



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΠΜΣ ‘ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ’**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΕ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ**

ΕΙΡΗΝΗ ΛΙΟΛΙΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Εξεταστική επιτροπή:

ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΝΥΧΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ-ΙΩΑΝΝΗΣ

ΔΡΟΣΙΝΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ

ΚΩΜΑΪΤΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΠΑΝΑΓΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2009

**Αφιερώνεται στην οικογένειά μου
και όλα τα αγαπημένα μου πρόσωπα**

Ευχαριστίες

Θεωρώ υποχρέωσή μου, τώρα που η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη ολοκληρώθηκε, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην περάτωσή της.

Συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, λέκτορα του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων για την πολύτιμη συμβολή του στην δομή, οργάνωση και διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης, τους κύριους Νυχά Γεώργιο-Ιωάννη, καθηγητή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Δροσινό Ελευθέριο, επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, Κωμαΐτη Μιχαήλ, καθηγητή του Εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, καθώς και τον κ. Πανάγου Ευστάθιο, λέκτορα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, στους συμφοιτητές μου και στους φίλους μου, κυρίως όμως στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Αθήνα 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ		Σελίδα
ΕΙΣΑΓΩΓΗ		1
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		3
1.	ΖΥΜΕΣ-ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	3
1.1	Μικροοργανισμοί που απαντώνται στα τρόφιμα	4
1.1.1	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	6
1.1.1.1	Πηγές των βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα	6
1.1.1.2	Σύντομη περιγραφή των κυριότερων γενών των βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα	10
1.1.2	ΖΥΜΕΣ	18
1.1.2.1	Κυριότερα γένη ζυμών που απαντώνται στα τρόφιμα	19
1.1.2.2	Σύντομη περιγραφή των κυριότερων γενών των ζυμών που απαντώνται στα τρόφιμα	20
1.1.2.3	Ομάδες ζυμών	24
1.2	Ο ρόλος των γαλακτικών βακτηρίων στα ζυμούμενα τρόφιμα	25
1.3	Ο ρόλος των ζυμών στα ζυμούμενα τρόφιμα	29
2.	ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	30
2.1	Λίγα λόγια γενικά για τις μυκοτοξίνες	31
2.2	Ωχρατοξίνη Α και Ωχρατοξινογόνα γένη μυκήτων	35
2.3	Φυσικοχημικές ιδιότητες ωχρατοξίνης Α	38
2.4	Τοξικότητα ωχρατοξίνης Α	39
3.	ΑΠΟΤΟΞΙΚΩΣΗ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α	43
3.1	Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης Α από είδη του γένους <i>Aspergillus</i>	44
3.2	Βακτηριακή διάσπαση ωχρατοξίνης Α	47
3.3	Διάσπαση ωχρατοξίνης Α σε εδαφικά-φυσικά υποστρώματα	49
3.4	Επίδραση των ζυμών στη συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α	50
3.5	Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης Α από γαλακτικά βακτήρια	52
3.5.1	Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης Α από είδη του γένους <i>Bacillus</i>	55
3.6	Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης Α από είδη του γένους <i>Rhizopus</i>	58
4.	ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ	61
4.1	Παρουσία της ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα	62

5.	ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	66
5.1	Νομοθεσία μυκοτοξινών και ειδικότερα ωχρατοξίνης A	67
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	70
6.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	70
6.1	Υλικά και μέθοδοι	71
6.1.1	Ζύμες και γαλακτικά βακτήρια	71
6.1.1.1	Μεμονωμένα στελέχη και κοκτέιλ ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων	75
6.1.2	Ανανέωση ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων	77
6.1.2.1	Προσδιορισμός αρχικού μικροβιακού φορτίου σε τρυβλία Petri	78
6.1.3	Παρασκευή εργαστηριακών θρεπτικών υποστρωμάτων ανάπτυξης	80
6.1.4	Πρότυπο ωχρατοξίνης A (OTA) και χημικά αντιδραστήρια	82
6.1.4.1	Πρότυπο ωχρατοξίνης A (OTA)	82
6.1.4.2	Χημικά αντιδραστήρια	82
6.2	Πειραματικός σχεδιασμός	84
6.2.1	Μέρη πειράματος	84
6.2.2	Προσδιορισμός της ωχρατοξίνης A	111
6.2.2.1	Καθαρισμός των δειγμάτων	111
6.2.2.2	Λίγα λόγια για τη συσκευή της HPLC	114
6.2.2.3	Ποσοτική ανάλυση με χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	116
6.2.2.4	Στατιστική επεξεργασία	119
7.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	121
7.1	Παρουσίαση αποτελεσμάτων	122
7.1.1	Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας	192
8.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	221
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	236

Εισαγωγή

Τα προβλήματα της αλλοίωσης των τροφίμων από τους μικροοργανισμούς και των τροφικών δηλητηριάσεων χρονολογούνται από την πρώτη περίοδο της παραγωγής τροφίμων (πριν από 8.000-10.000 χρόνια). Με τις πρώτες προσπάθειες παρασκευής τροφίμων εμφανίστηκαν και τα προβλήματα που συνδέονται με την ταχεία αλλοίωση των τροφίμων λόγω ακατάλληλης αποθήκευσής τους ή ασθενειών που μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω των τροφίμων.

