμα 56.	Απεικόνιση εργαστηριακής συσκευής για τη μέτρηση του k σε σταθερή κατάσταση.	σελ. 171
Σχήμα 57.	Απεικόνιση της μεθόδου μέτρησης του k με θερμοστοιχείο τύπου βελόνας.	σελ. 172
Σχήμα 58.	Απεικόνιση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.	σελ. 174
Σχήμα 59.	Αλληλεπιδράσεις φωτός και τροφίμου.	σελ. 174
Σχήμα 60.	Χρωματόμετρο Minolta, CR-200.	σελ. 177
Σχήμα 61.	Απεικόνιση του χρωματικού μοντέλου CIEL*a*b*.	σελ. 180
Σχήμα 62.	Απεικόνιση του χρωματικού μοντέλου CIE L*a*b* σε κυλινδρικό σύστημα με τις πολικές συντεταγμένες L*, C* και h*.	σελ. 180
Σχήμα 63.	Τρόποι εφαρμογής της δύναμης κατά τον προσδιορισμό της υφής με μηχανήματα.	σελ. 184
Σχήμα 64.	(α) Δοκιμή συμπίεσης με παράλληλες πλάκες. (β) Δοκιμή διείδυσης με κωνικό έμβολο.	σελ. 185
Σχήμα 65.	Εργαλεία δοκιμής για την εφαρμογή της δύναμης, τα οποία προσαρμόζονται στα μηχανήματα μέτρησης της υφής.	σελ. 185
Σχήμα 66.	Τυπικό διάγραμμα δύναμης – παραμόρφωσης ενός τροφίμου σε δοκιμή συμπίεσης.	σελ. 187
Σχήμα 67.	Μορφές δέσμευσης των μορίων του νερού στην επιφάνεια των τροφίμων και τα αντίστοιχα φαινόμενα ρόφησης.	σελ. 190
Σχήμα 68.	Μια τυπική ισόθερμη καμπύλη υγρασίας των τροφίμων με τις τρεις (A,B,C) χαρακτηριστικές περιοχές.	σελ. 191
Σχήμα 69.	Υστέρηση που παρατηρείται στο φιστίκι Αιγίνης (ψίχα) στους 15 °C.	σελ. 192

Σχήμα 70.	Επίδραση της a_w στο ρυθμό των χημικών αντιδράσεων και της μικροβιακής δραστηριότητας.	σελ. 193
Σχήμα 71.	Τύποι ισόθερων καμπυλών.	σελ. 194
Σχήμα 72.	Τα δείγματα της ομάδας των κανονικών καρπών S, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων.	σελ. 202
Σχήμα 73.	Οι πέντε υπο-κατηγορίες δειγμάτων της ομάδας των ελαττωματικών καρπών D.	σελ. 202
Σχήμα 74.	Μέτρηση μήκους, ύψους και πλάτους στα κελυφωτά φιστικά με παχύμετρο.	σελ. 206
Σχήμα 75.	Ορισμός διαστάσεων κατά τη μέτρηση των κελυφωτών φιστικών.	σελ. 206
Σχήμα 76.	Μέτρηση του χρώματος στο κέλυφος των φιστικών με το χρωματόμετρο Minolta, CR-200.	σελ. 208
Σχήμα 77.	Προσδιορισμός των παραμέτρων της υφής των κελυφωτών φιστικών (α) στο Instron (β) με δοκιμή διάτρησης.	σελ. 208
Σχήμα 78.	Μέτρηση της θερμικής αγωγιμότητας σε αλεσμένη ψίχα κελυφωτού φιστικού με το αγωγιμόμετρο.	σελ. 209
Σχήμα 79.	Καμπύλη προσρόφησης κελυφωτού φιστικού (ολόκληρο: κέλυφος και σπέρμα) στους 25°C.	σελ. 211
Σχήμα 80.	Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στις διαστάσεις (size) του κελυφωτού φιστικού ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ. 216
Σχήμα 81.	Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας (α) στην επιφάνεια (surface) και (β) στη μάζα του κελυφωτού φιστικού ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ. 217
Σχήμα 82.	Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας (α) στον όγκο και (β) στη φαινόμενη πυκνότητα του κελυφωτού φιστικού ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ. 217
Σχήμα 83.	Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στο χρώμα του κελύφους του φιστικού της ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ. 217
Σχήμα 84.	Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στη θερμική αγωγιμότητα (k) της ψίχας του κελυφωτού φιστικού ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ. 218
Σχήμα 85.	Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στην υφή της ψίχας των κελυφωτών φιστικών ποικιλίας «Αιγίνης».	σελ. 218
Σχήμα 86.	Επίδραση στο χρώμα του κελύφους (α) της μεθόδου ξήρανσης και (β) του χρόνου ωρίμανσης.	σελ. 220

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
Περιεχόμενα	1
1.1. Τα κελυφωτά φιστίκια	3
1.1.1. Καταγωγή και ιστορία της φιστικιάς	3
1.1.2. Οικονομικά στοιχεία παραγωγής	4
1.1.3. Βοτανική ταξινόμηση, μορφολογία, βιολογία	6
1.1.4. Η καλλιέργεια της φιστικιάς	9
1.1.5. Συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση	13
1.1.6. Χρήση – Θρεπτική αξία	17
1.2. Οι αφλατοξίνες	19
1.2.1. Ιστορικά – Στατιστικά στοιχεία	19
1.2.2. Παθογόνα αίτια	19
1.2.3. Φυσικές και χημικές ιδιότητες αφλατοξινών	20
1.2.4. Επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων	22
1.2.5. Νομοθεσία	23
1.2.6. Οικονομικές επιπτώσεις από τη μόλυνση με αφλατοξίνες	24
1.3. Οι ασπέργιλλοι	27
1.3.1. Οι μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i>	27
1.3.1.1. Ιστορικά στοιχεία	27
1.3.1.2. Μορφολογία	27
1.3.1.3. Οικολογία – Χρήσεις	28
1.3.2. Η ομάδα <i>Aspergillus section Flavi</i>	29
1.3.2.1. Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των ειδών εντός της ομάδας <i>Flavi</i>	29
1.3.2.2. Κύκλος ασθένειας και επιδημιολογία του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i>	32

1.3.2.3.	Γονιδιωματική του μύκητα <i>A. flavus</i>	34
1.3.2.4.	Βιοσύνθεση αφλατοξίνης.....	35
1.3.2.5.	Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης.....	37
1.4.	Στρατηγική αντιμετώπισης αφλατοξινών.....	39
1.4.1.	Έλεγχος του προβλήματος πριν τη συγκομιδή	39
1.4.1.1.	Προληπτικά μέτρα.....	39
1.4.1.2.	Δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών.....	39
1.4.1.3.	Βιολογική καταπολέμηση	40
1.4.2.	Έλεγχος του προβλήματος μετασυλλεκτικά	41
1.4.2.1.	Προληπτικά μέτρα.....	41
1.4.2.2.	Διαλογή.....	42
1.4.2.3.	Διεργασίες αποτοξικοποίησης και μεταβολισμού των αφλατοξινών	46
1.5.	Σκοποί και στόχοι της διατριβής.....	48
1.6.	Βιβλιογραφία.....	50
1.6.1.	Ελληνική βιβλιογραφία.....	50
1.6.2.	Διεθνής βιβλιογραφία	50

1.1. Τα κελυφωτά φιστίκια

1.1.1. Καταγωγή και ιστορία της φιστικιάς

Η φιστικιά (*Pistacia vera*), σύμφωνα με εργασίες ρώσων βοτανικών (Zohary 1950-1952) κατάγεται από την κεντρική Ασία, όπου φύεται άγρια, καλύπτοντας τεράστιες ορεινές και πεδινές εκτάσεις. Η περιοχή στην οποία αναπτύσσεται αρχίζει από το Ιράν και το Αφγανιστάν και επεκτείνεται μέσω Τουρκμενιστάν, Ουζμπεκιστάν, Τατζικιστάν και Κιργιστάν, μέχρι τη δυτική όχθη της λίμνης Ισσίκ-Κουλ. Η πρώτη αναφορά στη φιστικιά στην αρχαία ελληνική γραμματεία θεωρείται ότι έγινε τον 4^ο και 3^ο αιώνα π.Χ. από τον Θεόφραστο (Περί Φυτών Ιστορία, IV, 4,7). Ο Θεόφραστος, περιγράφοντας το δένδρο χωρίς να το ονομάζει, γράφει ότι, *όπως λένε, στην Ινδική και στην Βακτρία (Αφγανιστάν) φύεται ένα δένδρο όμοιο με την τέρμινθον (τερέβινθον) ως προς τα φύλλα, τους κλάδους και τα άλλα, διαφορετικό όμως προς τον καρπό. Οι καρποί είναι κάρνα που μοιάζουν με τα αμύγδαλα, αλλά είναι μικρότεροι και το κέλυφός τους δεν είναι τραχύ, στη γεύση δε, είναι πολύ νοστιμότεροι από τα αμύγδαλα και γι' αυτό προτιμώνται.* Το όνομα «πιστάκια» (από την περσική λέξη πίστα που σημαίνει φιστίκι) απαντάται για πρώτη φορά στον Νίκανδρο (Θηριακά, 891) τον 2^ο αιώνα π.Χ., ο οποίος επίσης τονίζει την ομοιότητα των καρπών με τα αμύγδαλα. Ο Διοσκουρίδης, τον 1^ο αιώνα μ.Χ. αναφέρει ότι τα φιστίκια παράγονται στη Συρία και έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες (Περί Ύλης Ιατρικής, Λόγος Πρώτος, 124), ενώ τον 2^ο αιώνα μ.Χ., ο Αθηναίος από την Αλεξάνδρεια γράφει (Δειπνοσοφισταί, XIV, 649d-e): *Τα φιστίκια, τα οποία προσφέρονται στο τραπέζι των σοφών, σύμφωνα με τα τότε γνωστά, παράγονται στη Συρία και στην Αραβία. Ο καρπός είναι λευκόφαιος, μακρός, πράσινος στο εσωτερικό και ενώ είναι λιγότερο χυμώδης από τον σπόρο της κουκουναριάς είναι περισσότερο εύγευστος από αυτόν.*

Αν και όπως αποδεικνύεται από τα ιστορικά κείμενα, τα φιστίκια ήταν γνωστά ήδη στους αρχαίους Έλληνες και εκτιμούνταν για τη νόστιμη γεύση τους, δεν είναι γνωστός ο χρόνος εισαγωγής και καλλιέργειας της φιστικιάς στην Ελλάδα. Είναι ενδιαφέρον ότι εισήχθη στη Ρώμη περίπου το 30 μ.Χ. και ταυτόχρονα στην Ισπανία (Πλίνιος, XV, 83,91). Ο Έλληνας φυσιολόγος Γεννάδιος (1914), ο οποίος ερεύνησε το θέμα αυτό, αναφέρει ότι, κατά τις πρώτες δεκαετίες του 19^{ου} αιώνα το φιστίκι ήταν «οπωρικόν» της Ασίας, καλλιεργούνταν στη Ζάκυνθο, αν και μεμονωμένα δένδρα υπήρχαν και σε άλλα μέρη της Ελλάδας. Η πρώτη οργανωμένη φυτεία φιστικιάς οφείλεται στον Έλληνα βιομήχανο σοκολάτας Δ.Παυλίδη, στο κτήμα του στο Ψυχικό Αττικής. Στη συνέχεια, ο διευθυντής του Δημοσίου Δενδροκομείου (Βοτανικός) Ορφανίδης, το 1869 άρχισε να

πολλαπλασιάζει τη φιστικιά και να συνιστά την καλλιέργειά της, ενώ το έργο του συνέχισε ο διάδοχος του Π.Γεννάδιος. Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα ο Ν.Περόγλου, εγκατέστησε την πρώτη φυτεία φιστικιάς στην Αίγινα, διαβλέποντας την οικονομική σημασία, αλλά και την καταλληλότητα του δένδρου αυτού για τις εδαφοκλιματικές συνθήκες του νησιού. Από το κτήμα του, η καλλιέργεια του δένδρου αυτού διαδόθηκε στο νησί και σε όλη την Ελλάδα. Στον ίδιο, οφείλεται η έκδοση του πρώτου πρακτικού εγχειριδίου για την καλλιέργεια της φιστικιάς, αυτού του «*λιτού αλλά προσοδοφόρου*» (όπως το περιγράφει) δένδρου. Όλες οι πληροφορίες για την ιστορία της καλλιέργειας και το «ταξίδι» του δένδρου από την Ασία στην Ελλάδα, έχουν προκύψει από την ενδελεχή έρευνα της Φυτοπαθολόγου Δρ. Α. Χιτζανίδου και περιλαμβάνονται στο άρθρο της Chitzanidis (2010). Η Δρ. Χιτζανίδου, εγγονή του Ν. Περόγλου, μαζί με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, εξακολουθεί να καλλιεργεί και σήμερα ένα μέρος από τον πρώτο ιστορικό φιστικεώνα, που εγκατέστησε ο πρόγονός της στην Αίγινα.

1.1.2. Οικονομικά στοιχεία παραγωγής

Το περίφημο φιστίκι Αιγίνης έχει χαρακτηριστεί προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) από την ΕΕ (ΕΚ 1263/96), όπως και της Φθιώτιδας και των Μεγάρων. Αρχικά, η καλλιέργειά της περιορίστηκε στα παράλια της Αττικής και στην Αίγινα. Από το 1950 άρχισε να επεκτείνεται στις περιοχές της Βοιωτίας, της Κορινθίας, της Εύβοιας και της Φθιώτιδας και από το 1968 στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλία, Χαλκιδική, Ροδόπη), στην Κρήτη και στις Κυκλάδες. Σήμερα καλλιεργείται σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από ζεστό και ξηρό κλίμα, όπως είναι το Ιράν, η Τουρκία, οι παραμεσόγειες χώρες και οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής.

Η φιστικιά είναι ένα καρποφόρο δένδρο με μικρές απαιτήσεις ως προς το έδαφος και το κλίμα, ενώ ο καρπός του, το κελυφωτό φιστίκι, θεωρείται ένας από τους πιο εύγευστους και διατροφικά άριστους καρπούς. Αυτοί είναι και οι σημαντικότεροι λόγοι για τους οποίους η καλλιέργεια του δένδρου έχει επεκταθεί παγκοσμίως και αποτελεί αντικείμενο διεθνούς ενδιαφέροντος. Σύμφωνα με τα στοιχεία του FAOSTAT (ενημέρωση 4/8/2014), από το 2006 έως το 2012, η παγκόσμια παραγωγή κελυφωτών φιστικιών, ακολουθώντας ανοδική τάση, αυξήθηκε από 594257 τον. σε 1005436 τον, ένα ποσοστό της τάξης του 69%. Η παραγωγή κελυφωτών φιστικιών ανά χώρα παραγωγής παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Το Ιράν, παραδοσιακά κατέχει την πρώτη θέση παγκοσμίως σε παραγωγή (47%). Από οικονομικές μελέτες που αφορούν την περιοχή, χαρακτηρίζεται ως «ο πράσινος χρυσός», το δεύτερο σε ακαθάριστη πρόσοδο προϊόν

Πίνακας 1. Παραγωγή φιστικιών παγκοσμίως (τόνοι).

Χώρα	Έτος			
	2006	2008	2010	2012
Ιράν	250000	446647	446647	472097 ^F
ΗΠΑ	107955	126100	236775	231000*
Τουρκία	110000	120113	128000	150000
Κίνα	36000**	40000**	58000**	74000**
Συρία	73183	52066	57471	57195
Ελλάδα	8233	8100 ^F	8998 ^F	10000 ^F
Ιταλία	1024	2000 ^F	3115 ^F	2850 ^F
Αφγανιστάν	2457 ^F	3300 ^F	2000 ^F	2000 ^F
Τυνησία	2700	2500	2300	1400
Αυστραλία	1000	1800	1000	1792 ^F
Πακιστάν	632	773	663	659 ^F
Κιργιστάν	500 ^F	759**	800 ^F	888 ^F
Ιορδανία	-	618	623	675
Ακτή Ελεφαντοστού	162	200	242	288 ^F
Ουζμπεκιστάν	203	190**	200 ^F	225 ^F
Μαδαγασκάρη	220 ^F	254**	187**	223 ^F
Μαρόκο	65**	69**	78**	80 ^F
Μεξικό	4	21	71	38
Κύπρος	12	24	19	17
Μαυρίκιος	5**	7**	6 ^F	6 ^F
Αζερμπαϊτζάν	15	3	2	3

F: κατ'εκτίμηση παραγωγή από τον FAO, * ανεπίσημη τιμή, **διαφόρων ειδών στοιχεία

Πηγή: FAOSTAT, 2015, Τελευταία ενημέρωση: 4/8/14 (www.faostat.fao.org)

μετά το πετρέλαιο (Aghdaie, 2009). Τη δεύτερη θέση σε παραγωγή κατέχουν οι Η.Π.Α. (23%), με αλματώδη αύξηση της παραγωγής τους από το 2000 και μετά, δεδομένου ότι οι πρώτες εντατικές καλλιέργειες φιστικιάς φυτεύτηκαν το 1975, στην Καλιφόρνια. Την τρίτη θέση σε παραγωγή κατέχει η Τουρκία (15%), με σταθερή σχετικά παραγωγή και ακολουθεί η Κίνα (7%) και η Συρία (6%). Η Ελλάδα (1%) κατέχει την 6^η θέση στην παγκόσμια παραγωγή κελυφωτού φιστικιού και την 1^η στην Ευρώπη, με συνεχή αυξητική τάση, ιδιαίτερα από το 1996 και μετά (FAOSTAT, 2014).

Η φιστικιά αποτελεί μια μικρή καλλιέργεια για την Ελλάδα, αν και η έκταση που καταλαμβάνει έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με στοιχεία της Icar Group, στα έτη 1998-2005, τα κελυφωτά φιστικά κάλυψαν μόλις το 12% της εγχώριας παραγωγής ξηρών καρπών, ενώ στις εξαγωγές αποτελούν το δεύτερο σε θέση ξηρό καρπό, μετά την αμυγδαλόψιχα. Οικονομικά στοιχεία για την καλλιέργεια, όπως το κόστος παραγωγής και η ακαθάριστη πρόσοδος περιέχονται στη μελέτη των Beede *et al.*

(2005), με την επισήμανση ότι τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται βασίζονται σε δεδομένα καλλιεργητικής πρακτικής και κόστους πρώτων υλών των Η.Π.Α.

1.1.3. Βοτανική ταξινόμηση, μορφολογία, βιολογία

Η φιστικιά (*Pistacia vera*) ανήκει στην οικογένεια των Anacardiaceae (Ποντίκης, 1996). Η συστηματική ταξινόμηση του δένδρου (κατά CRONQUIST, 1981) είναι:

Βασίλειο:	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία:	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία:	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Υφομοταξία:	Ροδίδες (Rosidae)
Τάξη:	Σαπινδώδη (Sapindales)
Οικογένεια:	Ανακαρδιοειδή (Anacardiaceae)
Γένος:	Πιστακία (<i>Pistacia</i>)
Διώνυμο:	Πιστακία η γνήσια (<i>Pistacia vera</i>)

Κατά τον Zohary (1952), το γένος *Pistacia* περιλαμβάνει 11 είδη (Χιτζανίδου *et al.*, 2004). Το είδος *Pistacia vera* L. είναι η καλλιεργούμενη ήμερη φιστικιά, ενώ στην Ελλάδα καλλιεργείται σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα η ποικιλία Αιγίνης. Σε πολύ μικρή έκταση καλλιεργείται η «Νυχάτη» και σποραδικά συναντάται η «Φουντουκάτη», ενώ από το 1989 δόθηκε στην καλλιέργεια μια νέα ποικιλία, με την ονομασία «Pontikis» (Ποντίκης, 1996). Ως υποκείμενα της φιστικιάς χρησιμοποιούνται διάφορα είδη του γένους *Pistacia*. Στην Ελλάδα, η φιστικιά εμβολιάζεται σχεδόν πάντα σε τσικουδιά (*Pistacia terebinthus*, L.) (Σχήμα 1α), λόγω της καλής της συγγένειας με την ποικιλία, αλλά και της ανθεκτικότητάς της στους φυτοπαθογόνους μύκητες του γένους *Phytophthora*. Στις ΗΠΑ, αλλά και σε άλλες χώρες γίνεται συστηματική έρευνα για τη δημιουργία υποκειμένων με καλές δενδροκομικές ιδιότητες και ανθεκτικότητα σε εδαφογενή παθογόνα και νηματώδεις (Holtz *et al.*, 2005).

Η φιστικιά (*Pistacia vera*) είναι δέντρο δίοικο, πρωτανδρικό και ανεμόφιλο, διότι το θηλυκό άνθος δεν φέρει πέταλα, ούτε νεκτάρια και δεν ελκύει τις μέλισσες (Ποντίκης, 1996). Οι αρσενικές ποικιλίες είναι τα αρσενικά άτομα της *P. vera*, καθώς και οι ποικιλίες Chico και Peters (Ferguson *et al.*, 2005a). Στην Ελλάδα, τα αρσενικά δένδρα διακρίνονται σε τέσσερις (Α, Β, Γ, Δ) ή κατ' άλλους τρεις (Α,Β,Γ) τύπους, ανάλογα με το

χρόνο έκπτυξης των οφθαλμών (Ποντίκης, 1996). Τα αρσενικά δένδρα τύπου Α ανθίζουν πρωϊμότερα από τον τύπο Β, ενώ ο τύπος Γ (ή και Δ) θεωρείται ο πιο όψιμος. Ανάλογα με την περιοχή εγκατάστασης του φιστικεώνα είναι σημαντικό να τηρείται μια αναλογία όχι μόνο των θηλυκών προς τα αρσενικά, αλλά και μια κατάλληλη αναλογία ανάμεσα στους τύπους των αρσενικών, ώστε να καλύπτονται επαρκώς οι ανάγκες των θηλυκών δένδρων σε γύρη. Ωστόσο, η φιστικιά μπορεί να γονιμοποιηθεί και με γύρη άλλων ειδών του γένους *Pistacia*, όπως η τσικουδιά και ο σχίνος, αλλά σε αυτή την περίπτωση, οι καρποί είναι κατώτερης ποιότητας και εμφανίζουν ελαττώματα, τόσο ως προς τις διαστάσεις και το βάρος (φαινόμενο ξενίας), όσο και ως προς το χρόνο ωρίμανσης, τις συνολικές διαστάσεις και την παρουσία ή μη, σπέρματος (φαινόμενο μεταξενίας). Ένας γενικός κανόνας αναλογίας θηλυκών προς αρσενικά είναι 10:1. Ανάλογα όμως την περιοχή καλλιέργειας μπορεί να διαφοροποιείται αντίστοιχα.

Η φιστικιά είναι ένα φυλλοβόλο δένδρο βραδείας ανάπτυξης. Εισέρχεται σε αξιόλογη καρποφορία από το 8^ο-10^ο έτος της ηλικίας της και η παραγωγική ζωή της υπολογίζεται σε 100 και πλέον έτη (Μπρουσοβάνας, 1980). Το ριζικό σύστημα του δένδρου είναι πολύ εκτεταμένο και διεισδύει σε μεγάλα βάθη. Τα φύλλα της είναι σύνθετα με περιττό αριθμό φυλλαρίων. Οι ανθοφόροι οφθαλμοί εκπτύσσονται την άνοιξη και δίνουν βοτρυώδεις ταξιανθίες με άνθη, τα οποία αν γονιμοποιηθούν εξελίσσονται σε καρπούς (Σχήμα 1β). Καρποφορεί σε ξύλο του παρελθόντος έτους, πλάγια, από απλούς ανθοφόρους οφθαλμούς. Ο καρπός είναι δρύπη, με σχήμα επίμηκες ωοειδές και σχηματίζεται σε σύνθετους βότρες. Αποτελείται από το περικάρπιο (φλοιός), το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο (κέλυφος) και το σπέρμα (ψίχα) (Σχήμα 2). Το σπέρμα περιβάλλεται από λεπτό φλοιό χρώματος βυσσινί ή κόκκινο στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του, το οποίο περικλείει το έμβρυο και τις δύο κοτυληδόνες, τα οποία, ανάλογα με την ποικιλία, το χρώμα είναι υπόλευκο μέχρι πράσινο.

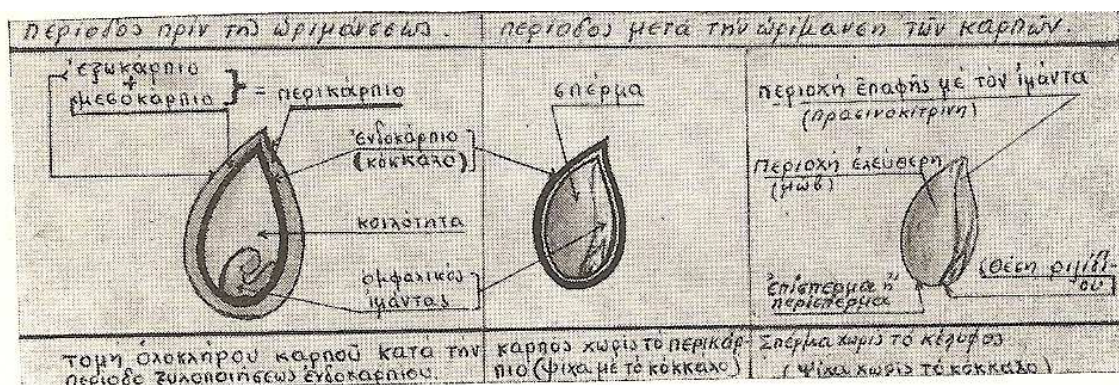
Μετά τη γονιμοποίηση και το δέσιμο, ο καρπός αυξάνει σε μέγεθος (Απρίλιος – Ιούνιος), ενώ το σπέρμα δεν αναπτύσσεται κατά το διάστημα αυτό. Οι καρποί ανεξάρτητα, αν τελικά είναι κούφιοι ή γεμάτοι, αναπτύσσονται κατά τον ίδιο τρόπο. Μέχρι να αρχίσει η ανάπτυξη του σπέρματος, φέρουν εσωτερικά μόνο τον ομφαλικό μίσχνο, που έχει υφή σφουγγαριού και σχήμα σπειροειδές, στο άκρο του έχει τη σπερματική βλάστη και είναι προσκολλημένο στο εσωτερικό χαλαζιακό άκρο του καρπού (Σχήμα 3). Μέχρι το τέλος Ιουνίου, το ενδοκάρπιο παραμένει μαλακό και ο καρπός είναι ευάλωτος σε προσβολές εντόμων. Από το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο γίνεται σκληρό και ο όγκος του σπέρματος αρχίζει να αυξάνεται πολύ γρήγορα, μέχρι να

γεμίσει όλο σχεδόν τον εσωτερικό χώρο, οπότε ο ομφαλικός ιμάντας πιάνει την κοιλιακή πλευρά του καρπού. Το σπέρμα φτάνει το τελικό του μέγεθος στα μέσα Αυγούστου.

Κατά την ωρίμανση, οι καρποί αποκτούν χρώμα υπόλευκο ή κίτρινο, με κόκκινη ή μωβ απόχρωση, ανάλογα την έκθεση στον ήλιο. Επιπλέον, το περικάρπιο μαλακώνει και αποκολλάται εύκολα από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο. Το χρώμα του φλοιού, ο βαθμός ευκολίας που αποκολλάται από το κέλυφος και η εύκολη απόσπαση των καρπών με ελαφρό τίναγμα από τον ποδίσκο, αποτελούν τα βασικά κριτήρια ωριμότητας. Συνήθως οι καρποί δεν ωριμάζουν όλοι μαζί. Οι πρώτοι ώριμοι καρποί εμφανίζονται στις αρχές με τα μέσα Αυγούστου. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά ποιότητας εκτός από την ανάπτυξη του σπέρματος (ψίχα) είναι το σχίσσιμο του κελύφους κατά μήκος της ραφής. Το *P. vera* είναι το μόνο είδος του γένους *Pistacia* που παρουσιάζει αυτή την ιδιομορφία. Ανάλογα με την ποικιλία, το ποσοστό σχισίματος κυμαίνεται από 20-95 %.



Σχήμα 1: (α) Το δέντρο της τσικουδιάς (*Pistacia terebinthus*, L.). (β) Ταξιανθία φιστικιάς (Ποντίκης, 1996).



Σχήμα 2: Μορφολογία του καρπού φιστικιάς. Σχέδιο με βάση το πρωτότυπο του Θ. Μουλούλη (Μπρουσοβάνας, 1980).

Ένας από τους φυσιολογικούς χαρακτήρες του δένδρου είναι η παρενιαυτοφορία κατά την οποία, εναλλάσσονται, μία χρονιά με μεγάλη παραγωγή και μία με μικρή ή με ακαρπία. Αν και ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί, υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι πρόβλημα ανταγωνισμού υδατανθράκων και ότι ελέγχεται χημικά από ρυθμιστές ανάπτυξης (Ferguson *et al.*, 2005a).

1.1.4. Η καλλιέργεια της φιστικιάς

Η φιστικιά ευδοκίμει καλύτερα σε περιοχές με μακρό, θερμό και ξηρό θέρος και ήπιους χειμώνες. Ευδοκίμει άριστα σε κλίμα ζεστό και ξηρό, που επηρεάζεται από τη θάλασσα, μέχρι και 650 μέτρα υψόμετρο (Ποντίκης, 1996). Οι μελέτες δείχνουν ότι για την ομαλή διακοπή του λήθαργου τόσο των θηλέων όσο και των αρρένων δένδρων απαιτούνται 1000 ώρες με θερμοκρασία μικρότερη από 7°C (Μπρουσοβάνας, 1980). Οι θερμοί χειμώνες επιτείνουν το φαινόμενο της πρωτανδρίας, λόγω ανώμαλης διακοπής του λήθαργου. Την τελευταία δεκαετία, τα μετεωρολογικά δεδομένα δείχνουν ότι δεν συμπληρώνονται οι απαιτούμενες ώρες ψύχους, λόγω του φαινομένου της κλιματικής αλλαγής, με αποτέλεσμα να έχουν εμφανιστεί προβλήματα πρωτανδρίας, ανώμαλης έκπτυξης των οφθαλμών με έντονη διακύμανση εντός του φιστικεώνα, τα οποία επηρεάζουν την επικονίαση και μειώνουν την καρπόδεση και τη συνολική παραγωγή (παρατηρήσεις συγγραφέα από επιτόπιες επισκέψεις σε φιστικεώνες στην Αίγινα). Ωστόσο, τις χρονιές που οι βροχοπτώσεις είναι ικανοποιητικές έχει παρατηρηθεί ότι η καρποφορία είναι καλή ακόμα και αν υπάρχουν προβλήματα καρπόδεσης.



Σχήμα 3: Στάδια ανάπτυξης του σπέρματος του φιστικιού σε επιμήκη (επάνω σειρά) και κάθετη (κάτω σειρά) τομή. Διακρίνεται ο ομφαλικός μάντας και το έμβρυο, το οποίο εξελίσσεται στο σπέρμα. Το σπέρμα (ψίχα) αναπτύσσεται από τις αρχές Ιουλίου έως και το τέλος Αυγούστου.

Το κλάδεμα γίνεται αργά τον χειμώνα και πριν από την έκπτυξη των οφθαλμών (Ποντίκης, 1996). Γενικά, το κλάδεμα πρέπει να είναι ελαφρό και να αποσκοπεί στη διατήρηση του σχήματος και στην ανανέωση του καρποφόρου ξύλου. Μελέτες συνδέουν το κλάδεμα με την παρενιαντοφορία (Ferguson *et al.*, 1995). Η φιστικιά, αν και είναι ανθεκτική στην ξηρασία, δίνει μεγαλύτερη παραγωγή όταν ποτίζεται, ιδιαίτερα στην περίοδο ανάπτυξης του σπέρματος (Ιούνιο με Αύγουστο). Τα συστήματα άρδευσης τα οποία εφαρμόζονται στους φιστικεώνες είναι οι λεκάνες, οι σταγόνες (στάγδην) και οι εκτοξευτήρες. Το δένδρο, αν και προσαρμόζεται σε ποικιλία εδαφών, προτιμά τα σχετικά βαθιά, καλά αποστραγγιζόμενα, μέσης σύστασης εδάφη, με υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο (Ποντίκης, 1996). Ανέχεται όμως και τα ελαφρώς όξινα, αλκαλικά ή αλατούχα εδάφη πολύ περισσότερο από ότι άλλα δένδρα, όπως η ελιά.

Η λίπανση αποτελεί καθοριστικής σημασίας καλλιεργητική επέμβαση για την παραγωγικότητα των δένδρων της φιστικιάς. Η διαμόρφωση και εφαρμογή ενός αποτελεσματικού προγράμματος λίπανσης, στηρίζεται στη διάγνωση της τρέχουσας κατάστασης εφοδιασμού των δένδρων σε ανόργανα θρεπτικά στοιχεία (φυλλοδιαγνωστική) και στην ανάλυση του εδάφους. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τις απαιτήσεις της καλλιέργειας και έχουν καταρτιστεί γενικά προγράμματα λίπανσης, καθώς και εφαρμογές συστημάτων υδρολίπανσης (Ποντίκης, 1996; Schwankl, 2005).

Η φυτοπροστασία κατέχει κεντρικό ρόλο στην καλλιέργεια, διότι επιδρά στην ποσότητα και στην ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά τη συγκομιδή, αλλά και στο τελικό επεξεργασμένο προϊόν. Δένδρα τα οποία είναι απαλλαγμένα από ασθένειες και εχθρούς, στο πλαίσιο μια ολοκληρωμένης εξορθολογισμένης διαχείρισης των γεωργικών πόρων και του περιβάλλοντος, είναι εύρωστα και παράγουν καρπούς υψηλής ποιότητας. Ειδικότερα, όταν οι προσβολές από μύκητες (μούχλες από σκωρίαση, καμαροσπόριο, ασπέργιλλους) ή οι ζημιές από έντομα (παραμορφώσεις, νύγματα, μεταχρωματισμοί) αφορούν τους καρπούς, τότε απαιτείται η άμεση απόρριψή τους πριν το στάδιο της αποθήκευσης του προϊόντος, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση και των υπόλοιπων υγιών καρπών. Στο βιβλίο των Χιτζανίδου *et al.* (2004) περιγράφονται με λεπτομέρεια και με πλούσιο φωτογραφικό υλικό, όλες οι ασθένειες (συμπτώματα, αίτιο, κύκλος ασθένειας, επιδημιολογία) και οι εντομολογικοί εχθροί (μορφολογία, βιολογία, ζημιές) της φιστικιάς στην Ελλάδα και προτείνονται τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισης. Στην παρούσα διατριβή γίνεται συνοπτική αναφορά τους, στους Πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2. Οι κυριότερες ασθένειες της φιστικιάς στην Ελλάδα (Χιτζανίδου *et al.*, 2004).

Ονομασία	Παθογόνο αίτιο	Συμπτωματολογία
Σηψιρριζία	<i>Armillaria sp.</i>	Καχεκτική βλάστηση, μικροφυλλία, χλωρωτικά φύλλα, πτώση φύλλων. Νέκρωση μεμονωμένων κλάδων, το δένδρο φθίνει και ξηραίνεται. Ξηρή σήψη ριζών.
Φυτόφθορα	<i>Phytophthora sp.</i>	Άφθονη έκκριση κόμμεος χαμηλά στον κορμό πάνω από το σημείο του εμβολιασμού (κομμίωση), μεταχρωματισμός καμβίου μέχρι το σημείο του εμβολιασμού. Αποπληξία.
Βερτισιλλίωση	<i>Verticillium dahliae</i>	Χλώρωση φύλλων, ημιπληγία, καστανός μεταχρωματισμός στα αγγεία του σομού ξύλου.
Ευτυπίωση	<i>Eutypa lata</i>	Απότομη ξήρανση μεμονωμένων κλάδων κατά το θέρος, παραμονή των ξηρών φύλλων στους κλάδους, σκούρος μεταχρωματισμός ξύλου και φλοιού.
Σήψη ξύλου	<i>Phelinus rimosus</i>	Απότομη ξήρανση κλάδων από Ιούνιο-Αύγουστο, παραμονή φύλλων και καρπών στους κλάδους, σκούρος ερυθροκάστανος μεταχρωματισμός.
Σεπτορίωση	<i>Septoria sp.</i>	Πολυάριθμες καστανές κηλίδες στις επιφάνειες των φύλλων.
Σκωρίαση	<i>Pileolaria terebinthi</i>	Κηλίδες, φλόκταινες στα άνθη, στις ταξιανθίες, στα φύλλα και στους καρπούς.
Καμαροσπόριο	<i>Botryosphaeria sp.</i>	Προσβολή όλων των οργάνων του δένδρου, εμφάνιση μαύρων στιγμάτων στο τέλος του θέρους.
Στιγματομύκωση	<i>Nematospora coryli</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>	Νεκρώσεις και παραμορφώσεις στο εσωτερικό ή/και εξωτερικό των κοτυληδόνων.
Προσβολές από ασπέργιλλους	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Σκουρόχρωμες κηλίδες στο περικάρπιο, σήψη του σπέρματος, κιτρινοπράσινες καρποφορίες. Παραγωγή αφλατοξινών.

Πίνακας 3. Οι κυριότεροι εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα (Χιτζανίδου *et al.*, 2004).

Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία, Τάξη	Ζημιές
Καπνώδης	<i>Capnodis tenebrionis</i> Coleoptera	Δημιουργία στοάς στο λαιμό και στις κεντρικές ρίζες, κάτω από το φλοιό. Χλώρωση φύλλων, κλάδων και τελικά του δένδρου.
Σκολύτης	<i>Acrantus vestitus</i> Coleoptera	Οι οφθαλμοί στους ετήσιους βλαστούς φέρουν οπή. Η οπή αποτελεί είσοδο στοάς μήκους μέχρι 5εκ., η οποία προχωρά κατά μήκος του κεντρικού άξονα του κλαδίσκου.
Σινόξυλο	<i>Sinoxylon sexdentatum</i> Coleoptera	Οι λεπτοί κλάδοι φέρουν οπή στο σημείο του γονάτου. Δημιουργία στοάς σε σχήμα δακτυλιδιού, σε επίπεδο κάθετο προς τον άξονα του κλάδου. Οι προσβεβλημένοι κλάδοι σπάζουν πολύ εύκολα.
Τίνεα	<i>Teleiodes decorella</i> <i>Archips rosanus</i> Lepidoptera	Τα εκπυσσόμενα φύλλα είναι δεμένα πολλά μαζί με νήματα και παρουσιάζουν φαγώματα.
Ψύλλα	<i>Agonoscena pistaciae</i> Homoptera	Τα φύλλα καλύπτονται από μελιτώδη ουσία πάνω στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί καπνιά. Σε μικρή προσβολή είναι σε μορφή σταγονιδίων, ενώ σε μεγάλη προσβολή η μελιτώδης ουσία στάζει στο έδαφος.
Σκώρος	<i>Palumbina guerinii</i> Lepidoptera	Απότομος μαρασμός της ακραίας εκπυσσόμενης βλάστησης, σε μεμονωμένους κλαδίσκους. Εμφανής οπή (είσοδος) στον ακραίο οφθαλμό. Οι καρποί φέρουν ελαφρύ καστανό μεταχρωματισμό με ασαφή όρια, κυρίως προς τη βάση. Αργότερα, εμφανίζεται μια μικρή οπή στην ένωση με τον ποδίσκο.
Ευρύτομο	<i>Eyrytoma plotnikovi</i> Hymenoptera	Ο κορυφή του καρπού γίνεται σκούρα καστανή, ως το ήμισυ του μήκους του. Συχνά παρουσιάζει εναλλασσόμενες ζώνες.
Τρωγόκαρπος	<i>Megastigmus pistaciae</i> Hymenoptera	Οι καρποί δεν ωριμάζουν και δεν φέρουν εξωτερικά συμπτώματα. Διακρίνεται οπή διαμέτρου 1mm στο μέσο του μήκους του καρπού. Το σπέρμα είναι φαγωμένο και υπάρχουν εμφανή αποχωρήματα εντόμου.
Τζιτζικάκι (Ιδιόκερος)	<i>Idiocerus stali</i> Hemiptera	Τα φύλλα και οι καρποί καλύπτονται από μελιτώδη ουσία πάνω στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί καπνιά. Συχνά, το έλασμα, ο μίσχος και οι καρποί φέρουν νύγματα εντόμων, που φαίνονται σαν μελανά στίγματα. Τα νύγματα είναι πολυπληθή στις διακλαδώσεις του βότρυ.

Κοκκοειδή	<i>Aspidiotus sp.</i> , <i>Melanaspis sp.</i> Homoptera	Εντοπισμένη νέκρωση φλοιού σε κλαδιά.
Έντομα αποθήκης	<i>Ephestia kuehniella</i> <i>Plodia interpunctella</i> Lepidoptera	Καρποί συχνά ενωμένοι μεταξύ τους με νήματα. Από τη σχισμή του ενδοκαρπίου φαίνονται τα αποχωρήματα των εντόμων. Το σπέρμα παρουσιάζει φαγώματα και ενδεχομένως την προνύμφη του λεπιδόπτερου.

Από όλες τις μυκητολογικές προσβολές, ιδιαίτερη μνεία γίνεται για τη μόλυνση των καρπών της φιστικιάς με τους ασπεργίλλους, οι οποίοι είναι τα αίτια παραγωγής αφλατοξινών. Ωστόσο, στο στάδιο πριν τη συγκομιδή, εξίσου σημαντικός έχει αποδειχθεί και ο ρόλος των εντομολογικών προσβολών στους καρπούς. Οι σπές που δημιουργούν στο φλοιό, αλλά και στο κέλυφος (όπως στην περίπτωση του σκώρου) αποτελούν την πύλη εισόδου των ασπεργίλλων, ώστε να αποικίσουν το σπέρμα, δηλαδή το εδώδιμο μέρος του καρπού. Πολλές είναι οι μελέτες από τη διεθνή βιβλιογραφία, που συσχετίζουν υψηλά επίπεδα αφλατοξίνης με φιστίκια, τα οποία εμφανίζουν ζημιές από έντομα ή πληγές από άλλα αίτια (Rice, 1978; Michailides *et al.*, 1995; Doster & Michailides, 1995, 1999). Επίσης, τα αποτελέσματα από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα δείχνουν ότι η παραγωγή αφλατοξίνης μπορεί να εντοπιστεί και σε στάδια πριν τη συγκομιδή, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μετρήθηκαν σε δείγματα που προέρχονταν από φιστικεώνες με πολλές εντομολογικές ζημιές (Georgiadou *et al.*, 2012a). Οι Yanniotis *et al.* (2011), μελετώντας φιστίκια με το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του σπέρματος, το οποίο προέρχεται από προσβολές εντόμων, έδειξαν ότι τα φιστίκια αυτά περιείχαν 60 φορές περισσότερη αφλατοξίνη. Περισσότερες λεπτομέρειες για το θέμα αυτό, δίδονται στο Κεφάλαιο 3 (§3.1.1.2).

1.1.5. Συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση

Η συγκομιδή των φιστικιών στη χώρα μας, ανάλογα με την περιοχή αρχίζει από τα τέλη Αυγούστου με μέσα Σεπτέμβρη, και διαρκεί 15-20 μέρες. Πραγματοποιείται με ράβδισμα ή τίναγμα των δένδρων, ενώ οι καρποί πέφτουν κάτω από την κόμη, πάνω σε απλωμένα πανιά ή δίχτυα συλλογής ελαιοκάρπων (Σχήμα 4α). Σε άλλες χώρες γίνεται μηχανική συγκομιδή με δονητές. Στη συνέχεια, τα συγκομισμένα φιστίκια οδηγούνται στον αποφλοιωτή, ώστε να απομακρυνθεί η φλούδα το ταχύτερο δυνατό. Καθυστερημένη αποφλοίωση οδηγεί σε «λέκιασμα» του κελύφους ή/και μαύρισμα, με αποτέλεσμα την

υποβάθμιση της ποιότητά τους (Kader *et al.*, 1982). Επιπλέον, όσο η φλούδα παραμένει, ο κίνδυνος προσβολής του σπέρματος από μύκητες αυξάνει (Georgiadou *et al.*, 2012a). Η αποφλοίωση γίνεται με ηλεκτροκίνητα αποφλοιωτικά μηχανήματα που λειτουργούν με νερό (Σχήμα 4β). Σε αυτό το στάδιο, οι καρποί μικρότερης πυκνότητας επιπλέουν (άσπερμοι καρποί ή καρποί με υπανάπτυκτο ή φαγωμένο από έντομα σπέρμα) οπότε και απομακρύνονται («αφρός»), ενώ οι φυσιολογικοί καρποί καταβυθίζονται. Σε κάποιες περιπτώσεις, αν το λευκό χρώμα του κελύφους δεν είναι ικανοποιητικό, τα φιστίκια λευκαίνονται με υποθειώδες νάτριο, πριν το επόμενο στάδιο της αποξήρανσης.

Ο παραδοσιακός τρόπος ξήρανσης γίνεται με άπλωμα των φιστικιών σε στρώση πάχους 2-3 καρπών στον ήλιο επί 3-4 ημέρες. Η ξήρανση στον ήλιο (φυσική ξήρανση), έχει το μειονέκτημα ότι διαρκεί πολλές ημέρες και τα φιστίκια εκτίθενται σε μη ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος, με διακύμανση θερμοκρασίας και υγρασίας, έρχονται σε επαφή με σκόνη, ακόμα και έντομα, αν δεν τηρηθούν οι κανόνες υγιεινής. Εναλλακτικά, η ξήρανση γίνεται με μηχανικό τρόπο, σε ξηραντήρια, σε θερμοκρασία 65°C επί 8 ώρες, με έκθεση των φιστικιών σε ρεύμα ζεστού και ξηρού αέρα. Ο αέρας αυτός, αφενός μεταφέρει την απαιτούμενη θερμότητα προκειμένου να εξατμιστεί το νερό από τα φιστίκια, αφετέρου απομακρύνει τους υδατμούς που παράγονται από την εξάτμιση του νερού. Στους αποξηραμένους καρπούς, το ποσοστό υγρασίας είναι <7% (Ferguson *et al.*, 2005b) ενώ η σχέση βάρους αποξηραμένων προς νωπούς με φλούδα καρπούς υπολογίζεται σε 40:100.



(α)



(β)

Σχήμα 4. (α) Συγκομιδή φιστικιάς με ράβδισμα των δένδρων (Αίγινα, Αύγουστος 2010). (β) Αποφλοίωση κελυφωτού φιστικιού σε ηλεκτροκίνητο μηχανήμα με νερό.

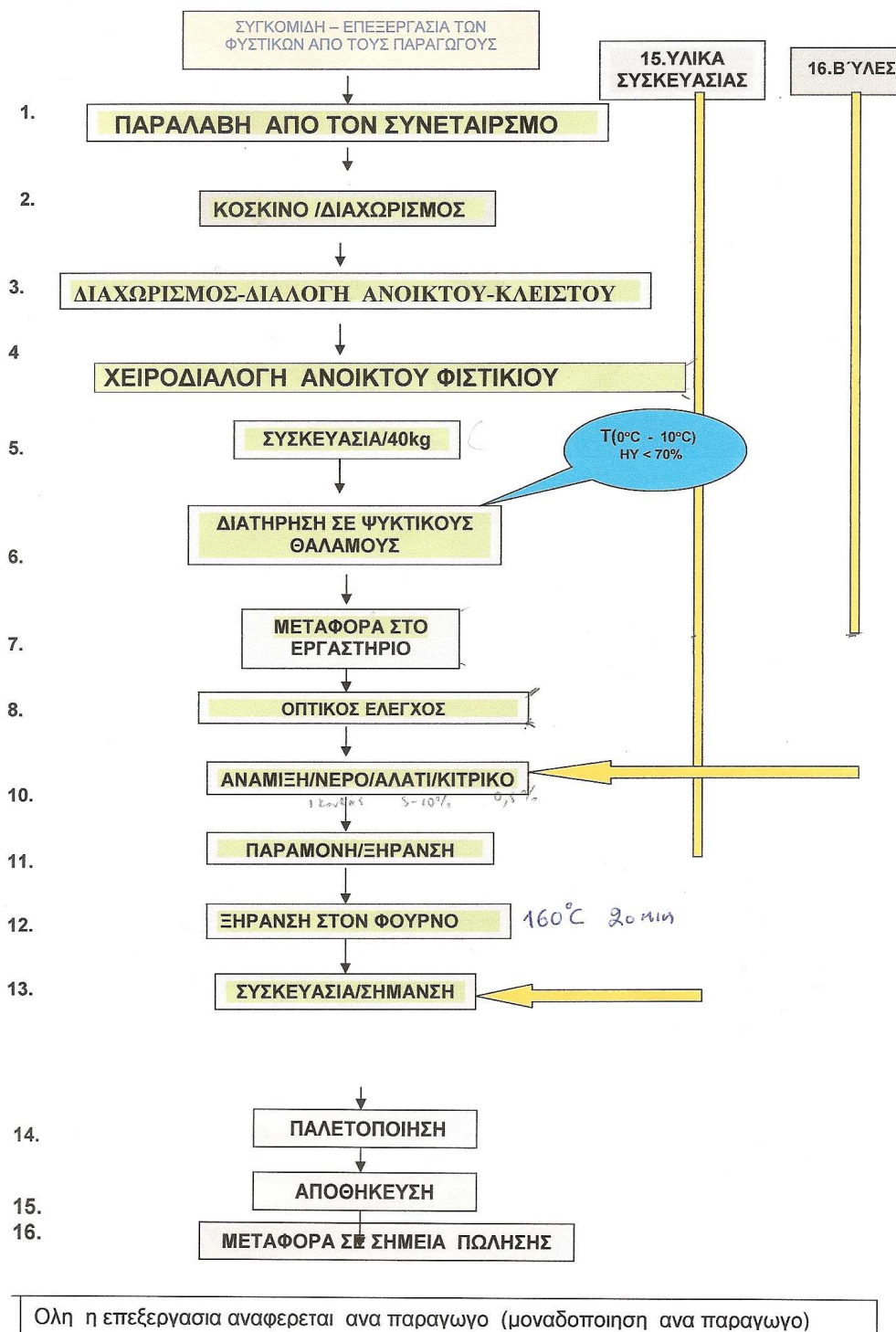
Στη συνέχεια, τα αποξηραμένα φιστίκια πρέπει να αποθηκεύονται σε αποθήκες-ψυγεία, όπου εφαρμόζονται όλες οι καλές πρακτικές υγιεινής, με σχολαστικότητα. Η χαμηλή θερμοκρασία και οι συνθήκες υγιεινής είναι απαραίτητες ώστε να εμποδίζεται η ανάπτυξη των μυκήτων, ειδικότερα αυτών που παράγουν αφλατοξίνη (Olsen, 1999; Georgiadiou *et al.*, 2012a). Πριν από την μακροχρόνια αποθήκευση γίνεται απομάκρυνση των κλειστών φιστικιών είτε με το χέρι, για μικρές ποσότητες, είτε με ειδικά τύμπανα συλλεκτικών βελονών, αλλά και διαλογή (με το χέρι ή μηχανικά), όλων των ελαττωματικών καρπών. Στη βιομηχανική πρακτική κατά την αποθήκευση των φιστικιών γίνεται απεντόμωση με φωσφίνη.

Πριν την τελική συσκευασία, γίνεται η τελική επεξεργασία του φιστικιού, η οποία περιλαμβάνει το ψήσιμο και το αλάτισμα (Σχήμα 5), ανάλογα με τον τύπο του τελικού προϊόντος (ελαφρώς ή κανονικά αλατισμένο, ελαφρώς ή κανονικά ψημένο). Αρχικά, τα φιστίκια ζεσταίνονται για 15 λεπτά σε φούρνο, σε θερμοκρασία 70°C και έπειτα όπως είναι ζεστά, τοποθετούνται σε διάλυμα άλμης 5-10% και κιτρικού οξέος (0.5%) για 15 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται η άλμη και ξηραίνονται σε φούρνο στους 160 °C για 20 λεπτά. Στο Σχήμα 6 απεικονίζονται συνοπτικά, όλα τα στάδια επεξεργασίας του φιστικιού, από την παραλαβή του προϊόντος μέχρι και τη διανομή, όπως πραγματοποιείται σε γενικές γραμμές στην Ελλάδα. Στοιχεία για τον τρόπο επεξεργασίας του προϊόντος στις Η.Π.Α. περιγράφονται με λεπτομέρεια στη μελέτη των Ferguson *et al.*, 2005b.



Σχήμα 5. Ανάμιξη φιστικιών με άλμη και κιτρικό οξύ και ψήσιμο στο φούρνο με κυλιόμενο ιμάντα. (Αγροτικός Συνεταιρισμός Φιστικοπαραγωγών Αίγινας).

**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ
ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΑΙΓΙΝΗΣ**



Σχήμα 6. Διάγραμμα ροής από την επεξεργασία φιστικιών Αιγίνης. (Στοιχεία από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Φιστικοπαραγωγών Αίγινας.)

1.1.6. Χρήση – Θρεπτική αξία

Η μεγαλύτερη ποσότητα φιστικιών διατίθεται στην κατανάλωση με το κέλυφος, αλατισμένα και ψημένα. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μεγάλη ζήτηση φιστικιών ψημένων, αλλά μη αλατισμένων, λόγω επιθυμίας των καταναλωτών για μειωμένη πρόσληψη αλατιού, αλλά και νωπών φιστικιών με τη φλούδα. Εμπορικά διαθέσιμη είναι και η ψίχα (σπέρμα) του φιστικιού, η οποία προέρχεται από τους κλειστούς καρπούς μετά από μηχανικό σπάσιμο. Σαν ψίχα χρησιμοποιείται κυρίως στη ζαχαροπλαστική (παγωτά, πάστες, ζαχαρωτά φιστίκια, μαντολάτα κλπ.) και στην αλλαντοποιία. Οι καρποί όταν είναι ακόμα τρυφεροί, χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γλυκού του κουταλιού ενώ το έλαιο των φιστικιών μπορεί να απομονωθεί και να χρησιμοποιηθεί ως εδώδιμο.

Πολλές μελέτες αναφέρονται στη χημική σύσταση των κελυφωτών φιστικιών, από διάφορες ποικιλίες και χώρες προέλευσης, όπως της Kerman, η οποία καλλιεργείται κυρίως στις Η.Π.Α. (Shokraii, 1977; Kader *et al.*, 1982), για ποικιλίες από την Τουρκία και το Ιράν (Agar *et al.*, 1995; Yildiz *et al.*, 1998; Okay, 2002; Küçüköner & Yurt, 2003; Satil *et al.*, 2003; Seferoglu *et al.*, 2006), ιταλικές ποικιλίες (Arena *et al.*, 2007), καθώς και για τις ελληνικές ποικιλίες Αιγίνης και Ποντικής (Zakynthinos & Rouskas, 1995; Tsantili *et al.*, 2010). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χημική σύσταση μπορεί να διαφοροποιείται μεταξύ των ποικιλιών, αλλά και να επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι κλιματικές συνθήκες της περιοχής που καλλιεργείται, η σύσταση του εδάφους, ακόμα και οι ίδιες οι καλλιεργητικές πρακτικές. Παρ'όλα αυτά, όλα τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι είναι πλούσια πηγή λιπών και ειδικότερα ακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το λινολενικό, τα οποία είναι απαραίτητα για τη διατροφή του ανθρώπου. Περιέχει επίσης μεταλλικά άλατα όπως Ca, Mg, K, P, Cu, βιταμίνες A, B1, B2, B6, τοκοφερόλες, σκουαλένιο, φυτοστερόλες και αμινοξέα, όπως η λυσίνη και η αργινίνη (Venkatachalam & Sathe, 2006). Σε μια συγκριτική μελέτη του λίπους διαφόρων ξηρών καρπών (Ryan *et al.*, 2006), το κελυφωτό φιστίκι έδειξε να έχει την υψηλότερη ποσότητα σε ολικές τοκοφερόλες και φυτοστερόλες, ενώ κατείχε τη δεύτερη θέση μετά το πεκάν στην περιεκτικότητα ακόρεστων λιπαρών οξέων έναντι των κορεσμένων (90.7%). Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων, μαζί με τους υπόλοιπους καρπούς, δικαίως κατέχει σημαντική θέση στη μεσογειακή διατροφή. Η χημική σύσταση των κελυφωτών φιστικιών της ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης», αποτελεί και μέρος της παρούσας διατριβής, οπότε περισσότερα στοιχεία δίδονται στο σχετικό Κεφάλαιο 3. Ενδεικτικά στοιχεία για τη σύσταση και θρεπτική αξία των φιστικιών παρατίθενται στους Πίνακες 4 και 5.

Πίνακας 4. Χημική σύσταση φιστικιών και θρεπτική αξία (Ferguson *et al.*, 2005b).

Συστατικό	Περιεκτικότητα ανά 100g ψίχας
Ύδωρ(g)	5.6
Πρωτεΐνες (g)	19.6
Λίπη (g)	53.2
Υδατάνθρακες (g)	19.0
Ίνες (g)	2.2
Τέφρα (g)	3.0
Σάκχαρα (g)	6.1
Θερμίδες	594
Ακόρεστα/κορεσμένα λιπαρά οξέα	8.1
Βιταμίνες:	
A (I.U.)	230
Θειαμίνη (mg)	0.67
Νιασίνη (mg)	1.4
Βιταμίνη C (mg)	0
Ανόργανα στοιχεία (mg)	
Ca	131
P	500
Fe	7.3
K	972
Mg	158

Πίνακας 5. Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης» (Καν.1263/96).

Συστατικό	Περιεκτικότητα ανά 100g ψίχας
Πρωτεΐνες (g)	19.5
Λίπη (g)	53.6
Υδατάνθρακες (g)	19.4
Θερμίδες	594

1.2. Οι αφλατοξίνες

1.2.1. Ιστορικά – Στατιστικά στοιχεία

Οι αφλατοξίνες αποτελούν την πιο συχνή ομάδα μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Αναμφίβολα είναι οι πιο μελετημένες μυκοτοξίνες, λόγω της ευρείας παρουσίας τους σε πολλά αγροτικά προϊόντα σε όλο τον κόσμο, όπως τα δημητριακά (καλαμπόκι, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, αλεύρι σίτου), τα όσπρια (φασόλια), τους ξηρούς καρπούς (αραχίδα, κελυφωτά φιστίκια, αμύγδαλα, καρύδια κ.α.), το σόργο, τα σύκα, τα αποξηραμένα φρούτα, τα μπαχαρικά, τα αυγά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τη μύρα κ.α. (Smith, 1997; Yu *et al.*, 2008).

Η πρώτη αναφορά στη μόλυνση με αφλατοξίνες τοποθετείται το 1960, όταν στη Μεγάλη Βρετανία, περισσότερες από 100000 γαλοπούλες (ασθένεια X) πέθαναν λόγω μόλυνσης από τοξικούς μεταβολίτες μυκήτων (Baker & Bennett, 2008). Η αιτία της ασθένειας αποδόθηκε σε ένα συστατικό της διατροφής τους, τις αραχίδες, οι οποίες είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *Aspergillus flavus*, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται σε αυτόν τον καρπό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του (Raper & Fennel, 1965). Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής αποκάλυψε μία σειρά φθοριζουσών ουσιών, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως μυκοτοξίνες και στη συνέχεια μετονομάστηκαν σε αφλατοξίνες. Παρόμοια περιστατικά μυκοτοξίκωσης προκλήθηκαν τον επόμενο χρόνο (1961) σε βοοειδή και χοίρους, οι οποίοι είχαν επίσης διατραφεί με μολυσμένη αραχίδα (Raper & Fennel, 1965). Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α., παρατηρήθηκε μία έξαρση καρκίνου του ήπατος σε πέστροφες, η οποία αργότερα αποδόθηκε στο μολυσμένο με αφλατοξίνες βαμβακόσπορο, ο οποίος περιλαμβανόταν στα συστατικά της διατροφής των ψαριών (Yu *et al.*, 2008).

1.2.2. Παθογόνα αίτια

Τα τρόφιμα αποικίζονται από ένα μεγάλο αριθμό μυκήτων, κάποιοι από τους οποίους παράγουν μυκοτοξίνες (μυκοτοξικογόνα στελέχη), όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές, με αποτέλεσμα τη μόλυνση του τροφίμου (Pittet, 2005). Οι αφλατοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται από μύκητες της ομάδας *Aspergillus section Flavi* και κυρίως από τα είδη *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Ωστόσο, και άλλα είδη ασπεργίλλων είναι ικανά να παράγουν αφλατοξίνες, όπως οι *Aspergillus nomius*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus pseudoamarii* της ομάδας *Flavi*, καθώς και οι *Aspergillus ochraceoroseus*, *Aspergillus rambelii*, της ομάδας *Ochraceorosei* (Amaiike & Keller, 2011). Από τα παραπάνω είδη, ο μύκητας *Aspergillus*

nomius αναφέρεται ως ισχυρά τοξικογόνο είδος (Kurtzman *et al.*, 1987), αλλά σπάνια απομονώνεται από γεωργικά εδάφη και αγροτικά προϊόντα, όπως δείχνουν οι σχετικές μελέτες επισκόπησης (Ehrlich *et al.*, 2007; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2006; Fiebelman *et al.*, 1998). Λόγω του ότι οι παραπάνω μύκητες βρίσκονται στο έδαφος, αλλά και σε φυτικά υπολείμματα, μεταφέρονται εύκολα με τον αέρα, τα έντομα και τα σταγονίδια της βροχής, με συνέπεια να ανιχνεύονται πολύ συχνά στα τρόφιμα μαζί με τις τοξίνες που παράγουν κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό (Pittet, 2005).

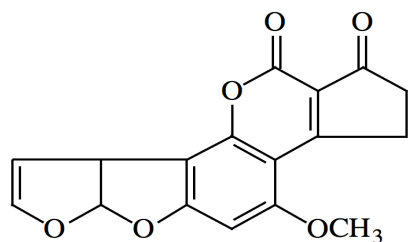
Οι κύριες αφλατοξίνες, οι οποίες εντοπίζονται στα φυτικά προϊόντα είναι οι B₁, B₂ και G₁, G₂. Λόγω του ότι οι τέσσερις αυτές βασικές αφλατοξίνες απομονώθηκαν αρχικά από καλλιέργειες του *A. flavus*, τα πρώτα γράμματα του μύκητα ('A' και 'fla') χρησιμοποιήθηκαν για την ονομασία αυτών των τοξινών (Yu *et al.*, 2008). Τα ζωϊκά προϊόντα επιμολύνονται μέσω της διατροφής των ζώων. Ειδικότερα, στα γαλακτοκομικά προϊόντα συναντώνται οι μεταβολίτες (υδροξυλιωμένα παράγωγα) M₁ και M₂ των B₁, B₂, G₁ και G₂ (Battilani, 2010). Στην πορεία των ερευνών, από καλλιέργειες των *A. flavus* και *A. parasiticus* απομονώθηκαν και άλλες αφλατοξίνες, όπως οι P₁, Q₁, B_{2A} και G_{2A}, οι οποίες όμως παράγονται σε μικρότερες ποσότητες (Yu *et al.*, 2008).

1.2.3. Φυσικές και χημικές ιδιότητες αφλατοξινών

Από χημική άποψη, οι αφλατοξίνες είναι μία ομάδα υψηλά οξυγονωμένων ετεροκυκλικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, διαλυτές σε ελαφρά πολικούς ή μέτρια πολικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη, το διμέθυλο-σουλφοξείδιο, η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο (Jaimez *et al.*, 2000). Αυτή η χαρακτηριστική τους φυσική ιδιότητα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εκχύλισης του δείγματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης. Πρόκειται για παράγωγα διφουρανοκουμαρίνης που παράγονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυκετιδίων (Bennett & Klich, 2003). Οι υψηλά συζευγμένες και σταθερές ρίζες στη δομή τους, προσδίδουν την ιδιότητα του φθορισμού στο υπεριώδες φως (UV), σε μπλε ή πράσινο χρώμα. Αυτό είναι το χαρακτηριστικό, το οποίο διακρίνει τις B (blue) από τις G (green) αφλατοξίνες (Jaimez *et al.*, 2000; Bennett & Klich, 2003).

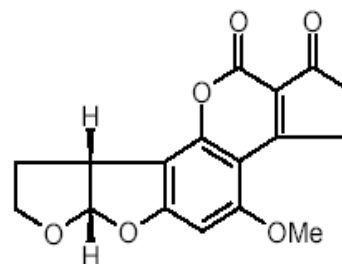
Η χημική δομή των αφλατοξινών φαίνεται στο Σχήμα 7. Όπως είναι εμφανές, μεταξύ των τεσσάρων υπάρχουν μικρές διαφοροποιήσεις στη δομή τους. Στις αφλατοξίνες B₁ και G₁ υπάρχει ένας διπλός δεσμός στον τερματικό φουρανικό δακτύλιο, ο οποίος δεν υπάρχει στις B₂ και G₂. Ωστόσο, η μικρή αυτή διαφορά στη χημική τους δομή σχετίζεται με μία πολύ σημαντική αλλαγή στη δράση τους: οι αφλατοξίνες B₁ και G₁ είναι πολύ πιο

τοξικές από τις B₂ και G₂, οι οποίες αποτελούν τα δι-υδροπαράγωγά τους (Jaimez *et al.*, 2000). Αντίθετα, τα B₂ και G₂ παράγωγα φθορίζουν πολύ πιο ισχυρά απ'ότι τα ακόρεστα ομόλογά τους B₁ και G₁ (Jaimez *et al.*, 2000). Επιπλέον, οι αφλατοξίνες B₁ και B₂ εκπέμπουν μπλε φθορισμό στα 425 nm, ενώ οι αφλατοξίνες G₁ και G₂ εκπέμπουν πράσινο φθορισμό στα 450 nm. Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά σταθερές απουσία φωτός, ακόμα και σε θερμοκρασίες πάνω από 100 °C (Jaimez *et al.*, 2000).



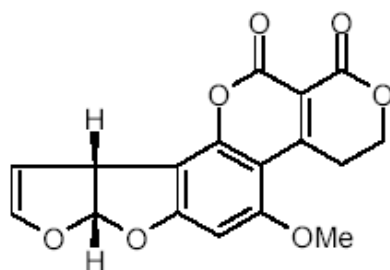
AFB₁

www.aspergillusflavus.org/aflatoxin/



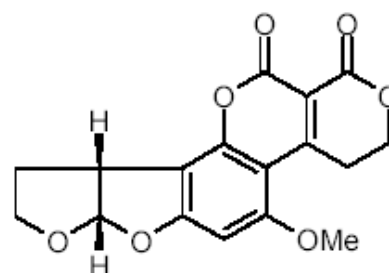
AFB₂

www.fermentek.co.il/struct/aflatoxin_b2.png



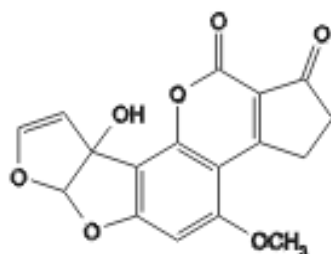
AFG₁

www.fermentek.co.il/struct/aflatoxinG1.png



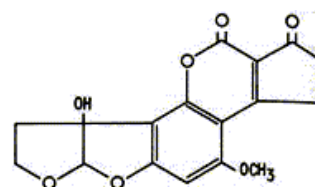
AFG₂

www.fermentek.co.il/struct/aflatoxin_G2.png



AFM₁

www.axxora.com/toxins-ALX-630-095/opfa.1.1.AL



AFM₂

www.fermentek.co.il/aflatoxin_M2.htm

Σχήμα 7. Χημικοί τύποι αφλατοξινών B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂.

Η ανίχνευση των αφλατοξινών εργαστηριακά, βασίζεται στην ιδιότητα φθορισμού τους στο UV. Οι επικρατέστερες και επίσημες μέθοδοι ανάλυσης περιλαμβάνουν αναλύσεις με TLC (Thin Layer Chromatography), με HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) και με ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Η επίσημη μέθοδος, η οποία ακολουθείται από τα διαπιστευμένα εργαστήρια ανάλυσης αφλατοξινών είναι η HPLC, η οποία χρησιμοποιείται και για ποσοτική ανάλυση. Οι υπόλοιπες μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως για ποιοτική ανάλυση (TLC) ή για μια άμεση και ταχεία ένδειξη πιθανής μόλυνσης σε «ύποπτα» δείγματα (ELISA) (Gilbert & Anklam, 2002).

1.2.4. Επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων

Η παρουσία των αφλατοξινών είναι ανεπιθύμητη στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, διότι μπορεί να προκαλέσουν πολύ σοβαρά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Τοξικολογικές μελέτες τις κατατάσσουν ως ουσίες υψηλής τοξικότητας με μεταλλαξιγόνο, καρκινογόνο και τερατογόνο δράση σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών (Massey *et al.*, 1995). Επίσης, ταξινομούνται ως ο πιο σημαντικός μη-μολυσματικός, χρόνιος παράγοντας διατροφικού κινδύνου, υψηλότερος από τα συνθετικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Yu *et al.*, 2008). Από όλες τις αφλατοξίνες, η Β₁ είναι η πιο τοξική. Σε μελέτες αναφέρεται ως ισχυρά καρκινογόνος ουσία, η οποία επάγει τη δημιουργία όγκων στο ήπαρ, στα νεφρά, στους πνεύμονες και στο παχύ έντερο (Liu & Wu, 2010).

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τις αφλατοξίνες έχουν τη γενική ονομασία «αφλατοξίκωση». Η αφλατοξίκωση είναι το αποτέλεσμα της μόλυνσης από χορήγηση μεσαίας έως υψηλής δόσης αφλατοξίνης μέσω της τροφής (Yu *et al.*, 2008). Η οξεία αφλατοξίκωση προκαλεί θάνατο, ενώ η χρόνια αφλατοξίκωση προκαλεί καρκίνο, καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλες αργής εξέλιξης παθολογικές καταστάσεις (Massey *et al.*, 1995). Περιπτώσεις οξείας τοξικότητας με θανατηφόρο κατάληξη έχουν αναφερθεί στην Κένυα (1981–1982, 2001, 2004–2006, 2008), στην Ινδία (1974, 397 περιστατικά, 108 θάνατοι), στη Μαλαισία και στην Ταϊλάνδη (Farombi, 2006; Baker & Bennett, 2008; Amaike & Keller, 2011; Obade *et al.*, 2015). Στην περίπτωση της Κένυας, τον Ιούλιο του 2004 καταγράφηκαν 317 περιστατικά οξείας αφλατοξίκωσης από κατανάλωση καλαμποκιού μολυσμένου με αφλατοξίνη και 125 άνθρωποι οδηγήθηκαν στο θάνατο (Probst *et al.*, 2010). Έξαρση αφλατοξίκωσης με θανατηφόρα επίσης αποτελέσματα καταγράφηκε σε κατοικίδια ζώα (σκύλοι) στις Η.Π.Α.

το 1998, το 2005 και το 2006, λόγω κατανάλωσης μολυσμένης ζωοτροφής (Stenske *et al.*, 2006). Ασθένειες οι οποίες έχουν συνδεθεί με την παρουσία αφλατοξινών στον οργανισμό είναι το Σύνδρομο Reye (συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας σε παιδιά) και η γνωστή ως «Ινδική» παιδική κίρρωση (Adams & Moss 2008). Αξιοσημείωτη είναι η πιθανή σύνδεση του ιού της ηπατίτιδας Β με την παρουσία αφλατοξίνης στο διαιτολόγιο, ως αιτία ανάπτυξης καρκίνου του ήπατος. Παρατηρήθηκε ότι ο σχετικός κίνδυνος είναι πολύ υψηλότερος όταν συνυπάρχουν και οι δύο παράγοντες (Bennett & Klich, 2003).

1.2.5. Νομοθεσία

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, για λόγους ασφάλειας και δημόσιας υγείας, κρίθηκε απαραίτητο να ληφθούν νομοθετικά μέτρα, ώστε να περιοριστεί η περιεκτικότητά τους στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Γι' αυτό το λόγο, οι αφλατοξίνες έχουν αναγνωριστεί και νομοθετικά ως επιμολυντές των τροφίμων (Καν. ΕΚ 1881/2006) και έχουν τεθεί μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα συγκέντρωσης ανά κατηγορία τροφίμων και ζωοτροφών, λαμβάνοντας υπ' όψιν και την πιθανή έκθεση των πιο ευαίσθητων ομάδων του πληθυσμού (βρέφη, παιδιά, ανοσοκατεσταλμένοι). Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχει θεσπίσει μέγιστη τιμή συγκέντρωσης στα κελυφωτά φιστίκια, τα οποία προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα, τα 8.0 μg/kg (ppb) για την Β₁ και 10.0 μg/kg (ppb) για το άθροισμα των Β₁, Β₂, G₁ και G₂ (ΚΑΝ ΕΕ 165/2010). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων, λαμβάνονται υπ' όψιν και συνεργάζονται πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και υπηρεσίες, όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency on Research on Cancer – IARC) και η Κοινή Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων του FAO/WHO (JECFA). Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα (SCF). Εντούτοις, αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών διεθνών φορέων, παρατηρούνται διαφορετικά ανώτατα επιτρεπτά όρια ανάμεσα στα κράτη για το ίδιο τρόφιμο, προκαλώντας προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, σε βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών (Van Egmond & Jonker, 2005).

Από την ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζεται ότι εφαρμόζοντας μηχανική διαλογή ή άλλες φυσικές διαδικασίες είναι δυνατόν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως: στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο (ΚΑΝ ΕΚ 1881/2006). Έτσι, προκειμένου να μειωθούν

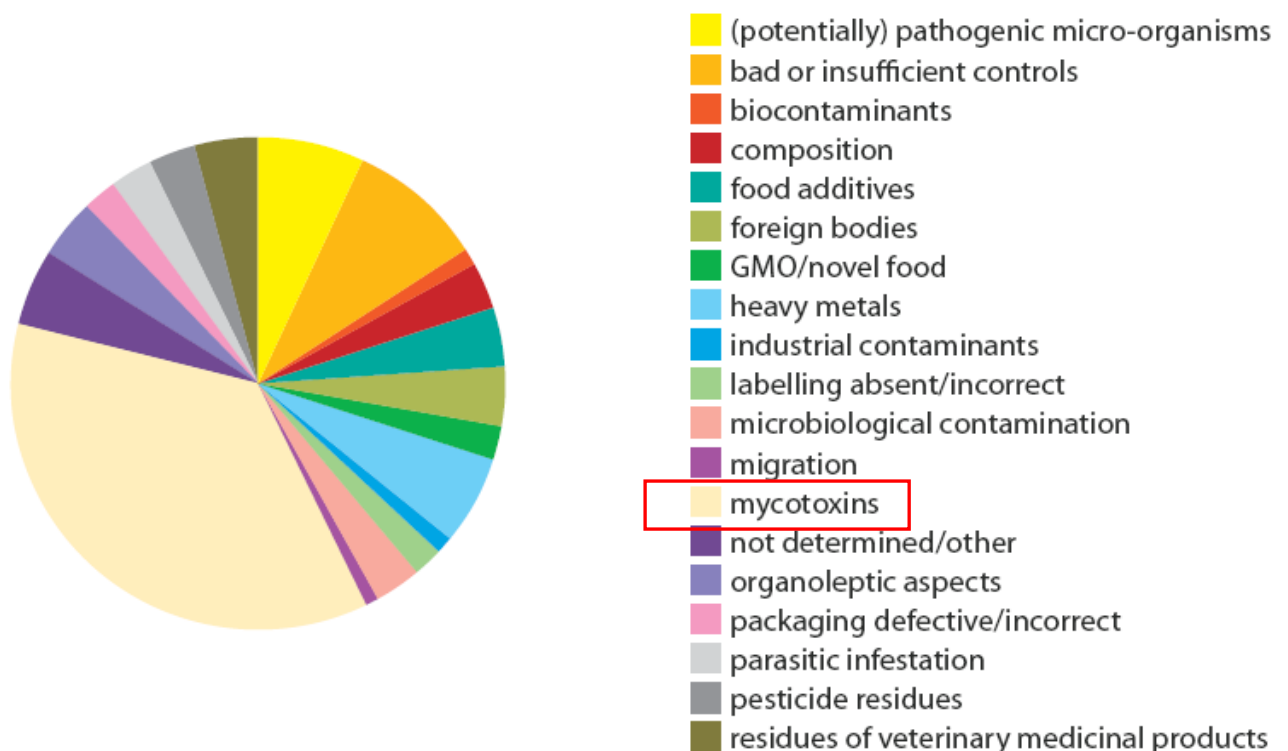
οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες αφλατοξίνης για τα προαναφερόμενα προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων. Επομένως, σε παρτίδες που ανιχνεύθηκαν αφλατοξίνες μέσα σε προσαυξημένα όρια (για τα κελυφωτά φιστίκια έχουν καθοριστεί στα 10.0 μg/kg για την B₁ και 15.0 μg/kg για το άθροισμα των B₁, B₂, G₁ και G₂), σημαίνονται κατάλληλα, οδηγούνται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία και επανελέγχονται. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης με τα θεσπισμένα όρια, η ευρωπαϊκή νομοθεσία χαρακτηρίζει τα τρόφιμα αυτά ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση, αποσύρονται και καταστρέφονται. Απαγορεύεται επίσης να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά σε άλλα τρόφιμα, να αναμειγνύονται με καθαρά από αφλατοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνσή τους.

1.2.6. Οικονομικές επιπτώσεις από τη μόλυνση με αφλατοξίνες

Η μόλυνση των γεωργικών προϊόντων με αφλατοξίνη είναι ένα μακροχρόνιο κοινό πρόβλημα, σε πολλές παραγωγικές χώρες του κόσμου, με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις σε όλη την αλυσίδα παραγωγής (πρωτογενής παραγωγή, επεξεργασία – μεταποίηση), αλλά και στη διανομή. Τα στοιχεία από το Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές της Ευρωπαϊκής Ένωσης (RASFF) δείχνουν ότι η μόλυνση με αφλατοξίνες είναι η πιο συχνή αίτια απόρριψης φορτίων με τρόφιμα, στα σημεία εισόδου της ΕΕ, συγκριτικά με τους υπόλοιπους χημικούς κινδύνους (Σχήμα 8). Επιπλέον, ο αριθμός προειδοποιήσεων που αφορά τις αφλατοξίνες είναι σαφώς μεγαλύτερος σε σχέση με τις υπόλοιπες μυκοτοξίνες (Πίνακας 6). Στην ετήσια έκθεση του RASFF του 2012, αναφέρεται ότι οι ξηροί καρποί αποτελούν την πρώτη από πλευράς συχνότητας κατηγορία τροφίμων στην οποία ανιχνεύονται αφλατοξίνες, δεύτερη είναι η κατηγορία των αποξηραμένων φρούτων και λαχανικών και τρίτη οι ζωοτροφές (Πίνακας 7).

Πίνακας 6. Αριθμός προειδοποιήσεων για επικίνδυνο φορτίο λόγω παρουσίας μυκοτοξινών, από το 2004 έως το 2013. (Στοιχεία από το RASFF).

Hazard	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Aflatoxins	839	946	801	705	902	638	649	585	484	341
Deoxynivalenol (DON)				10	4	3	2	11	4	8
Fumonisin	14	2	15	9	2	1	3	4	4	7
Ochratoxin A	27	42	54	30	20	27	34	35	32	54
Patulin		6	7		3					
Zearalenone			1	6	2				4	
Total mycotoxins	880	996	878	760	933	669	688	635	528	410



Σχήμα 8. Απορρίψεις φορτίων με τρόφιμα, στα σημεία εισόδου της ΕΕ, ανά κατηγορία κινδύνου (Στοιχεία 2009 – RASFF).

Πίνακας 7. Αριθμός προειδοποιήσεων για τις μυκοτοξίνες ανά κατηγορία προϊόντος (Στοιχεία 2012 – RASFF Annual Report).

Product Category	Aflatoxins	Deoxynivalenol (DON)	Fumonisin	Ochratoxin A	Zearalenone
Cereals And Bakery Products	17	4	4	6	3
Confectionery	7			1	
Feed	79				
Fruits And Vegetables	137			19	1
Herbs And Spices	33			4	
Milk And Milk Products	5				
Nuts, Nut Products And Seeds	204				
Prepared Dishes And Snacks	2			2	
Total	484	4	4	32	4

Λόγω του ότι ο αριθμός των προϊόντων τα οποία είναι δυνατό να μολυνθούν με αφλατοξίνες είναι μεγάλος, η ζημιά εκτιμάται σε πολλά δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο (CAST, 2003; Yu *et al.*, 2008). Σύμφωνα με οικονομικές μελέτες των Η.Π.Α., η ετήσια ζημιά λόγω μόλυνσης των προϊόντων με αφλατοξίνες έχει υπολογιστεί: (α) στην αραχίδα, \$25 εκ. για την Πολιτεία της Τζόρτζια, (β) στον αραβόσιτο \$15 εκ. για την Πολιτεία του Τέξας και \$2 εκ. για την Πολιτεία του Μισσισιππή, (γ) στο βαμβακόσπορο \$4.3 εκ. για την Πολιτεία της Αριζόνα και \$7 εκ. για την Πολιτεία του Τέξας, (δ) στα καρύδια \$3.87 εκ. και στα αμύγδαλα από \$2.3 έως \$4.7 εκ. για την Πολιτεία της Καλιφόρνια (Rubens & Cardwell, 2005). Όσον αφορά τις αναπτυσσόμενες χώρες στην Ασία και Αφρική, οι αντίστοιχες οικονομικές μελέτες δεν είναι διαθέσιμες. Ωστόσο, σε μία μελέτη ανασκόπησης του προβλήματος των μυκοτοξινών στην Αφρική, περιγράφεται με λεπτομέρεια και σαφήνεια η οξύτητα του προβλήματος σε αυτή την ήπειρο, όπου η οικονομική διάσταση του ζητήματος, αν και χαρακτηρίζεται «τεράστια» από τους συγγραφείς, είναι ήσσονος σημασίας, συγκρίνοντας τις απώλειες παιδιών και ενηλίκων από μολυσμένες με αφλατοξίνες τροφές (Wagacha & Muthomi, 2008).

1.3. Οι ασπέργιλλοι

1.3.1. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus*

1.3.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Βασίλειο: Fungi / Φύλο: Ascomycota / Τάξη: Eurotiales / Οικογένεια: Moniliaceae /
Γένος: *Aspergillus*

Λίγοι μύκητες είναι τόσο σημαντικοί όσο τα είδη του γένους *Aspergillus* (Baker & Bennett, 2008). Τα χαρακτηριστικά τους έχουν μεγάλο παθολογικό, γεωργικό, βιομηχανικό, φαρμακευτικό, επιστημονικό και καλλιεργητικό ενδιαφέρον. Αναφέρονται από την αρχαία Ελλάδα (Νίκανδρος ο Κολοφώνιος, 185 π.Χ.) ως και στην Εβραϊκή Βίβλο (Λευιτικό, Κεφ.13-14) (Raper & Fennel, 1965). Η πρώτη γνωστή αξιοποίηση των ασπεργίλλων ήταν στην Κίνα, πριν από 2000 χρόνια περίπου, για την ενίσχυση της γεύσης του ρυζιού, της σόγιας και άλλων φυτικών προϊόντων, υποστηρίζοντας έτσι, την περαιτέρω ζύμωσή τους από ζύμες και βακτήρια (Baker & Bennett 2008).

Η επιστημονική μελέτη των ασπεργίλλων, αλλά και των άλλων μυκήτων ξεκίνησε αμέσως μετά την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* πρωτοαναφέρθηκαν το 1729 από τον Ιταλό βοτανολόγο Pier A. Micheli (1679-1737) στο «Nova Plantarum Genera» (Raper & Fennel, 1965). Ο Micheli ήταν ο πρώτος που διέκρινε τις χαρακτηριστικές κονιδιοφόρους κεφαλές του γένους αυτού και λόγω του ότι ήταν ιερέας, ονόμασε αυτούς τους μύκητες ασπέργιλλους, από το λατινικό *aspergillum*, το σκεύος που η Ρωμαιοκαθολική Εκκλησία χρησιμοποιούσε στους αγιασμούς (αγιαστούρα) και με το οποίο προσομοίασε τις αποικίες του μύκητα (Bennett & Klich, 1992). Ήδη από τα μέσα του 19ου αιώνα, οι ασπέργιλλοι άρχισαν να αναγνωρίζονται ως παθογόνα του ανθρώπου και των ζώων και ως δραστικοί παράγοντες στις διαδικασίες ζύμωσης και αποσύνθεσης των βιολογικών υλικών. Το 1901 τελικά, οι μύκητες αυτοί πήραν οριστική θέση ως ξεχωριστό γένος από τον Wehmer (Raper & Fennel, 1965).

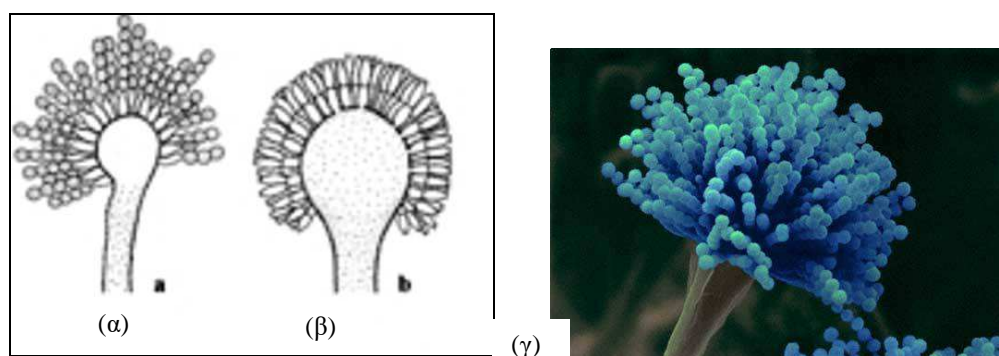
1.3.1.2. Μορφολογία

Τα είδη του γένους *Aspergillus* είναι μυκηλιακοί μύκητες και η ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους βασίζεται στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Η τέλεια μορφή αναφέρεται για μερικά μόνο είδη του γένους αυτού και ανήκει στα γένη *Eurotium* (Τζάμος, 2007) και *Petromyces* (Amaiike & Keller, 2011). Τα περισσότερα είδη θεωρούνται ατελείς μορφές και δεν έχει παρατηρηθεί η εγγενούς αναπαραγωγής (τέλεια) μορφή τους. Το γένος *Aspergillus* χαρακτηρίζεται από πολυκύτταρο υαλώδες ή ανοικτού

χρώματος μυκήλιο με υφές πλούσια διακλαδιζόμενες, το οποίο είναι εν μέρει εναέριο και εν μέρει βυθισμένο εντός του υποστρώματος. Οι κονιδιοφόροι είναι μη διακλαδιζόμενοι, σχηματίζονται από μυκηλιακή υφή και στην κορυφή τους σχηματίζουν μια χαρακτηριστική διόγκωση σφαιροειδούς, ροπαλοειδούς ή ωοειδούς σχήματος. Στο επάνω μέρος της διογκώσεως αυτής, φέρονται τα φιαλίδια του μύκητα, είτε απ' ευθείας είτε επάνω σε στηρίγματα, σε μία (uniseriate) ή σε δύο σειρές (biseriate) (Σχήμα 9α,β). Τα φιαλίδια παράγουν τα φιαλιδοσπόρια, δηλαδή τα κονίδια, τα οποία είναι μονοκύτταρα σφαιρικά ή ωοειδή με λεία ή ανώμαλη επιφάνεια και σχηματίζουν αλυσίδες (Σχήμα 9γ). Το χρώμα της εξάνθισης ποικίλλει από είδος σε είδος και κυμαίνεται από λευκό, κίτρινο, πράσινο, κυανό, καφέ ή μαύρο (Δημακοπούλου, 2009). Ωστόσο, τα είδη *Aspergillus* κατατάσσονται σε δύο μεγάλες ταξινομικές ομάδες με βάση το χρώμα της εξάνθισης (α) *Aspergillus* section *Flavi* όταν η εξάνθιση είναι κιτρινοπράσινη και (β) *Aspergillus* section *Nigri* όταν η εξάνθιση είναι σκούρα μαύρη.

1.3.1.3. Οικολογία – Χρήσεις

Το γένος *Aspergillus* περιλαμβάνει περισσότερα από 200 είδη, κυρίως σαπρόφυτα, αλλά και ασθενή παράσιτα, τα οποία προκαλούν προβλήματα κυρίως κατά τη διακίνηση και την αποθήκευση διαφόρων προϊόντων (Amaiike & Keller, 2011). Περίπου 20 είδη έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν προβλήματα και στον άνθρωπο με τη μορφή λοιμώξεων (ασπεργιλλώσεις), αλλεργιών (π.χ. τουμπερκούλωση) και τοξικών (π.χ. αφλατοξίκωση) (Adams & Moss, 2008). Είναι ευρέως διαδεδομένοι και συχνά απαντώμενοι στη φύση, διότι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε πολλές και διαφορετικές πηγές άνθρακα, εμφανίζοντας μια καταπληκτική θρεπτική ευελιξία (Baker & Bennett, 2008).



Σχήμα 9. Κονιδιοφόρος του μύκητα του γένους *Aspergillus* με φιαλίδια (α) σε μία σειρά και (β) σε δύο σειρές, (γ) απεικόνιση κονιδιοφόρου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

http://www.springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007_978-90-481-2408-4_2-1

Αυτή η μεγάλη και κοσμοπολίτικη ομάδα μυκήτων έχει ένα σημαντικό ρόλο στο οικοσύστημα, διότι εμπλέκεται στην αποδόμηση ενός μεγάλου εύρους φυσικών οργανικών υποστρωμάτων, ιδιαίτερος φυτικών υλικών (Raper & Fennel, 1965). Έχουν απομονωθεί από το έδαφος, από φυτικά υπολείμματα, από τον ατμοσφαιρικό αέρα εσωτερικών και εξωτερικών χώρων και από διάφορες άλλες πηγές, όπως στα καύσιμα αεροσκαφών, σε αιγυπτιακές μούμιες, πλαστικά προϊόντα κ.α.

Η ποικιλία των ενζύμων και των οργανικών οξέων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως θρεπτικά συστατικά, συμπληρώνεται από την μεταβολική τους ικανότητα να εκκρίνουν πολλούς χαμηλού μοριακού βάρους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι θεωρείται ότι έχουν το ρόλο χημικών σημάτων επικοινωνίας μεταξύ τους, αλλά και με άλλους μικροοργανισμούς (Spraker *et al.*, 2014). Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν αντιβιοτικά, μυκοτοξίνες, ανοσοκατασταλτικά και παράγοντες μείωσης της χοληστερόλης (Bennett, 1985). Δύο από τις πιο σημαντικές ενώσεις δευτερογενούς μεταβολισμού των ασπεργίλλων είναι η λοβαστατίνη και η αφλατοξίνη. Η πρώτη συνεισφέρει θετικά στην ανθρώπινη ζωή διότι χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία της υπερ-χοληστερολαιμίας, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο καρδιακών προσβολών ενώ η δεύτερη θεωρείται μία από τις πιο ισχυρές καρκινογόνες ουσίες (Baker & Bennett, 2008). Πολλές βιομηχανικές διεργασίες βασίζονται σε διάφορα είδη του γένους *Aspergillus*. Οι ασπέργιλλοι είναι σημαντικοί στη βιομηχανία οινοπνευματωδών, στη φαρμακοβιομηχανία και στην ενζυμική βιομηχανία. Πολλά ένζυμά τους έχουν απομονωθεί και έχουν ευρεία βιομηχανική χρήση (π.χ. αμυλάσες). Μία άλλη σημαντική χρήση των ασπεργίλλων στη βιομηχανία είναι η παραγωγή κιτρικού οξέος (Baker & Bennett, 2008). Για δεκαετίες πλέον, το είδος *A. niger* θεωρείται το βιολογικό εργοστάσιο παραγωγής κιτρικού οξέος για μαζική παραγωγή και χρήση του στη βιομηχανία αναψυκτικών και ποτών.