Οι πρώτες ενδείξεις για παραγωγή μπίρας έχουν βρεθεί στην αρχαία Βαβυλωνία και χρονολογούνται στα 7.000 π.Χ. Οι Σουμέριοι γύρω στο 3.000 π.Χ. παρασκεύαζαν γαλακτοκομικά προϊόντα και ήταν από τους πρώτους λαούς που παρασκεύασαν βούτυρο. Οι Αιγύπτιοι από το 3.000 π.Χ. χρησιμοποιούσαν στη διατροφή τους γάλα, βούτυρο και τυριά. Οι Κινέζοι και οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν στη διατροφή τους παστά ψάρια. Κρασί παρασκεύαζαν οι Ασσύριοι το 3.500 π.Χ. Ζυμούμενα αλλαντικά παρασκεύαζαν στην αρχαία Βαβυλωνία και στην Κίνα από το 1.500 π.Χ.

Το αλάτι ήταν η πρώτη ουσία που χρησιμοποιήθηκε για τη συντήρηση των τροφίμων. Από το 3.000 π.Χ. οι Εβραίοι χρησιμοποιούσαν το αλάτι που έπαιρναν από τη Νεκρά θάλασσα για τη συντήρηση διαφόρων τροφίμων. Μια άλλη μέθοδος συντηρήσεως των τροφίμων που χρησιμοποιήθηκε πολύ, από πολύ παλιά, είναι η προσθήκη λαδιού, η οποία είχε σαν συνέπεια την εμφάνιση μεγάλου αριθμού τροφοτοξινώσεων από σταφυλοκόκκους. Οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι θεωρούνται από τους πρωτοπόρους λαούς στη συντήρηση του κρέατος με αλάτι σε συνδυασμό με τον καπνισμό. Γραπτές μαρτυρίες αναφέρουν ότι οι Ρωμαίοι γύρω στα 1.000 π.Χ. χρησιμοποίησαν πάγο για τη συντήρηση των ψαριών.

Ορισμένα γεγονότα συνετέλεσαν στην κατανόηση του φαινομένου των τροφικών δηλητηριάσεων. Ο εργοτισμός, μια τροφική δηλητηρίαση

που προκαλείται από το μύκητα *Claviceps purpurea* (μύκητας που αναπτύσσεται στο ρύζι και στα σιτηρά), προκάλεσε πολλούς θανάτους το Μεσαίωνα. Παλαιότερα στη Γαλλία (το 943 μ.Χ.) είχαν προκληθεί 40.000 θάνατοι από εργοτισμό, αλλά δεν ήταν γνωστό ότι η τοξίνη που παράγεται από το μύκητα ήταν το αίτιο της ασθένειας.

Ο πρώτος που αντιλήφθηκε το ρόλο των μικροοργανισμών στην αλλοίωση των τροφίμων ήταν ο Kircher, ένας μοναχός, που στα 1658 ανέφερε ότι το γάλα, το κρέας και άλλες ουσίες αλλοιώνονται από “σκουλίκια” αόρατα με γυμνό μάτι. Η παρατήρησή του όμως δεν έτυχε ευρείας αποδοχής. Το 1683 ο Leeuwenhoek στην Ολλανδία παρατήρησε και περιέγραψε ζύμες στο μικροσκόπιο.

Η ιδέα της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων σαν μεθόδου συντηρήσεώς τους είναι του Spallanzani και χρονολογείται από το 1765 αλλά κανείς δεν επωφελήθηκε από την παρατήρησή του και δεν την εφάρμοσε στην πράξη. Το γεγονός που οδήγησε στην ανακάλυψη της κονσερβοποίησης ήταν η συντήρηση κρέατος σε γυάλινα δοχεία, τα οποία είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία σε βραστό νερό για διάφορα χρονικά διαστήματα. Η ανακάλυψη αυτή έγινε από το Γάλλο μάγειρα Appert, στον οποίο απονεμήθηκε η πατέντα αυτής της μεθόδου επεξεργασίας στα 1810 και ένα βραβείο της γαλλικής κυβερνήσεως 12.000 φράγκων, που είχε θεσπιστεί στα 1795 για την ανακάλυψη μιας πρακτικής μεθόδου συντηρήσεως των τροφίμων.

Ο πρώτος που εκτίμησε και κατάλαβε την παρουσία και τον ρόλο των μικροοργανισμών στα τρόφιμα ήταν ο Παστέρ. Το 1837 έδειξε ότι η οξίνιση του γάλακτος προκαλείται από μικροοργανισμούς και το 1860 χρησιμοποίησε τη θέρμανση για την καταστροφή ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στο κρασί και στη μπίρα. Αυτή η μορφή θερμικής επεξεργασίας είναι σήμερα γνωστή σαν παστερίωση (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

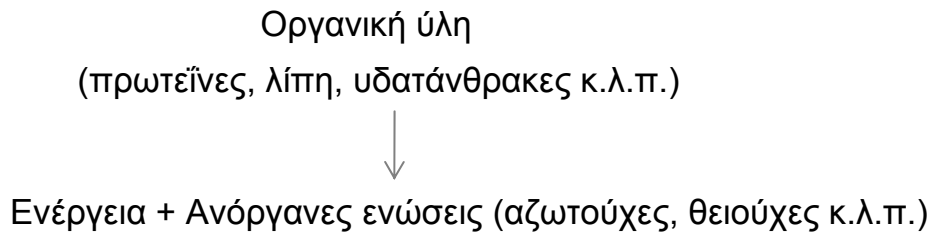
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΖΥΜΕΣ – ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.1 Μικροοργανισμοί που απαντώνται στα τρόφιμα

Η κυριότερη λειτουργία των μικροοργανισμών στη φύση είναι η δεικπεραίωση του είδους τους. Κατά τη διεκπεραίωση αυτής της βασικής λειτουργίας, οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί διεξάγουν την ακόλουθη γενική αντίδραση:



Η αλλοίωση των τροφίμων από τους μικροοργανισμούς είναι απλά η προσπάθεια της μικροχλωρίδας του τροφίμου να διεξάγει την παραπάνω γενική αντίδραση. Παρά την απλότητα της δομής τους σε σύγκριση με τους ανώτερους οργανισμούς, οι μικροοργανισμοί μπορούν να διεξάγουν πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις που είναι απαραίτητες για τη δεικπεραίωσή τους. Για να το επιτύχουν αυτό, παίρνουν θρεπτικά συστατικά από την οργανική ύλη, ένα μέρος της οποίας αποτελούν τα τρόφιμα.