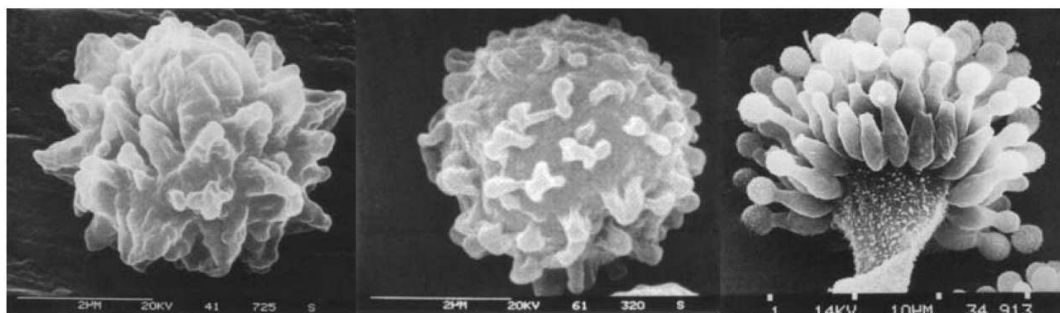
1.3.2. Η ομάδα *Aspergillus section Flavi*

1.3.2.1. Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των ειδών εντός της ομάδας *Flavi*

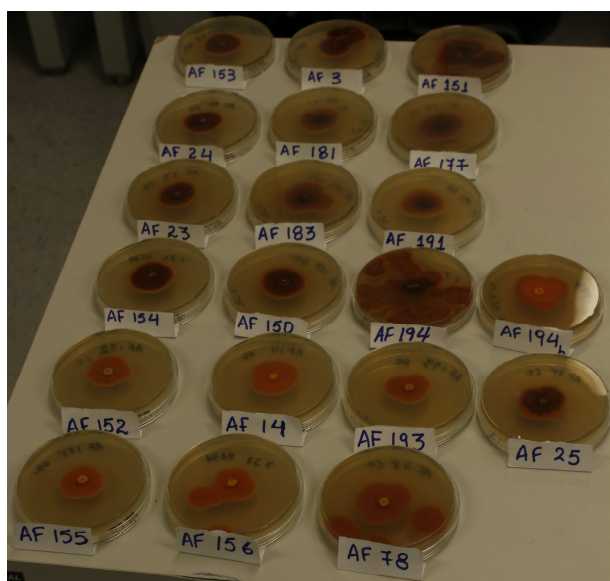
Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των ειδών εντός της ομάδας *Aspergillus Section Flavi* έχει παραδοσιακά βασιστεί στη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Δεδομένης όμως της πολυπλοκότητας που εμφανίζει το γένος φαινοτυπικά, η ταυτοποίηση αποδεικνύεται ένα πολύ δύσκολο έργο, το οποίο απαιτεί χρόνο και εμπειρία. Γι'αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια διάφορες δημοσιευμένες μελέτες ταξινόμησης του γένους *Aspergillus* χρησιμοποιούν μοριακές μεθόδους αναλύοντας τα

δεδομένα αλληλούχισης του DNA και του RNA των ειδών και ελέγχουν τις φυλογενετικές ομοιότητες μεταξύ των διαφόρων ειδών (Peterson, 2008). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά στα οποία βασίζεται η ταξινόμηση των ειδών, διακρίνονται σε μακρο-μορφολογικά και μικρο-μορφολογικά (Rodrigues *et al.*, 2009). Στα μακρο-μορφολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται το χρώμα του μυκηλίου και των κονιδίων (αγενή σπόρια), η μέση διάμετρος της αποικίας, το αντίστροφο χρώμα της αποικίας, η παραγωγή εκκριμάτων ή/και διαλυτών χρωστικών, η παρουσία σκληρωτίων και κλειστοθηκίων. Αντίστοιχα, ο χαρακτηρισμός με βάση τα μικρο-μορφολογικά χαρακτηριστικά αναφέρεται στα σχετικά μήκη των κονιδιοφόρων, στην τοποθέτηση των φιαλιδίων επάνω στις κονιδιοφόρους κεφαλές (Σχήμα 9), στο σχήμα και στο μέγεθος των φιαλιδίων, στην παρουσία των κυττάρων Hülle, αλλά και στη μορφολογία των κονιδίων, των κλειστοθηκίων και των ασκοσπορίων (Rodrigues *et al.*, 2007). Ειδικά για τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus*, τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, περιγράφονται με λεπτομέρεια και σαφήνεια στο βιβλίο των Χιτζανίδου *et al.*, 2004. Στο Σχήμα 10, απεικονίζονται κονίδια από τους μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus*, καθώς και ο κονιδιοφόρος του τελευταίου.

Λόγω της ιδιαιτερότητας της ομάδας των Flavi να παράγουν αφλατοξίνες, προβάλλεται επιπρόσθετα η αναγκαιότητα διαχωρισμού των ειδών σε τοξικογόνα και μη-τοξικογόνα είδη ή στελέχη. Ο παραπάνω διαχωρισμός, παράλληλα με τον προσδιορισμό του είδους επιτυγχάνεται με τη χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων, εκμεταλλευόμενοι ορισμένες βιοχημικές αντιδράσεις (π.χ. αλλαγή χρώματος της αποικίας) των ειδών της ομάδας με συστατικά του υποστρώματος (Rodrigues *et al.*, 2007). Τέτοια εκλεκτικά υποστρώματα, τα οποία ευρέως χρησιμοποιούνται είναι: (α) το *Aspergillus flavus* and *parasiticus* differentiation άγαρ (AFPA) (Σχήμα 11α) (β) το coconut cream άγαρ (CCA) (Σχήμα 11β) (γ) το Czapek Dox agar (CZ) και (δ) το 5-2 άγαρ (Σχήμα 12).



Σχήμα 10. Απεικόνιση των αγενών σπορίων (κονίδια) (α) του *Aspergillus parasiticus* και (β) του *Aspergillus flavus*, με σαφείς τις διαφορές στο σχήμα και την υφή και (γ) κονιδιακή κεφαλή του *Aspergillus parasiticus*. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Rodrigues *et al.*, 2007).



Σχήμα 11. (α) Διαχωρισμός των ειδών *A. flavus* και *A. parasiticus* στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα AFPA. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην ανάπτυξη πορτοκαλί χρώματος στις αποικίες των προαναφερόμενων ειδών, ο οποίος είναι εμφανής αναποδογυρίζοντας το τριβλίο ανάπτυξης (Pitt *et al.*, 1983). Στην παραπάνω εικόνα τα στελέχη που εμφανίζουν καφετί χρωματισμό χαρακτηρίστηκαν ως *Aspergillus tamaris* (Georgiadou *et al.*, 2012b). (β) Ανάπτυξη *A. flavus* σε CCA. Μετά από 7 ημέρες επώασης, τα αφλατοξικογόνα στελέχη εμφανίζουν μπλε φθορισμό σε φάσμα UV. Το μεγαλύτερο τριβλίο, το οποίο δε φθορίζει (μάρτυρας) περιέχει μη- τοξικογόνα στελέχη (Rodrigues *et al.*, 2007).



(α)

(β)

Σχήμα 12. (α) Καλλιέργειες *A. flavus* και (β) *A. parasiticus* όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα CZ και 5-2 άγαρ. Οι αποικίες του *A. flavus* περιγράφονται ως πρασινοκίτρινες ή πράσινες, ενώ σκούρες πράσινες (πράσινο του κισσού) του *A. parasiticus* (Klich, 2002). Στο ίδιο υπόστρωμα, το χρώμα της αποικίας του είδους *A. nomius* μοιάζει με αυτό του *A. flavus*, αλλά τα κονίδια του είναι πιο τραχιά (Kurtzman *et al.*, 1987). (<http://www.ars.usda.gov/research/docs.htm?docid=16816&page=3>)

(α)

(β)

(γ)

1.3.2.2. Κύκλος ασθένειας και επιδημιολογία του μύκητα *Aspergillus flavus*

Το είδος *A. flavus* είναι ο πιο συχνά απαντώμενος ασπέργιλλος στα γεωργικά προϊόντα και υπεύθυνος για τη μόλυνσή τους με αφλατοξίνη μαζί με τον *A. parasiticus*. Όπως όλα τα είδη του γένους *Aspergillus*, είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλο τον κόσμο, γεγονός που πιθανότατα προκύπτει από τα πολυάριθμα κονίδια (ξηροσπόρια) που παράγουν και τα οποία εύκολα μεταφέρονται με τον αέρα (πιθανώς και με τα έντομα) και μολύνουν τους εναέριους φυτικούς ιστούς (Hedayati *et al.*, 2007). Απομονώνονται από διάφορες κλιματικές ζώνες. Ο *A. flavus* βρίσκεται πιο συχνά σε υγρά και ζεστά κλίματα ενώ σπανιότερα σε γεωγραφικό πλάτος μεγαλύτερο από 45° (Cotty & Jaime-Garcia, 2007). Στο έδαφος βρίσκεται με τη μορφή σπορίων (κονίδια ή σκληρώτια), ενώ στους φυτικούς ιστούς με τη μορφή μυκηλίου. Τα σκληρώτια επιβιώνουν στο έδαφος για πολύ καιρό (έχουν βρεθεί και μετά από τρία χρόνια) και κάτω από ιδιαίτερα αντίξοες συνθήκες περιβάλλοντος (Payne & Yu, 2010; Amaike & Keller, 2011). Ανάλογη είναι και η οικολογία του είδους *A. parasiticus*, με τη διαφορά ότι έχει χαμηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής αφλατοξίνης και αυτό ίσως εξηγεί το γεγονός ότι συναντάται συχνότερα σε υπόγειους καρπούς π.χ. αραχίδα (Amaike & Keller, 2011).

Ο *Aspergillus flavus* είναι ένα μορφολογικά σύνθετο είδος, το οποίο έχει ταξινομηθεί σε δύο ομάδες, με βάση το μέγεθος των σκληρωτίων: L στελέχη (Ομάδα I) με διάμετρο σκληρωτίων >400 μm και τα S στελέχη (Ομάδα II) με διάμετρο σκληρωτίων <400 μm (Amaike & Keller, 2011). Και οι δύο ομάδες παράγουν τις αφλατοξίνες B₁ και B₂, αλλά τα S στελέχη (Ομάδα II) παράγουν και τις αφλατοξίνες G₁ και G₂. Ο μορφότυπος S θεωρείται πιο τοξικογόνος από τον L (Cotty, 1989). Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι τα στελέχη S διακρίνονται περαιτέρω σε δύο χημειο-τύπους: (α) τον S_{BG} τα στελέχη του οποίου παράγουν τις αφλατοξίνες B και G και (β) τον S_B, οι οποίοι παράγουν τις αφλατοξίνες B (Perrone *et al.*, 2014).

Από μυκητολογική άποψη, παρατηρούνται μεγάλες ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στην τοξικογόνο ικανότητα διαφόρων στελεχών του ίδιου είδους, γεγονός που αποδίδεται στο ότι η αφλατοξίνη είναι δευτερογενής μεταβολίτης του μύκητα (Amaike & Keller, 2011). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σπάνια επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων σε συνθήκες εργαστηρίου, αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στην οικολογία τους ως παράγοντες προσαρμογής (fitness factors), όπως προστασία από τις υπεριώδεις ακτίνες ή ως αποθητικές ουσίες των εχθρών τους (Amaike & Keller, 2011). Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η παραγωγή αφλατοξίνης είναι πολυάριθμοι. Γενικά, επίδραση έχει αναφερθεί από τις κλιματολογικές συνθήκες (υγρασία, θερμοκρασία, βροχοπτώσεις),

την καταλληλότητα του υποστρώματος ανάπτυξης (ενεργότητα νερού, pH), την ύπαρξη πληγών και τις συνθήκες αερισμού (O₂, CO₂) (Cotty & Jaime-Garcia, 2007). Ωστόσο, τα επίπεδα αφλατοξίνης είναι σταθερά εντός των φυλογενετικά συμβατών ομάδων (vegetative compatibility groups – VCGs) και γι' αυτό το λόγο, η ταυτοποίηση των μη-τοξικογόνων VCGs είναι απαραίτητη στην ανάπτυξη παραγόντων βιολογικού ελέγχου (Donner *et al.*, 2010).

Η μολυσματική ικανότητα αυτού του μύκητα συνδέεται στενά με διάφορους παράγοντες, όπως είναι η σποριοποίηση και ο δευτερογενής μεταβολισμός, η προσαρμοστικότητα σε αντίξοες συνθήκες και η παρεμπόδιση των μορίων-σημάτων στο σύστημα άμυνας του ξενιστή. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι οξυλιπίνες, μία ομάδα οξυγονωμένων ακόρεστων λιπαρών οξέων, οι οποίες προέρχονται από τις οξυγενάσες, εμπλέκονται στα συστήματα επικοινωνίας μεταξύ των μυκήτων, αλλά και ανάμεσα σε άλλους οργανισμούς (Tsitsigiannis & Keller, 2007). Στον *A. flavus* ειδικότερα, φαίνεται ότι ρυθμίζουν την παραγωγή σκληρωτίων και κονιδίων, τον δευτερογενή μεταβολισμό, αλλά επηρεάζουν και τις αλληλεπιδράσεις μύκητα - ξενιστή (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή των κονιδίων-σκληρωτίων στον *A. flavus* είναι η πυκνότητα του πληθυσμού. Σε μεγάλη πυκνότητα έχει παρατηρηθεί αύξηση της παραγωγής κονιδίων και μείωση της παραγωγής αφλατοξίνης (Horowitz *et al.*, 2008). Άλλοι παράγοντες, οι οποίοι συνδέονται με τη μολυσματική ικανότητα του μύκητα είναι η παρουσία ενζύμων αποικοδόμησης (α-αμυλάσες, πηκτινάσες, πρωτεάσες, λιπάσες) και τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα (Velvet complex). Αυτά σχετίζονται με την επιτυχία αποίκησης στον ξενιστή, αλλά έχουν και ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή σπορίων (κονίδια, σκληρώτια) και αφλατοξίνης (Amaiike & Keller, 2011).

Η προσβολή από το μύκητα και η επακόλουθη μόλυνση με αφλατοξίνη είναι δυνατό να συμβεί πριν ή / και μετά τη συγκομιδή (Olsen, 1999). Αυτό έδειξε και σχετική μελέτη στα κελυφωτά φιστίκια στην Ελλάδα (Voyatzidaki *et al.*, 2008; Georgiadou *et al.*, 2012a). Η αποίκηση ενισχύεται όχι μόνο όταν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά και από την παρουσία εντόμων και πουλιών. Οι τραυματισμοί και οι μηχανική ζημιά που προκαλούν στο φυτικό ιστό, αποτελούν τα σημεία εισόδου του μύκητα στο προϊόν (Payne & Yu, 2010). Σε διάφορες μελέτες έχει συσχετιστεί η αυξημένη προσβολή από το μύκητα και η υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης, με την παρουσία εντομολογικών προσβολών στα κελυφωτά φιστίκια (Doster & Michailides 1995; 1999; Georgiadou *et al.*, 2012a). Η μόλυνση μετά τη συγκομιδή είναι δυνατή λόγω

ακατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης (υψηλή θερμοκρασία, απουσία συνθηκών υγιεινής) (Cotty, 1997).

1.3.2.3. Γονιδιωματική του μύκητα *A. flavus*

Η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος του *A. flavus* δημοσιεύτηκε το 2005 από το Ινστιτούτο J.Craig Venter (πρώην Ινστιτούτο Έρευνας Γονιδιωματικής) και τα σχετικά δεδομένα είναι διαθέσιμα στην ιστοσελίδα [http:// www.aspergillusflavus.org/genomics](http://www.aspergillusflavus.org/genomics). Το μέγεθος του γονιδιώματος έχει υπολογιστεί στα 36.8 Mb και αποτελείται από περίπου 12.000 λειτουργικά γονίδια, πολλά εκ των οποίων αφορούν τον δευτερογενή μεταβολισμό (Amaike & Keller, 2011). Πιο συγκεκριμένα, έχουν ταυτοποιηθεί 25 συνθάσες πολυκετιδίου (PKS), μία από τις βασικές κατηγορίες ενζύμων για τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης (Throckmorton *et al.*, 2015). Αντίστοιχα, το γονιδίωμα του *A. parasiticus* δεν έχει αλληλουχηθεί, αλλά μελέτες καρυοτύπου δείχνουν ομοιότητα με τον *A. flavus* ως προς το μέγεθος (Amaike & Keller, 2011).

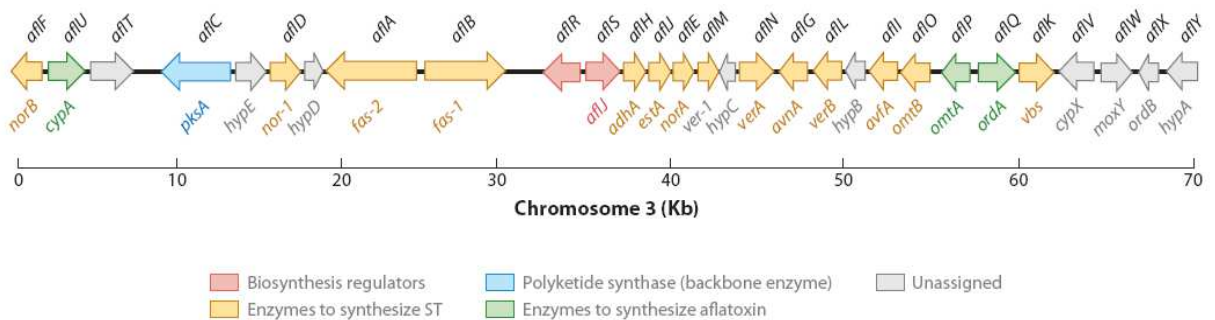
Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, βρίσκονται συνήθως σε δέσμες (clusters), οι οποίες περιέχουν ενζυμικά γονίδια (enzymatic genes) και παράγοντες μεταγραφής (transcriptional factors) (Throckmorton *et al.*, 2015). Η παραγωγή αφλατοξίνης συνδέεται με μία μεγάλη δέσμη γονιδίων κοντά στην τελομερική περιοχή του χρωμοσώματος 3 του *A. flavus* (Amaike & Keller, 2011). Σε όλο το γονιδίωμα έχουν ανιχνευθεί 55 δέσμες γονιδίων για το δευτερογενή μεταβολισμό, αλλά μόνο οι δέσμες που αφορούν τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης, κυκλοπιαζονικού οξέος (CPA) και αφλατρέμης (aflatrem) έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί (Keller *et al.*, 2005). Η δέσμη γονιδίων της αφλατοξίνης παρουσιάζεται στο Σχήμα 13.

Δέσμη γονιδίων για τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης έχει ανιχνευθεί και σε άλλα είδη *Aspergillus*, όπως στους *A. oryzae* και *A. sojae*. Σε αυτές τις περιπτώσεις όμως, περιλαμβάνονται μεταλλάξεις, διαγραφές και αναδιατάξεις, ιδιαίτερα στο τμήμα ρύθμισης της βιοσύνθεσης (*aflR*, *aflS*), με αποτέλεσμα να μην προκύπτει έκφραση των γονιδίων και παραγωγή αφλατοξίνης (Lee *et al.*, 2006). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία των γονιδίων *aflR* και *aflS* (*aflJ*), ο ρόλος των οποίων είναι η ενεργοποίηση του μηχανισμού της μετάφρασης και της ρύθμισης της βιοσύνθεσης, αντίστοιχα (Yu *et al.*, 2008) (Σχήμα 13). Διαταραχή του γονιδίου *aflR* οδηγεί στην απώλεια έκφρασης των γονιδίων της βιοσυνθετικής οδού και στη διακοπή παραγωγής αφλατοξίνης (Flaherty & Payne, 1997). Αντίστοιχα, η διαταραχή του γονιδίου *aflS* στον *A. flavus* είχε σαν αποτέλεσμα την αποτυχία παραγωγής αφλατοξίνης (Du *et al.*, 2007). Ωστόσο, θα πρέπει

να τονιστεί, ότι ένα σημαντικό ποσοστό από τα στελέχη του *A. flavus* στον αγρό δεν παράγουν αφλατοξίνες, ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την απώλεια αυτής της ικανότητας παραγωγής δεν είναι πλήρως κατανοητοί (Cotty & Bhatnagar, 1994). Στην παρουσία αυτών των μη-τοξικογόνων στελεχών βασίζεται η βιολογική στρατηγική μείωσης της αφλατοξίνης στο στάδιο πριν τη συγκομιδή (Cotty & Bayman, 1993), η οποία θα περιγραφεί λεπτομερέστερα στην § 1.4.1.3 του παρόντος κεφαλαίου.

1.3.2.4. Βιοσύνθεση αφλατοξίνης

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης είναι ένα από τα πιο μελετημένα μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων, λόγω των επιπτώσεών του στη δημόσια υγεία. Η συνεχής έρευνα του δευτερογενούς μεταβολισμού στους μύκητες, και ιδιαίτερα στις τάξεις των Βασιδιομυκήτων και των Ασκομυκήτων, έχει οδηγήσει στην απομόνωση και ταυτοποίηση ενός πολύ μεγάλου αριθμού φυσικών ουσιών, οι οποίες όχι μόνο δεν χαρακτηρίζονται πλέον ως «μεταβολικά απόβλητα», αλλά αποδεικνύονται ως ζωτικής σημασίας ενώσεις, τόσο για τη βιολογική δομή, όσο και για το μηχανισμό άμυνας και «επικοινωνίας» των οργανισμών αυτών (Lim & Keller, 2014). Η λειτουργία του δευτερογενούς μεταβολισμού απαιτεί έναν απρόσκοπτο και ορθολογισμένο συντονισμό όλων των μηχανισμών που εμπλέκονται (ένζυμα, συνεργιστές, ενδιάμεσες ενώσεις, τελικά προϊόντα), σε χωρικό και χρονικό επίπεδο, αλλά και ενσωμάτωση των



Σχήμα 13. Δέσμη γονιδίων αφλατοξίνης (aflatoxin cluster) στον *A. flavus*, η οποία αποτελείται από περίπου 30 διαφορετικά γονίδια. Στην επάνω πλευρά αναγράφεται η νέα ονομασία κάθε γονιδίου και στην κάτω πλευρά η παλαιά. Τα γονίδια *aflA*, *aflB* (συνθάσες του λιπαρού οξέος) και *aflC* (συνθάση πολυκετιδίου) απαιτούνται για τη σύνθεση του νορσολορινικού οξέος (NOR), της πρώτης σταθερή, πρόδρομης ουσίας στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης. Από το νορσολορινικό οξύ σχηματίζεται η στεριγματοκυστίνη (γονίδια με κίτρινο χρώμα) και στη συνέχεια η αφλατοξίνη (γονίδια με πράσινο χρώμα). Στα γονίδια με γκρι χρωματισμό δεν έχει αποδοθεί κάποια λειτουργία (Amaiike & Keller, 2011).

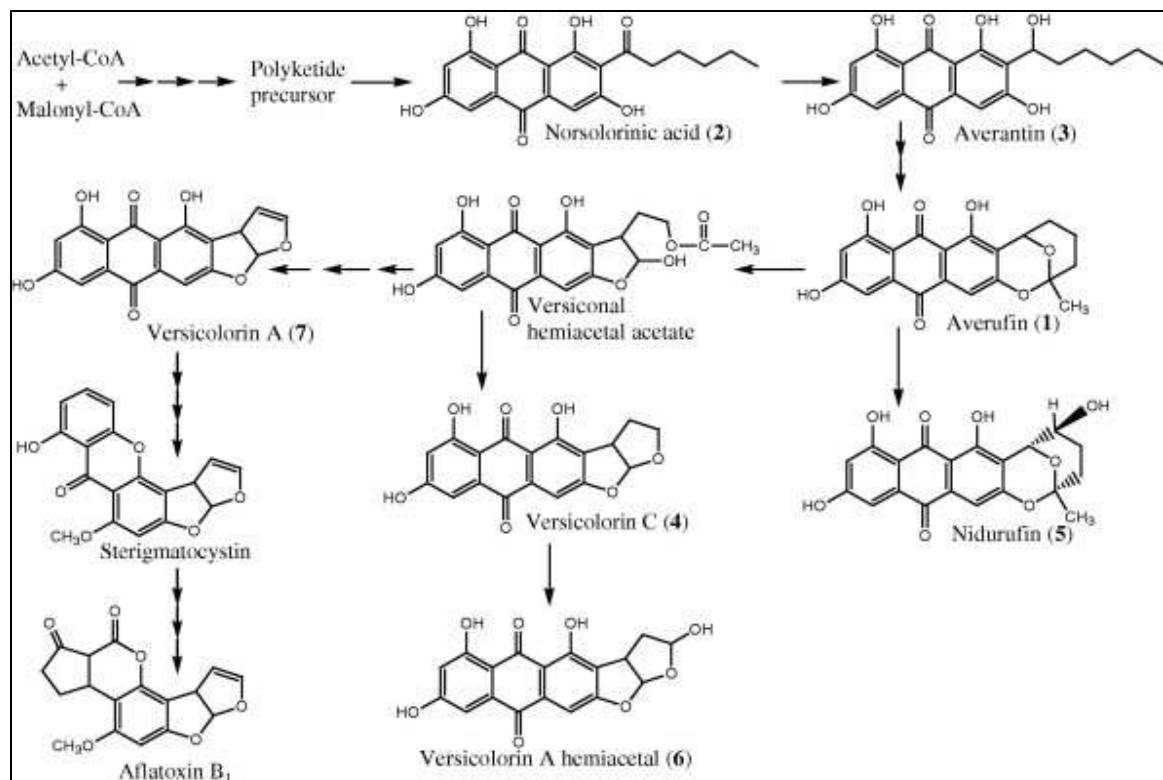
μηχανισμών αυτών στις πρωτογενείς μεταβολικές διεργασίες και τους εγκατεστημένους κυτταρικούς μηχανισμούς (Lim & Keller, 2014). Ωστόσο, δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστοί οι «μοριακοί διακόπτες», οι οποίοι ελέγχουν τη βιοσύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών, όπως είναι αφλατοξίνη.

Έχει αποδειχθεί, ότι η βιοσύνθεση της αφλατοξίνης περιλαμβάνει 23 τουλάχιστον ενζυμικές αντιδράσεις, ενώ παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 15 δομικά προσδιορισμένες ενδιάμεσες ενώσεις (Yu *et al.*, 2008). Στο Σχήμα 14 απεικονίζεται το πλήρες βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης, το οποίο, όπως φαίνεται και στο σχήμα ξεκινά από το ακετυλο-συνένζυμο Α (acyl-CoA). Στα 30 γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αφλατοξίνης βασίζεται η δημιουργία των ενώσεων, που προηγούνται του σχηματισμού των αφλατοξινών. Αυτά τα γονίδια δρουν απ' ευθείας ή κωδικοποιούν τα διάφορα ένζυμα, που εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης, όπως τις συνθάσες του πολυκετιδίου (polyketide synthases - PKSs), της χημικής τάξης στην οποία ανήκουν οι αφλατοξίνες (Throckmorton *et al.*, 2015). Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν διαθέσιμες μελέτες για την απομόνωση, τον καθαρισμό και χαρακτηρισμό των ενζύμων, τα οποία εμπλέκονται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης (Bhatnagar *et al.*, 1988; Bhatnagar & Cleveland, 1990; Chaturgoon *et al.*, 1990; Lin & Anderson, 1992; Keller *et al.*, 1993; Liu & Chu, 1997).

Χωρικά, ο βιοσυνθετικός μηχανισμός της αφλατοξίνης φαίνεται ότι πιθανότατα ξεκινά στα υπεροξεισωμάτια του κυτταροπλάσματος (Lim & Keller, 2014). Αυτά τα μικροσωμάτια, είναι μονομεμβρανικά σφαιρικά ή ωσειδή οργανύλλια, με διάμετρο από 0.1-1 μM και τα οποία εντοπίζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αρχικά, ήταν γνωστά για τη λειτουργία της αποτοξικοποίησης που επιτελούν στο κύτταρο (παραγωγή και αποδόμηση H_2O_2), λόγω του ότι φιλοξενούν οξειδοαναγωγάσες και καταλάσες, οι οποίες σχετίζονται με οξειδωτικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει μοριακό οξυγόνο. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες εμπλέκουν τα υπεροξεισωμάτια σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου και μεταβολικά μονοπάτια (π.χ. β -οξείδωση λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας), μεταξύ αυτών και στη βιοσύνθεση πολυκετιδίων (Lim & Keller, 2014). Από εκεί, σε υποκυττάριο επίπεδο, με διάφορους μηχανισμούς βιογένεσης κυστιδίων, η βιοσύνθεση αφλατοξίνης συνεχίζει σε εξειδικευμένα πολυ-λειτουργικά κυστίδια, όπως τα αφλατοξισωμάτια, τα οποία περιέχουν τα ένζυμα που εμπλέκονται στα διάφορα στάδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού (Roze *et al.*, 2011).

1.3.2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης

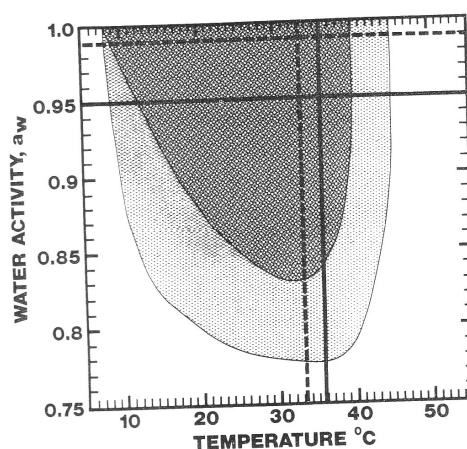
Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης από τα τοξικογόνα στελέχη των ασπεργίλλων. Γενικά, οι κλιματολογικές συνθήκες, η καταλληλότητα του υποστρώματος, η ευαισθησία του φυτικού ιστού και τα έντομα είναι οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή από μύκητες και η παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συλλογή (Hill *et al.*, 1983; Doster & Michailides, 1995). Σε κάθε περίπτωση, η παραγωγή αφλατοξίνης συνδέεται με παράγοντες που προκαλούν στρες (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια και άλλους μικροοργανισμούς) στους μύκητες (Moss & Frank, 1985). Σε μελέτες σε αραχίδα έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του στρες ξηρασίας και αυξημένης συγκέντρωσης αφλατοξίνης, ενώ η πιθανότητα γίνεται ακόμα μεγαλύτερη όταν συνδυάζονται και συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Hill *et al.*, 1985). Ωστόσο, πιο στρεσογόνος παράγοντας φαίνεται να είναι η ξηρασία, η οποία συνδυάζεται και με τη μειωμένη παραγωγή φυτοαλεξινών από την μεριά του φυτού (Hill *et al.*, 1983).



Σχήμα 14. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των αφλατοξινών. (<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S004520680500088X-gr2.jpg>)

Μετά τη συλλογή, τόσο η ανάπτυξη τοξικογόνων μυκήτων όσο και η ενδεχόμενη παραγωγή αφλατοξίνης επηρεάζονται από πλήθος παραγόντων, όπως είναι η υγρασία (ενεργότητα νερού), η θερμοκρασία και το pH του προϊόντος, η χρονική διάρκεια των διεργασιών που ευνοούν την ανάπτυξή τους, η υγεία του προϊόντος (ζημιές, ελαττώματα), οι συνθήκες αερισμού (επίπεδα O₂ και CO₂) και η παρουσία ή απουσία χημικών παρεμποδιστών (Moss & Frank, 1985). Η παραγωγή αφλατοξίνης στον *A. flavus* συσχετίζεται στενά με τις αλλαγές του pH, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται σε όξινα υποστρώματα, αλλά να παρεμποδίζεται σε αλκαλικά (Yu *et al.*, 2008). Η παρουσία μιας περιοχής (PacC) κοντά στο γονίδιο *aflR*, καθώς και άλλες περιοχές στα γονίδια *aflR-aflJ* (Σχήμα 13), φαίνεται να έχουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων από περιβαλλοντικά σήματα, όπως το pH και τα νιτρικά άλατα (Yu *et al.*, 2008).

Το εύρος των συνθηκών θερμοκρασίας (T) και ενεργότητας νερού (a_w) για την παραγωγή αφλατοξίνης είναι πιο περιορισμένο, από αυτό που απαιτείται για την ανάπτυξη του μύκητα (Hill *et al.*, 1985). Περιοριστικός παράγοντας για την προσβολή των φιστικιών από τους μύκητες αποτελεί η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία των σπερμάτων. Οι οριακές και βέλτιστες συνθήκες T και a_w για την ανάπτυξη των *A. flavus* και *A. parasiticus* έχουν προσδιοριστεί σε *in vitro* μελέτες και απεικονίζονται στο Σχήμα 15 (Hill *et al.*, 1985). Οι άριστες συνθήκες ανάπτυξης φαίνεται ότι είναι η θερμοκρασία 36°C και με ενεργότητα νερού (a_w) >0.95, ενώ σε θερμοκρασία < 8°C και a_w <0.77 οι μύκητες δεν αναπτύσσονται. Αντίστοιχα, η μέγιστη παραγωγή αφλατοξίνης παρατηρείται σε θερμοκρασία 33°C (από 28-35 °C) και με ενεργότητα νερού >0.95, ενώ σε ενεργότητα νερού κάτω από 0.83 δεν παράγεται αφλατοξίνη (Σχήμα 15).



Σχήμα 15. Επίδραση της θερμοκρασίας (T °C) και της ενεργότητας νερού (a_w) στην ανάπτυξη (βέλτιστες συνθήκες: μαύρες γραμμές, εύρος συνθηκών: σκιασμένη επιφάνεια) και παραγωγή αφλατοξίνης (βέλτιστες συνθήκες: διακεκομμένες γραμμές, εύρος συνθηκών: σκούρα επιφάνεια) *in vitro* από τους μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus*.

1.4. Στρατηγική αντιμετώπισης αφλατοξινών

1.4.1. Έλεγχος του προβλήματος πριν τη συγκομιδή

1.4.1.1. Προληπτικά μέτρα

Η πρόληψη, ως στρατηγική αντιμετώπισης του προβλήματος των αφλατοξινών επιτυγχάνεται σε δύο άξονες (α) προλαμβάνοντας τη μόλυνση (β) τροποποιώντας το περιβάλλον, ώστε να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των μυκήτων, άρα και η παραγωγή αφλατοξίνης. Στο πλαίσιο του πρώτου άξονα, περιλαμβάνεται η εφαρμογή κανόνων ορθής γεωργικής πρακτικής (σωστό κλάδεμα, ορθολογική άρδευση, λίπανση), οι οποίοι στοχεύουν στη διατήρηση της καλής υγείας του προϊόντος και στην αποφυγή πρακτικών που ευνοούν τη διασπορά και αποίκηση του μύκητα στην καλλιέργεια. Σημαντικό ρόλο παίζει η προστασία των δένδρων και των καρπών από ασθένειες και εχθρούς, διότι οι καρποί που φέρουν ζημιές από έντομα ή άλλα μηχανικά αίτια έχουν συνδεθεί με την παρουσία του μύκητα και με υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης (Doster & Michailides, 1995; Georgiadou *et al.*, 2012a). Η απομάκρυνση ή βαθειά ενσωμάτωση στο έδαφος φυτικών υπολειμμάτων (π.χ. φλοιός φιστικιών, φύλλα, ζιζάνια) προτείνεται σαν μέτρο που μειώνει δραστικά τον αριθμό σπορίων των μυκήτων στο χωράφι (Olsen 1999; Abbas *et al.*, 2009). Η συγκομιδή των καρπών θα πρέπει να γίνεται έγκαιρα, ώστε να μην υποβαθμίζεται ποιοτικά ο καρπός και γίνεται ευάλωτος σε μολύνσεις από τους ασπέργιλλους. Τα αποτελέσματα από προηγούμενη μελέτη έδειξαν ότι ο πληθυσμός των ασπεργίλλων στο φλοιό των κελυφωτών φιστικιών αυξανόταν σημαντικά, όσο ο καρπός ωρίμαζε (Tsitsigiannis *et al.*, 2010). Κατά τη συγκομιδή επίσης θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην έρχονται σε επαφή οι καρποί με το έδαφος και η αποφλοιώση να γίνεται άμεσα. Αν και η προστασία των καρπών από τους ασπέργιλλους δεν είναι εφικτή πάνω στο δένδρο, η εφαρμογή κάποιων μυκητοκτόνων σκευασμάτων έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική εναντίον των μυκήτων αυτών, αλλά η μείωση αφλατοξίνης δεν ήταν σημαντική (Abbas *et al.*, 2009).

1.4.1.2. Δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών

Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες ανάπτυξης ανθεκτικών ποικιλιών στις καλλιέργειες που προσβάλλονται από τον *A. flavus* (σιτηρά, καλαμπόκι, ρύζι, αραχίδα κ.α.). Ο στόχος είναι αυτές οι ποικιλίες να ανθίστανται στην εισβολή του μύκητα και στις προσβολές από έντομα, αλλά και να παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης, αναγνωρίζοντας κάποιες σχετικές πρωτεΐνες ή άλλους βιοχημικούς ή γενετικούς δείκτες

(Yu *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2009). Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η εμπορικά πλέον παραγωγή των διαγονιδιακών Bt (από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*) ποικιλιών καλαμποκιού και αραχίδας (Naidoo *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2005). Σε αυτά τα φυτά έχει ενσωματωθεί γονίδιο από το προαναφερόμενο βακτήριο και παράγεται μία πρωτεΐνη (αναφέρεται ως Cry πρωτεΐνη λόγω της κρυσταλλικής της δομής), η οποία είναι τοξική σε διάφορα έντομα (Weissinger *et al.*, 2002). Ωστόσο, μέχρι στιγμής, το επίπεδο ανθεκτικότητας που προσδίδεται δεν είναι ικανοποιητικό, ούτε η αποτελεσματικότητα αυτών των ποικιλιών σταθερή (Odvody *et al.*, 2000; Dowd, 2001, Munkvold, 2003; Abbas *et al.*, 2008). Ειδικά στα σιτηρά, το πρόβλημα είναι πιο σύνθετο, διότι απαιτείται ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε όλες τις μυκοτοξίνες που είναι πιθανοί κίνδυνοι (π.χ. ζεαραλενόνη) και όχι μόνο στις αφλατοξίνες. Η ανάπτυξη υβριδίων φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική, αλλά εμπορικά υβρίδια δεν είναι ακόμα διαθέσιμα (Abbas *et al.*, 2009).

1.4.1.3. Βιολογική καταπολέμηση

Η βιολογική καταπολέμηση περιλαμβάνει την εφαρμογή διαφόρων μη-αφλατοξικογόνων οργανισμών, όπως βακτήρια (Palumbo *et al.*, 2006; Dalie *et al.*, 2010), σαπροφυτικές ζύμες (Hua *et al.*, 1999; Δημακοπούλου, 2009; Antonopoulos *et al.*, 2012), μη-τοξικογόνα στελέχη του *Aspergillus* sc. *Flavi* (Cotty & Bayman, 1993; Abbas *et al.*, 2006; Pitt & Hocking, 2006; Atehnkengab *et al.*, 2008; Georgiadou *et al.*, 2012b) στο έδαφος της καλλιέργειας, με στόχο τη μείωση του πληθυσμού των τοξικογόνων στελεχών, λόγω ανταγωνισμού. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα είδη βακτηρίων (π.χ. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Flavobacterium*) και μυκήτων (π.χ. *Trichoderma*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Sporotrichum*) είτε αποτοξικοποιούν είτε αποικοδομούν την B₁ αφλατοξίνη (Tsitsigiannis *et al.*, 2012). Τα στελέχη τα οποία επιλέγονται για βιολογική καταπολέμηση θα πρέπει να ικανοποιούν δύο βασικά κριτήρια: να είναι γενετικά σταθερά έτσι ώστε να μην παράγουν αφλατοξίνη υπό οποιεσδήποτε συνθήκες, και δεύτερον, να είναι ανταγωνιστικά ώστε να επικρατούν των τοξικογόνων στελεχών (Cotty & Bayman, 1993).

Η εφαρμογή μη-τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus* στον αγρό έχει αποδειχθεί μία πολύ επιτυχημένη στρατηγική μείωσης της αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή. Ήδη, στις Η.Π.Α. διατίθενται εμπορικά σκευάσματα στη μορφή επενδυμένων σπόρων με κονίδια κατάλληλου μη-τοξικογόνου στελέχους, όπως το Afla-Guard με έγκριση για εφαρμογή σε καλλιέργεια αραχίδας και αραβοσίτου και το AF36 με έγκριση για εφαρμογή στο

βαμβάκι και τα κελυφωτά φιστίκια (Cotty & Bayman, 1993; Atehnkengab *et al.*, 2008). Αντίστοιχες προσπάθειες απομόνωσης, χαρακτηρισμού και αξιολόγησης ιθαγενών μυκοτοξικογόνων στελεχών του γένους *Aspergillus* ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης, πραγματοποιούνται και σε άλλες περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της Αφρικής (Donner *et al.*, 2010), της Ευρώπης (Battilani *et al.*, 2006) και της Ελλάδας (Tsitsigiannis *et al.*, 2010; Antonopoulos *et al.*, 2012; Georgiadou *et al.*, 2012b). Ειδικότερα για την περιοχή της Μεσογείου, στο άρθρο των Tsitsigiannis *et al.*, 2012 ανασκοπείται η προσπάθεια ανάπτυξης και εφαρμογής των στρατηγικών βιολογικής καταπολέμησης στις οικονομικά σημαντικές καλλιέργειες, για την αντιμετώπιση των μυκοτοξικογόνων μυκήτων και τη μείωση της συνολικής μυκοτοξίνης στα στάδια πριν τη συγκομιδή. Ωστόσο, σε κάθε τέτοια προσπάθεια, θα πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν η πληθυσμιακή διακύμανση των μυκοτοξικογόνων στελεχών, αλλά και οι μεταβολές στην επιδημιολογία τους, λόγω κλιματικής αλλαγής (Cotty & Jaime-Garcia, 2007).

1.4.2. Έλεγχος του προβλήματος μετασυλλεκτικά

1.4.2.1. Προληπτικά μέτρα

Λαμβάνοντας υπ'όψιν την οικολογία του μύκητα είναι κατανοητό ότι η παρουσία του είναι δεδομένη σε κάθε στάδιο. Συνεπώς, το πιο σημαντικό μέτρο πρόληψης μετασυλλεκτικά είναι η δημιουργία συνθηκών τόσο στο προϊόν, όσο και στο περιβάλλον επεξεργασίας και αποθήκευσης, οι οποίες θα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα και της αφλατοξίνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή κατάλληλων μεθόδων επεξεργασίας (ξήρανση, ζύμωση κ.α.) και τήρησης ορθών κανόνων υγιεινής κατά την αποθήκευση (συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας, υγιεινή, καθαριότητα, έλεγχος εντόμων αποθήκευσης) (Olsen, 1999). Πιο συγκεκριμένα, μετά την ξήρανση, η περιεκτικότητα σε υγρασία των καρπών πρέπει να είναι <7% , η οποία αντιστοιχεί σε $a_w < 0.65$. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 15, αυτή η τιμή της ενεργότητας είναι εκτός των ορίων ανάπτυξης αφλατοξίνης. Η πρόληψη, όπως περιγράφεται και γενικότερα στο πλαίσιο εφαρμογής ενός σχεδίου HACCP, πρέπει να περιλαμβάνει και συστήματα παρακολούθησης. Σε αυτή την περίπτωση, είναι αναγκαία η μέτρηση της υγρασίας των δειγμάτων μετά την ξήρανση και η καταγραφή της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας των χώρων αποθήκευσης.

1.4.2.2. Διαλογή

Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στον διαχωρισμό και την απόρριψη των καρπών που εμφανίζουν φυσιολογικά ελαττώματα, ζημιές από παθογόνα και παράσιτα ή γενικότερα των καρπών που δεν φέρουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας και δεν πληρούν τις ποιοτικές προδιαγραφές. Ο διαχωρισμός αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι διάφορες μελέτες σε προϊόντα όπως, καλαμπόκι (Huff, 1980; Huff & Hagler, 1982; Pearson & Wicklow, 2006), κελυφωτά φιστίκια (Pearson, 1996; Pearson & Schatzki, 1998; Pearson *et al.*, 2001), αμύγδαλα (Pearson, 1999; Pearson & Young, 2002), αραχίδα (Dickens & Whitaker, 1975) και σιτάρι (Pearson *et al.*, 2008) έχουν δείξει ότι, όταν τα προϊόντα δεν πληρούν τα κριτήρια ποιότητας, έχουν υψηλότερη πιθανότητα να είναι προσβεβλημένα από ασπέργιλλους και συνεπώς να είναι μολυσμένα με αφλατοξίνη (Doster & Michailides, 1995; 1999; Georgiadou *et al.*, 2012a). Γι' αυτό το λόγο, η μόνη διαδικασία που επιτρέπεται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία να εφαρμοστεί για μείωση της συγκέντρωσης αφλατοξίνης σε περίπτωση υπέρβασης του ανώτατου επιτρεπτού ορίου είναι η διαλογή, η οποία στοχεύει στην αφαίρεση των ελαττωματικών, με μη-τυπικά μακροσκοπικά χαρακτηριστικά καρπών, συντελώντας έμμεσα στη μείωση της συνολικής αφλατοξίνης στην παρτίδα.

Στα στάδια επεξεργασίας του φιστικιού και ειδικά κατά τη μηχανική αποφλοΐωση, ορισμένοι ελαττωματικοί καρποί αφαιρούνται με το νερό, διότι, λόγω χαμηλότερης πυκνότητας, επιπλέουν. Αντίθετα, οι φυσιολογικοί καρποί καταβυθίζονται. Αυτό το στάδιο είναι πολύ σημαντικό για το διαχωρισμό των κούφιων (χωρίς σπέρμα) καρπών και αυτών με μη καλά ανεπτυγμένο σπέρμα, λόγω φυσιολογικής ανωμαλίας ή προσβολής από έντομα. Στη συνέχεια, μετά την ξήρανση και πριν τη μακροχρόνια αποθήκευση του αποξηραμένου καρπού, εφαρμόζεται το στάδιο της διαλογής, στο οποίο όλοι οι ποιοτικά υποβαθμισμένοι καρποί (καρποί με μορφολογικές αλλοιώσεις, με μεταχρωματισμένο κέλυφος, μικρό μέγεθος, με παθολογικά ή εντομολογικά συμπτώματα) διαχωρίζονται και απορρίπτονται. Αυτή είναι μια κοινή, καλή βιομηχανική πρακτική, η οποία εφαρμόζεται είτε μηχανικά είτε με χειροδιαλογή και αποτελεί ένα κρίσιμο μέτρο για τη διασφάλιση της ποιότητας του προϊόντος.

Στην Ελλάδα, αυτό το στάδιο πραγματοποιείται με χειροδιαλογή, κατά την οποία, εξειδικευμένοι, κατάλληλα εκπαιδευμένοι και έμπειροι εργάτες, αναγνωρίζοντας τα εξωτερικά συμπτώματα, διακρίνουν και διαχωρίζουν τους ελαττωματικούς καρπούς. Ωστόσο, ζημιές ή συμπτώματα (π.χ. εσωτερικές νεκρωτικές κηλίδες), τα οποία δεν είναι ορατά στον ανθρώπινο οφθαλμό, δηλαδή δεν αφορούν ελαττώματα σε μακροσκοπικά

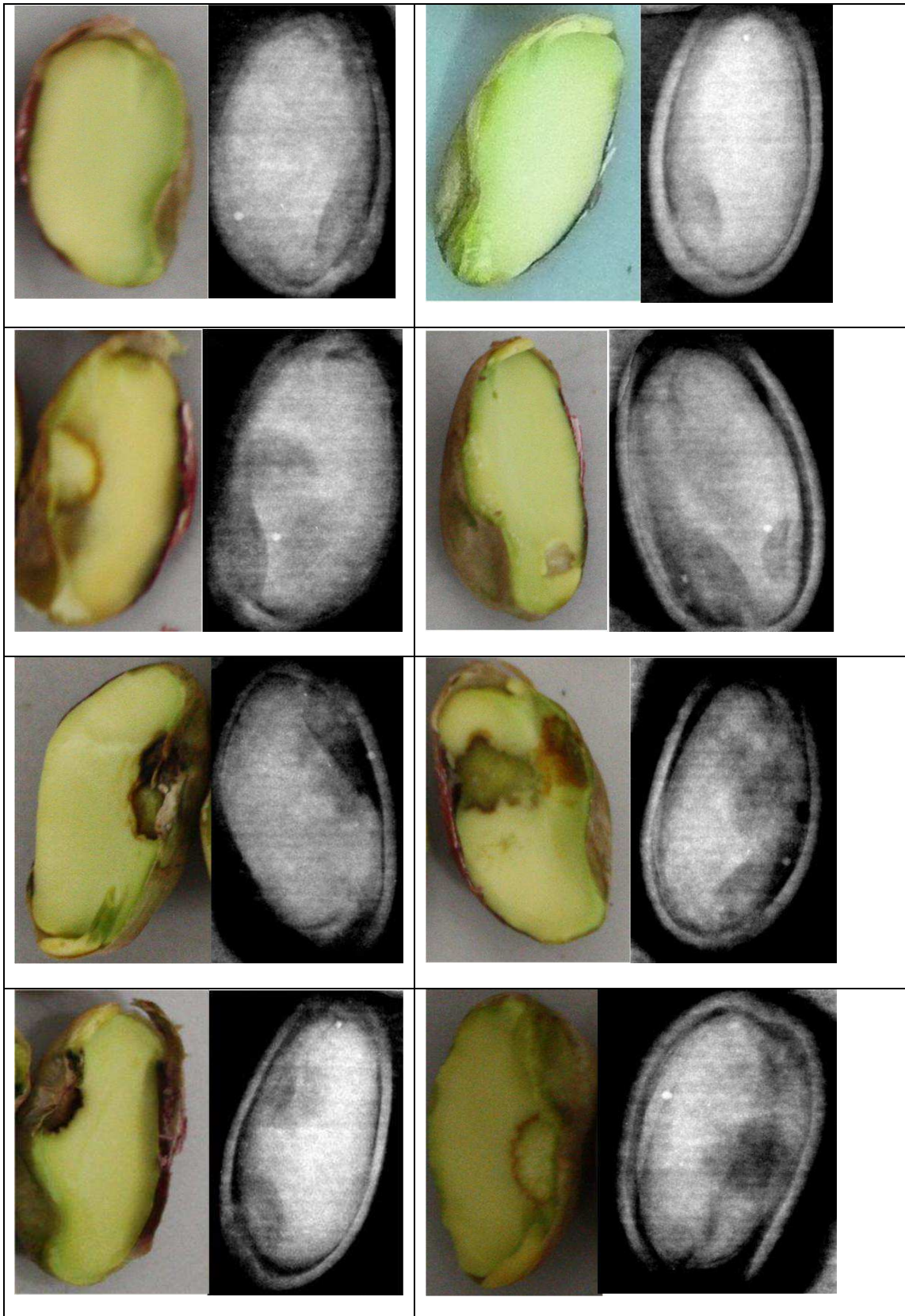
χαρακτηριστικά, δε μπορούν να εντοπιστούν ώστε να αφαιρεθούν. Σε αυτό το σημείο, προκύπτει η ανάγκη ανάπτυξης μηχανικών αυτόματων συστημάτων διαλογής, υψηλής ταχύτητας και αξιοπιστίας.

Ένα από τα πρώτα συστήματα αυτόματης διαλογής που αναπτύχθηκαν και διατίθεται εμπορικά μέχρι και σήμερα, λειτουργεί με λαμπτήρες του υπεριώδους φάσματος (UV), για την απόρριψη των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών, αξιοποιώντας την ιδιότητα των αφλατοξινών να φθορίζουν στο UV (360-435nm). Είναι το μόνο σύστημα διαλογής που στοχεύει άμεσα, στην απόρριψη μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών. Ωστόσο, η αξιοπιστία του έχει αμφισβητηθεί ιδιαίτερος, καθώς έχουν παρατηρηθεί αρκετές αστοχίες στην πράξη. Επιπλέον, ακόμα και τα πειραματικά αποτελέσματα από τις σχετικές μελέτες είναι αντιφατικά, διότι δεν αποδείχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις καλός συσχετισμός του φθορισμού με την παρουσία αφλατοξίνης, λόγω της ιδιότητας και άλλων ουσιών του υπάρχοντος να φθορίζουν στο ίδιο μήκος κύματος (McClure & Farsaie, 1980; Farsaie *et al.*, 1981; Steiner *et al.*, 1992; Hadavi, 2005). Από τη δεκαετία του '90, άρχισαν να σχεδιάζονται για τη βιομηχανία επεξεργασίας ξηρών καρπών, διάφορα αυτόματα, μηχανικά, μη-καταστροφικά συστήματα διαλογής για τον ποιοτικό έλεγχο (Toyofuku *et al.*, 2013). Αρχικά, αναπτύχθηκαν συσκευές που περιλάμβαναν ένα ή πολλαπλά αυτόματα οπτικά συστήματα επεξεργασίας εικόνας με ανίχνευση στο ορατό φάσμα, τα οποία με βάση τις φυσικές ιδιότητες (χρώμα) διαχώριζαν καρπούς με μεταχρωματισμούς ή «λερώματα» στο κέλυφος, καρπούς με προσκολλημένο τμήμα φλούδας στο κέλυφος και καρπούς με πρόωρο σχίσσιμο (Pearson, 1996; Pearson & Slaughter, 1996; Pearson & Schatzki, 1998; Pearson *et al.*, 2001). Επίσης, στις Η.Π.Α. έχει κατασκευαστεί σύστημα διαλογής κλειστών - ανοικτών καρπών και σπέρματος (ψίχας) από καρπούς με κέλυφος, το οποίο βασίζεται στην ηχητική τους διαφοροποίηση (acoustics-based sorting systems) κατά την πρόσκρουσή τους σε μεταλλική επιφάνεια (Pearson, 2001; Omid *et al.*, 2010; Haff & Pearson, 2007).

Πιο πρόσφατα, αναπτύχθηκαν και εφαρμόζονται στην πράξη, συστήματα διαλογής στο εγγύς υπέρυθρο φάσμα (NIR), μονής ή διπλής ζώνης, τα οποία στις Η.Π.Α. έχουν αντικαταστήσει τα προηγούμενα συστήματα επεξεργασίας εικόνας ορατού φάσματος. Αυτά εμφανίζουν καλύτερη αποτελεσματικότητα στο διαχωρισμό ορισμένων, αλλά όχι όλων των κατηγοριών ελαττωματικών καρπών, διότι βασίζονται σε διαφορές στο χημικό προφίλ (Haff & Pearson, 2006). Στην ίδια κατεύθυνση, η τεχνική απεικόνισης με ακτίνες X χρησιμοποιείται στη βιομηχανία για τον ποιοτικό έλεγχο σε σιτηρά και καρπούς. Πιο συγκεκριμένα, τα συστήματα συνεχούς γραμμής σάρωσης με ακτίνες X διαχωρίζουν

ξένες ύλες (πέτρες, γυαλί, μέταλλο, ξύλο) από τα τρόφιμα (Keagy *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1984; Haff & Pearson, 2007), ανιχνεύουν προσβολές από μύκητες (Pearson & Wicklow, 2006; Narvankar *et al.*, 2009) και ζημιές από έντομα (Keagy & Schatzki, 1993; Keagy *et al.*, 1996; Karunakaran *et al.*, 2004a, 2004b). Στα κελυφωτά φιστίκια, μελετήθηκε η δυνατότητα διαχωρισμού καρπών με νέκρωση του ενδοσπερμίου (μη ορατό σύμπτωμα εξωτερικά) με απεικόνιση με ακτίνες X (X-ray imaging) (Yanniotis *et al.*, 2011). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω του διαφορετικού βαθμού απορρόφησης των ακτίνων X στους υγιείς και αλλοιωμένους καρπούς (Σχήμα 16). Η ευαισθησία της μεθόδου αυτής αξιολογήθηκε περαιτέρω, λόγω της εξάρτησής της από την περιεκτικότητα των καρπών σε υγρασία, της κατανομής του λίπους και των διαστάσεων των κυττάρων (Proshlyakov *et al.*, 2013). Ιδιαίτερη σημασία είχε η παρατήρηση ότι στους καρπούς με το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του ενδοσπερμίου απομονώθηκε ο μύκητας που παράγει αφλατοξίνη. Το αποτέλεσμα ήταν η μείωση του μεγαλύτερου ποσοστού αφλατοξίνης (98%) στην παρτίδα, μετά το διαχωρισμό τους με ακτίνες X (Georgiadou *et al.*, 2012c).

Τα παραπάνω αυτόματα συστήματα διαλογής (με εξαίρεση της μελέτης με ακτίνες X) έχουν σχεδιαστεί και αξιολογηθεί με βάση τα χαρακτηριστικά ξένων ποικιλιών (Kerman, Ohadi) και τα οποία διαφέρουν από τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας «Αιγίνης». Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι η μακροσκοπική εικόνα των ελαττωματικών καρπών, καθώς και η συχνότητα εμφάνισής τους μεταβάλλεται ανάλογα την ποικιλία. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πρόβλημα των καρπών με πρόωρο σχίσσιμο, το οποίο είναι πολύ συνηθισμένο στην ποικιλία Kerman, η οποία καλλιεργείται στις Η.Π.Α και το οποίο έχει συνδεθεί άμεσα με τη μόλυνση με αφλατοξίνη (Doster & Michailides, 1995; Pearson & Schatzki, 1998). Αντίθετα, το πρόβλημα των καρπών με πρόωρο σχίσσιμο εμφανίζεται πολύ σπάνια στην ελληνική ποικιλία «Αιγίνης». Συνεπώς, η μελέτη των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών του προϊόντος στη βάση της ποικιλίας είναι βασική προϋπόθεση για τον ορθό σχεδιασμό και την αποτελεσματική λειτουργία ενός συστήματος διαλογής.



Σχήμα 16. Φιστίκια με το σύμπτωμα των νεκρωτικών κηλίδων (έγχρωμες φωτογραφίες) και η αντίστοιχη απεικόνιση σε σύστημα σάρωσης ακτίνων X (ασπρόμαυρες φωτογραφίες). Στην πρώτη σειρά απεικονίζονται τα υγιή φιστίκια, ενώ στις υπόλοιπες σειρές τα συμπτωματικά. Στις ακτινογραφίες X, οι νεκρωτικές κηλίδες απεικονίζονται σαν σκούρες γκρι περιοχές, με διακριτό σχήμα.

1.4.2.3. Διεργασίες αποτοξικοποίησης και μεταβολισμού των αφλατοξινών

Μία άλλη προσέγγιση που στοχεύει στη μείωση των αφλατοξινών στα μολυσμένα γεωργικά προϊόντα αφορά τις διεργασίες αποτοξικοποίησης των αφλατοξινών, οι οποίες πρακτικά στοχεύουν στην αποικοδόμηση, καταστροφή και απενεργοποίηση του μορίου. Αυτή η στρατηγική μείωσης περιλαμβάνει πέντε κύρια πεδία:

(α) *θερμική επεξεργασία του τροφίμου και της ζωοτροφής*: Αν και οι αφλατοξίνες είναι χημικά πολύ σταθερές, ακόμα και στις υψηλές θερμοκρασίες (θερμοκρασία απενεργοποίησης 237°C - 306 °C) έχει διερευνηθεί η δυνατότητα της θερμικής επεξεργασίας. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα δεν είναι σταθερή και ο βαθμός καταστροφής εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση, τη θερμοκρασία και το χρόνο επεξεργασίας, την περιεκτικότητα σε υγρασία, το pH και την ιονική ισχύ του τροφίμου (Rustom, 1997; Yazdanpanah *et al.*, 2005). Εναλλακτικά, διερευνήθηκε η χρήση ακτινοβολιών ιονισμού όπως UV και ακτίνες γ, οι οποίες οδήγησαν σε λιγότερο τοξικά προϊόντα (Rustom, 1997). Η ηλιακή ακτινοβολία έδειξε να καταστρέφει τις αφλατοξίνες σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα στην αραχίδα, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά όταν δοκιμάστηκε σε μολυσμένα δείγματα με φυσικό τρόπο, διότι η ισχυρή δέσμευσή της στις πρωτεΐνες του τροφίμου την έκαναν λιγότερο ευαίσθητη στην έκθεση της ηλιακής ακτινοβολίας (Rustom, 1997).

(β) *βιοαποικοδόμηση και βιομετατροπή*: Πολλές έρευνες δραστηριοποιούνται σε αυτό το πεδίο, δοκιμάζοντας την ικανότητα διαφόρων μικροοργανισμών ή/και ενζύμων (μύκητες, ζύμες, οξυγαλακτικά και άλλα βακτήρια, υδρολάσες κ.α.) στην αποικοδόμηση των αφλατοξινών και μυκοτοξινών γενικότερα (Smith & Bol, 1989; Abrunhosa *et al.*, 2010; Dalie *et al.*, 2010; Karetanakou *et al.*, 2012). Ωστόσο, ένας πολύ μικρός αριθμός μικροοργανισμών από αυτά έχουν δείξει κάποια δράση στη βιοαποικοδόμηση της αφλατοξίνης.

(γ) *διαιτητική τροποποίηση και χημειοπροφύλαξη*: Η τοξικότητα των αφλατοξινών επηρεάζεται σημαντικά από χημικές ουσίες της διατροφής, οι οποίες τροποποιούν την απόκριση των θηλαστικών στις τοξίνες. Σχετικές *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι διάφορα πρόσθετα και θρεπτικά συστατικά της τροφής, όπως τριτερπενοειδή, πολυφαινόλες, ισοθειοκυάνες (sulforaphane) και άλλες χημικές ουσίες όπως η oltipraz, η χλωροφυλίνη και τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Αυτές οι ουσίες φαίνεται ότι είτε αυξάνουν τις διεργασίες αποτοξικοποίησης στα ζώα είτε προλαμβάνουν, μειώνουν και αναστέλλουν τις τοξικές επιδράσεις (Hayes *et al.*, 1998; Kensler *et al.*, 2004). Είναι επίσης σημαντικό, τόσο ο τρόπος δράσης όσο και η

αποτελεσματικότητα αυτών των ουσιών να αξιολογείται και σε μελέτες *in vivo*. Ωστόσο, για την εμπορική εφαρμογή αυτών των ουσιών θα πρέπει να διερευνηθούν τρόποι πρόσληψης μέσω της τροφής, να αξιολογηθεί το κόστος σε συνάρτηση με την αποτελεσματικότητα, να αναζητηθούν παράπλευρες επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων (π.χ. δέσμευση άλλων θρεπτικών συστατικών) και να υπάρξει κοινωνική αποδοχή.

(δ) *εκχύλιση με διαλύτη και χημική αποικοδόμηση*: Εκχυλίσεις με διαλύτες όπως 95% αιθανόλη, 90% υδατική ακετόνη, 80% ισοπροπανόλη και μίγματα διαλυμάτων εξανίου-μεθανόλης, μεθανόλης-νερού, ακετονιτριλίου-νερού, εξανίου-αιθανόλης-νερού και ακετόνης-εξανίου-νερού έχουν εφαρμοστεί σε μολυσμένη αραχίδα και βαμβακόσπορο για αφαίρεση της αφλατοξίνης (Rustom, 1997). Όμως, μετά από μια τέτοια επέμβαση το προϊόν προορίζεται μόνο για ζωοτροφή. Μία άλλη ουσία είναι η αμμωνία, είτε σε αέρια μορφή είτε με τη μορφή διαλύματος $\text{NH}_4(\text{OH})$ η οποία έχει δοκιμαστεί σε μολυσμένες ζωοτροφές, σε διάφορες θερμοκρασίες, πιέσεις, χρόνους παραμονής και περιεκτικότητες σε υγρασία. Αν και τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά (αποικοδόμηση έως και 99% σε κάποιες περιπτώσεις), δεν εφαρμόζεται διότι δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί όλα τα προϊόντα αποικοδόμησης που προκύπτουν (Coker *et al.*, 1985). Το ίδιο συμβαίνει και με κάποιες εφαρμογές με όζον στα σιτηρά (McDonough *et al.*, 2011).

(ε) *μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των αφλατοξινών μέσω εκλεκτικής χημειο-ρόφησης με αργιλικά υλικά*: Αξιοσημείωτη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των αφλατοξινών έχει πραγματοποιηθεί μέσω της προσθήκης φυλλοπυριτικής αργίλλου (HSCAS - Hydrated Sodium Calcium Alumino Silicate) ή άλλων οργανικών υλικών (π.χ. κυτταρικά τοιχώματα ζυμών) στις ζωοτροφές, τα οποία εκλεκτικά προσροφούν μέσω χημειο-ρόφησης τις αφλατοξίνες στο γαστρεντερικό σύστημα των ζώων (Smith, 1997). Παρόμοια δράση εμφανίζουν και άλλα ορυκτά υλικά, όπως ο αργιλικός ασβεστούχος μοντμοριλονίτης (calcium montmorillonite clays) όπως είναι το NovaSil Plus (NSP), τα οποία είναι πολύ αποτελεσματικά και εκλεκτικά στη δέσμευση και απενεργοποίηση των αφλατοξινών στο γαστρεντερικό σύστημα διαφόρων ζώων (Wang *et al.*, 2005).

Το κρίσιμο σημείο αυτής της στρατηγικής αντιμετώπισης των αφλατοξινών είναι ότι θα πρέπει να ελέγχεται η ασφάλεια των προϊόντων αποικοδόμησης, διότι οι μεταβολίτες δεν θα πρέπει να είναι τοξικοί στον άνθρωπο και τα ζώα. Επίσης, θα πρέπει να αξιολογείται η επίδραση αυτών των επεμβάσεων στη διαθρεπτική αξία και τις οργανοληπτικές ιδιότητες των επεξεργασμένων προϊόντων.

1.5. Σκοποί και στόχοι της διατριβής

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η διαλογή αποτελεί το βασικότερο εργαλείο αντιμετώπισης του προβλήματος των αφλατοξινών στους καρπούς, σε μετασυλλεκτικό στάδιο. Στην ενότητα 1.4.2.2. αναφέρονται συνοπτικά τα ερευνητικά πεδία, στα οποία η διεθνής επιστημονική κοινότητα εργάζεται για το σχεδιασμό, την ανάπτυξη και την εφαρμογή γρήγορων και ευαίσθητων συστημάτων διαλογής, βασιζόμενη και στις νέες τεχνολογίες.

Μέχρι στιγμής, η διαλογή, όπως εφαρμόζεται στα κελυφωτά φιστίκια κατά την επεξεργασία, στοχεύει έμμεσα στη μείωση της αφλατοξίνης, διαχωρίζοντας τους ελαττωματικούς, ποιοτικά υποβαθμισμένους καρπούς οι οποίοι, όπως έχει αποδειχθεί από τις μελέτες συνδέονται με την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αφλατοξίνης. Ωστόσο, για τον άμεσο διαχωρισμό και απόρριψη μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών, απαιτούνται «δείκτες» μόλυνσης, οι οποίοι θα πρέπει να είναι χαρακτηριστικοί της παρουσίας της τοξίνης. Το πρόβλημα αυτό γίνεται πιο σύνθετο, αν ληφθεί υπ' όψιν ότι η ίδια η παρουσία του μύκητα (ως παθογόνο αίτιο της αφλατοξίνης) ενώ είναι δυνατό να αλλοιώσει τα φυσικά ή χημικά χαρακτηριστικά των φιστικιών, δεν αποτελεί αξιόπιστο «δείκτη» ή «αποτύπωμα» της αφλατοξίνης, δεδομένου ότι η αφλατοξίνη παράγεται κατά το δευτερογενή μεταβολισμό και μόνο από τα αφλατοξικογόνα στελέχη. Προς αυτή την κατεύθυνση, είναι απαραίτητο να μελετηθούν συγκριτικά, τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά υγιών, μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών, καθώς και καρπών με παρουσία του μύκητα αλλά χωρίς την ύπαρξη αφλατοξίνης.

Η παρούσα διατριβή αφορά στη μελέτη των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κελυφωτών φιστικιών, τα οποία συνδέονται άμεσα (μολυσμένα με αφλατοξίνη) ή έμμεσα (καρποί με ελαττώματα) με την παρουσία αφλατοξίνης. Πιο συγκεκριμένα, τα αντικείμενα της μελέτης είχαν ως στόχο:

- να προσδιοριστούν οι τυχόν διακριτές διαφορές των μολυσμένων ή «ύποπτων» ελαττωματικών καρπών με τα υγιή, κανονικά φιστίκια
- να διερευνηθεί η δυνατότητα χρήσης αυτών των διαφορών ως «δείκτες» για τη διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών
- να περιγραφεί ο βαθμός συσχέτισης αυτών των δεικτών με την παρουσία αφλατοξίνης (αποτελεσματικότητα διαλογής) και να αναγνωριστούν τα όρια και οι συνθήκες αποδοχής τους

Ταυτόχρονα, στο πλαίσιο αυτής της μελέτης ήταν αναγκαίο να αποτυπωθούν τα τυπικά φυσικά (σχήμα, μέγεθος, βάρος, όγκος, πυκνότητα, υγρασία, χρώμα, θερμική

αγωγιμότητα, υφή) και χημικά χαρακτηριστικά (πρωτεΐνη, τέφρα, λίπος, λιπαρά οξέα, πτητικές ουσίες), της ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης», τα οποία δεν είναι πλήρως μελετημένα και αποτελούν τη βάση, για οποιοδήποτε σχεδιασμό και αξιολόγηση διεργασίας απαιτείται κατά την επεξεργασία τους. Οι επιμέρους στόχοι της διατριβής περιγράφονται αναλυτικά σε κάθε κεφάλαιο ξεχωριστά, τα οποία αναφέρονται ως:

Κεφάλαιο 2: Μελέτη του πτητικού προφίλ υγιών και μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών.

Κεφάλαιο 3: Μελέτη των χημικών ιδιοτήτων σε υγιή, ελαττωματικά και μολυσμένα με αφλατοξίνη κελυφωτά φιστίκια.

Κεφάλαιο 4: Μελέτη των φυσικών χαρακτηριστικών σε κανονικά και ελαττωματικά κελυφωτά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».

Ωστόσο, ο απώτερος σκοπός αυτής της προσπάθειας είναι η ανάπτυξη μίας αυτόματης, ταχείας και αξιόπιστης μεθόδου διαλογής των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών, η οποία θα μπορεί να εφαρμοστεί στη βιομηχανική πρακτική και θα μειώσει το συνολικό κόστος παραγωγής μέσω (α) της ελαχιστοποίησης του αριθμού των αναλύσεων και (β) της μείωσης του κινδύνου απόσυρσης μολυσμένων προϊόντων που έχουν διατεθεί στην κατανάλωση. Ταυτόχρονα, διασφαλίζεται η υγεία του καταναλωτή με τη χρήση μιας φυσικής μεθόδου, όπως καλούν οι σύγχρονες απαιτήσεις. Από την άλλη πλευρά, οι προκλήσεις στην ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος είναι πολλές, λόγω του μεγάλου όγκου των προϊόντων που είναι υπό διαλογή, της υψηλής ταχύτητας που απαιτείται, παράλληλα με την ακρίβεια και την αξιοπιστία του αποτελέσματος, συναρτήσει του κόστους κατασκευής και λειτουργίας.

1.6. Βιβλιογραφία

1.6.1. Ελληνική βιβλιογραφία

1. Δημακοπούλου-Κοντοσταύλου, Μ. Γ. (2009). Βιολογική αντιμετώπιση των ωχρατοξικογόνων μυκήτων *Aspergillus niger* και *Aspergillus carbonarius* στα σταφύλια με επιφυτικές ζύμες. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. Μπρουσοβάνας, Ν. (1980). Η φιστικιά. Λάρισα, Εκδ.: Στρ.Κλαπάκης.
3. Ποντίκης, Κ.Α. (1996). Ειδική Δενδροκομία. ΓΠΑ, Αθήνα, Εκδ. Αθ.Σταμούλης.
4. Τζάμος, Ε.Κ. (2007). Φυτοπαθολογία. Αθήνα, Εκδ. Αθ. Σταμούλης.
5. Χιτζανίδου, Α., Μουρίκης, Π.Α., Χολέβας, Κ.Δ. (2004). Ασθένειες & Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα. Κηφισιά, Αθήνα, Εκδ. Μ.Φ.Ι.

1.6.2. Διεθνής βιβλιογραφία

1. Abbas, H.K., Zablutowicz, R.M., Bruns, H.A., Abel, C.A. (2006). Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology*, **16**(5), 437-449.
2. Abbas, H.K., Accinelli, C., Zablutowicz, R.M., Abel, C.A., Bruns, H.A, Dong, Y., Shier, W.T. (2008). Dynamics of mycotoxin and *Aspergillus flavus* levels in aging Bt and non-Bt corn residues under Mississippi no-till conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 7558-7585.
3. Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablutowicz, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A, Bruns, H.A. & Weaver, M.A (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, **28**, 142-153.
4. Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Venancio, A. (2010). Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, **2**, 1078-1099.
5. Adams, M.R., Moss, O.M. (2008). Food Microbiology. Third Edition, RSC Publishing.
6. Agar, I.T., Sarmiento, C., Garces, R., Kaska, N., Kafkas, S., Ak, B.E. (1995). Compositional changes of fatty acids during the development of embryo in *Pistachia vera*. *Acta Horticulturae*, **419**, 405-408.
7. Aghdaie, A. (2009). Investigating effective factors on Iran's pistachio exportation. *International Journal of Marketing Studies*, **1**(2), 35-40
8. Amaike, S., Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, **49**, 107-33.
9. Antonopoulos, D.F., Georgiadou, M., Agoritsis, S.P, Gianniotis, S., Tsitsigiannis, D.I. (2012). Biological control of the toxigenic fungus *Aspergillus flavus* and aflatoxins that are produced to the shelled pistachio nuts "Aiginis". 2nd Conference of Agricultural Biotechnology, Athens, Greece.
10. Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., Maccarone, E. (2007). Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chemistry*, **104**, 403-408.

11. Atehnkengab, J., Ojiamboac, P.S., Ikotunb, T., Sikorad, R.A., Cotty, P.J., & Bandyopadhyay, R. (2008). Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives and Contaminants*, **25**(10), 1264–1271.
12. Baker, S.E., Bennett, J.W. (2008). An overview of the genus *Aspergillus*. In: *The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*. Edited by Goldman, G.H. & Osmani, S.A., New York, CRC Press, 3-14.
13. Battilani, P., Magan, E., & Logrieco, A. (2006). European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, **111**, S2-S4.
14. Beede, R.H., Kallsen, C.E., Freeman, M.W., Holtz, B.A., Klonsky, K.M., & DeMoura, R.L. (2005). Costs and returns to produce pistachios. In: *Pistachio production manual*. Edited by Ferguson, L., 4th ed., Davis, CA, USA: University of California, Fruit & Nut Research Information Center, 8-30.
15. Bhatnagar, D., Ullah, A.H.J., Cleveland, T.E. (1988). Purification and characterization of a methyltransferase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 163 involved in aflatoxin biosynthetic pathway. *Preparative Biochemistry*, **18**, 321-349.
16. Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. (1990). Purification and characterization of a reductase from *Aspergillus parasiticus* SRRC2043 involved in aflatoxin biosynthesis. *FASEB Journal*, **4**, A2727.
17. Bennett, J.W. (1985). Mutants and mycotoxins: aflatoxins as a model system. In: *Trichothecenes and Other Mycotoxins*. Proceedings of the International Mycotoxin Symposium held in Sydney, Australia. Edited by Lacey, J. & International Society for Plant Pathology, J.Wiley & Sons, 271-280.
18. Bennett, J.W., Klich, M.A. (1992). *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. Stoneham, M.A., Butterworth-Heinemann.
19. Bennett, J.W., Klich, M.A. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**, 497-516.
20. CAST. (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Report 139. Ames, IA: Council for Agricultural Science and Technology.
21. Chitzanidis, A. (2010). From Asia to Aegina: the story of the pistachio tree. In: *XIV GREMPA, Meeting on Pistachios and Almonds*. Edited by Zakyntinos, G., 299-302.
22. Chuturgoon, A.A., Dutton, M.F., Berry, R.K. (1990). The preparation of an enzyme associated with aflatoxin biosynthesis by affinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **166**, 38-42.
23. Coker, R.D., Jewers, K., & Jones, N.E. (1985). The detoxification of aflatoxin by ammonia: practical possibilities. *Tropical Science*, **25**, 139-154.
24. Cotty, P.J. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, **79**, 808–814.
25. Cotty, P.J., Bayman, P. (1993). Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology*, **83**, 1283–1287.
26. Cotty, P.J., Bhatnagar, D. (1994). Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin

- biosynthetic pathway enzymes. *Applied Environmental Microbiology*, **60**, 2248–2251.
27. Cotty, P.J. (1997). Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research*, **101**, 698–704.
 28. Cotty, P.J., Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, **119**, 109-115.
 29. Dalie, 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.
 30. Dickens, J.W., Whitaker, T.B. (1975). Efficacy of electronic color sorting and hand picking to remove aflatoxin contaminated kernels from commercial lots of shelled peanuts. *Peanut Science*, **2(2)**, 45-50.
 31. Donner, M., Atehnkeng, J., Sikora, R.A., Bandyopadhyay, R., Cotty, P.J. (2010). Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. *Food Additives & Contaminants*, **27**, 576–590.
 32. Doster, M.A., Michailides, T.J. (1995). The development of early split pistachio nuts and their contamination by moulds, aflatoxins and insects. *Acta Horticulture*, **419**, 359-364.
 33. Doster, M. A., Michailides, T.J. (1999). Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect infestation. *Plant Disease*, **83(3)**, 259-264.
 34. Dowd, P.F. (2001). Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. *Journal of Economic Entomology*, **94**, 1067-1074.
 35. Du, W., O'Brian, G.R, Payne, GA. (2007). Function and regulation of *aflJ* in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Additives & Contaminants*, **24**, 1043–1050.
 36. Ehrlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G., Cotty, P.J. (2007). Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, **114**, 153-159.
 37. Farombi, E.O. (2006). Aflatoxin contamination of foods in developing countries: implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 1–14.
 38. Farsaie, A., McClure, W. F. and Monroe, R. J. (1981). Design and development of an electro-optical sorter for removing BGY fluorescent pistachio nuts. *Transactions of the ASAE*, **24**, 1372–1375.
 39. Ferguson, L., Maranto, J., & Beede, R. (1995). Mechanical topping mitigates alternate bearing of “Kerman” pistachios (*Pistacia vera*, L.). *Hortscience*, **30(7)**, 1369-1372.
 40. Ferguson, L., Polito, V., & Kallsen, C. (2005a). The pistachio tree; botany and physiology and factors that affect yield. In: *Pistachio production manual*. Edited

- by Ferguson, L., 4th ed., Davis, CA, USA: University of California, Fruit & Nut Research Information Center, 31-39.
41. Ferguson, L., Kader, A., & Thompson, J. (2005b). Harvesting, transporting, processing and grading. In: *Pistachio production manual*. Edited by Ferguson, L., 4th ed., Davis, CA, USA: University of California, Fruit & Nut Research Information Center, 164-169.
 42. Fiebelman, T.P., Cotty, P.J., Doster, M.A., Michailides, T.J. (1998). A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia*, **90**, 618-623.
 43. Flaherty, J.E, Payne, G.A. (1997). Overexpression of aflR leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Applied Environmental Microbiology*, **63**, 3995–4000.
 44. Georgiadou, M., Dimou, A., Yanniotis, S. (2012a). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, **26**, 580-586.
 45. Georgiadou, M., Agoritsis, S.P., Vichou, K., Vardouniotis, G., Yanniotis, S., Paplomatas, E.I., Cotty, P.J. & Tsitsigiannis D.I. (2012b). Genetic and molecular characterization and evaluation of the Greek non-toxigenic isolations of the fungi *Aspergillus* as potential biocontrol agents against aflatoxins. In: *Proceedings of 5th Congress of the Hellenic Society of Microbiology “Mikrobiokosmos”*, 13-16 December, Athens, Greece, 131.
 46. Georgiadou, M., Proshlyakov, A., Revithi, A., Tjamos, S., Stringlis, I., Tsitsigiannis, D., Paplomatas, E., Blahovec, J., Yanniotis, S. (2012c). Detection of insect necrotic internal damage and aflatoxin reduction in stored pistachio nuts. *Bulletin of IOBC-WPRS*, **81**, 21-29.
 47. Gilbert, J., Anklam, E. (2002). Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in analytical chemistry*, **21**, 468-486.
 48. Hadavi E. (2005). Several physical properties of aflatoxin-contaminated pistachio nuts: Application of BGY fluorescence for separation of aflatoxin – contaminated nuts. *Food Additives & Contaminants*, **22 (11)**, 1144-1153.
 49. Haff, R.B., Pearson, T.C. (2006). Spectral band selection for optical sorting of pistachio nuts defects. *Transactions of the ASABE*, **49(4)**, 1105-1113.
 50. Haff, R.P., Pearson, T.C. (2007). Separating in-shell pistachio nuts from kernels using impact vibration analysis. *Journal of Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, **1(4)**, 188 – 192.
 51. Hayes, J.D., Pulford, D.J., Ellis, E.M., McLeod, R., James, R.F.L., Seidegard, J., Mosialou, E., Jernstrom, B., Neal, G.E. (1998). Regulation of rat glutathione-S-transferase A5 by cancer chemopreventive agents: mechanisms of inducible resistance to aflatoxin B₁. *Chemico-Biological Interactions*, **111/112**, 51–67.
 52. Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, **153**, 1677 – 1692.
 53. Hill, R.A, Blankeship, P.D., Cole, R.J., Sanders, T.H. (1983). Effects of Soil Moisture and Temperature on Preharvest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequent Aflatoxin Development, *Applied and Environmental Microbiology*, **45 (2)**, 628-633.

54. Hill, R.A., Wilson, D.M., McMillian, W.W., Widstrom, N.W., Cole, R.J., Sanders, T.H., Blankenship, P.D. (1985). Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In: *Trichothecenes and Other Mycotoxins*, Proceedings of the International mycotoxin symposium Sydney – Australia, Edited by Lacey, J., & International Society for Plant Pathology, J.Wiley & Sons, 79-95.
55. Holtz, B., Ferguson, L., Parfitt, D., Allen, G., & Radoicich, R. (2005). Rootstock production and budding. In: *Pistachio production manual*. Edited by Ferguson, L., 4th ed., Davis, CA, USA: University of California, Fruit & Nut Research Information Center, 74-79.
56. Horowitz, B.S, Zarnowski, R., Sharpee, W.C, Keller, N.P. (2008). Morphological transition governed by density dependence and lipoxygenase activity in *Aspergillus flavus*. *Applied Environmental Microbiology*, **74**, 5674–5685.
57. Hua, S.S.T., Baker, J.L., Flores-Espiritu, M. (1999). Interactions of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus flavus*. *Applied Environmental Microbiology*, **65**(6), 2738-2740.
58. Huff, W.E. (1980). A physical method for the segregation of aflatoxin-contaminated corn. *Cereal Chemistry*, **57**, 236-238.
59. Huff, W.E., Hagler, W.M. (1982). Evaluation of density segregation as a means to estimate the degree of aflatoxin contamination of corn. *Cereal Chemistry*, **59**(2), 152-154.
60. Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P. 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography*, **882**, 1-10.
61. Kader, A.A., Heintz, C.M., Labavitch, J.M., Rae, H.L. (1982). Studies related to the description and evaluation of pistachio nut quality. *Journal of American Society for HortScience*, **107**(5), 812-816.
62. 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.
63. Karunakaran, C, Jayas, D.S., White, N.D.G. (2004a). Detection of internal wheat seed infection by *Rhizopertha dominica* using X-ray imaging. *Journal of Stored Products Research*, **40**, 507-516.
64. Karunakaran, C, Jayas, D.S., White, N.D.G. (2004b). Identification of wheat kernels damaged by the red flour beetle using X-ray images. *Biosystems Engineering*, **87**(3), 267-274.
65. Keagy, P.M. & Schatzki, T.F. (1993). Machine recognition of weevil damage in wheat radiographs. *Cereal Chemistry*, **70**, 696-700.
66. Keagy, P.M., Parvin, B., Schatzki, T.F. (1996). Machine recognition of Navel Orange Worm Damage in X-ray images of pistachio nuts. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **29**, 140-145.

67. Keller, N.P., Dischinger, H.C., Cleveland, T.E., Ullah, A.H.J. (1993). Purification of a 40 kDa methyltransferase active in the aflatoxin biosynthetic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 479-484.
68. Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism: from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 937-947.
69. Kensler, T.W., Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Lu, P.X., Chen, J.G., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Jackson, P.E., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Munoz, A., Groopman, J.D. (2004). Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology*, **127**, 310-318.
70. Klich, M.A. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. CBS, Netherlands.
71. Küçüköner, E., Yurt, B. (2003). Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *European Food Research and Technology*, **217**, 308-310.
72. Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**(3), 147-158.
73. Lee, Y.H., Tominaga, M., Hayashi, R., Sakamoto, K., Yamada, O., Akita, O. (2006). *Aspergillus oryzae* strains with a large deletion of the aflatoxin biosynthetic homologous gene cluster differentiated by chromosomal breakage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**, 339-345.
74. Liang, X., Holbrook, C.C., Lynch, R.E., Guo, B.Z. (2005). Beta-1,3-glucanase activity in peanut seed (*Arachis hypogaea*) is induced by inoculation with *Aspergillus flavus* and copurifies with a conglutin-like protein. *Phytopathology*, **95**, 506-511.
75. Lim, F.Y., Keller, N.P. (2014). Spatial and temporal control of fungal natural products. *Natural Product Reports*, **31**, 1277-1286.
76. Lin, B.K., Anderson, J.A. (1992). Purification and properties of versiconal cyclase from *Aspergillus parasiticus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **293**, 67-70.
77. Liu, B.H., Chu, F.S. (1997). Production and characterization of monoclonal antibodies against sterigmatocystic O-methyltransferase. *Food and Agricultural Immunology*, **9**, 167-176.
78. Liu, Y., Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, **118**, 818-824.
79. Massey, T.E., Stewart, R.K., Daniels, L.M., Ling, L. (1995). Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenicity. *Proceeding of The Society for Experimental Biology and Medicine*, **208**, 213-227.
80. McClure W.F., Farsaie A. (1980). Dual-wavelength fiber optic photometer measures fluorescence of aflatoxin contaminated pistachio nuts. *Transactions of the ASAE*, **23**(1), 204-207.
81. McDonough, M.X., Campabadal, C.A., Mason, L.J., Maier, D.E., Denvir, A., & Woloshuk, C. P. (2011). Ozone application in a modified screw conveyor to treat

- grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. *Journal of Stored Products Research*, **47**(3), 249-254.
82. Michailides, T.J., Morgan, D.P., & Doster, M.A. (1995). Diseases of pistachios in California and their significance. *Acta Horticulturae*, **419**, 337-343.
 83. Moss, M.O., Frank, J.M. (1985). The influence on mycotoxin production of interactions between fungi and their environment. In: *Trichothecenes and Other Mycotoxins*. Edited by Lacey, J., 257-268.
 84. Munkvold, G.P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, **41**, 99-116.
 85. Naidoo, G., Forbes, A.M., Paul, C., White, D.G., Rocheford, T.R. (2002). Resistance to *Aspergillus* ear rot and aflatoxin accumulation in maize F1 hybrids. *Crop Science*, **42**, 360-364.
 86. Narvankar, D.S., Singh, C.B., Jayas, D.S., White, N.D.G. (2009). Assessment of soft X-ray imaging for detection of fungal infection in wheat. *Biosystems Engineering*, **103**, 49-56.
 87. Obade, M.F., Andang'o, P., Obonyo, C., & Lusweti, F. (2015). Exposure of children 4 to 6 month of age to aflatoxin in Kisumu County, Kenya. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, **15**(2), 9949-9963.
 88. Odvody G.N., Chilcutt, C.F., Parker, R.D., Benedict, J.H. (2000). Aflatoxin and insect response of near-isogenic Bt and non-Bt commercial corn hybrids in South Texas. In: *Proceedings of the Aflatoxin/Fumonisin Workshop*. Edited by Robens, J.F., Beltsville MD, USDA-ARS.
 89. Okay, Y. (2002). The comparison of some pistachio cultivars regarding their fat, fatty acids and protein content. *Gartenbauwissenschaft*, **67**(3), 107-113.
 90. Olsen, M. (1999). Mycotoxin Prevention and Decontamination. Case study: Prevention of aflatoxins in pistachio. MYC-CONF/99/6d.
 91. Palumbo, J.D., Baker, J.L., Mahoney, N.E. (2006). Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial Ecology*, **52**(1), 45-52.
 92. Payne, G.A., Yu, J. (2010). Ecology, development and gene regulation in *Aspergillus flavus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Edited by Machida, M., Gomi, K., Norwich, UK, Caister Acad. Press., 157-171.
 93. Pearson, T. (1996). Machine vision system for automated detection of stained pistachio nuts. *LWT- Food Science and Technology*, **28** (6), 203-209.
 94. Pearson, T.C., & Slaughter, D.C. (1996). Machine vision detection of early split pistachio nuts. *Transactions of the ASAE*, **39**(3), 1203-1207.
 95. Pearson, T.C., Schatzki, T.F. (1998). Machine Vision System for Automated Detection of Aflatoxin-Contaminated Pistachios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2248-2252.
 96. Pearson, T.C. (1999). Use of near infrared transmittance to automatically detect almonds with concealed damage. *LWT- Food Science and Technology*, **32**(2), 73-78.
 97. Pearson, T.C. (2001). Detection of pistachio nuts with closed shells using impact acoustics. *Applied Engineering in Agriculture*, **16**(1), 91 – 94.

98. Pearson, T.C., Doster, M.A., Michailides, T.J. (2001). Automated Detection of pistachio defects by machine vision. *Applied Engineering in Agriculture*, **17**, 81-84.
99. Pearson, T.C., Young, R. (2002). Automated sorting of almonds with embedded shell by laser transmittance imaging. *Applied Engineering in Agriculture*, **18**(5), 637-641.
100. Pearson T.C., Wicklow, D.T. (2006). Detection of corn kernels infected by fungi. *Transactions of the ASAE*, **49**(4), 1235-1245.
101. Pearson, T.C., Brabec, D., Haley, S. (2008). Color image based sorter for separating red and white wheat. *Sensory and Instrumentation for Food Quality*, **2**(4), 280-288.
102. Perrone, G., Gallo, A. & Logrieco, A.F. (2014). Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Frontiers in Microbiology*, **5** (377), 1-5.
103. Peterson, S.W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, **100**(2), 205-226.
104. Pitt, J.I., Hocking, A.D., Glenn, D.R. (1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *The Journal of Applied Bacteriology*, **54** (1), 109-114.
105. Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2006). Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*, **162**(3), 233-243.
106. Pittet, A. (2005). Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **96**, 424-444.
107. Probst, C., Schulthess, F., Cotty, P.J. (2010). Impact of *Aspergillus* section *Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology*, **108**, 600–610.
108. Raper, K.B., Fennel, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
109. Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfaronki, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H., Rezaee, M.-B. (2006). A survey on distribution of *Aspergillus* Section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, **161**, 183-192.
110. Rice, R.E. (1978). Navel orangeworm: a pest of pistachio nuts in California. *Entomological Society of America*, **71**(5), 822-824.
111. Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N. and Venancio, A. (2007). Communicating Current Research and Educational Topics. In: *Trends in Applied Microbiology*. Edited by Mendez-Vilas, A., 527-534.
112. Rodrigues, P., Venancio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 187-193.
113. Roze, L.V., Chanda, A., Linz, J.E. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology*, **48**, 35-48.

114. Rubens, J., Cardwell, K.F. (2005). The cost of mycotoxin management in the United States. In: *Aflatoxin and Food Safety*. Edited by Abbas, H.K, Boca Raton, F.L, CRC Press, 1–13.
115. Rustom, I.Y.S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, **59**(1), 57-67.
116. Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. (2006). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **57**(3/4), 219-228.
117. Satil, F., Azcan, N., Baser, K.H.C. (2003). Fatty acid composition of pistachio nuts in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, **39**(4), 322-324.
118. Schwankl, L.J. (2005). Fertigation. In: *Pistachio production manual*. Edited by Ferguson, L., 4th ed., Davis, CA, USA: University of California, Fruit & Nut Research Information Center, 158-163.
119. Seferoglu, S., Seferoglu, H.G., Tekintas, F.E., Balta, F. (2006). Biochemical composition influenced by different locations in Uzun pistachio cv. (*Pistachia vera* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 461-465.
120. Shokraii, H.E. (1977). Chemical composition of the pistachio nuts (*Pistachia vera* L.) of Kerman, Iran. *Journal of Food Science*, **42**, 244-245.
121. Smith, J.E., & Bol, J. (1989). Biological detoxification of aflatoxin, *Food Biotechnology*, **3**, 127-144.
122. Smith, J.E. (1997). Aflatoxins. In: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Edited by Felix O'Mello, J.P., CRC Press New York, 269-285.
123. Spraker, J.E., Jewell, K., Roze, L.V., Scherf, J., Ndagano, D., Beaudry, R., Linz, J.E., Allen, C., Keller, N.P. (2014). A volatile relationship: Profiling an inter-kingdom dialogue between two plant pathogens, *Ralstonia solanacearum* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Chemical Ecology*, **40**, 502-513.
124. Steiner, W.E., Brunschweiler, K., Leimbacher, E., Schneider, R. (1992). Aflatoxins and fluorescence in brazil nuts and pistachio nuts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **40**(12), 2453-2457.
125. Stenske, K.A, Smith, J.R, Newman, S.J, Newman, L.B, Kirk, C.A. (2006). Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **228**, 1686–1691.
126. Throckmorton, K., Wiemann, P., Keller, N.P. (2015). Evolution of chemical diversity in a group of non-reduced polyketide gene clusters: Using phylogenetics to inform the search for novel fungal natural products. *Toxins*, **7**, 3572-3607.
127. Toyofuku, N., Haff, R., Pearson, T. (2013). Advances in automated nut sorting. In: *Improving the safety and quality of nuts*. Edited by Harris, L.J., Woodhead Publishing, 230-244.
128. Tsantili, E., Takidelli, C., Christopoulos, M.V., Lambrinea, E., Rouskas, D., Roussos, P.A. (2010). Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistachia vera* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, **125**, 562-568.

129. Tsitsigiannis, D.I., Kunze, S., Willis, D.K., Feussner, I., Keller, N.P. (2005). *Aspergillus* infection inhibits the expression of peanut 13S-HPODE-forming seed lipoxygenases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 1081–1089.
130. Tsitsigiannis, D.I., Keller, N.P. (2007). Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends in Microbiology*, **15**, 109–118.
131. Tsitsigiannis, D.I., Georgiadou, M., Agoritsis, S., Zakyntinos, G., Varzakas, T.H., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Dimakopoulou, M., Karnavas, G., Paplomatas, E., Yanniotis, S., & Tjamos, E.C. (2010). Ecology, epidemiology and control of *Aspergillus spp.* in pistachio orchards in Greece. *Petria*, **20**, 95-96.
132. Tsitsigiannis, D.I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P.P., Tjamos, E.C. (2012). Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea*, **51** (1), 158-174.
133. Van Egmond, H.P., Jonker, M.A. (2005). Worldwide regulations on aflatoxins. In: *Aflatoxin and Food Safety*. Edited by Abbas, H.K., Boca Raton, F.L, CRC Press, 77-93.
134. Venkatachalam, M., Sathe, S.K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4705-4714.
135. Voyatzidaki, Z., Georgiadou, M., Yanniotis S. (2008). A study of aflatoxin contamination in Greek pistachios. In: *GREMPA Proceedings*, Athens, Greece.
136. Wagacha, J.M., Muthomi, J.W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, **124**, 1-12.
137. Wang, J.S., Luo, H., Billam, M., Wang, Z., Guan, H., Tang, L., Goldston, T., Afriyie-Gyawu, E., Lovett, C., Griswold, J., Brattin, B., Taylor, R.J., Huebner, H.J., Phillips, T.D. (2005). Short-term safety evaluation of processed calcium montmorillonite clay (NovaSil) in humans. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 270–279.
138. Weissinger, A., Wu, M., Liu, Y.S., Ingram, K., Rajasekaran, K., Cleveland, T.E. (2002). Development of transgenic peanut with enhanced resistance against preharvest aflatoxin contamination, *Mycopathologia*, **155**, 97.
139. Williams, D., Sawyer, C., Conklin, W.C., Robe, K. (1984). X-ray scanner removes stones from almonds on conveyor belt. *Food Processing*, **44**(11), 56-57.
140. Yanniotis, S., Proshlyakov, A., Revithi, A., Georgiadou, M., Blahovec, J. (2011). X-ray imaging for fungal necrotic spot detection in pistachio nuts. *Procedia Food Science*, **1**, 379-384.
141. Yazdanpanah, H., Mohammadi, T., Abouhossain, G., Cheraghali, A.M. (2005). Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, **43**, 1135-1139.
142. Yildiz, M., Gürcan, S.T., Özdemir, M. (1998). Oil composition of pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey. *Lipid*, **100**(3), 84-86.
143. Yu, J., Payne, G.A., Campbell, B.C., Guo, B., Cleveland, T.E., Robens, J.F., Keller, N.P., Bennett, J.W., Nieman, W.C. (2008). Mycotoxin Production and Prevention of Aflatoxin Contamination in Food and Feed. In: *The Aspergilli: genomics*,

medical aspects, biotechnology, and research methods. Edited by Goldman, G.H. & Osmani, S.A., New York, CRC Press, 457-472.

144. Zakyntinos, G., Rouskas, D. (1995). Pistachio growing in Greece. *Acta Horticulturae*, **419**, 423-425.

Κεφάλαιο 2. Μελέτη του πτητικού προφίλ υγιών και μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 2. Μελέτη του πτητικού προφίλ υγιών και μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών	61
Περιεχόμενα	61
2.1. Εισαγωγή	63
2.1.1. Οι πτητικές ουσίες των μυκήτων.....	63
2.1.2. Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης των πτητικών ουσιών.....	66
2.1.2.1. Διεργασίες απομόνωσης και εκχύλισης	66
2.1.2.2. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME).....	68
2.1.2.3. Αέρια Χρωματογραφία – Φασματοσκοπία Μαζών (GC-MS).....	71
2.1.3. Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης	73
2.2. Υλικά και Μέθοδοι	75
2.2.1. Δειγματοληψία και χειρισμός των φιστικιών	75
2.2.2. Τεχνική μόλυνσης με στελέχη του μύκητα <i>Aspergillus flavus</i>	75
2.2.3. Ανάλυση αφλατοξίνης.....	79
2.2.3.1. Προετοιμασία – Εκχύλιση - Καθαρισμός δειγμάτων	79
2.2.3.2. Ανάλυση στην HPLC	80
2.2.3.3. Καμπύλες βαθμονόμησης αφλατοξινών.....	81
2.2.3.4. Δοκιμές ανάκτησης.....	81
2.2.4. Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία.....	83
2.2.5. Απομόνωση και συγκέντρωση των πτητικών με HS-SPME.....	84
2.2.6. Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ουσιών.....	85
2.2.7. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC).....	86
2.2.7.1. Προσδιορισμός πτητικών με GC-FID	86
2.2.7.2. Ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων με GC-MS.....	86

2.2.8.	Στατιστική επεξεργασία.....	87
2.3.	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	89
2.3.1.	Μέτρηση αφλατοξίνης.....	89
2.3.2.	Το πτητικό προφίλ.....	92
2.3.2.1.	<i>Το γενικό πτητικό προφίλ.....</i>	<i>92</i>
2.3.2.2.	<i>Το πτητικό προφίλ των δειγμάτων της ομάδας των υγιών (H).....</i>	<i>98</i>
2.3.2.3.	<i>Το πτητικό προφίλ των μολυσμένων από τις ομάδες NC, AC, ANT. 100</i>	<i>100</i>
2.3.3.	Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.....	104
2.3.3.1.	<i>Ανάλυση σε συστάδες (Cluster Analysis – CA).....</i>	<i>104</i>
2.3.3.2.	<i>Διακριτική ανάλυση (DA).....</i>	<i>104</i>
2.4.	Συμπεράσματα.....	109
2.5.	Βιβλιογραφία.....	111
2.5.1.	Ελληνική βιβλιογραφία.....	111
2.5.2.	Διεθνής βιβλιογραφία.....	111

2.1. Εισαγωγή

2.1.1. Οι πτητικές ουσίες των μυκήτων

Ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία στο πεδίο έρευνας και ανάπτυξης στρατηγικών πρόληψης κατά των μυκοτοξινών είναι η περιγραφή του πτητικού προφίλ των προσβεβλημένων τροφίμων. Είναι γνωστό ότι οι μικροβιακοί επιμολυντές (μύκητες, βακτήρια, ζύμες), από την έναρξη του αποικισμού τους σε διάφορα υποστρώματα, παράγουν ένα μεγάλο αριθμό από πτητικές ουσίες, διαφορετικές από αυτές που υπάρχουν στο τρόφιμο, διαφοροποιώντας έτσι το πτητικό προφίλ του προσβεβλημένου τροφίμου (Kaminski & Wasowicz, 1991). Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αυτής της διαφοροποίησης μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο δείκτη, αρχικά στην ανίχνευση και κατόπιν στο διαχωρισμό, των μολυσμένων από τα υγιή τρόφιμα. Ωστόσο, λόγω του ότι η παραγωγή αυτών των πτητικών ουσιών αφορά στο δευτερογενή μεταβολισμό, ο οποίος εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, pH, υγρασία, υπόστρωμα ανάπτυξης κ.α.) είναι δύσκολο να προσδιοριστούν πτητικές ουσίες χαρακτηριστικές για κάποιο συγκεκριμένο είδος (Kramer & Abraham, 2012).

Στα κρεατοσκευάσματα, πολλές μελέτες συσχετίζουν την πορεία της μικροβιακής αλλοίωσης με την παραγωγή δύσοσμων πτητικών ουσιών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενδεχόμενοι δείκτες αλλοίωσης (Argyri *et al.*, 2015; Casaburi *et al.*, 2015). Όσον αφορά στη μόλυνση των τροφίμων με μύκητες, οι διαθέσιμες έρευνες δείχνουν ότι ιδιαίτερα αυτοί που ανήκουν στους Βασιδιομύκητες και Ασκομύκητες παράγουν ένα μεγάλο αριθμό πτητικών οργανικών ουσιών κατά το δευτερογενή μεταβολισμό (Kramer & Abraham, 2012). Τόσο η αιτία παραγωγής αυτών των φυσικών προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού όσο και ο λειτουργικός τους ρόλος αποτελεί αντικείμενο μελέτης, μέσα από το οποίο επιχειρείται η βαθύτερη κατανόηση της οικολογίας των οργανισμών, του ρόλου των γονιδίων, των ενζύμων και των βιοσυνθετικών μονοπατιών. Η συνεχής έρευνα στο πεδίο του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων έριξε φως στο ζωτικό ρόλο αυτών των ουσιών, τόσο στη βιολογία των μυκήτων όσο και στους μηχανισμούς άμυνας και επικοινωνίας που αναπτύσσουν (Lim & Keller, 2014). Στη μελέτη των Spraker *et al.* (2014) περιγράφεται με πολύ ενδιαφέρον, ότι η επικοινωνία δύο μικροοργανισμών που δεν ανήκουν στο ίδιο βασίλειο, ενός μύκητα (*Aspergillus flavus*) και ενός βακτηρίου (*Ralstonia solanacearum*) και δεν υπάρχει μεταξύ τους φυσική επαφή, πραγματοποιείται μέσα από «ενεργά σήματα», τα οποία περιλαμβάνουν πτητικές οργανικές ενώσεις. Ορισμένες από τις αιτίες

που έχουν δοθεί στη βιβλιογραφία με σκοπό να αιτιολογηθεί η παραγωγή πτητικών ουσιών στους μύκητες συνοψίζονται παρακάτω (Linton & Wright 1993; Hedlund *et al.*, 1995; Kramer & Abraham, 2012):

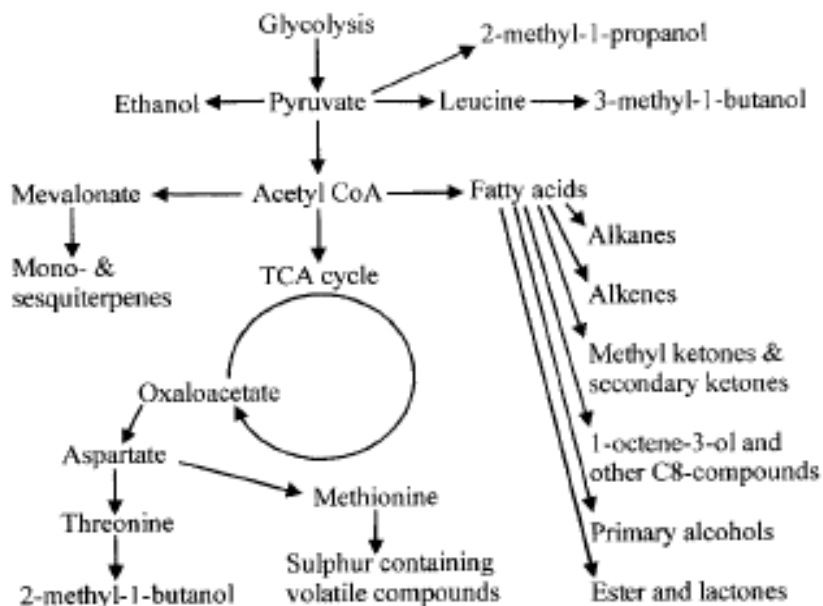
1. Συμμετέχουν στους μηχανισμούς απόρριψης παρεμποδιστικών ουσιών, οι οποίες παράγονται από το μεταβολισμό σε συνθήκες στρες.
2. Παρεμποδίζουν άλλους οργανισμούς σε συνθήκες ανταγωνισμού: π.χ. οι πτητικές ουσίες που παράγονται από το μύκητα *Trichoderma harzianum* δείχνουν να παρεμποδίζουν τον μυκοτοξικογόνο μύκητα *Fusarium moniliforme*, ο οποίος αποικίζει το καλαμπόκι.
3. Εμφανίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη των μυκήτων.
4. Προσελκύουν έντομα για τη μεταφορά των σπορίων τους και την αναπαραγωγή.

Οι πτητικές ουσίες που παράγονται από τους μύκητες περιλαμβάνουν χημικές ουσίες οι οποίες χαρακτηρίζονται χημικά ως αλειφατικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, εστέρες, κετόνες, αλδεΐδες, αλκοόλες, μόνο- και σεσκιτερπένια (Kramer & Abraham, 2012). Οι ουσίες αυτές βιοσυνθέτονται από ένα μεγάλο αριθμό αρχικών ουσιών όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, κετο-οξέα, οξικό άλας κ.α. (Schnüerer *et al.*, 1999). Στο Σχήμα 17 απεικονίζονται συνοπτικά, τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των κυριότερων ομάδων πτητικών ενώσεων, που παράγονται από τους μύκητες. Παρατηρώντας, λαμβάνουμε χρήσιμες ενδείξεις για τη σχέση μεταξύ των διαφόρων ομάδων πτητικών ουσιών, με τις μη-πτητικές, αλλά και με τη βιοσύνθεση μυκοτοξινών. Από το σχήμα φαίνεται ότι οι αλκοόλες προέρχονται από αμινοξέα μέσω της βιοσυνθετικής οδού Ehrlich. Επίσης, η οξειδωση των λιπιδίων, μέσω του ενζύμου της λιπάσης, δίνει ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία οξειδώνονται περαιτέρω σε β -κετο-οξέα και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνονται σε μεθυλ-κετόνες και με αναγωγή παράγονται οι αντίστοιχες δευτερογενείς αλκοόλες. Οι λακτόνες παράγονται από τα γ -κετο-οξέα, ενώ οι εστέρες, από ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις μεταξύ αλκοολών και ακετυλο-συνένζυμου-A. Η μεταβολική οδός του μεβαλονικού οξέος φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την παραγωγή μιας πλήθώρας τερπενίων.

Από τη δεκαετία του 1970, υπάρχουν διαθέσιμες βιβλιογραφικές αναφορές, στις οποίες μελετήθηκε η παραγωγή πτητικών οργανικών ουσιών από τα γένη των μυκήτων *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση των σιτηρών κατά την αποθήκευση και τη μόλυνσή τους με μυκοτοξίνες (Kaminski *et al.*, 1972; 1974). Βρέθηκε ότι οι πτητικές ουσίες που

προέρχονται από τη δραστηριότητα των μυκήτων είναι χαρακτηριστικές, προσδίδουν μία ιδιαίτερη οσμή και είναι διαφορετικές από αυτές των βακτηρίων. Παράλληλα, την ίδια περίοδο, άλλες μελέτες σχετικές με το πτητικό προφίλ στα σιτηρά, πρότειναν την παρακολούθηση της εμφάνισης ορισμένων πτητικών ως δείκτη ποιοτικής υποβάθμισης και παραγωγής μυκοτοξινών (Stawicki *et al.*, 1973; Abramson *et al.*, 1980). Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών έδειξαν ότι ορισμένες πτητικές ουσίες είναι κοινές σε όλους τους μύκητες, ενώ άλλες εμφανίζονται σε ένα μόνο είδος και μπορούν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες ταξινόμησης (Schnürer *et al.*, 1999). Στη συνέχεια, οι Magan & Evans (2000), ανασκοπώντας τα αποτελέσματα των ερευνών για το πτητικό προφίλ των προσβεβλημένων σιτηρών από μύκητες, συμπέραναν ότι είναι πιο αξιόπιστο να περιγράφεται το συνολικό πτητικό προφίλ, ως συνδυασμός των πτητικών ουσιών που παράγονται και το οποίο μπορεί να είναι μοναδικό για το κάθε είδος.

Στη βιβλιογραφία είναι πολλές οι διαθέσιμες μελέτες που αναφέρονται στη χρήση του πτητικού προφίλ, ως εργαλείο ανίχνευσης της παρουσίας και δράσης των μυκήτων και της παραγωγής αφλατοξίνης, κυρίως στα σιτηρά και τα προϊόντα τους (Tuma *et al.*, 1989; Kaminski & Wasowicz, 1991; Larsen & Frisvad, 1995; Jelen & Wasowicz, 1998). Πιο συγκεκριμένα, οι Pasanen *et al.*, (1996) παρουσίασαν κάποια σχέση μεταξύ της



Σχήμα 17. Συνοπτική απεικόνιση των κυριότερων μεταβολικών μονοπατιών βιοσύνθεσης των πτητικών ουσιών από μύκητες (Schnürer *et al.*, 1999).

παραγωγής ορισμένων πτητικών ενώσεων και της παρουσίας μυκοτοξινών. Περαιτέρω προσπάθειες διαχωρισμού των τοξικογόνων από τα μη-τοξικογόνα στελέχη με βάση το πτητικό τους προφίλ έχουν δημοσιευθεί από διάφορους ερευνητές και αφορούν στελέχη, τα οποία αναπτύχθηκαν είτε σε τεχνητά υγρά υποστρώματα, είτε σε υπόστρωμα σιτηρών και αραχίδας (Zeringue *et al.*, 1993; Keshri & Magan, 2000; Sahgal *et al.*, 2007; Jurjevic *et al.*, 2008). Πιο πρόσφατα, σε μία μελέτη των De Lucca *et al.* (2012) διερευνήθηκαν τα πτητικά προφίλ από τοξικογόνα και μη-τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus* κατά την ανάπτυξή του σε αποστειρωμένο και μη-αποστειρωμένο αραβόσιτο. Σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν πτητικές ουσίες, οι οποίες προέρχονταν μόνο από τα αφλατοξικογόνα στελέχη, οι οποίες όμως διαφοροποιούνταν τόσο στον αριθμό όσο και στο είδος, μεταξύ των διαφόρων στελεχών του μύκητα *A. flavus*. Στους καρπούς, οι Beck *et al.* (2011), προσδιόρισαν ορισμένες πτητικές ουσίες σε αμύγδαλα προσβεβλημένα με αφλατοξίνη. Ωστόσο, η παραλλακτικότητα των αποτελεσμάτων εντός των δειγμάτων ήταν μεγάλη, με αποτέλεσμα να μην ήταν δυνατό να καθοριστούν ορισμένες πτητικές ενώσεις ως δείκτες της μόλυνσης με αφλατοξίνη.

Σε αυτό το πλαίσιο, έχουν πραγματοποιηθεί διεπιστημονικές μελέτες, με στόχο τη χρήση σύγχρονων τεχνολογικών εργαλείων ανίχνευσης των τοξικογόνων μυκήτων και των μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Τα μικροσυστήματα αυτά βασίζονται στη χρήση «δεικτών μόλυνσης», οι οποίοι μπορεί να είναι γενετικό υλικό, πτητικές οργανικές ουσίες ή άλλες χημικές ενώσεις, ενδεικτικές της παρουσίας μυκοτοξικογόνων μυκήτων ή μυκοτοξινών. Τέτοια τεχνολογικά εργαλεία τα οποία έχουν αναπτυχθεί είναι η ηλεκτρονική μύτη, η ηλεκτρονική γλώσσα, μικροσυστοιχίες DNA ή DNA chips, βιο-αισθητήρες και χημειο-αισθητήρες. Το στάδιο ανάπτυξης ή εφαρμογής αυτών των τεχνολογιών στα τρόφιμα περιγράφεται συνοπτικά στο άρθρο των Logrieco *et al.* (2005).

2.1.2. Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης των πτητικών ουσιών

2.1.2.1. Διεργασίες απομόνωσης και εκχύλισης

Οι μέθοδοι απομόνωσης των αρωματικών συστατικών από τα τρόφιμα βασίζονται στην πτητικότητα των ενώσεων αυτών και χωρίζονται ουσιαστικά σε δύο κατηγορίες και οι οποίες περιλαμβάνουν την απόσταξη και την ανάλυση των συστατικών του υπερκείμενου χώρου (headspace analysis). Η πρώτη, με κυριότερη μέθοδο την απόσταξη μεθ' υδρατμών αποτελεί την κλασική και παλαιότερη μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην απομόνωση ολικών πτητικών προϊόντων, αλλά περιλαμβάνει πολλαπλά

στάδια στο χειρισμό του δείγματος, είναι χρονοβόρα και λόγω της χρήσης οργανικών διαλυτών χαρακτηρίζεται ως μη-φιλική προς το περιβάλλον (Acena *et al.*, 2010). Διεργασίες όπως υγρή εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (π.χ. CO₂), είτε εκχύλιση στερεάς φάσης και προσρόφιση είναι δυνατό να προηγηθούν και χρησιμοποιούνται εναλλακτικά ως τεχνικές απομόνωσης των πτητικών (Schnürer *et al.*, 1999).

Η δεύτερη κατηγορία, βασίζεται στη διάχυση των πτητικών συστατικών από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο (headspace). Υπερκείμενος χώρος (headspace) είναι ο κενός χώρος που υπάρχει σε ένα ειδικό κλειστό φιαλίδιο, στο οποίο έχει τοποθετηθεί το προς ανάλυση στερεό ή υγρό δείγμα. Λόγω επαρκούς κατανομής των πτητικών συστατικών που έχουν διαχυθεί στον υπερκείμενο χώρο, δημιουργείται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα, από το οποίο με κατάλληλη τεχνική (χρήση ειδικής σύριγγας) λαμβάνεται δείγμα, το οποίο αναλύεται σε αεριοχρωματογράφο. Το ειδικό αυτό φιαλίδιο τοποθετείται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας συνήθως 25°C έως 30°C. Υψηλές θερμοκρασίες αποφεύγονται, ώστε να μη σχηματίζονται παραπροϊόντα, ενώ συστατικά με υψηλότερα σημεία ζέσεως δεν ανιχνεύονται με αυτή την τεχνική.

Ως μέθοδος είναι πολύ δημοφιλής, λόγω του μικρού δείγματος που απαιτείται και της αυτοματοποίησης που έχει επιτευχθεί και δίνει πολύ καλά αποτελέσματα εφόσον διατηρούνται οι ίδιες συνθήκες στο πείραμα. Η τεχνική αυτή, σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται σήμερα στην ανάλυση του αρωματικών συστατικών τροφίμων και ποτών, υπολειμμάτων διαλυτών και καλλυντικών. Δύο παραλλαγές της παραπάνω τεχνικής, οι οποίες είναι πολύ χρήσιμες για τον προσδιορισμό πτητικών συστατικών του υπερκείμενου χώρου είναι οι:

- Στατική τεχνική υπερκείμενου χώρου (static headspace sampling)
- Δυναμική τεχνική υπερκείμενου χώρου με διάταξη παγίδευσης (Dynamic Headspace Purge and Trap Sampling).

Σε μία συγκριτική μελέτη των Nilsson *et al.* (1996), οι πτητικές οργανικές ενώσεις που συλλέχθηκαν από μύκητες του γένους *Penicillium* ήταν παρόμοιες χρησιμοποιώντας τις δύο παραπάνω τεχνικές. Ωστόσο, η επίδραση της μεθόδου εκχύλισης στον χαρακτηρισμό του πτητικού προφίλ διαφόρων προϊόντων είναι πολύ σημαντική (Acena *et al.*, 2010). Γι' αυτό το λόγο, για κάθε υπόστρωμα (δείγμα τροφίμου), η επικύρωση μιας κατάλληλης μεθόδου, με την οποία να παραλαμβάνεται ένα αντιπροσωπευτικό εκχύλισμα πτητικών ουσιών παραμένει μια πρόκληση για τους αναλυτές.

2.1.2.2. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME)

Η SPME είναι μια τεχνική προετοιμασίας ενός δείγματος, στο οποίο πρόκειται να γίνει διαχωρισμός των πτητικών συστατικών του (Κωμαΐτης, 2014). Αναπτύχθηκε στις αρχές του 1990 και πρόκειται για μια τεχνική απλή, χαμηλού κόστους, στην οποία δεν χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες για την εκχύλιση και την παραλαβή των πτητικών συστατικών, ενώ παράλληλα παρέχει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, τα οποία μπορεί να φθάσουν σε μέρη στο τρισεκατομμύριο (ppt). Περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση μιας ίνας επικαλυμμένης με τη φάση εκχύλισης, η οποία μπορεί να είναι υγρή (πολυμερές) ή στερεή (προσοροφητικό), η οποία εκχυλίζει διάφορα είδη πτητικών συστατικών κυρίως. Η ποσότητα του συστατικού που εκχυλίζεται από το δείγμα στην ειδική αυτή ίνα είναι ανάλογη με τη συγκέντρωσή του στο δείγμα, εφόσον επιτευχθεί ισορροπία ή σε περίπτωση μικρού χρόνου προ-ισορροπίας, με τη βοήθεια θέρμανσης ή ανακίνησης του δείγματος. Μετά την εκχύλιση (περίοδος δειγματοληψίας), η ίνα μεταφέρεται στο θάλαμο εξάερωσης του αέριου χρωματογράφου (GC) ή σε υγρή κινητή φάση (LC), όπου γίνεται εκρόφιση και ανάλυση των συστατικών που απομονώθηκαν (Σχήμα 18).

Η μέθοδος της SPME χρησιμοποιείται για υγρά, αέρια και στερεά δείγματα και απομονώνει πτητικά και ημιπτητικά συστατικά. Ουσιαστικά, η SPME είναι μία μέθοδος εκχύλισης στερεής φάσης (SPE), με τη διαφορά ότι η τελευταία, πραγματοποιείται σε μια σχετικά μεγάλη προσροφητική επιφάνεια (το μέγεθος ενός φίλτρου) ενώ στην SPME χρησιμοποιείται μια πολύ μικρή προσροφητική επιφάνεια (ίνα), η οποία είναι επιστρωμένη με το προσροφητικό υλικό. Η επιτυχία στηρίζεται επάνω στην επιλογή των συνθηκών, έτσι ώστε οι αναλύτες να προσροφούνται στο υλικό πλήρωσης της SPME όσο το δυνατόν περισσότερο, παρουσία του ολικού δείγματος και έπειτα να εκροφούνται πλήρως και όσο το δυνατόν γρηγορότερα, για χρωματογραφική ανάλυση.



Σχήμα 18. Λειτουργία και μέρη της συσκευής της μεθόδου SPME.

Πιο αναλυτικά, η συσκευή, που χρησιμοποιείται, αποτελείται από μια τριχοειδή ίνα η οποία μπορεί να είναι είτε επιστρωμένη εξωτερικά με ένα προσροφητικό υλικό, τη στατική φάση (υλικό πλήρωσης ίνας) είτε στη μορφή ενός μικρού σωλήνα, ο οποίος επιστρώνεται στο εσωτερικό. Οι πρώτοι ερευνητές χρησιμοποίησαν οπτικές ίνες πηκτής τετηγμένου διοξειδίου του πυριτίου 1 cm, επικαλυμμένες με πολυαμίδιο ως στατική φάση. Τελευταία χρησιμοποιούνται ίνες με στατικές φάσεις πολυακρυλικές από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο. Η επιλογή του προσροφητικού στρώματος, καθώς και του πάχους του επηρεάζει έντονα το βαθμό προσρόφησης και την αποδοτικότητα της εκρόφησης. Η ίνα είναι συνδεδεμένη με ένα ατσάλενο έμβολο και μια συσκευή συγκράτησης που μοιάζει με μικροσύριγγα (Σχήμα 18).

Τα κυριότερα στάδια μιας ανάλυσης SPME περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω (Vas & Vékey, 2004):

Βήμα 1- εκχύλιση: Το δείγμα τοποθετείται σε φιαλίδιο, με διάτρητο πάωμα, το οποίο σφραγίζεται με διάφραγμα (septum). Πριν την ανάλυση, η ίνα πρέπει να καθαριστεί, διότι οι υπολειπόμενες προσμείξεις προκαλούν θόρυβο στο χρωματογράφημα. Η εισαγωγή της ίνας στο δείγμα γίνεται με διάτρηση του διαφράγματος του δοχείου και πίεση του εμβόλου προς τα κάτω. Στη συνέχεια, η ίνα εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος (headspace analysis -SPME) ή εμβαπτίζεται εντός του υγρού δείγματος. Στην περίπτωση της SPME με επιστρωμένο σωλήνα, το υγρό ή το αέριο δείγμα αντλείται απλά, ενώ είναι δυνατή η δειγματοληψία διακοπόμενης ροής. Οι ίνες μπορεί να χρησιμοποιηθούν για μέχρι και 100 εκχυλίσεις. Η ποσότητα των διαλυτών ουσιών στο στρώμα της SPME (στατικής φάσης της ίνας) φθάνει βαθμιαία σε ένα επίπεδο ισορροπίας, το οποίο αντιπροσωπεύει το μέγιστο που μπορεί να προσροφηθεί κάτω από τους δεδομένους όρους και συνθήκες δειγματοληψίας. Η συγκέντρωση της κάθε ουσίας που έχει προσροφηθεί από την ίνα είναι ανάλογη με την αρχική της ποσότητα, γεγονός το οποίο επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό. Σε αυτή τη φάση, σημαντική είναι η επίδραση του λόγου του όγκου της υπερκείμενης αέριας φάσης προς τον όγκο του δείγματος, στη συγκέντρωση των προσροφημένων συστατικών. Πρακτικά, οι όγκοι δειγμάτων προς τον υπερκείμενο αέριο χώρο διατηρούνται σταθεροί για όλες τις επαναλήψεις. Μία άλλη σημαντική παράμετρος είναι ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσει η διαλυτή ουσία στην ισορροπία μεταξύ του δείγματος και του στρώματος (προσροφητικού υλικού) της SPME. Η ανάδευση του δείγματος βοηθά στη μείωση του χρόνου, λόγω μεγιστοποίησης της έκθεσης του στρώματος SPME στο δείγμα. Ωστόσο δεν αυξάνει το ποσοστό διάχυσης των προσροφημένων διαλυτών ουσιών μέσα στο στρώμα

SPME. Επιπλέον, υπάρχει διαφορά στο χρόνο ισορροπίας εάν το δείγμα λαμβάνεται απ'ευθείας από το υγρό δείγμα ή από την αέρια υπερκείμενη φάση, δεδομένου ότι στην τελευταία περίπτωση η διαλυτή ουσία πρέπει να διασχίσει τη διεπιφάνεια υγρού-αερίου πριν το στρώμα SPME. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τους συντελεστές κατανομής μεταξύ των φάσεων κατά την εκχύλιση και προσρόφηση του δείγματος είναι η ιοντική ισχύς και το pH του δείγματος, αλλά και η θερμοκρασία. Η προσθήκη άλατος σε ένα υδατικό διάλυμα δείγματος θα μετατοπίσει τους συντελεστές κατανομής για τις μη-πολικές διαλυτές ουσίες υπέρ του στρώματος SPME και θα μειώσει το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί η ισορροπία. Σε κάθε περίπτωση, οι παράγοντες αυτοί θα πρέπει να κρατούνται υπό σταθερό έλεγχο για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων από δείγμα σε δείγμα.

Βήμα 2- μεταφορά: Το επόμενο βήμα μετά την προσρόφηση είναι η μεταφορά της ίνας με τους προσροφημένους αναλύτες μακριά από την έκθεση των δειγμάτων και σε συνθήκες ικανές για την εκρόφιση στην κινητή φάση χρωματογραφίας. Το ποσοστό φυσικής εκρόφισης είναι αρκετά χαμηλό για πολλές διαλυτές ουσίες, αλλά τα πτητικά μόρια έχουν σημαντικές απώλειες. Συνεπώς, ο χρόνος μεταφοράς θα πρέπει να είναι αρκετά σύντομος ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες. Εκτός όμως από τις πτητικές απώλειες, ένα στρώμα SPME μπορεί εύκολα να προσροφήσει συστατικά από τον αέρα του περιβάλλοντος και γι'αυτό το λόγο, οι εμπορικά διαθέσιμες συσκευές SPME ενσωματώνουν συστήματα σφράγισης.

Βήμα 3- εκρόφιση: Το στρώμα SPME εκτίθεται στον χρωματογράφο, σε συνθήκες τέτοιες ώστε οι προσροφημένες διαλυτές ουσίες να εκροφούνται με αποτελεσματικότητα απόδοσης 100%, σε χρόνο συμβατό με τη χρωματογραφία που επιλέγεται. Η εκρόφιση από την ίνα βασίζεται στα εξωτερικά στρώματα SPME και γίνεται απλούστερη με την εισαγωγή των ινών σε ένα σύστημα GC τριχοειδές με τον ίδιο τρόπο όπως μια σύριγγα. Αντίστοιχα, σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC), η υγρή κινητή φάση εκπλένει το εξωτερικό στρώμα SPME και παρασύρουν τις εκροφημένες διαλυτές ουσίες στο βρόγχο έγχυσης της LC. Στην αέρια χρωματογραφία, η θέρμανση των εισόδων (inlet liners) των σωλήνων σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία είναι απαραίτητη ώστε οι διαλυτές ουσίες να αφήνουν το στρώμα SPME γρήγορα. Ωστόσο, οι υψηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να προκαλέσουν θερμική αποσύνθεση και από το ίδιο το στρώμα SPME και να εισάγουν επιμολυντές στη στήλη.

Συμπερασματικά, το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής SPME είναι ότι η δειγματοληψία δεν επηρεάζεται από το υπόστρωμα, το οποίο θα παρεμπόδιζε το

χρωματογραφικό διαχωρισμό, με αποτέλεσμα να εφαρμόζεται με επιτυχία και σε δύσκολα υποστρώματα δειγμάτων. Η ευκολία στη χρήση, η ταχύτητα (λόγω του ότι η εκχύλιση και συμπύκνωση των πτητικών πραγματοποιείται σε ένα στάδιο), συνδυασμένη με την ανύπαρκτη χρήση διαλύτη κάνουν την SMPE μία ελκυστική εναλλακτική λύση σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους εκχύλισης πτητικών συστατικών. Όσον αφορά το κελυφωτό φιστίκι, η μελέτη των Acena *et al.* (2010) έδειξε ότι συγκριτικά με τις άλλες τεχνικές εκχύλισης, η εφαρμογή της HS-SPME δίνει πιο ακριβείς και αντιπροσωπευτικές πληροφορίες σχετικά με το αρωματικό προφίλ του προϊόντος.

2.1.2.3. Αέρια Χρωματογραφία – Φασματοσκοπία Μαζών (GC-MS)

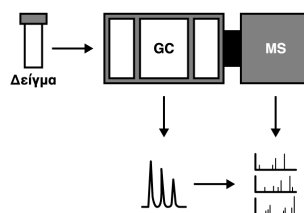
Τα αρωματικά συστατικά, μετά την απομόνωσή τους είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν με μια από τις παρακάτω ενόργανες τεχνικές (Κωμαΐτης, 2014):

- Αέρια Χρωματογραφία απλή (GC) ή πολυδιάστατη (MDGC)
- Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία ή Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)
- Αέρια Χρωματογραφία Ισοτοπικών λόγων-φασματοσκοπία μαζών (GCIR- MS)
- Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) για ορισμένα συστατικά
- Αέρια Χρωματογραφία - Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού κατά Fourier (GC-FTIR)
- Οσφρητική Αέρια Χρωματογραφία (GC-Sniffing) ή GC-Olfactometry (Ολφακτομετρία)
- Ηλεκτρονική Μύτη (Electronic Nose)

Η τεχνική του GC-MS είναι μία σύζευξη δύο ισχυρών αναλυτικών τεχνικών. Η αέρια χρωματογραφία (GC) διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος αποτελεσματικά και το φασματοφωτόμετρο μάζας (MS) παρέχει τις πληροφορίες που βοηθούν στην αναγνώριση της δομής κάθε συστατικού. Η ανάλυση με GC είναι η κυρίαρχη αναλυτική τεχνική για το διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων αντικαθιστώντας την απόσταξη, λόγω του ότι συνδυάζει την ταχύτητα της ανάλυσης, τον ακριβή διαχωρισμό, την ευκολία κατά τη λειτουργία της, τα άριστα ποσοτικά αποτελέσματα με όχι πολύ υψηλό κόστος. Ωστόσο, και στις δύο τεχνικές, η θερμοκρασία είναι μια σημαντική μεταβλητή. Στο διαχωρισμό με GC η χημική φύση (πολικότητα) της στατικής φάσης είναι μία ακόμα βασική μεταβλητή. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις της διαλυτής ουσίας είναι πολύ αραιές στις στήλες GC απομακρύνεται η περίπτωση σχηματισμού αζεοτροπικών μιγμάτων, η οποία δημιουργεί συχνά προβλήματα στους διαχωρισμούς με απόσταξη.

Δεδομένου ότι τα συστήματα GC δεν μπορούν να επιβεβαιώσουν την ταυτότητα ή τη δομή οποιασδήποτε κορυφής απαιτείται σύνδεση με φασματομέτρο μάζας. Απαιτεί μόνο μικρογραμμάρια του δείγματος και παρέχει στοιχεία για τον ποιοτικό προσδιορισμό των άγνωστων ενώσεων (δομή, στοιχειώδης σύνθεση, μοριακό βάρος) και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Η φασματομετρία μάζας είναι μια μέθοδος, κατά την οποία ηλεκτρόνια σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης προσκρούουν στα μόρια μιας ένωσης, η οποία βρίσκεται στην αέρια φάση και παράγουν ιόντα με θετικό συνήθως φορτίο. Τα παραχθέντα ιόντα διαχωρίζονται στη συνέχεια, ανάλογα με το λόγο μάζας προς το φορτίο m/z . Είναι μια σύγχρονη τεχνική με μεγάλες δυνατότητες και εφαρμογές. Μπορεί να συνδυαστεί με GC ή LC δίνοντας έτσι συνδυασμένες τεχνικές GC/MS (Σχήμα 19) ή LC/MS. Τα κυριότερα πλεονεκτήματά της είναι η αυξημένη ευαισθησία της και η υψηλή ικανότητα ταυτοποίησης ουσιών. Μειονέκτημα είναι το μεγάλο κόστος αγοράς και συντήρησης. Τόσο η αρχή λειτουργίας, όσο και η οργανολογία ενός συστήματος GC-MS είναι διαθέσιμα στη βιβλιογραφία και περιγράφονται με λεπτομέρεια (Κωμαΐτης, 2014). Η τεχνική GC-FTIR, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση πτητικών ενώσεων από μύκητες και επίσης, λόγω του ότι μπορεί να διαχωρίσει ισομερή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά με ένα σύστημα GC-MS (Schnürer *et al.*, 1999).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών ενός τροφίμου χρησιμοποιούνται συνήθως εσωτερικά πρότυπα, τα οποία εισάγονται στο προϊόν πριν την εκχύλιση. Ειδικότερα στη μέθοδο του headspace, η ποσοτική ανάλυση δεν είναι εύκολη, διότι οι ανακτήσεις των πτητικών εξαρτώνται από τη θερμοκρασία, την ταχύτητα ροής του αερίου και τους διαφορετικούς συντελεστές κατανομής των συστατικών. Ωστόσο, η ακρίβεια της μεθόδου μπορεί να βελτιωθεί με αυτόματους δειγματολήπτες. Τα ποιοτικά ή και ποσοτικά δεδομένα από διάφορες αναλύσεις όπως οι χρόνοι κατακράτησης, οι δείκτες Kovats για GC και τα φάσματα μαζών για MS είναι αποθηκευμένα σε ειδικές τράπεζες δεδομένων (βιβλιοθήκες) και χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων (Schnürer *et al.*, 1999).



Σχήμα 19. Σχηματική παράσταση σύνδεσης αεριοχρωματογράφου-φασματογράφου μαζών.

2.1.3. Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης

Από τα παραπάνω δεδομένα, γίνεται αντιληπτό ότι μέσα από την ανίχνευση, περιγραφή και παρακολούθηση του πτητικού προφίλ ενός προϊόντος μπορούν να αναζητηθούν χαρακτηριστικοί δείκτες μόλυνσης από μύκητες. Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι μεταξύ των ερευνητικών αποτελεσμάτων παρατηρούνται διαφορές στις πτητικές ουσίες που προσδιορίζονται, κυρίως στα σιτηρά, τα οποία έχουν μελετηθεί αρκετά. Εκτός από τις διαφορές, οι οποίες μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης και ανάλυσης των πτητικών ουσιών, οι υπόλοιπες οφείλονται στη χρήση διαφορετικού υποστρώματος ανάπτυξης, στη διαφορετική ενεργότητα νερού του υποστρώματος, στη θερμοκρασία επώασης, αλλά και στην ηλικία της καλλιέργειας (Sunesson *et al.*, 1995; Magan & Evans, 2000). Επιπλέον, έχουν καταγραφεί διαφοροποιήσεις στην παραγωγή πτητικών ουσιών και μεταξύ των στελεχών από το ίδιο είδος μύκητα, γεγονός που υποδεικνύει διαφορές στο μεταβολισμό τους (De Lucca *et al.*, 2012). Επίσης, η φυσική μικροχλωρίδα του τροφίμου και η ταυτόχρονη παρουσία άλλων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, επηρεάζουν το γενικό πτητικό προφίλ του τροφίμου (Spraker *et al.*, 2014).

Στους ξηρούς καρπούς, η διαθέσιμη βιβλιογραφία όσον αφορά την παραγωγή πτητικών ουσιών από μύκητες είναι πολύ περιορισμένη. Η ερευνητική ομάδα των Beck *et al.* (2011) μελέτησε τις πτητικές ουσίες που παράγονται σε αμύγδαλα τα οποία είχαν απορριφθεί κατά τη διαλογή και είχαν υψηλή πιθανότητας μόλυνσης με αφλατοξίνη και σε αντίστοιχα δείγματα, τα οποία είχαν υποβληθεί σε ζεμάτισμα (blanching). Ωστόσο, το πτητικό προφίλ των κελυφωτών φιστικιών, τα οποία έχουν μολυνθεί με στελέχη του μύκητα *A. flavus* δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί.

Ο στόχος της μελέτης αυτού του κεφαλαίου είναι να διερευνηθεί το πτητικό προφίλ σε υγιή και μολυσμένα με αφλατοξίνη κελυφωτά φιστίκια και να ταυτοποιηθούν οι πτητικές αυτές ουσίες, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές των μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων και οι οποίες εν δυνάμει, θα μπορούσαν να αποτελέσουν αξιόπιστους δείκτες της μόλυνσης, άρα και εργαλεία για το διαχωρισμό των υγιών. Ωστόσο, οι παράμετροι που αναφέρθηκαν παραπάνω και επηρεάζουν το πτητικό προφίλ, όπως η ταυτόχρονη παρουσία στο προϊόν διαφόρων τάξεων μυκήτων ή και άλλων μικροοργανισμών εκτός της ομάδας *Flavi* των ασπεργίλλων, η παρουσία μη-τοξικογόνων στελεχών εντός της ομάδας και εντός του είδους *A. flavus*, ο χρόνος και ο τρόπος παραγωγής της αφλατοξίνης, η πιθανή φυσική παραλλακτικότητα στις πτητικές ουσίες που υπάρχουν ακόμα και μεταξύ

των καρπών της ίδιας ποικιλίας, πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό. Συνεπώς, τα αντικείμενα της μελέτης μπορούν να περιγραφούν ως:

- η απομόνωση και ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών σε δείγματα αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών, τα οποία κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες, που ονομαστικά αναφέρονται ως, **H**: Υγιή (Healthy), **NC**: Φυσικά μολυσμένα με αφλατοξίνη (Naturally Contaminated), **AC**: Τεχνητά μολυσμένα με αφλατοξικογόνο στέλεχος του μύκητα *A. flavus* (Artificially Contaminated) και **ANT**: Τεχνητά μολυσμένα με μη-τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus* (Artificially Non-Toxigenic strains)
- η επιλογή των ουσιών που σχετίζονται και χαρακτηρίζουν περισσότερο, ή κατ' αποκλειστικότητα, το πτητικό προφίλ των μολυσμένων με αφλατοξίνη φιστικιών
- η αξιολόγηση της δυνατότητας ταξινόμησης και διαχωρισμού των επιμέρους δειγμάτων στις ομάδες που ανήκουν, βάσει του πτητικού τους προφίλ.

2.2. Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1. Δειγματοληψία και χειρισμός των φιστικιών

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 28 δείγματα αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών της τοπικής ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης». Τα δείγματα ήταν ομαδοποιημένα σε τέσσερις κατηγορίες: 1) υγιή (**H**), 2) μολυσμένα με αφλατοξίνη με φυσικό τρόπο (**NC**), 3) μολυσμένα με τοξικογόνο στελέχος του μύκητα *A.flavus* (**AC**) και 4) μολυσμένα με πέντε διαφορετικά μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A.flavus* (**ANT**). Τα δείγματα της ομάδας των υγιών (H) προήλθαν από διάφορες περιοχές καλλιέργειας του κελυφωτού φιστικιού στην Ελλάδα και συγκομίστηκαν το έτος 2010. Τα δείγματα που ήταν προσβεβλημένα με αφλατοξίνη με φυσικό τρόπο προήλθαν από διάφορες τοπικές μονάδες επεξεργασίας κελυφωτού φιστικιού και βρίσκονταν στο στάδιο της απόσυρσης. Τα δείγματα από τις ομάδες των τεχνητά μολυσμένων κελυφωτών φιστικιών (AC και ANT) προήλθαν από τα αντίστοιχα δείγματα των υγιών, αφού επιμολύνθηκαν με στελέχη του μύκητα *A. flavus* στο εργαστήριο, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω (§ 2.2.2). Το τελικό βάρος κάθε δείγματος ήταν 0.5 κιλά και τοποθετήθηκαν σε ερμητικά κλειστές πλαστικές σακούλες στο ψυγείο, μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας και ανάλυσης. Στον Πίνακα 8 δίδονται όλες οι πληροφορίες σχετικά με την προέλευση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, ανά κατηγορία.

2.2.2. Τεχνική μόλυνσης με στελέχη του μύκητα *Aspergillus flavus*

Τα δείγματα των ομάδων AC και ANT επιμολύνθηκαν τεχνητά στο εργαστήριο, με αφλατοξικογόνα και μη-αφλατοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A.flavus*, αντίστοιχα. Όλα τα στελέχη (τόσο τα τοξικογόνα, όσο και τα μη-τοξικογόνα) απομονώθηκαν από ελληνικά κελυφωτά φιστίκια, τα οποία είχαν συλλεχθεί από φιστικεώνες διαφόρων περιοχών καλλιέργειας στην Ελλάδα, κυρίως της Φθιώτιδας και της Αίγινας. Αρχικά, αξιολογήθηκε η τοξικογόνος ικανότητα των στελεχών που απομονώθηκαν, επιμολύνοντας σπέρματα φιστικιού και μετρώντας τη συγκέντρωση της αφλατοξίνης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC), όπως περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.2.3. (Tsitsigiannis *et al.*, 2010a; 2010b). Στη συνέχεια, τα στελέχη τα οποία δεν παρήγαγαν αφλατοξίνη (μη-τοξικογόνα) χαρακτηρίστηκαν και ομαδοποιήθηκαν γενετικά με τη χρήση των Απλών Επαναλαμβανόμενων Αλληλουχιών ή μικροδορυφορικών δεικτών (Simple Sequence Repeats – SSRs ή Microsatellites) εφαρμόζοντας τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με ένα πολλαπλό σετ εκκινητών

Πίνακας 8. Περιγραφή των δειγμάτων αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του πτητικού προφίλ.

Ομάδες	Ταυτότητα Δείγματος	Προέλευση	Χρόνος συγκομιδής	Μέθοδος ξήρανσης
H: Υγιή	H-1	Αίγινα	κανονικός	φυσική
	H-2	Αίγινα	>>	ξηραντήριο
	H-3	Καπανδρίτι	>>	φυσική
	H-4	Μάκρη	>>	>>
	H-5	Εύβοια	πρώιμα	>>
	H-6	Εύβοια	όψιμα	>>
	H-7	Πόρος	κανονικός	>>
	H-8	Βοτανικός	>>	>>
NC: Φυσικά μολυσμένα με αφλατοξίνη	NC-1	Αίγινα	>>	>>
	NC-2	Αίγινα	>>	>>
	NC-3	Μαρκόπουλο	>>	>>
	NC-4	Αίγινα	>>	>>
	NC-5	Αίγινα	>>	>>
	NC-6	Αίγινα	>>	>>
	NC-7	Αίγινα	>>	>>
	NC-8	Αίγινα	>>	>>
	NC-9	Αίγινα	>>	>>
	NC-10	Αίγινα	>>	>>
AC: Τεχνητά μολυσμένα με τοξικογόνο στέλεχος του μύκητα <i>A. flavus</i>	AC-1	Αίγινα	>>	>>
	AC-2	Καπανδρίτι	>>	>>
	AC-3	Μάκρη	>>	>>
	AC-4	Εύβοια	πρώιμα	>>
	AC-5	Πόρος	κανονικός	>>
ANT: Τεχνητά μολυσμένα με μη-τοξικογόνα στελέχη του μύκητα <i>A. flavus</i>	ANT-1	Μάκρη	>>	>>
	ANT-2	Μάκρη	>>	>>
	ANT-3	Αίγινα	>>	>>
	ANT-4	Εύβοια	>>	>>
	ANT-5	Μάκρη	>>	>>

(Georgiadou *et al.*, 2012b). Ωστόσο, λόγω του ότι ο γενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός των ελληνικών μη-τοξικογόνων απομονώσεων δεν περιλαμβάνεται στους στόχους της παρούσας διατριβής, δε θα αναλυθεί περαιτέρω.

Μεταξύ των στελεχών στα οποία μετρήθηκε υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης (τοξικογόνα στελέχη), επιλέχθηκε ένα για επιμόλυνση της ομάδας των δειγμάτων AC και προσδιορίστηκε ο μορφότυπός του (L ή S στέλεχος), με βάση το μέγεθος των σκληρωτίων, όπως περιγράφεται στη μελέτη του Cotty (1989). Ο προσδιορισμός του μορφότυπου πραγματοποιήθηκε με επώαση των κονιδίων του στελέχους σε εκλεκτικό υπόστρωμα 5/2 άγαρ (5% V8 χυμός και 2% άγαρ), για πέντε ημέρες στο σκοτάδι στους 31 °C (Cotty, 1989). Μετά την ανάπτυξη των σκληρωτίων μετρήθηκε η διάμετρος τους

σε σύνθετο μικροσκόπιο (N-400FL, Optika, Italy), στο οποίο υπάρχει ενσωματωμένο οπτικό μικρόμετρο. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, τα πέντε δείγματα της ομάδας των AC επιμολύνθηκαν τεχνητά με ένα τοξικογόνο στέλεχος (αναφέρεται ως Δ.1-3 AF2), ενώ τα άλλα πέντε δείγματα της ομάδας ANT επιμολύνθηκαν με επιλεγμένα μη τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* (αναφέρονται ως AF48-GR, AF54-GR, AF38-GR, AF27-GR και AF47-GR) από τη συλλογή ασπεργίλλων του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.). Όλα τα στελέχη των μυκήτων *Aspergillus section Flavi* (μονόσπορες αποικίες) είναι διατηρημένα στη μορφή κονιδίων, σε αποστειρωμένα κρυσταλλικά με 1mL αποστειρωμένο διάλυμα γλυκερόλης 25% v/v σε βαθιά κατάψυξη (-80°C). Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της επιμόλυνσης, τα στελέχη ενεργοποιούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar) κι επωάζονται στους 28°C μέχρι να σχηματίσουν ικανοποιητικό αριθμό κονιδιοφόρων (4-5 ημέρες).

Για την επιμόλυνση καθενός από τα δέκα της ομάδας των AC και ANT επιλέγονται τυχαία 100 κελυφωτά φιστίκια (~ 50g) από το αντίστοιχο δείγμα των υγιών (H) και ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία για την επιμόλυνσή τους:

Βήμα 1 - επιφανειακή απολύμανση: Οι καρποί (μαζί με το κέλυφος) εμβάπτιζονται σε 10% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (NaClO) για τρία λεπτά. Στη συνέχεια, ακολουθεί ξέπλυμα με στιγμιαία εμβάπτιση σε απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό, γρήγορη εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης και μία τελική πλύση πάλι με νερό. Έπειτα, τοποθετούνται σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί να στεγνώσουν. Η διαδικασία της επιφανειακής απολύμανσης πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής, ενώ όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα σε κλίβανο.

Βήμα 2 – Προετοιμασία διαλύματος μόλυνσης: Παρασκευάζεται υδατικό αιώρημα κονιδίων με 0.01% Tween 80 σε συγκέντρωση 10^6 κονίδια/mL. Η μέτρηση των κονιδίων πραγματοποιείται με τη βοήθεια αιματοκυττομέτρου.

Βήμα 3 – Επιμόλυνση καρπών: Οι επιφανειακά απολυμασμένοι καρποί μεταφέρονται σε κωνικές φιάλες των 500mL, οι οποίες περιέχουν το αιώρημα της μόλυνσης (300mL) και παραμένουν υπό ανάδευση (80 rpm), σε επωαστικό θάλαμο με ανακίνηση για 30 λεπτά.

Βήμα 4 – Επώαση: Οι καρποί τοποθετούνται μέσα σε πλαστικούς περιέκτες επώασης, με υγρό διηθητικό χαρτί στον πάτο, ώστε να διατηρείται υψηλή σχετική υγρασία στο εσωτερικό (Σχήμα 20α,β). Οι επιμολυσμένοι καρποί επωάζονται για εννέα ημέρες σε θερμοκρασία 28°C και φωτοπερίοδο 14 ώρες φως και 10 ώρες σκοτάδι. Ο αριθμός των ημερών επώασης (9 ημέρες) βασίστηκε σε οπτικές παρατηρήσεις (ανάπτυξη μυκηλίου, κονιδίων), αλλά και σε αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων, στα οποία

μετρήθηκε η παραγωγή αφλατοξίνης του τοξικογόνου στελέχους Δ.1-3 AF2 του μύκητα *A. flavus* σε διαφορετικές ημέρες επώασης (1-9 ημέρες). Μετά το πέρας της περιόδου επώασης, αφαιρείται το κέλυφος και κάθε δείγμα ξεχωριστά αποθηκεύεται σε καταψύκτη στους -18°C . Πριν από κάθε μέτρηση ή ανάλυση κάθε δείγμα αλέθεται σε εργαστηριακό μύλο (Tekmar A-10).

Επιπλέον, δύο δείγματα (H-3, H-4) από την ομάδα των υγιών (H) και ένα δείγμα από την ομάδα των μολυσμένων με αφλατοξίνη με φυσικό τρόπο (NC-3) υποβλήθηκαν στην ίδια ακριβώς προαναφερόμενη διαδικασία, όπως ακριβώς τα δείγματα των ομάδων AC και ANT, με μόνη διαφορά ότι το αιώρημα της μόλυνσης δεν περιείχε κονίδια του μύκητα, αλλά μόνο αποστειρωμένο νερό. Στόχος του πειράματος αυτού ήταν να εκτιμηθεί αν η διαδικασία της μόλυνσης και επώασης επιδρά και σε πιο βαθμό στο πτητικό προφίλ των προϊόντων. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις.



(α)



(β)

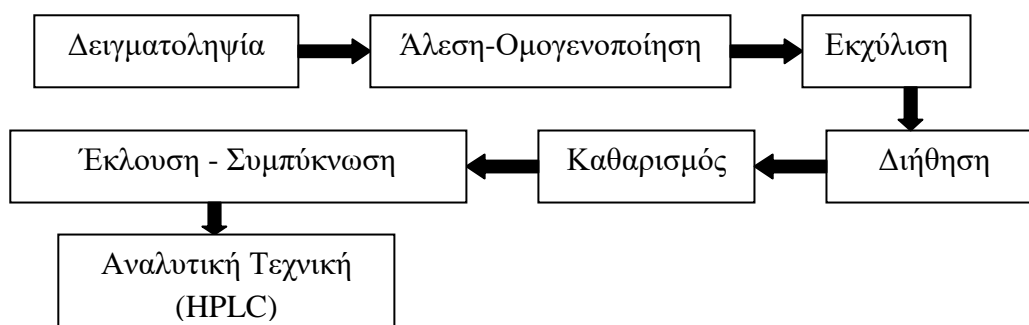


Σχήμα 20. Τεχνητά επιμολυσμένο δείγμα κελυφωτού φιστικιού (α) πριν την επώαση (β) μετά την επώαση.

2.2.3. Ανάλυση αφλατοξίνης

2.2.3.1. Προετοιμασία – Εκχύλιση - Καθαρισμός δειγμάτων

Σε οκτώ γραμμάρια ψιλοαλεσμένου σπέρματος φιστικιού μετρήθηκε η συγκέντρωση αφλατοξίνης από κάθε δείγμα των ομάδων NC και AC. Η διαδικασία της ανάλυσης αφλατοξίνης που ακολουθήθηκε περιγράφεται με λεπτομέρεια στη μελέτη των Georgiadou *et al.* (2012a). Η ανάλυση πραγματοποιείται με HPLC, σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους 2005.08 και 999.07 του AOAC. Στο Σχήμα 21 παρουσιάζονται συνοπτικά όλες οι φάσεις της διαδικασίας προσδιορισμού των αφλατοξινών. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται διάλυμα CH₃OH-H₂O 8:2 v/v, σε αναλογία 1:5 με το βάρος του δείγματος. Προσθέτονται επίσης 20mL n-εξανίου για το διαχωρισμό της φάσης του ελαίου και 5 g NaCl για αύξηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος και της εκχυλιστικής ικανότητας του διαλύτη. Στη συνέχεια, ακολουθεί ομογενοποίηση του δείγματος για τουλάχιστο 5 λεπτά σε υψηλή ταχύτητα (Ultra Turrax T25 basic IKA –Werke) (Σχήμα 22α). Πριν από τον καθαρισμό των δειγμάτων με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC, AflaClean™ 3mL widebore, LC Tech) προηγείται μια προκαταρκτική διαδικασία καθαρισμού του υποκειμένου (υδατική φάση του διηθήματος) (Σχήμα 22β) με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH: 7.2) με διήθηση σε φίλτρο Whatman 1 – 110 mm (Σχήμα 22γ) και σε φίλτρο 0.2μm με τη βοήθεια αντλίας, ώστε να αφαιρεθεί η επιπλέον τυρβώτητα και να είναι διαυγές. Κατόπιν, το δείγμα περνά άμεσα από τις στήλες IAC με ροή 2mL/λεπτό, προσαρμοσμένες σε κατάλληλη συσκευή Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction - SPE) (Σχήμα 22δ). Η έκλυση και παραλαβή της αφλατοξίνης πραγματοποιείται με πέρασμα από τη στήλη IAC διαλύματος CH₃OH (HPLC grade, MERCK, 1.06007.2500). Το μεθανολικό διάλυμα συλλέγεται σε γυάλινα φιαλίδια των 4mL, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, σε σύστημα υγρού αζώτου και αποθηκεύεται στο ψυγείο μέχρι να αναλυθεί στην HPLC.

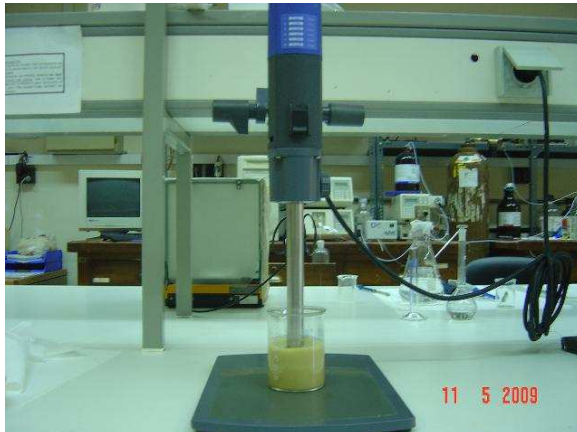


Σχήμα 21. Διάγραμμα ροής της μεθόδου προσδιορισμού αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια.

2.2.3.2. Ανάλυση στην HPLC

Το σύστημα ανάλυσης HPLC για αφλατοξίνες περιλαμβάνει:

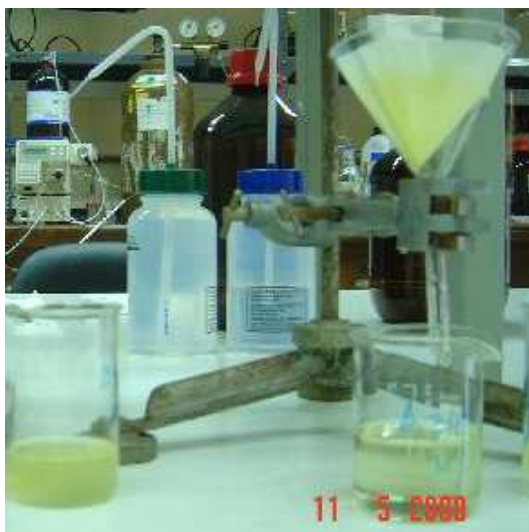
- αντλία & σύστημα εισαγωγής: JASCO PU 980
- διαλύτες – κινητή φάση: νερό-μεθανόλη-ακετονιτρίλιο (6-2-2) με ταχύτητα ροής 1mL/λεπτό, ισοκρατική έκκλουση
- σύστημα απαέρωσης με ήλιο: VWR 2004



(α)



(β)



(γ)



(δ)

Σχήμα 22. Στάδια προετοιμασίας και καθαρισμού των δειγμάτων πριν την εισαγωγή του στην HPLC.

(α) Άλεση και ομογενοποίηση του δείγματος με τον διαλύτη εκχύλισης σε υψηλή ταχύτητα σε Ultra Turrax

(β) Διήθηση του αλεσμένου δείγματος, συλλογή του εκχυλίσματος και διαχωρισμός του σε δύο φάσεις: λαδιού (υπερκεείμενη), υδατική (υποκείμενη)

(γ) Διήθηση του διαλύματος με PBS σε φίλτο Whatman 1– 110 mm

(δ) Καθαρισμός δειγμάτων με χρήση στηλών ανοσοσυγγένειας (IAC) σε συσκευή SPE

- σύστημα εισαγωγής δείγματος με θάλαμο έγχυσης (loop): 100 μ L
- στήλη: ODS Hypersyl-Thermo Scientific, 4.6 x 250 mm, 5 mm particle size
- σύστημα παραγωγοποίησης σε διάταξη μετά τη στήλη (post-column derivatization): φωτοχημικός αντιδραστήρας με υπεριώδες φως (UVE) στα 254nm
- φθορισμομετρικός ανιχνευτής: JASCO FP920-Co. Ltd., Japan, μήκος διέγερσης 360nm - μήκος εκπομπής 435nm
- Ολοκληρωτής: Clarity Lite software (Hewlett Packard HP3394A)

Πριν την εισαγωγή του δείγματος στην είσοδο της HPLC γίνεται επαναδιάλυση των αποθηκευμένων δειγμάτων σε 0.5mL διαλύτη της κινητής φάσης (νερό-μεθανόλη-ακετονιτρίλιο 6:2:2) με τελική συμπύκνωση 2.8 φορές. Για κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

2.2.3.3. Καμπύλες βαθμονόμησης αφλατοξινών

Για την ποσοτικοποίηση της αφλατοξίνης προετοιμάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε μία από τις τέσσερις αφλατοξίνες ξεχωριστά (B_1 , B_2 , G_1 , G_2), χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις από πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης (Aflatoxin Mix Kit-M, SUPELCO, 0.3 μ g/mL B_2, G_2 1 μ g/mL B_1, G_1 σε μεθανόλη). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν για τις B_1 , G_1 : 2, 4, 8, 10, 15, 20, 25, 50 και 100 ppb και αντίστοιχα για τις B_2 , G_2 : 0.6, 1.2, 2.4, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 15 και 30 ppb. Για κάθε μία συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις, ενώ βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε δύο φορές κατά τη διάρκεια της διδακτορικής έρευνας, το 2011 (Σχήμα 23) και το 2013, πριν την έναρξη των αναλύσεων αφλατοξίνης.

2.2.3.4. Δοκιμές ανάκτησης

Οι τιμές ανάκτησης προσδιορίστηκαν από τις σχετικές δοκιμές σε απαλλαγμένα από αφλατοξίνη δείγματα, τα οποία μολύνθηκαν με γνωστή συγκέντρωση από πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης (5, 10 και 20 μ g/kg ολική αφλατοξίνη) σε ποσότητα 1mL. Στο Σχήμα 24 απεικονίζεται το HPLC χρωματογράφημα από τη σχετική δοκιμή ανάκτησης, σε συγκέντρωση 20 μ g/kg ολική αφλατοξίνη, μαζί με το αντίστοιχο χρωματογράφημα από την ανάλυση προτύπου αφλατοξίνης στην ίδια συγκέντρωση. Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών ανάκτησης, το αποτέλεσμα της κάθε μέτρησης από τα άγνωστα δείγματα διορθώνεται σύμφωνα με το ποσοστό ανάκτησης (Πίνακας 9).

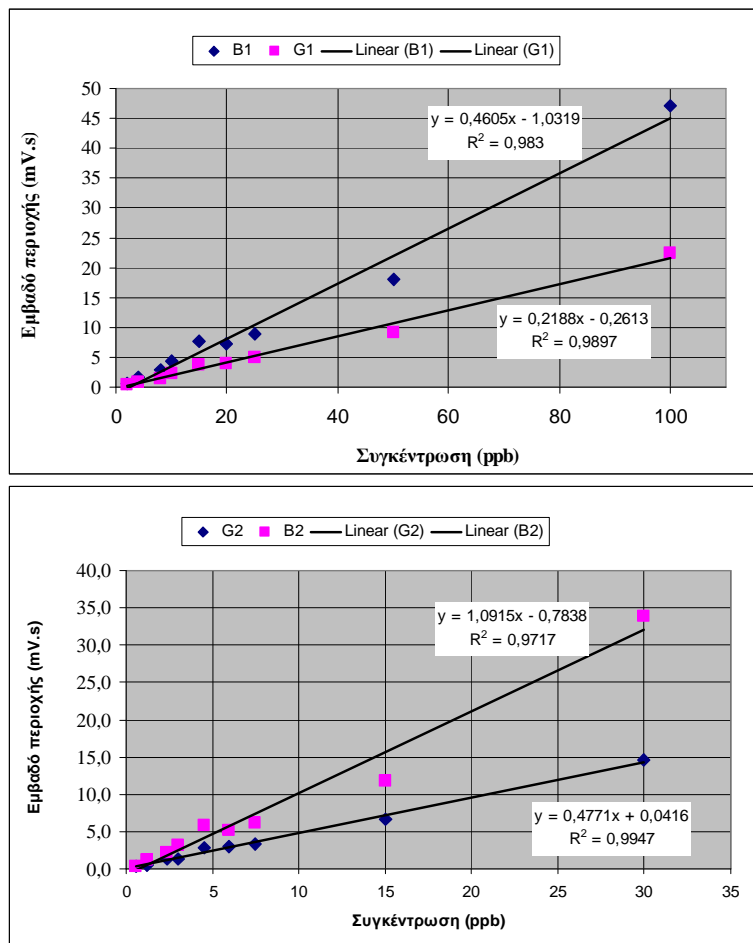
Πίνακας 9. Τιμές ανάκτησης (%) των αφλατοξινών B₁, G₁, B₂ και G₂ σε τεχνητά μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα κελυφωτών φιστικιών.

	Ολική μg/kg ^α	5 % ανάκτηση	Ολική 10 μg/kg ^β	% ανάκτηση	Ολική 20 μg/kg ^β	% ανάκτηση	% Μέση ανάκτηση
B₁	2	73.2	4	94.6	8	82.1	84.6
G₁	2	69.0	4	81.7	8	78.3	77.3
B₂	0.5	69.5	1	90.4	2	74.5	79.2
G₂	0.5	67.7	1	86.0	2	71.8	76.1

^α: 2 επαναλήψεις

^β: 3 επαναλήψεις

Από τον Πίνακα 2 φαίνεται ότι τα ποσοστά ανάκτησης είναι σύμφωνα με τα κριτήρια απόδοσης για τις αφλατοξίνες, όπως αναφέρονται στη νομοθεσία (KAN. ΕΚ 401/2006).

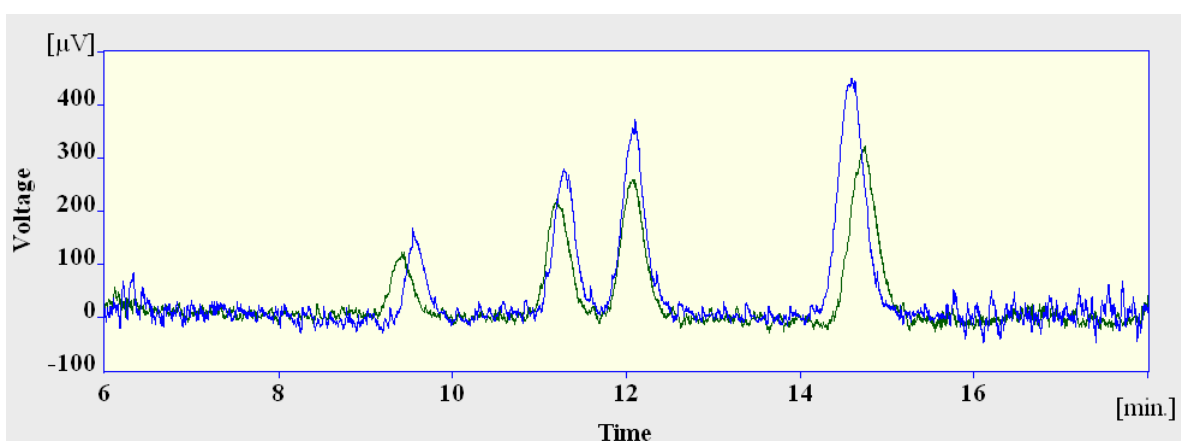


Σχήμα 23. Καμπύλη βαθμονόμησης για τις αφλατοξίνες B₁, G₁ (πάνω διάγραμμα) και B₂, G₂ (κάτω διάγραμμα).

2.2.4. Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία

Σε όλα τα δείγματα, πριν την ανάλυση του πτητικού τους προφίλ μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε υγρασία σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο 925.40 του AOAC. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, από το αρχικό δείγμα λαμβάνεται μία ποσότητα 2.5g ψιλοαλεσμένου σπέρματος ζυγισμένο σε αναλυτικό ζυγό (Mark 2200) και τοποθετείται σε κεραμικές κάψες ξήρανσης, οι οποίες έχουν προθερμανθεί σε ηλεκτρικό φούρνο (Gallenkamp, Plus Oven) στους 100°C για 5 λεπτά και τοποθετηθεί να κρυσώσουν σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο (P₂O₅). Τόσο το απόβαρο (M1) της κάθε κάψας, όσο και το μικό τους βάρος (M2) προσδιορίζονται σε ζυγό ακριβείας (Sartorius, B 120 S, Germany). Στη συνέχεια, οι κάψες τοποθετούνται σε κλίβανο στους 102°C και σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται μετρήσεις (M3) μέχρι να σταθεροποιηθεί το βάρος τους (δύο διαδοχικές μετρήσεις να μην διαφέρουν περισσότερο από 0.001g) (Yanniotis & Zarboutis, 1996). Σε αυτό το σημείο θεωρείται ότι έχει αφαιρεθεί η περιεχόμενη υγρασία του δείγματος. Πριν από κάθε μέτρηση, οι κάψες αφήνονται στο ξηραντήριο να ισορροπήσουν με τη θερμοκρασία του χώρου. Πέντε επαναλήψεις πραγματοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα. Η αρχική περιεχόμενη υγρασία των καρπών του δείγματος εκφρασμένη σε g νερού/100g καρπών υπολογίζεται από τον τύπο:

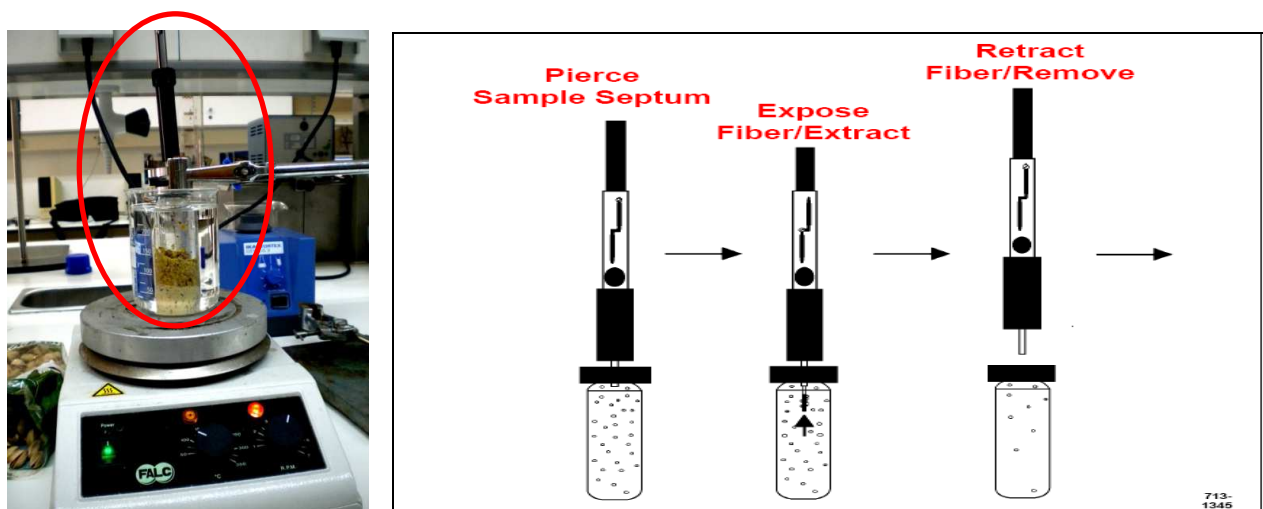
$$Y = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100 \quad \text{Εξ. 1}$$



Σχήμα 24. HPLC χρωματογραφήματα από την ανάλυση του πρότυπου διαλύματος αφλατοξίνης (υψηλότερες κορυφές) ολικής συγκέντρωσης 20μg/kg (8 μg/kg B₁,G₁ και 2μg/kg B₂,G₂) και του αντίστοιχου τεχνητά μολυσμένου δείγματος με την ίδια συγκέντρωση αφλατοξίνης, σε δοκιμή ανάκτησης.

2.2.5. Απομόνωση και συγκέντρωση των πτητικών με HS-SPME

Η απομόνωση των πτητικών συστατικών από το φυσίκι πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεής-φάσης (SPME) από υπερκείμενη αέρια φάση (Headspace, HS), εν συντομία HS-SPME. Η διαδικασία εκχύλισης, καθώς και η επιλογή της SPME ίνας έγινε σύμφωνα με τη μελέτη των Acena *et al.*, 2010 και περιγράφεται παρακάτω. Από κάθε δείγμα, λαμβάνονται 10g ψιλοαλεσμένου σπέρματος φυσικιού, τα οποία ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας (Sartorius, B 120 S, Germany). Στη συνέχεια τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο των 40mL με βιδωτό διάτρητο καπάκι με κλείστρο (Sigma–Aldrich, Athens, Greece), στο οποίο έχει τοποθετηθεί μαγνήτης ανάδευσης και προσθέτονται 10mL απεσταγμένο H₂O (Chroma Solv Plus for HPLC) και 20mg/L 2-πεντανόλη (εσωτερικό πρότυπο για την ανάλυση), έτσι ώστε η αναλογία δείγμα/υπερκείμενος χώρος να είναι 1:1. Το φιαλίδιο αφού σφραγιστεί άμεσα, αφήνεται να ισορροπήσει σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο για 15 λεπτά στους 50°C υπό ανάδευση. Μετά την ολοκλήρωση του απαιτούμενου χρόνου εξισορρόπησης, εισάγεται η μικροσύριγγα της SPME (DVB/CAR/PDMS 50/30μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) από το διάτρητο καπάκι και πιέζοντας το έμβολο προς τα κάτω, η ίνα εισέρχεται μέσα στον υπερκείμενο κενό χώρο του φιαλιδίου (Σχήμα 25). Ο συνολικός χρόνος έκθεσης της ίνας είναι 2 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση και σε σταθερή θερμοκρασία 50°C με το μήκος της ίνας να διατηρείται σταθερό. Μετά το πέρας της έκθεσης, η μικροσύριγγα της SPME απομακρύνεται από το φιαλίδιο, τραβώντας το έμβολο προς τα πάνω και εισάγεται αμέσως στη θύρα έγχυσης του GC (Σχήμα 26).

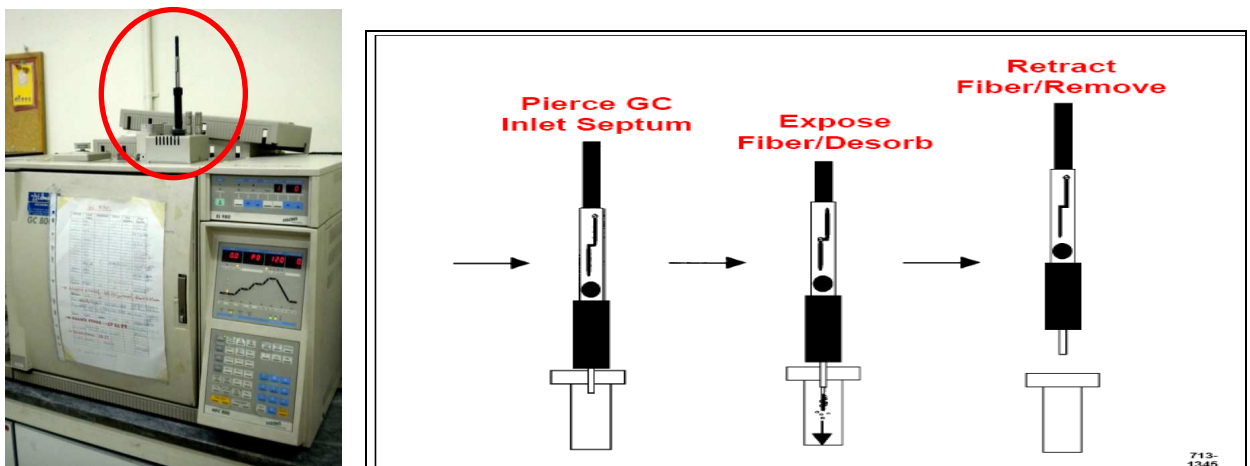


Σχήμα 25. Εκχύλιση πτητικών συστατικών με HS-SPME.

Πριν από κάθε ανάλυση, η ίνα της SPME καθαρίζεται θερμικά στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου σε θερμοκρασία 230°C (θερμοκρασία που συνίσταται από τον κατασκευαστή) για 10 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν οι πτητικές ουσίες που έχουν εναπομείνει ή διάφοροι επιμολυντές που τυχόν έχουν προσροφηθεί. Πριν την έναρξη ανάλυσης των δειγμάτων πραγματοποιείται μια τυφλή δοκιμή.

2.2.6. Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ουσιών

Για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών ουσιών στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην § 2.2.5., πριν τη σφράγιση του φιαλιδίου, το οποίο περιέχει το δείγμα και το νερό, προστίθεται διάλυμα 20 µL 2-πεντανόλης, ως εσωτερικό πρότυπο. Στο τέλος της ανάλυσης, διαιρώντας το εμβαδό της κάθε κορυφής από το χρωματογράφημα του GC-FID, προς το εμβαδό της κορυφής του προτύπου και πολλαπλασιάζοντας με τη συγκέντρωσή του (εκφρασμένη σε mg/L) υπολογίζεται η ποσότητα κάθε ταυτοποιημένης πτητικής ουσίας.



Σχήμα 26. Εισαγωγή της ίνας στον αέριο χρωματογράφο (GC-FID) και εκρόφηση των πτητικών συστατικών.

2.2.7. Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC)

2.2.7.1. Προσδιορισμός πτητικών με GC-FID

Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων που προσροφήθηκαν στην SPME ίνα, πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο (Fisons Instruments, GC 8000 series, Model 8060), εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID), μία μη-πολική τριχοειδή στήλη Equity 5 (30 mm x 0.25 mm, πάχος φιλμ 0.25 μm, Supelco) και φέρον αέριο ήλιο υψηλής καθαρότητας, με ρυθμό ροής 1mL/λεπτό. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν προγραμματισμένη στους 40°C για 12 λεπτά και στη συνέχεια με βαθμιδωτή αύξηση έως τους 240°C με ρυθμό 5°C/ λεπτό παρέμενε για 12 λεπτά. Ο εισαγωγέας λειτουργούσε με σύστημα διαχωρισμού ροής (split injection) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία 230°C, ενώ ο ανιχνευτής είχε προγραμματιστεί στους 270°C, αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε συγκρίνοντας τους γραμμικούς δείκτες κατακράτησης (LRI) με τους αντίστοιχους δείκτες πρότυπων ουσιών (πειραματικών και βιβλιογραφίας). Οι LRI υπολογίστηκαν με βάση τους χρόνους κατακράτησης μιας σειράς n-αλκανίων (από 7 έως 24 άτομα άνθρακα) (Niles, Illinois, USA) μετά από ανάλυση στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες.

2.2.7.2. Ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων με GC-MS

Οι GC-MS αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τον αέριο χρωματογράφο Agilent (GC-7890A, USA), συζευγμένο με τον ανιχνευτή μάζας, Agilent MS-5975C, σύλληψης ηλεκτρονίων (70 eV). Οι συνθήκες λειτουργίας ήταν ίδιες με αυτές που περιγράφονται στην § 2.2.7.1 για το GC-FID. Οι θερμοκρασίες της διεπαφής (interface), της πηγής ιόντων και του τετράπολου ήταν 280°, 230° και 150° C αντίστοιχα, και το εύρος μάζας ήταν από 29 έως 350 amu. Όπως και στην περίπτωση της ανάλυσης με GC-FID, η θύρα έγχυσης λειτουργούσε στη μορφή διαχωρισμού ροής για 1 λεπτό. Η τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των χρωματογραφικών διαχωρισμών ήταν η μη πολική HP-5MS (30m x 250μm x 0,25 μm) (Agilent Technologies, USA). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο υψηλής καθαρότητας με μια σταθερή ταχύτητα ροής 1mL/λεπτό.

Η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε: (α) συγκρίνοντας τους γραμμικούς δείκτες κατακράτησης (LRI) με τους αντίστοιχους δείκτες πρότυπων ουσιών (πειραματικών και βιβλιογραφίας) και (β) συγκρίνοντας τα δεδομένα φάσματος μαζών με τα αντίστοιχα από πρότυπες ουσίες και από την τράπεζα δεδομένων (βιβλιοθήκη) NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, data version NIST 05, software version 2.0d). Για τον υπολογισμό των LRI χρησιμοποιήθηκε μια σειρά n-αλκανίων (από 7 έως 24

άτομα άνθρακα) (Niles, Illinois, USA) μετά από ανάλυση στις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Η ανάλυση κάθε δείγματος γινόταν εις τριπλούν. Το λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των φασματογραφικών δεδομένων ήταν το Amdis software (version 2.62, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>).

2.2.8. Στατιστική επεξεργασία

Η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων βασίστηκε στην πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της ανάλυσης κατά συστάδες (Cluster Analysis – CA) και η διακριτική (ή διαχωριστική) ανάλυση (Discriminant Analysis - DA). Όλες οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό λογισμικό πακέτο STATGRAPHICS® Centurion XV.Π .

Η CA εφαρμόστηκε με σκοπό να κατατάξει σε ομάδες (συστάδες – clusters) τα δείγματα κελυφωτού φιστικιού, με βάση το πτητικό τους προφίλ, μετά την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων που προέκυψαν από τις αναλύσεις. Με αυτό τον τρόπο, διερευνήθηκαν: (α) η δυνατότητα ώστε, το πτητικό προφίλ του κάθε δείγματος, όπως περιγράφεται από το σύνολο των πτητικών ενώσεων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, να μπορεί να αποτελέσει κριτήριο (δείκτη) αναγνώρισης και διαχωρισμού της ομάδας υγιών (H) φιστικιών από τις υπόλοιπες ομάδες (NC, AC, ANT) και (β) κατά πόσο η κατάταξη αυτή είναι επαναλήψιμη εντός των δειγμάτων της ίδιας ομάδας.

Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση κατά συστάδες περιλαμβάνει 28 παρατηρήσεις (δηλ. το συνολικό αριθμό των δειγμάτων σε όλες τις ομάδες), οι οποίες ομαδοποιούνται με βάση το σύνολο των πτητικών ενώσεων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν (μεταβλητές). Η στατιστική επεξεργασία για την ομαδοποίηση των δεδομένων προσεγγίστηκε με τον αλγόριθμο του Ward (agglomerative algorithm) της κατηγορίας των ιεραρχικών μεθόδων και υπολογίστηκαν οι Τετραγωνικές Ευκλίδειες αποστάσεις (Squared Euclidean distances) για κάθε παρατήρηση και μεταβλητή. Τα αποτελέσματα της CA εμφανίζονται με τη μορφή δενδρογράμματος. Ο αλγόριθμος αυτός (Ward's algorithm) ξεκινά με κάθε παρατήρηση να αποτελεί από μόνη της μια ομάδα και σε κάθε βήμα ενώνει τις δύο παρατηρήσεις που απέχουν λιγότερο, στη συνέχεια ενώνει τις ομάδες που είναι πιο κοντινές, μέχρι να δημιουργηθεί μια ενιαία ομάδα. Αυτό σημαίνει ότι οι παρατηρήσεις (δείγματα φιστικιού) που μοιάζουν πολύ μεταξύ τους (παρόμοιο πτητικό προφίλ) θα πρέπει να έχουν μεγάλη τιμή για το μέτρο της ομοιότητας και μικρή

απόσταση μεταξύ τους. Αντίθετα, οι παρατηρήσεις διαφορετικών ομάδων θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους αρκετά.

Η δεύτερη πολυμεταβλητή στατιστική επεξεργασία (DA) εφαρμόστηκε στα δεδομένα από τις αναλύσεις των πτητικών ουσιών σε συνέχεια της CA. Η σημαντική διαφορά των μεθόδων CA και DA είναι ότι στη DA είναι γνωστή κάποια ομαδοποίηση των παρατηρήσεων ως προς κάποιο χαρακτηριστικό και αναζητείται ένας διαχωριστικός κανόνας (μια διακριτική συνάρτηση – discriminant function), ο οποίος μπορεί να κατατάξει σωστά, όσο το δυνατόν περισσότερες παρατηρήσεις. Ως εκ τούτου, ο σκοπός από την εφαρμογή της DA στα πειραματικά δεδομένα ήταν να διερευνηθεί ποιές πτητικές ενώσεις ή ποιές χημικές ομάδες πτητικών ενώσεων (μεταβλητές) είναι κατάλληλες, ώστε τα δείγματα των φιστικιών (παρατηρήσεις) να διαχωρίζονται και να ταξινομούνται ανά ομάδες (H, NC, AC και ANT). Στην περίπτωση αυτή, οι ταυτοποιημένες χημικές ομάδες των πτητικών ενώσεων (συνολική ποσότητα) εισάγονται ως μεταβλητές στη στατιστική ανάλυση, έτσι ώστε να αναπτυχθεί ο κανόνας (γραμμική συνάρτηση) που θα διαχωρίσει και θα ταξινομήσει σωστά τα 28 δείγματα φιστικιού στις αντίστοιχες ομάδες τους. Οι διακριτικές συναρτήσεις με τιμές $P < 0.05$ θεωρούνται στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95.0%.

Εκτός από τις παραπάνω πολυμεταβλητές αναλύσεις, πραγματοποιήθηκε μία στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης (ή διασποράς) κατά ένα κριτήριο (One-way ANOVA) στα αποτελέσματα των μετρήσεων της υγρασίας των κελυφωτών φιστικιών. Σκοπός της ανάλυσης αυτής ήταν να διερευνηθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της υγρασίας μεταξύ των δειγμάτων και μεταξύ των ομάδων των δειγμάτων με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Τα δείγματα τα οποία παρουσιάζουν τιμή $p < 0.05$ θεωρείται ότι οι μέσοι όροι τους διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και εφαρμόζεται η δοκιμή της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (LSD).

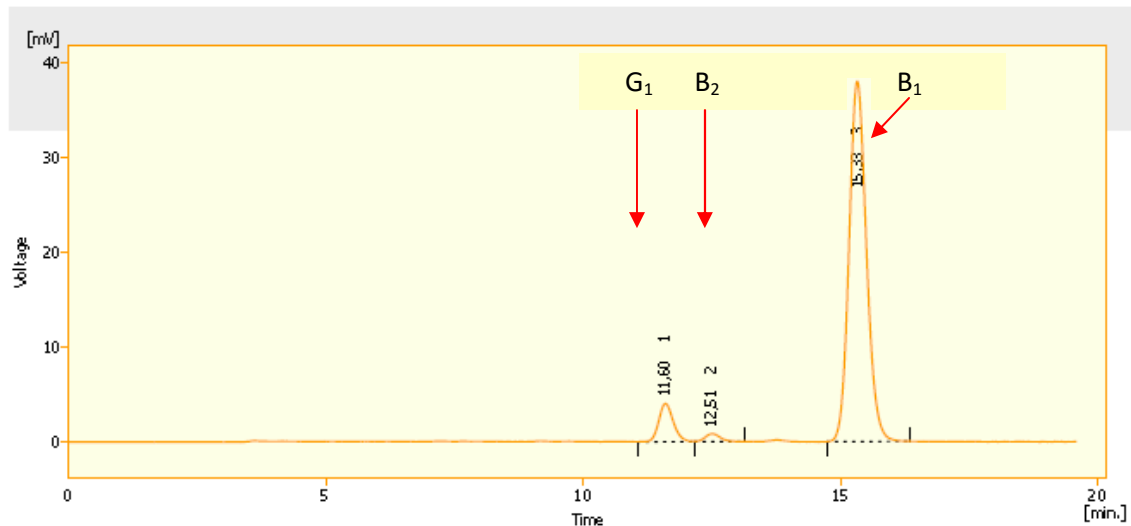
2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

2.3.1. Μέτρηση αφλατοξίνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αφλατοξίνης πραγματοποιήθηκε με HPLC, την πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδο ανάλυσης (Pittet, 2005; Scudamore, 2005). Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση αφλατοξίνης στις ομάδες των δειγμάτων που ήταν μολυσμένα με αφλατοξίνη με φυσικό τρόπο (NC) και με τεχνητή μόλυνση, με το αφλατοξικογόνο στέλεχος του *A. flavus* (AC), καθώς και ένα χρωματογράφημα ανάλυσης στην HPLC από το δείγμα NC1 (Σχήμα 27). Ωστόσο, και στα υπόλοιπα δείγματα της ομάδας των υγιών (H), όσο και της ομάδας των τεχνητά μολυσμένων με μη-τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* πραγματοποιήθηκε ανάλυση αφλατοξίνης, αλλά δεν ανιχνεύθηκε. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, η ποσότητα αφλατοξίνης που μετρήθηκε ήταν υψηλή, ιδιαίτερος στα AC δείγματα μετά από εννέα ημέρες επώασης, με το δείγμα AC-4 να περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα. Από αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων (Πίνακας 11), το στέλεχος Δ.1-3 AF2 φάνηκε να είναι ιδιαίτερος τοξικογόνο σε σχέση με άλλα στελέχη που δοκιμάστηκαν και από την πέμπτη ημέρα επώασης η συγκέντρωση ήταν πολύ υψηλή. Σε όλες τις περιπτώσεις η B₁ βρέθηκε να είναι η κυρίαρχη αφλατοξίνη σε σχέση με τις άλλες, με ποσοστό >90% στη συνολική ποσότητα που μετρήθηκε, γεγονός που επαληθεύεται και από άλλες μελέτες στα κελυφωτά φιστίκια (Georgiadou *et al.*, 2012a). Τα χρωματογραφήματα από τις αναλύσεις αφλατοξίνης στην HPLC όλων των δειγμάτων είναι διαθέσιμα στο Παράρτημα I.