Αν κανείς αναλογιστεί τα είδη των μικροοργανισμών που απαντώνται στα φυτά και τα ζώα του πλανήτη μας μπορεί να υποθέσει τα είδη των μικροοργανισμών που αναμένεται να υπάρχουν σ' ένα τρόφιμο. Μικροβιολογικές αναλύσεις πολλών εργαστηρίων έχουν δείξει ότι οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των τροφίμων και τα νωπά τρόφιμα περιέχουν ένα ποικίλο αριθμό βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων και το ερώτημα που γεννάται είναι, κατά πόσο ένα τρόφιμο είναι ασφαλές (αβλαβές) για τον καταναλωτή, παίρνοντας σαν κριτήριο το συνολικό μικροβιολογικό φορτίο του τροφίμου. Η ερώτηση έχει δύο σκέλη: Ποιος είναι ο συνολικός αριθμός των μικροοργανισμών που υπάρχουν ανά g ή ml του τροφίμου; και ποια είδη μικροοργανισμών αντιπροσωπεύονται σ' αυτόν τον αριθμό; Για να

απαντήσει κανείς σ' αυτά τα ερωτήματα πρέπει να ξέρει ποιοι μικροοργανισμοί υπάρχουν σ' ένα συγκεκριμένο τρόφιμο στη φυσική του κατάσταση και ποιοι από τους μικροοργανισμούς δεν είναι φυσικό (αναμενόμενο) να απαντώνται στο συγκεκριμένο τρόφιμο. Γι' αυτό είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς τη γενική διασπορά των βακτηρίων στη φύση και τα είδη των μικροοργανισμών που είναι φυσικό να απαντώνται στα διάφορα τρόφιμα και τους χώρους επεξεργασίας των τροφίμων.

Τα σημαντικότερα γένη των μικροοργανισμών που απαντώνται στα τρόφιμα αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα 1.1.1. Ορισμένοι από τους μικροοργανισμούς αυτούς είναι επιθυμητοί σε ορισμένα τρόφιμα, άλλοι προκαλούν αλλοιώσεις των τροφίμων και άλλοι είναι παθογόνοι (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

Πίνακας 1.1.1: Γένοι βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών που απαντώνται στα τρόφιμα¹

ΒΑΚΤΗΡΙΑ		
<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Proteus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Psychrobacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Brochothrix</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Serratia</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Carnobacterium</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Shigella</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Listeria</i>	<i>Staphylococcus</i>

¹ Κοτζεκίδου – Ρούκα, Π. 'Μικροβιολογία Τροφίμων', 16

<i>Clostridium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Yersinia</i>
ΜΥΚΗΤΕΣ		
<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Stachybotrys</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Thamnidium</i>
<i>Botrytis</i>	<i>Mucor</i>	<i>Trichothecium</i>
<i>Byssochlamys</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Wallemia</i>
		<i>Xeromyces</i>
ZYMEΣ		
<i>Brettanomyces</i>	<i>Issatchenkia</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>Candida</i>	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Torulaspota</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Saccharomyces</i>	

1.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.1.1.1 Πηγές των βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα

Οι κυριότερες πηγές των βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα αναφέρονται στον πίνακα 1.1.2.

Πίνακας 1.1.2: Πηγές των κυριότερων βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα²

Βακτήρια	Έδαφος & Νερό	Φυτά/Φυτικά Προϊόντα	Δοχεία, Σκευή, Μηχανήματα	Εντερική οδός	Προσωπικό	Ζωοτροφές	Δέρμα ζώων	Αέρας & Σκόνη
<i>Acinetobacter</i>	XX	X	X				X	X
<i>Aeromonas</i>	XX ^a	X						
<i>Alcaligenes</i>	X	X	X	X			X	
<i>Alteromonas</i>	XX ^a							
<i>Bacillus</i>	XX ^b	X	X		X	X	X	XX
<i>Brochothrix</i>		XX	X					
<i>Campylobacter</i>				XX	X			
<i>Carnobacterium</i>	X	X	X					
<i>Citrobacter</i>	X	XX	X	XX				
<i>Clostridium</i>	XX ^b	X	X	X		X	X	XX
<i>Corynebacterium</i>	XX ^b	X	X		X		X	X
<i>Enterobacter</i>	X	XX	X				X	
<i>Enterococcus</i>	X	X	X	XX	X	X	X	X
<i>Erwinia</i>	X	XX	X					
<i>Escherichia</i>	X	X		XX	X			
<i>Flavobacterium</i>	X	XX					X	
<i>Hafnia</i>	X	X		XX				
<i>Lactococcus</i>		XX	X	X			X	
<i>Lactobacillus</i>		XX	X	X			X	
<i>Leuconostoc</i>		XX	X	X			X	
<i>Listeria</i>	X	XX		X	X	X	X	
<i>Micrococcus</i>	X	X	X		X	X	X	XX
<i>Moraxella</i>	X	X					X	
<i>Pantoea</i>	X	X		X				
<i>Pediococcus</i>		XX	X	X			X	
<i>Proteus</i>	X	X	X	X	X		X	
<i>Pseudomonas</i>	XX	X	X			X	X	
<i>Psychrobacter</i>	XX	X	X				X	
<i>Salmonella</i>				XX		XX		
<i>Serratia</i>	X	X	X	X		X	X	
<i>Shewanella</i>	X	X						
<i>Shigella</i>				XX				
<i>Staphylococcus</i>				X	XX		X	
<i>Vagococcus</i>	XX			XX				
<i>Vibrio</i>	XX ^a			X				
<i>Yersinia</i>	X	X		X				

XX: Σημαίνει πολύ σημαντική πηγή του μικροοργανισμού

a: Κυρίως στο νερό

b: Κυρίως στο έδαφος

² Κοτζεκίδου – Ρούκα, Π. 'Μικροβιολογία Τροφίμων', 21

Έδαφος και Νερό. Τα δύο αυτά οικοσυστήματα εξετάζονται μαζί επειδή είναι κοινοί οι μικροοργανισμοί που απαντώνται σ' αυτά. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους μεταφέρονται στην ατμόσφαιρα με τον αέρα και κατόπιν με τη βροχή εισέρχονται στο υδάτινο οικοσύστημα. Μπορούν επίσης να μεταφερθούν από το οικοσύστημα του εδάφους στο υδάτινο οικοσύστημα με το νερό της βροχής. Οι μικροοργανισμοί του υδάτινου οικοσυστήματος μεταφέρονται στο έδαφος μέσω του σχηματισμού σύννεφων και της βροχής. Αυτός ο κύκλος έχει σαν αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί των οικοσυστημάτων του εδάφους και του νερού να είναι κατά ένα μεγάλο βαθμό οι ίδιοι. Ορισμένοι μικροοργανισμοί του υδάτινου οικοσυστήματος και ειδικά εκείνοι που προέρχονται από το θαλάσσιο νερό δεν επιβιώνουν στο έδαφος. Βακτήρια του γένους *Alteromonas* που υπάρχουν στο θαλάσσιο οικοσύστημα απαιτούν για την ανάπτυξή τους χλωριούχο νάτριο στη συγκέντρωση που υπάρχει στο θαλάσσιο νερό, ενώ δεν μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος. Στο θαλάσσιο νερό υπάρχουν συνήθως αρνητικά κατά Gram βακτήρια και η εμφάνιση θετικών κατά Gram βακτηρίων είναι μόνο παροδική.

Φυτά και φυτικά προϊόντα. Αν και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί του εδάφους και του νερού μολύνουν τα φυτά, μόνο ένας μικρός αριθμός τους μπορεί να επιβιώσει σ' αυτά. Οι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν είναι εκείνοι που έχουν την ικανότητα να προσκολώνονται στην επιφάνεια των φυτών και βρίσκουν τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους. Σημαντικοί τέτοιου είδους μικροοργανισμοί είναι τα γαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες, ενώ μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών για τα φυτά συγκαταλέγονται πολλά είδη μυκήτων και από τα βακτήρια τα γένη *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* και *Xanthomonas*.

Δοχεία, Σκεύη, Μηχανήματα επεξεργασίας. Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στην επιφάνεια των διαφόρων φυτικών προϊόντων

μολύνουν τα δοχεία συγκομιδής και μεταφοράς των προϊόντων με αποτέλεσμα να υπάρχει σ' αυτά ένα ανάλογο του προϊόντος μικροβιολογικό φορτίο. Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στα σφάγια των ζώων μολύνουν τις επιφάνειες κοπής του κρέατος, τα μαχαίρια ή τα μηχανήματα κοπής. Ο βαθμός μόλυνσης είναι ανάλογος του αριθμού των μικροοργανισμών που φέρει το σφάγιο.

Εντερική οδός του ανθρώπου και των ζώων. Οι μικροοργανισμοί του εντερικού σωλήνα, μέσω του νερού, μολύνουν τα τρόφιμα όταν χρησιμοποιείται μολυσμένο νερό για το πλύσιμο των πρώτων υλών των τροφίμων. Ορισμένοι μικροοργανισμοί του εντερικού σωλήνα δεν επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο νερό, ενώ άλλοι, και μεταξύ αυτών τα περισσότερα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, επιβιώνουν.

Προσωπικό που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα. Η μικροχλωρίδα των χεριών και των ρούχων του προσωπικού έχει σχέση με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο έδαφος, το νερό, τον αέρα, τη σκόνη κλπ. του χώρου εργασίας. Εφ' όσον δεν τηρούνται οι κανόνες υγιεινής, μικροοργανισμοί από τη μύτη, το στόμα, το δέρμα και τον γαστρεντερικό σωλήνα του προσωπικού μπορεί να μολύνουν τα τρόφιμα.

Ζωοτροφές. Οι ζωοτροφές αποτελούν σημαντική πηγή μόλυνσης με σαλμονέλλες των πουλερικών και των ζώων. Επίσης με τις ενσιρωμένες ζωοτροφές η *Listeria monocytogenes* μεταδίδεται στα ζώα γαλακτοπαραγωγής και κρεατοπαραγωγής. Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στις ζωοτροφές μεταδίδονται και στο δέρμα των ζώων.

Δέρμα ζώων. Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο νωπό γάλα αντικατοπτρίζουν τη μικροχλωρίδα του μαστού και του περιβάλλοντος της μονάδας γαλακτοπαραγωγής. Μικροοργανισμοί που προέρχονται από το μαστό και το δέρμα μπορεί να μολύνουν το χώρο της μονάδας

γαλακτοπαραγωγής, τα δοχεία συλλογής γάλακτος και τα χέρια του προσωπικού.