Σε όλα τα δείγματα επίσης, ανιχνεύθηκε η G αφλατοξίνη. Το γεγονός αυτό, ιδιαίτερα για τα δείγματα της ομάδας AC, τα οποία είχαν μολυνθεί με το αφλατοξικογόνο στέλεχος Δ.1-3 AF2 παρουσιάζει ενδιαφέρον, διότι υποδεικνύει την παρουσία ενός στελέχους με μορφότυπο S (S_{BG} strain), τα οποία από τη βιβλιογραφία φαίνεται να παράγουν τόσο B όσο και G αφλατοξίνες (Payne *et al.*, 2008; Amaike & Keller, 2011). Αυτό ήταν το έναυσμα ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω ο μορφότυπος του στελέχους Δ.1-3 AF2, βάσει του μεγέθους των σκληρωτίων του (Σχήμα 28), όπως περιγράφηκε στην § 2.2.2. Η μέση τιμή της διαμέτρου των σκληρωτίων που αναπτύχθηκαν από το στέλεχος αυτό μετρήθηκε 235±71 μm, δηλαδή <400 μm, χαρακτηρίζοντάς το ως μορφότυπο S (Cotty, 1989). Στη συνέχεια, θεωρήθηκε σημαντικός ο μοριακός και γενετικός χαρακτηρισμός του στελέχους, με αλληλούχιση του γονιδιώματος, αποστέλλοντας γενετικό υλικό (purified PCR product) σε ανεξάρτητο εργαστήριο μοριακής βιολογίας (CeMIA SA, Κυτταρικές,

Μοριακές & Ανοσολογικές Εφαρμογές: Εταιρεία Τμήματος Ιατρικής, Εργ. Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας, Παν. Θεσσαλίας), όπου και επιβεβαιώθηκε ότι πρόκειται για μύκητα του είδους *A. flavus* S-strain. Υψηλές ποσότητες G αφλατοξίνης μετρήθηκαν επίσης και στα δείγματα της ομάδας NC, γεγονός το οποίο σχετίζεται με την παρουσία όλων των εν δυνάμει παραγωγών μυκήτων αφλατοξίνης G, συμπεριλαμβανομένου του *A. parasiticus* και των μορφοτύπων S_{BG} του *A. flavus*. Ωστόσο, η ταξινόμηση και ο χαρακτηρισμός της αφλατοξικογόνου μικροχλωρίδας των δειγμάτων της ομάδας NC δεν αποτελούσε έναν από τους στόχους της παρούσας μελέτης, οπότε και δεν διερευνήθηκε περαιτέρω. Γενικότερα όμως, από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η κατανομή των τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus* στους αγρούς, περιλαμβάνει μικτούς μορφοτύπους S και L (Probst *et al.*, 2010), ενώ η παρουσία τους διαφοροποιείται εποχιακά και επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του εδάφους (Jaime-Garcia & Cotty, 2010). Μία ενδελεχής ανασκόπηση στη βιοποικιλότητα και γενετική διασπορά των ειδών και στελεχών των μυκήτων της ομάδας *Aspergillus* section *Flavi* στην Ευρώπη, περιγράφεται στη μελέτη των Perrone *et al.*, 2014.

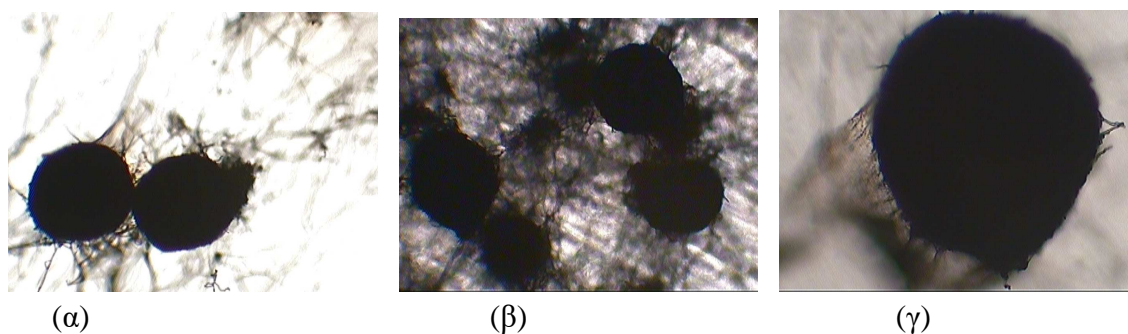


Σχήμα 27. HPLC χρωματογράφημα από την ανάλυση αφλατοξίνης στο δείγμα NC-1 (1^η επανάληψη).

Πίνακας 10. Συγκέντρωση αφλατοξίνης σε δείγματα κελυφωτού φιστικιού από τις ομάδες των μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων NC και AC.

Δείγματα	Αφλατοξίνη (μg/kg) ^a				Σύνολο
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
NC-1	936.5 ± 80.9	6.1 ± 0.9	146.1 ± 27.4	<LOQ	1089
NC-2	333.8 ± 7.6	15.7 ± 3.1	244.9 ± 25.1	5.8 ± 0.1	600
NC-3	843.1 ± 4.6	18.8 ± 0.5	152.3 ± 7.3	1.3 ± 0.2	1015
NC-4	1005.0 ± 19.4	10.9 ± 0.5	127.4 ± 20.6	<LOQ	1143
NC-5	554.0 ± 49.9	33.4 ± 11.7	197.3 ± 41.9	9.9 ± 5.5	795
NC-6	504.1 ± 25.9	14.3 ± 7.0	138.6 ± 60.0	4.5 ± 3.7	661
NC-7	879.5 ± 77.0	9.7 ± 0.5	158.3 ± 34.3	<LOQ	1047
NC-8	492.8 ± 40.6	12.6 ± 0.7	320.4 ± 55.1	5.5 ± 1.5	831
NC-9	352.7 ± 35.0	23.5 ± 0.9	207.4 ± 28.6	10.1 ± 1.7	594
NC-10	671.4 ± 64.7	24.3 ± 6.8	75.0 ± 3.9	3.5 ± 0.8	774
AC-1	1149.1 ± 9.6	11.0 ± 0.2	4.2 ± 0.8	<LOQ	1164
AC-2	1321.1 ± 56.1	60.6 ± 0.01	5.8 ± 0.4	<LOQ	1387
AC-3	1004.8 ± 17.7	7.3 ± 1.0	6.4 ± 1.1	<LOQ	1019
AC-4	1584.5 ± 7.0	60.2 ± 0.5	8.4 ± 0.7	<LOQ	1653
AC-5	1171.4 ± 26.0	11.6 ± 0.5	4.3 ± 1.5	<LOQ	1187

^a: τα αποτελέσματα αφορούν τις μέσες τιμές τριών επαναλήψεων και δίδονται με τη μορφή μ.ο.±σ. LOQ: Το Όριο Ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification) της μεθόδου είναι 0.18 μg/kg όπως προσδιορίστηκε από τις δοκιμές ανάκτησης σε δείγματα κελυφωτού φιστικιού (Georgiadou *et al.*, 2012a)



Σχήμα 28. Σκληρώτια του στελέχους Δ.1-3 AF2 του μύκητα *A. flavus*, όπως αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα 5/2 άγαρ μετά από επώαση 5 ημερών. Φωτογραφία από σύνθετο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση (α), (β) 4x και (γ) 10x.

Πίνακας 11. Μέτρησης συγκέντρωσης αφλατοξίνης σε δείγμα κελυφωτού φιστικιού μολυσμένο με το αφλατοξικογόνο στέλεχος Δ.1-3 AF-2.

Ημέρες επώασης	Αφλατοξίνη (μg/kg)				Σύνολο
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0
4	91.0 ± 5.2	1.2 ± 0.1	<LOQ	<LOQ	92.2
5	1294.1 ± 13.0	16.9 ± 1.5	21.1 ± 1.8	<LOQ	1332.0
7	940.4 ± 6.2	8.2 ± 1.0	11.1 ± 0.9	<LOQ	959.6
9	1126.2 ± 6.0	16.2 ± 1.7	21.4 ± 1.4	<LOQ	1163.7

2.3.2. Το πτητικό προφίλ

2.3.2.1. Το γενικό πτητικό προφίλ

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 72 πτητικές ενώσεις και από τις τέσσερις ομάδες (H, NC, AC, ANT), οι οποίες χημικά ανήκουν κυρίως στις τάξεις των αλκοολών, κετονών, αλδευδών, εστέρων, υδρογονανθράκων, εστέρων των λιπαρών οξέων, μονοτερπενίων και των οξυγονωμένων παραγώγων τους και των σесκιτερπενίων (Πίνακας 12). Σε κάθε ομάδα ανιχνεύθηκε ένας σχετικά ίδιος αριθμός πτητικών ουσιών (53-56). Η περιεκτικότητα σε υγρασία των δειγμάτων από τις ομάδες H και NC μετρήθηκε μεταξύ 4.4 – 6.9% υγρ.β., ενώ η υγρασία των δειγμάτων από τις ομάδες AC και ANT που υποβλήθηκαν στη διαδικασία της τεχνητής μόλυνσης ήταν 17.4 – 31.2% υγρ.β. Αν και η διαφορά στην περιεχόμενη υγρασία ήταν σημαντική μεταξύ των ομάδων, δεν διέφεραν όμως στατιστικά σημαντικά ως προς τον αριθμό των πτητικών ενώσεων που απομονώθηκαν, σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης της ANOVA ($p \leq 0.05$) (Πίνακας 13).

Τα μονοτερπένια αποτέλεσαν την επικρατούσα χημική τάξη στο πτητικό προφίλ των δειγμάτων από όλες τις ομάδες. Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 15 πτητικές ενώσεις σε σημαντικές ποσότητες σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων πτητικών. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Tsokou *et al.* (2007), όπου πολλές ενώσεις από την ομάδα των μονοτερπενίων και των οξυγονωμένων τους παραγώγων αναγνωρίστηκαν ως τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου των καρπών της φιστικιάς. Η βιοσύνθεση τερπενίων γίνεται μόνο σε φυτά και σε ορισμένους μικροοργανισμούς και ξεκινάει από το ακετύλο-CoA ή όπως έχει αποδειχθεί πρόσφατα, από αντίδραση του D-

γλυκερυλο-3-φωσφορικού εστέρα και του πυροσταφυλικού εστέρα (εναλλακτική βιοσύνθεση τερπενίων) (Belitz *et al.*, 2006). Η αιθυλική αλκοόλη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα και ήταν η κυρίαρχη ένωση της τάξης των αλκοολών ακολουθούμενη από τη μεθανόλη. Οι Borjesson *et al.* (1989), μελετώντας το πτητικό προφίλ σε σιτηρά μολυσμένα με μύκητες, αναφέρουν επίσης ότι η αιθανόλη αντιστοιχεί στο 90% των συνολικών αλκοολών που ανιχνεύθηκαν.

Όπως φαίνεται επίσης στον Πίνακα 12, η πλειοψηφία των πτητικών ενώσεων, οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε όλες τις ομάδες των δειγμάτων ήταν αλκοόλες, κετόνες, αλδεΐδες, εστέρες και υδρογονάνθρακες, με ορισμένες διαφορές μεταξύ των ομάδων H, NC, AC και ANT. Δεδομένου ότι τα κελυφωτά φιστίκια είναι καρποί πλούσιοι σε λίπος, οι περισσότερες από τις πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, μπορούν να χαρακτηριστούν ως δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης των λιπαρών οξέων, τα οποία παράγονται χημικά ή ενζυμικά με τη δράση του ενζύμου της λιπάσης (Belitz *et al.*, 2006). Πολλοί μικροοργανισμοί απελευθερώνουν ένζυμα τύπου λιπάσης στα θρεπτικά υποστρώματά τους, ενώ ειδικότερα για τον *A. flavus* αναφέρεται ότι εμφανίζει μία ισχυρή λιπολυτική δράση και σε κάποιες περιπτώσεις πρωτεολυτική και αμυλολυτική (Kaminski *et al.*, 1972). Μάλιστα, οι Belitz *et al.*, (2006) αναφέρουν ότι οι λιπάσες που προέρχονται από το μύκητα αυτό δεν εμφανίζουν εξειδίκευση. Ορισμένοι επίσης ασπέργιλλοι έχουν την ικανότητα να παράγουν λιπάσες εξωκυτταρικά, οι οποίες εναποτίθενται στον ιστό του φυτού-ξενιστή και απελευθερώνουν λιπαρά οξέα (Beck *et al.*, 2011). Γενικότερα περιγράφεται, ότι οι λιπάσες μικροβιακής προέλευσης είναι πολύ σταθερές στη θερμότητα και συνεπώς, δεν αδρανοποιούνται με παστερίωση, κατεργασία υπερυψηλής θερμοκρασίας ή διαδικασίες ξήρανσης και αποτελούν μία από τις αιτίες υποβάθμισης της ποιότητας τέτοιων προϊόντων κατά την αποθήκευση (Belitz *et al.*, 2006).

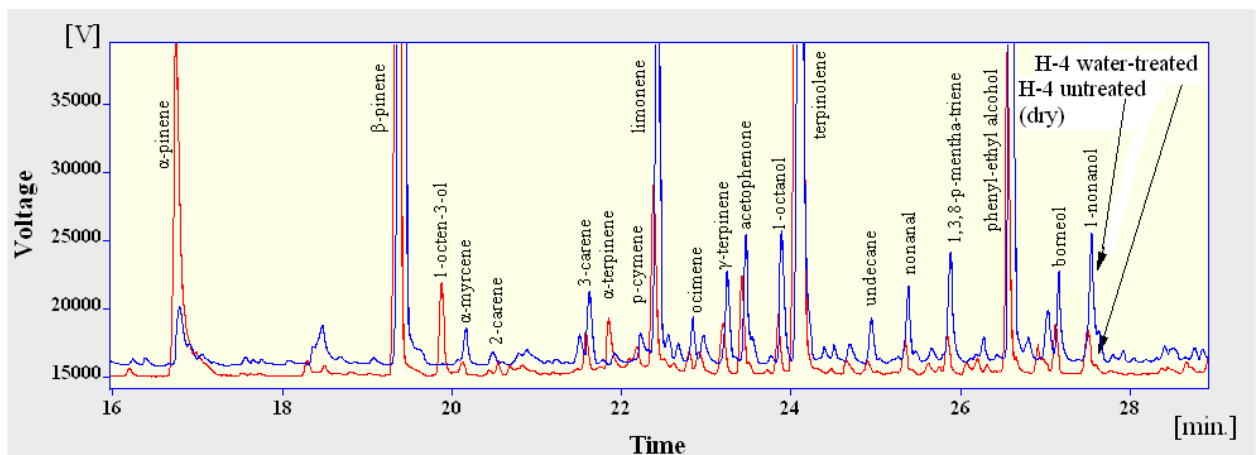
Τα πτητικά κλάσματα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της οξείδωσης του ελαϊκού, λινελαϊκού και λινολενικών οξέων περιέχουν κυρίως αλδεΐδες και κετόνες, οι οποίες μπορούν να αναχθούν περαιτέρω στις αντίστοιχες αλκοόλες τους (Belitz *et al.*, 2006). Η εξανάλη (οσμή πράσινου φύλλου), η 1-οκτεν-3-όλη (οσμή μανιταριού), κάποιες κετόνες και αλκάνια προέρχονται από την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος, ενώ η 1-επτανόλη, η 1-οκτανόλη, η οκτανάλη (οσμή λιπαρού, σαπουνιού), η δεκανάλη (οσμή φλούδας πορτοκαλιού), η νονανάλη (οσμή σαπουνιού-φρουτώδες) και το οξικό οξύ προέρχονται από την οξείδωση του ελαϊκού οξέος (Mexis & Kontominas, 2009). Το ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ είναι τα σημαντικότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα των κελυφωτών φιστικιών από πλευράς ποσότητας (Arena *et al.*, 2007; Tsantili *et al.*, 2010). Οι άλλες πτητικές

ουσίες που ανιχνεύθηκαν βιοσυνθέτονται μέσω διαφορετικών μεταβολικών οδών και από διαφορετικές αρχικές ενώσεις, όπως είναι το οξικό άλας, τα αμινοξέα ή τα κετοξέα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ουσία 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, η οποία σχηματίζεται από τη λευκίνη (Schnüerer *et al.*, 1999).

Είναι ωστόσο σημαντικό να επισημανθεί, ότι οι περισσότερες από τις ουσίες που απομονώθηκαν και ανιχνεύθηκαν σε σχεδόν όλα τα δείγματα, με εξαίρεση την ομάδα των μονοτερπενίων, η οποία συνδέεται με τον καρπό του φιστικιού, αναφέρονται ως οι χαρακτηριστικές, τυπικές πτητικές ενώσεις που προδίδουν την παρουσία διαφόρων γενών και ειδών μυκήτων, όπως των *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* και *Eurotium* σε αποθηκευμένο σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι, αλλά και στην αραχίδα (Larsen & Frisvad, 1995; Magan & Evans, 2000; Sahgal *et al.*, 2007; Jurjevic *et al.*, 2008). Επιπλέον, αυτές οι ουσίες έχουν προταθεί ως οι πτητικές ουσίες-δείκτες για την ανίχνευση προσβολής από μύκητες σε αποθηκευμένα σιτηρά (Magan & Evans, 2000). Η ύπαρξη αυτών των ουσιών σε όλα σχεδόν τα δείγματα φαίνεται να συνδέεται με την παρουσία και δραστηριότητα της υπάρχουσας φυσικής μικροχλωρίδας των φιστικιών. Στα κελυφωτά φιστίκια, οι μύκητες που συνήθως απομονώνονται και αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα του καρπού ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Rhizopus* και *Penicillium*, ενώ πιο σπάνια, απαντώνται μύκητες από τα γένη *Alternaria*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Verticillium* και κάποιες μη ταυτοποιημένες ζύμες (Bayman *et al.*, 2002).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η ανίχνευση πτητικών επηρεάζεται από την ενεργότητα νερού του υποστρώματος (Magan & Evans, 2000) και λόγω της διαφορετικής μεταχείρισης που είχαν υποστεί τα δείγματα των ομάδων AC και ANT με τη διαδικασία της τεχνητής μόλυνσης, διερευνήθηκε αν επηρεάζεται το πτητικό προφίλ και σε ποιο βαθμό, υποβάλλοντας δείγματα από την ομάδα των H και NC στην ίδια ακριβώς επέμβαση, χωρίς όμως την παρουσία μολύσματος (§ 2.2.2). Τα αποτελέσματα της παραπάνω συγκριτικής δοκιμής έδειξαν ότι το πτητικό προφίλ δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Στο Σχήμα 29 απεικονίζονται δύο αεριο-χρωματογραφήματα ανάλυσης πτητικών από το ίδιο δείγμα H-4 της ομάδας των υγιών. Το ένα, αντιστοιχεί στο δείγμα που είχε υποβληθεί στην τεχνητή μόλυνση με το νερό (κόκκινη γραμμή), ενώ το άλλο απεικονίζει το τυπικό δείγμα, που δεν είχε γίνει κανένας χειρισμός (μπλε γραμμή). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι το πτητικό προφίλ παρέμεινε ποιοτικά το ίδιο, ανιχνεύοντας τις ίδιες ουσίες και στις δύο περιπτώσεις. Παρ' όλα αυτά, σε όλες τις επαναλήψεις παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα που είχαν υποστεί τη διαδικασία της

τεχνητής μόλυνσης με νερό μετρήθηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις για την πλειοψηφία των πτητικών που ανιχνεύθηκαν, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα τους δείγματα, με εξαίρεση τις ουσίες 3-μεθυλ-1-βουτανόλη και το παράγωγο της πυρρόλης, 1-μεθυλ-1-H-πυρρόλη. Μία άλλη διαφορά που διαπιστώθηκε είναι ότι η ουσία 1-οκτεν-3-ολη, χαρακτηριστική της οσμής μανιταριού (Kaminski *et al.*, 1972), ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα που υποβλήθηκαν στη διαδικασία τεχνητής μόλυνσης με νερό (Σχήμα 29, κόκκινη γραμμή). Αυτό πιθανότατα ερμηνεύεται από την παρουσία μικροχλωρίδας μυκήτων (*Mucorales*, *Alternaria*, *Aspergillus sc Nigri*), η οποία αναπτύχθηκε στο κέλυφος των φιστικιών μετά από εννέα ημέρες επώασης και η οποία ήταν εμφανής σε ορισμένα τριβλία με τη μορφή αραιών μυκηλιακών υφών. Αυτό είναι αναμενόμενο, διότι η διαδικασία της επιφανειακής απολύμανσης που εφαρμόστηκε δε συνιστά αποστείρωση των καρπών, με αποτέλεσμα να επιτρέπει μια περιορισμένη ανάπτυξη μυκήτων της φυσικής μικροχλωρίδας, όταν βρεθούν σε ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης, όπως αυτές που επικράτησαν με το χειρισμό των καρπών κατά τη διαδικασία της τεχνητής μόλυνσης και επώασης.



Σχήμα 29. Συγκριτική απεικόνιση των GC χρωματογραφήματων από τη δοκιμή επίδρασης της διαδικασίας της τεχνητής μόλυνσης στο πτητικό προφίλ του δείγματος H-4. Το χρωματογράφημα με την κόκκινη γραμμή αφορά το υπο-δείγμα το οποίο είχε υποβληθεί στο χειρισμό με νερό

Πίνακας 12. Οι πτητικές ουσίες που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα κελυφωτού φιστικιού από όλες τις ομάδες, ταξινομημένες ανά χημική τάξη.

Πτητικές ενώσεις	LRI	Ταυτοποίηση ^α	ΟΜΑΔΑ							
			H		NC		AC		ANT	
			mg/L ^β	% ^γ	mg/L ^β	% ^γ	mg/L ^β	% ^γ	mg/L ^β	% ^γ
ΑΛΚΟΟΛΕΣ										
methyl-alcohol	503	B	241	100	93	100	86	100	42	100
ethyl-alcohol	517	B	661	100	318	100	123	100	1277	100
3-methyl-1-butanol	729	B,C	196	100	76	90	1	40	23	100
1-pentanol	761	B,C			6	60				
1-hexanol	869	B,C	70	62	3	70	18	80	tr	40
1-heptanol	978	B,C	10	37	84	100				
1-octen-3-ol	986	B,C			50	90	1110	100	34	40
2-octen-1-ol	1068	B,C			27	50	57	100	11	100
1-octanol	1070	B,C	40	100	186	100	21	100	10	100
phenyl-ethyl alcohol	1112	B,C	tr	12	55	100	51	100	17	60
1-nonanol	1173	B,C	54	75	35	100	3	60	10	100
KETONEΣ										
2-pentanone	699	C							116	40
3-octanone	990	B,C					138	100	77	100
2-octanone	994	B,C	5	12	57	70				
3-octen-2-one	1040	B,C			99	80	3	20	3	40
acetophenone	1065	B,C	53	62	47	30	3	20	8	100
ΑΛΔΕΥΔΕΣ										
3-methyl butanal	649	B,C	tr	37	tr	10	79	80		
hexanal	802	B,C	52	50	41	90			4	60
heptanal	909	B,C	tr	12	49	90	16	60		
2-heptenal (E)-	962	B,C			174	70	94	60	tr	20
benzaldehyde	965	B,C	tr	25	67	30	32	100	4	80
octanal	1005	B,C	34	100	19	90	6	60		
benzeneacetaldehyde	1043	B,C	tr	12	42	70	718	100	34	80
2-octenal	1060	B,C			9	10	24	100		
nonanal	1104	B,C	170	100	489	100	28	100	10	100
decanal	1205	B,C	25	87	14	100	4	80	4	60
2-decenal	1263	B,C			9	70	4	60	5	80
dodecanal	1409	B,C	4	37						
ΕΣΤΕΡΕΣ										
ethyl-acetate	609	B,C	22	12					27	40
acetic acid butyl ester	814	B,C	5	62						
1-butanol, 3-methyl, acetate	879	B,C	5	37						
butanoic acid butyl ester	998	B,C	27	62						
acetic acid hexyl ester	1017	B,C	43	62	79	20	70	100	12	80
bornyl acetate	1287	B,C	14	12	94	90	6	60		
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ										
hexane	600	B,C	370	100	517	100	697	100	40	100
octane	801	A,B,C	25	25	tr	10	23	100		
decane	999	A,B,C,	8	25	tr	10	4	80	tr	40
undecane	1099	A,B,C	7	37	1	20	9	80	9	100

(συνεχίζεται)

(συνέχεια Πίνακα 12)

tridecane	1300	A,B,C	5	87	1	50	3	80	43	100
tetradecane	1400	A,B,C	6	87	tr	10	1	100	11	100
ΟΞΕΑ										
acetic acid	704	C	76	87			tr	80		
ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ										
naphthalene	1180	B,C	52	75	146	80	5	80	7	60
ΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ										
hexanoic acid butyl-ester	1192	B,C	74	75						
octanoic acid ethyl-ester	1197	B,C	26	50						
ethyl-9-hexa-decenoate		B,C							35	80
hexadecanoic acid ethyl-ester	1993	B,C					tr	20	132	100
9-octadecenoic acid (z)-methyl ester	2100	B,C					1	20	46	100
ethyl-oleate	2165	B,C					2	20	74	80
ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΑ										
α -pinene	939	A,B,C	2774	100	2765	100	1014	100	462	100
camphene	952	B,C	83	100	149	100	18	100	11	100
β -pinene	977	A,B,C	74	87	78	100	31	100	5	100
α -myrcene	993	A,B,C	219	100	308	100	88	100	32	100
2-carene	997	B,C	20	25	3	80			4	80
α -phellandrene	1003	B,C	15	37	63	100	21	60	8	100
3-carene	1008	B,C	145	100	164	100	45	80	63	100
α -terpinene	1014	A,B,C	68	37	50	100	3	60	7	40
p-cymene	1023	A,B,C	271	100	93	100	16	80	19	80
limonene	1027	B,C	427	100	407	100	160	100	56	80
ocimene isomer	1050	B,C	20	50	150	100	14	80	11	80
γ -terpinene	1059	A,B,C	50	37	76	100			4	80
p-mentha-2.4(8)-diene	1085	B,C	5	25	33	40	22	80		
isoterpinolene										
α -terpinolene	1087	B,C	1255	100	2545	100	183	100	269	100
1,3,8-p-mentha-triene	1109	B,C	52	50	7	90			14	80
ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ										
ylangene	1375	B,C	4	25	13	100	20	100	17	100
β -elemene	1394	B,C					18	100	14	100
γ -cadinene	1518	B,C			20	100	59	100	18	100
ΟΞΥΓΟΝΩΜΕΝΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΑ										
linalool	1097	B,C			99	60			1	40
camphor	1143	B,C	9	25	51	100	2	40	4	60
borneol	1165	B,C	6	25	70	100	30	100	9	60
a-terpineol	1198	B,C			61	100				
verbenone	1209	B,C	tr	12	50	90				
ΠΑΡΑΓΩΓΟ ΠΥΡΡΟΛΗΣ										
1 H-pyrrole 1-methyl	735	B,C	729	75	25	90	92	100	51	80

LRI: Linear Retention Index: Γραμμικοί Δείκτες Κατακράτησης, tr = trace quantity: ίχνος, ποσότητα <0.5 mg/L.

^a A: Δεδομένα φάσματος και δείκτες κατακράτησης σύμφωνα με την ανάλυση της πρότυπης ουσίας, B: Δεδομένα φάσματος και δείκτες κατακράτησης σύμφωνα με αυτά της βιβλιογραφίας, C: Δεδομένα φάσματος σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιοθήκης NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program. data version NIST 05. software version 2.0).

^b Συνολική ποσότητα (mg/L) (ημι-ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου) όπως υπολογίστηκε από τα GC χρωματογραφήματα.

^γ Το ποσοστό των δειγμάτων εντός της ομάδας που ανιχνεύθηκε η πτητική ουσία.

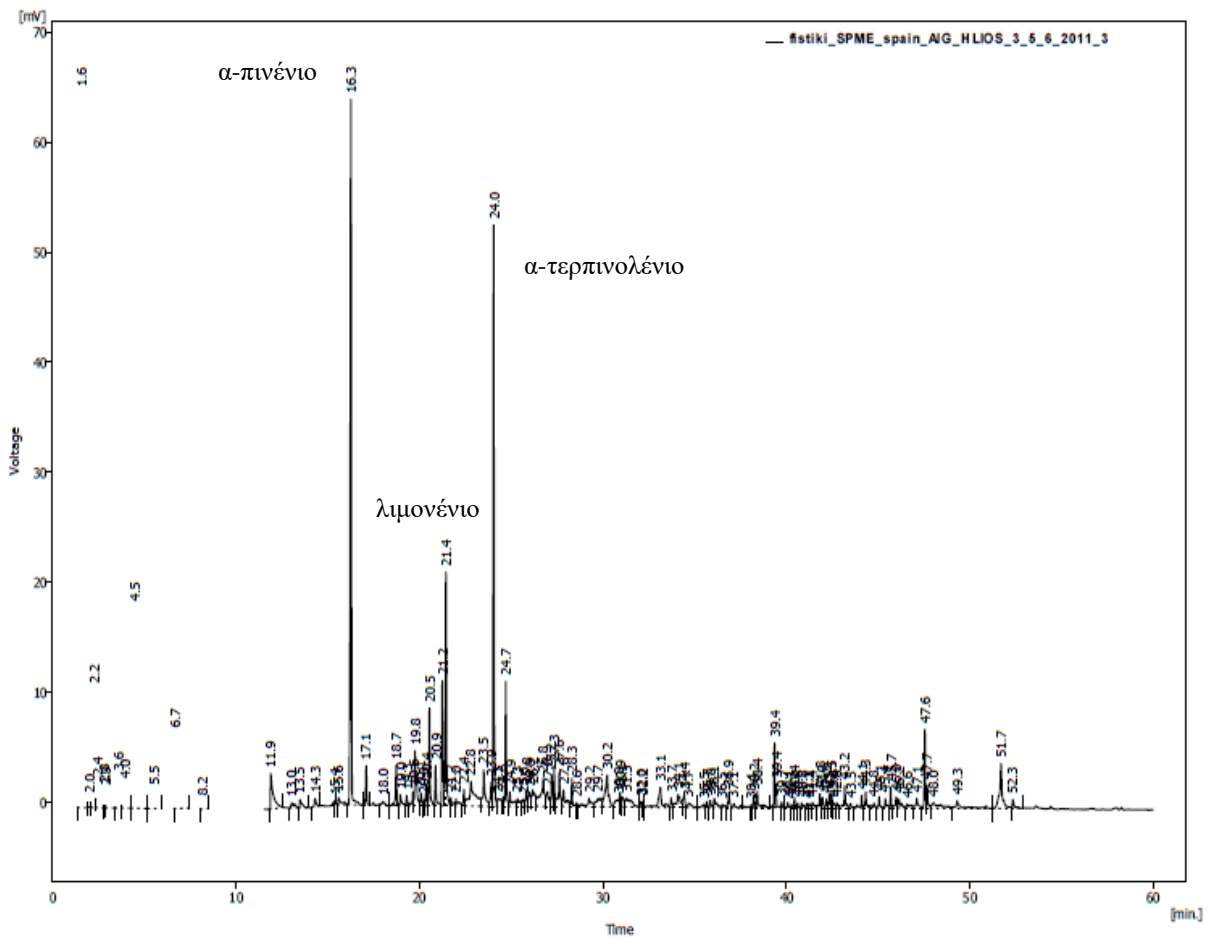
Πίνακας 13. Αποτελέσματα μέτρησης της υγρασίας των δειγμάτων και συσχέτιση με τον αριθμό των πτητικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.

Ομάδα	Δείγμα	Αριθμός πτητικών ουσιών	Υγρασία (% w.b.)	
			<i>μ.ο.</i>	<i>±σ</i>
H	H-1	29	5.5	0.1
	H-2	28	5.2	0.2
	H-3	26	5.4	0.5
	H-4	38	6.0	0.04
	H-5	35	6.8	0.2
	H-6	34	6.6	0.2
	H-7	37	6.9	0.4
	H-8	29	4.4	0.2
NC	NC-1	47	5.9	0.2
	NC-2	40	5.6	0.1
	NC-3	42	5.2	0.1
	NC-4	42	5.5	0.1
	NC-5	43	4.9	0.2
	NC-6	42	5.3	0.1
	NC-7	42	5.5	0.1
	NC-8	45	5.6	0.2
	NC-9	46	5.2	0.2
	NC-10	44	5.3	0.2
AC	AC-1	30	25.2	0.5
	AC-2	44	31.2	0.2
	AC-3	43	25.7	0.5
	AC-4	39	17.4	0.6
	AC-5	52	28.5	0.6
ANT	ANT-1	51	27.5	0.3
	ANT-2	52	26.8	0.5
	ANT-3	46	28.2	0.2
	ANT-4	30	25.6	0.3
	ANT-5	31	24.7	0.3

2.3.2.2. Το πτητικό προφίλ των δειγμάτων της ομάδας των υγιών (H)

Το πτητικό προφίλ των δειγμάτων από την ομάδα των υγιών (H) φάνηκε να είναι κοινό, αν και παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφορές (Πίνακας 12). Σε όλα τα δείγματα, χαρακτηριστική ήταν η παρουσία των μονοτερπενίων, ειδικότερα α-πινενίου και α-τερπινολενίου, σε υψηλές συγκεντρώσεις (Σχήμα 30), αλκοολών με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα (αιθανόλη, 1-εξανόλη, 1-νονανόλη), αλδευδών (εξανάλη, νονανάλη) και του παράγωγου της πυρρόλης. Οι μικρές διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων της ομάδας των υγιών είναι πιθανό να σχετίζονται με παράγοντες που επηρεάζουν τα χημικά χαρακτηριστικά τους, άρα και το πτητικό προφίλ, όπως είναι η προέλευση (περιοχή καλλιέργειας), η διαφορετική φυσική μικροχλωρίδα που συν-

υπάρχει, οι διαφορετικές αγροτικές πρακτικές, η μέθοδος ξήρανσης και ο χρόνος συγκομιδής. Ωστόσο, ο τρόπος και ο βαθμός που αυτές οι παράμετροι επιδρούν στο πτητικό προφίλ ενός γεωργικού προϊόντος, όπως τα κελυφωτά φιστίκια, δεν αποτελούσαν αντικείμενα της μελέτης του παρόντος κεφαλαίου και δεν διερευνήθηκαν περαιτέρω, δεδομένου ότι απαιτείται ένας διαφορετικός πειραματικός σχεδιασμός και δειγματοληψία. Παρ'όλα αυτά, για την αντιπροσωπευτικότητα των αποτελεσμάτων, θεωρήθηκε απαραίτητο, στην ομάδα των υγιών (H) να συμπεριληφθούν δείγματα διαφορετικής προέλευσης της ίδιας όμως, τοπικής ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης». Όλα τα χρωματογραφήματα από τις αναλύσεις των πτητικών ενώσεων υπάρχουν διαθέσιμα στο Παράρτημα II.



Σχήμα 30. Απεικόνιση του χρωματογραφήματος από την ανάλυση του δείγματος H-1 σε αέριο χρωματογράφο (GC-FID).

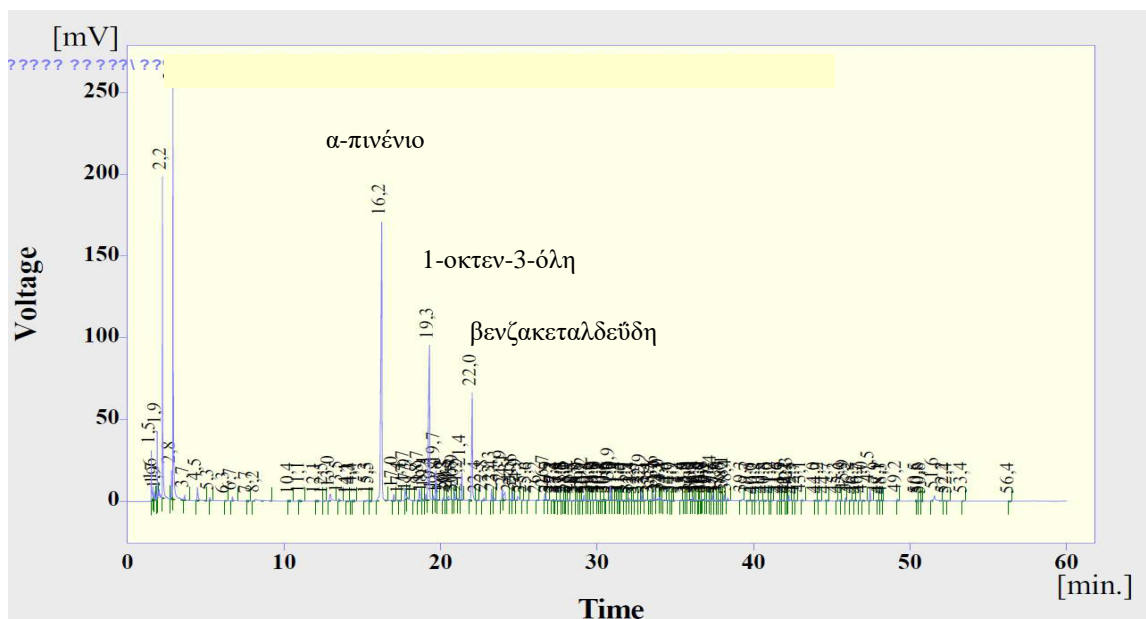
2.3.2.3. Το πτητικό προφίλ των μολυσμένων από τις ομάδες NC, AC, ANT

Το πτητικό προφίλ των δειγμάτων από τις ομάδες NC και AC, αντιστοιχεί στην περίπτωση που υπάρχει αφλατοξίνη, ενώ το πτητικό προφίλ των δειγμάτων από την ομάδα ANT αντιπροσωπεύει την περίπτωση της παρουσίας του παθογόνου αίτιου (μη-τοξικογόνα στελέχη του είδους *A. flavus*), αλλά χωρίς την ταυτόχρονη ύπαρξη της τοξίνης. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων όπως περιγράφονται στον Πίνακα 12 δείχνουν ότι το πτητικό προφίλ των δειγμάτων από τις ομάδες των μολυσμένων NC, AC, ANT δεν είναι κοινό. Θεωρώντας ότι το πτητικό προφίλ περιγράφεται στη βιβλιογραφία και ως «αποτύπωμα» τόσο του είδους όσο και του στελέχους, ακόμα και αν το υπόστρωμα ανάπτυξης είναι κοινό (δηλ. κελυφωτά φιστίκια), όπως αναλύεται στην εισαγωγή του παρόντος κεφαλαίου (§ 2.1.1.), τα αποτελέσματα μπορούν να χαρακτηριστούν και ως αναμενόμενα. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι, σε αντίθεση με τα τεχνητά μολυσμένα δείγματα των ομάδων AC και ANT, των οποίων το πτητικό προφίλ προσδιορίζεται (α) από ελεγχόμενες συνθήκες μόλυνσης και (β) συγκεκριμένα στελέχη του είδους *A. flavus*, το πτητικό προφίλ των δειγμάτων της ομάδας NC δεν προσδιορίζεται από αυτές τις παραμέτρους, διότι αντιπροσωπεύουν τα εμπορικά επεξεργασμένα προϊόντα, στα οποία ούτε ο χρόνος της μόλυνσης, ούτε τα παθογόνα αφλατοξικογόνα είδη είναι γνωστά.

Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα της ομάδας ANT χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία εστέρων των λιπαρών οξέων, ενώ τα οξυγονωμένα παράγωγα των μονοτερπενίων εμφανίστηκαν κυρίως στα NC δείγματα. Οι ίδιες αλκοόλες ανιχνεύθηκαν στα δείγματα των ομάδων AC και ANT, ενώ η 1-πεντανόλη και 1-επτανόλη απομονώθηκε κυρίως από τα δείγματα της ομάδας NC. Από την τάξη των κετονών, η 2-πεντανόνη ανιχνεύθηκε στα δείγματα της ομάδας ANT, ενώ η 2-οκτανόνη από τα περισσότερα δείγματα της ομάδας NC. Οι διαφορές ήταν πιο χαρακτηριστικές στην τάξη των αλδευδών. Η 3-μεθυλβουτανάλη, η επτανάλη, η οκτανάλη και η 2-οκτενάλη δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα της ομάδας ANT, αλλά μόνο στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα των ομάδων NC και AC. Γενικότερα, οι ουσίες αυτές αποτελούν προϊόντα οξειδωσης του ελαϊκού και λινελαϊκού οξέος, ουσίες στις οποίες είναι πλούσιο το έλαιο του φιστικιού. Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Beck *et al.*, (2011) σε αμύγδαλα, οι οποίοι διαπίστωσαν αυξημένες ποσότητες πτητικών προϊόντων από την οξείδωση λιπαρών οξέων, σε δείγματα μολυσμένα με αφλατοξίνη.

Συγκρίνοντας τις πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα υγιή και στα μολυσμένα παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες διαφορές. Οι ακόρεστες αλκοόλες και αλδεύδες με οκτώ

άτομα άνθρακα (C-8), οι C-8 κετόνες, τα σεσκιτερπένια, καθώς και οι αλδεΐδες: 2-επτενάλη, 2-δεκενάλη, βενζαλδεΐδη και βενζακεταλδεΐδη ανιχνεύθηκαν κυρίως στις ομάδες των μολυσμένων δειγμάτων (NC, AC, ANT), υποδεικνύοντας ότι σχετίζονται με την παρουσία των μυκήτων (Σχήμα 31). Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι τυπικές της παρουσίας πολλών ειδών μυκήτων και όχι ειδικά των ειδών του γένους *Aspergillus* ή ακόμα περισσότερο δεν προσδιορίζουν στελέχη, τοξικογόνα ή μη. Για παράδειγμα, οι αλκοόλες 1-οκτεν-3-όλη και 2-οκτεν-1-όλη, θεωρούνται ουσίες που προσδίδουν το χαρακτηριστικό άρωμα του μανιταριού, του ταγγίσματος και του ελαιώδους και συνδέονται με την παρουσία πολλών μυκήτων, μεταξύ αυτών και του γένους *Aspergillus* (Kaminski *et al.*, 1972). Επιπλέον, οι ουσίες 1-οκτεν-3-όλη και 3-οκτανόνη αναφέρονται ανάμεσα στις κύριες πτητικές ενώσεις που παράγονται από αλλοιογόνα είδη μυκήτων των γενών *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, οι οποίοι αναπτύσσονται σε διάφορα υποστρώματα και από διάφορα στελέχη, ανεξαρτήτως τοξικογόνου ικανότητας (Schnürer *et al.*, 1999; Magan & Evans, 2000; Sahgal *et al.*, 2007). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η βενζαλδεΐδη, οι ακόρεστες C-8 αλκοόλες και οι C-8 κετόνες είναι μεταξύ των πτητικών ουσιών, οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε αραβόσιτο και αραχίδα μολυσμένα με τοξικογόνα και μη-τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* (Jurjevic *et al.*, 2008). Επίσης,



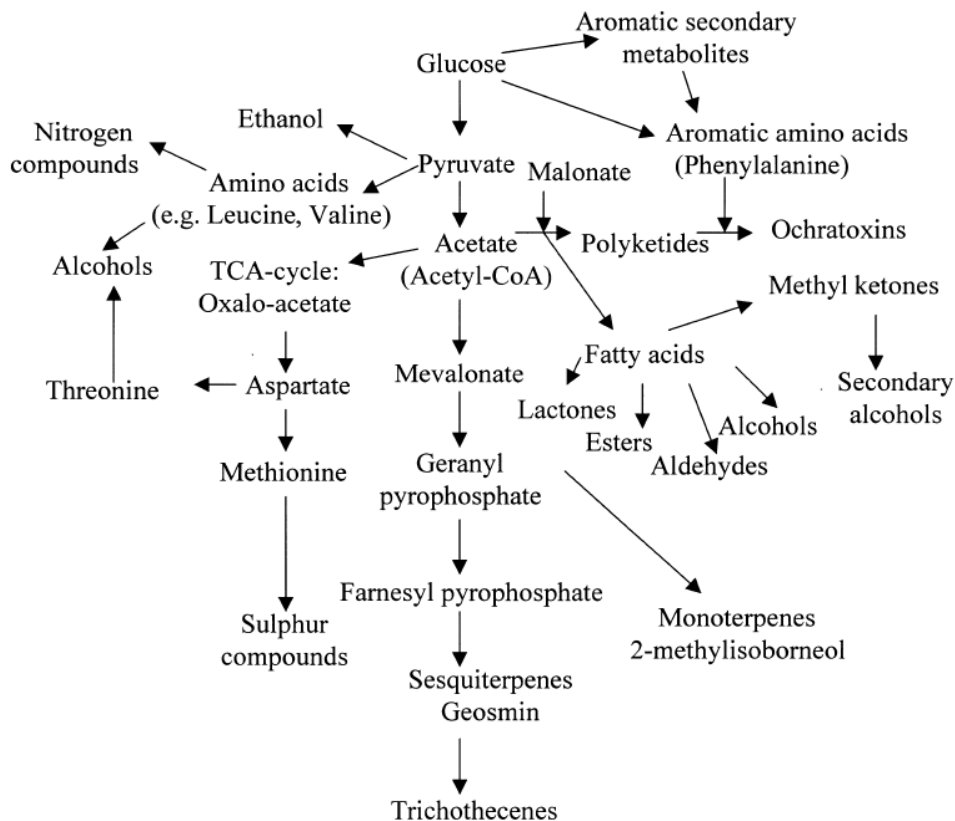
Σχήμα 31. Απεικόνιση του χρωματογραφήματος από την ανάλυση του δείγματος AC-2 σε αέριο χρωματογράφο (GC-FID).

αποτελέσματα από συναφείς μελέτες έδειξαν ότι η βενζαλδεΐδη, η 3-μεθυλ-βουτανάλη και η 2-επτενάλη απομονώθηκαν από καλαμπόκι και αραχίδα μολυσμένη είτε με τοξικογόνα είτε με μη-τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus* (Jurjevic *et al.*, 2008; De Lucca *et al.*, 2012). Στην παρούσα μελέτη, η επτανάλη και η 2-οκτενάλη ανιχνεύθηκαν μόνο στα μολυσμένα με αφλατοξίνη φιστίκια (NC και AC).

Η χημική τάξη των σεσκιτερπενίων παρουσίασε ενδιαφέρον, διότι συσχετίστηκε κυρίως με τις ομάδες των μολυσμένων δειγμάτων. Οι ασκομύκητες και βασιδιομύκητες, κατά το δευτερογενή μεταβολισμό τους παράγουν έναν μεγάλο αριθμό σεσκιτερπενίων στην τελευταία φάση ανάπτυξης. Η βιοσύνθεσή τους ρυθμίζεται από διάφορα ένζυμα, η δράση των οποίων επάγεται από περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες (Kramer & Abraham, 2012). Οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι απόλυτα γνωστοί για τους μύκητες, όμως στους φυτικούς οργανισμούς αντίστοιχα, φαίνεται ότι η UV-ακτινοβολία, διάφορες προσβολές ή μολύνσεις αποτελούν παράγοντες που επάγουν την αυξημένη παραγωγή σεσκιτερπενίων (Kramer & Abraham, 2012). Η παρουσία τους έχει συνδεθεί με τους μηχανισμούς άμυνας, κατά τη φάση της εισβολής ενός μικρο-οργανισμού ή και εντόμου στο φυτικό ιστό, επάγοντας την έναρξη βιοχημικών μηχανισμών, οι οποίοι ορίζουν την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου (Koch *et al.*, 1999). Αναφέρεται επίσης, ότι οι πτητικές αυτές ενώσεις λειτουργούν ως «σήματα» επικοινωνίας μακρινών αποστάσεων, οι οποίες δεν καλύπτονται με διαφορετικό τρόπο λόγω της ακίνητης φύσης τους. Είναι εντυπωσιακά τα παραδείγματα σεσκιτερπενίων των οποίων ο ρόλος είναι να προσελκύουν «χημικά» τους φυσικούς εχθρούς των εισβολέων τους ή να «προειδοποιούν» τους γειτονικούς μη-προσβεβλημένους ιστούς (Kramer & Abraham, 2012).

Αν και οι ουσίες αυτές δεν είναι ιδιαίτερα πτητικές, οι νέες τεχνικές ανάλυσης επιτρέπουν τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους στο πτητικό προφίλ πολλών μυκήτων (Kramer & Abraham, 2012). Παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη αναφέρονται και από τους Magan & Evans (2000), οι οποίοι τις θεώρησαν ως ουσίες χαρακτηριστικές τόσο του είδους, όσο και του στελέχους των μυκήτων στα σιτηρά. Αντίστοιχα, οι Zeringue *et al.* (1993), μελετώντας το πτητικό προφίλ αφλατοξικογόνων και μη-τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus* σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα, παρατήρησαν μία συσχέτιση μεταξύ της έναρξης της βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης και της παρουσίας κάποιων πτητικών συστατικών, τα οποία χημικά τα ταυτοποίησαν ως σεσκιτερπένια (C₁₅H₂₄). Στην ίδια μελέτη ωστόσο, οι ουσίες αυτές δεν ανιχνεύθηκαν όταν ολοκληρώθηκε η βιοσύνθεση αφλατοξίνης. Επιπλέον, η ουσία γ-καδινένιο, καθώς και

άλλα σεσκιτερπένια, τα οποία παράγονται από τον *A. flavus*, αναφέρονται ως πτητικές ουσίες χαρακτηριστικές σε επίπεδο στελέχους (Jurjevic *et al.*, 2008). Οι Schnüerer *et al.* (1999) πρότειναν τα σεσκιτερπένια ως δείκτες, για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση των μυκήτων του γένους *Penicillium*, σε επίπεδο είδους. Επίσης, σαφής συσχετισμός μεταξύ της βιοσύνθεσης της μυκοτοξίνης τριχοθισίνη (trichothecene) και της παρουσίας πτητικών σεσκιτερπενίων παρατηρήθηκε και από τους Jelen & Wasowicz (1998) στα είδη του γένους *Fusarium*. Στην ίδια μελέτη, οι πτητικές ουσίες αυτές προτείνονται ως δείκτες μόλυνσης τριχοθισίνης, διότι ανίχνευσαν διαφορετικές ουσίες της τάξης των σεσκιτερπενίων μεταξύ των τοξικογόνων και μη-τοξικογόνων στελεχών. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 32, τα σεσκιτερπένια ανήκουν στο ίδιο βιοσυνθετικό μονοπάτι με την τριχοθισίνη, αλλά όχι με αυτό των ωχρατοξινών και των αφλατοξινών.



Σχήμα 32. Βιοσυνθετικά μονοπάτια, τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού στους μύκητες.

2.3.3. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση

2.3.3.1. Ανάλυση σε συστάδες (*Cluster Analysis – CA*)

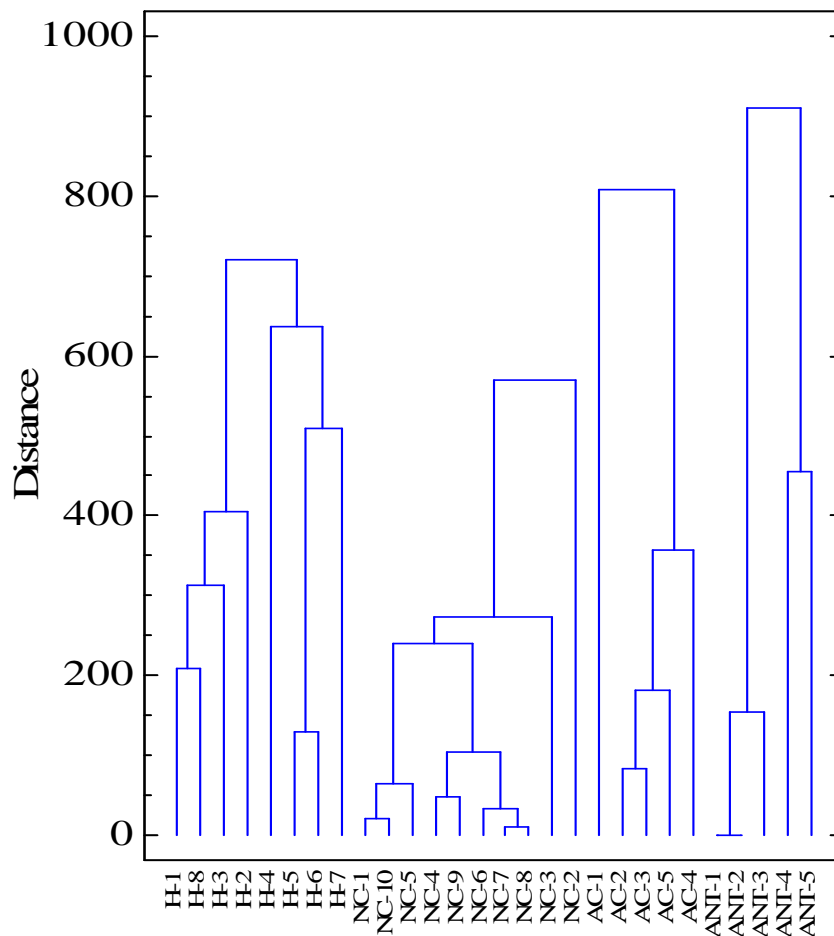
Στο δενδρόγραμμα του Σχήματος 33 απεικονίζονται οι συστάδες, οι οποίες δημιουργήθηκαν με βάση τις ομοιότητες στο πτητικό προφίλ των δειγμάτων. Σε αυτή την ανάλυση συμμετείχαν τα 28 δείγματα φιστικιού (παρατηρήσεις), τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε συστάδες, χρησιμοποιώντας τις 72 πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν (μεταβλητές). Από την επεξεργασία των δεδομένων προέκυψαν τέσσερις πρωτογενείς συστάδες από τις 28 παρατηρήσεις (συνολικά δείγματα φιστικιού), οι οποίες αντιστοιχούν απόλυτα στις τέσσερις ομάδες των δειγμάτων που μελετήθηκαν: H, NC, AC, ANT. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το πτητικό προφίλ θα μπορούσε να αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ταξινόμηση των κελυφωτών φιστικιών στις παραπάνω ομάδες. Η πρώτη συστάδα περιέχει τα οκτώ δείγματα από την ομάδα H, η δεύτερη συστάδα τα δέκα δείγματα της ομάδας NC και αντίστοιχα, οι υπόλοιπες δύο συστάδες τα δείγματα από τις ομάδες AC και ANT.

Στο ίδιο δενδρόγραμμα παρατηρείται επίσης ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, τα δείγματα ίδιας προέλευσης π.χ. H-5, H-6 είναι πολύ κοντά (άρα συσχετίζονται) εντός των συστάδων. Όπως επίσης φαίνεται στο Σχήμα 33, η δεύτερη συστάδα των δειγμάτων NC είναι η πιο καλά συσχετιζόμενη, διότι η μεγαλύτερη απόσταση συγχώνευσης (ομαδοποίησης) είναι περίπου 550. Αντιθέτως, τα δείγματα από την ομάδα ANT συγχωνεύτηκαν σε απόσταση 900, γεγονός που αναδεικνύει μικρότερο βαθμό συσχετισμού μεταξύ τους. Ωστόσο, η απόσταση αυτή είναι σαφώς μικρότερη από την απόσταση συγχώνευσης με οποιοδήποτε άλλο δείγμα από κάποια άλλη ομάδα. Από τις 72 πτητικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην CA, οι ουσίες υλανγένιο, β-ελεμένιο, γ-καδινένιο της ομάδας των σεσκιτερπενίων, καθώς επίσης, οι αλκοόλες, οι κετόνες και οι αλδεΐδες με οκτώ άτομα άνθρακα (1-οκτεν-3-όλη, 2-οκτεν-1-όλη, 3-οκτανόνη, 3-οκτεν-2-όνη, 2-οκτενάλη) και κάποιες άλλες ουσίες, όπως η 1-επτανόλη, η επτανάλη, η 2-επτενάλη, η βενζακεταλδεΐδη και η 2-δεκενάλη, είχαν υψηλότερη μέση τιμή (centroid), άρα και υψηλότερη συγγένεια με τις συστάδες των μολυσμένων δειγμάτων, όπως είχε παρατηρηθεί και στον Πίνακα 12.

2.3.3.2. Διακριτική ανάλυση (*DA*)

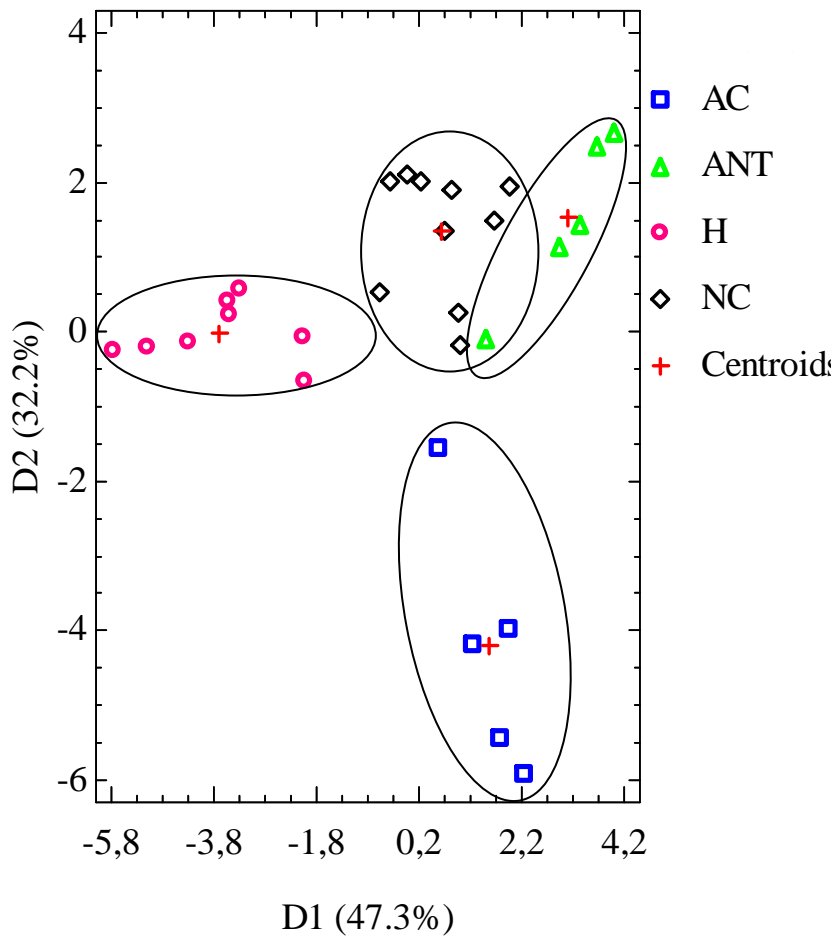
Σε συνέχεια της ανάλυσης κατά συστάδες εφαρμόστηκε η διακριτική ανάλυση, ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα ταξινόμησης των δειγμάτων ανά ομάδες (H, NC, AC και ANT), με βάση το πτητικό τους προφίλ. Σε αυτή την περίπτωση, ως μεταβλητή της

ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η συνολική ποσότητα των πτητικών που ανιχνεύθηκαν ανά χημική τάξη. Συνεπώς, κατά την επεξεργασία εισάχθηκαν 15 μεταβλητές πρόβλεψης στο μοντέλο ταξινόμησης: οι 12 χημικές τάξεις όπως περιγράφονται στον Πίνακα 12 και τρεις



Σχήμα 33. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά συστάδες (CA) σε μορφή δενδρογράμματος. Τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε τέσσερις συστάδες βάσει των πτητικών που ανιχνεύθηκαν, οι οποίες αντιστοιχούν στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν (H, NC, AC, ANT). Οι αποστάσεις (Squared Euclidean Distances) υπολογίστηκαν με βάση τον αλγόριθμο του Ward.

ξεχωριστές υπο-τάξεις: C-8 αλκοόλες, C-8 κετόνες και C-8 αλδεΐδες, επειδή σε αυτές παρατηρήθηκε υψηλή βαρύτητα συγγένειας με τα μολυσμένα δείγματα. Τα αποτελέσματα της διακριτικής ανάλυσης απεικονίζονται στο Σχήμα 34.

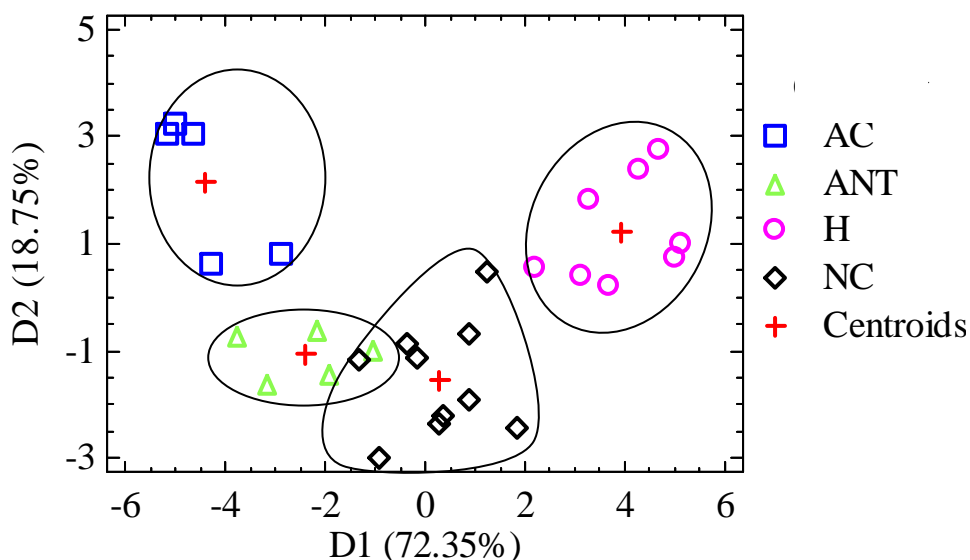


Σχήμα 34. Διάγραμμα απεικόνισης των δύο γραμμικών διακριτικών συναρτήσεων (D1 και D2) μετά την ανάλυση DA. Όλες οι ομάδες (H, NC, AC, ANT) διαχωρίστηκαν σαφώς μεταξύ τους βάσει του πτητικού τους προφίλ, όπως περιγράφεται από τις 15 μεταβλητές πρόβλεψης (12 χημικές τάξεις πτητικών και 3 υπο-τάξεις C-8 αλκοολών – κετονών - αλδεϋδών).

Για το διαχωρισμό των ομάδων προσδιορίστηκαν τρεις γραμμικές διακριτικές συναρτήσεις (D1:47.4%, D2:32.3%, D3:20.5%) με τιμές $P < 0.05$ σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Οι δύο πρώτες απεικονίζονται στο διάγραμμα του Σχήματος 34. Τα δεδομένα της ανάλυσης (σχετικό μέγεθος συντελεστών γραμμικής εξίσωσης) έδειξαν ότι οι χημικές τάξεις των σεσκιτερπενίων, των μονοτερπενίων, των υδρογονανθράκων και C-8 αλδευδών συνεισφέρουν περισσότερο στη διακριτική συνάρτηση D1 (47.3%), ενώ οι εστέρες, οι C-8 αλδεύδες και C-8 αλκοόλες, στη D2 (32.2%). Επιπλέον, κατά την ταξινόμηση των 28 δειγμάτων (παρατηρήσεις) στις αντίστοιχες ομάδες, τα 27 ή το 96.7% αυτών, ταξινομήθηκαν σωστά στις αντίστοιχες ομάδες, βάσει των 15 μεταβλητών πρόβλεψης, οι οποίες αντιστοιχούν στις χημικές τάξεις το πτητικού τους προφίλ. Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 34, οι τέσσερις ομάδες διαχωρίστηκαν μεταξύ τους και ειδικότερα η ομάδα των υγιών δειγμάτων (H) διακρίνεται σαφώς από τις υπόλοιπες ομάδες με τα μολυσμένα. Ωστόσο, οι ομάδες NC και ANT είναι κοντά, με αποτέλεσμα να υπάρχει λανθασμένη ταξινόμηση σε ένα δείγμα το οποίο ήταν στην ομάδα ANT, ενώ το μοντέλο το κατέταξε στην ομάδα NC. Εκτός από τη θέση των δειγμάτων στο διάγραμμα ταξινόμησης (Σχήμα 34) είναι σημαντικό να παρατηρηθεί η θέση του κέντρου της κάθε διακριτής ομάδας (centroid), το οποίο απεικονίζεται με το σύμβολο + και αντιστοιχεί στη μέση τιμή της γραμμικής διακριτικής συνάρτησης. Οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων των μολυσμένων ομάδων είναι μικρότερες σε σχέση με την απόσταση του κέντρου της ομάδας των υγιών με οποιαδήποτε άλλη ομάδα. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι εφαρμόζοντας τη διακριτική ανάλυση μόνο στα δείγματα της ομάδας H και NC με βάση το ίδιο μοντέλο (15 μεταβλητές), προσδιορίστηκε μία διακριτική συνάρτηση με τιμή $P < 0.05$ σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και όλα τα δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά στις επιμέρους ομάδες.

Στη συνέχεια, τροποποιώντας το μοντέλο ταξινόμησης, εφαρμόστηκε διακριτική ανάλυση στα δείγματα όλων των ομάδων (H, NC, AC, ANT), εισάγοντας 10 διαφορετικές μεταβλητές πρόβλεψης, από τα δεδομένα της ανάλυσης των πτητικών. Οι μεταβλητές αυτές αφορούσαν την ποσότητα των πτητικών από τις ομάδες των: C-8 αλκοολών, C-8 αλδευδών, σεσκιτερπενίων, μονοτερπενίων, οξυγονωμένων μονοτερπενίων και τις επιμέρους ουσίες, βενζαλδεύδη, βενζακεταλδεύδη, 1-επτανόλη, επτανάλη και 2-επτενάλη. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης απεικονίζονται στο Σχήμα 35. Με αυτό το μοντέλο επετεύχθη 100% σωστή ταξινόμηση όλων των δειγμάτων στις ομάδες που πραγματικά ανήκουν. Προσδιορίστηκαν τρεις στατιστικά σημαντικά γραμμικές διακριτικές

συναρτήσεις, με την πρώτη (D1) να περιγράφει το 72.4% της παραλλακτικότητας των δειγμάτων. Η επικάλυψη που εμφανίζεται στο Σχήμα 35 είναι σχηματική λόγω του ότι το διάγραμμα είναι δύο διαστάσεων (απεικονίζονται μόνο οι δύο από τις τρεις συναρτήσεις). Στην προσπάθεια να μειωθεί περαιτέρω ο αριθμός των μεταβλητών πρόβλεψης του μοντέλου, απαλείφθηκαν οι χημικές τάξεις των πτητικών μονοτερπενίων και οξυγονωμένων μονοτερπενίων και οι ουσίες βενζαλδεΐδη και βενζακεταλδεΐδη. Δοκιμάζοντας από τέσσερις έως εννιά μεταβλητές, το ποσοστό ορθής ταξινόμησης κυμάνθηκε από 82 – 89%, με πέντε έως τρία δείγματα να ταξινομούνται λανθασμένα. Σε αυτή την περίπτωση, ο διαχωρισμός δεν ήταν τόσο σαφής και η λανθασμένη ταξινόμηση αφορούσε δείγματα της ομάδας των NC, τα οποία ταξινομήθηκαν ως υγρή.



Σχήμα 35. Διάγραμμα απεικόνισης των δύο γραμμικών διακριτικών συναρτήσεων (D1 και D2) μετά την ανάλυση DA βασισμένη στο πτητικό προφίλ των δειγμάτων, όπως προσδιορίστηκε από 10 μεταβλητές πρόβλεψης: τις χημικές τάξεις των C-8 αλκοολών - αλδεϋδών, των σεσκιτερπενίων, των μονοτερπενίων, των οξυγονωμένων μονοτερπενίων και τις επιμέρους ουσίες, βενζαλδεΐδη, βενζακεταλδεΐδη, 1-επτανόλη, επτανάλη και 2-επτενάλη.

2.4. Συμπεράσματα

Το γεγονός ότι η εισβολή των μικρο-οργανισμών ή και εντόμων σε φυτικούς ιστούς επάγει τη βιοσύνθεση πτητικών ουσιών έχει περιγραφεί σε διάφορες μελέτες τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι το πτητικό προφίλ που διαμορφώνεται μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον οργανισμό που εισβάλλει (παράγοντες μολυσματικότητας), με συνέπεια, να απαιτείται κατ'αρχάς ο κατάλληλος μηχανισμός αναγνώρισης από την πλευρά του ξενιστή και ένα αντίστοιχα οργανωμένο σύστημα άμυνας, το οποίο ενεργοποιείται μέσω ενζύμων και υλοποιείται με τη βιοσύνθεση προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού.

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η μελέτη αυτού του κεφαλαίου της παρούσας διατριβής αποτελεί ένα πρώτο βήμα στην περιγραφή των διαφορών που μπορεί να υπάρχουν στο πτητικό προφίλ υγιών και μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών, εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι διάφορα είδη μυκήτων παράγουν πτητικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να είναι χαρακτηριστικές για ένα είδος. Έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν ουσίες, οι οποίες θα μπορούσαν να διακρίνουν τα υγιή δείγματα από (α) τα μολυσμένα με αφλατοξίνη με τη μορφή που αυτά βρίσκονται στην αλυσίδα διανομής (μολυσμένα με φυσικό τρόπο) και (β) τα μολυσμένα με αφλατοξικογόνα και μη-τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus*, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την παραγωγή αφλατοξίνης στα κελυφωτά φιστικά. Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 72 πτητικές ουσίες συνολικά, από όλα τα δείγματα. Χαρακτηριστική ήταν η παρουσία αλκοολών, κετονών, αλδευδών, εστέρων, υδρογονανθράκων και μονοτερπενίων στα δείγματα όλων των ομάδων που μελετήθηκαν (H, NC, AC, ANT). Ωστόσο, κάποιες διαφορές στο πτητικό προφίλ παρατηρήθηκαν μεταξύ των ομάδων. Οι αλκοόλες, κετόνες και αλδεύδες με οκτώ άτομα άνθρακα (C-8), κάποιες ενώσεις από την τάξη των σεσκιτερπενίων, καθώς επίσης και οι ουσίες 1-πεντανόλη, 1-επτανόλη, επτανάλη, 2-επτενάλη, 2-δεκενάλη, βενζαλδεΐδη και βενζακεταλδεΐδη, απομονώθηκαν κυρίως από τα μολυσμένα δείγματα. Δυστυχώς όμως, οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι κοινές σε πολλούς μύκητες και όχι χαρακτηριστικές για τα είδη των *Aspergillus* ή ακόμα περισσότερο για τα τοξικογόνα στελέχη τους. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις αποτελούν προϊόντα οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων και κυρίως του ελαϊκού και λινελαϊκού οξέος, τα οποία υπάρχουν σε υψηλή αναλογία στο λίπος του φιστικιού.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε πολυμεταβλητή στατιστική επεξεργασία στα αποτελέσματα των αναλύσεων, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί αν οι διαφορές αυτές

είναι ικανές να διαχωρίσουν τα υγιή από τα μολυσμένα. Η ανάλυση κατά συστάδες (CA) οδήγησε σε 100% ορθή ομαδοποίηση των δειγμάτων στις επιμέρους ομάδες που πραγματικά ανήκαν, με βάση το συνολικό πτητικό προφίλ, όπως προσδιορίστηκε από τις 72 ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο της διακριτικής ανάλυσης, επετεύχθη ένας πολύ καλός διαχωρισμός των υγιών δειγμάτων από τα μολυσμένα (82-100%) χρησιμοποιώντας ως «πτητικούς» δείκτες (μεταβλητές πρόβλεψης) τις ομάδες των C-8 αλκοολών και αλδευδών, τα σεσκιτερπένια, τα μονοτερπένια και τις ενώσεις: βενζαλδεΰδη, βενζακεταλδεΰδη, 1-επτανόλη, επτανάλη και 2-επτενάλη. Παρ'όλα αυτά, κύριες παράμετροι, όπως (α) ο μεγάλος αριθμός πτητικών ενώσεων που παράγονται από τα διάφορα είδη μυκήτων (β) η διαφοροποίηση της παραγωγής πτητικών ενώσεων σε επίπεδο στελέχους (γ) η εξάρτηση της παραγωγής τους από το χρόνο και τις επικρατούσες συνθήκες, αναδεικνύουν τη συνθετότητα και το βαθμό δυσκολίας του έργου αυτού.

2.5. Βιβλιογραφία

2.5.1. Ελληνική βιβλιογραφία

1. Κωμαΐτης, Μ.Ε. (2014). Μέθοδοι ανάλυσης τροφίμων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Αθήνα, ΓΠΑ.

2.5.2. Διεθνής βιβλιογραφία

1. Abramson, D., Sinha, R.N., Mills, J.T. (1980). Mycotoxin and odor formation in moist cereal grain during granary storage. *Cereal Chemistry*, **57**, 346-351.
2. Acena, L., Vera L., Guasch, J., Busto, O., & Mestres, M. (2010). Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analyzed by gas chromatography-olfactometry: Application to roasted pistachio aroma. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 7781-7787.
3. Amaike, S. & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, **49**, 107-133.
4. Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., Maccarone, E. (2007). Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chemistry*, **104**, 403-408.
5. AOAC. (1995). Moisture in Nuts and Nut Products. Official Method 925.40, XVIth edition.
6. AOAC. (1999). Aflatoxin B₁ and total aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder - Immunoaffinity column liquid chromatography with post-column derivatization. Official method 999.07, 49.2.29.
7. AOAC. (2005). Aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter, liquid chromatography with post-column photochemical derivatization. Official method 2005.08, 49.2.18A.
8. Argyri, A.A., Mallouchos, A., Panagou, E.Z., Nychas, G-Z. (2015). The dynamics of the HS/SPME-GC/MS as a tool to assess the spoilage of minced beef stored under different packaging and temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **193**, 51-58.
9. Bayman, P., Baker, J. L., Mahoney, N. E. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, **155**, 161-169.
10. Börjesson, T., Stöllman, U., Adamek, P. & Kaspersson, A. (1989). Analysis of volatile compounds for detection of moulds in stored cereals. *Cereal Chemistry*, **66**, 300-304.
11. Beck, J.J., Mahoney, N.E., Cook, D., Gee, W.S. (2011). Volatile analysis of ground almonds contaminated with naturally occurring fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 6180-6187.
12. Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2006). Food Chemistry. Third Edition. Berlin, Heidelberg: Springer.

13. Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G-J., Villani, F., Ercolini, D. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology*, **45**, 83-102.
14. Cotty, P.J. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*, **79**, 808–814.
15. De Lucca, A. J., Boué, S. M, Carter-Wientjes, C., & Bhatnagar, D. (2012). Volatile profiles and aflatoxin production by toxigenic and non-toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* grown on sterile and non-sterile cracked corn. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **19**(1), 91-98.
16. Georgiadou, M., Dimou, A. & Yanniotis, S. (2012a). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, **26**, 580-586.
17. Georgiadou, M., Agoritsis, S. P., Vichou, K., Vardouniotis, G., Yanniotis, S., Paplomatas, E., Cotty, P. J. & Tsitsigiannis, D. I. (2012b). Genetic and molecular characterization and evaluation of the Greek non-toxigenic isolations of the fungi *Aspergillus* as potential biocontrol agents against aflatoxins. In: *Proceedings of 5th Congress of the Hellenic Society of Microbiology “Mikrobiokosmos”*, 13-16 December, Athens, Greece, 131.
18. Hedlund, K., Bengtsson, G., Rundgren, S. (1995). Fungal odour discrimination in two sympatric species of fungivorous collembolans. *Functional Ecology*, **9**, 869-875.
19. Jaime-Garcia, R., & Cotty, P. J. (2010). Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **42**, 1842-1847.
20. Jelen, H. & Wasowicz, E. (1998). Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Reviews International*, **14**, 391-426.
21. Jurjevic, Z., Rains, G. C., Wilson, D. M. & Lewis, W. J. (2008). Volatile metabolites associated with one aflatoxigenic and one nontoxigenic *Aspergillus flavus* strain grown on two different substrates. *Phytopathologia Mediterranea*, **47**, 266-271.
22. Kaminski, E., Libbey, L.M., Stawicki, S., Wasowicz, E. (1972). Identification of the predominant volatile compounds produced by *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology*, **24**, 721-726.
23. Kaminski, E., Stawicki, S., Wasowicz, E. (1974). Volatile flavour compounds produced by moulds of *Aspergillus*, *Penicillium* and fungi imperfecti. *Applied Microbiology*, **27**, 1001-1004.
24. Kaminski, E. & Wasowicz, E. (1991). The usage of volatile compounds produced by moulds as indicators of grain deterioration. In: *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Edited by Chelkowski, J., Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 229-280.
25. Keshri, G., & Magan, N. (2000). Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium spp.* using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, **89**, 1-10.

26. Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J., Boland, W. (1999). Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology*, **121**, 153-162.
27. Kramer, R., Abraham, W.R. (2012). Volatile sesquiterpenes from fungi: What are they good for?. *Phytochemistry Reviews*, **11**, 15-37.
28. Larsen, T.O. & Frisvad, J.C. (1995). Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research*, **99**, 1153-1166.
29. Lim, F.Y., Keller, N.P. (2014). Spatial and temporal control of fungal natural product synthesis. *Natural Product Reports*, **31**, 1277-1286.
30. Linton, C., Wright, S. (1993). Volatile organic compounds: microbiological aspects and some technological implications. *Letters in Applied Bacteriology*, **75**, 1-12.
31. Logrieco, A., Arrigan, D.W.M., Brengel-Pesce, K., Siciliano, P. & Tothill, I. (2005). DNA arrays, electronic noses and tongues, biosensors and receptors for rapid detection of toxigenic fungi and mycotoxins: A review. *Food Additives & Contaminants*, **22**, 335-344.
32. Magan, N. & Evans, P. (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, **36**, 319-340.
33. Mexis, S. F. & Kontominas, M. G. (2009). Effect of gamma irradiation on the physic-chemical and sensory properties of raw shelled peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and pistachio nuts (*Pistachia vera* L.). *Journal Science of Food Agriculture*, **89**, 867-875.
34. Nilsson, T., Larsen, T.O., Montanarella, L. & Madsen, J.O. (1996). Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods*, **25**, 245-255.
35. Payne, G.A., Yu, J., Nierman, W.C., Machida, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. & Dean, R.A. (2008). A first glance into the genome sequence of *Aspergillus flavus*. In: *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. Edited by Goldman, G.H., & Osmani, S.A., New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 15-23.
36. Pasanen, A.L., Lappalainen, S., & Pasanen, P. (1996). Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins. *Analyst*, **121**, 1949-1953.
37. Perrone, G., Gallo, A. & Logrieco, A.F. (2014). Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Frontiers in Microbiology*, **5** (377), 1-5.
38. Pittet, A. (2005). Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **96**, 424-444.
39. Probst, C., Shulthess, F. & Cotty, P. J. (2010). Impact of *Aspergillus* section *Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology*, **108**, 600-610.

40. Sahgal, N., Needham, R., Cabañes, F.J., & Magan, N. (2007). Potential for detection and discrimination between mycotoxigenic and non-toxigenic spoilage moulds using volatile production patterns: A review. *Food Additives & Contaminants*, **24**(10), 1161-1168.
41. Schnürer, J., Olsson, J. & Börjesson, T. (1999). Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genetics and Biology*, **27**, 209-217.
42. Scudamore, K.A. (2005). Principles and applications of mycotoxin analysis. In: *Mycotoxin Blue Book*. Edited by Diaz, D.E., Nottingham University Press, Nottingham, UK, 157-185.
43. Spraker, J.E., Jewell, K., Roze, L.V., Scherf, J., Ndagano, D., Beaudry, R., Linz, J.E., Allen, C., Keller, N.P. (2014). A volatile relationship: Profiling an inter-kingdom dialogue between two plant pathogens, *Ralstonia solanacearum* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Chemical Ecology*, **40**, 502-513.
44. Stawicki, S., Kaminski, E., Niewiarowicz, A., Trojan, M., Wasowicz, E. (1973). The effect of microflora on the formation of odours in grain during storage. *Annales de Technologie Agricole*, **22**, 449-476.
45. Sunesson, A.L., Vaes, W.H.J., Nilsson, C.A., Blomquist, G., Andersson, B., & Carlson, R. (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2911-2918.
46. Tsantili, E., Takidelli, C., Christopoulos, M.V., Lambrinea, E., Rouskas, D., Roussos, P.A. (2010). Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistachia vera* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, **125**, 562-568.
47. Tsitsigiannis, D.I., Georgiadou M., Agoritsis S., Zakyntinos G., Varzakas T.H., Tjamos S., Antoniou P., Dimakopoulou M., Karnavas G., Paplomatas E., Yanniotis S., Tjamos E.C. (2010a). Ecology, epidemiology and control of *Aspergillus spp.* in pistachio orchards in Greece. *Petria*, **20**, 95-96.
48. Tsitsigiannis, D.I., Georgiadou, M., Agoritsis, S., Zakyntinos, G., Varzakas, T.H., Tjamos, S., Antoniou, P., Dimakopoulou, M., Karnavas, G., Paplomatas, E., Yanniotis, S., Tjamos, E.C. (2010b). Occurrence and management of mycotoxins and toxigenic fungi in grapes and pistachio nuts in Greece. In: *Proceedings of MYCORED International Workshop: "Mycotoxicological Risks in Mediterranean Countries: Economic Impact, Prevention, Management and Control"*, 25-27 October, Cairo, Egypt, 29-30.
49. Tsokou, A., Georgopoulou, K., Melliou, E., Magiatis, P., & Tsitsa, E. (2007). Composition and Enantiomeric Analysis of the essential oil of the fruits and the leaves of *Pistachia vera* from Greece. *Molecules*, **12**, 1233-1239.
50. Tuma, D., Sinha, R.N., Muir, W.E, & Abramson, D. (1989). Odour volatiles associated with microflora in damp ventilated and non-ventilated bin-stored bulk wheat. *International Journal of Food Microbiology*, **8**, 103-119.
51. Vas, G. & Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 233-254.

52. Zeringue, H.J., J.R., Bhatnagar, D., & Cleveland, T.E. (1993). C₁₅H₂₄ volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 2264-2270.

Κεφάλαιο 3. Μελέτη των χημικών ιδιοτήτων σε υγιή, ελαττωματικά και μολυσμένα με αφλατοξίνη κελυφωτά φιστίκια

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 3. Μελέτη των χημικών ιδιοτήτων σε υγιή, ελαττωματικά και μολυσμένα με αφλατοξίνη κελυφωτά φιστίκια	116
Περιεχόμενα	116
3.1. Εισαγωγή	118
3.1.1. Ελαττωματικοί καρποί.....	118
3.1.1.1. Περιγραφή – Αίτια εμφάνισης ελαττωματικών καρπών.....	118
3.1.1.2. Το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του ενδοσπερμίου	122
3.1.1.3. Η παρουσία αφλατοξίνης στους ελαττωματικούς καρπούς	124
3.1.2. Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης	126
3.2. Υλικά και Μέθοδοι	128
3.2.1. Δειγματοληψία και χειρισμός των φιστικιών	128
3.2.2. Τεχνητή μόλυνση και ανάλυση αφλατοξίνης.....	128
3.2.3. Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεϊνών	130
3.2.4. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε τέφρα.....	134
3.2.5. Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικού λίπους.....	135
3.2.6. Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων	136
3.2.6.1. Μετεστεροποίηση των λιπαρών υλών.....	136
3.2.6.2. Ανάλυση σε αεριοχρωματογράφο (GC).....	138
3.2.7. Στατιστική επεξεργασία.....	138
3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	140
3.3.1. Μέτρηση αφλατοξίνης.....	140
3.3.2. Μετρήσεις χημικών ιδιοτήτων	141
3.3.2.1. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και τέφρα	141
3.3.2.2. Περιεκτικότητα σε ολικό λίπος.....	142

3.3.2.3.	<i>Ανάλυση λιπαρών οξέων</i>	148
3.3.3.	Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση	151
3.3.3.1.	<i>Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)</i>	151
3.3.3.2.	<i>Διακριτική Ανάλυση (DA)</i>	153
3.4.	Συμπεράσματα	156
3.5.	Βιβλιογραφία	158
3.5.1.	Ελληνική βιβλιογραφία	158
3.5.2.	Διεθνής βιβλιογραφία	158

3.1. Εισαγωγή

3.1.1. Ελαττωματικοί καρποί

3.1.1.1. Περιγραφή – Αίτια εμφάνισης ελαττωματικών καρπών

Οι καρποί οι οποίοι δεν εμφανίζουν τα τυπικά, μακροσκοπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας στην οποία ανήκουν θεωρούνται ελαττωματικοί και υποβαθμίζουν ποιοτικά το τελικό προϊόν. Στους καρπούς της φιστικιάς, τα προβλήματα αυτά είναι κυρίως συνυφασμένα με τη φυσιολογία του δένδρου και η έντασή τους κυμαίνεται κατά πολύ, επηρεαζόμενη από εσωτερικούς (γονότυπο) και εξωτερικούς παράγοντες (περιβαλλοντικές συνθήκες, γεωργικές πρακτικές). Τα προβλήματα αυτά, ανάλογα τη χρονιά, αποβαίνουν καθοριστικά για το ύψος και την ποιότητα της παραγωγής και γίνονται αιτία σημαντικών απωλειών. Θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι και οι καρποί οι οποίοι φέρουν παθολογικά ή εντομολογικά συμπτώματα ανήκουν και αυτοί στους ποιοτικά υποβαθμισμένους καρπούς και διαχωρίζονται σαφώς από τους υγιείς. Ωστόσο, ο όρος ελαττωματικοί καρποί συνηθίζεται να χρησιμοποιείται για τα προβλήματα μη παρασιτικής αιτιολογίας.

Τα πιο συχνά ελαττώματα που έχουν περιγραφεί για τα κελυφωτά φιστίκια είναι (Χιτζανίδου *et al.*, 2004):

(α) *οι άσπερμοι καρποί (κούφιοι - blanks)*: Ο καρπός στερείται σπέρματος κατά την ωρίμανση, αν και έχει αποκτήσει κανονικό περικάρπιο (φλούδα και κέλυφος) (Σχήμα 36α). Είναι συνηθισμένο πρόβλημα στη φιστικιά, φτάνοντας και σε ποσοστό 20% επί της συνολικής παραγωγής. Στο στάδιο της ωριμότητας, οι άσπερμοι καρποί αναγνωρίζονται εύκολα εξωτερικά, διότι έχουν μειωμένο χρωματισμό εξωκαρπίου, η φλούδα είναι πιο συμπαγής και δεν αποκολλάται εύκολα από το κέλυφος. Επίσης, κατά τη συλλογή πέφτουν δύσκολα με δόνηση των κλάδων. Η ασπερμία είναι αποτέλεσμα της αποβολής του εμβρύου κατά το παραγωγικό στάδιο ή παρθενοκαρπίας λόγω μη γονιμοποίησης του ωοκυττάρου. Η πρώτη αιτία αποδίδεται σε διαταραχή της τροφοδότησης της σπερματικής βλάστης, κατά το στάδιο ανάπτυξης του σπέρματος (Ιούλιος – Αύγουστος, βλέπε § 1.1.3.). Αντίστοιχες διαταραχές στην τροφοδοσία του εμβρύου, σε πιο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης, οδηγεί σε ατροφία και εκφυλισμό των κοτυλιδόνων του σπέρματος, με αποτέλεσμα το σχηματισμό καρπών με μικρά σπέρματα. Οι παράγοντες που φαίνεται να επιδεινώνουν το πρόβλημα των κούφιων καρπών είναι η γονιμοποίηση από γύρη

άγριων ειδών, εκτός των αρσενικών δένδρων της φιστικιάς, η τροφοπενία σε K, B και Zn, αλλά και η μειωμένη άρδευση.

(β) *οι κλειστοί καρποί (χωρίς σχίσσιμο κελύφους – closed shell nuts)*: Ο διαχωρισμός (σχίσσιμο) στη ραφή των δύο ημίσεων τμημάτων του κελύφους αρχίζει προς τα τέλη Ιουλίου, περίπου ένα μήνα πριν ολοκληρωθεί η φυσιολογική ωρίμανση του καρπού. Πρωτίστως, το σχίσσιμο του κελύφους εξαρτάται από την πλήρη ανάπτυξη του σπέρματος, δεδομένου ότι οι άδειοι καρποί είναι πάντοτε κλειστοί. Για κάποιους ερευνητές, το σχίσσιμο οφείλεται σε μηχανική πίεση που ασκεί το σπέρμα κατά την ανάπτυξή του στα τοιχώματα του κελύφους, όσο ακόμα οι ραφές του είναι μαλακές (Ποντίκης, 1996). Άλλοι ερευνητές θεωρούν, ότι το φαινόμενο οφείλεται σε φυσιολογική και ανατομική διεργασία αφορισμού των ιστών στην περιοχή των ραφών, ως επακόλουθο της δράσης κάποιου χημικού παράγοντα που απελευθερώνεται ίσως από το σπέρμα (Crane *et al.*, 1982). Είναι ωστόσο εντυπωσιακό, ότι το φαινόμενο του σχισίματος του κελύφους εμφανίζεται μόνο στο είδος *Pistacia vera* και σε κανένα άλλο είδος του γένους *Pistacia*. Οι παράγοντες που αναφέρονται ότι σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά κλειστών καρπών, εκτός από την ιδιαιτερότητα της κάθε ποικιλίας και την ατομικότητα του κάθε δένδρου, είναι η πηγή της γύρης (γονιμοποίηση με γύρη άγριων ειδών αυξάνει το ποσοστό των κλειστών καρπών), η ανεπάρκεια στις απαιτούμενες ώρες χαμηλών θερμοκρασιών, η ανεπάρκεια σε νερό την εποχή ανάπτυξης του σπέρματος ή αντιστρόφως η υπερβολική άρδευση.

(γ) *καρποί με πρόωρο σχίσσιμο (early-split nuts)*: Συμβαίνει όταν το κέλυφος σχίζεται πριν επέλθει η φυσιολογική αποκόλληση της φλούδας, με επακόλουθο το ταυτόχρονο σχίσσιμο και της φλούδας κατά μήκος της αντίστοιχης σχισμής του κελύφους (Σχήμα 36β). Μετά το σχίσσιμο, η φλούδα μπορεί να αφυδατωθεί γρήγορα και να συρρικνωθεί. Το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί ιδιαίτερος, λόγω του ότι δημιουργείται ένας καφέ μεταχρωματισμός του κελύφους κατά μήκος της σχισμής και το σπέρμα εκτίθεται σε προσβολές εντόμων και μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνη (Doster & Michailides, 1995; Pearson & Slaughter, 1996). Οι παράγοντες που αναφέρονται ότι ευνοούν την εμφάνιση αυτού του ελαττώματος είναι οι απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας ή της υδατικής κατάστασης των ταξικαρπιών, αλλά και το είδος του υποκειμένου. Στον τελευταίο αυτό παράγοντα πιθανόν να οφείλεται και το γεγονός ότι οι καρποί με πρόωρο σχίσσιμο εμφανίζονται πολύ σπάνια στην ποικιλία «Αιγίνης» ενώ είναι πολύ συνηθισμένες στην ποικιλία Kerman.