Αέρας και σκόνη. Ενώ όλοι οι μικροοργανισμοί που αναφέρονται στον πίνακα 1 μπορεί μερικές φορές να βρεθούν στον αέρα και τη σκόνη μιας μονάδας επεξεργασίας τροφίμων, οι μικροοργανισμοί που αντέχουν και επιβιώνουν είναι κυρίως τα θετικά κατά Gram βακτήρια, μεγάλος αριθμός μυκήτων και ορισμένες ζύμες. Γενικά, οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στον αέρα και τη σκόνη είναι οι σπορογόνοι μικροοργανισμοί (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

1.1.1.2 Σύνομη περιγραφή των κυριοτέρων γενών των βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα

Acinetobacter (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές ακίνητος και βακτήριο). Περιλαμβάνει αρνητικά κατά Gram ραβδία ορισμένα από τα οποία έχουν συγγένεια με την οικογένεια Neisseriaceae ενώ άλλα παλαιότερα ανήκαν στα γένη *Achromobacter* και *Moraxella*. Ορισμένα βακτήρια που παλαιότερα ανήκαν στο γένος *Acinetobacter* ανήκουν τώρα στο γένος *Psychrobacter*. Διαφέρουν από τα βακτήρια των γενών *Psychrobacter* και *Moraxella* στο ότι παρουσιάζουν αρνητικό το τεστ της οξειδάσης. Είναι αυστηρά αερόβια βακτήρια που δεν ανάγουν τα νιτρικά ιόντα. Αν και τα νεαρά κύτταρα έχουν σχήμα ραβδίου, τα γηραιά κύτταρα έχουν σχήμα κοκκοειδές. Είναι ευρέως διαδεδομένα στο νερό και στο έδαφος και βρίσκονται σε πολλά τρόφιμα και ειδικά σε νωπά προϊόντα που συντηρούνται με ψύξη.

Aeromonas (δηλαδή βακτήρια που παράγουν αέριο). Είναι βακτήρια αρνητικά κατά Gram των οποίων ο κυριότερος βιότοπος είναι το νερό. Παλαιότερα ανήκαν στην οικογένεια Vibrionaceae ενώ σήμερα

ανήκουν στην οικογένεια Aeromonadaceae. Παράγουν μεγάλες ποσότητες αερίου από τη ζύμωση των σακχάρων. Αποτελούν ξενιστές του εντερικού σωλήνα των ψαριών και ορισμένα είναι παθογόνα των ψαριών. Το είδος *A. hydrophila* που είναι παθογόνο στον άνθρωπο, απαντάται κυρίως στο θαλάσσιο νερό και προκαλεί διάρροια.

Alcaligenes (Βακτήρια που παράγουν αλκάλια). Αν και είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μερικές φορές εμφανίζουν θετική τη χρώση Gram. Είναι ραβδία που δεν ζυμώνουν τα σάκχαρα αλλά προκαλούν αλκαλικές αντιδράσεις. Δεν παράγουν χρωστικές. Απαντώνται στο νωπό γάλα, στα πουλερικά, σε κόπρανά και σε προϊόντα που βρίσκονται σε αποσύνθεση.

Alteromonas. Απαντώνται στο θαλάσσιο νερό και σε όλα τα αλιεύματα. Για να αναπτυχθούν απαιτούν χλωριούχο νάτριο στη συγκέντρωση που υπάρχει στο θαλάσσιο νερό. Είναι ραβδία αρνητικά κατά Gram που παρουσιάζουν κινητικότητα και είναι αυστηρά αερόβια. Τα είδη *A. putrefaciens* και *A. colwelliana* που παλαιότερα ταξινομούσαν σ' αυτό το γένος, ανήκουν τώρα στο γένος *Shewanella*.

Bacillus. Είναι θετικά κατά Gram σπορογόνα ραβδία που είναι αερόβια σε αντίθεση με τα κλωστρίδια που είναι αναερόβια. Τα περισσότερα είναι μεσόφιλα αλλά υπάρχουν ψυχρότροφα και θερμόφιλα στελέχη. Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει δύο παθογόνα είδη *B. anthracis* και *B. cereus*.

Brochothrix (Σύνθετη λέξη που προέρχεται από τις ελληνικές βρόχος και θριξ). Περιλαμβάνει μη σπορογόνα θετικά κατά Gram ραβδία. Είναι γένος συγγενές προς τα γένη *Lactobacillus* και *Listeria*. Αν και δεν είναι πραγματικά κορυνομορφα βακτήρια έχουν ομοιότητες με αυτή την ομάδα. Στη φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης έχουν σχήμα ραβδίου ενώ τα γηραιότερα κύτταρα είναι κοκκοειδή, που είναι τυπικό χαρακτηριστικό των κορυνοειδών βακτηρίων. Το γένος *Brochothrix* περιλαμβάνει δύο είδη *B. thermosphacta* και *B. campestris*. Έχουν

μερικά κοινά χαρακτηριστικά με το γένος *Microbacterium*. Συχνά απαντώνται σε νωπά και επεξεργασμένα κρέατα που είναι συσκευασμένα σε κενό και διατηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης.

Campylobacter (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές καμπύλο και βακτήριο). Είναι αρνητικά κατά Gram ελικοειδή ραβδία που παλαιότερα ταξινομούσαν στο γένος *Vibrio*. Είναι μικροαερόφιλα έως αναερόβια.

Carnobacterium. Το γένος περιλαμβάνει στελέχη που παλαιότερα ταξινομούσαν σαν γαλακτοβάκιλλοι. Τέσσερα είδη έχουν αναγνωρισθεί *C. divergens* (παλαιότερα *Lactobacillus divergens*) *C. piscicola* (παλαιότερα *Lactobacillus piscicola*) *C. gallinarum* και *C. mobile*. Είναι βακτήρια σχήματος ραβδίου, θετικά κατά Gram που δεν παράγουν καταλάση. Φυλογενετικά είναι περισσότερο συγγενή προς τα γένη *Enterococcus* και *Vagococcus* παρά προς τους γαλακτοβάκιλλους. Είναι ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί και οι περισσότεροι αναπτύσσονται στους 0 °C αλλά όχι στους 45 °C. Ορισμένα είδη παράγουν αέριο από την αποικοδόμηση της γλυκόζης. Απαντώνται σε κρέατα και κρεατοσκευάσματα που είναι συσκευασμένα σε κενό, σε ψάρια και πουλερικά.

Citrobacter. Όλα τα βακτήρια του γένους *Citrobacter* χρησιμοποιούν τα κιτρικά ιόντα σαν μοναδική πηγή άνθρακα. Είναι εντερικά βακτήρια, σχήματος ραβδίου, αρνητικά κατά Gram που ζυμούν αργά τη λακτόζη. *C. freundii* είναι το πιο γνωστό είδος που απαντάται σε λαχανικά και νωπά κρέατα.

Clostridium (Η λέξη είναι παράγωγο της ελληνικής λέξης κλωστήρ). Είναι αναερόβια σπορογόνα ραβδία που είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Το γένος περιλαμβάνει πολλά είδη ορισμένα από τα οποία όπως το *Cl. perfringens* και το *Cl. botulinum* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.

Corynebacterium (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές κορύνη και βακτήριο). Είναι κορυνοειδή βακτήρια, θετικά κατά Gram που προκαλούν αλλοιώσεις σε λαχανικά και κρεατοσκευάσματα. Τα περισσότερα στελέχη είναι μεσόφιλα, αν και υπάρχουν και ψυχρότροφα στελέχη. Το *C. diphtheriae* προκαλεί διφθερία στον άνθρωπο.

Enterobacter (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές έντερο και βακτήριο). Εντερικά βακτήρια, σχήματος ραβδίου, αρνητικά κατά Gram που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae.

Enterococcus (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές έντερο και κόκκος). Το γένος αυτό δημιουργήθηκε για να περιλάβει ορισμένα βακτήρια της ορολογικής ομάδας D των στρεπτόκοκκων κατά Lancefield. Περιλαμβάνει 16 είδη θετικών κατά Gram βακτηρίων σχήματος ωοειδούς που τα κύτταρά τους απαντώνται είτε μεμονωμένα, ή ενωμένα ανά δύο ή σχηματίζοντας κοντές αλυσίδες.

Erwinia. Είναι βακτήρια εντερικής προέλευσης, σχήματος ραβδίου, αρνητικά κατά Gram που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Απαντώνται στα φυτά και προκαλούν σήψη στα φρούτα και τα λαχανικά.

Escherichia. Είναι το γένος των βακτηρίων που έχει μελετηθεί περισσότερο. Το είδος *E. coli* θεωρείται δείκτης της υγιεινής κατάστασης των τροφίμων ενώ υπάρχουν στελέχη που προκαλούν γαστρεντερίτιδα.

Flavobacterium. Είναι ραβδία αρνητικά κατά Gram, τα οποία σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα παράγουν κίτρινες ή κόκκινες χρωστικές. Ορισμένα βακτήρια του γένους είναι μεσόφιλα ενώ άλλα είναι ψυχρότροφα. Απαντώνται στα φυτά και προκαλούν αλλοιώσεις στα λαχανικά και στο κρέας που διατηρούνται σε ψυγεία.

Hafnia. Το γένος περιλαμβάνει ένα είδος *H. alvei*. Είναι ραβδία εντερικής προέλευσης αρνητικά κατά Gram που προκαλούν αλλοιώσεις

στα λαχανικά, στο κρέας και σε κρεατοσκευάσματα που διατηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης.

Lactobacillus. Στη δεκαετία του '80 έγιναν πολλές μεταβολές στη συστηματική κατάταξη αυτού του γένους με αποτέλεσμα πολλά είδη βακτηρίων να μεταφερθούν σε άλλα γένη. Το γένος *Lactobacillus* περιλαμβάνει θετικά κατά Gram ραβδία που σχηματίζουν αλυσίδες και δεν παράγουν καταλάση. Τα στελέχη που απαντώνται στα τρόφιμα είναι μικροαερόφιλα. Απαντώνται σε όλα σχεδόν τα λαχανικά και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Με τη δράση των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* παράγονται πολλά ζυμούμενα προϊόντα.

Lactococcus. Το γένος περιλαμβάνει βακτήρια της ορολογικής ομάδας N των στρεπτόκοκκων κατά Lancefield. Είναι θετικά κατά Gram σφαιρικά ή ωοειδή βακτήρια που απαντώνται είτε μεμονωμένα ή σε ζεύγη ή σε αλυσίδες. Δεν παρουσιάζουν κινητικότητα και δεν παράγουν καταλάση. Αναπτύσσονται στους 10 °C αλλά όχι στους 45 °C. Στα ζυμούμενα προϊόντα που παράγουν κυριαρχεί το L – γαλακτικό οξύ. Τέσσερα είδη και τρία υποείδη ανήκουν στο γένος *Lactococcus*:

L. lactis subsp. *lactis* (παλαιότερα *Strep. lactis* subsp. *lactis* και *Lactobacillus xylosus*)

L. lactis subsp. *cremoris* (παλαιότερα *Strep. lactis* subsp. *cremoris*)

L. lactis subsp. *hordniae* (παλαιότερα *Lactobacillus hordniae*)

L. garvieae (παλαιότερα *Strep. garvieae*)

L. plantarum (παλαιότερα *Strep. plantarum*)

L. raffinolactis (παλαιότερα *Strep. raffinolactis*)

Οικογένεια Leuconostocaceae. Η Leuconostocaceae είναι μια οικογένεια βακτηρίων που τοποθετείται στο εσωτερικό της τάξης των Lactobacillales. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τα γένη *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Weissella*. Τα βακτήρια που ανήκουν σε αυτά τα τρία γένη είναι θετικά κατά Gram, με στρογγυλό ή επίμηκες σχήμα και είναι

αναερόβια ή ανεκτικά στο οξυγόνο. Συνήθως ζουν σε περιβάλλοντα πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία, όπως το γάλα, το κρέας, τα φυτικά προϊόντα και ποτά που προέρχονται από ζύμωση (Bjorkroth and Holzapfel, 2006).