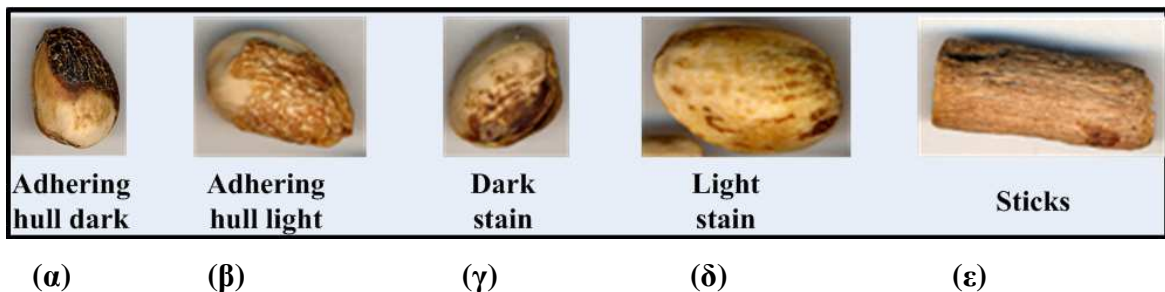
- (δ) *οι παραμορφωμένοι καρποί (C-shaped or curly nuts)*: Είναι μία ανατομική αλλοίωση, η οποία αφορά ένα σύνδρομο δυσπλασιών του κελύφους (Σχήμα 36γ), συνήθως κοντά στο σημείο πρόσφυσης με τον ποδίσκο, η οποία δυσχεραίνει την αποφλοιώση. Επειδή το πρόβλημα εκδηλώνεται πολύ πιο έντονα σε δένδρα υψηλής καρποφορίας και πολύ πριν από την έναρξη του γεμίσματος, έχει εκφραστεί η άποψη ότι ο μεγάλος αριθμός καρπών ανά ταξικαρπία, ενδεχομένως λόγω ανταγωνισμού, συντελεί στη δημιουργία συνθηκών ανεπαρκούς εφοδιασμού των ιστών με απαραίτητα μεταβολικά προϊόντα σε μερικές μόνο θέσεις του περικαρπίου, οι οποίες δεν αναπτύσσονται και εκφυλίζονται, με αποτέλεσμα να προκαλείται παραμόρφωση του καρπού.
- (ε) *καρποί με μεταχρωματισμό του κελύφους (βάψιμο του κελύφους, shell staining)*: Η κατηγορία αυτή ελαττωματικών καρπών αφορά την αλλοίωση του χρώματος, που παρουσιάζεται στην επιφάνεια του κελύφους των ώριμων καρπών, με τη μορφή κιτρινωπού (light stain) ή καστανού μεταχρωματισμού (dark stain) και φαίνονται σαν «λερωμένοι» μετά την αποφλοιώση (Σχήμα 37γ,δ). Το βάψιμο αυτό αρχίζει στη βάση του καρπού, γύρω από το σημείο πρόσφυσης στον ποδίσκο και επεκτείνεται σταδιακά προς την κοιλιακή πλευρά του κελύφους. Ο μεταχρωματισμός του κελύφους είναι αποτέλεσμα εμποτισμού του με τις φαινολικές ουσίες της φλούδας, οι οποίες προέρχονται από σήψη, φυσική αποσύνθεση ή και οξείδωση της φλούδας (Kader *et al.*, 1982). Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο, ότι το «λέρωμα» του κελύφους είναι και ενδεικτικό μυκητολογικών σήψεων ή εντομολογικών προσβολών (Doster & Michailides, 1999). Οι έρευνες δείχνουν ότι το σκούρο καστανό βάψιμο αποδίδεται σε σήψη λόγω προσβολής από τον μύκητα *Alternaria alternata*, το λαμπερό κίτρινο οφείλεται στον *Aspergillus niger*, ενώ το διάχυτο ανοικτό κίτρινο στην περίπτωση φυσικής αποσύνθεσης της φλούδας (Doster & Michailides, 2002). Η χρωματική αυτή



Σχήμα 36. (α) Άσπερμοι (κούφιοι) καρποί (β) Καρποί με πρόωρο σχίσιμο (γ) Καρποί με διάφορες παραμορφώσεις του κελύφους (Χιτζανίδου *et al.*, 2004).

αλλοίωση ευνοείται από το πρόωρο σχίσσιμο του κελύφους, την καθυστερημένη αποφλοίωση, την παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, τη μεταφορά και αποθήκευση των αναποφλοίων φιστικιών σε μεγάλους σωρούς.

- (στ) *καρποί με προσκολλημένο τμήμα της φλούδας στο κέλυφος (adhering hull)*: Το ελάττωμα αυτό εμφανίζεται λόγω απουσίας του φυσιολογικού κενού που δημιουργείται ανάμεσα στη φλούδα και το κέλυφος κατά την ωρίμανση. Σε αυτή την περίπτωση, η φλούδα δεν αποκολλάται από το κέλυφος κατά την αποφλοίωση και παραμένει και μετά το στάδιο της ξήρανσης (Σχήμα 37α,β). Αυτό συμβαίνει διότι είτε δεν έχει επέλθει η φυσιολογική αποκόλληση της φλούδας κατά την ωρίμανση, είτε έχει αφυδατωθεί και συρρικνωθεί επάνω στο κέλυφος. Οι καρποί με πρόωρο σχίσσιμο και οι άσπερμοι καρποί εμφανίζουν αυτό το σύμπτωμα με υψηλή συχνότητα.
- (ζ) *καρποί με νέκρωση του ενδοκαρπίου*: Περιλαμβάνει την εμφάνιση ενός σκοτεινού μεταχρωματισμού εντοπισμένου στο οξύ άκρο του ενδοκαρπίου (blossom end), λόγω τοπικής νέκρωσης των ιστών. Το νεκρωτικό άκρο διαχωρίζεται απότομα από το υπόλοιπο υγιές τμήμα του ενδοκαρπίου, ενώ η φλούδα διατηρείται αναλλοίωτη. Η ακριβής αιτία εμφάνισης της αλλοίωσης αυτής δεν είναι γνωστή (Χιτζανίδου *et al.*, 2004).
- (η) *καρποί με ξήρανση της κορυφής*: Όλοι οι ιστοί της κορυφής του περικαρπίου είναι νεκρωμένοι, ξηραίνονται και συρρικνώνονται (Σχήμα 38). Έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζεται σε ταξικαρπίες με περιορισμένη ανάπτυξη της ράχης. Αν και δεν έχει διευκρινιστεί η αιτιολογία του συμπτώματος αυτού, ως πιθανοί παράγοντες θεωρούνται η φυτοτοξικότητα από διάφορα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα, η ασπερμία, η ρύπανση του αέρα και η έλλειψη νερού (Χιτζανίδου *et al.*, 2004).



Σχήμα 37. Οι πιο συχνές κατηγορίες ελαττωματικών καρπών που απαντώνται κατά τη διαλογή του κελυφωτού φιστικιού, μετά το στάδιο της ξήρανσης: (α),(β) καρποί με προσκολλημένο τμήμα φλούδας στο κέλυφος (γ) καρπός με σκούρο μεταχρωματισμό στο κέλυφος (δ) καρπός με ανοικτό μεταχρωματισμό στο κέλυφος (ε) ξένες ύλες (κλαδίσκος).

3.1.1.2. Το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του ενδοσπερμίου

Η ζημιά αυτή αφορά μόνο το εσωτερικό του ενδοσπερμίου και γίνεται ορατή μόνο μετά το άνοιγμα του. Οι καρποί εξωτερικά δε φέρουν κανένα σύμπτωμα, ενώ στο εσωτερικό των κοτυληδόνων του σπέρματος εμφανίζονται ακανόνιστου σχήματος, ξηρές, σπογγώδους υφής περιοχές, χρώματος ανοιχτού πράσινου αρχικά και καστανού στη συνέχεια (Σχήμα 39α,β) (Michailides *et al.*, 1995). Οι περιοχές αυτές (νεκρωτικές κηλίδες) βρίσκονται κυρίως στην πλευρά που είναι κοντά στο σημείο πρόσφυσης του καρπού με τον ποδίσκο (peduncle) ή κατά μήκος της ραφής (Michailides *et al.*, 1988). Ωστόσο, το αίτιο των νεκρώσεων αυτών αποδίδεται σε ζημιά που προκαλείται από παρασιτικά αίτια και γι' αυτό το λόγο περιγράφεται ξεχωριστά από τις υπόλοιπες κατηγορίες ελαττωματικών καρπών. Ειδικότερα, τα έντομα της τάξης των Ημιπτέρων (κοινώς βρωμούσες), τα οποία βρίσκονται στους φιστικεώνες από τις αρχές Μαΐου μέχρι και το τέλος Αυγούστου, τρέφονται από τους καρπούς, χρησιμοποιώντας τα νύσσοντομυζητικού τύπου στοματικά τους μόρια και προκαλούν πληγές στο περικάρπιο των μικρών καρπών στην αρχή της περιόδου και νεκρωτικά συμπτώματα στο σπέρμα των ανεπτυγμένων καρπών, στο τέλος της περιόδου (Michailides *et al.*, 1987; Daane *et al.*, 2005) (Σχήμα 40α,β).

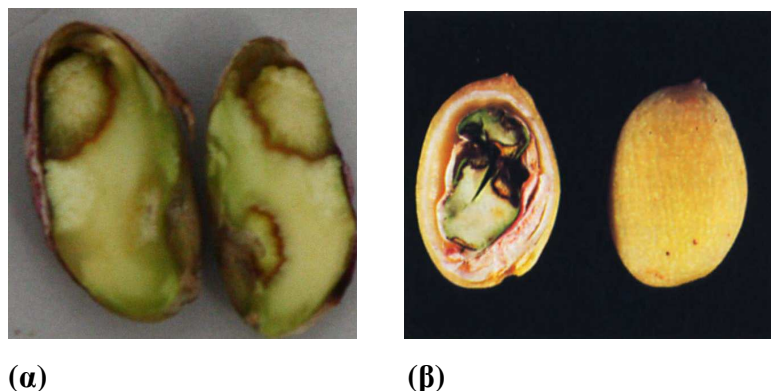
Επιπλέον, το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του σπέρματος αποδίδεται και σε προσβολή από τους μύκητες *Nematospora coryli* (ασκομύκητας) και *Aureobasidium pullulans* (βασιδιομύκητας). Οι μύκητες αυτοί επωάζονται στα στοματικά μόρια των εντόμων και μεταφέρονται στο ενδοσπέρμιο των πιο ανεπτυγμένων καρπών μέσω των νυγμάτων που προκαλούν τα έντομα (Michailides *et al.*, 1995). Η ασθένεια αυτή είναι γνωστή με το όνομα στιγματομύκωση και έχει αναφερθεί σε όλες τις φιστικοπαραγωγικές χώρες (Ιράν, Συρία, Η.Π.Α., Τουρκία, Ελλάδα) (Χιτζανίδου *et al.*, 2004). Στο Ιράν, η ασθένεια ονομάζεται «massu», δηλαδή βλέννα και εκεί περιγράφηκε για πρώτη φορά, το 1967. Για την ακρίβεια, ο όρος στιγματομύκωση είναι η γενική ονομασία μιας ασθένειας, η οποία εμφανίζεται στο εσωτερικό των καρπών ενώ εξωτερικά δείχνουν υγιείς και άθικτοι (Σχήμα 39β). Στην Ελλάδα, από αυτούς τους καρπούς απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ο μύκητας *Nematospora coryli* (Georgiadou *et al.*, 2012b) (Σχήμα 41).

Τα τελευταία χρόνια, η ζημιά από το σύμπτωμα αυτό είναι σημαντική. Οι αυξημένοι πληθυσμοί των ημιπτέρων που παρατηρούνται καθ' όλη την περίοδο ανάπτυξης του καρπού τα τελευταία χρόνια, είτε λόγω μείωσης του αριθμού εφαρμογών των εντομοκτόνων είτε λόγω κλιματικής αλλαγής, αποτελεί πιθανόν τη βασικότερη αιτία

εμφάνιση των συμπτωμάτων αυτών. Από το 2008, στο πλαίσιο της εργασίας των Georgiadou *et al.* (2012a) παρατηρήθηκε υψηλή συχνότητα καρπών που έφεραν το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας στο ενδοσπέρμιο και οι οποίοι ταυτόχρονα σχετίστηκαν με την παρουσία μυκήτων της ομάδας *Aspergillus section Flavi*. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε τόσο από τις μονάδες επεξεργασίας κελυφωτών φιστικιών όσο και από τα τμήματα ποιοτικού ελέγχου των εμπορών-διανομέων, οι οποίοι εξαναγκάστηκαν στην ανάκληση μεγάλων ποσοτήτων ελληνικών φιστικιών, εξαιτίας αυτών των συμπτωμάτων. Όλα τα παραπάνω αποτέλεσαν το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη του θέματος (Yanniotis *et al.*, 2011; Georgiadou *et al.*, 2012b).



Σχήμα 38. Ταξικαρπία με το σύμπτωμα της ξήρανσης της κορυφής. (Φωτογραφία από προσωπική συλλογή της γεωπόνου Χατζηπέρη Αθ.)



(α)

(β)

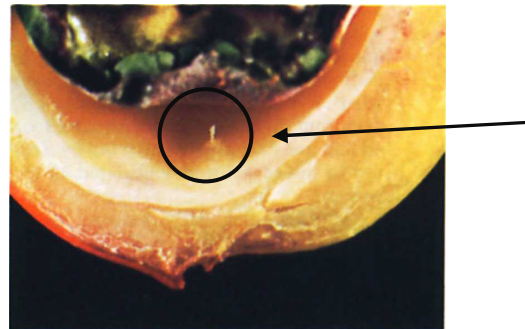
Σχήμα 39. (α) Απεικόνιση καρπών με νέκρωση του ενδοσπερμίου. Η συμπτωματολογία του προβλήματος διαφοροποιείται ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα και την περιοχή εντός της κοτυληδόνας. Η ποικιλομορφία αυτή σχετίζεται με το στάδιο ανάπτυξης του καρπού όταν συμβαίνει η προσβολή, αλλά και με το είδος του εντόμου από την τάξη των Ημιπτέρων που δημιουργεί την πληγή (φωτογραφία από προσωπική συλλογή). (β) Το σύμπτωμα δεν είναι ορατό εξωτερικά και ο ίδιος ο καρπός δείχνει άθικτος και υγιής (φωτογραφία από συλλογή της γεωπόνου Χατζηπέρη Αθ.).

3.1.1.3. Η παρουσία αφλατοξίνης στους ελαττωματικούς καρπούς

Οι καρποί που εμφανίζουν τα φυσιολογικά ελαττώματα, που περιγράφονται στην ενότητα §3.1.1.1 ή προσβολές από παθογόνα και ζημιές από παράσιτα ή γενικότερα, οι καρποί που δεν φέρουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας και δεν πληρούν τις ποιοτικές προδιαγραφές, δεν είναι αποδεκτοί για εμπορία και δεν πρέπει να διατίθενται στον καταναλωτή. Επιπλέον, από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία τεκμηριώνεται πολύ καλά, ότι η πιθανότητα παρουσίας αφλατοξίνης είναι ιδιαίτερα αυξημένη στους ποιοτικά υποβαθμισμένους καρπούς. Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι καρποί με συμπτώματα πρόωρου σχισίματος της φλούδας (early split pistachios), με μεταχρωματισμούς στο κέλυφος, με ζημιές από έντομα ή άλλα ελαττώματα έχουν υψηλότερη πιθανότητα να είναι προσβεβλημένοι από ασπέργιλλους και συνεπώς να είναι μολυσμένοι με αφλατοξίνη (Rice, 1978; Sommer *et al.*, 1986; Doster & Michailides, 1995;1999; Pearson, 1996; Pearson & Schatzki, 1998; Pearson *et al.*, 2001).



(α)



(β)

Σχήμα 40. (α) Έντομο της τάξης των Ημιπτέρων, το οποίο τρεφόμενο από τον ανεπτυγμένο καρπό μεταφέρει τον μύκητα *Nematospora coryli* εντός του σπέρματος προκαλώντας το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας. (β) Απεικόνιση της ακίδας του στίλετου από τα στοματικά μόρια των εντόμων, η οποία έχει απομείνει μετά την προσβολή του καρπού (Daane *et al.*, 2005).



Σχήμα 41. Υφές (επάνω αριστερά) και ασκοσπόρια (δεξιά) από την απομόνωση του μύκητα *Nematospora coryli*, από ελληνικά φιστίκια, τα οποία έφεραν το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του ενδοσπερμίου (Georgiadou *et al.*, 2012b).

Αντίστοιχα, αποτελέσματα από μελέτη στην Ελλάδα, με σκοπό να προσδιοριστεί σε ποιο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας και κάτω από ποιες πρακτικές παράγεται η αφλατοξίνη στα κελυφωτά φιστίκια (Georgiadou *et al.*, 2012a), έδειξαν ότι η μόλυνση είναι πιθανό να συμβεί από το στάδιο ωρίμανσης του καρπού πάνω στο δένδρο (προ-συλλεκτικά) έως και την αποθήκη (μετα-συλλεκτικά). Ωστόσο, η πολύ υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης (>900 ppb) ανιχνεύθηκε στο στάδιο της συγκομιδής σε καρπούς, οι οποίοι προέρχονταν από φιστικεώνες με εντομολογικές προσβολές (κυρίως από ευρύτομο και σκώρο). Αντίστοιχα, και στα μετασυλλεκτικά στάδια (ξήρανση, αποθήκευση), η υψηλότερη συγκέντρωση αφλατοξίνης μετρήθηκε στους καρπούς, οι οποίοι προέρχονταν από φιστικεώνες με εντομολογικές ζημιές και εμφάνιζαν διάφορα ελαττώματα (μεταχρωματισμοί κελύφους, νεκρωτικές κηλίδες ενδοσπερμίου, εντομολογικές οπές). Κατά την αποθήκευση, δείγματα κελυφωτών φιστικιών στα οποία δεν είχε μετρηθεί υψηλή ποσότητα αφλατοξίνης μέχρι αυτό το στάδιο, αλλά προσβλήθηκαν από έντομα αποθήκης, ανέπτυξαν αφλατοξίνη σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (400-600 µg/kg) μετά από 44 ημέρες αποθήκευση (Georgiadou *et al.*, 2012a).

Στην ίδια μελέτη, μύκητες του γένους *Aspergillus* section *Flavi*, απομονώθηκαν από τη φλούδα ανώριμων καρπών (τέλη Ιουλίου), οι οποίοι εμφάνιζαν ελαττώματα, ενώ κανένας ασπέργιλλος δεν απομονώθηκε από μακροσκοπικά υγιείς καρπούς από το ίδιο δείγμα σε αυτό το στάδιο ωρίμανσης (Tsitsigiannis *et al.*, 2010). Μετασυλλεκτικά, στο στάδιο μετά την ξήρανση, η ανάπτυξη των *Aspergillus* section *Flavi* δεν αναστάλθηκε πλήρως, αλλά παρατηρήθηκε μία καθυστέρηση τόσο στην ανάπτυξη όσο και στον αριθμό, σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια, δείχνοντας ότι αν και η ξήρανση αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο ανάπτυξης του μολυσματικού παράγοντα, η παραγωγή αφλατοξίνης ακόμα και σε αυτό το στάδιο δεν μπορεί να αποκλειστεί. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάστηκε μελετώντας κελυφωτά φιστίκια με το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας του ενδοσπερμίου, όταν από το σπέρμα απομονώθηκε ο μύκητας που παράγει αφλατοξίνη (Georgiadou *et al.*, 2012b). Στη συνέχεια, διαχωρίζοντας τους καρπούς αυτούς με ακτίνες X, η συνολική ποσότητα αφλατοξίνης στην παρτίδα μειώθηκε κατά 98% (Yanniotis *et al.*, 2011). Από τα παραπάνω, όπως και σε αντίστοιχες μελέτες, αποδεικνύεται ότι στους ελαττωματικούς και ποιοτικά υποβαθμισμένους καρπούς είναι πολύ πιθανή η παρουσία τοξικογόνων μυκήτων και η μέτρηση υψηλής συγκέντρωσης αφλατοξίνης.

3.1.2. Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανής η αναγκαιότητα ύπαρξης ενός σταδίου διαλογής των ελαττωματικών καρπών, ως μέτρο πρόληψης και αντιμετώπισης του προβλήματος των αφλατοξινών. Φιστίκια, τα οποία δεν ικανοποιούν τα καθορισμένα κριτήρια ποιότητας είναι «ύποπτα» για την παρουσία αφλατοξίνης και θα πρέπει να απορρίπτονται. Στην ενότητα 1.4.2.2. περιγράφονται αναλυτικά τα υπάρχοντα μηχανικά συστήματα αυτόματης διαλογής, καθώς και οι προσπάθειες ανάπτυξης νέων μεθόδων διαλογής που βρίσκονται σε ερευνητικό στάδιο (Yanniotis *et al.*, 2011). Η διαλογή, είτε γίνεται μηχανικά είτε από το εργατικό προσωπικό, στηρίζεται στην ανίχνευση διαφορών μεταξύ των υγιών και των ποιοτικά υποβαθμισμένων καρπών, οι οποίες συνιστούν και τα κριτήρια διαλογής. Τα κριτήρια διαλογής βασίζονται στις μακροσκοπικές διαφορές των φυσικών χαρακτηριστικών κυρίως (με εξαίρεση τη διαλογή στο φάσμα UV, § 1.4.2.2), οι οποίες είναι εμφανείς στο ανθρώπινο μάτι (απαραίτητο στην περίπτωση της χειροδιαλογής) ή απεικονίζονται σε άλλα μήκη κύματος, εκτός του ορατού (π.χ. διαλογείς NIR φάσματος).

Ωστόσο, στην περίπτωση των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών, θα ήταν πολύ ενδιαφέρουσα η μελέτη του χημικού τους προφίλ, δεδομένου ότι η παρουσία του μύκητα (ως παθογόνο αίτιο της μόλυνσης) και η επαγόμενη παραγωγή αφλατοξίνης μπορεί να αλλοιώνει τα χημικά χαρακτηριστικά του προϊόντος, με τέτοιο τρόπο και σε τέτοιο βαθμό, που να διακρίνονται από τα υγιή. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ότι κατά την ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων στα προϊόντα, διάφορα θρεπτικά συστατικά τους μεταβολίζονται με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το χημικό προφίλ (Dowell *et al.*, 2002). Γενικότερα, τα φιστίκια, όπως και όλα τα προϊόντα πρωτογενούς παραγωγής, ως βιολογικές δομές, ανταποκρίνονται και αντιδρούν με χημικό τρόπο, στις ζημιές που προκαλούνται από έντομα, στις προσβολές από μύκητες ή τους άλλους οικολογικούς παράγοντες. Αυτό το δεδομένο δίνει συνεπώς το έναυσμα να αναζητηθούν δείκτες μόλυνσης μέσα από τη μελέτη του χημικού προφίλ των μολυσμένων προϊόντων. Επιπλέον, παράμετροι όπως η ταυτόχρονη παρουσία στο προϊόν διαφόρων τάξεων μυκήτων ή και άλλων μικροοργανισμών εκτός της ομάδας *Flavi* των ασπεργίλλων, ο τρόπος παραγωγής της αφλατοξίνης, η παρουσία ελαττωματικών καρπών, αλλά και η φυσική παραλλακτικότητα στις χημικές ιδιότητες μεταξύ των υγιών καρπών της ίδιας ποικιλίας, θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν. Παρ' όλα αυτά, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η

περίπτωση μόλυνσης με αφλατοξίνη υγιών, με τυπικά χαρακτηριστικά προϊόντων, καθιστώντας το πρόβλημα συνθετότερο (Bayman *et al.*, 2002).

Οι χημικές ιδιότητες των τυπικά υγιών, φιστικιών έχουν μελετηθεί επαρκώς, για διάφορες ποικιλίες (Shokraii, 1977; Beuchat & Worthington, 1978; Kader *et al.*, 1982; Yildiz *et al.*, 1988; Agar *et al.*, 1995a; Zakynthinos & Rouskas, 1995; Okay, 2002; Küçüköner & Yurt, 2003; Satil *et al.*, 2003; Seferoglu *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006; Venkatachalam & Sathe, 2006; Arena *et al.*, 2007; Tsantili *et al.*, 2010). Οι παραπάνω μελέτες συμφωνούν, ότι τα χημικά χαρακτηριστικά διαφέρουν μεταξύ των ποικιλιών και επηρεάζονται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι εδαφοκλιματικές και καλλιεργητικές συνθήκες, σε βαθμό που κάποια από αυτά (λιπαρά οξέα) να μπορούν να χρησιμοποιούνται ως δείκτες προέλευσης της κάθε ποικιλίας (Agar *et al.*, 1995b; Arena *et al.*, 2007). Μεταξύ των μελετών, η εργασία των Tsantili *et al.* (2010) εστιάζει στη συγκριτική μελέτη ξένων ποικιλιών φιστικιάς, οι οποίες φυτεύτηκαν σε κοινό πειραματικό αγρό με δύο ελληνικές (Αιγίνης, Ποντικής), αξιολογώντας ορισμένα φυσικά, χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, με σκοπό τη διερεύνηση εισαγωγής νέων ποικιλιών για καλλιέργεια, κατάλληλων για τις εδαφοκλιματικές συνθήκες της Ελλάδας. Στοιχεία της χημικής σύνθεσης της ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης» δίδονται και στη μελέτη των Zakynthinos & Rouskas (1995) και από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν από το Γενικό Χημείο του Κράτους, στο πλαίσιο ένταξης του φιστικιού «Αιγίνης» στον κατάλογο των προϊόντων Π.Ο.Π. Όμως, τα χημικά χαρακτηριστικά σε ελαττωματικά και μολυσμένα με αφλατοξίνη φιστίκια, με στόχο την αναγνώριση πιθανών διαφορών, οι οποίες να τεθούν ως δείκτες μόλυνσης για την ανάπτυξη μιας μεθόδου διαλογής, δεν έχουν μελετηθεί. Τα αντικείμενα εργασίας που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο είναι:

- Να μετρηθούν ορισμένα χημικά χαρακτηριστικά (πρωτεΐνη, τέφρα, λίπος, λιπαρά οξέα) σε τρεις ομάδες κελυφωτών φιστικιών: α) υγιή (H), β) μολυσμένα με αφλατοξίνη (C) και γ) ελαττωματικά (D).
- Να προσδιοριστούν, εφόσον υπάρχουν, οι διακριτές διαφορές ανάμεσα στις τρεις ομάδες ως προς το χημικό τους προφίλ, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν αξιόπιστους δείκτες μόλυνσης ή ελαττωματικότητας.
- Να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των δεικτών αυτών στο διαχωρισμό των υγιών καρπών από τις υπόλοιπες ομάδες (μολυσμένα με αφλατοξίνη, ελαττωματικά).

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1. Δειγματοληψία και χειρισμός των φιστικιών

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 31 δείγματα αποξηραμένων φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης». Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: 1) υγιή, τα οποία έφεραν τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας (**H:Healthy**), 2) μολυσμένα με αφλατοξίνη, με φυσικό ή τεχνητό τρόπο (**C:Contaminated**) και 3) ελαττωματικά (**D:Defected**) (Πίνακας 14). Τα δείγματα της ομάδας H (υγιή) προήλθαν από διάφορες περιοχές καλλιέργειας του κελυφωτού φιστικιού στην Ελλάδα και συγκομίστηκαν κατά τα έτη 2009 - 2011. Τα δείγματα της ομάδας C που ήταν προσβεβλημένα με αφλατοξίνη με φυσικό τρόπο (C.6-A, C.7-A) προήλθαν από τοπικές μονάδες επεξεργασίας ξηρών καρπών, ενώ βρίσκονταν στο στάδιο της απόσυρσης. Τα υπόλοιπα μολυσμένα δείγματα της ομάδας C που περιείχαν αφλατοξίνη, προήλθαν μετά από τεχνητή μόλυνση των αντίστοιχων υγιών δειγμάτων, με αφλατοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus* στο εργαστήριο. Τα δείγματα της ομάδας D προήλθαν από τοπικές μονάδες επεξεργασίας κελυφωτού φιστικιού, μετά τη χειροδιαλογή, τα οποία χωρίστηκαν σε πέντε υποκατηγορίες, ανάλογα με τον τύπο του ελαττώματος που έφεραν (Σχήμα 42), και οι οποίες ονομαστικά αναφέρονται ως, **DK**: καρποί με κίτρινο μεταχρωματισμό στο κέλυφος, **DE**: καρποί με σκούρο μεταχρωματισμό στο κέλυφος, **DM**: μικροί-παραμορφωμένοι καρποί, **DT**: καρποί με εμφανή εντομολογική οπή στο κέλυφος και **DF**: καρποί με προσκολλημένο τμήμα της φλούδας στο κέλυφος. Το τελικό βάρος κάθε δείγματος για όλες τις ομάδες ήταν 0.5 κιλά και τοποθετήθηκαν σε ερμητικά κλειστές πλαστικές σακούλες στο ψυγείο μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας και ανάλυσης. Στον Πίνακα 14 δίδονται όλες οι πληροφορίες σχετικά με την προέλευση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των χημικών χαρακτηριστικών, ανά ομάδα.

3.2.2. Τεχνητή μόλυνση και ανάλυση αφλατοξίνης

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 14, τα πέντε δείγματα της ομάδας C προήλθαν από τεχνητή μόλυνση υγιών φιστικιών, με το αφλατοξικογόνο στέλεχος Δ.1-3 AF2 του μύκητα *A. flavus*. Ό,τι αφορά την απομόνωση, το χαρακτηρισμό και την επιλογή του στελέχους, καθώς και τη διαδικασία της μόλυνσης, την επώαση και τη διατήρηση των δειγμάτων, έχουν περιγραφεί αναλυτικά στην §2.2.2. Στη συνέχεια, σε όλα τα δείγματα της ομάδας C και D μετρήθηκε η συγκέντρωση αφλατοξίνης με ανάλυση σε HPLC. Η διαδικασία περιγράφεται με λεπτομέρεια στην §2.2.3.

Πίνακας 14. Περιγραφή των δειγμάτων αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των χημικών χαρακτηριστικών.

<i>Ομάδα Δείγματος</i>	<i>Ταυτότητα Δείγματος*</i>	<i>Προέλευση</i>	<i>Έτος Περίοδος συγκομιδής</i>	<i>Μέθοδος Ξήρανσης</i>	
H: Υγιή	H.1-A	Αίγινα	2009-κανονική	φυσική	
	H.2-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική	
	H.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	ξηραντήριο	
	H.4-K	Καπανδρίτι	2010- κανονική	φυσική	
	H.5-Π	Πόρος	2010- κανονική	φυσική	
	H.6-M	Μάκρη	2010- κανονική	φυσική	
	H.7-E	Εύβοια	2010-πρώιμη	φυσική	
	H.8-E	Εύβοια	2010-όψιμη	φυσική	
	H.9-B	Βοτανικός	2010- κανονική	φυσική	
C: Μολυσμένα με αφλατοξίνη	Τεχνητά	C.1-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	μολυσμένα με	C.2-K	Καπανδρίτι	2010- κανονική	φυσική
	αφλατοξικογόνο	C.3-Π	Πόρος	2010- κανονική	φυσική
	στέλεχος	C.4-M	Μάκρη	2010- κανονική	φυσική
		C.5-E	Εύβοια	2010-πρώιμη	φυσική
	Φυσικά	C.6-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	μολυσμένα	C.7-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
D: Ελαττωματικά	Κίτρινος	DK.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
	μεταχρωματισμός	DK.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
	στο κέλυφος	DK.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Σκούρος	DE.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
	μεταχρωματισμός	DE.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
	στο κέλυφος	DE.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Μικροί	DM.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
	παραμορφωμένοι	DM.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
	καρποί	DM.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Έντομολογική οπή	DT.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
	εμφανής στο	DT.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
	κέλυφος	DT.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Προσκολλημένο	DF.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
	τμήμα της	DF.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
	φλούδας στο	DF.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
κέλυφος					

* Το κεφαλαίο γράμμα δίπλα στον αριθμό του δείγματος προσδιορίζει την περιοχή προέλευσης.

3.2.3. Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεϊνών

Η μέτρηση της περιεκτικότητας των σπερμάτων των φιστικιών σε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl, σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο του AOAC 950.48. Η μέθοδος αυτή αποτελεί τη συνηθέστερη μέθοδο για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας οποιουδήποτε τροφίμου, σε πρωτεΐνες. Ουσιαστικά βασίζεται στην ολική μετατροπή των αζωτούχων συστατικών ενός τροφίμου σε αμμωνιακά άλατα. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι κατά τη μέτρηση με τη μέθοδο Kjeldahl, εκτός από το άζωτο των πρωτεϊνών προσδιορίζεται και το άζωτο άλλων ενώσεων όπως νουκλεϊνικών οξέων, αλκαλοειδών, χρωστικών κλπ.

Τα στάδια της διαδικασίας που ακολουθήθηκε περιγράφονται παρακάτω:

Βήμα 1 - Προετοιμασία δειγμάτων: Μετά τον διαχωρισμό του κελύφους, τα σπέρματα του φιστικιού αλέθονται σε εργαστηριακό μύλο (Tekmar A-10) και τοποθετούνται σε φούρνο στους 60°C για 6 ώρες για απώλεια της υγρασίας. Στη συνέχεια, σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας (Kern ABS) ζυγίζονται περίπου 0.5g σπέρματος φιστικιού (χρησιμοποιώντας χαρτιά ζύγισης ελεύθερα αζώτου MN 226.9x11,5 εκ.) σε 3 διαφορετικές επαναλήψεις, από κάθε δείγμα.



Σχήμα 42. Οι πέντε υπο-κατηγορίες δειγμάτων της ομάδας των ελαττωματικών καρπών (D). Αυτές οι κατηγορίες είναι και οι πιο συχνοί τύποι ελαττωμάτων που απαντώνται κατά την επεξεργασία κελυφωτού φιστικιού στην Ελλάδα.

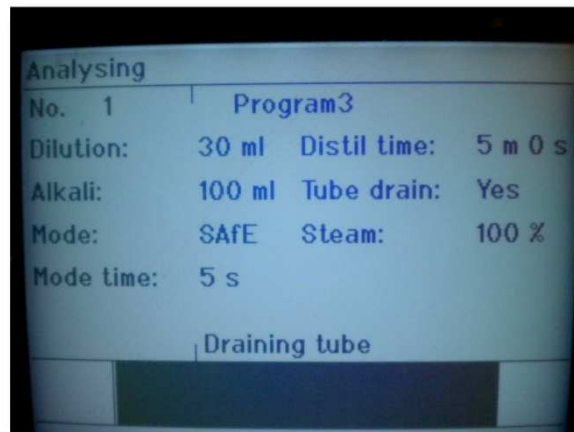
Βήμα 2 - Λευκός προσδιορισμός (blank): Αφορά τον προσδιορισμό του αζώτου που τυχόν υπάρχει στα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια κατά τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και το οποίο προστίθεται στο άζωτο των αγνώστων δειγμάτων και αλλοιώνει τα αποτελέσματα. Ο λευκός προσδιορισμός εκτελείται στην αρχή και ακολουθείται η πλήρης διαδικασία χωρίς να υπάρχει δείγμα (φιστίκι). Το αποτέλεσμα του λευκού (χωρίς δείγμα) προσδιορισμού αφαιρείται από το αποτέλεσμα του προσδιορισμού με δείγμα.

Βήμα 3 - Καύση δείγματος: Το ξηρό δείγμα (0.5g) τοποθετείται αρχικά στον πυθμένα ενός γυάλινου σωλήνα καύσης και προστίθεται μια ταμπλέτα Kjeldahl (Merck) και αντιαφριστική σιλικόνη, καθώς επίσης και 25mL διαλύματος πυκνού θειϊκού οξέος (H_2SO_4) 95-97%. Στη συνέχεια, οι γυάλινοι σωλήνες τοποθετούνται στη συσκευή καύσης (Σχήμα 43) και παραμένουν εκεί, έως ότου το δείγμα διαγύσει και αποκτήσει ασθενώς κυανοπράσινο χρώμα (περίπου μία ώρα στους $430^{\circ}C$). Κατά την καύση, το οργανικό άζωτο των δειγμάτων οξειδώνεται παρουσία του H_2SO_4 και του καταλύτη και μετατρέπεται ποσοτικά σε θειϊκό αμμώνιο $(NH_4)_2SO_4$. Η ταμπλέτα Kjeldahl (καταλύτης) περιέχει: 96.5% Na_2SO_4 , 1.5% $CuSO_4$, 2% Se. Η παρουσία του ενσωματωμένου άλατος στην ταμπλέτα Kjeldahl είναι απαραίτητη για την αύξηση του σημείου βρασμού του H_2SO_4 , ενώ οι ενσωματωμένοι καταλύτες (Se, Hg, Cu) επιταχύνουν τη διαδικασία της καύσης.



Σχήμα 43. Συσκευή υγρής καύσης (εφοδιασμένη με διάταξη απαγωγής αερίων) Velp Scientifica (Du6).

Βήμα 4 - Απόσταξη: Μετά το τέλος της καύσης του δείγματος, κάθε γυάλινος σωλήνας, αφού κρυώσει, τοποθετείται στη συσκευή απόσταξης Kjeldahl (Kjeltec™ 8100 Distillation Unit, 220V/50Hz) και ρυθμίζεται στο προκαθορισμένο πρόγραμμα απόσταξης (Σχήμα 44). Μέσα στην αποστακτική συσκευή προστίθενται αυτόματα 30mL H₂O και 100 mL NaOH 40%, ενώ στην έξοδο της αποστακτικής συσκευής τοποθετείται κωνική φιάλη με 50mL βορικού οξέος (H₃BO₃) 4%, με δείκτες πράσινο της βρωμοκρεζόλης και κόκκινο του μεθυλίου. Κατά την απόσταξη, το θειϊκό αμμώνιο (που παρήχθη κατά την καύση) σε αλκαλικό περιβάλλον διασπάται και παράγεται αμμωνία, η οποία ψύχεται και διαβιβάζεται στο διάλυμα H₃BO₃, όπου δεσμεύεται με την μορφή βορικού αμμωνίου (NH₄)₃BO₃. Η απόσταξη θεωρείται ικανοποιητική εφόσον συλλεχθούν τουλάχιστον 150-200mL αποστάγματος στην κωνική φιάλη.



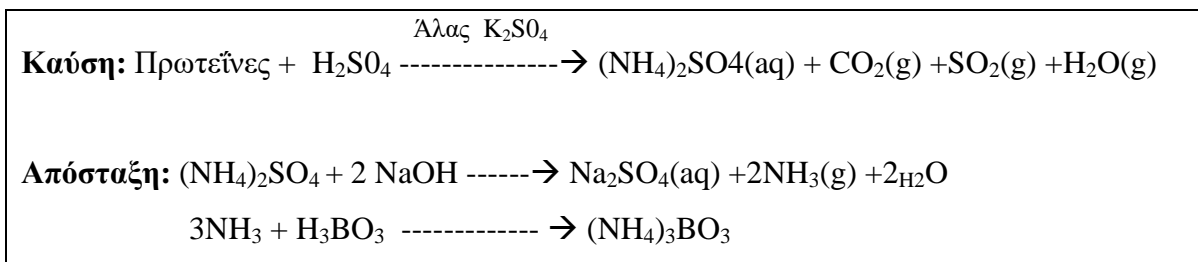
Σχήμα 44. Συσκευή απόσταξης Kjeltec™ 8100 Distillation Unit, 220V/50Hz, με ρυθμιζόμενο πρόγραμμα.

Βήμα 5 - Τιτλοδότηση: Ακολουθεί ογκομέτρηση με υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0.1 N χρησιμοποιώντας ως δείκτη μίγμα ερυθρού του μεθυλίου και πράσινου της βρωμοκρεζόλης, έως ότου το διάλυμα του αποστάγματος αποκτήσει μια ελαφρώς ροζ απόχρωση (Σχήμα 45). Από την ογκομέτρηση με HCl υπολογίζεται το περιεχόμενο του αζώτου σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\%N = \frac{(\text{mL HCl for sample} - \text{mL HCl for blank}) \times \text{normality of HCl} \times 14.007 \times 100}{\text{Wt of sample (mg)}} \quad \text{Εξ. 2}$$

$$\text{Protein (\%)} = \text{total N(\%)} \times 5.3 \quad \text{Εξ. 3}$$

Στην εξίσωση 3, η εκατοστιαία ποσότητα του ολικού αζώτου πολλαπλασιάζεται με τον εμπειρικό συντελεστή 5.3, ο οποίος δεν είναι σταθερός για κάθε ομάδα τροφίμου και υπολογίζεται η ποσοστιαία ποσότητα της πρωτεΐνης κάθε δείγματος (Belitz *et al.*, 2006). Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στα στάδια προσδιορισμού της περιεκτικότητας πρωτεϊνών κατά Kjeldahl αναφέρονται συνοπτικά παρακάτω:



Σχήμα 45. Απεικόνιση της μεταβολής του χρώματος του (NH₄)₃BO₃ κατά την τιτλοδότηση με HCl.

3.2.4. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε τέφρα

Η μέτρηση της περιεκτικότητας των σπερμάτων των φιστικιών σε τέφρα πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την επίσημη μέθοδο AOAC 923.03. Η τέφρα, ως το ανόργανο υπόλειμμα που απομένει μετά την τέλεια καύση των οργανικών συστατικών των προϊόντων, αποτελεί ένα από τα συστατικά της βασικής σύνθεσης και καθορίζει την ποιότητα και την ταυτότητά τους (Κωμαΐτης, 2014).

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, από το αρχικό δείγμα λαμβάνεται μία ποσότητα 0.5g ψιλοαλεσμένου και αποξηραμένου σπέρματος φιστικιού ζυγισμένο σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας (Kern ABS) και τοποθετείται σε πορσελάνινα χωνευτήρια καύσης. Τα χωνευτήρια έχουν προηγουμένως προθερμανθεί σε ηλεκτρικό φούρνο (Gallenkamp, Plus Oven) στους 100°C για 15 λεπτά και έχει καταγραφεί το απόβάρό τους, αφού έλθουν σε κανονική θερμοκρασία μέσα σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο (P₂O₅). Στη συνέχεια, τοποθετούνται στον αποτεφρωτήρα (Vulcan 3-550 NEY) για πρόκαυση στους 250°C για 2 ώρες, μέχρι να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο μέρος της οργανικής ύλης και να αποφευχθεί ο αφρισμός κατά την αποτέφρωση (Σχήμα 46α). Έπειτα, ακολουθεί τέλεια καύση με αποτέφρωση όλου του άνθρακα στους 550°C για 6 ώρες. Στο τέλος, το στερεό άκαυστο υπόλειμμα ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας (Sartorius, B 120 S) και επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου το βάρος να παραμένει σταθερό. Ο χειρισμός των χωνευτηριών γίνεται με μεταλλικές λαβίδες και η μέτρηση του βάρους γίνεται αφού κρυώσουν τα δείγματα σε ξηραντήριο (Σχήμα 46β).



(α)



(β)

Σχήμα 46. (α) Φούρνος αποτέφρωσης Vulcan 3-550 NEY και (β) Τοποθέτηση των χωνευτηριών καύσης σε ξηραντήριο με αφυγραντικό μέσο (P₂O₅).

Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για τη μέτρηση της τέφρας. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα των δειγμάτων φιστικιού σε τέφρα υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Τέφρα \%} = 100 \times (\beta - \alpha) / B \quad \text{Εξ. 4}$$

Όπου :

α : το απόβαρο χωνευτηρίου σε g.

β : το μικτό βάρος χωνευτηρίου μετά την αποτέφρωση σε g.

B : το βάρος του δείγματος σε g.

3.2.5. Προσδιορισμός περιεκτικότητας ολικού λίπους

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών λιπιδίων στο σπέρμα των κελυφωτών φιστικιών προσδιορίστηκε με ημισυνεχή εκχύλιση με οργανικό διαλύτη σε συσκευή Soxhlet, σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 948.22. Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, μια ποσότητα 3-4 g από το κάθε δείγμα, μεταφέρεται στο φυσίγγιο εκχύλισης (καρτούσα) και λαμβάνεται μέτρηση από το απόβαρο (κενή καρτούσα) και το μικτό βάρος (καρτούσα + δείγμα) σε αναλυτικό ζυγό (Sartorius, B 120 S). Το δείγμα έχει προηγουμένως ψιλοαλεστεί σε αναλυτικό μύλο (Tekmar A-10) και αποξηραθεί μέχρι σταθερού βάρους σε φούρνο (Gallenkamp, Plus Oven) στους 102-105°C, ώστε να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Στη συνέχεια, η καρτούσα με το δείγμα τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής Soxhlet, ο οποίος προσαρμόζεται σε προζυγισμένη γυάλινη φιάλη (Σχήμα 47), η οποία περιέχει 250-300 mL από το διαλύτη εκχύλισης (πετρελαϊκός αιθέρας). Το δείγμα εκχυλίζεται για έξι ώρες. Μετά την παραλαβή του λίπους, ο διαλύτης εκχύλισης απομακρύνεται με περιστρεφόμενο εξατμιστήρα κενού (Büchi Rotavapor, R-114) συνδεδεμένο με υδατόλουτρο (Büchi Waterbath, B-480) στους 50°C. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε λίπος υπολογίστηκε α) με απ'ευθείας ζύγιση του ελαίου μετά την εξάτμιση σε αναλυτικό ζυγό (Εξίσωση 5) και β) με ζύγιση των απολιπασμένων δειγμάτων (η καρτούσα μετά το τέλος της εκχύλισης) σε ζυγό ακριβείας (Εξίσωση 6) και λήφθηκε η μέση τιμή των δύο μετρήσεων. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

$$(\alpha) \% \text{ λίπος} = \frac{B1 - B0}{B2} \times 100 \quad \text{Εξ. 5}$$

Όπου:

B2 = το βάρος του αρχικού δείγματος σε g.

B1 = το βάρος της φιάλης μετά την εκχύλιση με το δείγμα σε g.

B_0 = απόβαρο φιάλης σε g.

$$(\beta) \% \text{ λίπος} = \frac{G_0 - G_1}{G_2} \times 100$$

Εξ. 6

Όπου:

G_2 = το βάρος του αρχικού δείγματος σε g.

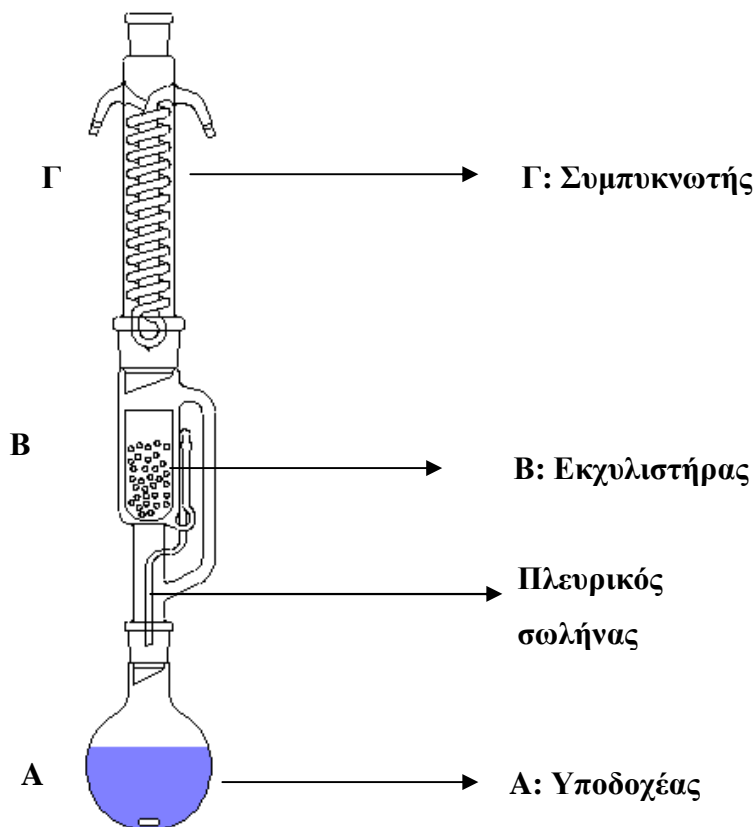
G_1 = το μικτό βάρος της καρτούσας με το απολιπασμένο δείγμα μετά την εκχύλιση σε g.

G_0 = το μικτό βάρος της καρτούσας πριν την εκχύλιση σε g.

3.2.6. Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων

3.2.6.1. Μετεστεροποίηση των λιπαρών υλών

Η ανάλυση των λιπαρών υλών πραγματοποιήθηκε σε αεριοχρωματογράφο (GC). Ωστόσο, πριν την ανάλυση σε GC, οι λιπαρές ύλες του φιστικιού, οι οποίες παραλήφθηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης που περιγράφηκε στην § 3.2.5, μετατρέπονταν με



Σχήμα 47: Συσκευή ημισυνεχούς εκχύλισης Soxhlet.

άμεση μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλ-εστέρες τους, ώστε να αποφευχθεί η τρανσισομερίωση των μεθυλιωμένων λιπαρών οξέων, με μία αντίδραση δύο σταδίων, όπως περιγράφεται στην εργασία των Papanikolaou *et al.* (2011). Λόγω του ότι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν είναι πτητικά είναι δύσκολο να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία (GC). Για το λόγο αυτό παραγωγοποιούνται, αφού μετατραπούν σε μεθυλεστέρες, οι οποίοι έχουν χαμηλά σημεία ζέσεως και διαφορετικούς συντελεστές κατανομής. Με αυτόν τον τρόπο, ο προσδιορισμός τους με αέρια χρωματογραφία γίνεται εφικτός, αφού διαλυθούν σε κατάλληλο διαλύτη (Κωμαΐτης, 2014). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, η εστεροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια: το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον χρησιμοποιώντας μεθοξείδιο του νατρίου ($\text{CH}_3\text{O-Na}^+$) και το δεύτερο σε όξινο χρησιμοποιώντας υδροχλωρική μεθανόλη ($\text{CH}_3\text{OH/HCl}$). Κατά το πρώτο στάδιο τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στα μόρια των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν, τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ενυπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Στο διάλυμα $\text{CH}_3\text{O-Na}^+$ περιέχεται 1% μεταλλικό νάτριο σε μίγμα μεθανόλης:βενζολίου σε αναλογία 70:30 (v/v). Το διάλυμα $\text{CH}_3\text{OH/HCl}$ παρασκευάζεται διαλύοντας 50 mL ακετυλο-χλωριδίου σε 625 mL μεθανόλης (Κωμαΐτης, 2014).

Πιο συγκεκριμένα, σε σφαιρική φιάλη μεταφέρονται 100mg λίπους ζυγισμένου σε αναλυτικό ζυγό (Sartorius, B 120 S) και προστίθενται 10 mL $\text{CH}_3\text{O-Na}^+$, 1-2 σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης ως δείκτης pH και λίγες πέτρες βρασμού. Το δείγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού για 20 λεπτά σε κάθετο ψυκτήρα. Στη συνέχεια, προστίθενται αργά, από το πάνω μέρος του ψυκτήρα 5-10 mL διαλύματος υδροχλωρικής μεθανόλης (έως ότου το pH γίνει όξινο και το διάλυμα αποχρωματιστεί) και αφήνεται να βράσει για επιπλέον 20 λεπτά. Διακόπτεται η θέρμανση, ακολουθεί προσθήκη απιονισμένου νερού, ώστε να λάβει τέλος η αντίδραση και το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη. Προστίθενται 6 mL n-εξανίου, το δείγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται για λίγα λεπτά προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (επάνω η οργανική με το εξάνιο και κάτω η υδατική) και να εκχυλιστούν οι μεθυλεστέρες. Η φάση του εξανίου συλλέγεται σε μικρό φιαλίδιο, προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θειϊκού νατρίου (Na_2SO_4) για την απορρόφηση της υγρασίας και φυλάσσεται στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυση με GC.

3.2.6.2. Ανάλυση σε αεριοχρωματογράφο (GC)

Η ανάλυση του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο (GC) πραγματοποιήθηκε με έγχυση 1-2 μL με ειδική σύριγγα από το διάλυμα των μεθυλεστέρων στην υποδοχή του αερίου χρωματογράφου (Fisons 8060, Manchester, UK), συζευγμένου με έναν ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID) και μία τριχοειδή στήλη (60m x 0.25mm, DB 23, J&W Scientific). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο υψηλής καθαρότητας, με ροή 2mL/min υπό σταθερή πίεση. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν προγραμματισμένη στους 200°C για 13 λεπτά και στη συνέχεια, με βαθμιδωτή αύξηση έως τους 220°C με ρυθμό 2°C/λεπτό και έως τους 240°C με ρυθμό 20°C/λεπτό, όπου και παρέμενε για τρία λεπτά. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή είχε ρυθμιστεί στους 250°C. Ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων βασίστηκε στη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης (tR) των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων του δείγματος με αυτών ενός πρότυπου διαλύματος που περιείχε τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAME Mix C8-C22, Supelco Analytical, USA). Από το πηλίκιο του εμβαδού της κάθε κορυφής προς το συνολικό εμβαδό υπολογίστηκε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος. Η ανάλυση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα ελαίου.

3.2.7. Στατιστική επεξεργασία

Στην πρώτη φάση της στατιστικής επεξεργασίας, τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χημικών ιδιοτήτων αναλύθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου της ανάλυσης διακύμανσης (ή διασποράς) κατά ένα κριτήριο (One-way ANOVA). Σκοπός της ανάλυσης αυτής ήταν να διερευνηθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (H, C, D) σε κάποια από τις χημικές ιδιότητες που αξιολογήθηκαν (πρωτεΐνες, τέφρα, λίπος, λιπαρά οξέα). Η σύγκριση στις μέσες τιμές των δειγμάτων της κάθε ομάδας πραγματοποιήθηκε για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Tukey με $p < 0.05$ και σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Η μέθοδος ANOVA εφαρμόστηκε επίσης για σύγκριση των δειγμάτων εντός της ομάδας των υγιών (H) για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά, ώστε να περιγραφεί η εντός της ομάδας παραλλακτικότητα. Η δοκιμή t (t-test) χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση ζεύγους δειγμάτων με διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Σε δεύτερη φάση, η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων βασίστηκε στην πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση, με σκοπό να διερευνηθεί αν κάποιο από τα χημικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν ή ένας συνδυασμός τους (μεταβλητές), θα μπορούσε

να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο ή «δείκτης», ώστε να διαχωριστούν και να ταξινομηθούν τα δείγματα (παρατηρήσεις) στις τρεις ομάδες (H,C,D). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Component Analysis – PCA) και η διακριτική (ή διαχωριστική) ανάλυση (Discriminant Analysis - DA).

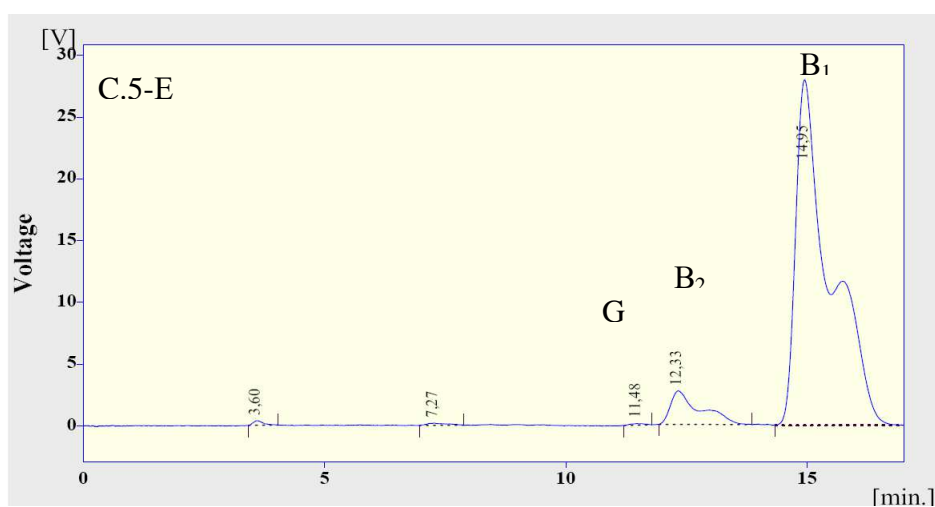
Η PCA εφαρμόστηκε με σκοπό την εύρεση των κύριων συνιστωσών (γραμμικοί μετασχηματισμοί των αρχικών μεταβλητών, ασυσχέτιστοι μεταξύ τους), οι οποίες μπορούν να ερμηνεύσουν ένα μεγάλο ποσοστό της διακύμανσης, ώστε να μειωθεί η μεταβλητότητα των αρχικών δεδομένων. Σε συνέχεια, εφαρμόστηκε η DA ώστε να διερευνηθεί ποιά χημικά χαρακτηριστικά ή συνδυασμός τους (μεταβλητές πρόβλεψης) είναι κατάλληλα να διαχωρίσουν και να ταξινομήσουν τα επιμέρους δείγματα των φιστικιών (παρατηρήσεις) στις τρεις ομάδες: υγιή, μολυσμένα με αφλατοξίνη, ελαττωματικά. Η DA στοχεύει στο να βρεθεί ένας διαχωριστικός κανόνας (μια διακριτική συνάρτηση), που να μπορεί να κατατάξει σωστά όσο το δυνατόν περισσότερες παρατηρήσεις. Σε αυτή την περίπτωση, στη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 19 μεταβλητές πρόβλεψης, οι οποίες αντιστοιχούν στα χημικά χαρακτηριστικά που μετρήθηκαν, έτσι ώστε να αναπτυχθεί ο κανόνας (γραμμική συνάρτηση) που θα διαχωρίσει και θα ταξινομήσει σωστά τα 31 δείγματα φιστικιού στις αντίστοιχες ομάδες τους. Οι διακριτικές συναρτήσεις με τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95.0%. Όλες οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό λογισμικό πακέτο STATGRAPHICS® Centurion XV.II.

3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.3.1. Μέτρηση αφλατοξίνης

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση αφλατοξίνης των δειγμάτων της ομάδας C και στο Σχήμα 48 ένα χρωματογράφημα ανάλυσης στην HPLC από το δείγμα C.5-E. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ανάλυση αφλατοξίνης πραγματοποιήθηκε και στα δείγματα των ελαττωματικών καρπών, αλλά δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 15, η ποσότητα αφλατοξίνης που μετρήθηκε ήταν υψηλή, με το C.5-E δείγμα να περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα.. Σε όλες τις μετρήσεις, η αφλατοξίνη B₁ βρέθηκε να είναι η κυρίαρχη σε σχέση με τις άλλες, κατέχοντας ποσοστό >90% της συνολικής ποσότητας αφλατοξίνης. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στις μετρήσεις των δειγμάτων της §2.3.1., αλλά επαληθεύεται και από άλλες αναλύσεις στα κελυφωτά φιστίκια (Georgiadou *et al.*, 2012a). Τα χρωματογραφήματα από τις αναλύσεις αφλατοξίνης στην HPLC όλων των δειγμάτων είναι διαθέσιμα στο Παράρτημα I.

Θα πρέπει να επισημανθεί επίσης η παρουσία G αφλατοξίνης, τόσο στα τεχνητά μολυσμένα δείγματα, όσο και στα μολυσμένα με φυσικό τρόπο. Όπως συζητήθηκε αναλυτικά στην §2.3.1., το αφλατοξικογόνο στέλεχος Δ-1.3 AF2, χαρακτηρίστηκε ως *Aspergillus flavus*, S_{BG} μορφότυπος βάσει του μεγέθους των σκληρωτίων του (Georgiadou *et al.*, 2015). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία και με την παρατήρηση ότι τα στελέχη S παράγουν πολύ περισσότερη αφλατοξίνη από τα στελέχη L (Amaiike & Keller, 2011).



Σχήμα 48. HPLC χρωματογράφημα από την ανάλυση αφλατοξίνης στο δείγμα C.5-E (1^η επανάληψη).

Πίνακας 15. Συγκέντρωση αφλατοξίνης σε δείγματα κελυφωτού φιστικιού από την ομάδα των μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων (C), όπως μετρήθηκαν με ανάλυση HPLC.

Δείγματα	Αφλατοξίνη (μg/kg) ^a				Σύνολο
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
C.1-A	1149.1 ±9.6	11.0 ±0.2	4.2 ±0.8	<LOQ	1164
C.2-K	1321.1 ±56.1	60.6 ±0.01	5.8 ±0.4	<LOQ	1387
C.3-P	1171.4 ±26.0	11.6 ±0.5	4.3 ±1.5	<LOQ	1187
C.4-M	1004.8 ±17.7	7.3 ±1.0	6.4 ±1.1	<LOQ	1019
C.5-E	1584.5 ±7.0	60.2 ±0.5	8.4 ±0.7	<LOQ	1653
C.6-A	671.4 ±64.7	24.3 ±6.8	75.0 ±3.9	3.5 ±0.8	774
C.7-A	520.4 ±18.0	6.1 ±0.5	<LOQ	<LOQ	526

^a: τα αποτελέσματα αφορούν τις μέσες τιμές τριών επαναλήψεων και δίδονται με τη μορφή μ.ο.±σ.

LOQ: Το Όριο Ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification) της μεθόδου είναι 0.18 μg/kg όπως προσδιορίστηκε από τις δοκιμές ανάκτησης σε δείγματα κελυφωτού φιστικιού (Georgiadou *et al.*, 2012a)

3.3.2. Μετρήσεις χημικών ιδιοτήτων

3.3.2.1. Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και τέφρα

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χημικών ιδιοτήτων για όλα τα δείγματα των ομάδων H, C, D παρουσιάζονται στον Πίνακα 16, ως ο μέσος όρος του δείγματος για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά. Δίπλα στη μέση τιμή, φαίνεται η τυπική απόκλιση και το αποτέλεσμα της στατιστικής ανάλυσης (σύγκριση μεταξύ των ομάδων) με τη μορφή γραμμάτων, για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 16, η μέση περιεκτικότητα των φιστικιών σε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε από 16.6% έως 18.9% ξ.β. και η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των υγιών, των μολυσμένων με αφλατοξίνη και ελαττωματικών φιστικιών (οριζόντια σύγκριση) στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Αντίστοιχα, η μέση περιεκτικότητα σε τέφρα μετρήθηκε από 2.3% έως 3.0% ξ.β. χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων που μελετήθηκαν (H, C, D). Οι τιμές αυτές συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που πραγματοποιήθηκαν στην ποικιλία «Αιγίνης» (Tsantili *et al.*, 2010), αλλά και σε ξένες ποικιλίες (Shokraii, 1977; Okay, 2002; Küçüköner & Yurt, 2003).

Στον Πίνακα 17, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χημικών ιδιοτήτων στα δείγματα της ομάδας H, των υγιών φιστικιών, ως ο μέσος όρος των επαναλήψεων για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Σε αντιστοιχία με τον Πίνακα 16, δίπλα στη μέση τιμή, φαίνεται η τυπική απόκλιση και το αποτέλεσμα της στατιστικής ανάλυσης (κάθετη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων) με τη μορφή γραμμάτων, για κάθε ιδιότητα

ξεχωριστά. Από τον Πίνακα 17, φαίνεται η διακύμανση στις τιμές των χημικών ιδιοτήτων για τα υγιή, τυπικά της ποικιλίας «Αιγίνης» φιστίκια, καθώς και η παραλλακτικότητα των δειγμάτων εντός της ομάδας. Όσον αφορά την πρωτεΐνη, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα μετρήθηκε στο δείγμα Η.6-Μ από την περιοχή της Μάκρης (16.6% ξ.β.), ενώ η υψηλότερη στο δείγμα Η.4-Κ (18.9% ξ.β.) από την περιοχή του Καπανδριτίου. Τα δείγματα που προέρχονται από την ίδια περιοχή, όπως τα Η.1-Α, Η.2-Α, Η.3-Α (Αίγινα) και Η.7-Ε, Η.8-Ε (Εύβοια) δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, ενώ το δείγμα από την πιο βόρεια περιοχή της Ελλάδας (Μάκρη) έχει σημαντική διαφορά με τα υπόλοιπα δείγματα, που προέρχονται από τις νοτιότερες περιοχές.

Η παραλλακτικότητα εντός των δειγμάτων της ομάδας των υγιών απεικονίζεται και στο Σχήμα 49. Τα δείγματα που δεν εμφανίζουν σημαντική διαφορά εμπεριέχονται στον ίδιο κύκλο ή οι κύκλοι τους επικαλύπτονται. Στην περίπτωση της μέτρησης της πρωτεΐνης φαίνεται ότι τα δείγματα Η.6-Μ και Η.4-Κ, που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ανήκουν σε τελείως ξεχωριστούς κύκλους. Στον προσδιορισμό της τέφρας, δεν μετρήθηκαν τόσο έντονες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της ομάδας των υγιών, όπως φαίνεται από τον Πίνακα 17 και από το Σχήμα 49. Σε κάθε περίπτωση, η παραλλακτικότητα που εμφανίζεται ανάμεσα στα δείγματα των υγιών φιστικιών αντανακλά την επίδραση άλλων παραγόντων, εκτός της ποικιλίας, στα χημικά χαρακτηριστικά του φιστικιού, όπως οι εδαφοκλιματικοί και καλλιεργητικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν επισημανθεί και σε άλλες μελέτες (Okay, 2002; Seferoglu *et al.*, 2006). Θα πρέπει όμως να παρατηρηθεί ότι η μελέτη της επίδρασης αυτών των παραγόντων στα χημικά χαρακτηριστικά του φιστικιού δεν περιλαμβάνεται στους σκοπούς της παρούσας διατριβής και δεν είναι συνεπώς δυνατό να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα με τον παρόντα πειραματικό σχεδιασμό. Όμως, οι ενδείξεις που προκύπτουν είναι συναφείς με τα αποτελέσματα από τις παραπάνω σχετικές μελέτες.

3.3.2.2. Περιεκτικότητα σε ολικό λίπος

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των μετρήσεων της πρωτεΐνης και της τέφρας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ολικό λίπος μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 16). Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα της ομάδας C που ήταν μολυσμένα με αφλατοξίνη μετρήθηκε μικρότερη περιεκτικότητα σε λίπος συγκριτικά με τα υγιή. Αντίστοιχη τάση παρουσιάζεται και στην ομάδα των ελαττωματικών φιστικιών, ιδιαίτερα

στην κατηγορία DF, στα οποία υπήρχε προσκολλημένο τμήμα της φλούδας επάνω στο κέλυφος. Ωστόσο, στις υπόλοιπες κατηγορίες ελαττωματικών φιστικιών, η διαφορά δεν ήταν σημαντική σε σύγκριση με τα υγιή, σύμφωνα με τη δοκιμή Tukey. Η περιεκτικότητα σε λίπος της ποικιλίας «Αιγίνης», όπως μετρήθηκε από την ομάδα των υγιών φιστικιών κυμάνθηκε από 57.5% έως 62% ξ.β. Από τον Πίνακα 17 επίσης, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων της ομάδας των υγιών, δείχνοντας μια πιο ομοιογενή συμπεριφορά ως προς αυτό το χημικό χαρακτηριστικό.

Από διάφορες μελέτες στα κελυφωτά φιστίκια τεκμηριώνεται ότι η περιεκτικότητα σε λίπος διαφοροποιείται μεταξύ των ποικιλιών της *Pistacia vera* (Tsantili *et al.*, 2010; Agar *et al.*, 1995b) και των περιοχών προέλευσης και καλλιέργειας (Satil *et al.*, 2003; Seferoglu *et al.*, 2006), αλλά επηρεάζεται και από το στάδιο ωρίμανσης του καρπού (Agar *et al.*, 1995a). Παρ'όλα αυτά, στην παρούσα μελέτη, οι παραπάνω παράγοντες που φαίνεται να επιδρούν στην περιεκτικότητα των καρπών σε λίπος δεν υφίστανται, λαμβάνοντας υπ'όψιν ότι όλα τα δείγματα ανήκουν στην ίδια ποικιλία, αλλά και ότι τα τεχνητά μολυσμένα δείγματα προέρχονται από τα αντίστοιχα υγιή και συνεπώς, από την ίδια περιοχή καλλιέργειας και το ίδιο στάδιο ωρίμανσης. Στο Σχήμα 50, απεικονίζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε λίπος στα υγιή δείγματα και στα αντίστοιχα μολυσμένα δείγματα, τα οποία προέκυψαν μετά την τεχνητή μόλυνση των υγιών. Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα του Σχήματος 50, συγκρίνοντας τα αντίστοιχα ζεύγη υγιών-μολυσμένων είναι χαρακτηριστική η μειωμένη ποσότητα σε ολικό λίπος, σε όλα τα μολυσμένα δείγματα, ενώ στα τρία από αυτά (H.2-A/C.1-A, H.5-Π/C.3-Π, H.8-E/C.5-E) η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε ολικό λίπος των υπόλοιπων δύο δειγμάτων της ομάδας C, που ήταν μολυσμένα με αφλατοξίνη με φυσικό τρόπο ήταν επίσης χαμηλότερη από τα υγιή με τιμές 55.8% και 56.4%, αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μικρή αυτή μείωση του ολικού λίπους θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία του μύκητα και τη μόλυνση με αφλατοξίνη.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ότι οι μύκητες του γένους *Aspergillus*, παράγουν λιπάσες, οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογόνο δύναμη του μύκητα (Amaike & Keller, 2011). Κατά την εισβολή, εγκατάσταση και αποίκισή τους στους ιστούς του ξενιστή, χρησιμοποιούν τα πλούσια σε λίπος θρεπτικά συστατικά του ξενιστή, με αποτέλεσμα η περιεκτικότητα του μέσου (καρπός) σε λίπος να μειώνεται, υπέρ της παραγωγής και αύξησης της μυκηλιακής τους μάζας (Paranikolaou *et al.*, 2011). Γενικότερα, ο μύκητας *A. flavus* αποικίζει κατά προτίμηση προϊόντα πλούσια σε λίπος και εμφανίζει μια έντονα λιπολυτική δράση, λόγω του ότι οι λιπάσες που

ενεργοποιούνται χαρακτηρίζονται από μη-εξειδικευμένη δράση (Belitz *et al.*, 2006). Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι η έκφραση του γονιδίου *lipA*, το οποίο έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί στον *A. flavus* για την κωδικοποίηση μιας λιπάσης, σχετίζεται με την παραγωγή αφλατοξίνης (Amaike & Keller, 2011). Τα αποτελέσματα της §2.3.2.3 της παρούσας διατριβής συνάδουν με την παρατήρηση αυτή, δεδομένου ότι οι πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν από τα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα αποτελούν στην πλειοψηφία τους δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης των λιπαρών οξέων, τα οποία παράγονται χημικά ή ενζυμικά με τη δράση της λιπάσης (Georgiadou *et al.*, 2015).

Από την άλλη πλευρά, θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ενζυμική δραστηριότητα κατά την αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου δεν περιορίζεται μόνο στην απόκτηση θρεπτικών συστατικών για το παθογόνο (μύκητας), αλλά επάγει και τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας και άμυνας από την πλευρά του ξενιστή. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τις λιπάσες του ξενιστή, για την παραγωγή πτητικών ενώσεων, οι οποίες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή αφλατοξίνης (Amaike & Keller, 2011). Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε επιπλέον μείωση της περιεκτικότητας σε λίπος του φυτικού ιστού, λόγω της ενεργοποίησης των ενδογενών φυτικών λιπασών, οι οποίες επάγονται κατά την εισβολή ενός παθογόνου ή όταν επικρατούν μη-ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες (Urchurch, 2008).

Οι ελαττωματικοί καρποί της ομάδας D, δεν εμφάνισαν σημαντική μείωση στην εκατοστιαία περιεκτικότητα σε λίπος, σε σύγκριση με τα υγιή δείγματα, με εξαίρεση την υποκατηγορία DF. Όπως περιγράφεται και στην §3.1.1.1. του παρόντος κεφαλαίου, οι καρποί που εμφανίζουν το ελάττωμα της προσκόλλησης του φλοιού στο κέλυφος είναι συνήθως ανώριμοι, με υπανάπτυκτο σπέρμα, γεγονός το οποίο σχετίζεται με τη μειωμένη περιεκτικότητα σε λάδι (Agar *et al.*, 1995a; Ποντίκης, 1996). Τα διαθέσιμα δεδομένα για τα χημικά χαρακτηριστικά των ελαττωματικών φιστικιών είναι πολύ περιορισμένα. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, οι Kader *et al.* (1982), αναφέρουν ότι δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην ελαιοπεριεκτικότητα των σπερμάτων των κελυφωτών φιστικιών, τα οποία εμφάνιζαν διαφορετικής έντασης και έκτασης μεταχρωματισμούς (λεκιάσματα) στο κέλυφος.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χημικών ιδιοτήτων σε υγιή (H), μολυσμένα (C) και ελαττωματικά (D) φιστίκια.

Χημική ιδιότητα	Ομάδα H Υγιή		Ομάδα C Μολυσμένα με αφλατοξίνη		Ομάδα D									
	mean \pm s	SD	mean \pm s	SD	DK (κίτρινο κέλυφος)		DE (σκούρο κέλυφος)		DM (παραμορφωμένα)		DT (εντομολογική οπή)		DF (με τμήμα φλούδας)	
					mean \pm s	SD	mean \pm s	SD	mean \pm s	SD	mean \pm s	SD	mean \pm s	SD
% πρωτεΐνη (ξ.β.)	17.8 \pm 0.5	a	18.1 \pm 0.4	a	18.0 \pm 0.3	a	18.8 \pm 0.4	a	18.9 \pm 0.4	a	18.2 \pm 0.4	a	17.9 \pm 0.3	a
% τέφρα (ξ.β.)	2.6 \pm 0.2	a	2.7 \pm 0.1	a	2.5 \pm 0.1	a	2.5 \pm 0.2	a	2.2 \pm 0.2	a	2.2 \pm 0.1	a	2.8 \pm 0.2	a
% λίπος (ξ.β.)	59.4 \pm 1.0	c	54.2 \pm 0.7	ab	58.0 \pm 1.1	bc	56.6 \pm 1.5	bc	54.9 \pm 2.2	abc	54.9 \pm 0.8	abc	50.3 \pm 0.9	a
Λιπαρά οξέα (%)														
Μυριστικό C _{14:0}	0.2 \pm 0.01	a	0.1 \pm 0.05	a	0.1 \pm 0.01	a	0.1 \pm 0.01	a	0.1 \pm 0.01	a	0.1 \pm 0.05	a	0.1 \pm 0.01	a
Παλμιτικό C _{16:0}	10.3 \pm 0.8	a	9.3 \pm 0.7	a	10.0 \pm 0.3	a	9.8 \pm 0.2	a	9.7 \pm 0.2	a	10.0 \pm 0.3	a	10.0 \pm 0.5	a
Παλμιτελαϊκό C _{16:1}	0.9 \pm 0.1	a	1.0 \pm 0.2	a	1.0 \pm 0.04	a	1.0 \pm 0.1	a	0.9 \pm 0.03	a	1.0 \pm 0.03	a	1.0 \pm 0.1	a
Στεαρικό C _{18:0}	1.6 \pm 0.3	a	1.7 \pm 0.4	a	1.5 \pm 0.1	a	1.4 \pm 0.05	a	1.9 \pm 0.1	a	1.3 \pm 0.1	a	1.5 \pm 0.3	a
Ελαϊκό C _{18:1 n-9 cis}	68.5 \pm 3.9	a	68.2 \pm 4.5	a	69.3 \pm 2.3	a	69.7 \pm 1.5	a	71.5 \pm 0.7	a	69.3 \pm 0.9	a	69.9 \pm 4.4	a
Λινελαϊκό C _{18:2 n-9,12}	16.7 \pm 3.2	a	17.3 \pm 3.0	a	17.2 \pm 2.1	a	16.8 \pm 1.3	a	14.9 \pm 0.7	a	17.3 \pm 1.0	a	16.3 \pm 4.1	a
Α-Λινολενικό C _{18:3 n-9,12,15}	0.3 \pm 0.02	a	0.2 \pm 0.01	a	0.3 \pm 0.02	a	0.3 \pm 0.01	a	0.3 \pm 0.01	a	0.3 \pm 0.01	a	0.3 \pm 0.03	a
Αραχιδικό C _{20:0}	0.2 \pm 0.03	a	0.1 \pm 0.03	a	0.1 \pm 0.01	a	0.1 \pm 0.01	a	0.2 \pm 0.01	a	0.1 \pm 0.01	a	0.1 \pm 0.02	a
Γονδοϊκό C _{20:1}	0.4 \pm 0.03	a	0.4 \pm 0.05	a	0.4 \pm 0.03	a	0.4 \pm 0.04	a	0.4 \pm 0.02	a	0.4 \pm 0.01	a	0.4 \pm 0.02	a
Βεχενικό C _{22:0}	0.3 \pm 0.02	a	0.3 \pm 0.02	a	0.5 \pm 0.04	a	0.6 \pm 0.03	a	0.3 \pm 0.01	a	0.5 \pm 0.03	a	0.3 \pm 0.04	a
TS	12.5 \pm 0.9	a	11.5 \pm 0.9	a	11.8 \pm 0.3	a	11.8 \pm 0.1	a	12.0 \pm 0.1	a	11.8 \pm 0.4	a	12.2 \pm 0.3	a
MUFA	69.9 \pm 3.9	a	69.7 \pm 4.4	a	71.4 \pm 1.6	a	71.6 \pm 1.0	a	73.0 \pm 0.5	a	70.7 \pm 1.4	a	71.8 \pm 3.3	a
PUFA	17.0 \pm 3.2	a	17.5 \pm 3.0	a	17.5 \pm 2.1	a	17.1 \pm 1.3	a	15.2 \pm 0.7	a	17.6 \pm 1.0	a	16.6 \pm 4.2	a
MUFA:PUFA	4.3 \pm 1.1	a	4.1 \pm 0.9	a	4.1 \pm 0.6	a	4.2 \pm 0.4	a	4.8 \pm 0.3	a	4.0 \pm 0.3	a	4.5 \pm 1.4	a
TUFA	86.8 \pm 1.4	a	87.2 \pm 2.4	a	88.9 \pm 0.6	a	88.6 \pm 0.3	a	88.2 \pm 0.3	a	88.3 \pm 0.6	a	88.4 \pm 0.9	a
TUFA:TS	7.0 \pm 0.6	a	7.6 \pm 0.7	a	7.5 \pm 0.2	a	7.5 \pm 0.1	a	7.4 \pm 0.05	a	7.5 \pm 0.3	a	7.3 \pm 0.1	a

SD:(Significant Difference) Ένδειξη της σημαντικότητας της διαφοράς μεταξύ των ομάδων για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά (οριζόντια σύγκριση), όπως υπολογίστηκε από τη δοκιμή ANOVA ($p \leq 0.05$ σε 95% επίπεδο εμπιστοσύνης). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ αν περιέχεται έστω και ένα γράμμα ίδιο δεν υφίσταται σημαντική διαφορά.

TS: (Total Saturated) Ολικά κορεσμένα λιπαρά οξέα, **MUFA:** (Mono-Unsaturated Fatty Acids) Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. **PUFA:** (Poly-Unsaturated Fatty Acids) Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, **TUFA:** (Total Unsaturated Fatty Acids) Ολικά ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χημικών ιδιοτήτων σε υγιή φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».

Χημική ιδιότητα	H.1-A	H.2-A	H.3-A	H.4-K	H.5-P	H.6-M	H.7-E	H.8-E	H.9-V
	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD
% πρωτεΐνη (ξ.β.)	17.9 \pm 0.3 abc	18.1 \pm 1.5 bc	18.4 \pm 0.8 bc	18.9 \pm 0.5 c	18.3 \pm 0.1 bc	16.6 \pm 1.1 a	17.9 \pm 0.2 abc	17.0 \pm 0.01 ab	17.5 \pm 0.3 abc
% τέφρα (ξ.β.)	2.5 \pm 0.1 a	2.6 \pm 0.1 ab	2.5 \pm 0.05 ab	2.8 \pm 0.3 ab	3.0 \pm 0.1 b	2.7 \pm 0.2 ab	2.4 \pm 0.1 a	2.4 \pm 0.1 a	2.3 \pm 0.4 a
% λίπος (ξ.β.)	58.7 \pm 0.1 a	62.2 \pm 0.4 a	58.0 \pm 1.9 a	59.1 \pm 1.2 a	57.5 \pm 1.0 a	59.1 \pm 0.5 a	60.0 \pm 0.7 a	58.8 \pm 0.1 a	60.9 \pm 0.9 a
Λιπαρά οξέα (%)									
Μυριστικό C _{14:0}	0.2 \pm 0.06 a	0.1 \pm 0.03 a	0.09 \pm 0.01 a	0.3 \pm 0.3 a	0.2 \pm 0.1 a	0.2 \pm 0.2 a	0.07 \pm 0.01 a	0.08 \pm 0.01 a	0.1 \pm 0.01 a
Παλμιτικό C _{16:0}	10.5 \pm 0.1 bc	9.7 \pm 0.1 ab	11.2 \pm 0.01 cd	10.5 \pm 0.4 bc	11.7 \pm 0.2 d	10.4 \pm 0.9 bc	9.5 \pm 0.04 ab	10.1 \pm 0.04 abc	9.0 \pm 0.2 a
Παλμιτελαϊκό C _{16:1}	1.0 \pm 0.08 bc	0.7 \pm 0.05 a	0.8 \pm 0.01 ab	1.0 \pm 0.03 c	1.0 \pm 0.1 c	1.0 \pm 0.07 c	1.0 \pm 0.01 c	1.0 \pm 0.01 c	0.8 \pm 0.01 a
Στεαρικό C _{18:0}	1.4 \pm 0.03 a	1.3 \pm 0.02 a	1.6 \pm 0.01 ab	1.3 \pm 0.2 a	2.1 \pm 0.1 c	2.1 \pm 0.3 c	1.4 \pm 0.01 a	1.4 \pm 0.01 ab	1.9 \pm 0.02 bc
Ελαϊκό C _{18:1 n-9 cis}	63.5 \pm 1.0 a	66.8 \pm 0.2 bc	68.9 \pm 0.1 c	64.8 \pm 1.0 ab	64.8 \pm 1.5 b	71.5 \pm 0.7 d	74.4 \pm 0.2 e	68.7 \pm 0.1 c	73.1 \pm 0.2 de
Λινελαϊκό C _{18:2 n-9,12}	21.1 \pm 0.6 f	19.9 \pm 0.1 e	15.7 \pm 0.01 c	20.3 \pm 0.1 ef	17.3 \pm 0.8 d	13.4 \pm 0.4 b	12.4 \pm 0.03 a	17.2 \pm 0.03 cd	13.4 \pm 0.1 ab
A-Λινολενικό C _{18:3 n-9,12,15}	0.3 \pm 0.01 ab	0.3 \pm 0.01 a	0.3 \pm 0.01 a	0.3 \pm 0.03 ab	0.3 \pm 0.07 b	0.3 \pm 0.01 ab	0.2 \pm 0.01 a	0.3 \pm 0.01 ab	0.3 \pm 0.01 ab
Αραχιδικό C _{20:0}	0.2 \pm 0.01 a	0.1 \pm 0.01 a	0.1 \pm 0.01 a	0.1 \pm 0.04 a	0.2 \pm 0.07 a	0.2 \pm 0.09 a	0.1 \pm 0.02 a	0.1 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.04 a
Γονδοϊκό C _{20:1}	0.4 \pm 0.04 ab	0.4 \pm 0.01 abc	0.4 \pm 0.01 abc	0.4 \pm 0.01 a	0.4 \pm 0.01 c	0.4 \pm 0.03 ab	0.4 \pm 0.01 abc	0.4 \pm 0.01 a	0.4 \pm 0.06 bc
Βεχενικό C _{22:0}	0.1 \pm 0.01 a	0.4 \pm 0.1 a	0.1 \pm 0.01 a	0.5 \pm 0.1 a	0.1 \pm 0.06 a	0.1 \pm 0.01 a	0.3 \pm 0.1 a	0.5 \pm 0.06 a	0.4 \pm 0.07 a
TS	12.4 \pm 0.2 ab	11.7 \pm 0.2 ab	13.1 \pm 0.01 bc	12.9 \pm 0.8 b	14.3 \pm 0.4 c	13.0 \pm 0.8 b	11.4 \pm 0.2 a	12.2 \pm 0.03 ab	11.6 \pm 0.5 ab
MUFA	64.9 \pm 0.9 a	68.0 \pm 0.2 bc	70.2 \pm 0.1 c	66.2 \pm 0.9 ab	66.2 \pm 1.0 b	72.9 \pm 0.7 d	75.8 \pm 0.2 e	70.1 \pm 0.1 c	74.4 \pm 0.3 de
PUFA	21.4 \pm 0.6 f	20.2 \pm 0.1 e	15.9 \pm 0.1 c	20.5 \pm 0.1 ef	17.6 \pm 0.8 d	13.7 \pm 0.3 b	12.6 \pm 0.1 a	17.5 \pm 0.1 cd	13.6 \pm 0.1 ab
MUFA:PUFA	3.0 \pm 0.1 a	3.4 \pm 0.05 b	4.4 \pm 0.05 d	3.2 \pm 0.05 ab	3.8 \pm 0.2 c	5.3 \pm 0.1 e	6.0 \pm 0.05 f	4.0 \pm 0.05 d	5.5 \pm 0.05 e
TUFA	86.3 \pm 0.4 ab	88.1 \pm 0.3 c	86.1 \pm 0.1 abc	86.8 \pm 0.9 bc	83.8 \pm 0.6 a	86.6 \pm 0.8 bc	88.5 \pm 0.2 c	87.6 \pm 0.1 bc	88.0 \pm 0.4 c
TUFA:TS	7.0 \pm 0.1 bcd	7.6 \pm 0.1 bcd	6.6 \pm 0.05 ab	6.7 \pm 0.6 bc	5.9 \pm 0.2 a	6.7 \pm 0.5 bc	7.8 \pm 0.1 d	7.2 \pm 0.1 bcd	7.6 \pm 0.3 cd

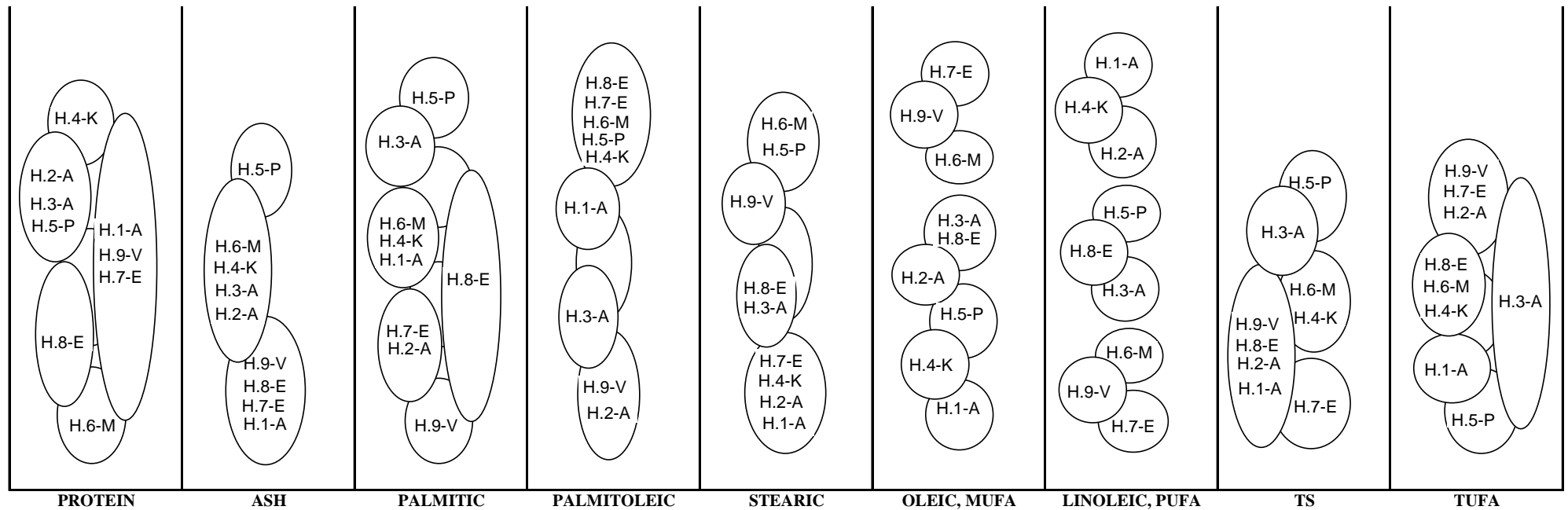
SD:(Significant Difference) Ένδειξη της σημαντικότητας της διαφοράς μεταξύ των δειγμάτων για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά (οριζόντια σύγκριση), όπως υπολογίστηκε από τη δοκιμή ANOVA ($p \leq 0.05$ σε 95% επίπεδο εμπιστοσύνης). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ αν περιέχεται έστω και ένα γράμμα ίδιο δεν υφίσταται σημαντική διαφορά.

TS: (Total Saturated) Ολικά κορεσμένα λιπαρά οξέα.

MUFA: (Mono-Unsaturated Fatty Acids) Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

PUFA: (Poly-Unsaturated Fatty Acids) Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

TUFA: (Total Unsaturated Fatty Acids) Ολικά ακόρεστα λιπαρά οξέα.



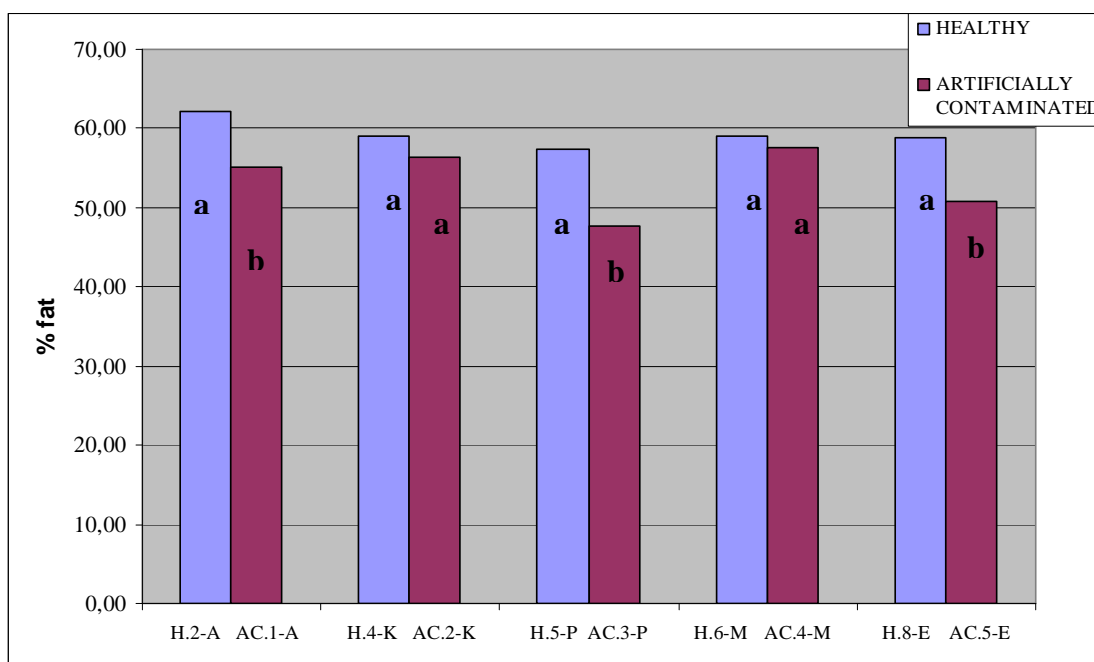
Σχήμα 49. Απεικόνιση της παραλλακτικότητας των δειγμάτων από την ομάδα των υγιών (H), για κάθε χημική ιδιότητα που υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, εντός της ομάδας, σύμφωνα με τη δοκιμή ANOVA ($p \leq 0.05$ σε 95% επίπεδο εμπιστοσύνης). Τα δείγματα που βρίσκονται εντός του ίδιου κύκλου ή οι κύκλοι τους επικαλύπτονται δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (ομοιογενής ομάδα). Τα δείγματα που βρίσκονται σε διαφορετικούς κύκλους και οι κύκλοι τους δεν εφάπτονται έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη χημική ιδιότητα που αναφέρεται.

TS: (Total Saturated) Ολικά κορεσμένα λιπαρά οξέα.

TUFA: (Total Unsaturated Fatty Acids) Ολικά ακόρεστα λιπαρά οξέα.

3.3.2.3. Ανάλυση λιπαρών οξέων

Το προφίλ των λιπαρών οξέων από το έλαιο των σπερμάτων των κελυφωτών φιστικιών περιλαμβάνει το μυριστικό, το παλμιτικό, το παλμιτελαϊκό, το στεαρικό, το ελαϊκό, το λινελαϊκό, το Α-λινολενικό, το αραχιδικό, το γονδοϊκό και το βεγενικό, με κατανομή η οποία μοιάζει πολύ με αυτή του ελαιολάδου. Η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητά τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 16, για τα δείγματα όλων των ομάδων και στον Πίνακα 17 για τα δείγματα της ομάδας των υγιών. Το ελαϊκό οξύ ($C_{18:1\ n9}$) αποτελεί το κύριο λιπαρό οξύ ποσοτικά, όπως μετρήθηκε σε όλα τα δείγματα, με τιμές που κυμαίνονται από 64.8% έως 74.4% β/β στα υγιή φιστίκια (Πίνακας 17). Δεύτερο σε ποσοστιαία περιεκτικότητα μετρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις το λινελαϊκό οξύ ($C_{18:2\ n9,12}$) με τιμές από 12.4% έως 21.1% στα υγιή δείγματα και τρίτο το παλμιτικό ($C_{16:0}$) με τιμές από 9.0% έως 11.7% β/β (Πίνακας 17). Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα βρέθηκαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, όπως το παλμιτελαϊκό και το στεαρικό ή σε ίχνη, όπως το μυριστικό, το Α-λινολενικό, το αραχιδικό, το γονδοϊκό και το βεγενικό.



Σχήμα 50. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε λίπος (% fat) των φιστικιών, όπως μετρήθηκε στα υγιή δείγματα (healthy) και στα αντίστοιχά τους τεχνητά μολυσμένα δείγματα (artificially contaminated). Τα γράμματα a,b δείχνουν τη σημαντική διαφορά μεταξύ των ζευγών των δειγμάτων, όπως υπολογίστηκε με τη δοκιμή t (t-test). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντική διαφορά σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

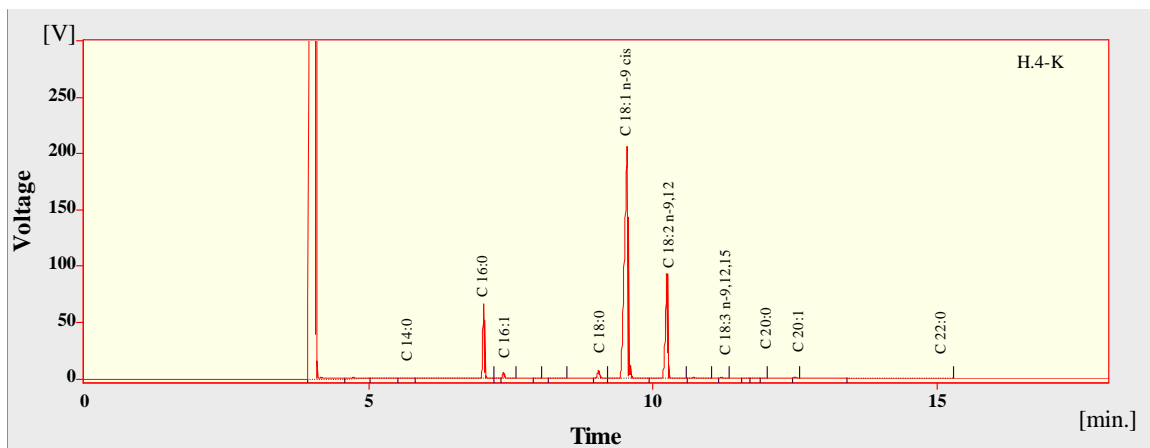
Στο Σχήμα 51α απεικονίζεται το χρωματογράφημα από την ανάλυση των λιπαρών οξέων του δείγματος H.4-K και στο Σχήμα 51β, η ανάλυση από το αντίστοιχο τεχνητά μολυσμένο δείγμα C.2-K. Τα χρωματογραφήματα των αναλύσεων των λιπαρών οξέων για όλα τα δείγματα απεικονίζονται στο Παράρτημα III.

Αν και το γενικό προφίλ των λιπαρών οξέων είναι όμοιο ανάμεσα στα δείγματα της ομάδας των υγιών (H), υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς την εκατοστιαία περιεκτικότητα, για ορισμένα λιπαρά οξέα, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 17 και το Σχήμα 49. Η παραλλακτικότητα αυτή, όπως και στις άλλες περιπτώσεις των χημικών ιδιοτήτων που μελετήθηκαν, αποδίδεται στη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων, εφόσον όλα ανήκουν στην ίδια ποικιλία (Seferoglu *et al.*, 2006). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 49, η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα εντός της ομάδας των υγιών εμφανίζεται στην περιεκτικότητα του ελαϊκού, του λινελαϊκού και του παλμιτικού οξέος. Ανεξαρτήτως όμως της γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων, το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ είναι τα οξέα, τα οποία ουσιαστικά καθορίζουν ποσοτικά την περιεκτικότητα του ελαίου σε μονο-ακόρεστα και πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα, αντίστοιχα. Συνεπώς, η παραλλακτικότητα εντός της ομάδας των υγιών δειγμάτων ως προς το ποσοστό των μονο-ακόρεστων και πολυ-ακόρεστων λιπαρών οξέων, ακολουθεί την ίδια εικόνα με την περιεκτικότητα σε ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ.

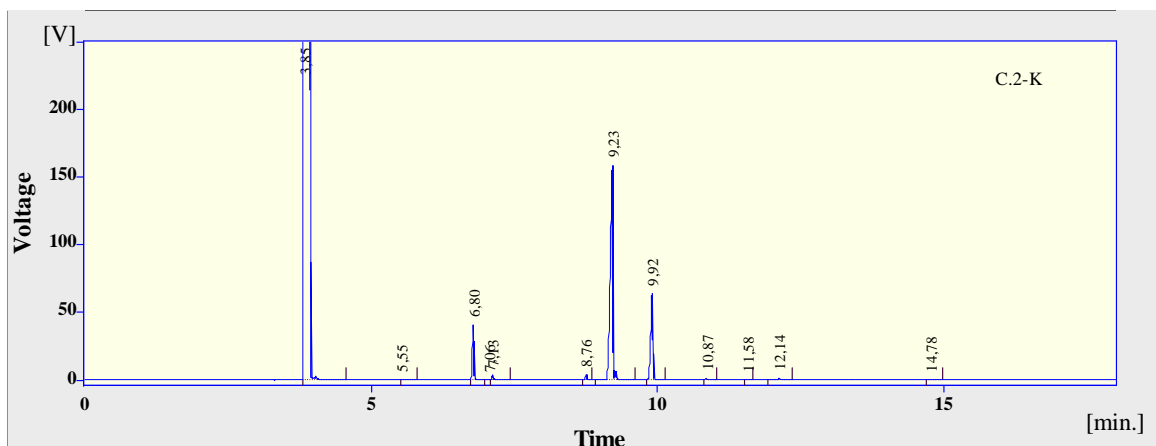
Η αρνητική συσχέτιση στη μεταξύ τους περιεκτικότητα φαίνεται επίσης στο Σχήμα 49. Όπως έχει παρατηρηθεί και στις άλλες σχετικές μελέτες, οι συγκεντρώσεις αυτών των δύο λιπαρών οξέων έχουν ένα συμπληρωματικό χαρακτήρα (Agar *et al.*, 1995a,b). Ομοίως, τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη δείχνουν ότι το δείγμα H.1-A, το οποίο έχει τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε ελαϊκό οξύ, έχει ταυτόχρονα την υψηλότερη συγκέντρωση σε λινελαϊκό οξύ. Αντίθετα, στο δείγμα H.7-E μετρήθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση σε ελαϊκό, ενώ η χαμηλότερη σε λινελαϊκό. Η αναλογία ελαϊκό:λινελαϊκό παραμένει περίπου σταθερή μεταξύ των δειγμάτων, με μέση τιμή 4.3, πολύ κοντά στην τιμή που αναφέρεται στην μελέτη των Arena *et al.* (2007), για το έλαιο των κελυφωτών φιστικιών από διάφορες χώρες προέλευσης. Επίσης, ο δείκτης ακορεστότητας, όπως προσδιορίστηκε από το πηλίκο της ολικής συγκέντρωσης των ακόρεστων προς τη συνολική συγκέντρωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων (TUFA:TS) έχει τιμή 7 για την ομάδα των υγιών. Η τιμή αυτή είναι πολύ κοντά σε αυτήν που αναφέρεται στη μελέτη των Agar *et al.* (1995a), για ώριμους καρπούς (7.0-8.0), αλλά και στην τιμή 6.5, η οποία δίνεται στη μελέτη των Arena *et al.* (2007) για διάφορες ποικιλίες. Γενικότερα, η ποσοτική σύνθεση των λιπαρών οξέων, όπως προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα

σχετικών μελετών, οι οποίες αναφέρονται είτε στην τοπική ποικιλία «Αιγίνης» (Tsantili *et al.*, 2010) είτε σε άλλες ποικιλίες (Okay, 2002; Satil *et al.*, 2003; Arena *et al.*, 2007). Οι διάφορες αποκλίσεις που παρατηρούνται, αποδίδονται στον παράγοντα ποικιλία και στις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες επιδρούν στη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Kader *et al.*, 1982; Seferoglu *et al.*, 2006). Ωστόσο, οι διαφορές που αναμένονται μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ποικιλίας, με γεωγραφική απόκλιση προέλευσης, στο μέγεθος μιας χώρας όπως η Ελλάδα, είναι σαφώς μικρότερες απ'ότι στην περίπτωση διαφορετικών ποικιλιών από διαφορετικές χώρες.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της εκατοστιαίας περιεκτικότητας του κάθε λιπαρού οξέος μεταξύ των ομάδων H, C και D, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 16, εφαρμόζοντας τη μέθοδο ANOVA. Το ίδιο παρατηρείται και στα άλλα χαρακτηριστικά, όπως η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε ολικά κορεσμένα (TS),



(α)



(β)

Σχήμα 51. Χρωματογράφημα ανάλυσης (α) του δείγματος H.4-K και (β) του τεχνητά μολυσμένου δείγματος C.2-K.

σε μονο-ακόρεστα (MUFA), σε πολυ-ακόρεστα (PUFA), σε ολικά ακόρεστα (TUFA) λιπαρά οξέα, καθώς και οι αντίστοιχες αναλογίες τους MUFA:PUFA και TUFA:TS. Θα πρέπει να επισημανθεί ωστόσο, ότι στα πρωτογενή δεδομένα μέτρησης, παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της περιεκτικότητας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα, όσο και στα δείγματα των ελαττωματικών φιστικιών, όπως προσδιορίζεται κυρίως από το δείκτη TUFA:TS, αν και η στατιστική επεξεργασία ANOVA δεν έδειξε σημαντικές διαφορές.

Έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία, ότι η αλλαγή στα επίπεδα των ακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελεί έναν μηχανισμό άμυνας ή και προσαρμογής των φυτικών ιστών σε αβιοτικούς (υψηλή θερμοκρασία, αλατότητα, ξηρασία, παρουσία βαρέων μετάλλων) και βιοτικούς (παθογόνα, ζωϊκοί εχθροί) στρεσογόνους παράγοντες (Urchurch, 2008). Αυτό το φαινόμενο ρυθμίζεται ενζυμικά (fatty acid desaturases) και έχει ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της περατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και τη συσσώρευση ουσιών που ενισχύουν την ανθεκτικότητα εντός του φυτικού κυττάρου (Urchurch, 2008). Ένας τέτοιος μηχανισμός άμυνας περιγράφεται για το επίπεδο συγκέντρωσης του ελεύθερου ελαϊκού οξέος στους χλωροπλάστες, το οποίο ρυθμίζει το μηχανισμό άμυνας των φυτών σε διάφορα παθογόνα. Ειδικά ένζυμα του κυτταροπλάσματος (stearoyl-ACP desaturases) ενεργοποιούνται κατά την εισβολή του παθογόνου και καταλύουν την αντίδραση μετατροπής του στεαρικού (18:0) σε ελαϊκό οξύ (18:1), αυξάνοντας το επίπεδο ακορεστότητας στα κύτταρα (Urchurch, 2008). Στην περίπτωση των μυκήτων του γένους *Aspergillus*, οι αλλαγές στα επίπεδα συγκέντρωσης των MUFA και PUFA έχουν συσχετιστεί άμεσα με μηχανισμούς ανθεκτικότητας και γενικότερα επικοινωνίας ξενιστή-μύκητα, οι οποίοι επάγονται και ελέγχουν την ανάπτυξη, την αποίκιση του παθογόνου και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Urchurch, 2008). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η παραγωγή οξυλιπινών, οι οποίες προέρχονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα (Tsitsigiannis & Keller, 2007).

3.3.3. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση

3.3.3.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

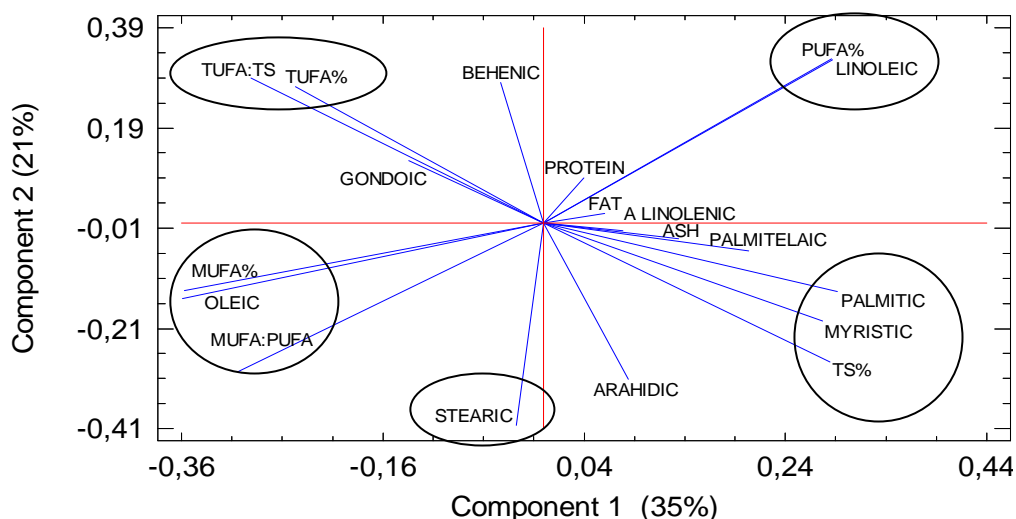
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων των μετρήσεων μέσω της πολυμεταβλητής προσέγγισης πραγματοποιήθηκε, ώστε να διερευνηθεί αν, και σε ποιο βαθμό, το σύνολο των χημικών ιδιοτήτων που μελετήθηκαν και περιγράφουν το χημικό προφίλ, σχετίζεται και αντικατοπτρίζει τις διαφορές μεταξύ των ομάδων των H, C και D. Στη μέτρηση

πολλών χαρακτηριστικών για την περιγραφή δύο ή περισσότερων διαφορετικών ομάδων είναι πολύ πιθανό, συγκρίνοντας κάθε ένα χαρακτηριστικό ξεχωριστά να προκύψουν στατιστικά μη-σημαντικές διαφορές, αλλά συγκεράζοντας όλα τα χαρακτηριστικά μαζί (μεταβλητές), να προκύψει σημαντική διαφορά (Manly, 2004). Η PCA εφαρμόστηκε στα πρωτογενή δεδομένα των μετρήσεων για όλες τις χημικές ιδιότητες (19 μεταβλητές), έτσι ώστε να μειωθεί η μεταβλητότητα των δεδομένων και να προσδιοριστούν οι κυριότερες αιτίες της παραλλακτικότητας μεταξύ των ομάδων (H,C,D). Από την ανάλυση αυτή, προέκυψαν πέντε κύριες συνιστώσες, με ιδιοτιμή (eigenvalue) >1, οι οποίες είναι οι γραμμικοί συνδυασμοί των 19 χημικών ιδιοτήτων που μετρήθηκαν. Οι πέντε αυτές κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 82.3% της συνολικής μεταβλητότητας. Ωστόσο, οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες που έχουν τις υψηλότερες ιδιοτιμές (6.7 και 3.9, αντίστοιχα), εξηγούν το 56% της μεταβλητότητας των πρωτογενών δεδομένων, επιβεβαιώνοντας τη σημαντικότητά τους σε σύγκριση με τις υπόλοιπες.

Στο Σχήμα 52 απεικονίζονται όλες οι χημικές ιδιότητες που μετρήθηκαν (μεταβλητές) ως συνάρτηση της πρώτης και της δεύτερης κύριας συνιστώσας (component). Η πρώτη συνιστώσα ερμηνεύει το 35% της συνολικής μεταβλητότητας και προσδιορίζεται κυρίως από τις μεταβλητές (χημικές ιδιότητες) των λιπαρών οξέων, όπως MUFA, PUFA, MUFA:PUFA, TS και τα λιπαρά οξέα: ελαϊκό και παλμιτικό. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 52, αυτές οι μεταβλητές βρίσκονται μακριά από το κέντρο των αξόνων, υποδεικνύοντας ότι αντιπροσωπεύονται ικανοποιητικά από την πρώτη κύρια συνιστώσα. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα ερμηνεύει το 22% της συνολικής μεταβλητότητας και προσδιορίζεται κυρίως από την περιεκτικότητα σε PUFA, λινελαϊκό, TUFA, TUFA:TS (η πλευρά με τις θετικές τιμές) και TS και στεαρικό οξύ (η πλευρά με τις αρνητικές τιμές). Παρατηρείται επίσης, ότι οι μεταβλητές MUFA, MUFA:PUFA και το ελαϊκό οξύ είναι τοποθετημένα σε κοντινή απόσταση στην πλευρά των αρνητικών τιμών του οριζόντιου άξονα (x), υποδεικνύοντας μία θετική συσχέτιση μεταξύ τους. Αντίστοιχα, οι μεταβλητές PUFA και λινελαϊκό οξύ συσχετίζονται θετικά μεταξύ τους, αλλά αρνητικά με τα MUFA. Οι μεταβλητές των κορεσμένων (TS, μυριστικό και παλμιτικό οξύ) παρουσιάζουν θετική συσχέτιση μεταξύ τους, αλλά αρνητική με τα ολικά ακόρεστα. Γενικότερα είναι σαφές, ότι η σύνθεση των λιπαρών οξέων αποτελεί την κύρια αιτία παραλλακτικότητας, δηλαδή την πιο χαρακτηριστική ιδιότητα για το διαχωρισμό των τριών ομάδων που μελετήθηκαν.

3.3.3.2. Διακριτική Ανάλυση (DA)

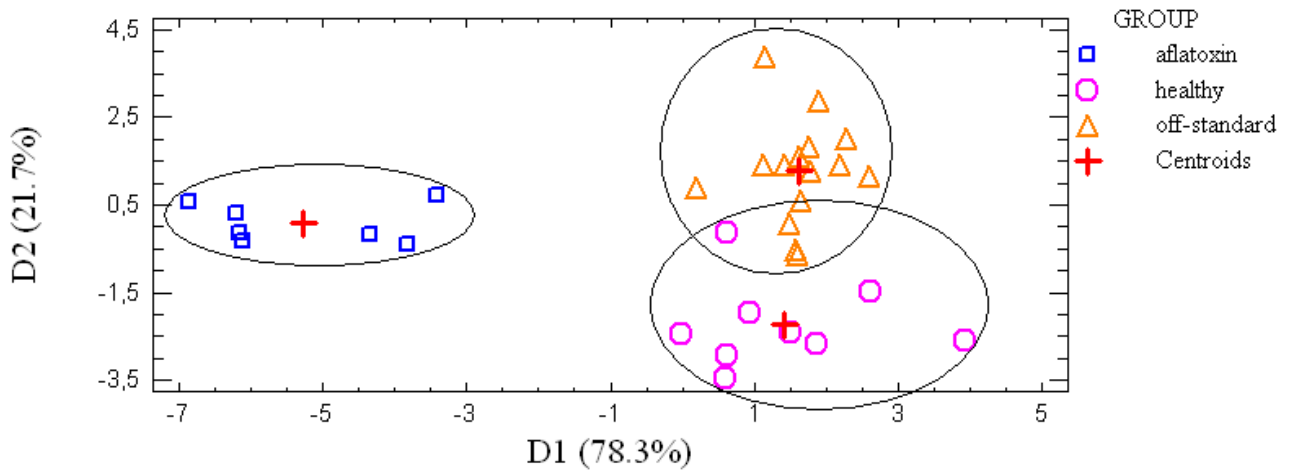
Σε συνέχεια της ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες εφαρμόστηκε η διακριτική ανάλυση, ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα ταξινόμησης των δειγμάτων με βάση τις χημικές ιδιότητες στις αντίστοιχες ομάδες (H, C, D) (Σχήμα 53) και ακολούθως, στις αντίστοιχες υποκατηγορίες της ομάδας D, των ελαττωματικών φιστικιών (Σχήμα 54). Κατά την επεξεργασία εισάχθηκαν 19 μεταβλητές πρόβλεψης στο μοντέλο ταξινόμησης, ίσες με τον αριθμό των χημικών ιδιοτήτων που μελετήθηκαν, όπως και στην περίπτωση της PCA. Μία γραμμική διακριτική συνάρτηση προσδιορίστηκε στην περίπτωση διαχωρισμού των 31 δειγμάτων στις τρεις ομάδες H, C και D (Σχήμα 53), όπως επίσης και στην περίπτωση διαχωρισμού τους στις επτά ομάδες: H, C, DK, DE, DM, DT και DF (Σχήμα 54). Τα δεδομένα της ανάλυσης, όπως καθορίζονται από το σχετικό μέγεθος των συντελεστών της γραμμικής εξίσωσης για κάθε μεταβλητή (χημική ιδιότητα), έδειξαν ότι οι μεταβλητές MUFA, PUFA, TUFA και λινελαϊκό οξύ συνεισφέρουν περισσότερο στον κανόνα της διάκρισης (διακριτική συνάρτηση). Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 53, τα υγιή δείγματα διαχωρίστηκαν πολύ καλά από τα μολυσμένα με αφλατοξίνη. Ομοίως και στο Σχήμα 54, είναι σαφής η διάκριση των υγιών, με τα μολυσμένα, αλλά και με τις άλλες κατηγορίες των ελαττωματικών φιστικιών, όπως: DM (small), DT (insect hole), DF (adhering hole) και DK (yellow shell).



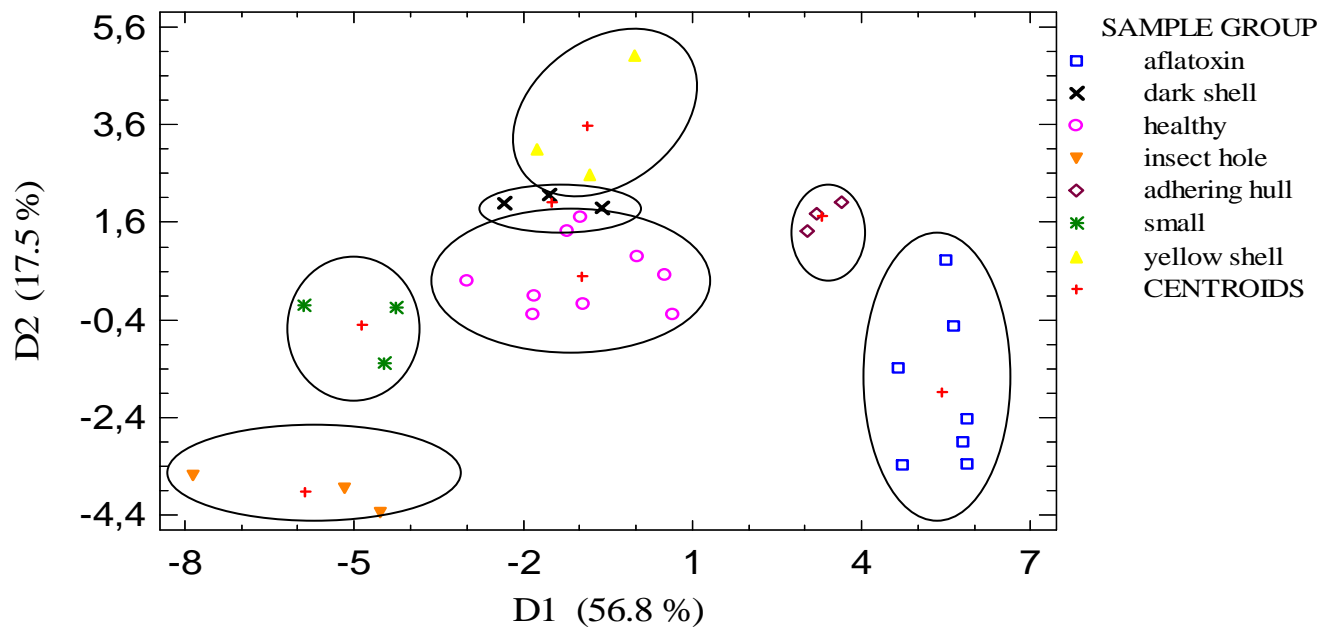
Σχήμα 52. Διάγραμμα απεικόνισης των δύο πρώτων συνιστωσών από την PCA, με βάση το συντελεστή στάθμισης για κάθε μεταβλητή (χημική ιδιότητα) που αναλύθηκε.

Εκτός από τη θέση των δειγμάτων στα διαγράμματα (Σχήμα 53,54), είναι σημαντικό να παρατηρηθεί η θέση του κέντρου της κάθε διακριτής ομάδας (centroid), το οποίο απεικονίζεται με το σύμβολο + και αντιστοιχεί στη μέση τιμή της γραμμικής διακριτικής συνάρτησης. Στο Σχήμα 53, η απόσταση μεταξύ του κέντρου των μολυσμένων και των υγιών δειγμάτων είναι μεγάλη, σε σχέση με την απόσταση του κέντρου της ομάδας των υγιών με τα ελαττωματικά. Αντίστοιχα, στο Σχήμα 54, η απόσταση των υγιών δειγμάτων από τα μολυσμένα είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη κατηγορία δειγμάτων, ένδειξη ιδιαίτερα σημαντική. Όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση, τόσο πιο διακριτός είναι ο διαχωρισμός που επιτυγχάνεται με αυτή τη συνάρτηση.

Στη συνέχεια, κατά την ταξινόμηση των 31 συνολικά δειγμάτων (παρατηρήσεις) στις αντίστοιχες ομάδες H,C,D, μόνο το 10% δεν ταξινομήθηκε σωστά. Η λανθασμένη ταξινόμηση περιλαμβάνει ένα δείγμα από την ομάδα των υγιών το οποίο ταξινομήθηκε ως ελαττωματικό και δύο δείγματα από την ομάδα των ελαττωματικών φιστικιών, τα οποία χαρακτηρίστηκαν υγιή. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 53, υπάρχει μία περιοχή αλληλοεπικάλυψης της ομάδα H και της ομάδας D, με αποτέλεσμα να μην είναι σαφής ο διαχωρισμός όλων των δειγμάτων από αυτές τις δύο ομάδες. Η ίδια διαπίστωση προκύπτει και από το Σχήμα 54, όπου η ομάδα των υγιών δεν διαχωρίζεται καλά με την υποκατηγορία DE (dark shell) των ελαττωματικών φιστικιών. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, όλα τα δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά. Σε μία προσπάθεια για μείωση του αριθμού των μεταβλητών (χημικές ιδιότητες) που θα χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό των δειγμάτων στις αντίστοιχες ομάδες H, C και D, το καλύτερο ποσοστό ταξινόμησης που επετεύχθη ήταν 74% χρησιμοποιώντας ως δείκτες επτά μεταβλητές: πρωτεΐνη, τέφρα, λίπος, MUFA, PUFA, TUFA και TS. Ακόμα και σε αυτή την περίπτωση, η ομάδα των υγιών και η ομάδα των μολυσμένων διαχωρίζονταν σαφώς, ενώ οι αστοχίες αφορούσαν τις υποκατηγορίες των ελαττωματικών φιστικιών.



Σχήμα 53. Διάγραμμα απεικόνισης της DA, βασισμένη στις 19 μεταβλητές πρόβλεψης (δείκτες), οι οποίες αντιστοιχούν στις χημικές ιδιότητες που προσδιορίστηκαν. Η ομάδα των υγιών και των μολυσμένων διαχωρίζεται σαφώς.



Σχήμα 54. Απεικόνιση του διαχωρισμού των 31 δειγμάτων (παρατηρήσεις) στις ομάδες H (healthy), C (aflatoxin) και στις υποκατηγορίες DE (dark shell), DT(insect hole), DF(adhering hull), DM(small), DK(yellow shell), μετά από διακριτική ανάλυση βασισμένη στις 19 μεταβλητές πρόβλεψης (αριθμός χημικός ιδιοτήτων που μετρήθηκαν).

3.4. Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο μετρήθηκαν ορισμένα χημικά χαρακτηριστικά της σύστασης των κελυφωτών φιστικιών: πρωτεΐνη, τέφρα, λίπος και λιπαρά οξέα, με στόχο να διερευνηθούν πιθανές διαφορές ανάμεσα σε φιστίκια υγιή, μολυσμένα με αφλατοξίνη και ελαττωματικά (ποιοτικά υποβαθμισμένα). Συγκρίνοντας κάθε ένα επιμέρους χαρακτηριστικό μεταξύ των τριών ομάδων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση την περιεκτικότητα σε ολικό λίπος, του οποίου η εκατοστιαία περιεκτικότητα ήταν ελαφρώς μειωμένη στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα και σε μια κατηγορία ελαττωματικών φιστικιών (DF: φιστίκια με προσκολλημένο τμήμα φλούδας στο κέλυφος). Το προφίλ των λιπαρών οξέων ήταν όμοιο σε όλες τις ομάδες και περιλάμβανε τα παρακάτω λιπαρά οξέα, με σειρά εμφάνισης στα χρωματογραφήματα ανάλυσης: μυριστικό, παλμιτικό, παλμιτελαϊκό, στεαρικό, ελαϊκό, λινελαϊκό, Α-λινολενικό, αραχιδικό, γονδοϊκό και βεχενικό. Σε υψηλότερη περιεκτικότητα βρέθηκαν το ελαϊκό, λινελαϊκό και παλμιτικό οξύ. Αν και η εκατοστιαία περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων δε φάνηκε να αλλάζει σημαντικά μεταξύ των ομάδων, επισημάνθηκε ωστόσο, μια τάση αύξησης της περιεκτικότητας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα, όσο και στα δείγματα των ελαττωματικών φιστικιών, όπως προσδιορίζεται κυρίως από το δείκτη TUFA:TS, αν και η στατιστική επεξεργασία ANOVA δεν έδειξε σημαντικές διαφορές. Συμπερασματικά μπορεί να διατυπωθεί ότι οι σημαντικότερες διαφορές ως προς τα χημικά χαρακτηριστικά των υγιών και μολυσμένων κελυφωτών φιστικιών που παρατηρήθηκαν, αφορούν: (α) μία ελαφρώς μειωμένη περιεκτικότητα σε ολικό λίπος στα μολυσμένα φιστίκια και (β) μία τάση αύξησης της περιεκτικότητας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα στα μολυσμένα. Οι ενδείξεις αυτές παραπέμπουν σε φαινόμενα αλληλεπίδρασης ξενιστή – παθογόνου και στους αντίστοιχους βιοχημικούς μηχανισμούς άμυνας – επίθεσης που αναπτύσσονται και από τις δύο πλευρές, σε επίπεδο δευτερογενούς μεταβολισμού.

Εφαρμόζοντας την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) στα πρωτογενή δεδομένα μετρήσεων φάνηκε ότι το προφίλ των λιπαρών οξέων ήταν η κύρια αιτία της υπάρχουσας παραλλακτικότητας μεταξύ των δειγμάτων. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ως κριτήρια ταξινόμησης, το σύνολο των χημικών ιδιοτήτων που αξιολογήθηκαν, τα δείγματα διαχωρίστηκαν στις επιμέρους ομάδες και ταξινομήθηκαν σωστά, στο 90% των περιπτώσεων, εφαρμόζοντας διακριτική ανάλυση (DA). Η ανάλυση έδειξε ότι τα κριτήρια με την υψηλότερη βαρύτητα στο διαχωρισμό ήταν η σύνθεση των

λιπαρών οξέων και πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του ελαίου του φιστικιού σε MUFA, PUFA, TUFA και λινελαϊκό οξύ.

Μέσω της πολυμεταβλητής στατιστικής προσέγγισης υποδεικνύεται ότι το χημικό προφίλ, εστιασμένο στο λίπος και στα λιπαρά οξέα, θα μπορούσε να είναι ένα ενδεχόμενο κριτήριο ή δείκτης διαχωρισμού των υγιών από τα μολυσμένα και δευτερευόντως από τα ελαττωματικά φιστίκια. Ωστόσο, αυτή είναι μια πρώτη ένδειξη, η οποία θα πρέπει να διερευνηθεί λαμβάνοντας υπ' όψιν και άλλες παραμέτρους, οι οποίες δεν εμπεριέχονται στην παρούσα εργασία, όπως, μελέτη του λιπαρού προφίλ σε μολυσμένους καρπούς από διαφορετικά είδη αφλατοξικογόνων μυκήτων, αλλά και μη-τοξικογόνων στελεχών. Επιπλέον, όλα τα αποτελέσματα θα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε έναν μεγάλο αριθμό μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων με φυσικό τρόπο, αν και η εύρεση τέτοιων δειγμάτων εμπεριέχει μία δυσκολία.

3.5. Βιβλιογραφία

3.5.1. Ελληνική βιβλιογραφία

1. Κωμαΐτης, Μ.Ε. (2014). Μέθοδοι ανάλυσης τροφίμων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Αθήνα, ΓΠΑ.
2. Ποντίκης, Κ.Α. (1996). Ειδική Δενδροκομία. ΓΠΑ, Αθήνα, Εκδ. Αθ.Σταμούλης.
3. Χιτζανίδου, Α., Μουρίκης, Π.Α., Χολέβας, Κ.Δ. (2004). Ασθένειες & Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα. Κηφισιά, Αθήνα, Εκδ. Μ.Φ.Ι.

3.5.2. Διεθνής βιβλιογραφία

1. Agar, I.T., Sarmiento, C., Garces, R., Kaska, N., Kafkas, S., Ak, B.E. (1995a). Compositional changes of fatty acids during the development of embryo in *Pistachia vera*. *Acta Horticulturae*, **419**, 405-408.
2. Agar, I.T., Kaska, N., Kafkas, S. (1995b). Effect of different ecologies on the fat content and fatty acid composition of different *Pistachia vera* varieties grown in different parts of Turkey. *Acta Horticulturae*, **419**, 411-415.
3. Amaike, S., Keller, N.P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, **49**, 107-133.
4. Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., Maccarone, E. (2007). Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chemistry*, **104**, 403-408.
5. Bayman, P., Baker, J. L., Mahoney, N. E. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, **155**, 161-169.
6. Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2006). Food Chemistry. Third Edition. Berlin, Heidelberg: Springer.
7. Beuchat, L.R., Worthington, R.E. (1978). Technical note: Fatty acid composition of tree nut oils. *Journal of Food Technology*, **13**, 355-358.
8. Crane, J.C., Iwakiri, B.T., & Lin, T-L. (1982). Effects of ethephon on shell dehiscence and flower bud abscission in pistachio. *HortScience*, **17**, 383-384.
9. Daane, K.M, Yokota, G.Y, Krugner, R, Steffan, S.A, Da Silva, P.G, Beede, R.H, Bentley, W.J, Weinberger, G.B. (2005). Large bugs damage pistachio nuts most severely during midseason. *California Agriculture*, **59**(2), 95-102.
10. Doster, M.A., & Michailides, T.J. (1995). The development of early split pistachio nuts and their contamination by moulds, aflatoxins and insects. *Acta Horticulture*, **419**, 359-364.
11. Doster, M.A., & Michailides, T.J. (1999). Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidence of fungal decay and insect infestation. *Plant Disease*, **83** (3), 259-264.
12. Doster, M.A., & Michailides, T.J. (2002). Non-infection disorders: Early splitting, immature nut splitting, shell staining. In: *Compendium of nut crop diseases in*

temperature zones. Edited by Teviotdale, B. *et al.* American Phytopathological Society, 75.

13. Dowell, F.E., Pearson, T.C., Maghirang, E.B., Xie, F., Wicklow, D.T. (2002). Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. *Cereal Chemistry*, **79**(2), 222-226.
14. Georgiadou, M., Dimou, A., Yanniotis, S. (2012a). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, **26**, 580-586.
15. Georgiadou, M., Proshlyakov, A., Revithi, A., Tjamos, S., Stringlis, I., Tsitsigiannis, D., Paplomatas, E., Blahovec, J., Yanniotis, S. (2012b). Detection of insect necrotic internal damage and aflatoxin reduction in stored pistachio nuts. *Bulletin of IOBC-WPRS*, **81**, 21-29.
16. Georgiadou, M., Gardeli, Chr., Komaitis, M., Tsitsigiannis, D.I., Paplomatas, E.J., Sotirakoglou, K., Yanniotis, S. (2015). Volatile profiles of healthy and aflatoxin contaminated pistachios. *Food Research International*, **75**, 89-96.
17. Kader, A.A., Heintz, C.M., Labavitch, J.M., Rae, H.L. (1982). Studies related to the description and evaluation of pistachio nut quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **107**(5), 812-816.
18. Küçüköner, E., Yurt, B. (2003). Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *European Food Research and Technology*, **217**, 308-310.
19. Manly, B.F.J. (2004). *Multivariate Statistical Methods: A primer*. Third Edition. Chapman & Hall, CRC.
20. Michailides, T.J, Rice, R.E, Ogawa, J.M. (1987). Succession and significance of several hemipterans attacking pistachio orchard. *Journal of Economic Entomology*, **80**, 398-406.
21. Michailides, T.J, Ogawa, J.M, Rice, R.E. (1988). Sites of epicarp lesions and kernel necrosis in relationship to symptoms and phenology of pistachio fruit. *Journal of Economic Entomology*, **81**, 1152-1154.
22. Michailides, T.J., Morgan, D.P., & Doster, M.A. (1995). Diseases of pistachios in California and their significance. *Acta Horticulturae*, **419**, 337-343.
23. Okay, Y. (2002). The comparison of some pistachio cultivars regarding their fat, fatty acids and protein content. *Gartenbauwissenschaft*, **67**(3), 107-113.
24. Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M. & Aggelis, G. (2011). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology*, **110**, 1138-1150.
25. Pearson, T.C. (1996). Machine vision system for automated detection of stained pistachio nuts. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **28** (6), 203-209.
26. Pearson, T.C., & Slaughter, D.C. (1996). Machine vision detection of early split pistachio nuts. *Transactions of the ASAE*, **39**(3), 1203-1207.
27. Pearson, T.C., & Schatzki, T.F. (1998). Machine vision system for automated detection of aflatoxin-contaminated pistachios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2248-2252.

28. Pearson, T.C., Doster, M.A., Michailides, T.J. (2001). Automated detection of pistachio defects by machine vision. *Applied Engineering in Agriculture*, **17**, 81-84.
29. Rice, R.E. (1978). Navel orangeworm: a pest of pistachio nuts in California. *Entomological Society of America*, **71**(5), 822-824.
30. Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. (2006). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **57**(3/4), 219-228.
31. Satil, F., Azcan, N., Baser, K.H.C. (2003). Fatty acid composition of pistachio nuts in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, **39**(4), 322-324.
32. Seferoglu, S., Seferoglu, H.G., Tekintas, F.E., Balta, F. (2006). Biochemical composition influenced by different locations in Uzun pistachio cv. (*Pistachia vera* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 461-465.
33. Shokraii, H.E. (1977). Chemical composition of the pistachio nuts (*Pistachia vera* L.) of Kerman, Iran. *Journal of Food Science*, **42**, 244-245.
34. Sommer, N.F., Buchanan, J.R., & Fortlage, R.J. (1986). Relation to early splitting and tattering of pistachio nuts to aflatoxin in the orchard. *Phytopathology*, **76**, 692-694.
35. Tsantili, E., Takidelli, C., Christopoulos, M.V., Lambrinea, E., Rouskas, D., Roussos, P.A. (2010). Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistachia vera* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, **125**, 562-568.
36. Tsitsigiannis, D.I., Keller, N.P. (2007). Oxylipins as a developmental and host-fungal communication signals. *Trends in Microbiology*, **15**(3), 109-118.
37. Tsitsigiannis, D.I., Georgiadou, M., Agoritsis, S., Zakynthinos, G., Varzakas, T.H., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Dimakopoulou, M., Karnavas, G., Paplomatas, E., Yanniotis, S., & Tjamos, E.C. (2010). Ecology, epidemiology and control of *Aspergillus* spp. in pistachio orchards in Greece. *Petria*, **20**, 95-96.
38. Upchurch, R.G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, **30**, 967-977.
39. Venkatachalam, M., Sathe, S.K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4705-4714.
40. Yanniotis, S., Proshlyakov, A., Revithi, A., Georgiadou, M., Blahovec, J. (2011). X-ray imaging for fungal necrotic spot detection in pistachio nuts. *Procedia Food Science*, **1**, 379-384.
41. Yildiz, M., Gürcan, S.T., Özdemir, M. (1998). Oil composition of pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey. *Lipid*, **100**(3), 84-86.
42. Zakynthinos, G., Rouskas, D. (1995). Pistachio growing in Greece. *Acta Horticulturae*, **419**, 423-425.

Κεφάλαιο 4. Μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων σε κανονικά και ελαττωματικά κελυφωτά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 4. Μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων σε κανονικά και ελαττωματικά κελυφωτά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».....	161
Περιεχόμενα.....	161
4.1. Εισαγωγή	163
4.1.1. Οι φυσικές ιδιότητες των τροφίμων.....	163
4.1.2. Γεωμετρικές ιδιότητες.....	163
4.1.3. Βάρος, όγκος, πυκνότητα.....	166
4.1.4. Θερμικές ιδιότητες - Θερμική αγωγιμότητα (k)	169
4.1.5. Οπτικές ιδιότητες	173
4.1.5.1. Χρώμα - Ορισμοί.....	173
4.1.5.2. Μέτρηση του χρώματος	175
4.1.5.3. Χρωματικά μοντέλα.....	177
4.1.6. Ρεολογικές ιδιότητες στερεών τροφίμων.....	181
4.1.6.1. Υφή.....	181
4.1.6.2. Δοκιμές αξιολόγησης της υφής	181
4.1.6.3. Ανάλυση διαγράμματος δύναμης - παραμόρφωσης.....	186
4.1.7. Ενεργότητα νερού (a_w).....	188
4.1.7.1. Θεωρία - Ορισμοί.....	188
4.1.7.2. Ισόθερμες καμπύλες υγρασίας.....	190
4.1.7.3. Ταξινόμηση ισόθερμων καμπυλών υγρασίας	194
4.1.7.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της a_w – Μαθηματικά μοντέλα.....	195
4.1.8. Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης	198

4.2.	Υλικά και Μέθοδοι	200
4.2.1.	Δειγματοληψία και χειρισμός των καρπών – Πειραματικός σχεδιασμός.	200
4.2.2.	Προσδιορισμός ισόθερμης καμπύλης προσρόφησης.....	203
4.2.3.	Μέτρηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών	205
4.2.4.	Μέτρηση μάζας, όγκου (V_{app}), πυκνότητας (ρ_{app})	207
4.2.5.	Μέτρηση του χρώματος.....	207
4.2.6.	Μέτρηση της υφής	208
4.2.7.	Προσδιορισμός του συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας (k).....	209
4.2.8.	Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία	209
4.2.9.	Στατιστική επεξεργασία	210
4.3.	Αποτελέσματα και συζήτηση	211
4.3.1.	Ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης.....	211
4.3.2.	Οι φυσικές ιδιότητες σε συνάρτηση με την υγρασία του καρπού	213
4.3.3.	Τα φυσικά χαρακτηριστικά σε κανονικά και ελαττωματικά φιστίκια.....	218
4.4.	Συμπεράσματα.....	224
4.5.	Βιβλιογραφία	226
4.5.1.	Ελληνική βιβλιογραφία.....	226
4.5.2.	Διεθνής βιβλιογραφία	226

4.1. Εισαγωγή

4.1.1. Οι φυσικές ιδιότητες των τροφίμων

Η μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων ενός τροφίμου αποτελεί το βασικό προαπαιτούμενο για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων προϊόντων, την ορθή λειτουργία και τον έλεγχο όλων των διεργασιών επεξεργασίας, ώστε να επιτυγχάνεται ένα τελικό προϊόν με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, εγγυημένη ασφάλεια και ποιότητα, αποδεκτό στις απαιτήσεις των καταναλωτών. Είναι σαφές ότι η γνώση των τυπικών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των εξεταζόμενων προϊόντων είναι πολύ σημαντική στην ανάπτυξη της μεθόδου διαλογής.

Η αναγκαιότητα αυτή αποκτά μεγαλύτερη σημασία με την είσοδο καινοτόμων τεχνολογιών που εφαρμόζονται στην επεξεργασία και στον έλεγχο των προϊόντων. Με τον όρο φυσικές ιδιότητες των τροφίμων περιλαμβάνονται όλες οι μετρήσεις που αφορούν την ενεργότητα του νερού (a_w), τις βασικές ιδιότητες της μάζας, του όγκου, της πυκνότητας, του ειδικού βάρους (σχετική πυκνότητα), του πορώδους, τις γεωμετρικές ιδιότητες όπως καθορίζονται από το μέγεθος και το σχήμα, τις ρεολογικές, με βασικά χαρακτηριστικά το ιξώδες και την υφή, τις θερμικές ιδιότητες με προσδιορισμό της ειδικής θερμότητας, της θερμικής αγωγιμότητας και της θερμικής διάχυσης, τις ηλεκτρομαγνητικές και οπτικές ιδιότητες, με βασική παράμετρο τη μέτρηση του χρώματος. Σε κάποιες περιπτώσεις και ανάλογα τις επεξεργασίες για τις οποίες προορίζονται τα τρόφιμα, είναι αναγκαίο να προσδιοριστούν και άλλες ιδιότητες όπως οι μαγνητικές, οι ηλεκτρικές οι διηλεκτρικές, οι υπερηχητικές, οι ραδιενεργές, κατά την τριβή κ.α. (Κωσταρόπουλος, 2005; Rao *et al.*, 2005; Sahin & Sumnu, 2006; Figura & Teixeira, 2007). Στη συνέχεια, περιγράφονται ορισμένες από τις φυσικές ιδιότητες των τροφίμων, οι οποίες μελετήθηκαν στα κελυφωτά φιστίκια, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.

4.1.2. Γεωμετρικές ιδιότητες

Το μέγεθος και το σχήμα, σε κάποιες αναφορές προσδιορίζονται και ως γεωμετρικές ιδιότητες, διότι προέρχονται από τη γεωμετρία του σώματος ή των επιμέρους σωματιδίων, τα οποία περιέχονται και δημιουργούν το σώμα του τροφίμου (Figura & Teixeira, 2007). Το μέγεθος και το σχήμα είναι μια σημαντική φυσική ιδιότητα των τροφίμων, διότι χρησιμοποιείται ως βασική ποιοτική παράμετρος για το διαχωρισμό ξένων υλών από τα στερεά τρόφιμα, στη διαλογή των ελαττωματικών προϊόντων, αλλά και ως κριτήριο

ταξινόμησης, όπως συμβαίνει π.χ. στα φρούτα, στα λαχανικά, στους καρπούς, στα αυγά και στα ψάρια.

Σε αρκετές περιπτώσεις ωστόσο, η μέτρηση των διαστάσεων, ο προσδιορισμός της επιφάνειας και του σχήματος δεν είναι εύκολος, λόγω του ακανόνιστου του σχήματος των περισσότερων στερεών τροφίμων, αλλά και της ανομοιομορφίας μεταξύ των ομοειδών προϊόντων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το σχήμα προσδιορίζεται από τη μέτρηση των χαρακτηριστικών διαστάσεων ολόκληρου του σώματος ή των επιμέρους σωματιδίων από το οποίο αποτελείται. Αυτοί είναι οι λόγοι, που το μέγεθος και το σχήμα αντιμετωπίζονται και επεξεργάζονται με μαθηματικούς όρους κατανομής (Figura & Teixeira, 2007). Στα προϊόντα με κανονική γεωμετρία, το μέγεθός τους χαρακτηρίζεται από τις γραμμικές τους διαστάσεις (μήκος, πλάτος, πάχος, διάμετρος) κατά μήκος των κύριων αξόνων (x,y,z). Ο όρος «ισοδύναμο μέγεθος» ή «ισοδύναμη διάσταση» χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του μεγέθους προϊόντων ή σωματιδίων με ακανόνιστο σχήμα και αναφέρονται στις υποθετικές διαστάσεις ενός κανονικής γεωμετρίας σώματος, το οποίο έχει τον ίδιο όγκο ή την ίδια επιφάνεια με το υπό μέτρηση σώμα. Η μέση τιμή των τριών κάθετων μεταξύ τους διαστάσεων: μήκος (L), πλάτος (W), πάχος (H) προσδιορίζει το μέσο μέγεθος του σώματος, χρησιμοποιώντας μία μοναδική χαρακτηριστική διάσταση. Αυτή μπορεί να υπολογιστεί ως ο αριθμητικός $[(L+W+H)/3]$ ή ο γεωμετρικός τους μέσος $(L \cdot W \cdot H)^{1/3}$. Από τη βιβλιογραφία, προτείνονται και κάποιες άλλες χαρακτηριστικές διαμέτροι, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όπως η κύρια διάμετρος (η διάσταση με το μεγαλύτερο μήκος), η ενδιάμεση (η μικρότερη διάμετρος της μέγιστης μετρούμενης περιοχής ή το αντίστροφο) και η δευτερεύουσα διάμετρος (η μικρότερη διάσταση της ελάχιστης μετρούμενης περιοχής) (Sahin & Sumnu, 2006). Οι διαστάσεις μπορούν να μετρηθούν με υποδεκάμετρο, διαβήτη ή με μικρόμετρο, το οποίο είναι ένα απλό όργανο που μετράει την απόσταση μεταξύ επιφανειών (Αθανασόπουλος, 2005).

Μία χρήσιμη παράμετρος στην περιγραφή του σχήματος των αγροτικών προϊόντων είναι η σφαιρικότητα (Φ : sphericity), η οποία ορίζεται γενικά ως το πηλίκο του όγκου του στερεού που μετριέται, προς τον όγκο μιας σφαίρας, η οποία έχει διάμετρο ίση με την μέγιστη διάμετρο του στερεού, καθορίζοντας με αυτό τον τρόπο τα όρια του στερεού δείγματος (Sahin & Sumnu, 2005). Μία άλλη έκφραση της σφαιρικότητας ενός στερεού αντικειμένου περιγράφεται ως το πηλίκο της επιφάνειας μιας σφαίρας, η οποία έχει ισοδύναμο όγκο, προς

την πραγματική επιφάνεια του αντικειμένου (McCabe *et al.*, 1993). Οι εναλλακτικοί τρόποι υπολογισμού της σφαιρικότητας που προτείνονται στη βιβλιογραφία είναι σημαντικοί για τις περιπτώσεις που ο προσδιορισμός του όγκου ή της επιφάνειας του στερεού είναι δύσκολος. Αντίστοιχα με τους προηγούμενους ορισμούς, η σφαιρικότητα έχει επίσης οριστεί ως το πηλίκο της διαμέτρου του μεγαλύτερου εγγεγραμμένου κύκλου, προς τη διάμετρο του μικρότερου περιγεγραμμένου κύκλου (Mohsenin, 1970). Σε περιπτώσεις ακανόνιστης γεωμετρίας σχημάτων, η σφαιρικότητα προσεγγίζεται με παραδοχές, όπου η ισοδύναμη διάμετρος ορίζεται ως η μέση διάσταση του στερεού και ο υπολογισμός της σφαιρικότητας βασίζεται στο πηλίκο του αθροίσματος των τετραγώνων των διαφορών της μετρούμενης διάστασης με τη μέση διάσταση, προς το τετράγωνο του γινομένου της μέσης διάστασης επί τον αριθμό των μετρήσεων (Bayram, 2005) (Εξίσωση 7).

$$\Phi = \frac{\sum (D_i - \bar{D})^2}{(\bar{D}N)^2} \quad \text{Εξ. 7}$$

Όπου:

Φ = σφαιρικότητα

D_i = οποιαδήποτε μετρούμενη διάσταση (m)

\bar{D} = η μέση διάσταση, η οποία ισούται με την ισοδύναμη διάμετρος

N = αριθμός των μετρήσεων

Όπως φαίνεται από την εξίσωση αυτή, όσο οι τιμές πλησιάζουν το μηδέν, τόσο το σχήμα τείνει να είναι σφαιρικό. Επίσης, όσο μεγαλώνει ο αριθμός των μετρήσεων, αυξάνεται και η ακρίβεια της μεθόδου υπολογισμού.

Άλλες χρήσιμες εκφράσεις περιγραφής του σχήματος ενός στερεού τροφίμου είναι η αναλογία μήκους/πλάτους (R_a : aspect ratio), η φυσική γωνία στήριξης (angle of repose), η καμπυλότητα (R : roundness) και η ακτίνα καμπυλότητας (radius of curvature) (Sahin & Sumnu, 2005). Αυτές οι μετρήσεις είναι πολύ σημαντικές κατά το σχεδιασμό διεργασιών επεξεργασίας, μεταφοράς (π.χ. ταινίες μεταφοράς) και αποθήκευσης.

4.1.3. Βάρος, όγκος, πυκνότητα

Ο ευκολότερος τρόπος να μετρήσουμε τη μάζα (m) ενός σώματος είναι να μετρήσουμε το βάρος του. Το βάρος (B) αποτελεί ποιοτικό χαρακτηριστικό και προσδιορίζεται εύκολα με διάφορους τύπους ζυγών. Αναφέρεται τόσο στα συσκευασμένα, όσο και στα μη συσκευασμένα προϊόντα και εκφράζεται σαν συνολικό βάρος, βάρος ανά μονάδα, βάρος ορισμένου αριθμού μονάδων ή αριθμός μονάδων ανά μονάδα βάρους (Αθανασόπουλος, 2005). Η μονάδα μέτρησης της μάζας στο σύστημα SI είναι το kg.

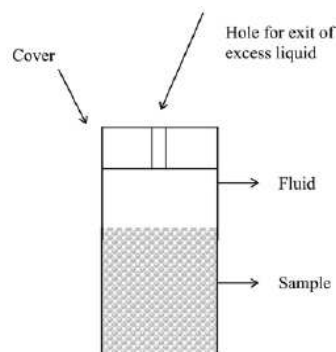
Αντίστοιχα, ο όγκος (V) ορίζεται ως ο χώρος που καταλαμβάνει το προϊόν και μονάδα μέτρησής του στο σύστημα SI είναι το m^3 . Παράγωγες έννοιες είναι ο σχετικός όγκος (ο όγκος ενός αριθμού μονάδων ή ο όγκος ορισμένου βάρους του προϊόντος) και ο απόλυτος όγκος (ο όγκος μιας μονάδας προϊόντος) (Αθανασόπουλος, 2005). Ο όγκος ενός στερεού προϊόντος είναι μια σημαντική ποιοτική παράμετρος, διότι γίνεται αντιληπτή με τις αισθήσεις, αλλά σχετίζεται και με άλλες ιδιότητες, όπως η υφή. Ο προσδιορισμός του όγκου ενός κανονικού στερεού σχήματος γίνεται με μέτρηση των χαρακτηριστικών του διαστάσεων. Σε διαφορετική περίπτωση, μετριέται με τη μέθοδο επεξεργασίας εικόνας σε ειδικό λογισμικό (image processing method) (Sabliov *et al.*, 2002) ή προσδιορίζεται εργαστηριακά με τη μέθοδο της εκτόπισης υγρού, αερίου ή στερεού. Στη μέθοδο εκτόπισης υγρού, ο όγκος μετριέται είτε με πυκνόμετρο (Σχήμα 55) είτε με απ'ευθείας ένδειξη της διαφοράς σε βαθμονομημένο κύλινδρο, μετά την είσοδο του στερεού εντός του κυλίνδρου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται, εφόσον το στερεό προϊόν δεν διαλύεται στο υγρό ή δεν απορροφά το υγρό πολύ γρήγορα. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα στερεά τρόφιμα επικαλύπτονται με ειδικά αδιάβροχα υλικά. Γι'αυτό το λόγο τα υγρά εκτόπισης επιλέγονται να έχουν χαμηλή επιφανειακή τάση, να ρέουν ομαλά επάνω στην επιφάνεια του τροφίμου και να μην αντιδρούν με τα συστατικά του (Razavi *et al.*, 2007b). Αυτά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι το νερό, η αιθυλική αλκοόλη, το τολουόλιο και το τετραχλωρο-αιθυλένιο (Sahin & Sumnu, 2005). Στη μέθοδο εκτόπισης αερίου χρησιμοποιούνται ειδικά πυκνόμετρα που λειτουργούν με αέρα, ήλιο ή άζωτο (Karathanos & Saravakos, 1993). Στη μέθοδο εκτόπισης στερεού, χρησιμοποιούνται γυάλινα σφαιρίδια ή άμμος, των οποίων προσδιορίζεται αρχικά η πυκνότητα, μετρώντας το βάρος τους εντός ενός περιέκτη γνωστού όγκου. Ο όγκος του στερεού τροφίμου ισοδυναμεί με τον όγκο των εκτοπισμένων σφαιριδίων, τα οποία προέκυψαν μετά την εισαγωγή του υπό μέτρηση προϊόντος και υπολογίζεται από τη μέτρηση

του βάρους τους προς την ήδη γνωστή πυκνότητα (Hwang & Hayakawa, 1980). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες εκφράσεις του όγκου των στερεών τροφίμων. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

Όγκος στερεού (V_s , *solid volume*) ορίζεται ο όγκος του στερεού υλικού (συμπεριλαμβανομένης της υγρασίας του), αφαιρώντας όλο τον αέρα ή τα κενά διαστήματα που σχηματίζονται εντός του υλικού. Προσδιορίζεται με τη μέθοδο εκτόπισης αερίου, κατάλληλου να διαπερνά όλα τα κενά (πόρους) που υφίστανται.

Φαινόμενος όγκος (V_{app} , *apparent volume*) είναι ο όγκος ενός υλικού συμπεριλαμβάνοντας όλο τον αέρα ή τα κενά διαστήματα που σχηματίζονται εντός του υλικού, και τα οποία ορίζουν το φαινόμενο πορώδες (*apparent porosity*) του υλικού. Στα κανονικού σχήματος στερεά, ο όγκος προσδιορίζεται από τις χαρακτηριστικές του διαστάσεις, ενώ στα στερεά με μη-κανονικό σχήμα, προσδιορίζεται έμμεσα με τις μεθόδους εκτόπισης υγρού ή στερεού.

Όγκος κλίνης (V_{bulk} , *bulk volume*) είναι ο όγκος ενός υλικού όταν αυτό σωρεύεται ή συσκευάζεται χύμα, περιλαμβάνοντας όλους τους εσωτερικούς και εξωτερικούς πόρους του, καθώς και τα κενά που δημιουργούνται μεταξύ των μεμονωμένων σωματιδίων κατά τη σώρευση.



Σχήμα 55. Πυκνόμετρο για τη μέτρηση του όγκου στερεού τροφίμου με τη μέθοδο εκτόπισης υγρού. Ο όγκος υπολογίζεται ως το πηλίκο του βάρους του εκτοπισμένου υγρού (λόγω τοποθέτησης του στερεού στο εσωτερικό του) προς την πυκνότητα του υγρού Sahin & Sumnu, 2005.

Η πυκνότητα (ρ) είναι μια σημαντική φυσική ιδιότητα, αφού είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό του χώρου ενός προϊόντος, κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά του. Η πυκνότητα παρουσιάζει μια ευρεία περιοχή τιμών. Το πιο πυκνό υλικό που βρέθηκε στη γη είναι το μεταλλικό όσμιο (22.5 g/cm^3), ενώ η πυκνότητα του αέρα είναι $0,0012 \text{ g/cm}^3$ (Young, 1994). Στη βιβλιογραφία δίδονται διάφορες εκφράσεις της πυκνότητας των στερεών τροφίμων, κάποιες κατ'αντιστοιχία των εκφράσεων του όγκου. Οι κυριότερες από αυτές περιγράφονται παρακάτω (Sahin & Sumnu, 2005):

Πραγματική πυκνότητα (ρ_t , *true density*) ενός τροφίμου είναι το άθροισμα των πυκνοτήτων των επιμέρους συστατικών.

Πυκνότητα ενός συστατικού (ρ_m , *substance or material density*) είναι η μετρούμενη πυκνότητα αυτού σε μορφή που δεν περιέχει καθόλου πόρους (π.χ. μετά από άλεση σε πολύ μικρά σωματίδια) και υπολογίζεται ως το πηλίκο της μάζας προς τον όγκο του.

Πυκνότητα στερεού (ρ_s , *solid density*) είναι η πυκνότητα του στερεού υλικού (συμπεριλαμβανομένης της υγρασίας του), αφαιρώντας όλο τον αέρα ή τα κενά διαστήματα που σχηματίζονται εντός του υλικού. Υπολογίζεται από το πηλίκο της μάζας του υλικού προς τον όγκο του στερεού, ο οποίος έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο εκτόπισης αερίου, κατάλληλου να διαπερνά όλα τα κενά (πόρους) που υφίστανται.

Πυκνότητα σωματιδίου (ρ_p , *particle density*) ορίζεται ως η πυκνότητα ενός σωματιδίου, του οποίου η δομή δεν έχει μεταβληθεί. Περιλαμβάνει τον όγκο όλων των κλειστών πόρων, αλλά όχι αυτών που συνδέονται μεταξύ τους εξωτερικά. Υπολογίζεται από το πηλίκο της μάζας του σωματιδίου προς τον αντίστοιχο όγκο του, ο οποίος έχει προσδιοριστεί με πυκνόμετρο αερίου.

Φαινόμενη πυκνότητα (ρ_{app} , *apparent density*) είναι η πυκνότητα ενός υλικού συμπεριλαμβάνοντας όλο τον αέρα ή τα κενά διαστήματα που σχηματίζονται εντός του υλικού και τα οποία ορίζουν το φαινόμενο πορώδες (*apparent porosity*) του. Στα κανονικού σχήματος στερεά, η πυκνότητα υπολογίζεται από το πηλίκο της μάζας του προς τον όγκο, ο οποίος προσδιορίζεται από τις χαρακτηριστικές του διαστάσεις. Στα στερεά με μη-κανονικό σχήμα, προσδιορίζεται έμμεσα με τις μεθόδους εκτόπισης υγρού ή στερεού.

Πυκνότητα κλίνης (ρ_{bulk} , *bulk density*) αφορά την πυκνότητα ενός υλικού, όταν αυτό σωρεύεται ή συσκευάζεται χύμα. Υπολογίζεται από το πηλίκο της μάζας του υλικού προς

τον όγκο κλίνης, ο οποίος προσδιορίζεται μέσω σώρευσης ενός δείγματος του υλικού σε περιέκτη γνωστών διαστάσεων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στον τρόπο στοίβαξης του στερεού υλικού και στις διαστάσεις του περιέκτη, ώστε να μην επηρεάζεται η μέτρηση.

4.1.4. Θερμικές ιδιότητες - Θερμική αγωγιμότητα (k)

Λόγω του ότι η πλειοψηφία των μεθόδων επεξεργασίας και διεργασιών συντήρησης στα τρόφιμα περιλαμβάνουν φαινόμενα μεταφοράς θερμότητας, ο υπολογισμός των θερμοφυσικών ιδιοτήτων ενός τροφίμου είναι προϋπόθεση για τον ορθό σχεδιασμό τους. Τα τρόφιμα είναι γενικά ανομοιογενή υλικά, με κύρια συστατικά το νερό, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λιπαρά και οι ιδιότητές τους εξαρτώνται άμεσα από τη σύστασή τους. Επιπλέον, η μακροδομή των τροφίμων, π.χ. το πορώδες, το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων στα στερεά ή ημιστερεά τρόφιμα, το μέγεθος των σταγονιδίων ή διασπαρμένων σωματιδίων και η κατ'όγκο περιεκτικότητά τους στα υγρά τρόφιμα επηρεάζει τις ιδιότητές τους. Ορισμένες από τις θερμικές ιδιότητες που μελετώνται στα τρόφιμα είναι η ειδική θερμότητα (c_p , specific heat), η ενθαλπία (H, enthalpy), η θερμική αγωγιμότητα (k, thermal conductivity) και η θερμική διάχυση (α , thermal diffusivity).

Η θερμική αγωγιμότητα (k), η οποία εκφράζει την ικανότητα ενός υλικού να άγει (μεταφέρει) τη θερμότητα είναι ένας δείκτης της ταχύτητας της κίνησης της θερμότητας μέσα στο σώμα ή το μέσον (Λαζαρίδης, 2007). Ο δείκτης αυτός εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη σύσταση και το πορώδες του υλικού (Γιαννιώτης, 2007). Σε πορώδη στερεά, όπως είναι πολλά τρόφιμα, η θερμική αγωγιμότητα εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση και τη δομή τους, αλλά και από το σχήμα, το μέγεθος, τη διευθέτηση και το μέγεθος των πόρων, από το αν στο εσωτερικό των πόρων βρίσκεται αέρας ή υγρό και από την ομοιογένεια του τροφίμου. Γενικά, στα ξηρά τρόφιμα, η θερμική αγωγιμότητα μειώνεται απότομα όσο αυξάνεται το πορώδες, λόγω του ότι η τιμή k του αέρα είναι πολύ μικρή (Sahin & Sumnu, 2005). Η θερμική αγωγιμότητα σε τρόφιμα με ινώδη δομή, π.χ. κρέας, δεν μπορεί να είναι ίδια σε διαφορετικές κατευθύνσεις, γιατί οι διαδρομές ροής θερμότητας μέσα στο προϊόν αλλάζουν, ανάλογα με την κατεύθυνση, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν 15-20% μεγαλύτερη θερμική αγωγιμότητα παράλληλα με τις ίνες, απ'ότι κάθετα στις ίνες.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη θερμοαγωγιμότητα υγρών και στερεών είναι πολύπλοκη και δεν ακολουθεί κάποιο σταθερό πρότυπο. Εξαρτάται κυρίως από τη χημική

και φυσική δομή του υλικού, η οποία με τη σειρά της επιτρέπει ή δεν επιτρέπει κινήσεις ηλεκτρονίων, ατόμων, ιόντων ή μορίων. Έτσι δεν είναι τυχαίο, ότι υλικά με καλή ηλεκτραγωγιμότητα (πολλά ελεύθερα e), έχουν και καλή θερμοαγωγιμότητα και αντίστροφα (Λαζαρίδης, 2007). Επίσης, η θερμική αγωγιμότητα ενός τροφίμου έχει θετική συσχέτιση με την περιεκτικότητά του σε υγρασία, λόγω της μεγαλύτερης θερμικής αγωγιμότητας του νερού σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά (Sahin & Sumnu, 2005). Κατά την κατάψυξη, η θερμική αγωγιμότητα αυξάνεται λόγω του ότι η τιμή k του πάγου είναι πολύ μεγαλύτερη από την τιμή k του νερού (Γιαννιώτης, 2007). Η μονάδα μέτρησης του k στο σύστημα SI είναι $W/(m \cdot K)$.

Οι τιμές θερμικής αγωγιμότητας των τροφίμων ποικίλουν και βρίσκονται ανάμεσα σε αυτή του νερού ($k_{\text{water}} = 0.614 \text{ W/m } ^\circ\text{C}$ στους $27 \text{ }^\circ\text{C}$) και σε αυτή του αέρα ($k_{\text{air}} = 0.026 \text{ W/m } ^\circ\text{C}$ στους $27 \text{ }^\circ\text{C}$), που είναι τα περισσότερο και λιγότερο αγωγή συστατικά των τροφίμων, αντίστοιχα. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν εμπειρικοί κανόνες που δίνουν τις τιμές k για ορισμένες κατηγορίες τροφίμων (νωπά με υγρασία $>30-40\%$: $k_f = 0.40-0.58 \text{ W/m } ^\circ\text{C}$, κατεψυγμένα τρόφιμα υγρασίας $>30-40\%$: $k_{ff} \approx 2.5k_f$, αφυδατωμένα τρόφιμα: $k_{df} \approx 0.1k_f$), ως μια πρώτη προσέγγιση. Για τα ομοιογενή υλικά, έχουν διατυπωθεί διάφορες εξισώσεις με βάση τη σύσταση του τροφίμου, οι οποίες έχουν σχετικά καλή ακρίβεια πρόβλεψης. Μια τέτοια εξίσωση ανέπτυξε ο Sweat (1995), στηριζόμενος σε δεδομένα από 430 υγρά και στερεά τρόφιμα, που έχει ικανοποιητική ακρίβεια:

$$k = 0.58Y_w + 0.155Y_p + 0.25Y_{ca} + 0.135Y_{as} + 0.16Y_{fa} \quad \text{Εξ. 8}$$

όπου:

w = νερό, p = πρωτεΐνες, ca = υδαάνθρακες, as = ανόργανα, fa = λιπαρά

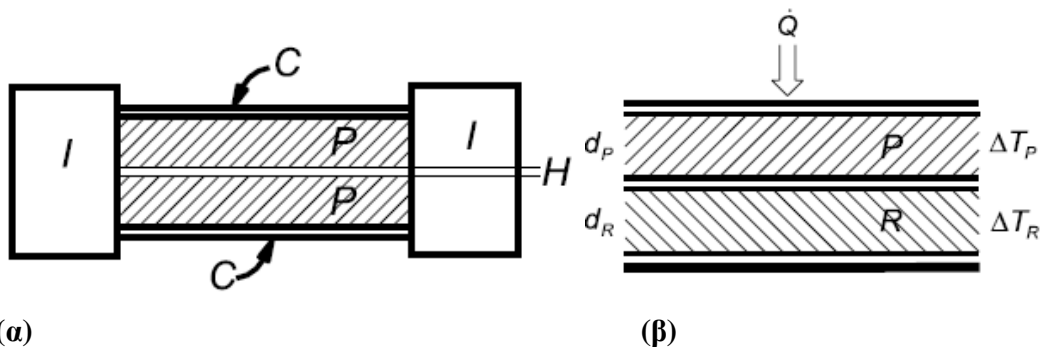
Ωστόσο, για τον ακριβέστερο υπολογισμό του συντελεστή k προτείνονται διάφορες τεχνικές μέτρησης, οι οποίες διακρίνονται σε (Figura & Teixeira, 2007):

Μέθοδοι μέτρησης σε σταθερή κατάσταση (steady-state): Η θερμική αγωγιμότητα είναι η ιδιότητα που διέπει τα φαινόμενα μεταφοράς θερμότητας με αγωγή σε σταθερή κατάσταση. Το πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι ότι ο πειραματικός προσδιορισμός του k πραγματοποιείται με σχετικά απλό και φθινό εργαστηριακό εξοπλισμό και τα δεδομένα μεταφέρονται άμεσα για υπολογισμό της τιμής, ακολουθώντας τον πρώτο νόμο του Fourier. Ο βασικός σχεδιασμός ενός τέτοιου

πειράματος περιλαμβάνει την έκθεση ενός δείγματος τροφίμου γνωστής γεωμετρίας, (επιφάνεια, πάχος) σε ροή θερμότητας προς μια κατεύθυνση. Όταν η θερμοκρασία στην απέναντι πλευρά του δείγματος παραμένει σταθερή καταγράφεται, μετριέται η ροή της θερμότητας και υπολογίζεται το k από την εξίσωση του 1^{ου} Νόμου του Fourier. Σε αυτά τα πειράματα, η πηγή θερμότητας είναι συνήθως μία απλή ηλεκτρική αντίσταση, της οποίας η ροή θερμότητας (ισχύς) είναι γνωστή (προσδιορίζεται από την τάση και την ένταση του ρεύματος). Οι θερμοκρασίες μετρώνται με θερμοζεύγη ή θερμομέτρα αντίστασης. Στην κατηγορία της μέτρησης σε σταθερή κατάσταση περιλαμβάνονται οι παρακάτω μέθοδοι:

- Μέθοδος θερμαινόμενης επιφάνειας (Guarded hot plate) (Σχήμα 56α).
- Μέθοδος ομόκεντρων κυλίνδρων (Concentric cylinder method) (Σχήμα 56β).
- Μέθοδος ομόκεντρης σφαίρας (Concentric sphere method).

Μέθοδοι μέτρησης σε ημι-σταθερή κατάσταση (quasi steady-state): Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στο 2^ο Νόμο του Fourier, με την παραδοχή ότι η ροή θερμότητας είναι περίπου σταθερή κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Αυτές οι τεχνικές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες, όταν η θερμική αγωγιμότητα του υλικού είναι πολύ μικρή. Μία τέτοια τεχνική είναι η μέθοδος του Fitch.

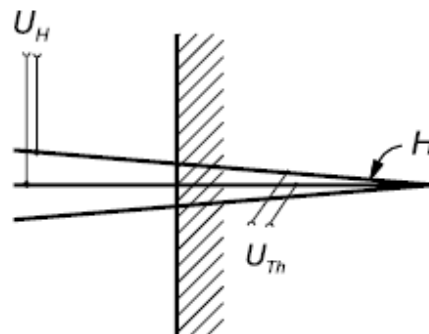


Σχήμα 56. Απεικόνιση εργαστηριακής συσκευής για τη μέτρηση του k σε σταθερή κατάσταση, με βάση τη μέθοδο (α) της θερμαινόμενης επιφάνειας και (β) των ομόκεντρων κυλίνδρων. P: δείγμα, C: ψυχρή επιφάνεια, H: πηγή θερμότητας, I: θερμομόνωση, R: υλικό αναφοράς, d: διάμετρος κυλίνδρου (Figura & Teixeira, 2007).

Μέθοδοι μέτρησης σε μη-σταθερή κατάσταση (*transient techniques, unsteady-state*): Η θερμότητα ρέει στο υλικό και συσσωρεύεται με την πάροδο του χρόνου, προκαλώντας αύξηση της εσωτερικής θερμοκρασίας. Στην περίπτωση αυτή η βαθμίδα θερμοκρασίας δεν είναι σταθερή, αλλά μειώνεται εκθετικά με το χρόνο. Συνεπώς, σκοπός αυτών των πειραματικών μεθόδων είναι η καταγραφή του χρονο-θερμοκρασιακού προφίλ εντός του δείγματος ως αποτέλεσμα της ροής θερμότητας. Στη συνέχεια, η ανάλυση των δεδομένων βασίζεται στο 2^ο Νόμο του Fourier. Στην κατηγορία της μέτρησης σε μη-σταθερή κατάσταση περιλαμβάνονται οι παρακάτω μέθοδοι:

- Μέθοδος του Fitch.
- Μέθοδος Γραμμικής Πηγής Θερμότητας (Line Heat Source Method).
- Μέθοδος μέτρησης θερμικής αγωγιμότητας με χρήση στελέχους (Thermal Conductivity Probe Method) (Σχήμα 57).

Ο υπολογισμός της θερμικής αγωγιμότητας ενός τροφίμου είναι πολύ σημαντικός για την πρόβλεψη του χρόνου μιας θερμικής διεργασίας, για τον υπολογισμό και έλεγχο του ρυθμού ροής θερμότητας, αλλά και για την πρόβλεψη άλλων θερμοφυσικών ιδιοτήτων.



Σχήμα 57. Απεικόνιση της μεθόδου μέτρησης του k με θερμοστοιχείο τύπου βελόνας (H : θερμοστοιχείο) με ηλεκτρική τάση (U_H) ως πηγή θερμότητας με σύνδεση σε θερμοζεύγος (U_{Th}) για μέτρηση της θερμοκρασίας (Figura & Teixeira, 2007).

4.1.5. Οπτικές ιδιότητες

4.1.5.1. Χρώμα - Ορισμοί

Οι οπτικές ιδιότητες των τροφίμων είναι εκείνα τα χαρακτηριστικά, τα οποία καθορίζουν τον τρόπο που τα τρόφιμα αποκρίνονται στην έκθεσή τους στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα καλύπτει -πηγαίνοντας από τα μεγαλύτερα στα μικρότερα μήκη κύματος- την ακτινοβολία ραδιοκυμάτων, μικροκυμάτων, την υπέρυθη ακτινοβολία, το ορατό φως, την υπεριώδη ακτινοβολία, τις ακτίνες X και τις ακτίνες γ (Σχήμα 58). Το ανθρώπινο μάτι είναι ευαίσθητο σε ένα ηλεκτρομαγνητικό φάσμα πολύ μικρό, σε σχέση με το συνολικό, που κυμαίνεται από 380-770 nm. Η ακτινοβολία της περιοχής αυτής είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία της αίσθησης του χρώματος (MacDougall, 2002; Westland, 2002).

Όλες οι οπτικές ιδιότητες καθορίζονται από τα φαινόμενα της ανάκλασης, της διαπερατότητας και της απορρόφησης του φωτός από ένα αντικείμενο. Το είδος και η ένταση αυτών των φαινομένων είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του φωτός με το αντικείμενο προσδίδοντας σε αυτό συγκεκριμένες ιδιότητες:

Διαφανές σώμα: το φως διαπερνά το υλικό, ενώ ανακλάται και απορροφάται από αυτό ελάχιστα.

Αδιαφανές σώμα: το σώμα δεν επιτρέπει στο φως να το διαπεράσει, αλλά απορροφά ή/και ανακλά όλη την φωτεινή ακτινοβολία που προσπίπτει σε αυτό.

Ημιδιαφανές σώμα: το φως ανακλάται και διαπερνά το σώμα ταυτόχρονα.

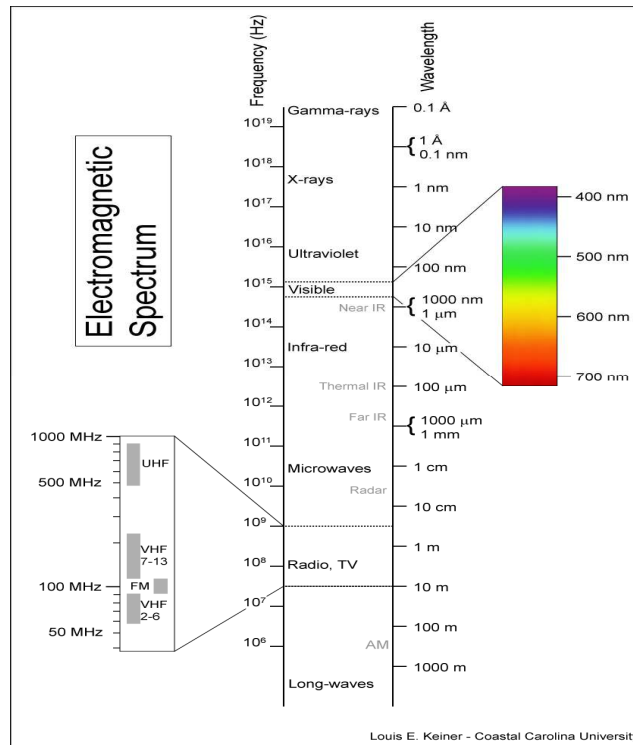
Εντοπίζονται δύο είδη διαπερατότητας και ανάκλασης (Σχήμα 59):

Διάχυτη διαπερατότητα (diffuse transmittance): το φως εισχωρεί σε ένα αντικείμενο, διασκορπίζεται και αναδύεται από την άλλη πλευρά του σκορπίζοντας σε πολλές κατευθύνσεις, δίνοντας την αίσθηση της «ημιδιαφάνειας» (translucency) και του ομιγλώδους.

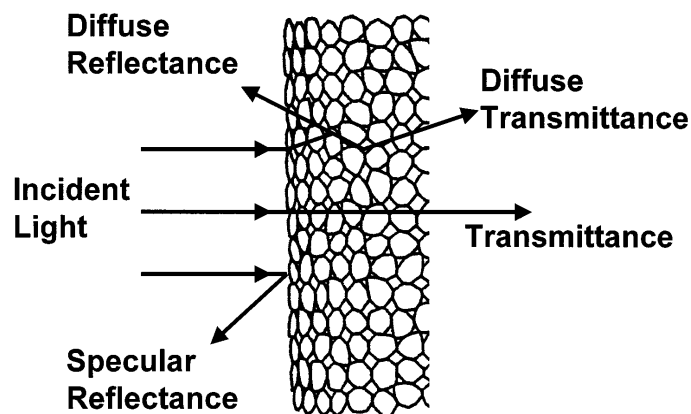
Ευθύγραμμη διαπερατότητα (transmittance): το φως διαπερνά το σώμα, χωρίς να διαχέεται όταν εξέρχεται από αυτό.

Διάχυτη ανάκλαση (diffuse reflection): η ακτινοβολία ανακλάται προς όλες τις κατευθύνσεις και συμβαίνει σε ανώμαλες και αδιαφανείς επιφάνειες.

Κατοπτρική ανάκλαση (*specular reflection*): η ακτινοβολία ανακλάται προς μια μόνο κατεύθυνση με την ίδια γωνία που είχε και η προσπίπτουσα ακτινοβολία, με αποτέλεσμα το σώμα να εμφανίζεται λείο και γυαλιστερό (στιλπνό - gloss).



Σχήμα 58. Απεικόνιση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. (http://1.bp.blogspot.com/osL5o7rITeg/SSQfUPk-SxI/AAAAAAAAAFI/fJeBQcrPYCc/s1600-h/bio_espectrum.jpg)



Σχήμα 59. Αλληλεπιδράσεις φωτός και τροφίμου (Abbott, 1999).

Το χρώμα οφείλεται σε επιφανειακή διάχυτη ανάκλαση, με το μήκος κύματος της ανακλώμενης ακτινοβολίας να είναι εκείνο που καθορίζει αυτό που ονομάζεται χρώμα (color) (Abbott, 1999). Οι διάφοροι συνδυασμοί του ποσοστού απορρόφησης - ανάκλασης με το μήκος κύματος δίνουν την τελική απόχρωση. Παρακάτω αναφέρονται οι συνήθεις περιπτώσεις εμφάνισης χρώματος:

Λευκό χρώμα: η ακτινοβολία ανακλάται πλήρως και ομοιόμορφα σε όλα τα μήκη κύματος.

Μαύρο χρώμα: η ακτινοβολία απορροφάται πλήρως σε όλα τα μήκη κύματος.

Γκρι χρώμα: ένα μέρος της ορατής ακτινοβολίας απορροφάται, αλλά ισόποσα σε όλα τα μήκη κύματος.

Φωτεινότητα ή λαμπρότητα (lightness): σχετίζεται με το ποσοστό της ακτινοβολίας που απορροφάται, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη το μήκος κύματος (Sahin & Sumnu, 2005).

Ένταση (intensity): το χρώμα του αντικειμένου είναι έντονο και «καθαρό», όταν η ακτινοβολία ανακλάται σε μεγάλο ποσοστό και μέσα σε στενά όρια μήκους κύματος (Αθανασόπουλος, 2005).

Είναι σαφές ότι το χρώμα, δεν είναι καθαρά μια φυσική ιδιότητα των αντικειμένων, αλλά το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους με το φως που προσπίπτει σε αυτά, σε συνδυασμό με τον παρατηρητή. Το χρώμα που βλέπει ο παρατηρητής επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της πηγής του φωτός και από τον τρόπο που το αντικείμενο συμπεριφέρεται στο φως που πέφτει πάνω σε αυτό, από πλευράς αντανάκλασης και απορρόφησης. Επίσης, το περιβάλλον στο οποίο γίνεται η παρατήρηση, όπως επίσης και ο ανθρώπινος παράγων (οφθαλμός, εγκέφαλος), που μεταφράζει τα οπτικά ερεθίσματα είναι παράγοντες που επιδρούν στην αίσθηση του χρώματος (Westland, 2002; Francis, 2005).

4.1.5.2. Μέτρηση του χρώματος

Το χρώμα των τροφίμων μπορεί να μετρηθεί με υποκειμενικές και αντικειμενικές μεθόδους. Η υποκειμενική αξιολόγηση του χρώματος βασίζεται στο μάτι του παρατηρητή, αφού το ανθρώπινο μάτι έχει εξαιρετική ικανότητα να διακρίνει μικροδιαφορές στο χρώμα. Η εκτίμηση του χρώματος στην περίπτωση αυτή, γίνεται με σύγκριση του χρώματος του τροφίμου με άλλο τρόφιμο του ίδιου είδους, του οποίου το χρώμα θεωρείται αποδεκτό ή χρησιμοποιούνται πρότυπα χρωμάτων. Αντικειμενικές μέθοδοι μέτρησης του χρώματος είναι αυτές που δεν χρησιμοποιούν το ανθρώπινο μάτι για τη μέτρηση ή αξιολόγηση του

χρώματος, αλλά όργανα με δυνατότητα επανάληψης της μέτρησης. Οι αντικειμενικές μέθοδοι διακρίνονται σε αυτές που χρησιμοποιούνται εντός και εκτός της γραμμής παραγωγής (Αθανασόπουλος 2005; Bee & Honeywood, 2002):

Σε γραμμή παραγωγής: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αυτοματοποιημένοι χρωματικοί ανιχνευτές και τα συστήματα ψηφιακής ανάλυσης χρώματος. Οι αυτοματοποιημένοι χρωματικοί ανιχνευτές είναι φωτοευαίσθητες συσκευές, οι οποίες δεν παρέχουν εικόνα, αλλά το σήμα ψηφιοποιείται απευθείας και επεξεργάζεται σε μικροϋπολογιστή. Έχουν τη δυνατότητα αποφάσεων σε πραγματικό χρόνο και βρίσκουν εφαρμογή στην ταυτοποίηση, εξακρίβωση και ανίχνευση ελαττωμάτων. Τα συστήματα ψηφιακής ανάλυσης εικόνας χρησιμοποιούν κάμερα για τη λήψη εικόνας και ειδικό λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας (ImagePro) για την επεξεργασία.

Εκτός γραμμής παραγωγής: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν (α) η φασματοφωτομετρία, η οποία βασίζεται στη μέτρηση του φωτός που απορροφάται ή ανακλάται από ένα τρόφιμο με φασματοφωτόμετρα, τα οποία δίνουν πληροφορίες για όλα τα μήκη κύματος και (β) η χρωματομετρία (colorimetry), η οποία ασχολείται με τον ποσοτικό προσδιορισμό και την φυσική περιγραφή της ανθρώπινης αντίληψης του χρώματος. Η μέτρηση του χρώματος βασίζεται στη χρησιμοποίηση τριών βασικών χρωμάτων, που προσομοιάζουν την ανάλυση στα βασικά χρώματα, κόκκινο, πράσινο και μπλε. Τα τριχρωματικά χρωματόμετρα ή χρωματόμετρα τριπλής διέγερσης (Tristimulus Colorimeter) αποτελούνται από τρία φίλτρα γυαλιού που αντιστοιχούν στα τρία βασικά χρώματα, μια πηγή φωτός και ένα σύστημα ανίχνευσης. Παίρνουν τις απορροφήσεις σε συγκεκριμένα μήκη κύματος δίνοντας αποτελέσματα των χρωματικών παραγόντων ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο χρωματικό μοντέλο. Ένα αρκετά διαδεδομένο χρωματόμετρο με ευρεία χρήση σε πολλά γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα, είναι το MINOLTA (Σχήμα 60), το οποίο μετατρέπει το ποιοτικό αίσθημα του χρώματος σε ποσοτική μέτρηση. Το χρωματόμετρο MINOLTA χρησιμοποιεί μια λυχνία βολταϊκού τόξου, που παράγει ένα στιγμιαίο φωτεινό παλμό, ο οποίος φωτίζει μια περιοχή διαμέτρου 8 mm, της επιφάνειας που μετράται. Το φως που ανακλάται κάθετα από την επιφάνεια συλλέγεται από την κεφαλή του οργάνου και μετατρέπεται σε ρεύμα, που ψηφιοποιείται και εισάγεται στον μικροϋπολογιστή του οργάνου, όπου τα ψηφιακά σήματα μετατρέπονται σε ένα σετ

παραμέτρων. Τα αποτελέσματα, που εμφανίζονται στην οθόνη του χρωματόμετρου, εισάγονται σε Η/Υ και αναλύονται (Pitts *et al.*, 1998).

4.1.5.3. Χρωματικά μοντέλα

Η προσπάθεια να προσδιοριστεί επακριβώς το χρώμα ξεκίνησε στις αρχές του 19ου αιώνα με την δημιουργία χρωματικών μοντέλων (color model) στη μορφή τρισδιάστατων χώρων. Σε αυτή τη μορφή γίνεται οργάνωση των χρωμάτων, όπου κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε αριθμητικές συντεταγμένες. Περίπου το 1930, η Διεθνής Επιτροπή Φωτισμού CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) εισάγει το τριχρωματικό μοντέλο RGB, με βάση την αρχή των τριών διεγέρσεων του ανθρώπινου οφθαλμού στο κόκκινο (Red) στο πράσινο (Green) και στο μπλε (Blue). Στο σύστημα αυτό, κάθε χρώμα μπορεί να περιγραφεί από τη μίξη των τριών βασικών χρωμάτων (κόκκινο, πράσινο, μπλε) με μαθηματικές τιμές, οι οποίες προκύπτουν από μαθηματικές εξισώσεις (Sahin & Sumnu, 2005). Εκτός του RGB υπάρχουν και άλλα χρωματικά μοντέλα, όπως το XYZ, το σύστημα Munsell, το CMY(K), το HSB, CMC, το σύστημα Hunter και το CIE L*a*b*, το οποίο περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω (MacDougall, 2002; Francis, 2005; Hsien-Che, 2005). Θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι σε κάποια από τα παραπάνω συστήματα, όπως στο σύστημα Hunter και στο Munsell, χρησιμοποιούνται οι ίδιες χρωματικές παράμετροι με το χρωματικό μοντέλο CIE L*a*b*, αλλά ο προσδιορισμός τους βασίζεται σε διαφορετικές μαθηματικές εξισώσεις. Στη βιβλιογραφία επίσης, περιγράφονται και πιο εξειδικευμένα μοντέλα προσδιορισμού του χρώματος, όπως το χρωματικό σύστημα Lovibond, το οποίο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του χρώματος της μπύρας, αλλά και στη βιομηχανία ελαίων (Sahin & Sumnu, 2005).



Σχήμα 60. Χρωματόμετρο Minolta, CR-200.

Το χρωματικό μοντέλο CIE $L^*a^*b^*$ παρουσιάστηκε από την CIE το 1976 και αποτελεί ακόμα και σήμερα ένα από τα πρότυπα για τη μέτρηση των χρωμάτων. Το μοντέλο αυτό δέχεται τη θεωρία ότι η αντίληψη του χρώματος βασίζεται σε τρεις διακριτούς υποδοχείς χρώματος (κόκκινο, πράσινο και μπλε) στο ανθρώπινο μάτι και αντιπροσωπεύει ένα χώρο, όπου οι αποστάσεις αντιστοιχούν στις χρωματικές διαφορές. Έτσι, το κάθε χρώμα περιγράφεται από τρεις χρωματικές συντεταγμένες ή παράγοντες, που ονομάζονται L^* , a^* και b^* , οι οποίες απεικονίζονται σε τρισδιάστατο καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων. Η τιμή του L^* αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα ενός αντικείμενου και μετρείται σε μια κλίμακα, όπου το απόλυτο μαύρο έχει τιμή $L^* = 0$, και το απόλυτο λευκό, που αντανακλά απόλυτα όλα τα μήκη κύματος που προσπίπτουν σε αυτό, $L^* = 100$. Ο άξονας του a^* παρουσιάζει το πόσο κόκκινο ή πράσινο είναι ένα αντικείμενο ($+a^*$: κόκκινο, $-a^*$: πράσινο), ενώ ο άξονας του b^* δείχνει το πόσο κίτρινο ή μπλε είναι ($+b^*$: κίτρινο, $-b^*$: μπλε) (Σχήμα 61). Οι τιμές του a^* και του b^* πλησιάζουν το 0 για τα ουδέτερα χρώματα, όπως το γκρι και το άσπρο και αυξάνονται ή μειώνονται, ανάλογα με το χρώμα, όσο πιο έντονα και κορεσμένα είναι τα χρώματα.