Leuconostoc. (Η λέξη είναι παράγωγο της ελληνικής λέξης λευκός). Τα βακτήρια του γένους *Leuconostoc* ανήκουν στην ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων. Είναι ετεροζυμωτικά βακτήρια, σχήματος κόκκου, θετικά κατά Gram, που δεν παράγουν καταλάση. Απαντώνται στα ίδια τρόφιμα με τους γαλακτοβάκιλλους. Ο *L. oenos* διαφέρει από τα άλλα είδη του γένους *Leuconostoc* επειδή είναι οξυάντοχος μικροοργανισμός και είναι σημαντική η παρουσία του στα κρασιά.

Listeria. Είναι γένος συγγενές προς το γένος *Brochothrix*. Περιλαμβάνει μη σπορογόνα βακτήρια σχήματος ραβδίου, θετικά κατά Gram. Το γένος περιλαμβάνει 7 είδη από τα οποία περισσότερο διαδεδομένο είναι η *L. monocytogenes*.

Micrococcus (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές μικρός και κόκκος). Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια σχήματος κόκκου που παράγουν καταλάση. Ορισμένα παράγουν ροζ, πορτοκαλί ή κόκκινες χρωστικές ενώ άλλα δεν παράγουν χρωστικές. Τα περισσότερα βακτήρια του γένους *Micrococcus* είναι μεσόφιλα, αλλά υπάρχουν και ψυχρότροφα στελέχη. Αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaCl. Είναι βακτήρια πολύ διαδεδομένα στο χώρο επεξεργασίας των τροφίμων, στο προσωπικό που εργάζεται σε βιομηχανίες τροφίμων και φυσικά σε πολλά τρόφιμα.

Moraxella. Είναι κοντά ραβδία αρνητικά κατά Gram. Έχουν οξειδωτικό μεταβολισμό και δεν σχηματίζουν οξύ από γλυκόζη. Το νέο γένος *Psychrobacter* περιλαμβάνει βακτήρια που ανήκαν στο γένος *Moraxella*. Διαφέρουν από τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* στην ευαισθησία τους στην πενικιλίνη και στην παραγωγή οξειδάσης.

Pantoea. Το γένος αποτελείται από αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα ραβδία, που δεν σχηματίζουν έλυτρο. Πολλά από αυτά κινούνται με μαστίγια που φέρουν περιφερειακά. Δεν παράγουν οξειδάση. Ορισμένα παράγουν κίτρινη χρωστική. Απαντώνται στα φυτά, στους σπόρους, στο έδαφος, στο νερό και σε δείγματα αίματος ή ούρων του ανθρώπου. Το γένος αποτελείται από δύο είδη *P. agglomerans* (που περιλαμβάνει τα βακτήρια με την παλαιότερη ονομασία *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola* και *Erwinia milletiae*) και *P. dispersa*. Τα βακτήρια του γένους *Pantoea* δεν αναπτύσσονται στους 44 °C.

Pediococcus (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές πεδίο και κόκκος, δηλαδή κόκκοι που αναπτύσσονται σ' ένα επίπεδο). Ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια σχήματος κόκκου που απαντώνται σε ζεύγη ή σε τετράδες οι οποίες σχηματίζονται από κυτταρική διαίρεση σε δύο επίπεδα. *P. acidilactici*, ένα είδος που απαντάται συχνά σε καλλιέργειες εκκινήσεως.

Proteus. Είναι εντερικά βακτήρια, σχήματος ραβδίου, αερόβια, αρνητικά κατά Gram. Παρουσιάζουν κινητικότητα και σχηματίζουν αποικίες που εξαπλώνονται στην επιφάνεια των στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων. Απαντώνται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Απομονώνονται από πολλά λαχανικά και κρεατοσκευάσματα και ειδικά από αυτά που έχουν αλλοιωθεί σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος.

Pseudomonas (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές ψευδής και μονάς). Αρνητικά κατά Gram ραβδία. Είναι το ευρύτερα διαδεδομένο γένος βακτηρίων που απαντάται στα νωπά τρόφιμα. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, στα λαχανικά, στο κρέας, στα πουλερικά και στα αλιεύματα. Τα περισσότερα στελέχη είναι ψυχρότροφα και είναι η πιο σημαντική ομάδα βακτηρίων που προκαλεί

αλλοιώσεις σε νωπά τρόφιμα που συντηρούνται με ψύξη. Παράγουν γκριζο-γάλανες χρωστικές που είναι υδατοδιαλυτές.