Το χρωματικό μοντέλο CIE $L^*a^*b^*$ μπορεί να αναπαρασταθεί και σε κυλινδρικό σύστημα πολικών συντεταγμένων με το μοντέλο CIE L^*, C^*, h^* (Σχήμα 62). Το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε ως ένας πιο κατάλληλος και εύκολος τρόπος διαχείρισης των χρωματικών ανοχών, στην περίπτωση που καθορίζονται προδιαγραφές αποδοχής ή απόρριψης (Francis, 2005). Οι τρεις συντεταγμένες εκφράζουν:

$L^* = \text{φωτεινότητα (Lightness)}$: χρησιμοποιείται για τη διάκριση ανοιχτού-σκούρου χρώματος της ίδιας χροιάς.

$C^* = \text{χρωματική πυκνότητα ή κορεσμός (Chroma)}$: προσδιορίζει τη συγκέντρωση και χαρακτηρίζει την ένταση και καθαρότητα της χροιάς (Sahin & Sumnu, 2005; Κωσταρόπουλος 2005)

$h^* = \text{χροιά (hue angle)}$: προσδιορίζει την απόχρωση και μετράται σε μοίρες παίρνοντας τιμές (κατ' αντιστοιχία με τις παραμέτρους a^*, b^*) από 0° για το κόκκινο-πορφυρό ($+a^*$), 90° για το κίτρινο ($+b^*$), 180° για το πράσινο ($-a^*$) και 270° για το μπλε ($-b^*$) (McGuire, 1992; MacDougall, 2002; Sahin & Sumnu, 2005)

Οι παράμετροι C^*, h^* υπολογίζονται από τις παρακάτω μαθηματικές εξισώσεις 9-12 (McGuire, 1992):

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{Εξ. 9}$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*), \quad \text{όταν } a^* > 0 \text{ και } b^* > 0 \quad \text{Εξ. 10}$$

$$h^* = 180^\circ + \tan^{-1}(b^*/a^*), \quad \text{όταν } a^* < 0 \quad \text{Εξ. 11}$$

$$h^* = 360^\circ + \tan^{-1}(b^*/a^*), \quad \text{όταν } a^* > 0 \text{ και } b^* < 0 \quad \text{Εξ. 12}$$

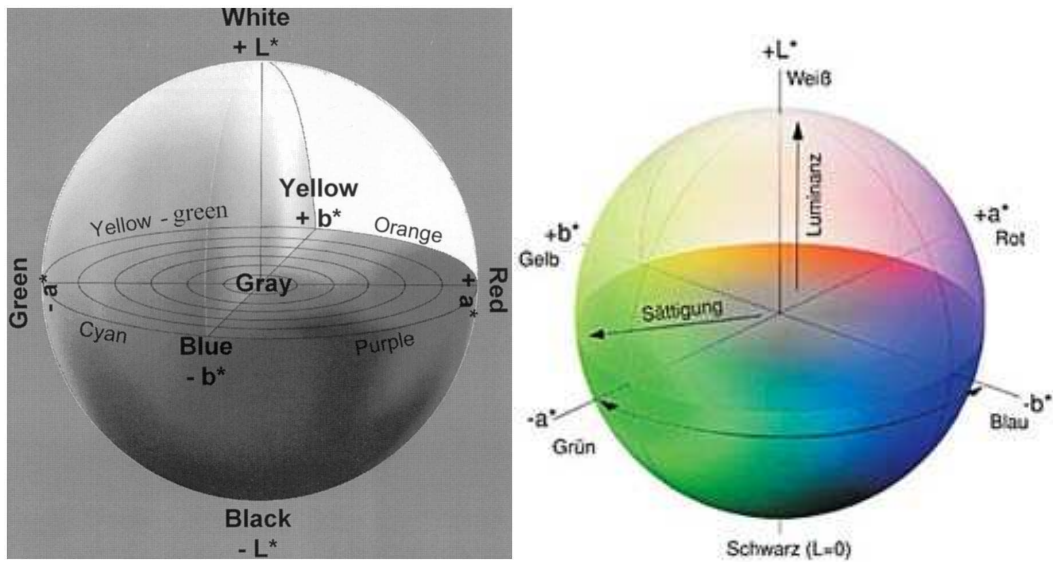
Πολλές φορές είναι χρήσιμο να υπολογιστεί η χρωματική διαφορά (ΔE) μεταξύ δύο αντικειμένων, ιδιαίτερα στην περίπτωση που η ιδιότητα του χρώματος, αποτελεί ποιοτικό δείκτη. Επίσης, μπορεί να συνδεθεί με την υποκειμενική εκτίμηση του χρώματος διότι έχει μελετηθεί το μέγεθος που γίνεται αντιληπτό με το ανθρώπινο μάτι (Sahin & Sumnu, 2005). Η τιμή ΔE υπολογίζεται από τις εξισώσεις 13 ή 14, αντίστοιχα, αν έχουν χρησιμοποιηθεί οι συντεταγμένες $L^*a^*b^*$ ή L^*, C^*, h^* .

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Εξ. 13}$$

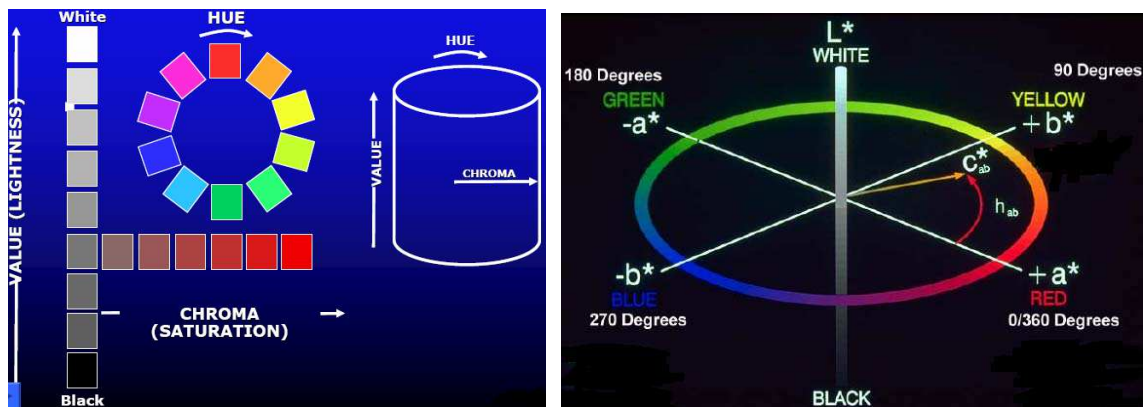
$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*)^2 + (\Delta H^*)^2]^{1/2} \quad \text{Εξ. 14}$$

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ΔE δεν εξηγεί την κατεύθυνση της αλλαγής του χρώματος, οπότε είναι απαραίτητο λαμβάνονται υπ'όψιν και οι μεμονωμένες τιμές των συντεταγμένων L^*, a^* και b^* για να εκτιμηθεί το είδος της μεταβολής ή της διαφοράς. Μία άλλη έκφραση της χρωματικής διαφοράς είναι η ΔH , η οποία προσδιορίζει τη μεταβολή ή τη διαφορά στη χροιά και υπολογίζεται από την εξίσωση 15:

$$\Delta H^* = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 - (\Delta C^*)^2]^{1/2} \quad \text{Εξ. 15}$$



Σχήμα 61. Απεικόνιση του χρωματικού μοντέλου CIE $L^*a^*b^*$, όπου $L^*=100$ (λευκό)- $L^*=0$ (μαύρο) , a^* πράσινο / κόκκινο , b^* μπλε / κίτρινο (Sahin & Sumnu, 2005).



Σχήμα 62. Απεικόνιση του χρωματικού μοντέλου CIE $L^*a^*b^*$ σε κυλινδρικό σύστημα με τις πολικές συντεταγμένες L^* , C^* και h^* (Sahin & Sumnu, 2005).

4.1.6. Ρεολογικές ιδιότητες στερεών τροφίμων

4.1.6.1. Υφή

Η υφή είναι μία πολύ-παραμετρική ιδιότητα και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια ποιότητας των τροφίμων. Ιδιαίτερα κατά την αξιολόγηση νέων προϊόντων έχει επιβεβαιωθεί από μελέτες, ότι η υφή τίθεται ως ένας βασικός ποιοτικός συντελεστής από τους καταναλωτές (Αθανασόπουλος, 2005). Τα στερεά τρόφιμα έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά ως προς την υφή τους, τα οποία απορρέουν από τη δομή τους (μοριακή, μικροσκοπική, μακροσκοπική), τις μηχανικές τους ιδιότητες (π.χ. αντίδραση στην παραμόρφωση) και τις ιδιότητες της επιφάνειας (π.χ. γεωμετρικά χαρακτηριστικά) (Szczeniak, 2002). Μία προτεινόμενη ταξινόμηση των παραμέτρων της υφής περιλαμβάνεται στον Πίνακα 18. Είναι σαφές, ότι η υφή είναι η έκφραση των ρεολογικών ιδιοτήτων ενός τροφίμου, διότι οι παράμετροι που τη χαρακτηρίζουν εξαρτώνται από τη σχέση της ασκούμενης τάσης (stress) προς την παραμόρφωση (strain) στο χρόνο.

4.1.6.2. Δοκιμές αξιολόγησης της υφής

Λόγω του ότι η υφή είναι μια ιδιότητα άμεσα συνδεδεμένη με τις αισθήσεις, μπορεί να αξιολογηθεί με οργανοληπτικές μεθόδους (υποκειμενική μέτρηση), αλλά και με τη χρήση μηχανημάτων (αντικειμενική μέτρηση). Οι συσκευές μέτρησης υφής μπορούν να αντιληφθούν και να ποσοτικοποιήσουν μόνο συγκεκριμένες φυσικές παραμέτρους, οι οποίες μετά θα πρέπει να ερμηνευθούν με όρους αισθητικής αντίληψης.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος γίνεται από έμπειρα, εκπαιδευμένα μέλη μιας ομάδας και περιλαμβάνει εξέταση των δειγμάτων, ως προς τα χαρακτηριστικά που αφορούν το πρώτο σπάσιμο, τη μάσηση, την κατάποση και την αίσθηση που αφήνει το προϊόν στο στόμα και στο λαιμό. Συνήθως βασίζεται στη σύγκριση της αίσθησης που αφήνει το προϊόν σε σχέση με κάποια πρότυπα προϊόντα, των οποίων τα χαρακτηριστικά της υφής έχουν εκτιμηθεί και καταγραφεί σε μια κλίμακα. (Szczeniak, 2002).

Ο αντικειμενικός προσδιορισμός περιλαμβάνει τη μέτρηση της υφής με μηχανήματα, τα οποία ασκούν δύναμη στο προϊόν με διαφορετικούς τρόπους, (συμπίεση, διάτμηση, κοπή, εφελκυσμό) σε έναν ή πολλούς άξονες, εφόσον πολλά από τα χαρακτηριστικά της υφής έχουν σαν κοινή ιδιότητα την αντίσταση του προϊόντος σε κάποια δύναμη (Σχήμα 63) (Dobraszczyk & Vincent, 1999). Η αρχή λειτουργίας ενός τέτοιου μηχανήματος φαίνεται στο

Πίνακας 18. Ταξινόμηση των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την υφή ενός τροφίμου (Szczeniak, 2002).

Μηχανικά χαρακτηριστικά		
<i>Κύριες παράμετροι</i>	<i>Δευτερεύουσες παράμετροι</i>	<i>Συνήθειες όροι</i>
Σκληρότητα (hardness)		μαλακό (soft), σφιχτό (firm), σκληρό (hard)
Συνεκτικότητα (cohesiveness)	Ευθραυστότητα (fracturability, brittleness)	εύθρυπτο (crumbly), τραγανό (crunchy), εύθραυστο (brittle)
	Μασητικότητα (chewiness)	τρυφερό (tender), λαστιχωτό-τσιγλώδες (chewy), (tough)
	Κολλητικότητα (gumminess)	αλευρώδες (mealy), κολλώδης πάστα (pasty gummy), (short)
Ιξώδες (viscosity)		λεπτόρευστο (thin), παχύρευστο (viscous)
Ελαστικότητα (springiness)		πλαστικό (plastic), ελαστικό (elastic)
Συγκολλητικότητα (adhesiveness)		κολλώδες (sticky, tacky, gooey)
Γεωμετρικά χαρακτηριστικά		
<i>Τάξη</i>	<i>Παραδείγματα</i>	
Μέγεθος και σχήμα σωματιδίων	αμμώδες (gritty), κοκκώδες (grainy), χονδρόκοκκο (coarse)	
Σχήμα σωματιδίων και κατεύθυνση	ινώδες (fibrous), πορώδες (cellular), κρυσταλλικό (crystalline)	
Άλλα χαρακτηριστικά		
<i>Κύριες παράμετροι</i>	<i>Δευτερεύουσες παράμετροι</i>	<i>Συνήθειες όροι</i>
Περιεκτικότητα σε υγρασία		ξηρό (dry), υγρό (moist), (wet), υδαρές (watery)
Περιεκτικότητα σε λίπος	ελαιώδης υφή (oiliness)	ελαιώδες (oily)
	λιπαρότητα (greasiness)	λιπαρό (greasy)

Σχήμα 64. Αποτελείται από μία κινούμενη κεφαλή στην οποία προσαρμόζονται διάφορα εργαλεία για την εφαρμογή της δύναμης (πλάκα, έμβολο, βελόνα, μαχαίρι), ανάλογα με τη δοκιμή που έχει σχεδιαστεί (Σχήμα 65). Το δείγμα τοποθετείται σε σταθερή επιφάνεια και η κεφαλή κινείται προς το δείγμα μέχρις ότου προκληθεί ένα προκαθορισμένο ποσοστό παραμόρφωσης. Μέσω μιας κυψέλης φορτίου (load cell) μετριέται η δύναμη, ενώ η κίνηση της κεφαλής καταγράφεται στη συσκευή. Με αυτό τον τρόπο, δημιουργούνται οι καμπύλες δύναμης – παραμόρφωσης, από τις οποίες ποσοτικοποιούνται οι μηχανικές ιδιότητες των εξεταζόμενων τροφίμων. Ωστόσο, διακρίνονται δύο κατηγορίες δοκιμών, οι στατικές και οι δυναμικές. Στις στατικές, το φορτίο της δύναμης παραμένει σταθερό στο χρόνο που διαρκεί η δοκιμή, ενώ στις δυναμικές το φορτίο δύναμης μεταβάλλεται με γραμμικό βήμα ή με περιοδικούς ημιτονοειδείς κύκλους (Figura & Teixeira, 2007). Το Instron είναι ένα ευρείας χρήσης όργανο μέτρησης της μηχανικής αντοχής υλικών, με αυτόματη παρουσίαση των πειραματικών μετρήσεων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των οργάνων πολλαπλών μετρήσεων. Χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα υλικών, με σκοπό τον έλεγχο της συμπεριφοράς τους ως προς τη συμπίεση, τη διάτρηση, τον εφελκυσμό κ.α. Αποτελείται από 2 κατακόρυφες μεταλλικές ράβδους, μεταξύ των οποίων κινείται έμβολο, στερεωμένο πάνω σε μια γέφυρα, στο οποίο γίνεται ρύθμιση της ταχύτητας και των γεωμετρικών του χαρακτηριστικών. Παράλληλα καθορίζονται οι συνθήκες πραγματοποίησης των ελέγχων (ποσοστό παραμόρφωσης, μέγιστη δύναμη, διαστάσεις δείγματος κ.α) και γίνεται δυνατή η παρατήρηση της μεταβολής της δύναμης με το χρόνο παραμόρφωσης.

Οι συνήθεις τρόποι εφαρμογής της δύναμης στις δοκιμές μέτρησης της υφής είναι (Σχήμα 63):

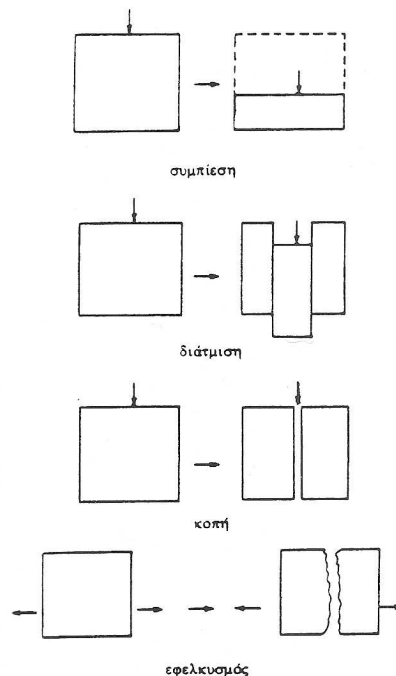
Συμπίεση: Είναι μια από τις πιο σημαντικές μηχανικές δοκιμές. Μετρά την παραμόρφωση που προκύπτει στο τρόφιμο μετά την εφαρμογή μιας συγκεκριμένης δύναμης (με κατεύθυνση προς το υλικό) ή τη δύναμη που απαιτείται ώστε να προκληθεί μια συγκεκριμένη παραμόρφωση. Η μεταβολή αυτή χρησιμοποιείται για την έκφραση της αντοχής του στη συμπίεση και εφαρμόζεται τόση δύναμη, ώστε αυτό να παραμείνει ακέραιο (αδιαίρετο). Η οργανοληπτική περιγραφή αυτής της δοκιμής είναι η σκληρότητα, το μαλακό ή το σφιχτό.

Διάτμηση: Είναι αποτέλεσμα της δράσης δυο αντίθετων δυνάμεων (δύναμη-αντίσταση). Η δύναμη εφαρμόζεται σε μια ζώνη του προϊόντος τέτοια, ώστε να προκληθεί διαχωρισμός της ζώνης αυτής από το κύριο σώμα του προϊόντος. Οι δυνάμεις που δρουν είναι εφαπτόμενες στο επίπεδο του υλικού.

Κοπή: η δύναμη (κατευθυνόμενη προς το υλικό) εφαρμόζεται κατά τέτοιον τρόπο, ώστε το προϊόν να χωρίζεται σε δυο τμήματα χωρίς να συμπιέζεται ή να συνθλίβεται. Η εκτίμηση της φρεσκότητας και της νωπότητας στα φρούτα και λαχανικά βασίζεται στις δοκιμές κοπής (Kramer shear press, Pea Tenderometer) (Sahin & Sumnu, 2005).

Εφελκυσμός: δοκιμάζεται η αντοχή του τροφίμου μέχρι αυτό να σπάσει, εφαρμόζοντας σε αυτό δύο δυνάμεις που έχουν αντίθετη φορά, με κατεύθυνση απομάκρυνσης από το επίπεδο που δρουν.

Διάτρηση: μετριέται η δύναμη που απαιτείται για να διεισδύσει ένα έμβολο μέσα στη μάζα του τροφίμου σε συγκεκριμένο βάθος. Είναι ένας τρόπος εκτίμησης της σκληρότητας και χαρακτηρίζει πόσο μαλακό (soft), σφιχτό (firm) ή σκληρό (hard) είναι το υλικό. Χρησιμοποιείται κυρίως σε φρούτα, λαχανικά, καθώς και σε κάποια γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα κρέατος (Sahin & Sumnu, 2005).



Σχήμα 63. Τρόποι εφαρμογής της δύναμης κατά τον προσδιορισμό της υφής με μηχανήματα (Αθανασόπουλος, 2005).

Σε τρόφιμα, που περιέχουν σημαντικές ποσότητες λίπους, παρατηρείται και ροή. Καθώς το έμβολο ακουμπά και διεισδύει σε ένα τρόφιμο, αναπτύσσονται δυνάμεις συμπίεσης και διάτμησης. Οι δυνάμεις συμπίεσης είναι ανάλογες του εμβαδού του εμβόλου, ενώ οι δυνάμεις διάτμησης είναι ανάλογες της περιμέτρου του. Η δύναμη που απαιτείται για ένα πείραμα διάτμησης υπολογίζεται από την εξίσωση του Bourne (1966):

$$F = K_c A + K_s P + K_f A + C \quad (\text{Bourne, 1982}) \quad \text{Εξ. 16}$$

όπου:

F : η δύναμη διάτμησης

K_c : ο συντελεστής συμπίεσης του υλικού

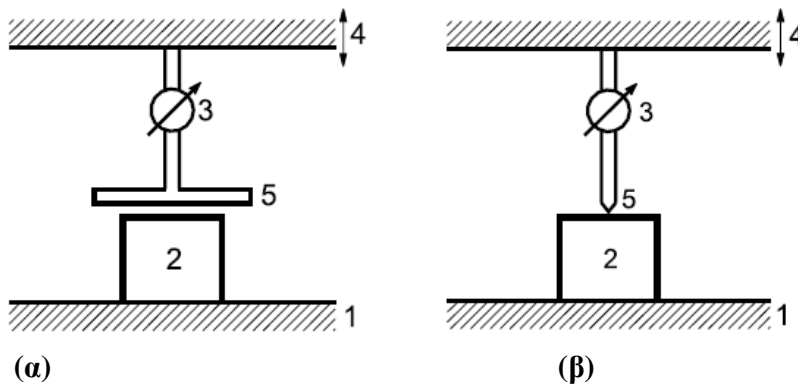
A : το εμβαδόν του εμβόλου

K_s : ο συντελεστής διάτμησης του υλικού

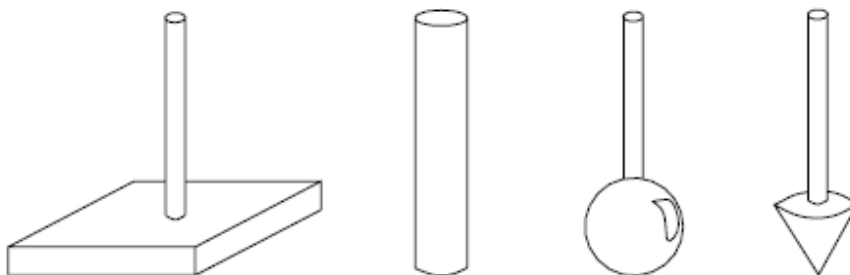
P : η περίμετρος του εμβόλου

K_f : ο συντελεστής ροής

C : σταθερά



Σχήμα 64. (α) Δοκιμή συμπίεσης με παράλληλες πλάκες (β) Δοκιμή διείσδυσης με κωνικό έμβολο. 1: σταθερή επιφάνεια 2: δείγμα 3: κυψέλη φορτίου (load cell) 4: κινητή κεφαλή 5: εργαλείο δοκιμής (Figura & Teixeira, 2007).



Σχήμα 65. Εργαλεία δοκιμής για την εφαρμογή της δύναμης, τα οποία προσαρμόζονται στα μηχανήματα μέτρησης της υφής (Figura & Teixeira, 2007).

Οι άλλες δοκιμές μέτρησης της υφής που εφαρμόζονται στα τρόφιμα αποτελούν συνδυασμούς των προηγούμενων και είναι: η διείσδυση (το βάθος που ένας κώνος ή μια βελόνα εισέρχεται μετά την εφαρμογή της δύναμης), ο ερπυσμός (creep), η κάμψη-κοπή (για τα εύθραυστα προϊόντα, π.χ. μπισκότα), η στρέψη, η χαλάρωση-ανάπαυση (relaxation) και η TPA (Texture Profile Analysis-μέθοδος προσομοίωσης της μάσησης) ή δοκιμές διπλής συμπίεσης (Κωσταρόπουλος, 2005; Sahin & Sumnu, 2005). Πληροφορίες για τη δοκιμή TPA είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία (Pons & Fiszman, 1996).

4.1.6.3. Ανάλυση διαγράμματος δύναμης - παραμόρφωσης (TPA)

Οι παράμετροι που μπορούν να μετρηθούν κατά τη συμπίεση και φαίνονται στο διάγραμμα (Σχήμα 66) είναι οι εξής:

Πρώτη δύναμη υποχώρησης (Bioyield Force, F_y): Η δύναμη αυτή παρουσιάζεται στο σημείο όπου παρατηρείται αύξηση της παραμόρφωσης, χωρίς όμως να υπάρχει ταυτόχρονη αύξηση της δύναμης. Αυτή η πρώτη κορυφή αντιπροσωπεύει την πρώτη κατάρρευση μερικών κυττάρων του βιολογικού υλικού (κατάρρευση στη μικροδομή του τροφίμου).

Τάση στο σημείο υποχώρησης του τροφίμου (yield stress): Ορίζεται ως το πηλίκο της πρώτης δύναμης υποχώρησης F_y που δέχεται το τρόφιμο (N) ως προς την επιφάνεια A (m^2) στην οποία ασκείται η δύναμη.

Το σημείο που παρατηρείται η δύναμη υποχώρησης (Bioyield Point, D_y): είναι η παραμόρφωση που παρατηρείται, όταν εφαρμοστεί η δύναμη υποχώρησης.

Δύναμη και παραμόρφωση στο όριο ελαστικότητας (FL , DL): Το τρόφιμο συμπεριφέρεται σαν ελαστικό, αφού αν αφηθεί σε ηρεμία, επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση. Πέρα από αυτό το σημείο το τρόφιμο χάνει την ελαστικότητά του. Το σημείο LL είναι το ανώτατο όριο παραμόρφωσης και δείχνει το σημείο μέχρι το οποίο το υλικό συμπεριφέρεται σαν ελαστικό σώμα.

Μέγιστη δύναμη ή δύναμη κατάρρευσης (Rupture Force FR): είναι η δύναμη που αντιστοιχεί στην κατάρρευση του τροφίμου, που σημαίνει ότι το σώμα έχει υποστεί μια μόνιμη μη αντιστρεπτή παραμόρφωση (κατάρρευση στη μακροδομή).

Το σημείο που παρατηρείται η μέγιστη δύναμη (Rupture Point DR): είναι η παραμόρφωση που παρατηρείται όταν εφαρμοστεί η μέγιστη δύναμη.

Δείκτης ακαμψίας ή δείκτης ελαστικότητας (Young's Modulus or apparent modulus of deformability) (E): ορίζεται ως το πηλίκο της μεταβολής της τάσης προς την παραμόρφωση και είναι ίσος με την κλίση της ευθείας στο ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης δύναμης – παραμόρφωσης. Ο δείκτης αυτός αποτελεί μέτρο της ακαμψίας ενός δείγματος, δηλαδή της δυσκολίας να συμπιεστεί το δείγμα όταν δεχθεί μια δύναμη συμπίεσης. Γενικά ο δείκτης ακαμψίας δίνεται από τον τύπο (Sahin & Sumnu, 2005; Figura & Teixeira, 2007):

$$E = \text{τάση} / \text{παραμόρφωση} = (F/A) / (\Delta L/L_0) \quad (\text{Bourne, 1982}) \quad \text{Εξ. 17}$$

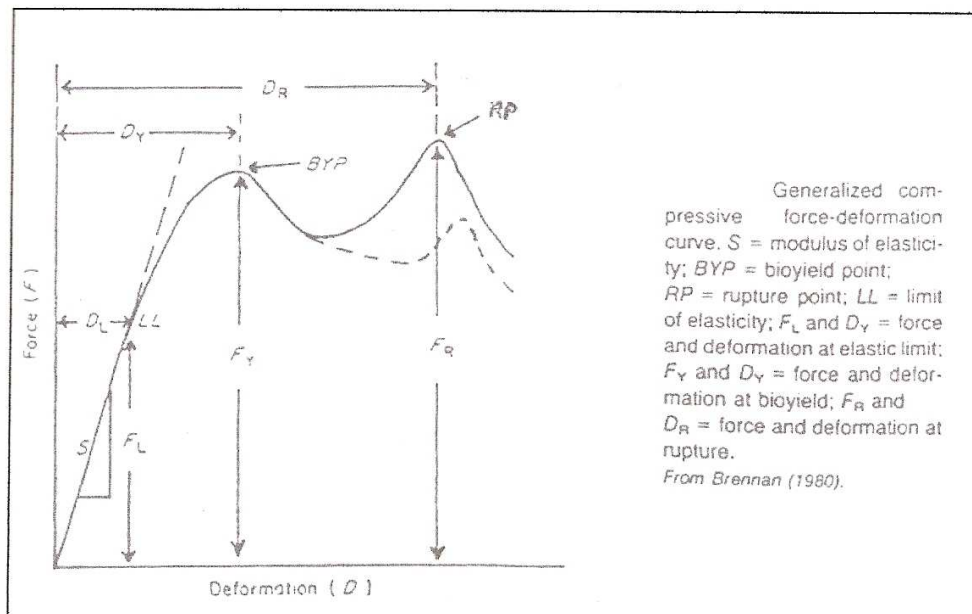
όπου

F : η δύναμη που δέχεται το δείγμα (N),

A : η επιφάνεια πάνω στην οποία εξασκείται η δύναμη (m²),

ΔL : η παραμόρφωση του δείγματος (μεταβολή του ύψους του δείγματος στην κατεύθυνση της ασκούμενης δύναμης) (m)

L₀ : το αρχικό ύψος (m)



Σχήμα 66. Τυπικό διάγραμμα δύναμης – παραμόρφωσης ενός τροφίμου σε δοκιμή συμπίεσης (Brennan, 1980).

Λόγω της παρουσίας ιξωδών στοιχείων στη ρεολογική δομή των περισσότερων τροφίμων, το σχήμα και η θέση της καμπύλης δύναμης-παραμόρφωσης επηρεάζεται πολύ από το ποσοστό της εφαρμοζόμενης παραμόρφωσης. Αυτό συμβαίνει, γιατί το υλικό αντιδρά (ή ρέει) από τη στιγμή που συμπίεζεται και το μέγεθος αυτής της αντίδρασης εξαρτάται από το είδος του ιξώδους στοιχείου. Όσο μικρότερο είναι το ιξώδες του υλικού, τόσο πιο γρήγορη και αποτελεσματική θα είναι η ροή και μεγαλύτερο το ποσοστό παραμόρφωσης. Όσο ταχύτερο είναι το ποσοστό παραμόρφωσης, τόσο πιο μεγάλες δυνάμεις απαιτούνται για τη συμπίεση του υλικού.

4.1.7. Ενεργότητα νερού (a_w)

4.1.7.1. Θεωρία - Ορισμοί

Το νερό είναι ένα σημαντικό συστατικό των τροφίμων, διότι παίζει αποφασιστικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικών τους ιδιοτήτων, αλλά και στην ποιοτική, χημική, μικροβιολογική και βιοχημική τους υποβάθμιση (Lewicki, 2004). Το περιεχόμενο νερό των τροφίμων ενυπάρχει με διάφορες μορφές, λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του τροφίμου και των μορίων του νερού. Στα περισσότερα τρόφιμα, με περιεκτικότητα σε υγρασία $>50\%$, το νερό είναι ελεύθερα διαθέσιμο και φέρει τις ιδιότητες του καθαρού νερού, δηλαδή είναι διαλύτης, συμμετέχει σε αντιδράσεις, εξατμίζεται, παγώνει (Figura & Teixeira, 2007). Όσο η περιεκτικότητα σε υγρασία μειώνεται, το περιεχόμενο νερό είναι λιγότερο ενεργό και δεν μπορεί να δρα φυσικά ή χημικά, όπως το καθαρό νερό. Σε αυτή την κατάσταση θεωρείται ότι είναι δεσμευμένο. Ο τρόπος με τον οποίο το νερό είναι δεσμευμένο στην εσωτερική δομή του τροφίμου, ο βαθμός στον οποίο είναι ελεύθερα διαθέσιμο να δρα ή ο βαθμός που είναι χημικά δεσμευμένο και μη-διαθέσιμο, περιλαμβάνονται στην έννοια της ενεργότητας του νερού (a_w) του τροφίμου. Στον Πίνακα 19 περιγράφονται οι συνθήκες και μορφές υπό τις οποίες το νερό είναι δεσμευμένο και το ρόλο (ενεργότητα) που μπορεί να έχει σε κάθε μία από αυτές. Από τον Πίνακα φαίνεται, ότι το νερό μπορεί να υπάρχει σε μορφή σταγόνας, ελεύθερο και ενεργό, είτε να είναι ελαφρώς δεσμευμένο με μηχανικό ή φυσικό τρόπο, σε μεγάλα ή λεπτά τριχοειδή, είτε να βρίσκεται μεταξύ των μορίων ως διαλύτης ή να είναι προσροφημένο κατά θέσεις στην επιφάνεια και να είναι δεσμευμένο φυσικοχημικά, είτε να βρίσκεται σε κρυσταλλική μορφή και να είναι ισχυρά δεσμευμένο με χημικό τρόπο στα συστατικά του τροφίμου (Figura & Teixeira, 2007).

Πίνακας 19. Μορφές δέσμευσης του νερού μέσα στα τρόφιμα και οι σχετικές ενέργειες δέσμευσης (Figura & Teixeira, 2007).

	adhering water droplets	capillary water	water as a solute	adsorbed water	crystal water	water of constitution	
description	water dropping from bodies	water in coarse capillaries	water in fine capillaries	water between molecules	water sitting on surfaces	water belonging to a crystal lattice	water in a compound
binding	none	mechanical	physical	physicochemical		chemical	
binding type			nonstoichiometric			stoichiometric	
water mobility	free	nearly free		decreased		none mobile	
heat of binding in J/g H ₂ O	0	0	0–300	0–1000	100–3300	300–2200	1000–6000
examples	wet surfaces of solids	wet sand	wet filter tissue	starch gel, gelatin gel	solid surfaces in atmospheric air	crystalline glucose-mono- hydrate	Ca(OH) ₂

Όλες οι παραπάνω συνθήκες ή μορφές ύπαρξης του νερού μέσα στο τρόφιμο αντιστοιχούν σε διαφορετική ενεργότητα. Συνεπώς, η ενεργότητα νερού (a_w) σε ένα προϊόν, ορίζεται από το λόγο της τάσης των υδρατμών (p) στο συγκεκριμένο προϊόν ως προς την τάση ατμών του καθαρού νερού (p_w) στην ίδια θερμοκρασία (Εξίσωση 18) και οι τιμές της κυμαίνονται από 0-1. Η τιμή της a_w στα περισσότερα τρόφιμα κυμαίνεται από 0.7-1 (Blahovec & Yanniotis, 2008). Ένας άλλος ορισμός της a_w περιγράφεται ως η σχετική υγρασία ισορροπίας του τροφίμου με το περιβάλλον που το περικλείει. Σε αυτή την περίπτωση, η a_w του τροφίμου ισούται με τη σχετική υγρασία (ΣY) του χώρου με τον οποίο βρίσκεται σε ισορροπία (Γιαννιώτης 2007), δηλαδή:

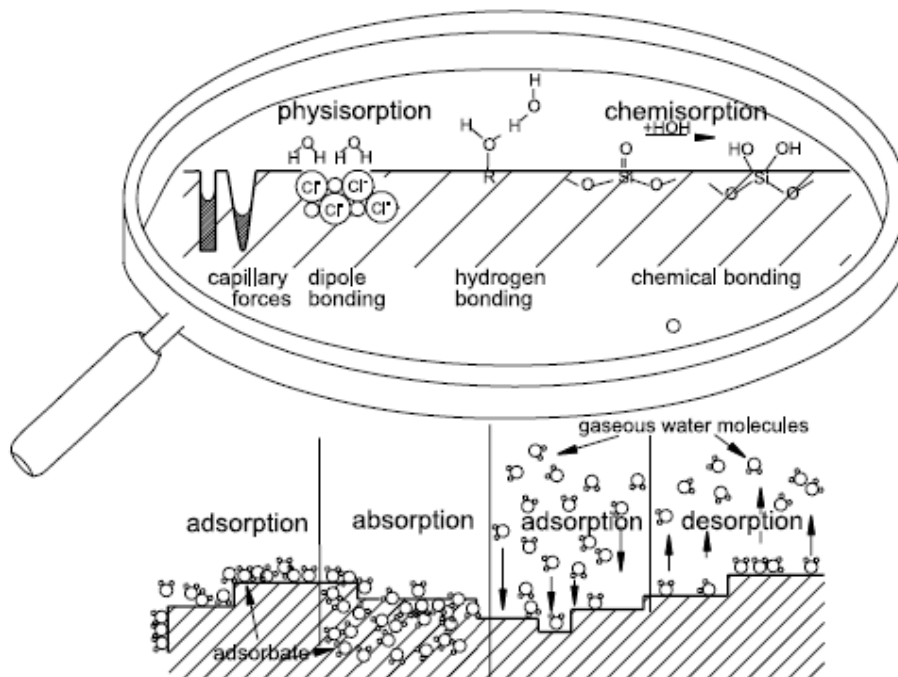
$$a_w = p / p_w = \Sigma Y \% / 100 \quad \text{Εξ. 18}$$

Από το δεύτερο ορισμό, γίνεται αντιληπτό, ότι η μέγιστη τιμή a_w που μπορεί να έχει ένα τρόφιμο είναι η τάση ατμών του νερού του περιβάλλοντός του, δεδομένο πολύ σημαντικό για την μακροχρόνια αποθήκευσή του (Blahovec, 2004). Από τη στιγμή που το τρόφιμο είναι σε ισορροπία με τη σχετική υγρασία του περιβάλλοντος που το περικλείει, δεν προσλαμβάνει ούτε χάνει υγρασία με το χρόνο. Ωστόσο, μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία λαμβάνουν χώρα φαινόμενα μεταφοράς των μορίων του νερού (ρόφησης-sorption) είτε (α) από το εσωτερικό της μάζας του τροφίμου προς την επιφάνεια ή το αντίστροφο (τριχοειδή αγωγή, διάχυση-diffusion) είτε (β) από την επιφάνεια του τροφίμου προς το περιβάλλον ή αντίστροφα (εκρόφηση-desorption, προσρόφηση-adsorption). Ωστόσο, ο ρυθμός με τον οποίο αυτά τα φαινόμενα λαμβάνουν χώρα καθορίζεται από τα φυσικο-χημικά χαρακτηριστικά της

επιφάνειας του τροφίμου (π.χ. πορώδες). Τα φαινόμενα αυτά μεταφοράς σε συνάρτηση με τις διάφορες μορφές του νερού απεικονίζονται στο Σχήμα 67.

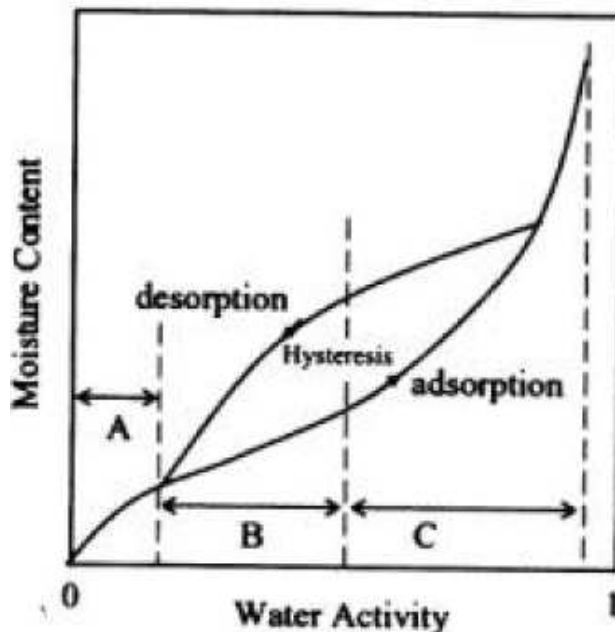
4.1.7.2. Ισόθερμες καμπύλες υγρασίας

Ο χρόνος ζωής ενός προϊόντος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες (θερμοκρασία, pH, σύνθεση της ατμόσφαιρας αποθήκευσης, υγρασία), αλλά είναι εμφανές από τα παραπάνω, ότι η a_w είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας, διότι ελέγχει τις βασικές διεργασίες αλλοίωσης: την ενζυμική και μικροβιακή δράση. Αυτός είναι ο λόγος που η σχέση της περιεκτικότητας της υγρασίας και της a_w πρέπει να είναι γνωστή σε διάφορες θερμοκρασίες, διότι η θερμοκρασία επιδρά στην τιμή της a_w . Η θερμοδυναμική σχέση μεταξύ της περιεχόμενης υγρασίας και της ενεργότητας του νερού σε ένα προϊόν σε σταθερή θερμοκρασία και πίεση απεικονίζεται με τις ισόθερμες καμπύλες υγρασίας (water sorption isotherms) (Γιαννιώτης, 2007). Στο Σχήμα 68 απεικονίζεται μια τυπική ισόθερμη καμπύλη υγρασίας, η οποία συναντάται στα τρόφιμα.



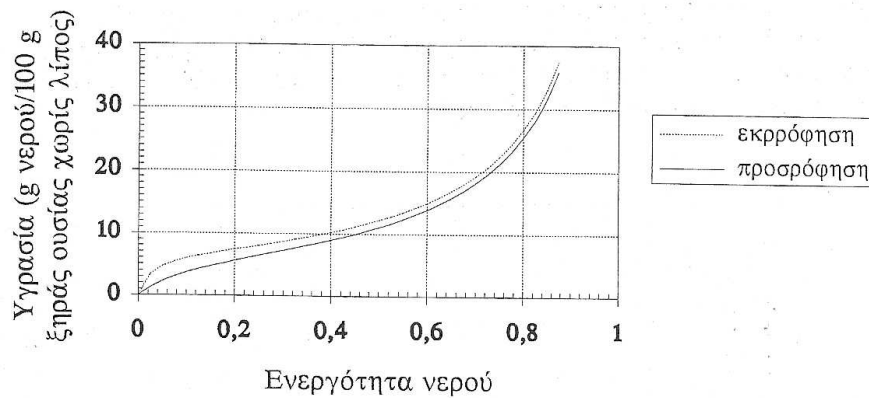
Σχήμα 67. Μορφές δέσμευσης των μορίων του νερού στην επιφάνεια των τροφίμων και τα αντίστοιχα φαινόμενα ρόφησης (Figura & Teixeira, 2007).

Στην ισόθερμη καμπύλη υγρασίας διακρίνονται τρεις διαφορετικές περιοχές: A, B, C (Σχήμα 68). Η περιοχή A ($a_w < 0.25$) αντιπροσωπεύει το ισχυρά δεσμευμένο νερό στα υδρόφιλα πολικά συστατικά του τροφίμου, με υψηλή ενθαλπία εξάτμισης (Πίνακας 19) και το οποίο θεωρείται ότι καλύπτει τις κύριες θέσεις προσρόφησης με μία μόνο στιβάδα μορίων (ένα μόριο νερού ανά θέση προσρόφησης), γνωστό και ως υγρασία μονοστιβάδας (monolayer) (Yanniotis & Blahovec, 2009). Το νερό της περιοχής B ($0.25 < a_w < 0.75$), αντιστοιχεί στο λιγότερα δεσμευμένο νερό, στο οποίο είναι διαλυμένες ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και συμμετέχει σε βιοχημικές αντιδράσεις. Το νερό αυτό είναι σε μορφή πολλαπλών στοιβάδων, πάνω από τη μονοστιβάδα (Yanniotis & Blahovec, 2009). Κατ'αντιστοιχία, η περιοχή C ($a_w > 0.75$) αντιπροσωπεύει το νερό το οποίο βρίσκεται σε μεγάλα τριχοειδή αγγεία ή είναι σε υγρή φάση ελεύθερο και φέρει όλες τις ιδιότητες του καθαρού νερού (Yanniotis & Blahovec, 2009).



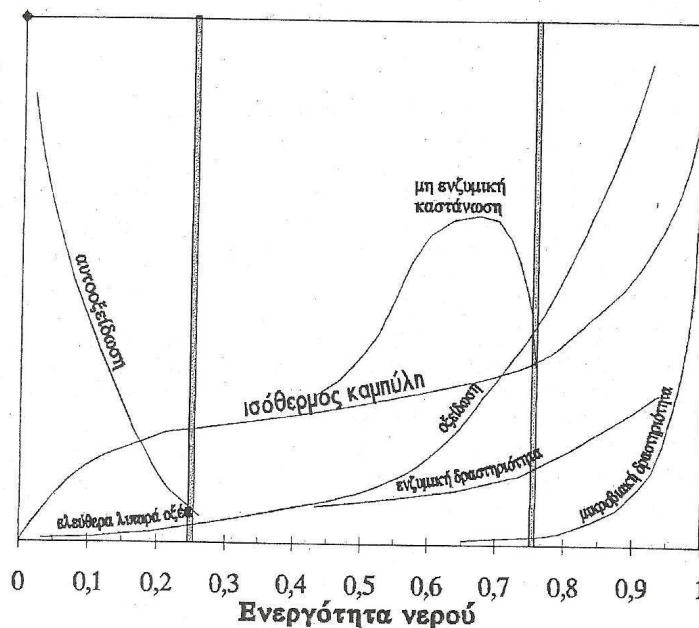
Σχήμα 68. Μια τυπική ισόθερμη καμπύλη υγρασίας των τροφίμων με τις τρεις (A,B,C) χαρακτηριστικές περιοχές. Είναι εμφανές επίσης, το φαινόμενο της υστέρησης μεταξύ της καμπύλης προσρόφησης και εκρόφησης (Sahin & Sumnu, 2006).

Οι ισόθερμες καμπύλες υγρασίας διακρίνονται σε καμπύλες προσρόφησης (adsorption) και καμπύλες εκρόφησης (desorption), ανάλογα, εάν κατά προσδιορισμό της καμπύλης το προϊόν προσλαμβάνει ή αποβάλλει νερό (Γιαννιώτης, 2007). Μεταξύ της καμπύλης προσρόφησης και της καμπύλης εκρόφησης, για την ίδια θερμοκρασία, συνήθως παρατηρείται ένας βρόγχος υστέρησης (hysteresis), με την καμπύλη εκρόφησης να βρίσκεται πάνω από την καμπύλη προσρόφησης, φαινόμενο το οποίο σχετίζεται με τη φύση και την κατάσταση των συστατικών του τροφίμου (Σχήμα 68, 69). Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος είναι ότι για την ίδια υγρασία, το προϊόν θα παρουσιάζει διαφορετική ενεργότητα νερού, ανάλογα εάν έχει αποκτήσει τη συγκεκριμένη υγρασία προσλαμβάνοντας ή αποβάλλοντας υγρασία, δεδομένο με ιδιαίτερη σημασία για τη συντήρηση των τροφίμων. Η υστέρηση συνήθως μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Παρακάτω, φαίνονται οι καμπύλες προσρόφησης – εκρόφησης και ο βρόγχος υστέρησης (Σχήμα 69), από μελέτες στο σπέρμα του κελυφωτού φιστικιού Αιγίνης (Yanniotis & Zarboutis, 1996).



Σχήμα 69. Υστέρηση που παρατηρείται στο φιστίκι Αιγίνης (ψίχα) στους 15 °C, (Γιαννιώτης, 2007).

Οι ισόθερμες καμπύλες υγρασίας στα τρόφιμα, αλλά ειδικά στους ξηρούς καρπούς χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό και βελτιστοποίηση των διεργασιών ξήρανσης, αποθήκευσης και συσκευασίας, καθώς και για την εκτίμηση της μικροβιακής και χημικής τους σταθερότητας (Yazdami *et al.*, 2006). Στο Σχήμα 70 απεικονίζεται η επίδραση της a_w στη σχετική ταχύτητα χημικής και ενζυματικής δράσης, καθώς και στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Για τιμές a_w από 0.20 έως 0.40, τα τρόφιμα έχουν τη μεγαλύτερη σταθερότητα, για τιμές $a_w < 0.20$ η αυτοξείδωση των λιπών επιφέρει αλλοίωση του τροφίμου και σε $a_w > 0.40$ αυξάνεται η χημική, ενζυματική και μικροβιακή δραστηριότητα (Γιαννιώτης, 2007). Για τους καρπούς, όπως είναι το κελυφωτό φιστίκι, μία ασφαλής, όσον αφορά τη μικροβιολογική μόλυνση, περιοχή τιμών a_w είναι < 0.7 . Αν και ορισμένοι ξηροφιλικοί μύκητες αναπτύσσονται σε a_w 0.62-0.64, οι μυκοτοξικογόνοι ασπέργιλλοι δεν αναπτύσσονται σε $a_w < 0.79$ (Beuchat, 1978).



Σχήμα 70. Επίδραση της a_w στο ρυθμό των χημικών αντιδράσεων και της μικροβιακής δραστηριότητας (Labuza, 1971).

4.1.7.3. Ταξινόμηση ισόθερων καμπυλών υγρασίας

Η ανάγκη για ταξινόμηση των ισόθερων καμπυλών υγρασίας προήλθε λόγω του μεγάλου αριθμού τους στη βιβλιογραφία, σε διάφορα υλικά και τρόφιμα. Η πρώτη ταξινόμηση έγινε από τους Brunauer *et al.* (1940) σε πέντε τύπους, με βάση το σχήμα και τις διεργασίες που περιγράφουν (Σχήμα 71), και οι οποίοι διακρίνονται σε (Blahovec & Yanniotis, 2009; Andrade *et al.*, 2011):

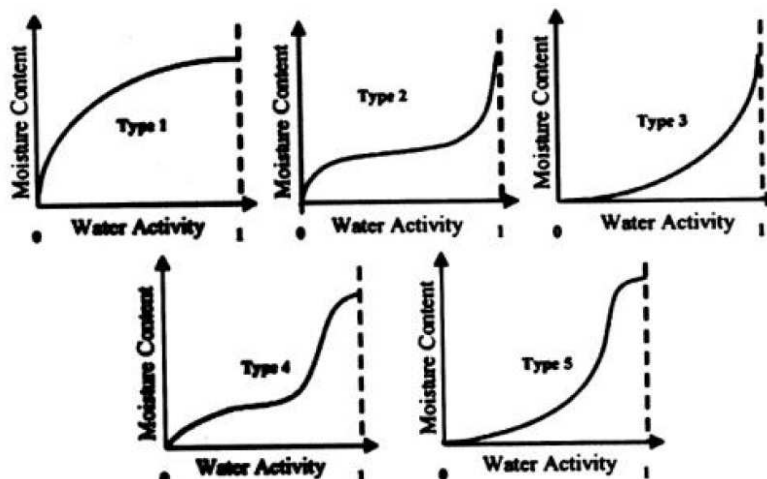
Τύπος I – Langmuir: εμφανίζεται μια χαρακτηριστική αύξηση της a_w , η οποία σχετίζεται με την αύξηση της υγρασίας, τυπική έκφραση της διεργασίας πλήρωσης της υγρασίας μονοστοιβάδας στην εσωτερική επιφάνεια ενός υλικού.

Τύπος II – Σιγμοειδής: η καμπύλη εμφανίζεται με τα κοίλα προς τα επάνω, ενώ είναι χαρακτηριστικό το σημείο καμπής. Λαμβάνει υπ' όψιν την ύπαρξη του νερού σε πολλαπλές στοιβάδες και είναι η τυπική μορφή καμπύλης των περισσοτέρων τροφίμων.

Τύπος III – Flory-Huggings: δεν απαντάται συχνά και αφορά την περίπτωση υλικού που λειτουργεί ως διαλύτης ή πλαστικοποιητής π.χ. γλυκερόλη σε θερμοκρασία υψηλότερη από τη θερμοκρασία ναλώδους μετάπτωσης ή τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα.

Τύπος IV: περιγράφει την προσρόφηση ενός διογκούμενου υδρόφιλου στερεού, μέχρι την επίτευξη του μέγιστου σημείου ενυδάτωσης.

Τύπος V- Brunauer-Emmett-Teller: γνωστή ως ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης των πολλαπλών στοιβάδων και σχετίζεται με τις ισόθερμες καμπύλες των τύπων II και III.



Σχήμα 71. Τύποι ισόθερων καμπυλών (Andrade *et al.*, 2011)

Οι πιο συχνά απαντώμενοι τύποι ισόθερμων καμπυλών υγρασίας στα τρόφιμα είναι οι τύποι II και III (Andrade *et al.*, 2011). Οι πιο σύνθετοι τύποι IV και V απαντώνται συχνά στην περίπτωση τριχοειδούς συμπύκνωσης, όπου η ρόφιση εξαρτάται από την κατανομή της γεωμετρίας των πόρων (Blahovec & Yanniotis, 2009).

Στην εργασία των Blahovec & Yanniotis (2009), προτείνεται ένα νέο σύστημα ταξινόμησης των ισόθερμων καμπυλών υγρασίας για γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα. Το μοντέλο αυτό εμπεριέχει τέσσερις παραμέτρους και βασίζεται στην αρχή της ρόφισης – διάλυσης κατά θέσεις, υποθέτοντας ότι ένα μέρος του νερού είναι προσροφημένο σε μη-διαλυτά στερεά σχηματίζοντας μία μονοστοιβάδα (σύμφωνα με το μοντέλο του Langmuir), ενώ το υπόλοιπο νερό είναι λιγότερο δεσμευμένο και είναι διαθέσιμο ως διαλύτης για τα διαλυτά στερεά συστατικά του τροφίμου (Yanniotis & Blahovec, 2009). Αυτό το σύστημα περιλαμβάνει τέσσερις χαρακτηριστικές παραμέτρους D_{10} , R_{fi} , a_{wm} και X_4 , οι οποίες προσδιορίζονται από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων με μη-γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης και την επίλυση ενός συστήματος τεσσάρων εξισώσεων (Yanniotis & Blahovec, 2009). Βάσει των τιμών των παραμέτρων αυτών, οι ισόθερμες καμπύλες υγρασίας ταξινομούνται σε τρεις τύπους σύμφωνα με τον Πίνακα 20.

4.1.7.4. Μέθοδοι προσδιορισμού της a_w – Μαθηματικά μοντέλα

Οι κυριότερες εργαστηριακές μέθοδοι προσδιορισμού των ισόθερμων καμπυλών υγρασίας διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, τις μανομετρικές, τις υγρομετρικές και τις βαρυμετρικές. Οι λεπτομέρειες για την πορεία και εφαρμογή των μεθόδων αυτών είναι διαθέσιμες στη διεθνή βιβλιογραφία (Figura & Teixeira, 2007). Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος COST-90 για τη μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων των τροφίμων, τυποποιήθηκε η βαρυμετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό των ισόθερμων καμπυλών, με τη συνεργασία 32 ευρωπαϊκών εργαστηρίων.

Πολλές είναι επίσης, τα θεωρητικά, εμπειρικά ή ημι-εμπειρικά μοντέλα που έχουν προταθεί, σε μια προσπάθεια να εκφραστεί μαθηματικά η σχέση της a_w με την περιεχόμενη υγρασία. Τα μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί είναι γραμμικά, μη-γραμμικά, μοντέλα παλινδρόμησης και περιλαμβάνουν συνήθως δύο, τρεις ή τέσσερις παραμέτρους, οι οποίες ερμηνεύουν κάθε μία από τις τρεις περιοχές της ισόθερμης καμπύλης ρόφισης. Σε πολλές περιπτώσεις όμως, το μοντέλο που είναι κατάλληλο για ένα τρόφιμο μπορεί να μην είναι για

Πίνακας 20. Τα βασικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων ισόθερμων καμπυλών ρόφησης, με βάση το μοντέλο ταξινόμησης των Yanniotis & Blahovec (2009).

Parameter	D_{10}	R_{fi}	α_{wm}	X_4
Type				
I Langmuir-like isotherms	positive	positive	-	Less than X_2/X_1
II Sigmoid isotherms More to the Langmuir-like	positive	negative	(0,1)	negative
More to the solution-like	positive	negative	(0,1)	positive
III Solution-like isotherms	negative	positive	-	Higher than X_2/X_1

κάποιο άλλο και επιπλέον, να μην περιγράφει με ακρίβεια όλο το εύρος τιμών της a_w (Andrade *et al.*, 2011). Αυτός ο τελευταίος περιορισμός οδήγησε στη δημιουργία μεθόδων παρεμβολής (interpolation) και παρέκτασης (extrapolation) των πειραματικών δεδομένων της a_w από μια ουσία αναφοράς σε μια άλλη (Yanniotis, 1994). Στον Πίνακα 21 περιγράφονται τα μαθηματικά μοντέλα δύο (α), τριών (β) και τεσσάρων (γ)-παραμέτρων, τα οποία έχουν αναπτυχθεί για να περιγράψουν τη σχέση a_w και περιεκτικότητας σε υγρασία.

Στην περίπτωση των τροφίμων έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως η εξίσωση GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer), η οποία εμφανίζει καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα, για τιμές a_w έως 0.90, αλλά υποεκτιμά την υγρασία σε υψηλότερες τιμές ενεργότητας νερού (Γιαννιώτης, 2007; Andrade *et al.*, 2011). Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει τρεις παραμέτρους ($X_{w,a}$, C, k) και αποτελεί μία γενίκευση της εξίσωσης BET (Brunauer-Emmet-Teller), εισάγοντας τη σταθερά k, με τιμές από 0-1 και η οποία εκφράζει την ενθαλπία προσρόφησης της πολυστοιβάδας, σε σχέση με το καθαρό νερό. Η άλλη ενεργειακή σταθερά C εκφράζει αντίστοιχα την ενθαλπία προσρόφησης της πολυστοιβάδας σε σχέση με τη μονοστοιβάδα. Έχει αποδειχθεί, ότι οι σιγμοειδείς ισόθερμες καμπύλες ρόφησης με σημείο καμπής έχουν τιμή $C > 2$, ενώ όταν $1 < C < 2$, τότε η ισόθερμη καμπύλη είναι τύπου III, σύμφωνα με την ταξινόμηση Brunauer (Blahovec, 2004).

Πίνακας 21. Τα μαθηματικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για την περιγραφή των ισόθερμων καμπυλών υγρασίας χρησιμοποιώντας (α) δύο (β) τρεις και (γ) τέσσερις παραμέτρους (Figura & Teixeira, 2007).

FREUNDLICH (1906)	$x_W = A \cdot a_W^B$
LANGMUIR (1916)	$x_W = x_{\max} \left(\frac{a_W}{a_W + B} \right)$
SMITH (1947)	$x_W = A + B \cdot \ln(1 - a_W)$
OSWIN (1946)	$x_W = A \left(\frac{a_W}{1 - a_W} \right)^B$
HENDERSON (1952)	$x_W = \left[\frac{\ln(1 - a_W)}{-A} \right]^{\frac{1}{B}}$
BRUNAUER, EMMET, TELLER (1938) (BET)	$x_W = \frac{x_{W,a} \cdot C \cdot a_W}{(1 - a_W)(1 + (C - 1)a_W)}$ $\frac{1}{x_W} \cdot \frac{a_W}{1 - a_W} = \frac{1}{x_{W,a} \cdot C} + \frac{C - 1}{x_{W,a} \cdot C} \cdot a_W$
HALSEY (1948)	$x_W = \left[-\frac{A}{\ln a_W} \right]^{\frac{1}{B}}$
CHUNG, PFOST (1967)	$x_W = -\frac{1}{B} \cdot \ln \left[-\frac{\ln a_W}{A} \right]$
IGLESIAS, CHIRIFE (1978)	$\ln \left[x_W + (x_W^2 + x_{0.5W})^{\frac{1}{2}} \right] = A \cdot a_W + B$
LEWICKI (2000)	$x_W = A \cdot \left[\frac{1}{a_W} - 1 \right]^{B-1} - 1$
(α)	
Cubic model	$x_W = p_1 + p_2 \cdot a_W + p_3 \cdot a_W^2 + p_4 \cdot a_W^3$
GAB: GUGGENHEIM (1966), ANDERSEN (1946), DE BOER (1953)	$x_W = \frac{x_{W,a} \cdot C \cdot k \cdot a_W}{(1 - k \cdot a_W)(1 + (C - 1) \cdot k \cdot a_W)}$
expressed by BIZOT as:	$\frac{a_W}{x_W} = \alpha \cdot a_W^2 + \beta \cdot a_W + \gamma$
(β)	
PELEG (1993)	$x_W = A \cdot a_W^C + B \cdot a_W^D$
ISSE (1993)	$\ln x_W = A \cdot \ln \frac{a_W}{1 - a_W} + B$
(γ)	

Όπου: a_w : ενεργότητα νερού, x_w : περιεκτικότητα σε υγρασία (ξ.β.) σε kg/kg ξ.ο., $x_{w,a}$: υγρασία μονοστοιβάδας (ξ.β.) σε kg/kg ξ.ο., $X_{0.5m}$: περιεκτικότητα σε υγρασία (ξ.β.) σε kg/kg ξ.ο., A,B,C,D: σταθερές

Τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί ένα πιο σύνθετο μοντέλο με περισσότερες παραμέτρους από τους Blahovec & Yanniotis (2008), σε μια προσπάθεια ανάπτυξης μιας εξίσωσης, η οποία να δίνει καλή προσαρμογή στις υψηλές τιμές της a_w . Η επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των παραμέτρων που εισάγονται στο μοντέλο, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων (Blahovec & Yanniotis, 2008). Μία άλλη εξίσωση που αναπτύχθηκε από τους Blahovec & Yanniotis περιλαμβάνει τέσσερις παραμέτρους και δίδεται από την παρακάτω σχέση (Blahovec & Yanniotis, 2009):

$$\frac{a_w}{W} = X_1 + X'_2 a_w - X'_3 \frac{a_w^2}{1 + X_4 a_w} \quad \text{Εξ. 19}$$

όπου:

a_w : η τιμή της ενεργότητας νερού

W : % υγρασία

Όλες οι υπόλοιπες παράμετροι της εξίσωσης 19 (X_1 , X'_2 , X'_3 , X_4), προκύπτουν από μαθηματικούς τύπους, οι οποίοι περιγράφονται αναλυτικά στην εργασία των Blahovec & Yanniotis (2009).

4.1.8. Στόχοι και αντικείμενα της μελέτης

Τα φυσικά χαρακτηριστικά των κελυφωτών φιστικιών έχουν περιγραφεί σε πολλές εργασίες, οι οποίες είναι διαθέσιμες στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν τα χαρακτηριστικά των ποικιλιών Kerman (Hsu *et al.*, 1991; Pearson *et al.*, 1994), Ohadi, Akbari, Badami, Kalle-Ghuchi, Momtaz (Kashaninejad *et al.*, 2006; Razavi *et al.*, 2007a; 2007b; 2007c), Siirt, Bianca (Bellomo & Fallico, 2007) και Kirmizi (Polat *et al.*, 2007). Ορισμένα φυσικο-χημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας «Αιγίνης» περιγράφονται στην εργασία των Tsantili *et al.* (2010), στο πλαίσιο αξιολόγησης της δυνατότητας εγκατάστασης και καλλιέργειας νέων ποικιλιών φιστικιάς, κατάλληλων για τις εδαφο-κλιματικές συνθήκες της Ελλάδας.

Στα προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής, αναφέρεται αναλυτικά η συσχέτιση των ελαττωματικών – ποιοτικά υποβαθμισμένων φιστικιών με την παρουσία αφλατοξίνης και έχουν περιγραφεί με λεπτομέρεια, όλοι οι τύποι και κατηγορίες ελαττωμάτων που εμφανίζονται (§3.1.1). Επίσης έχει τεκμηριωθεί η σκοπιμότητα ανάπτυξης μιας μεθόδου διαλογής, κατάλληλης να διαχωρίζει τα μολυσμένα με αφλατοξίνη φιστικά, αλλά και τα

ελαττωματικά, τα οποία χαρακτηρίζονται «ύποπτα» για παρουσία αφλατοξίνης και πρέπει να διαχωρίζονται τόσο για ποιοτικούς λόγους όσο και για λόγους ασφάλειας. Ο σχεδιασμός ενός τέτοιου συστήματος προϋποθέτει προσδιορισμό του εύρους τιμών των φυσικών ιδιοτήτων στα υγιή, κανονικά προϊόντα, που φέρουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας. Στη συνέχεια, προσδιορίζοντας τις αποκλίσεις των χαρακτηριστικών αυτών στους ελαττωματικούς καρπούς, αναγνωρίζεται το κρίσιμο χαρακτηριστικό ή κάποιος συνδυασμός τους, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των ελαττωματικών προϊόντων. Όπως έχει αναφερθεί και στην § 1.4.2.2, η πλειοψηφία των μηχανημάτων διαλογής που έχουν αναπτυχθεί, βασίζονται στην ανίχνευση μακροσκοπικών διαφορών (π.χ. χρώμα). Ωστόσο, τα διαθέσιμα στοιχεία για την ελληνική ποικιλία «Αιγίνης» δεν είναι επαρκή, ώστε να καθοριστούν τα όρια αποδοχής ή αντίστοιχα απόκλισης της κάθε φυσικής ιδιότητας από το κανονικό. Επιπροσθέτως, δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για ορισμένες φυσικές ιδιότητες π.χ. θερμικές και μηχανικές ιδιότητες, ούτε έχει διερευνηθεί η επίδραση της υγρασίας στις φυσικές ιδιότητες του προϊόντος, δεδομένου ότι αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα που επηρεάζει τις τιμές τους. Συνεπώς, τα αντικείμενα της μελέτης στο παρόν κεφάλαιο είναι:

- Να κατασκευαστεί η ισόθεμη καμπύλη προσρόφησης για το κελυφωτό φιστίκι (ολόκληρος ο καρπός, χωρίς της φλούδα).
- Να προσδιοριστούν οι τιμές των φυσικών χαρακτηριστικών: διαστάσεις, επιφάνεια, μάζα, όγκος, πυκνότητα, χρώμα, θερμική αγωγιμότητα και υφή, σε κανονικούς καρπούς, συναρτήσει της περιεχόμενης υγρασίας.
- Να υπολογιστούν τα φυσικά χαρακτηριστικά: διαστάσεις, σχήμα (δείκτης μήκος/ύψος, σφαιρικότητα), μάζα, όγκος, πυκνότητα, χρώμα, σε κανονικά και ελαττωματικά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης» και να καθοριστούν τα αποδεκτά όρια τιμών.
- Να αναγνωριστούν τα φυσικά χαρακτηριστικά, τα οποία θα μπορούσαν να τεθούν ως κριτήρια (εργαλεία) διαλογής των ελαττωματικών καρπών.

4.2. Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1. Δειγματοληψία και χειρισμός των καρπών – Πειραματικός σχεδιασμός

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 24 δείγματα αποξηραμένων (χωρίς φλούδα) κελυφωτών φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης». Τα δείγματα ήταν ομαδοποιημένα σε δύο κατηγορίες: 1) κανονικά, τα οποία έφεραν τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας (**S: Standard**) και 2) ελαττωματικά φιστίκια (**D: Defected**) (Πίνακας 22). Τα δείγματα της ομάδας S (κανονικά) προήλθαν από διάφορες περιοχές καλλιέργειας του κελυφωτού φιστικιού στην Ελλάδα και συγκομίστηκαν από το τελευταίο δεκαήμερο του Αυγούστου, έως το πρώτο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου, κατά τα έτη 2009 έως 2011 (Σχήμα 72).

Τα δείγματα της ομάδας D (ελαττωματικά φιστίκια) προήλθαν από διάφορες τοπικές μονάδες επεξεργασίας κελυφωτού φιστικιού, κατά το στάδιο της απόρριψης, μετά τη χειροδιαλογή. Τα δείγματα αυτά, κατά την άφιξή τους στο εργαστήριο, χωρίστηκαν σε πέντε περαιτέρω υπο-κατηγορίες, ανάλογα με τον τύπο του ελαττώματος που έφεραν (Σχήμα 73), και οι οποίες ονομαστικά αναφέρονται ως, **DK: καρποί με κίτρινο μεταχρωματισμό στο κέλυφος**, **DE: καρποί με σκούρο μεταχρωματισμό στο κέλυφος**, **DM: μικροί-παραμορφωμένοι καρποί**, **DT: καρποί με εμφανή εντομολογική οπή στο κέλυφος** και **DF: καρποί με προσκολλημένο τμήμα της φλούδας στο κέλυφος**. Το τελικό βάρος κάθε δείγματος για όλες τις ομάδες ήταν 0.5 κιλά και τοποθετήθηκαν σε ερμητικά κλειστές πλαστικές σακούλες στο ψυγείο μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας και ανάλυσης.

Στον Πίνακα 22 δίδονται όλες οι πληροφορίες σχετικά με την προέλευση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των φυσικών χαρακτηριστικών και στον Πίνακα 23 αναφέρονται οι φυσικές ιδιότητες, οι οποίες προσδιορίστηκαν σε κάθε δείγμα, σύμφωνα με το πειραματικό σχέδιο. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 23, στα κανονικά δείγματα της ομάδας S, προσδιορίστηκαν το μέγεθος, το βάρος, ο όγκος, η πυκνότητα, το χρώμα, η υγρασία, ο συντελεστής θερμικής αγωγιμότητας και υφή, ώστε να περιγραφούν τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας. Ωστόσο, στις επιμέρους κατηγορίες των ελαττωματικών καρπών, μετρήθηκαν εκείνες μόνο οι παράμετροι στις οποίες αναμένονταν αποκλίσεις, με βάση την μακροσκοπική εικόνα των καρπών. Επίσης, όλες οι ιδιότητες εκφράστηκαν συναρτήσει της υγρασίας, σε καρπούς οι οποίοι είχαν ισορροπήσει σε περιβάλλον γνωστής σχετικής υγρασίας και σταθερής θερμοκρασίας, όπως περιγράφεται παρακάτω.

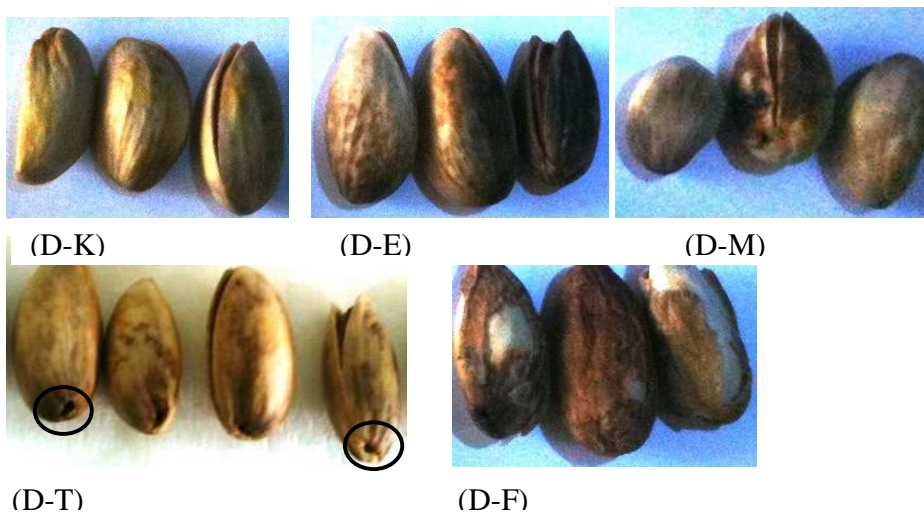
Πίνακας 22. Περιγραφή των δειγμάτων αποξηραμένων κελυφωτών φιστικιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των φυσικών χαρακτηριστικών.

<i>Ομάδα Δείγματος</i>		<i>Ταυτότητα Δείγματος*</i>	<i>Προέλευση</i>	<i>Έτος - Περίοδος συγκομιδής</i>	<i>Μέθοδος ξήρανσης</i>
S: Κανονικά (Standard)		S.1-A	Αίγινα	2009-κανονική	φυσική
		S.2-A	Αίγινα	2010- κανονική	ξηραντήριο
		S.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
		S.4-K	Καπανδρίτι	2010- κανονική	φυσική
		S.5-Π	Πόρος	2010- κανονική	φυσική
		S.6-M	Μάκρη	2010- κανονική	φυσική
		S.7-E	Εύβοια	2010-πρώιμη	φυσική
		S.8-E	Εύβοια	2010-όψιμη	φυσική
		S.9-B	Βοτανικός	2010- κανονική	φυσική
D: Ελαττω- ματικά (Defected)	Κίτρινος μεταχρωματισμός στο κέλυφος	DK.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
		DK.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
		DK.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Σκούρος μεταχρωματισμός στο κέλυφος	DE.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
		DE.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
		DE.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Μικροί παραμορφωμένοι καρποί	DM.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
		DM.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
		DM.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Εντομολογική οπή εμφανής στο κέλυφος	DT.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
		DT.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
		DT.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική
	Προσκολλημένο τμήμα της φλούδας στο κέλυφος	DF.1-A	Αίγινα	2011- κανονική	ξηραντήριο
		DF.2-A	Αίγινα	2011- κανονική	φυσική
		DF.3-A	Αίγινα	2010- κανονική	φυσική

* Το κεφαλαίο γράμμα δίπλα στον αριθμό του δείγματος προσδιορίζει την περιοχή προέλευσης.



Σχήμα 72: Τα δείγματα της ομάδας των κανονικών καρπών S, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των φυσικών ιδιοτήτων.



Σχήμα 73: Οι πέντε υπο-κατηγορίες δειγμάτων της ομάδας των ελαττωματικών καρπών D. Αυτές οι κατηγορίες είναι και οι πιο συχνοί τύποι ελαττωμάτων που απαντώνται κατά την επεξεργασία κελυφωτού φυστικιού στην Ελλάδα.

Πίνακας 23. Κατάλογος των φυσικών χαρακτηριστικών που προσδιορίστηκαν σε κάθε ομάδα και υποκατηγορία δειγμάτων.

Ομάδα Δείγματος	Ταυτότητα Δείγματος*	Φυσικές ιδιότητες							
		μέγεθος	βάρος	όγκος	πυκνότητα	χρώμα	υγρασία	k*	υφή
S: Κανονικά	S.1-A	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.2-A	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.3-A	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.4-K	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.5-Π	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.6-M	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.7-E	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.8-E	√	√	√	√	√	√	√	√
	S.9-B	√	√	√	√	√	√	√	√
D: Ελαττωματικά	DK.1-A					√	√		
	DK.2-A					√	√		
	DK.3-A					√	√		
	DE.1-A					√	√		
	DE.2-A					√	√		
	DE.3-A					√	√		
	DM.1-A	√	√	√	√		√		
	DM.2-A	√	√	√	√		√		
	DM.3-A	√	√	√	√		√		
	DT.1-A		√	√	√		√		
	DT.2-A		√	√	√		√		
	DT.3-A		√	√	√		√		
	DF.1-A		√	√	√	√	√		
	DF.2-A		√	√	√	√	√		
	DF.3-A		√	√	√	√	√		

* k: θερμική αγωγιμότητα

4.2.2. Προσδιορισμός ισόθερμης καμπύλης προσρόφησης

Η ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης ολόκληρου του καρπού (κέλυφος και σπέρμα) προσδιορίστηκε στους 25°C σε κανονικά φιστίκια, ακολουθώντας τη βαρυμετρική μέθοδο, η οποία αναπτύχθηκε στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος ECSTRP (European Cooperation in Scientific and Technological Research Project) COST-90 (Wolf *et al.*, 1984).

Οκτώ δείγματα των 100 καρπών το καθένα (βάρους 100g περίπου), τοποθετήκαν σε υφασμάτινα σακουλάκια φτιαγμένα από τούλι και αποξηράνθηκαν σε φούρνο κενού (Bioblock, 45001) στους 70°C (30 in Hg) για 12 ώρες. Μετά την ξήρανση, κάθε δείγμα ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας (Sartorius, B120S) και τοποθετήθηκε σε γυάλινα βάζα του 1 λίτρου με στόμιο και αεροστεγές κλείστρο, τα οποία περιείχαν στον πυθμένα τα κορεσμένα διαλύματα αλάτων για τη δημιουργία περιβάλλοντος συγκεκριμένης σταθερής σχετικής υγρασίας. Οκτώ διαλύματα κορεσμένων αλάτων χρησιμοποιήθηκαν (LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NaBr, KI, NaCl, (NH₄)₂SO₄, KCl) για τη δημιουργία διαφορετικών τιμών ενεργότητας νερού (a_w), οι οποίες σύμφωνα με την εργασία του Greenspan (1977) αντιστοιχούν σε 0.1129, 0.3278, 0.5289, 0.5757, 0.6886, 0.7529, 0.8099 και 0.8434, στους 25°C. Μέσα στα γυάλινα βάζα ισορροπίας, τα δείγματα ήταν τοποθετημένα επάνω σε μία πλαστική βάση, ώστε να μην έρχονται σε επαφή με το άλας. Στη συνέχεια, όλα τα βάζα τοποθετήθηκαν σε θερμοστατούμενο θάλαμο (Sanyo, MIR-153) σε σταθερή θερμοκρασία (25°C) για να ισορροπήσουν. Τα κορεσμένα διαλύματα αλάτων είχαν προετοιμαστεί σύμφωνα με τις οδηγίες της μελέτης COST-90 (Wolf *et al.*, 1984). Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι μία μικρή ποσότητα θυμόλης (Merck) τοποθετήθηκε μέσα σε κάθε βάζο ισορροπίας ώστε να αποφευχθεί ανάπτυξη μούχλας, ιδιαίτερα στα δείγματα με τις υψηλές τιμές a_w .

Τα δείγματα ισορρόπησαν σε 40-50 ημέρες (ο μεγαλύτερος χρόνος αφορά τα δείγματα που παρέμειναν για ισορροπία στις υψηλές τιμές a_w), όπως προσδιορίστηκε από διαδοχικές μετρήσεις του βάρους τους, ανά τρεις έως πέντε ημέρες, μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος (η διαφορά βάρους μεταξύ τριών διαδοχικών μετρήσεων να είναι <1mg). Από τη διαφορά του τελικού σταθερού βάρους ισορροπίας με το αρχικό υπολογίστηκε η υγρασία που προσροφήθηκε. Στη συνέχεια, η τιμή της υγρασίας απεικονίστηκε συναρτήσει της τιμής a_w , για τον σχεδιασμό της καμπύλης προσρόφησης με βάση τα πειραματικά δεδομένα.

Για τον σχεδιασμό της θεωρητικής καμπύλης προσρόφησης προσδιορίστηκαν οι τιμές των παραμέτρων X_m , k και C της εξίσωσης GAB, βάσει των πειραματικών δεδομένων, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Microsoft Excel 2003. Οι τρεις αυτές παράμετροι υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την παραβολική μορφή της εξίσωσης GAB, όπως περιγράφεται στην εργασία των Blahovec & Yanniotis (2008). Υπολογίστηκε επίσης, ο μέσος όρος της σχετικής % απόκλισης (E) των πειραματικών από τις θεωρητικές τιμές

υγρασίας (όπως προσδιορίστηκαν από το μοντέλο GAB), ως κριτήριο αξιολόγησης του βαθμού προσαρμοστικότητας του μοντέλου, όπως ορίζεται στη μελέτη των Yanniotis & Zarmboutis (1996), σύμφωνα με τον τύπο:

$$E = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|X_{e,i} - X_{p,i}|}{X_{e,i}} \quad \text{Εξ. 20}$$

όπου:

$X_{e,i}$: πειραματική τιμή της % υγρασίας

$X_{p,i}$: θεωρητική τιμή της % υγρασίας, βάσει της εξίσωσης GAB

N: ο αριθμός των πειραματικών σημείων

Στη συνέχεια, ακολούθησε περαιτέρω επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων προσρόφησης, σε ολόκληρο το εύρος των τιμών της a_w (0-1) με ένα μοντέλο τεσσάρων παραμέτρων, χρησιμοποιώντας τον τύπο των Blahovec & Yanniotis (2009), ο οποίος δίδεται από την εξίσωση 19 (§4.1.7.4). Για την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων με μη-γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης και την επίλυση του συστήματος τεσσάρων εξισώσεων, για τον υπολογισμό των χαρακτηριστικών παραμέτρων D_{10} , R_{fi} , a_{wm} και X_4 χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Staatgraphics XV.II και το λογισμικό Derive 6, αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων αυτών πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ταξινόμηση της ισόθερμης καμπύλης προσρόφησης, όπως περιγράφεται με λεπτομέρεια στη μελέτη Yanniotis & Blahovec (2009).

4.2.3. Μέτρηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών

Για τον προσδιορισμό των διαστάσεων ολόκληρου του καρπού μετρήθηκαν οι τρεις διαστάσεις του (μήκος, πλάτος, ύψος) με παχύμετρο χειρός (Helios, 0-25mm) με ακρίβεια 0.01mm, σε 60 καρπούς από κάθε δείγμα. Στο Σχήμα 74 απεικονίζεται ο τρόπος που έγινε η μέτρηση. Το μήκος ορίστηκε ως η απόσταση μεταξύ του χαλαζιακού άκρου (μύτη) και του σημείου πρόσφυσης με τον ποδίσκο (βάση), πλάτος, ως η μέγιστη διάμετρος και ύψος, ως η απόσταση από το υψηλότερο στο χαμηλότερο σημείο του καρπού κατά την τοποθέτησή του σε οριζόντια θέση, όπως προτείνεται στις εργασίες των Hsu *et al.*, (1991) και Pearson *et al.*, (1994) (Σχήμα 75).

Για το χαρακτηρισμό του σχήματος, προσδιορίστηκε η σφαιρικότητα του καρπού σύμφωνα με τον τύπο (Razavi *et al.*, 2007a):

$$\Phi = \frac{(LWH)^{1/3}}{L}$$

Εξ. 21

όπου:

L: μήκος (mm), W: πλάτος (mm), H: ύψος (mm)

Ο αριθμητής του πηλίκου της εξίσωσης 18 εκφράζει το γεωμετρικό μέσο των τριών χαρακτηριστικών διαστάσεων (D_g), όπου:

$$D_g = (LWH)^{1/3}$$

Εξ. 22

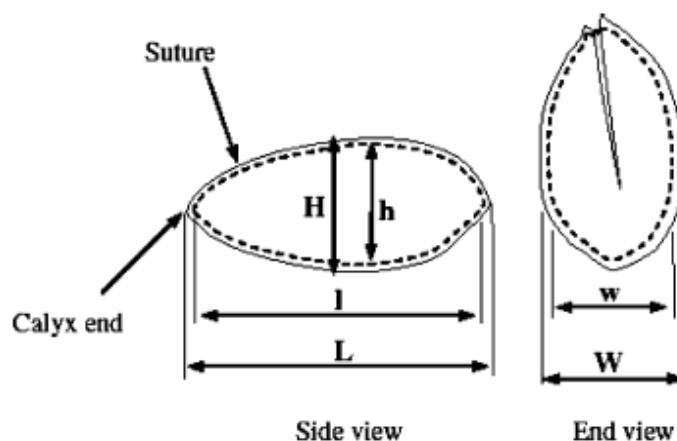
Αντίστοιχα, η επιφάνεια του φιστικιού S (mm^2) προσδιορίστηκε με βάση το D_g , σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$S = \pi D_g^2$$

Εξ. 23



Σχήμα 74. Μέτρηση μήκους, ύψους και πλάτους στα κελυφωτά φιστίκια με παχύμετρο.



Σχήμα 75. Ορισμός διαστάσεων κατά τη μέτρηση των κελυφωτών φιστικιών (Razavi *et al.*, 2007a).

4.2.4. Μέτρηση μάζας, όγκου (V_{app}), πυκνότητας (ρ_{app})

Η μάζα του κάθε καρπού μετρήθηκε σε δείγμα 60 καρπών σε ζυγό ακριβείας (Sartorius B 120 S) με ακρίβεια 0.0001g. Για τον υπολογισμό του φαινόμενου όγκου και της πυκνότητας των κελυφωτών φιστικιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκτόπισης στερεού με τη χρήση μικρών γυάλινων σφαιριδίων, διαμέτρου 2 mm (Hwang & Hayakawa, 1980). Τα γυάλινα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν σε ορθογώνιο περιέκτη γνωστού όγκου, ο οποίος είχε προσδιοριστεί από τις διαστάσεις του, μέχρι πλήρωσης (με τη βοήθεια ενός χάρακα). Σε πρώτη φάση, υπολογίστηκε η πυκνότητα των σφαιριδίων (d_{beads}) από το πηλίκο της μάζας τους, όπως προσδιορίστηκε σε ζυγό ακριβείας αφαιρώντας το βάρος του περιέκτη ($m_{container}$) σε τρεις διαδοχικές μετρήσεις, προς τον όγκο τους, ο οποίος ισοδυναμεί με τον όγκο του περιέκτη ($V_{container}$). Στη συνέχεια, κάποια ποσότητα των γυάλινων σφαιριδίων αφαιρέθηκε από τον περιέκτη, έτσι ώστε ο καρπός του φιστικιού να τοποθετηθεί περίπου στο γεωμετρικό κέντρο του περιέκτη, σε οριζόντια θέση. Ακολούθησε πλήρωση του περιέκτη με τα γυάλινα σφαιρίδια, μέχρι πλήρωσης και μετρήθηκε το συνολικό τους βάρος (m_{total}) σε ζυγό ακριβείας, με τρεις διαδοχικές μετρήσεις. Ο όγκος του καρπού (V_{nut}) ισοδυναμεί με τον όγκο των σφαιριδίων που εκτοπίστηκαν και ο οποίος υπολογίστηκε από τις παρακάτω σχέσεις:

$$V_{nut} = V_{container} - V_{beads} \quad \text{Εξ. 24}$$

Όπου:

$$V_{beads} = \frac{m_{beads}}{d_{beads}} = \frac{m_{total} - m_{nut} - m_{container}}{d_{beads}} \quad \text{Εξ. 25}$$

Κατόπιν, υπολογίστηκε η φαινόμενη πυκνότητα ως το πηλίκο της μάζας του καρπού προς τον φαινόμενο όγκο.

4.2.5. Μέτρηση του χρώματος

Για τη μέτρηση του χρώματος του κελύφους των καρπών χρησιμοποιήθηκε χρωματόμετρο MINOLTA (CR-200, Japan). Για λόγους επαναληψιμότητας και μείωσης του σφάλματος στις μετρήσεις, κατασκευάστηκε ειδικός υποδοχέας, στο εσωτερικό του οποίου υπήρχε εύκαμπτο μαλακό υλικό (πλαστελίνη) λευκού χρώματος, επάνω στον οποίο εφάρμοζε σταθερά ο καρπός. Το κολλάρο της κεφαλής του οργάνου εφάρμοζε ακριβώς στο στόμιο του υποδοχέα και καταγράφονταν οι μετρήσεις του χρώματος στις παραμέτρους CIE $L^*a^*b^*$ C^* και h^* (Σχήμα 76). Μετρήθηκαν 20 φιστικά από κάθε δείγμα, από τις δύο μεριές

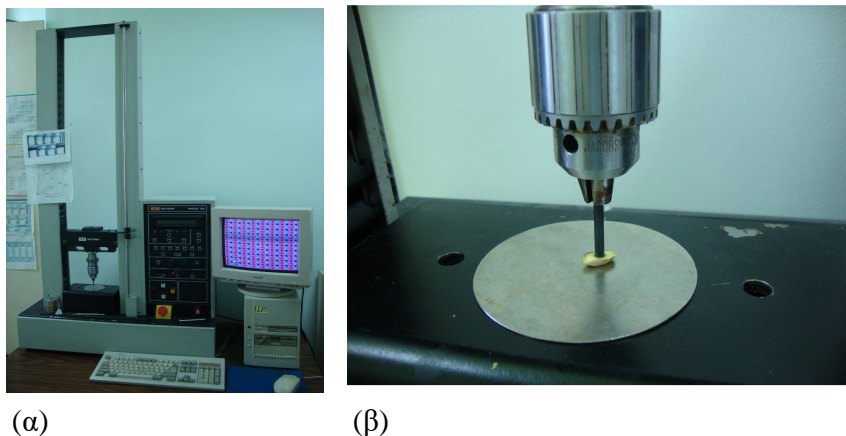
του κελύφους. Σε κάθε 10 μετρήσεις γινόταν καλιμπράρισμα του οργάνου σε λευκό πλακίδιο ($L = 96,98$, $a = -0,81$, $b = +3,19$.)

4.2.6. Μέτρηση της υφής

Για τον προσδιορισμό των παραμέτρων της υφής, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Instron 1011-Universal Testing Machine σε δοκιμή διάτρησης στο σπέρμα του φιστικιού (Σχήμα 77α,β).



Σχήμα 76. Μέτρηση του χρώματος στο κέλυφος των φιστικιών με το χρωματόμετρο Minolta, CR-200. Ο καρπός τοποθετείται οριζόντια στον ειδικό υποδοχέα, ο οποίος εφαρμόζει στο στόμιο του οργάνου.



(α)

(β)

Σχήμα 77. Προσδιορισμός των παραμέτρων της υφής των κελυφωτών φιστικιών (α) στο Instron (β) με δοκιμή διάτρησης.

Για τη δοκιμή διάτρησης, χρησιμοποιήθηκε ένα λεπτό κυλινδρικό έμβολο, με επίπεδη βάση (Σχήμα 77β). Η γέφυρα στην οποία προσαρμόζονταν τα έμβολα ήταν μέγιστης δύναμης 500N. Η ταχύτητα καθόδου του εμβόλου ήταν 5mm/min με μέγιστο βάθος εισχώρησης τα 3mm. Πριν την έναρξη της δοκιμής, το σπέρμα του φιστικιού διαχωριζόταν στις δύο κοτυληδόνες, ενώ με κατάλληλους χειρισμούς κοπής του καρπού, η επιφάνεια που ακουμπούσε το έμβολο ήταν επίπεδη. Οι δοκιμές έγιναν σε 15 καρπούς από κάθε δείγμα.

4.2.7. Προσδιορισμός του συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας (k)

Η μέτρηση της θερμικής αγωγιμότητας πραγματοποιήθηκε με το αγωγιμόμετρο KD2 Thermal Properties Analyzer (Σχήμα 78) στην ψίχα (σπέρμα) των κελυφωτών φιστικιών, η οποία είχε προηγουμένως αλεστεί σε εργαστηριακό μύλο (A-10, Tekmar). Το δείγμα ήταν τοποθετημένο σε γυάλινο κυλινδρικό φιαλίδιο, με μήκος λίγο μεγαλύτερο από τη βελόνα του αγωγιμόμετρου. Πριν την εισαγωγή της βελόνας και την έναρξη της μέτρησης, το δείγμα συμπιεζόταν καλά με κεραμικό γουδί, ώστε να αποτελεί μια συμπαγή μάζα και να μην αφήνονται κενά αέρα μεταξύ των τεμαχιδίων. Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 15 μετρήσεις.

4.2.8. Μέτρηση περιεκτικότητας σε υγρασία

Η μέθοδος για τη μέτρηση της υγρασίας των καρπών περιγράφεται με λεπτομέρεια στην ενότητα 2.2.4.



Σχήμα 78. Μέτρηση της θερμικής αγωγιμότητας σε αλεσμένη ψίχα κελυφωτού φιστικιού με το αγωγιμόμετρο.

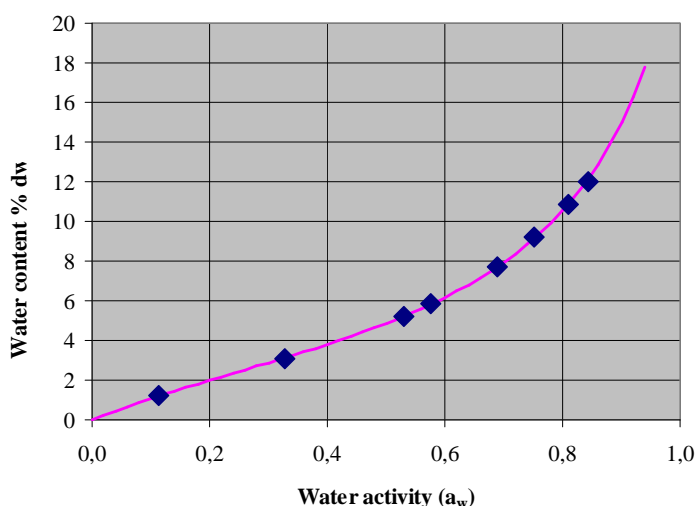
4.2.9. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων όλων των παραπάνω φυσικών ιδιοτήτων βασίστηκε στη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης (ή διασποράς) κατά ένα κριτήριο (One-way ANOVA). Σκοπός της ανάλυσης αυτής ήταν να διερευνηθεί αν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές των φυσικών ιδιοτήτων, ανάμεσα στα δείγματα της ομάδας των κανονικών καρπών (S), αλλά και μεταξύ των ομάδων των κανονικών και των ελαττωματικών καρπών σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Τα δείγματα με τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε ότι οι μέσοι όροι τους διέφεραν στατιστικά σημαντικά και εφαρμόστηκε η δοκιμή Tukey HSD για να αναγνωριστεί ποιοί μέσοι όροι διέφεραν σημαντικά. Όλες οι επεξεργασίες πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό λογισμικό πακέτο STATGRAPHICS® Centurion XV.II.

4.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.3.1. Ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης

Τα πειραματικά και θεωρητικά (όπως προσδιορίστηκαν από το μοντέλο GAB) δεδομένα της ισόθερμης καμπύλης προσρόφησης (a_w - % υγρασία) για ολόκληρο τον καρπό του κελυφωτού φιστικιού στους 25°C δίδονται στον Πίνακα 24 και στο διάγραμμα του Σχήματος 79. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα, το μοντέλο GAB περιγράφει πολύ καλά τα πειραματικά δεδομένα και φαίνεται ότι χαρακτηρίζει επαρκώς τη συμπεριφορά του καρπού (κέλυφος και ψίχα) κατά την προσρόφηση για όλο το εύρος των τιμών της a_w , όπως επίσης διαπιστώθηκε και από τη χαμηλή τιμή της παραμέτρου E (0.6). Οι ενεργειακές σταθερές της εξίσωσης GAB, k και C, οι οποίες αντιστοιχούν στη μοριακή ενθαλπία ρόφησης, προσδιορίστηκαν στις τιμές 0.852 και 3.8, ενώ η υγρασία μονοστοιβάδας (W_m) υπολογίστηκε στην τιμή 3.771. Η τιμή αυτή είναι πολύ κοντά στη τιμή που προσδιορίστηκε με το μοντέλο GAB στη μελέτη των Maskan & Karatas (1997) σε ολόκληρο φιστίκι (3.707) της ποικιλίας Kerman στους 30°C, όπως και η αντίστοιχη τιμή k, η οποία στην ίδια μελέτη προσδιορίστηκε 0.904. Ωστόσο, η ενεργειακή σταθερά C, προσδιορίστηκε υψηλότερα (5.134), πιθανόν λόγω της διαφορετικής θερμοκρασίας ισορροπίας ή πιθανόν στις διαφορές της σύστασης του καρπού, λόγω διαφορετικής ποικιλίας.



Σχήμα 79. Καμπύλη προσρόφησης κελυφωτού φιστικιού (ολόκληρο: κέλυφος και σπέρμα) στους 25°C. (◆) σημεία = πειραματικά αποτελέσματα, (----) γραμμή = θεωρητικά δεδομένα, όπως προβλέπονται από το μοντέλο GAB.

Πίνακας 24. Τιμές της περιεκτικότητας της υγρασίας (M_c), όπως προσδιορίστηκαν πειραματικά και υπολογίστηκαν θεωρητικά βάσει του μοντέλου GAB.

a_w	Πειραματικές τιμές M_c (% ξ,β.)	Θεωρητικές τιμές M_c (% ξ,β.)
0.113	1.2092	1.2026
0.328	3.0817	3.1183
0.529	5.2046	5.1990
0.576	5.8396	5.8179
0.689	7.7295	7.7071
0.753	9.2111	9.1750
0.81	10.8346	10.8876
0.843	12.0026	12.1366

Όπως τεκμηριώνεται στη μελέτη του Blahovec (2004), οι τιμές k και C που υπολογίστηκαν, ικανοποιούν τις σχέσεις: $0 < k \leq 1$ και $C > 2$, οι οποίες περιγράφουν τρόφιμα που ακολουθούν την κλασική σιγμοειδή καμπύλη υγρασίας με σημείο καμπής ή αλλιώς την τύπου-II ισόθερμη, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Brunauer. Ωστόσο, η τιμή C (3.8) που υπολογίστηκε βρίσκεται στο χαμηλότερο όριο τιμών για υλικά βιολογικής προέλευσης, υποδεικνύοντας μία οριακή συνθήκη προσαρμογής του μοντέλου GAB στις χαμηλές τιμές a_w , ειδικότερα, στην περιοχή του σημείου καμπής των τύπου-II ισόθερμων καμπυλών (Blahovec, 2004). Γι' αυτό το λόγο, εφαρμόστηκε το τροποποιημένο μοντέλο ταξινόμησης των ισόθερμων καμπυλών, όπως προτείνεται από τη μελέτη των Blahovec & Yanniotis (2009). Με βάση τα πειραματικά δεδομένα a_w – υγρασίας (W), προσδιορίστηκαν οι χαρακτηριστικές παράμετροι D_{10} , R_{fi} , a_{wm} και X_4 του μοντέλου, με τιμές 0.375, -0.407, 0.376, και 1.5547, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές ικανοποιούν τα κριτήρια ταξινόμησης για καμπύλες σιγμοειδούς μορφής GAB, τύπου IIb, σύμφωνα με το μοντέλο αυτό (Yanniotis & Blahovec, 2009).

Όπως εξηγείται στην εργασία των Blahovec & Yanniotis (2009), αυτή η υπο-κατηγορία σιγμοειδούς καμπύλης GAB, υποδεικνύει τη συμμετοχή και επίδραση του νερού ως διαλύτη, στα φαινόμενα ρόφησης στις υψηλές τιμές a_w , το οποίο έχει παρατηρηθεί σε τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνη, στους περισσότερους καρπούς και στα λαχανικά. Στη συνέχεια, θέλοντας να διερευνηθεί περαιτέρω η παραπάνω παρατήρηση, αναλύθηκαν τα δεδομένα προσρόφησης της ψίχας των κελυφωτών φιστικιών της ίδιας θερμοκρασίας, όπως παρουσιάζονται στη μελέτη των Yanniotis & Zarmboutis (1996) με το παραπάνω μοντέλο ταξινόμησης. Αντίστοιχα, βάσει των χαρακτηριστικών παραμέτρων D_{10} , R_{fi} , a_{wm} και X_4 η

ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης της ψίχας των φιστικιών ταξινομήθηκε στην ίδια κατηγορία με την καμπύλη προσρόφησης ολόκληρου του καρπού, ως μορφής GAB τύπου Pb, δείχνοντας την καταλυτική συμμετοχή της χημικής σύνθεσης του σπέρματος του φιστικιού στα φαινόμενα προσρόφησης. Επίσης, τα παραπάνω δεδομένα είναι αρκετά κοντά με αποτελέσματα άλλων σχετικών μελετών σε ολόκληρο τον καρπό του φιστικιού (χωρίς της φλούδα), αν και η αντιστοιχία δεν μπορεί να είναι ακριβής λόγω των διαφορετικών θερμοκρασιών ισορροπίας και των διαφορετικών ποικιλιών (Maskan & Karatas, 1997; Yazdani *et al.*, 2006). Ωστόσο, και σε αυτές τις εργασίες διαπιστώθηκε ότι το μοντέλο GAB περιγράφει πολύ καλά τα πειραματικά δεδομένα σε σύγκριση με τα άλλα μοντέλα που δοκιμάστηκαν (Maskan & Karatas, 1997). Μεγαλύτερες αποκλίσεις ως προς τα δεδομένα προσρόφησης παρατηρούνται μεταξύ του κελύφους και ολόκληρου του καρπού, οι οποίες θα πρέπει να αποδοθούν στη διαφορετική χημική σύσταση.

4.3.2. Οι φυσικές ιδιότητες σε συνάρτηση με την υγρασία του καρπού

Στον Πίνακα 25 αναφέρονται όλες οι γραμμικές σχέσεις των φυσικών ιδιοτήτων που μελετήθηκαν, συναρτήσε της περιεχόμενης υγρασίας των καρπών, με βάση τις πειραματικές τιμές υγρασίας, όπως προσδιορίστηκαν από την ισόθερμη καμπύλη (1-12% ξ.β.). Όπως φαίνεται και στα Σχήματα 80 και 81(α), όλα τα χαρακτηριστικά που προσδιορίζουν τις διαστάσεις (μήκος, πλάτος, ύψος, γεωμετρικός μέσος, επιφάνεια) εμφανίζουν θετική συσχέτιση με την υγρασία. Αυτό σημαίνει ότι κατά την ξήρανση, ο καρπός συρρικνώνεται κυρίως ως προς το μήκος και το ύψος του και λιγότερο ως προς το πλάτος, όπως υποδεικνύεται από τους συντελεστές των αντίστοιχων εξισώσεων. Όσον αφορά τη διάσταση του πλάτους, η οποία ορίστηκε ως η μέγιστη διάμετρος και προσδιορίζεται κυρίως από το άνοιγμα του κελύφους, η επίδραση της υγρασίας είναι μικρότερη. Αυτό έχει φανεί και σε άλλες μελέτες, οι οποίες έδειξαν μείωση του ανοίγματος του κελύφους με αύξηση της υγρασίας από 5-35% υγρ.β. σε όλες τις ποικιλίες (Razavi *et al.*, 2007a; Kashaninejad *et al.*, 2006). Σε κάθε περίπτωση, η αύξηση που μετρήθηκε στο μέγεθος του καρπού ήταν από 4-6.5% σε ένα εύρος υγρασίας από 1-12% ξ.β, όπως προκύπτει από το γεωμετρικό μέσο των τριών διαστάσεων. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η σφαιρικότητα του καρπού προσδιορίστηκε 68-69%, αλλά δε μετρήθηκε αξιοσημείωτη μεταβολή στις τιμές της, σε σχέση με την υγρασία, συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουν και άλλες σχετικές εργασίες σε ποικιλίες φιστικιών όπως η Akbari, η Badami και η Ohadi (Razavi *et al.*, 2007a). Η

επιφάνεια του καρπού έδειξε να μειώνεται περίπου 10%, με μείωση της υγρασίας στο εύρος που μελετήθηκε. Στην εργασία των Razavi *et al.* (2007a), η μείωση ήταν μεγαλύτερη (17-24%) για το εύρος της υγρασίας που μελετήθηκε. Ωστόσο, οι Hsu *et al.* (1991) παρατήρησαν αρνητική σχέση μεταξύ της υγρασίας και της επιφάνειας, αλλά η διαφορά αυτή οφείλεται πιθανότατα στη μέθοδο υπολογισμού (η οποία περιλάμβανε και μέρος του σπέρματος λόγω ανοίγματος του κελύφους), διότι το μέγεθος του καρπού έδειξε να μειώνεται καθώς μειώνεται η υγρασία, όπως και στην παρούσα εργασία.

Η μάζα αυξήθηκε κατά 12% στο εύρος της υγρασίας που μετρήθηκε, εμφανίζοντας μία γραμμική, αναμενόμενα θετική συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε υγρασία, όπως φαίνεται στον Πίνακα 25 και στο διάγραμμα του Σχήματος 81β. Αντίστοιχα, αυξήθηκε ο φαινόμενος όγκος ενώ η πυκνότητα μειώθηκε με την αύξηση της υγρασίας, εμφανίζοντας αρνητική συσχέτιση, όπως φαίνεται στα αντίστοιχα διαγράμματα του Σχήματος 82. Αν και όλα τα αποτελέσματα από τις σχετικές μελέτες δείχνουν μια μείωση της μάζας και του όγκου του φιστικιού όταν μειώνεται η υγρασία (Hsu *et al.*, 1991; Kashaninejad *et al.*, 2006; Razavi *et al.*, 2007b), η σχέση της πυκνότητας με την υγρασία φαίνεται να διαφοροποιείται είτε λόγω ποικιλίας, είτε λόγω των διαφορετικών μεθόδων μέτρησης. Όσον αφορά το πρώτο, φαίνεται ότι η θετική ή αρνητική συσχέτιση της πυκνότητας με την υγρασία, σχετίζεται με το αν μεταβάλλεται περισσότερο η μάζα ή ο όγκος με την υγρασία, οπότε αναλόγως επηρεάζεται και η πυκνότητα, ως πηλίκο τους. Η μέθοδος μέτρησης παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των αποτελεσμάτων της πυκνότητας, διότι έχει παρατηρηθεί επίδραση της υγρασίας, στο άνοιγμα του κελύφους σε ορισμένες ποικιλίες και μάλιστα αρνητική (Razavi *et al.*, 2007a). Συνεπώς, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι διαφορετικό, αν η μέθοδος που εφαρμόστηκε το λαμβάνει αυτό υπ'όψιν ή όχι. Ωστόσο, για την πυκνότητα της κλίνης (bulk density), υπάρχει συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων ότι έχει θετική συσχέτιση με την υγρασία, είτε γραμμικής μορφής (Hsu *et al.*, 1991; Razavi *et al.*, 2007b) είτε εκθετικής (Kashaninejad *et al.*, 2006).

Για το χρώμα του κελύφους, προσδιορίστηκαν οι παράμετροι CIE $L^*a^*b^*$, C^* και h^* . Από αυτές, μόνο οι παράμετροι a^* , C^* και h^* έδειξαν μία σχετικά καλή γραμμική συσχέτιση με την υγρασία, όπως φαίνεται από τις εξισώσεις του Πίνακα 25. Πιο συγκεκριμένα, με την αύξηση της υγρασίας φαίνεται μια αύξηση στις παραμέτρους a^* και C^* , ενώ η απόχρωση h^* μειώνεται. Αυτό δίνει μια συνολική μεταβολή του χρώματος του κελύφους, προς ένα πιο

Πίνακας 25. Γραμμικές εξισώσεις των φυσικών χαρακτηριστικών συναρτήσει της περιεκτικότητας σε υγρασία (M_C).

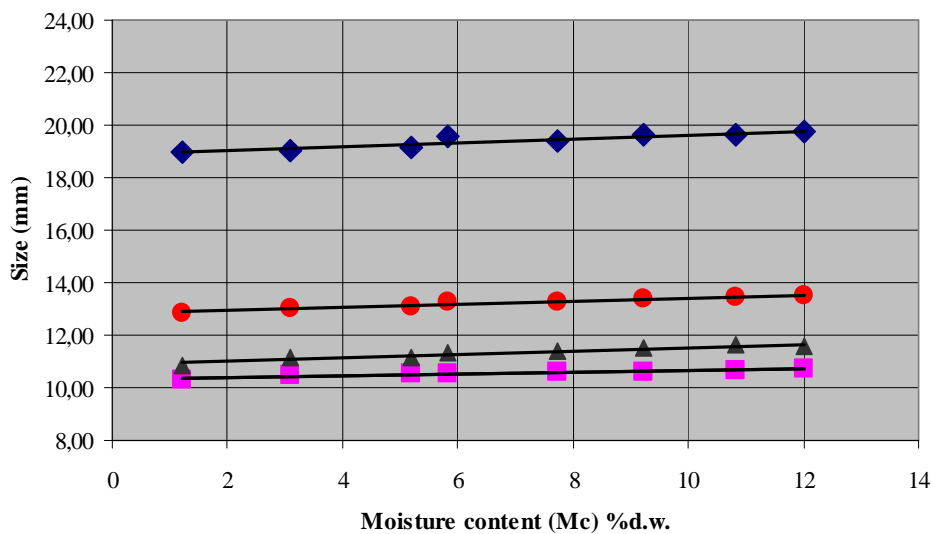
Φυσικές ιδιότητες	Εξίσωση παλινδρόμησης	R^2
Μήκος (L) mm	$L = 0.0757 M_C + 18.864$	0.854
Πλάτος (W) mm	$W = 0.0368 M_C + 10.315$	0.937
Ύψος (H) mm	$H = 0.0659 M_C + 10.875$	0.930
Γεωμετρικός μέσος (D_g) mm	$D_g = 0.0585 M_C + 12.826$	0.948
Επιφάνεια (S) mm ²	$S = 4.8644 M_C + 517.01$	0.949
Μάζα (M) g	$M = 0.0112 M_C + 0.9188$	0.987
Φαινόμενος Όγκος (V_{app}) cm ³	$V_{app} = 0.0276 M_C + 1.0491$	0.916
Φαινόμενη πυκνότητα (ρ_{app}) kg/cm ³	$\rho_{app} = -6.0811 M_C + 859.12$	0.824
Χρώμα (CIE a*)	$a^* = 0.08 M_C + 3.224$	0.739
Χρώμα (CIE C*)	$C^* = 0.201 M_C + 22.761$	0.875
Χρώμα (CIE h*)	$h^* = -0.130 M_C + 82.126$	0.740
Θερμική αγωγιμότητα (k) W/m ^o C	$k = 0.007 M_C + 0.072$	0.920
1η δύναμη υποχώρησης κατά τη διάτρηση (Fy) N	$Fy = -1.425 M_C + 40.293$	0.7414
Δείκτης ακαμψίας (Young's Modulus, E) MPa	$E = -0.1044 M_C + 2.4637$	0.8437

έντονο κίτρινο προς πορτοκαλί, όσο αυξάνεται η υγρασία, σε αντίθεση με ένα πιο απαλό κίτρινο στις χαμηλότερες τιμές. Στα διαγράμματα του Σχήματος 83 απεικονίζεται η γραμμική συνάρτηση των τριών παραμέτρων του χρώματος με την υγρασία.

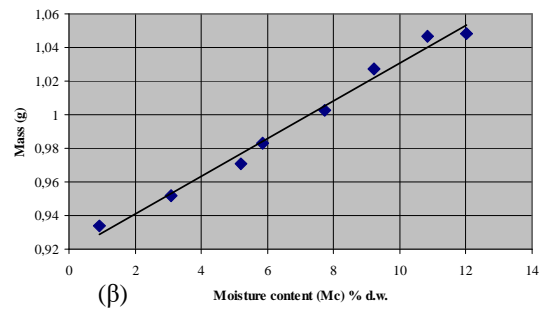
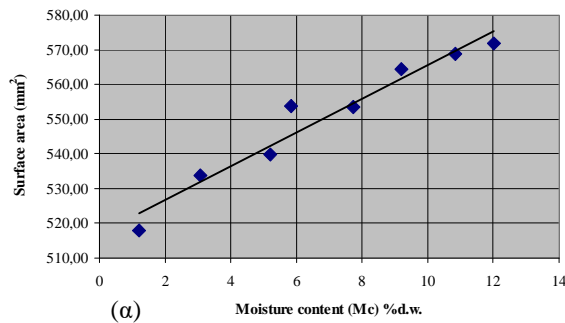
Η επίδραση της υγρασίας στο συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας k υπολογίστηκε για την ψίχα (σπέρμα) του φιστικιού. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 84, η τιμή k διπλασιάστηκε με αύξηση της υγρασίας από το 1% στο 12% ξ.β. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ότι η θερμική αγωγιμότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα των τροφίμων σε υγρασία (Sahin & Sumnu, 2005). Επίσης, εξαρτάται από το πορώδες και τη σύσταση του τροφίμου, αλλά στην προκειμένη περίπτωση, επειδή η μέτρηση έγινε σε δείγμα ψιλοαλεσμένης φιστικόψιχας το οποίο ήταν σε μορφή πάστας, τα κενά με αέρα μπορούν να θεωρηθούν

αμελητέα. Η γραμμική εξίσωση που εκφράζει την επίδραση της υγρασίας στη θερμική αγωγιμότητα αναφέρεται στον Πίνακα 25.

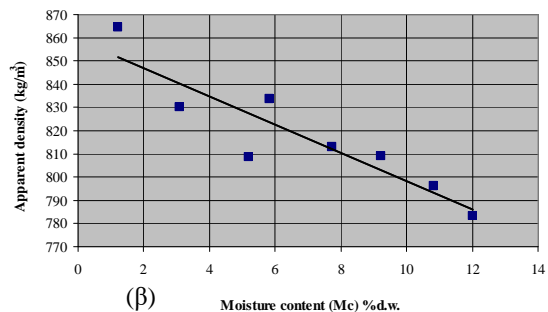
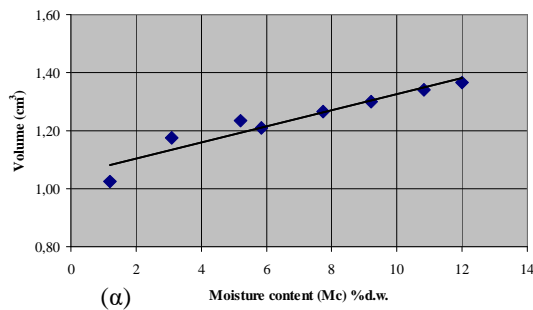
Όσον αφορά την έκφραση των ιδιοτήτων της υφής κατά τη διάτρηση της ψίχας του φιστικιού, σε σχέση με την υγρασία, φαίνεται μια αρνητική συσχέτιση (Σχήμα 85α,β). Η πρώτη δύναμη υποχώρησης (F_y) μειώθηκε κατά 40% κατά την αύξηση της υγρασίας από 1% στο 12% και αντίστοιχα, ο δείκτης ακαμψίας (E). Αυτά τα δύο στοιχεία δείχνουν ότι στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε υγρασία, η ψίχα μαλακώνει και γίνεται πιο εύκαμπτη, οπότε η δύναμη που απαιτείται είναι μικρότερη. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην εργασία των Galedar *et al.* (2009), στην οποία μελετήθηκε η συμπεριφορά του καρπού (με κέλυφος) και της ψίχας στη μηχανική συμπίεση, με μεταβολή της υγρασίας από 6% σε 34% επί υγρής βάσης.



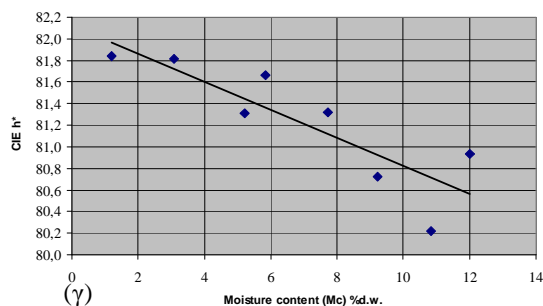
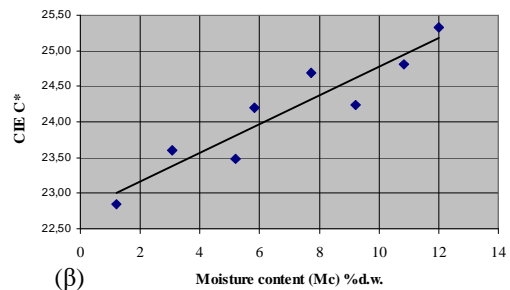
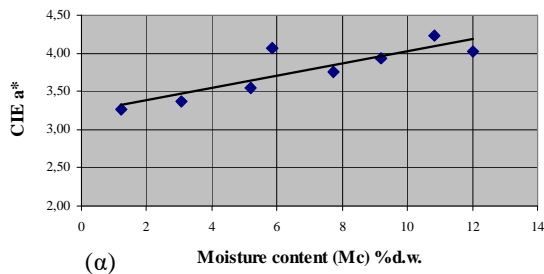
Σχήμα 80. Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στις διαστάσεις (size) του κελυφωτού φιστικιού ποικιλίας «Αιγίνης». (◆)= Μήκος (L) (●)= Γεωμετρικός μέσος (D_g) (▲)= Ύψος (H) (■) = Πλάτος (W)



Σχήμα 81. Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας (α) στην επιφάνεια (surface) και (β) στη μάζα του κελυφωτού φιστικιού ποικιλίας «Αιγίνης».



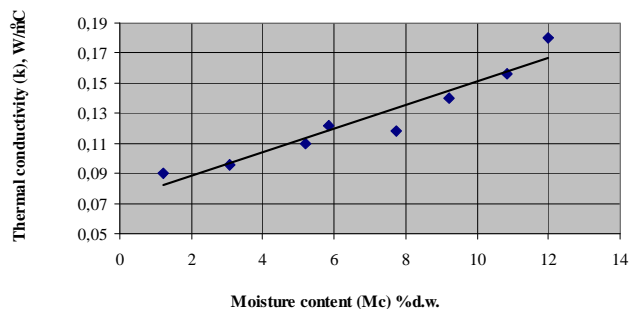
Σχήμα 82. Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας (α) στον όγκο (volume) και (β) στη φαινόμενη πυκνότητα (Dapp) του κελυφωτού φιστικιού ποικιλίας «Αιγίνης».



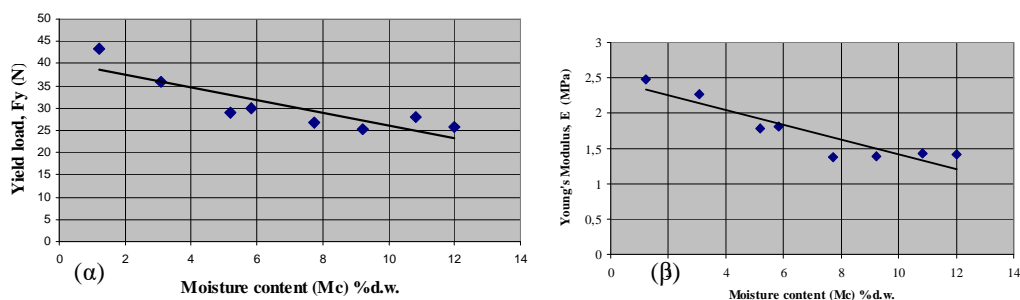
Σχήμα 83. Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στο χρώμα του κελύφους του φιστικιού της ποικιλίας «Αιγίνης», όπως περιγράφεται από τις παραμέτρους a*, C* και h*, στα διαγράμματα (α), (β) και (γ), αντίστοιχα.

4.3.3. Τα φυσικά χαρακτηριστικά σε κανονικά και ελαττωματικά φιστίκια

Τα φυσικά χαρακτηριστικά των κανονικών φιστικιών, τυπικών της ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης», μετρήθηκαν σε εννέα δείγματα διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, όσον αφορά την παραγωγή, ώστε να υπάρχει καλύτερη αντιπροσωπευτικότητα στα αποτελέσματα των μετρήσεων. Οι φυσικές ιδιότητες που προσδιορίστηκαν σε αυτή την περίπτωση (Πίνακας 23) αφορούν τις διαστάσεις και το σχήμα του καρπού, όπως εκφράζονται από το μήκος(L), το πλάτος(W) και το ύψος(H), το δείκτη μήκος/πλάτος (L/W), τη σφαιρικότητα (Φ) και την επιφάνεια (S), τις χαρακτηριστικές ιδιότητες, μάζα (M), φαινόμενο όγκο (V_{app}) και πυκνότητα (ρ_{app}) και το χρώμα του κελύφους (CIE L^*, C^*, h^*). Τα αντίστοιχα φυσικά χαρακτηριστικά μετρήθηκαν και σε ελαττωματικά φιστίκια της ίδιας ποικιλίας, ώστε να ποσοτικοποιηθούν οι διαφορές. Η επιλογή των φυσικών χαρακτηριστικών που μετρήθηκαν, βασίστηκε στα μακροσκοπικά ελαττώματα των ποιοτικά υποβαθμισμένων καρπών, τα οποία αφορούν αποκλίσεις ως προς το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα του κελύφους (Σχήμα 73).



Σχήμα 84. Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στη θερμική αγωγιμότητα (k) της ψίχας του κελυφωτού φιστικιού ποικιλίας «Αιγίνης».



Σχήμα 85. Επίδραση της περιεκτικότητας της υγρασίας στην υφή της ψίχας των κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας «Αιγίνης», όπως μετρήθηκε από τις παραμέτρους (α) F_y (πρώτη δύναμη υποχώρησης) και (β) E (Young's Modulus, δείκτης ακαμψίας), σε δοκιμή διάτρησης.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των παραπάνω ιδιοτήτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 26, για όλα τα δείγματα των κανονικών και ελαττωματικών φιστικιών. Για κάθε φυσικό χαρακτηριστικό παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

Όσον αφορά τα φυσικά χαρακτηριστικά των κανονικών φιστικιών, μετρήθηκαν και στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς κάποιες ιδιότητες μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, ως προς το μήκος, διακρίνονται δύο ομοιογενείς ομάδες σύμφωνα με τη δοκιμή Tukey, με τα τρία πρώτα δείγματα από την Αίγινα να έχουν το μικρότερο μήκος. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπ'όψιν και τις τρεις διαστάσεις, τα δείγματα από τον Πόρο και το Βοτανικό είχαν το μικρότερο μέγεθος, με την παρατήρηση ότι τα φιστίκια αυτά δεν είχαν καλό άνοιγμα κελύφους, γεγονός που φαίνεται και από τη μέτρηση του πλάτους. Τα δείγματα από την Εύβοια, το Καπανδρίτι και τη Μάκρη είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος. Η αναλογία L/W και η σφαιρικότητα εκφράζουν το σχήμα του φιστικιού. Με βάση τις μετρήσεις φαίνεται ότι το δείγμα του Πόρου και του Βοτανικού έχουν τους πιο μακρόστενους καρπούς, ενώ οι καρποί από τα υπόλοιπα δείγματα είναι πιο σφαιρικοί. Τα αποτελέσματα των γεωμετρικών ιδιοτήτων στους κανονικούς καρπούς συμφωνούν με τις μετρήσεις από την εργασία των Tsantili *et al.* (2010) για την ποικιλία «Αιγίνης». Το σχήμα, όπως φαίνεται τόσο από την παρούσα μελέτη, όσο και στην προαναφερόμενη εργασία των Tsantili *et al.* (2010), είναι μία χαρακτηριστική ιδιότητα, βάσει της οποίας μπορεί να διακριθούν οι ποικιλίες. Η ελληνική ποικιλία, όπως και οι ιταλικές και οι τυνησιακές χαρακτηρίζονται ως μακρόστενες ($L/W > 1.8$) σε σύγκριση με τις ιρανικές και τις τούρκικες, οι οποίες είναι πιο ωοειδείς ($L/W > 1.5-1.8$).

Συγκρίνοντας το βάρος και τον όγκο των κανονικών φιστικιών, ακολουθείται η ίδια σειρά μεταξύ των δειγμάτων, όπως και με το μέγεθος. Τα φιστίκια από τον Πόρο και τον Βοτανικό έχουν τη μικρότερη μάζα και όγκο, ενώ αυτά από την Εύβοια, το Καπανδρίτι και τη Μάκρη, το μεγαλύτερο βάρος και όγκο. Κατά πάσα πιθανότητα, οι διαφορές αυτές οφείλονται στις διαφορετικές καλλιεργητικές φροντίδες και ειδικότερα στην άρδευση, δεδομένου ότι στις βορειότερες περιοχές καλλιέργειας, οι συνθήκες είναι λιγότερο ξηροθερμικές και οι αρδεύσεις πυκνότερες. Ωστόσο, για την ορθότερη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων της ομάδας των κανονικών, μετρήθηκε η περιεχόμενη υγρασία, η οποία δεν διέφερε σημαντικά (4.5 – 6.0% ξ.β.). Συγκριτικά με τις ξένες ποικιλίες, η ελληνική ποικιλία κατατάσσεται στις

μεσαίου μεγέθους ποικιλίες με κριτήριο το βάρος 100 καρπών (103 γρ/100 καρποί), σύμφωνα με τις προδιαγραφές τυποποίησης του CODEX (STAN 131-1981).

Άλλοι παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να επηρεάζουν τα φυσικά χαρακτηριστικά των τυπικών κελυφωτών φιστικιών της ποικιλίας «Αιγίνης», είναι ο χρόνος συγκομιδής και η μέθοδος ξήρανσης. Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη δείχνουν, ότι οι δυο αυτοί παράγοντες επιδρούν κυρίως στο χρώμα του κελύφους, όπως ποσοτικοποιείται στις παραμέτρους L^* , C^* και h^* (Σχήμα 86). Το δείγμα το οποίο ξηράνθηκε φυσικά στον ήλιο (Σχήμα 86α, δεξιά) έχει πιο έντονο κίτρινο χρώμα ($>C^*$, $>h^*$), ενώ αυτό που προήλθε από το ξηραντήριο εμφανίζει πιο θαμπό και λιγότερο κίτρινο χρώμα (Σχήμα 86α, αριστερά). Αντίστοιχα, το δείγμα S.7-E από την Εύβοια, που συγκομίστηκε πρώτο, εμφανίζει ένα πιο λευκό και πιο κίτρινο χρώμα (Σχήμα 86β, αριστερά), όπως προσδιορίζεται από τη μεγαλύτερη τιμή L^* και h^* , συγκριτικά με το S.8-E (Σχήμα 86β, δεξιά). Η καθυστερημένη συγκομιδή μπορεί να επηρεάσει το χρώμα του κελύφους, διότι εκχυλίζονται οι φαινολικές ουσίες από το φλοιό και βάφουν το κέλυφος (Χιτζανίδου *et al.*, 2004). Ωστόσο, οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτελούν ενδείξεις σχετικά με την επίδραση περιβαλλοντικών και καλλιεργητικών παραγόντων στα φυσικά χαρακτηριστικά του φιστικιού. Ο αριθμός των δειγμάτων, δε διασφαλίζει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, σχετικά με την επίδραση αυτών των παραγόντων στα φυσικά χαρακτηριστικά του κελυφωτού φιστικιού, αλλά δεν αποτελεί και αντικείμενο της παρούσας διατριβής. Σε κάθε περίπτωση όμως, το χρώμα του κελύφους αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας, με την ελληνική ποικιλία «Αιγίνης» να εμφανίζει έναν πιο σκούρο, έντονα κίτρινο χρωματισμό, σε σχέση με άλλες ποικιλίες (Tsantili *et al.*, 2010).



Σχήμα 86. Επίδραση στο χρώμα του κελύφους (α) της μεθόδου ξήρανσης, όπως απεικονίζεται μεταξύ των δειγμάτων S.2-A (αριστερά) και S.3-A (δεξιά) και (β) του χρόνου ωρίμανσης, όπως απεικονίζεται μεταξύ των δειγμάτων S.7-E (αριστερά) και S.8-E (δεξιά).

Οι παραπάνω φυσικές ιδιότητες μετρήθηκαν αντίστοιχα, στις πέντε κατηγορίες των ελαττωματικών φιστικιών, όπως περιγράφεται στον Πίνακα 26 και έγινε σύγκριση με τα αποτελέσματα των μετρήσεων στα κανονικά, τυπικά της ποικιλίας φιστίκια. Στον Πίνακα 27, για κάθε ιδιότητα που μετρήθηκε, περιγράφεται το εύρος των τιμών (ελάχιστη, μέγιστη τιμή), η μέση τιμή, καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας (SD), τα οποία προέκυψαν από τη σύγκριση των κανονικών φιστικιών με τα ελαττωματικά. Αν και όλα τα δείγματα αφορούν αποξηραμένους καρπούς, μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε υγρασία, λόγω της σημαντικής της επίδρασης, στις φυσικές ιδιότητες. Όπως φαίνεται, η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε υγρασία κυμαίνεται από 5.4 – 5.8 %ξ.β., διαφορά πολύ μικρή για να επηρεάζει τις ιδιότητες, όπως φαίνεται και από την §4.3.2 του παρόντος κεφαλαίου.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η κατηγορία των μικρών παραμορφωμένων καρπών (DM) διαφέρει σημαντικά από τα κανονικά φιστίκια, ως προς όλες τις γεωμετρικές ιδιότητες. Ειδικότερα, είναι περίπου 20% μικρότερα ως προς τις διαστάσεις και 40% ως προς τη συνολική επιφάνεια, τη μάζα και τον όγκο. Επίσης, είναι πιο σφαιρικά από τα κανονικά, όπως υποδεικνύεται από τον δείκτη L/W και τη σφαιρικότητα. Συνεπώς, τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήρια διαχωρισμού τους.

Αντίστοιχα, οι κατηγορίες των ελαττωματικών φιστικιών με κίτρινο ή σκούρο κέλυφος, φαίνεται ότι μπορούν να διαχωριστούν βάσει του χρώματος. Πιο συγκεκριμένα, η φωτεινότητα (L^*), στα κανονικά φιστίκια κυμαίνεται από 63 – 73.8, ενώ στους καρπούς με σκούρο μεταχρωματισμό στο κέλυφος είναι σημαντικά χαμηλότερη, από 56.4-58.7. Στους καρπούς με κίτρινο μεταχρωματισμό στο κέλυφος, πιο χαρακτηριστικές φαίνεται να είναι οι παράμετροι h^* και C^* . Στα κανονικά φιστίκια, το h^* κυμαίνεται από 81.6-85.4 και το C^* από 18.8-25.3, ενώ στα φιστίκια της κατηγορίας DK είναι 84.2-86.2 και 26.7-28.5 αντίστοιχα, υποδεικνύοντας έναν πιο έντονο κίτρινο χρωματισμό. Το χρώμα επίσης, φαίνεται ως το πιο καθοριστικό χαρακτηριστικό διαχωρισμού των καρπών και της κατηγορίας DF, αν και η μάζα και ο όγκος, διαφέρουν επίσης σημαντικά. Σε σύγκριση με τα κανονικά, σημαντική είναι η διαφορά και ως προς τις τρεις παραμέτρους του χρώματος, με την τιμή L^* να είναι μειωμένη κατά 25%, ενώ η τιμή h^* να προσδιορίζει άλλη απόχρωση (πορτοκαλί-μωβ). Τέλος, η πιο δύσκολη ίσως κατηγορία για να διαχωριστεί φαίνεται ότι είναι η DT. Προσδιορίστηκε η μάζα και ο όγκος τους, αλλά μόνο ως προς το δεύτερο χαρακτηριστικό φαίνεται να διαφέρει σημαντικά.

Πίνακας 26. Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των φυσικών χαρακτηριστικών, σε κανονικά και ελαττωματικά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».

Όνομα δειγματος	L (mm)		W(mm)		H (mm)		L/W	Φ (%)	S (mm ²)	M (g)		V _{app} (cm ³)		ρ _{app} (kg/m ³)		L*		C*		h ^(o)	
	μ.ο./SD	s	μ.ο./SD	s	μ.ο./SD	s				μ.ο.	μ.ο./SD	μ.ο./SD	s	μ.ο./SD	s	μ.ο./SD	s	μ.ο.	s	μ.ο./SD	s
S: Κανονικά																					
S.1-A	18.7 _a	0.8	10.5 _b	0.5	11.0 _{ab}	0.5	1.8	69	528.3 _{ab}	0.9 _{bc}	0.1	1.1 _{ab}	0.1	0.8 _{ab}	0.1	64.5 _a	3.0	23.7 _{cd}	1.5	82.5 _{bc}	1.1
S.2-A	18.9 _a	0.9	10.6 _{bc}	0.5	11.1 _b	0.5	1.8	68	521.2 _{ab}	0.9 _c	0.1	1.2 _b	0.1	0.8 _{ab}	0.1	63.0 _a	3.8	18.9 _a	1.1	81.6 _a	1.3
S.3-A	18.7 _a	0.8	10.3 _b	0.5	11.1 _b	0.6	1.8	68	532.8 _b	0.9 _{bc}	0.1	1.1 _{ab}	0.1	0.8 _b	0.1	64.3 _a	3.8	24.0 _{cd}	3.1	82.8 _{bc}	1.5
S.4-K	20.2 _b	0.7	10.7 _{cd}	0.7	11.3 _{bc}	0.6	1.9	67	570.2 _c	1.0 _d	0.1	1.3 _c	0.2	0.8 _{ab}	0.1	65.8 _{ab}	3.1	23.7 _{cd}	2.7	82.4 _{ab}	1.1
S.5-Π	20.0 _b	0.9	9.9 _a	0.6	11.0 _{ab}	0.6	2.0	65	528.2 _{ab}	0.9 _{ab}	0.1	1.1 _{ab}	0.2	0.8 _{ab}	0.1	68.1 _{bc}	2.8	25.3 _d	1.7	84.3 _{de}	1.4
S.6-M	20.2 _b	0.7	11.0 _{de}	0.7	11.3 _{bc}	0.6	1.8	67	579.2 _{cd}	1.0 _d	0.1	1.4 _c	0.2	0.7 _a	0.1	70.0 _c	3.5	18.8 _a	1.2	83.1 _{bcd}	2.3
S.7-E	19.8 _b	0.8	11.0 _{de}	0.5	11.5 _c	0.6	1.8	69	576.7 _{cd}	1.1 _{de}	0.1	1.3 _c	0.1	0.8 _{ab}	0.1	73.8 _d	2.2	20.4 _{ab}	1.7	85.4 _e	1.6
S.8-E	20.1 _b	0.8	11.1 _e	0.5	11.5 _c	0.6	1.8	68	586.9 _d	1.1 _e	0.1	1.3 _c	0.2	0.8 _b	0.1	70.6 _c	3.5	21.0 _b	3.1	84.0 _{cd}	1.6
S.9-B	19.0 _b	1.0	9.8 _a	0.7	10.7 _c	0.6	1.9	66	496.9 _a	0.8 _a	0.1	1.1 _a	0.2	0.8 _{ab}	0.2	65.0 _a	4.6	22.9 _c	2.1	83.6 _{bcd}	1.9
D: Ελαττωματικά																					
DK.1-A																66.7	4.6	27.0	4.3	86.2	3.2
DK.2-A																65.2	4.9	28.5	3.7	84.2	2.7
DK.3-A																63.1	5.1	26.7	3.0	85.6	3.0
DE.1-A																58.7	6.4	21.4	2.9	82.2	3.3
DE.2-A																57.0	6.8	23.1	3.6	81.2	2.1
DE.3-A																56.4	5.9	20.0	1.0	81.9	1.8
DM.1-A	14.3	1.3	9.0	0.7	9.3	0.7	1.6	74	353.7	0.6	0.1	0.8	0.1	0.7	0.1						
DM.2-A	16.4	1.1	8.6	0.7	9.6	0.7	1.9	68	385.0	0.6	0.1	0.8	0.1	0.8	0.1						
DM.3-A	14.0	1.0	8.1	0.8	8.6	0.7	1.7	71	310.0	0.5	0.1	0.8	0.1	0.6	0.1						
DT.1-A										1.0	0.1	1.1	0.2	0.9	0.1						
DT.2-A										0.9	0.1	1.2	0.2	0.8	0.1						
DT.3-A										0.8	0.1	1.0	0.1	0.8	0.1						
DF.1-A										0.9	0.1	0.9	0.2	1.0	0.2	48.9	8.1	23.2	4.3	69.3	7.9
DF.2-A										0.8	0.1	0.9	0.2	0.9	0.1	50.7	9.9	22.9	5.5	72.7	8.6
DF.3-A										1.0	0.1	1.5	0.3	0.7	0.1	51.3	5.6	30.3	3.5	74.9	5.3

Όπου: L = μήκος, W = πλάτος, H = ύψος, Φ = σφαιρικότητα, S = επιφάνεια, M = μάζα, V_{app} = φαινόμενος όγκος, ρ_{app} = φαινόμενη πυκνότητα, s = τυπική απόκλιση, SD: Σημαντική διαφορά (Significant Difference). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά (κάθετη σύγκριση κατά στήλες).

Πίνακας 27. Στατιστική συγκριτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, από τις μετρήσεις των φυσικών χαρακτηριστικών σε κανονικά και ελαττωματικά κελυφωτά φιστίκια της ποικιλίας «Αιγίνης».

Ιδιότητα	Κανονικά (S)						Κατηγορίες ελαττωματικών καρπών (D)																															
							DK			DE			DM			DT			DF																			
	<i>min</i>	<i>max</i>	mean	s	N	SD	<i>min</i>	<i>max</i>	mean	s	N	SD	<i>min</i>	<i>max</i>	mean	s	N	SD	<i>min</i>	<i>max</i>	mean	s	N	SD	<i>min</i>	<i>max</i>	mean	s	N	SD								
L (mm)	18.7	20.2	19.6	1	540	a							14.0	16.4	14.9	1.1	180	b																				
W (mm)	9.8	11.1	10.5	0.7	540	a							8.2	9.0	8.6	0.7	180	b																				
H (mm)	10.7	11.5	11.2	0.6	540	a							8.6	9.6	9.1	0.7	180	b																				
L/W	1.8	2.0	1.8	0.1	540	a							1.6	1.9	1.7	0.1	180	b																				
Φ (%)	65	69	67	0.02	540	a							68	74	71	3.0	180	b																				
S (mm²)	496.9	579.2	548.6	33.3	540	a							310	385	350	37.6	180	b																				
M (g)	0.8	1.1	1.0	0.1	540	c							0.5	0.6	0.6	0.1	180	a	0.8	1.0	0.9	0.1	180	bc	0.8	1.0	0.9	0.1	180	b								
V_{app} (cm³)	1.1	1.4	1.2	0.2	540	c							0.8	0.8	0.8	0.1	180	a	1.0	1.2	1.1	0.2	180	b	0.9	1.5	1.1	0.2	180	b								
ρ_{app} (kg/m³)	0.7	0.8	0.8	0.1	540	b							0.6	0.8	0.7	0.1	180	a	0.8	0.9	0.8	0.1	180	bc	0.7	1.0	0.8	0.1	180	c								
Υγρασία %ζ.β.	4.4	6.9	5.8	0.8	225		4.7	6.4	5.5	0.9	75		4.5	6.5	5.7	0.7	75		5.2	6.1	5.7	0.4	75		4.4	6.4	5.5	0.3	75		5.1	5.6	5.4	0.1	75			
Χρώμα	L*	63.0	73.8	67.6	4.8	288	d	63.1	66.7	65.0	4.9	180	c	56.4	58.7	57.4	6.4	180	b													48.9	51.3	50.3	7.9	180	a	
	C*	18.8	25.3	21.9	3.2	288	b	26.7	28.5	27.4	3.7	180	d	20.0	23.1	21.5	2.5	180	a														22.9	30.3	25.5	4.4	180	c
	H*(⁶⁰)	81.6	85.4	83.4	2.0	288	c	84.2	86.2	85.4	2.6	180	d	81.2	82.2	81.8	2.4	180	b														69.3	74.9	72.3	7.3	180	a

Όπου:

DK = καρποί με κίτρινο μεταχρωματισμό στο κέλυφος, DE = καρποί με σκούρο μεταχρωματισμό στο κέλυφος, DM = μικροί παραμορφωμένοι καρποί, DT = καρποί με εμφανή οπή από έντομα στο κέλυφος, DF = καρποί με προσκολλημένο τμήμα της φλούδας στο κέλυφος

L = μήκος, W = πλάτος, H = ύψος, Φ = σφαιρικότητα, S = επιφάνεια, M = μάζα, V_{app} = φαινόμενος όγκος, ρ_{app} = φαινόμενη πυκνότητα,

min = ελάχιστη τιμή, max = μέγιστη τιμή, mean = μέσος όρος, s = τυπική απόκλιση, N = συνολικός αριθμός μετρήσεων

SD: Σημαντική διαφορά (Significant Difference). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών των δειγμάτων για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά (οριζόντια σύγκριση κατά γραμμές).

4.4. Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό, προσδιορίστηκαν οι φυσικές ιδιότητες των κελυφωτών φιστικιών σε διάφορες περιεκτικότητες υγρασίας (1%-12% ξ.β.) και περιγράφηκαν οι σχετικές εξισώσεις, για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά. Κατασκευάστηκε επίσης, η ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης για ολόκληρο τον καρπό στους 25 °C, ώστε να περιγραφεί η σχέση της a_w με την περιεκτικότητα του προϊόντος σε υγρασία. Τα πειραματικά δεδομένα περιγράφηκαν πολύ καλά από το μοντέλο GAB και προσδιορίστηκαν οι τρεις παράμετροι του μοντέλου. Ακολουθώντας ένα νέο μοντέλο ταξινόμησης τεσσάρων παραμέτρων, η ισόθερμη καμπύλη υγρασίας χαρακτηρίστηκε ως σιμοειδής τύπου IIb βάσει της ταξινόμησης Yanniotis & Blahovec (2009), υποδεικνύοντας τη συμμετοχή και επίδραση του νερού ως διαλύτη, στα φαινόμενα ρόφησης στις υψηλές τιμές a_w . Στη συνέχεια, μελετώντας την επίδραση της υγρασίας στις διάφορες φυσικές ιδιότητες, παρατηρήθηκε θετική γραμμική συσχέτιση με όλες τις ιδιότητες που μετρήθηκαν, εκτός από τις χαρακτηριστικές παραμέτρους της υψής (F_y , E), την παράμετρο h^* του χρώματος και τη φαινόμενη πυκνότητα, στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση των τιμών τους, όσο αυξανόταν η υγρασία.

Αναζητώντας το καταλληλότερο χαρακτηριστικό για το διαχωρισμό των ελαττωματικών φιστικιών, μετρήθηκαν ορισμένες από τις παραπάνω ιδιότητες σε δείγματα κανονικών καρπών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης για λόγους αντιπροσωπευτικότητας της ποικιλίας. Σε αυτούς τους καρπούς, οι οποίοι έφεραν τα τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας «Αιγίνης» προσδιορίστηκε για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά, το εύρος των τιμών που καθορίζεται η κανονικότητα. Μετά από τις αντίστοιχες μετρήσεις στα ελαττωματικά, προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά εκείνα, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για το διαχωρισμό τους (δείκτες διαλογής). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι μία διαλογή με βάση το χρώμα, στο εύρος των τιμών L^* , C^* και h^* , όπως ορίστηκαν από τις μετρήσεις στα κανονικά, μπορεί να διαχωρίσει τις τρεις κατηγορίες DK, DE και DF. Επίσης, λόγω του ότι τα φιστίκια της κατηγορίας DM βρέθηκαν να αποκλίνουν σημαντικά ως προς το μέγεθος, το σχήμα και κυρίως το βάρος, ο διαχωρισμός τους μπορεί να βασιστεί σε αυτές τις ιδιότητες, εφόσον καθορίστηκε το αποδεκτό εύρος τιμών τους από τα κανονικά. Αντίστοιχα, ο όγκος έδειξε να είναι η πιο χαρακτηριστική φυσική ιδιότητα για το διαχωρισμό των ελαττωματικών φιστικιών της κατηγορίας DT, για την οποία όμως δε διαπιστώθηκαν μεγάλες αποκλίσεις από τα κανονικά, στις ιδιότητες που μετρήθηκαν.

Μηχανικά συστήματα διαλογής τα οποία να βασίζονται στο διαχωρισμό του χρώματος είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, όπως και συστήματα επεξεργασίας εικόνας. Ωστόσο, θα πρέπει να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητά τους σε μεγάλου όγκου δείγματα και σε ημι-εργαστηριακή κλίμακα, ρυθμίζοντας τους οπτικούς αισθητήρες των μηχανημάτων στο επιθυμητό εύρος τιμών των κανονικών φιστικιών, όπως ορίστηκε παραπάνω. Επιπλέον, ειδικά για τις κατηγορίες των μικρών-παραμορφωμένων καρπών ή των καρπών με τρύπα, οι οποίες φάνηκε ότι διαφέρουν σημαντικά ως προς τη μάζα και τον όγκο τους, θα ήταν ενδιαφέρον η δοκιμή διαλογής με ακουστικά συστήματα, τα οποία ήδη εφαρμόζονται σε κάποιες κατηγορίες καρπών, όπως περιγράφεται στην §1.4.2.2. Σε κάθε περίπτωση, η αποτελεσματικότητα και η αξιοπιστία ενός συστήματος διαλογής θα πρέπει να αξιολογείται παράλληλα με το κόστος εφαρμογής και την ευκολία στη χρήση.

4.5. Βιβλιογραφία

4.5.1. Ελληνική βιβλιογραφία

1. Αθανασόπουλος, Π.Ε. (2005). Αρχές ποιοτικού ελέγχου τροφίμων, Τεύχος 1, Αθήνα, Γ.Π.Α.
2. Γιαννιώτης, Σ. (2007). Μηχανική Τροφίμων, Μέρος 1ο: Φαινόμενα μεταφοράς στη μηχανική Τροφίμων, Αθήνα, Γ.Π.Α.
3. Κωσταρόπουλος, Α. (2005). Φυσικές Ιδιότητες Τροφίμων, Αθήνα, Γ.Π.Α.
4. Λαζαρίδης, Χ.Ν. (2007). Μηχανική Τροφίμων: Θεμελιώδεις έννοιες-φαινόμενα μεταφοράς-βασικές διεργασίες. 2^η έκδοση, Θεσσαλονίκη, Εκδ. Γιαχούδη.
5. Χιτζανίδου, Α., Μουρίκης, Π.Α., Χολέβας, Κ.Δ. (2004). Ασθένειες & Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα. Κηφισιά, Αθήνα, Εκδ. Μ.Φ.Ι.

4.5.2. Διεθνής βιβλιογραφία

1. Abbott, J.A. (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, **15**, 207–225.
2. Andrade, R.D.P, Lemus, R.M., Perez, C.E.C. (2011). Models of sorption isotherms for food: Uses and limitations. *Vitae, Revista de la Facultad de Quimica Farmaceutica*, **18**(3), 325-334.
3. Bayram, M. (2005). Determination of the sphericity of granular food materials. *Journal of Food Engineering*, **68**, 385–390.
4. Bee, S.C., & Honeywood, M. J. (2002). Colour sorting for the bulk food industry. In: *Colour in food Improving quality*, Edited by MacDougall, D.B., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 115-142.
5. Bellomo, M.G., Fallico, B. (2007). Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin. *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**, 352-359.
6. Beuchat, L.R. (1978). Relationship of water activity to moisture content in tree nuts. *Journal of Food Science*, **43**, 754-758.
7. Blahovec, J. (2004). Sorption isotherms in materials of biological origin. Mathematical and physical approach. *Journal of Food Engineering*, **65**, 489-495.
8. Blahovec, J., Yanniotis, S. (2008). GAB generalized equation for sorption phenomena. *Food and Bioprocess Technology*, **1**, 82-90.
9. Blahovec, J., Yanniotis, S. (2009). Modified classification of sorption isotherms. *Journal of Food Engineering*, **91**, 72-77.
10. Bourne, M.C. (1982). Sensory methods of texture and viscosity measurements. In: *Food texture and viscosity: Concept and Measurement*. N.Y. Academic Press, 27-278.

11. Brennan, J.G. (1980). Food Texture Measurement. In: *Developments in Food Analysis Techniques-2*. Edited by King, R.D., Applied Science Publishers, Essex, 1-78.
12. Brunauer, S., Deming, L.S., Teller, E. On a theory of Van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, **60**, 309-319.
13. Dobraszczyk, B. J., & Vincent, J. F.V. (1999). Measurement of mechanical properties of food materials in relation to texture: The materials approach. In: *Food Texture: Measurement and Perception*. Edited by Rosenthal, A.J., New York: Aspen, 99–151.
14. Figura, L.O., Teixeira, A.A. (2007). *Food Physics, Physical Properties – Measurement and Applications*. Springer, Berlin-Heidelberg.
15. Francis, F.J. (2005). Colorimetric properties of foods. In: *Engineering properties of foods*. Edited by Rao *et al.*, 3rd, CRC Press, U.S.A., 703-732.
16. Galedar, M.N., Mohtasebi, S.S., Tabatabaeefar, A., Jafari, A., Fadaei, H. (2009). Mechanical behavior of pistachio nut and its kernel under compression loading. *Journal of Food Engineering*, **95**, 499-504.
17. Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of standards – A. Physics and Chemistry*, **81A** (1), 89-96.
18. Hsien-Che, L. (2005). *Introduction to Color Imaging Science*, Cambridge University Press.
19. Hsu, M.H, Mannapperuma, J. D., Singh, R.P. (1991). Physical and thermal properties of pistachios. *Journal of Agricultural Engineering Research*, **49**, 311-321.
20. Hwang, M.P., & Hayakawa, K. (1980). Bulk density of cookies undergoing commercial baking processes. *Journal of Food Science*, **45**, 1400-1402.
21. Karathanos, V.T., & Saravacos, G.D. (1993). Porosity and pore size distribution of starch materials. *Journal of Food Engineering*, **18**, 259–280.
22. Kashaninejad, M., Mortazavi, A., Safekordi, A., Tabil, L.G. (2006). Some physical properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) nut and its kernel. *Journal of Food Engineering*, **72**, 30-38.
23. Labuza, T.P. (1971). Kinetics of lipidoxidation in foods. *Critical Reviews in Food Technology*, **2**, 355.
24. Lewicki, P.P. (2004). Water as the determinant of food engineering properties. A review. *Journal of Food Engineering*, **61**, 483-495.
25. MacDougall, D.B. (2002). Colour measurement of food: principles and practice. In: *Colour in food Improving quality*. Edited by MacDougall, D.B., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 33-63.
26. Maskan., M., Karatas, S. (1997). Sorption characteristics of whole pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *Drying Technology*, **15**(3&4), 1119-1139.
27. McCabe, W.L, Smith, J.C., & Harriot, P. (1993). *Unit Operations of Chemical Engineering*, 5th ed. Singapore, McGraw-Hill.

28. McGuire, R.G. (1992) Reporting of objective color measurements. *HortScience*, **27**, 1247-1255.
29. Mohsenin, N.N. (1970). Physical Properties of Plant and Animal Materials. New York, Gordon and Breach.
30. Pearson, T.C., Slaughter, D.C., Studer, H.C. (1994). Physical properties of pistachio nuts. *Transactions of the ASAE*, **37**(3), 913-918.
31. Pitts, B., Hamilton, M.A., Mc Fetters, G.A., Stewart, P.S., Willse, A., Zelver, N. (1998). Color measurement as a means of quantifying surface biofouling. *Journal of Microbiological Methods*, **34**, 143-149.
32. Polat, R., Aydin, C., & Ak, B.E. (2007). Some physical and mechanical properties of pistachio nut. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **13**, 237-246.
33. Pons, M., & Fiszman, S.M. (1996). Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of texture studies*, **27**, 597-624.
34. Rao, M.A., Rizvi, S.S.H., Datta, A.K. (2005). Engineering properties of foods. 3rd Ed., CRC Press, U.S.A.
35. Razavi, S.M.A., Emadzadeh, R.B., Rafe, A., Amini, A.M. (2007a). The physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety. Part I. Geometrical properties. *Journal of Food Engineering*, **81**, 209–217.
36. Razavi, S.M.A., Rafe, A., Moghaddam, M.T., Amini, A.M. (2007b). Physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety. Part II. Gravimetric properties. *Journal of Food Engineering*, **81**, 218–225.
37. Razavi, S.M.A., Amini, A.M., Rafe, A., Emadzadeh, R.B. (2007c). The physical properties of pistachio nut and its kernel as a function of moisture content and variety. Part III. Frictional properties. *Journal of Food Engineering*, **81**, 226–235.
38. Sabliov, C.M., Boldor, D., Keener, K.M., & Farkas, B.E. (2002). Image processing method to determine surface area and volume of axi-symmetric agricultural products. *International Journal of Food Properties*, **5**, 641–653.
39. Sahin, S., Sumnu, S.G. (2006). Physical Properties of Foods. Springer, U.S.A.
40. Sweat, V.E. (1995). Thermal properties of foods. In *Engineering Properties of Foods*. Edited by Rao, M.A., & Rizvi, S.S.H., 2nd Edition. New York, Marcel Dekker, 99–138.
41. Szczesniak, A.S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, **13**, 215-225.
42. Tsantili, E., Takidelli, C., Christopoulos, M.V., Lambrinea, E., Rouskas, D. & Roussos, P.A. (2010). Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistachia vera* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, **125**, 562-568.
43. Yanniotis, S. (1994). A new method for interpolating and extrapolating water activity data. *Journal of Food Engineering*, **21**, 81-96.
44. Yanniotis, S., Zarmboutis, I. (1996). Water sorption isotherms of pistachio nuts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **29**, 372-375.

45. Yanniotis, S., Blahovec, J. (2009). Model analysis of sorption isotherms. *LWT-Food Science and Technology*, **42**, 1688-1695.
46. Yazdani, M., Sazandehchi, P., Azizi, M., Ghobadi, P. (2006). Moisture sorption isotherms and isosteric heat for pistachio. *European Food Research and Technology*, **223**, 577-584.
47. Young, H.D. (1994). Πανεπιστημιακή Φυσική, Τόμος Α'- Μηχανική θερμοδυναμική, Εκδόσεις Παπαζήση.
48. Westland, S. (2002). Models of color perception and color appearance. In: *Colour in food Improving quality*. Edited by MacDougall, D.B., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 64-79.
49. Wolf, W., Spiess, W.E.L., Jung, G., Weisser, H., Bizot, H., Duckworth, R.B. (1984). The water-vapour sorption isotherms of microcrystalline cellulose and of purified potato starch. Results of a collaborative study. *Journal of Food Engineering*, **3**, 51-73.

Κεφάλαιο 5. Γενικά συμπεράσματα – Προτάσεις

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 5. Γενικά συμπεράσματα – Προτάσεις	230
Περιεχόμενα.....	230
5.1. Γενικά συμπεράσματα	231
5.2. Προτάσεις	235

5.1. Γενικά συμπεράσματα

Στην προσπάθεια να διερευνηθεί η δυνατότητα ανάπτυξης μεθόδου διαλογής των μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών μελετήθηκαν τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά τους, όπως περιγράφεται στα επιμέρους κεφάλαια της παρούσας διατριβής. Κοινός στόχος στη μελέτη αυτή ήταν να εντοπιστούν οι διαφορές που πιθανόν υπάρχουν, μεταξύ των υγιών και μολυσμένων καρπών, ώστε να αναγνωριστούν τα διακριτά εκείνα χαρακτηριστικά και να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μόλυνσης. Η βασική ιδέα είναι ότι η ίδια η διαδικασία της μόλυνσης, η οποία προϋποθέτει την παρουσία αφλατοξικογόνου στελέχους του μύκητα και την επαγωγή βιοσυνθετικών μονοπατιών δευτερογενούς μεταβολισμού, τόσο από την πλευρά του παθογόνου, όσο και από την πλευρά του ξενιστή (κελυφωτό φιστίκι) μπορεί να αλλοιώνει κάποιες από τις φυσικές ή χημικές ιδιότητες του προϊόντος με τέτοιο τρόπο και σε τέτοιο βαθμό, ώστε να γίνονται αντιληπτές. Το αρωματικό, πτητικό προφίλ των προϊόντων είναι ένα χαρακτηριστικό πεδίο, στο οποίο αποτυπώνονται πολλές από τις βιοχημικές μεταβολές που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της μόλυνσης και συνεπώς περιλαμβάνεται στη μελέτη.

Θα πρέπει όμως να ληφθεί υπ' όψιν, ότι φιστίκια τα οποία προέρχονται από τη συγκομιδή, με αλλοιωμένα τα φυσικά τους μακροσκοπικά χαρακτηριστικά, είτε λόγω προσβολής από παθογόνα και εχθρούς είτε λόγω μηχανικού τραυματισμού ή φυσιολογικής ανωμαλίας κατά την ανάπτυξη, έχουν πολύ υψηλή πιθανότητα να είναι μολυσμένα με αφλατοξίνη. Συνεπώς, το πεδίο αναζήτησης εργαλείων διαλογής σε αυτή την περίπτωση, των ελαττωματικών, όπως αναφέρονται καρπών, είναι διαφορετικό και στοχεύει στη μείωση της αφλατοξίνης με έμμεσο τρόπο, απαλλάσσοντας τη συνολική παρτίδα από τους ποιοτικά υποβαθμισμένους, «ύποπτους» για αφλατοξίνη καρπούς. Ωστόσο, η διαθέσιμη βιβλιογραφία για τις φυσικές ιδιότητες των κελυφωτών φιστικιών της ελληνικής ποικιλίας «Αιγίνης» είναι πολύ περιορισμένη. Γι' αυτό, κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί ένα μεγαλύτερο εύρος φυσικών ιδιοτήτων, οι οποίες είναι απαραίτητες όχι μόνο για το διαχωρισμό των ελαττωματικών, μη-τυπικών της ποικιλίας καρπών, αλλά και για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη οποιασδήποτε μηχανικής διεργασίας.

Για την ορθότερη και πιο ολοκληρωμένη εικόνα των διαφορών ανάμεσα στα υγιή και μολυσμένα φιστίκια, λήφθηκαν υπ' όψιν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό, κάποιες παράμετροι, οι οποίες μπορεί να επιδρούν στις χημικές και φυσικές ιδιότητες,

ανεξάρτητα από την παρουσία της αφλατοξίνης, όπως η φυσική μικροχλωρίδα, η παρουσία μη-τοξικογόνων στελεχών του είδους *A. flavus*, η εμφάνιση διαφόρων τύπων ελαττωμάτων στους καρπούς και η φυσική παραλλακτικότητα στα χαρακτηριστικά των υγιών, κανονικών φιστικιών, ακόμα και εντός της ίδιας ποικιλίας, η οποία οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιπλέον, λόγω του ότι ο χρόνος και ο τρόπος παραγωγής της αφλατοξίνης μπορούν να επηρεάσουν ποιοτικά και ποσοτικά τις μεταβολές, συμπεριλήφθηκαν ως παράγοντες στην επιλογή των δειγμάτων.

Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκαν το πτητικό προφίλ και ορισμένες χημικές και φυσικές ιδιότητες, σε διαφορετικής προέλευσης, αλλά ίδιας ποικιλίας δείγματα κελυφωτών φιστικιών. Στα δείγματα αυτά, περιλαμβάνονταν φιστίκια (α) υγιά, τυπικά της ποικιλίας «Αιγίνης», (β) μολυσμένα με διαφορετικό τρόπο με αφλατοξίνη (τεχνητό ή φυσικό) (γ) και ελαττωματικά, με μη-τυπικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας. Στην περίπτωση της μελέτης του πτητικού προφίλ, συμπεριλήφθηκε και μια ομάδα δειγμάτων φιστικιών, τα οποία ήταν τεχνητά μολυσμένα με το παθογόνο είδος, αλλά δεν υπήρχε αφλατοξίνη (μη-τοξικογόνα στελέχη του *A. flavus*), λόγω της ιδιαιτερότητας και συνθετότητας που υπάρχει στην περιγραφή των πτητικών ενώσεων, όπως εξηγείται με λεπτομέρεια στην §2.1.1.

Μελετώντας τις επιμέρους φυσικές και χημικές ιδιότητες προσδιορίστηκαν ορισμένες διαφορές και σε κάποιες περιπτώσεις, ιδιαίτερα χαρακτηριστικές, ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός των υγιών από τα μολυσμένα και ελαττωματικά φιστίκια. Πιο συγκεκριμένα, από τη μελέτη του πτητικού προφίλ απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 72 πτητικές ουσίες συνολικά, με χαρακτηριστική την παρουσία αλκοολών, κετονών, αλδεϋδών, εστέρων, υδρογονανθράκων και μονοτερπενίων. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των υγιών και των μολυσμένων αφορούν αλκοόλες, κετόνες και αλδεϋδες με οκτώ άτομα άνθρακα (C-8), κάποιες ενώσεις από την τάξη των σεσκιτερπενίων, καθώς επίσης και τις ουσίες 1-πεντανόλη, 1-επτανόλη, επτανάλη, 2-επτενάλη, 2-δεκενάλη, βενζαλδεϋδη και βενζακεταλδεϋδη, οι οποίες σχετίζονται κυρίως με τα μολυσμένα δείγματα. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι κοινές σε πολλούς μύκητες και όχι χαρακτηριστικές για τα είδη των *Aspergillus* ή ακόμα περισσότερο για τα τοξικογόνα στελέχη τους. Παρ'όλα αυτά, στην ανάλυση των δεδομένων από τα αποτελέσματα του πτητικού προφίλ κατά συστάδες (cluster analysis), τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις συστάδες, οι

οποίες αντιστοιχούσαν ακριβώς στις τέσσερις ομάδες που μελετήθηκαν (Σχήμα 33), υποδεικνύοντας ότι το πτητικό προφίλ, όπως περιγράφηκε σε αυτή την εργασία, μπορεί να αποτελέσει εργαλείο διαχωρισμού των υγιών από τα μολυσμένα. Θέλοντας να αναγνωριστούν περαιτέρω οι κατάλληλοι «πτητικοί» δείκτες, οι οποίοι σχετίζονται με τη μόλυνση με αφλατοξίνη, εφαρμόστηκε η διακριτική ανάλυση (discriminant analysis). Χρησιμοποιώντας ως δείκτες μόλυνσης (μεταβλητές πρόβλεψης του μοντέλου) τις πτητικές ενώσεις των C-8 αλκοολών και αλδευδών, τα σεσκιτερπένια, τα μονοτερπένια και τις ενώσεις: βενζαλδεϋδη, βενζακεταλδεϋδη, 1-επτανόλη, επτανάλη και 2-επτενάλη επιτεύχθη ένας πολύ καλός διαχωρισμός των υγιών δειγμάτων από τα μολυσμένα (Σχήμα 35) και παράλληλα το 82-100% των δειγμάτων ταξινομήθηκε σωστά στις ομάδες από τις οποίες προέρχονταν.

Όσον αφορά το χημικό προφίλ, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υγιών, των μολυσμένων και των ελαττωματικών φιστικιών, συγκρίνοντας κάθε ένα επιμέρους χημικό χαρακτηριστικό. Εξαίρεση αποτέλεσε η περιεκτικότητα σε ολικό λίπος, του οποίου η εκατοστιαία περιεκτικότητα ήταν ελαφρώς μειωμένη στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα και σε μια κατηγορία ελαττωματικών φιστικιών (DF: φιστίκια με προσκολλημένο τμήμα φλούδας στο κέλυφος). Αντίστοιχα, το προφίλ των λιπαρών οξέων ήταν όμοιο σε όλες τις ομάδες περιλαμβάνοντας το μυριστικό, παλμιτικό, παλμιτελαϊκό, στεαρικό, ελαϊκό, λινελαϊκό, Α-λινολενικό, αραχιδικό, γονδοϊκό και βεχενικό οξύ. Αν και η εκατοστιαία περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων δε φάνηκε να αλλάζει σημαντικά μεταξύ των υγιών, των μολυσμένων και των ελαττωματικών, επισημάνθηκε μια τάση αύξησης της περιεκτικότητας σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο στα μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα, όσο και στα δείγματα των ελαττωματικών φιστικιών, όπως προσδιορίζεται κυρίως από το δείκτη TUFA:TS. Οι ενδείξεις αυτές παραπέμπουν σε φαινόμενα αλληλεπίδρασης ξενιστή – παθογόνου και στους αντίστοιχους βιοχημικούς μηχανισμούς άμυνας – επίθεσης που αναπτύσσονται και από τις δύο πλευρές, σε επίπεδο δευτερογενούς μεταβολισμού. Εφαρμόζοντας και σε αυτή την περίπτωση την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) στα πρωτογενή δεδομένα μετρήσεων διαπιστώθηκε ότι το προφίλ των λιπαρών οξέων ήταν η κύρια αιτία της υπάρχουσας παραλλακτικότητας μεταξύ των ομάδων (υγιά, μολυσμένα, ελαττωματικά). Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ως κριτήρια ταξινόμησης (μεταβλητές πρόβλεψης του μοντέλου), το σύνολο των χημικών ιδιοτήτων που

αξιολογήθηκαν, τα δείγματα διαχωρίστηκαν στις επιμέρους ομάδες και ταξινομήθηκαν σωστά, στο 90% των περιπτώσεων, εφαρμόζοντας διακριτική ανάλυση (DA). Η ανάλυση έδειξε ότι τα κριτήρια με την υψηλότερη βαρύτητα στο διαχωρισμό ήταν η σύνθεση των λιπαρών οξέων και πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του ελαίου του φιστικιού σε MUFA, PUFA, TUFA και λινελαϊκό οξύ (Σχήμα 53,54).

Στο πλαίσιο μελέτης των φυσικών ιδιοτήτων των κελυφωτών φιστικιών κατασκευάστηκε η ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης υγρασίας για ολόκληρο τον καρπό στους 25 °C. Τα πειραματικά δεδομένα περιγράφηκαν πολύ καλά από το μοντέλο GAB και προσδιορίστηκαν οι τρεις παράμετροι του μοντέλου, ενώ παράλληλα, η ισόθερμη καμπύλη υγρασίας χαρακτηρίστηκε και ταξινομήθηκε ως σιγμοειδής τύπου IIb, ακολουθώντας το μοντέλο Yanniotis & Blahovec (2009). Με βάση τα πειραματικά δεδομένα της υγρασίας προσδιορίστηκαν οι φυσικές ιδιότητες σε διάφορες περιεκτικότητες (1%-12% ξ.β.) και περιγράφηκαν οι σχετικές εξισώσεις, για κάθε ιδιότητα ξεχωριστά. Για την πλειοψηφία των φυσικών ιδιοτήτων που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε θετική γραμμική συσχέτιση, με εξαίρεση τις χαρακτηριστικές παραμέτρους της υψής (Fy, E), την παράμετρο h* του χρώματος και τη φαινόμενη πυκνότητα, στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση των τιμών τους, όσο αυξανόταν η υγρασία. Στη συνέχεια, προσδιορίζοντας το εύρος των τιμών της κάθε φυσικής ιδιότητας στους κανονικούς καρπούς έγινε σύγκριση με τα αποτελέσματα των μετρήσεων των αντίστοιχων ιδιοτήτων στους ελαττωματικούς και εντοπίστηκαν οι σημαντικές διαφορές. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι μία διαλογή με βάση το χρώμα, στο εύρος των τιμών L*, C* και h*, όπως ορίστηκαν από τις μετρήσεις στα κανονικά, μπορεί να διαχωρίσει τις κατηγορίες ελαττωματικών καρπών με μεταχρωματισμούς στο κέλυφος (κίτρινος, σκούρος) και καρπών με προσκολλημένο τμήμα της φλούδας στο κέλυφος. Επίσης, λόγω του ότι τα μικρά-παραμορφωμένα φιστίκια βρέθηκαν να αποκλίνουν σημαντικά ως προς το μέγεθος, το σχήμα και κυρίως το βάρος, ο διαχωρισμός τους μπορεί να βασιστεί σε αυτές τις ιδιότητες, εφόσον καθορίστηκε το αποδεκτό εύρος τιμών τους από τα κανονικά. Ωστόσο, στην κατηγορία των ελαττωματικών φιστικιών με τρύπα στο κέλυφος δε διαπιστώθηκαν μεγάλες αποκλίσεις από τα κανονικά, στις ιδιότητες που μετρήθηκαν, με εξαίρεση τον όγκο.

5.2. Προτάσεις – Επόμενα βήματα

Συνοψίζοντας, μπορεί να ειπωθεί ότι η διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών στη βάση των διαφορών που μπορεί να υπάρχουν σε φυσικο-χημικό επίπεδο ακολουθεί μία ολιστική προσέγγιση. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των χαρακτηριστικών που μελετήθηκαν έδειξαν ότι καμμία επιμέρους ιδιότητα δεν είναι ικανή να περιγράψει από μόνη της την υπαρκτή διαφορά, μεταξύ αυτών που έχουν αφλατοξίνη (μολυσμένα) και αυτών που δεν έχουν (υγιή). Ωστόσο, ο συνδυασμός ορισμένων χαρακτηριστικών μπορεί να περιγράψει αρκετά ικανοποιητικά τη διαφορετικότητα, επιβεβαιώνοντας το Αριστοτελικό δόγμα ότι «το όλον είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των μερών του» (Αριστοτέλης, 384-322 π.Χ., *Μετά τα φυσικά*). Μέσω της πολυμεταβλητής στατιστικής προσέγγισης φάνηκε ότι τόσο το πτητικό προφίλ, συνδυάζοντας την παρουσία κάποιων πτητικών ενώσεων, όσο και το χημικό προφίλ, εστιασμένο στο λίπος και στα λιπαρά οξέα, θα μπορούσαν να είναι ένα ενδεχόμενο κριτήριο ή δείκτης διαχωρισμού των υγιών από τα μολυσμένα με αφλατοξίνη και δευτερευόντως από τα ελαττωματικά φιστίκια, τα οποία λόγω των μακροσκοπικών διαφορών οι οποίες ποσοτικοποιήθηκαν, να είναι πιο εφικτό να διαχωριστούν στη βάση ενός και μόνο χαρακτηριστικού (π.χ. χρώμα). Συνεπώς, η έννοια του δείκτη της μόλυνσης με αφλατοξίνη, στον οποίο μπορεί να βασιστεί μία μέθοδος διαλογής, φαίνεται να εμπεριέχει ένα συνδυασμό χαρακτηριστικών, τα οποία έχουν μεταβληθεί λόγω της παραγωγής της αφλατοξίνης και μάλιστα σε τέτοιο βαθμό ώστε να μπορούν να εντοπιστούν.

Προς αυτή την κατεύθυνση και με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα των φυσικο-χημικών χαρακτηριστικών μπορεί να σχεδιαστεί το πλαίσιο των επόμενων βημάτων. Όσον αφορά το πτητικό προφίλ, είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί ότι οι πτητικές ενώσεις – δείκτες που περιγράφηκαν παραπάνω, παράγονται και από άλλα τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *A. flavus*. Αντίστοιχα, το λιπαρό προφίλ θα πρέπει να μελετηθεί και σε μολυσμένους καρπούς από διαφορετικά είδη αφλατοξικογόνων μυκήτων, αλλά και μη-τοξικογόνων στελεχών. Σε επόμενο στάδιο επίσης, εστιάζοντας περαιτέρω στα λιπίδια του προϊόντος, μία μελέτη που θα αφορά στο προφίλ των τριγλυκεριδίων, την περιεκτικότητα σε φυτοστερόλες και αντιοξειδωτικές ουσίες, σε υγιή, μολυσμένα και ελαττωματικά φιστίκια, ακολουθώντας την ίδια προσέγγιση του προσδιορισμού κριτηρίων ή «δεικτών» διαλογής, θα φώτιζε πολύπλευρα το θέμα. Επιπλέον, η ανάλυση του προφίλ των αμινοξέων θα μπορούσε

να συμβάλλει στην πληρέστερη περιγραφή της χημικής κατάστασης των μολυσμένων κελυφωτών φιστικιών, λαμβάνοντας υπ' όψιν και το γεγονός ότι τα αμινοξέα αποτελούν εναρκτήριοιες ουσίες σε πολλά βιοσυνθετικά μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού, με τελικά προϊόντα τοξίνες και διάφορες πτητικές ενώσεις, οι οποίες μεταβάλλουν το πτητικό προφίλ. Σε κάθε περίπτωση, η αποτελεσματικότητα των παραπάνω «πτητικών» ή «λιπαρών» δεικτών, στο διαχωρισμό των μολυσμένων φιστικιών, θα πρέπει να ελεγχθεί σε ένα μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων του εμπορίου, τα οποία έχουν απορριφθεί λόγω παρουσίας αφλατοξινών πάνω από το νομοθετικό όριο.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω συμπεράσματα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση να μελετηθεί η απεικόνιση των μολυσμένων με αφλατοξίνη φιστικιών σε φάσμα εκτός του ορατού όπως, σε NIR ή FT-IR φάσμα ή ακόμα και σε μία πολυφασματική απεικόνιση. Προς την ίδια κατεύθυνση, η απεικόνιση με την τεχνική της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), η οποία χρησιμοποιείται για τη λήψη χημικών και δομικών πληροφοριών για ένα υλικό, όπως τα τρόφιμα (π.χ. έλεγχος νοθείας ελαιολάδου), θα μπορούσε να αποτελεί ένα ενδεχόμενο πεδίο έρευνας του προβλήματος. Μέσα στο παραπάνω πλαίσιο έρευνας, έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια ηλεκτρονικοί αισθητήρες, όπως η τεχνολογία της «ηλεκτρονικής μύτης», βιο-αισθητήρες (τεχνολογία lab on-a-chip), φορητές συσκευές GC-MS, με εφαρμογές στα τρόφιμα, στη γεωργία και στο περιβάλλον. Σε κάθε τέτοια εφαρμογή, το ερώτημα που προκύπτει είναι ο βαθμός αποτελεσματικότητας και αξιοπιστίας των δεικτών μόλυνσης, στους οποίους βασίζεται η τεχνολογία αυτή, για το διαχωρισμό των μολυσμένων με τοξίνες προϊόντων, σε πραγματικό χρόνο. Η συνεχής έρευνα των βιοχημικών μηχανισμών του δευτερογενούς μεταβολισμού, η επαναληψιμότητα του πτητικο-χημικού αυτού μοτίβου στο χρόνο και σε διάφορες συνθήκες, καθώς και ο πειραματισμός με σύγχρονα τεχνολογικά εργαλεία για την περιγραφή αυτού του μοτίβου και την ανάδειξη των κατάλληλων δεικτών μόλυνσης είναι η απάντηση σε αυτής της μορφής τις προσεγγίσεις.

Ιούλιος 2015

Μαρία Γεωργιάδου

Θυμάτων Κατοχής 45,
Αμφιάλη - Πειραιάς, 18757

Τηλ. 6947299087
m.georgiadiou@aua.gr

Επαγγελματικό προφίλ

Γεωπόνος, Φυτ.Παραγωγής Ειδ.Φυτοπροστασίας,
MSc Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων,
Υποψήφια Διδάκτορας στην Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων, Γ.Π.Α
(με υποτροφία Ι.Κ.Υ.)

Εργ. Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργ. Προϊόντων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ/ση Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής Π.Ε.Πειραιά

- Τμήμα Ποιοτικού & Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου Τροφίμων
- Έλεγχοι Επιχειρήσεων Τροφίμων

Επιθεωρητής Συστημάτων Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων
(GLOBALGAP, AGRO 2-1,2-2, ISO 22000, HACCP, BRC, IFS, ISO 9001)

- Πιστοποίηση IRCA

Αξιολογήτρια Γ' ΚΠΣ

- Συγχρηματοδοτούμενων Ενεργειών ΕΓΤΠΕ
- Περιφέρεια Αττικής, Πελοποννήσου, Β.Αιγαίου

Εκπαιδύτρια Ενηλίκων Αγροτικού Τομέα – Τομέας Τροφίμων

- Πιστοποίηση ΕΚΕΠΙΣ
- Μητρώο Εκπαιδευτών ΟΑΕΔ

Εκπαίδευση –Σπουδές

2009-2012, Υποτροφία ΙΚΥ – Υλοποίηση Διδακτορικής Μελέτης με Θέμα: «Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών με σκοπό τη μείωση αφλατοξίνης»

6^{ος}-7^{ος}/2012 - 2μηνη μετεκπαίδευση στις Η.Π.Α. στο πλαίσιο υλοποίησης της Διδακτορικής Διατριβής, Εργ. Μείωσης Αφλατοξινών, Πανεπιστήμιο Αριζόνα - U.S.D.A

2008, 6-μηνο Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα Ειδίκευσης στην Ασφάλεια Τροφίμων,

- From Farm to Fork, F4ST, Leonardo Da Vinci

2007-2009, ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,

- Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων:
«Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων»

1993-1998, ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ,

- Πτυχίο Φυτικής Παραγωγής Ειδ. Φυτοπροστασίας

Υποτροφίες – Βραβεύσεις - Διακρίσεις

- 2010-2013, Υπότροφος Ι.Κ.Υ. για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής
- 2014, Απονομή βραβείου καλύτερης παρουσίασης στο 3^ο Διεθνές Συνέδριο του ISEKI «Food Science & Technology excellence for a sustainable bioeconomy», 21-23 Μαΐου στην Αθήνα, το οποίο περιλάμβανε και χρηματική αμοιβή (500€) από τον εκδοτικό οίκο Elsevier.

Ιστορικό απασχόλησης

1998-2000, Τεχνικό Τμήμα, Εγκρίσεις Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων, Bayer Hellas ABEE, Αθήνα

2000-2002, Τμήμα Marketing – Διαφήμιση, Bayer Hellas ABEE, Αθήνα

2002-2006, Νομαρχία Πειραιά – Δ/ση Γεωργίας, Γραφείο Φυτοπροστασίας, Δενδροκομίας - Ανθοκομίας

2006-2011, Νομαρχία Πειραιά - Δ/ση Αγρ.Οικονομίας – Τμήμα Φυτοπροστασίας, Ποιοτικού & Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου

2011 - 2013, Περιφέρεια Αττικής - Δ/ση Αγρ. Οικονομίας & Κτηνιατρικής Π.Ε. Πειραιά, Τμήμα Ποιοτικού & Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου

2013-2015, Εργ. Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργ. Προϊόντων

Άλλα Πτυχία

- Μουσική – Δίπλωμα Βυζαντινής Μουσικής

Ξένες Γλώσσες

- Αγγλικά – Proficiency Certificate of Cambridge

Δημοσιεύσεις

- Μονογραφίες

1. Γεωργιάδου Μ. (2009). *Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια*. MSc Thesis, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Εργ. Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργ. Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Γεωργιάδου Μ. (1998). *Επίδραση της δ.ο. imazapyr στον μύκητα Ustilago maydis*. BSc Thesis, Πτυχιακή μελέτη, Εργ.Φαρμακολογίας, Τμήμα Φυτ. Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Σε επιστημονικά περιοδικά

1. M. Georgiadou, Chr. Gardeli, M. Komaitis, D.I. Tsitsigiannis, E.J. Paplomatas, K. Sotirakoglou and S.Yanniotis (2015). Volatile profiles of healthy and aflatoxin contaminated pistachios. Food Research International (74) p.89-96.
2. M. Georgiadou, A. Dimou, S. Yanniotis (2012). *Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study*. Food Control (26) p.580-586
3. M. Georgiadou, A. Proshlyakov, A. Revithi, S. Tjamos, I. Stringlis, D.

- Tsitsigiannis, E. Paplomatas, J. Blahovec, S. Yanniotis (2012). *Detection of insect necrotic internal damage and aflatoxin reduction in stored pistachio nuts*. IOBC-WPRS Bulletin, Vol. 81 p.21-29
4. Yanniotis S., Proshlyakov A., Revithi A., Georgiadou M., Blahovec J. (2011). *X-ray imaging for fungal necrotic spot detection in pistachio nuts*. Procedia – Food Science (1) p.379–384
 5. Tsitsigiannis, D.I., Georgiadou, M., Agoritsis, S., Zakynthinos, G., Varzakas, T.H., Tjamos, S., Antoniou, P., Dimakopoulou, M., Karnavas, G., Paplomatas, E., Gianniotis, S., & Tjamos, E.C. (2010). *Ecology, epidemiology and control of Aspergillus spp. in pistachio orchards in Greece*. 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 20-25 June 2010, Rome, Italy. Petria 20:95-96.

Παρουσιάσεις (προφορικές) σε επιστημονικά συνέδρια

1. M. Georgiadou, Chr. Gardeli, M. Komaitis, D.I. Tsitsigiannis, E.J. Paplomatas and S.Yanniotis. *Study of physical and chemical properties of dried pistachio as a sorting tool of aflatoxin contaminated nuts*. 3rd ISEKI International Conference «Food Science & Technology excellence for a sustainable bioeconomy», Athens-Greece, May 21-23, 2014.
2. Yanniotis S. and Georgiadou M. *Aflatoxin in Food and Feed: Food safety issues and control* (2013). 5th International Conference TAE. In Conference Proceedings pp.33-39, Prague, September 2013.
3. Γεωργιάδου Μ., Αγορίτσης, Σ.Π., Βήχου, Κ., Βαρδουσιώτης Γ., Γιαννιώτης Σ., Παπλωματάς Ε.Ι., Cotty P.J. και Δ.Ι. Τσιτσιγιάννης. *Γενετικός και μοριακός χαρακτηρισμός και αξιολόγηση ελληνικών μη-τοξικογόνων απομονώσεων του γένους Aspergillus για την επιλογή τους ως παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης των αφλατοξινών*. (α) 16ο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 16-18 Οκτωβρίου (β) 5ο Συνέδριο της Επιστημονικής Εταιρείας «ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ», Αθήνα, 13-16 Δεκεμβρίου, 2012.
4. Antonopoulos DF, Georgiadou M., Agoritsis SP, Gianniotis S., Tsitsigiannis DI. *Biological control of the toxigenic fungus Aspergillus flavus and aflatoxins that are produced to the shelled pistachio nuts “Aiginis”*. 2^o Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Αθήνα, 4-5 Οκτωβρίου, 2012.
5. M. Georgiadou, A. Proshlyakov, A. Revithi, S.Tjamos, I. Stringlis, D.Tsitsigiannis, E.Paplomatas, J. Blahovec , S. Yanniotis. *Detection of insect necrotic internal damage and aflatoxin reduction in stored pistachio nuts*. Conference of the IOBC/WPRS (OILB/SROP) Working Group on “Integrated Protection of Stored Products” Volos, Greece, July 4-7, 2011.
6. Yanniotis S., Proshlyakov A., Revithi A., Georgiadou M., Blahovec J. *X-ray imaging for fungal necrotic spot detection in pistachio nuts*. International Conference on Engineering and Food, Athens, May 22-26, 2011.
7. Tsitsigiannis D.I., M. Georgiadou, S. Agoritsis, G. Zakynthinos, T.H. Varzakas, S. Tjamos, P. Antoniou, M. Dimakopoulou, G. Karnavas, E. Paplomatas, S. Yanniotis, E.C. Tjamos. *Occurrence and management of mycotoxins and toxigenic fungi in grapes and pistachio nuts in Greece*. MYCORED International Workshop: “Mycotoxicological Risks in Mediterranean Countries: Economic Impact, Prevention, Management and Control”, In conference proceedings, p. 29-30. Cairo, Egypt, October 25-27, 2010.
8. Tsitsigiannis D.I., Georgiadou M., Agoritsis S., Zakynthinos G., Varzakas T.H., Tjamos S., Antoniou P., Dimakopoulou M., Karnavas G., Paplomatas E., Gianniotis S. and Tjamos E.C. *Ecology, epidemiology and control of Aspergillus spp. in pistachio orchards in Greece* . 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Rome-Italy, June 20-25 2010.
9. Voyatzidaki Zoi, Georgiadou M., Yanniotis St. *A study of Aflatoxin*

Ανακοινώσεις σε poster

1. M. Georgiadou, A. Dimou, S. Tzamos, E. Paplomatas and S. Yanniotis. *Aflatoxin contamination and Aspergillus occurrence in stored pistachios in Greece*. Conference of the IOBC/WPRS (OILB/SROP) Working Group on “Integrated Protection of Stored Products” Volos, Greece, Ιούλιος 4-7, 2011.
2. Georgiadou M., Dimou A., Tzamos S., Paplomatas E. and Yanniotis S. *Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study*. Proceedings of the 1st International Symposium for Mycotoxins, Tulln – Austria, Σεπτέμβριος 9-11, 2009.

Παρουσιάσεις – Ομιλίες

1. Γεωργιάδου Μαρία «Από τον ελαιώνα στο λιοτρίβι - Η συμβολή της γεωργικής πρακτικής στην παραγωγή ποιοτικού ελαιολάδου». 2^ο Φεστιβάλ Δήμου Σητείας σε συνεργασία με το ΤΕΙ Κρήτης (Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας) με θέμα: Τοπικά προϊόντα – Διατροφικές και Θεραπευτικές Ιδιότητες, στο πλαίσιο της ενέργειας 2.4 του έργου «ΤΟΠΩΝ ΕΥΦΟΡΙΑ», Σητεία – Κρήτη, 18-28 Ιουνίου, 2013.
2. Γεωργιάδου Μ., Γιαννιώτης Σ. «Αντιμετώπιση του προβλήματος της κηλίδωσης της ψίχας των φιστικιών με ακτίνες Χ». 2^η Ημερίδα Κελυφωτού Φιστικιού Fistiki Fest, Αίγινα, 17 Σεπτεμβρίου, 2011.
3. Γεωργιάδου Μ., Δήμου Α. & Γιαννιώτης Σ. «Μελέτη των αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια στην Ελλάδα» 1^η Διημερίδα Κελυφωτού Φιστικιού, Αίγινα, 8-9 Απριλίου 2011.
4. Γεωργιάδου Μ. «Ποιότητα & Ασφάλεια στην Πρωτογενή Παραγωγή» 1^η Διημερίδα Κελυφωτού Φιστικιού, Αίγινα, 8-9 Απριλίου 2011.
5. Γιαννιώτης Σ., Γεωργιάδου Μ. Τα κελυφωτά φιστίκια: Προβλήματα και προοπτικές. Φεστιβάλ Κελυφωτού Φιστικιού, Αίγινα, Σεπτέμβριος 2010.
6. Γεωργιάδου Μ. «Φυτοφάρμακα – Οι γνωστές άγνωστες ουσίες» Φεστιβάλ Κελυφωτού Φιστικιού, Αίγινα, Σεπτέμβριος 2009.

Ερευνητική – Επιστημονική Δραστηριότητα

- Επιστημονικός Συνεργάτης στο ερευνητικό Πρόγραμμα του ΓΠΑ «Μελέτη των αφλατοξινών στα κελυφωτά φιστίκια» 2006, 2008-2009
- Οργάνωση 1^{ης} Πανελλήνιας Διημερίδας Ανθοκομίας στην Τροιζηνία, 13-14/5/2006
- Επιστημονικό πρόγραμμα του ΓΠΑ με θέμα «Μελέτη γονιμότητας, αλατότητας και θρεπτικής κατάστασης των φιστικιών στην Αίγινα», Ιούνιος 2004