Psychrobacter (Σύνθετη λέξη που παράγεται από τις ελληνικές ψυχρός και βακτήριο). Το γένος αυτό των βακτηρίων δημιουργήθηκε για να συμπεριλάβει αρνητικά κατά Gram ραβδία που δεν παρουσιάζουν κινητικότητα και τα οποία παλαιότερα ταξινομούσαν στα γένη *Acinetobacter* και *Moraxella*. Είναι φαρδιά κοντά ραβδία που απαντώνται σε ζεύγη. Είναι αερόβια, δεν παρουσιάζουν κινητικότητα, παράγουν καταλάση και οξειδάση και δεν ζυμώνουν τη γλυκόζη. Αναπτύσσονται σε 6,5% NaCl και σε θερμοκρασία 1 °C αλλά όχι σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 35 °C. Επειδή είναι γένος συγγενές προς το γένος *Moraxella* τοποθετήθηκε στην οικογένεια Neisseriaceae. Βρίσκονται συχνά στο κρέας, στα πουλερικά, στα ψάρια και στο νερό.

Salmonella. Είναι εντερικά βακτήρια αρνητικά κατά Gram που θεωρούνται παθογόνα για τον άνθρωπο.

Serratia. Είναι αρνητικά κατά Gram ραβδία, αερόβια και πρωτεολυτικά που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Παράγουν συνήθως κόκκινες χρωστικές στα θρεπτικά υποστρώματα και σε ορισμένα τρόφιμα. *S. liquefaciens* είναι το πιο διαδεδομένο είδος στα τρόφιμα που προκαλεί αλλοίωση στα λαχανικά και στα κρεατοσκευάσματα που διατηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης.

Shewanella. Είναι αρνητικά κατά Gram ίσια ή κεκαμμένα ραβδία που δεν παράγουν χρωστικές και φέρουν μαστίγια και στους δύο πόλους. Το γένος περιλαμβάνει τέσσερα είδη *S. putrefaciens* (βακτήριο που παλαιότερα είχε ταξινομηθεί σαν *Pseudomonas putrefaciens* και αργότερα σαν *Alteromonas putrefaciens*), *S. hanedai*, *S. benthica* και *S. colwelliana*. Απαντώνται στο νερό, στο θαλασσινό νερό και στα αλιεύματα.

Shigella. Όλα τα βακτήρια του γένους είναι εντεροπαθογόνα στον άνθρωπο.

Staphylococcus (Σύνθετη λέξη που σχηματίζεται από τις ελληνικές σταφύλι και κόκκος). Κόκκοι θετικοί κατά Gram που παράγουν καταλάση. Στο γένος περιλαμβάνεται το είδος *S. aureus* που προκαλεί γαστρεντερίτιδα στον άνθρωπο.

Streptococcus Γένος θετικών κατά Gram σφαιρικών βακτηρίων. Είναι μικροαερόφιλοι διπλόκοκκοι, οι οποίοι δεν είναι κινητοί και εμφανίζονται ανά αλυσίδες ή ζεύγη, εξ' ου και η ονομασία διπλόκοκκοι. Είναι παθογόνοι και ανήκουν στους σχιζομύκητες. Το γένος των στρεπτόκοκκων μπορεί να παρατηρηθεί στο έδαφος, στον αέρα και στο γάλα. Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1879 από τον Παστέρ.

Vagococcus (δηλαδή περιπλανώμενοι κόκκοι). Το γένος δημιουργήθηκε για να συμπεριλάβει τους στρεπτόκοκκους της ορολογικής ομάδας N. Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, που δεν παράγουν καταλάση και κινούνται με μαστίγια που φέρουν περιμετρικά. Αναπτύσσονται στους 10 °C αλλά όχι στους 45 °C. Αναπτύσσονται σε 4% NaCl αλλά όχι σε 6,5% NaCl. Δεν αναπτύσσονται σε pH 9,6. Βρίσκονται στο νερό, στα ψάρια, στα κόπρανα κλπ.

Vibrio. Είναι ευθεία ή καμπυλοειδή ραβδία που ανήκουν στην οικογένεια Vibrionaceae. Το είδος *V. parahaemolyticus* προκαλεί γαστρεντερίτιδα στον άνθρωπο.

Yersinia. Γένος που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Το είδος *Y. enterocolitica* προκαλεί γαστρεντερίτιδα στον άνθρωπο (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

1.1.2 ΖΥΜΕΣ

Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει πολλές αλλαγές στη συστηματική κατάταξη των ζυμών. Οι ζύμες που παλαιότερα κατατάσσονταν στο γένος *Torulopsis* έχουν μεταφερθεί στο γένος *Candida* και ορισμένες ζύμες που παλαιότερα ανήκαν στο γένος

Saccharomyces μεταφέρθηκαν στα γένη *Torulaspota* και *Zygosaccharomyces*. Οι τέλειες μορφές των περισσοτέρων ζυμών έχουν βρεθεί τώρα και αυτό δυσχεραίνει την αναφορά σε παλαιότερα βιβλιογραφικά δεδομένα (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

1.1.2.1 **Κυριότερα γένη ζυμών που απαντώνται στα τρόφιμα**

Η ταξινόμηση των κυριότερων γενών των ζυμών που απαντώνται στα τρόφιμα παρουσιάζεται παρακάτω:

Διαίρεση: Ascomycota (**Ασκομύκητες** στις ζύμες κατατάσσονται οι μονοκύτταροι Ασκομύκητες των οποίων ο ζυγωτός ή ένα μεμονωμένο κύτταρο μετατρέπεται σε ασκό).

Οικογένεια: Saccharomycetaceae (Σχηματίζουν ασκοσπόρια και αρθροσπόρια. Βλαστική αναπαραγωγή με διαίρεση ή με εκβλάστηση)

Υποοικογένεια: Nadsonioideae

Γένος: *Hanseniaspora*

Υποοικογένεια: Saccharomycotoideae

Γένος: *Debaryomyces*

Issatchenkia

Kluyveromyces

Pichia

Saccharomyces

Torulaspota

Zygosaccharomyces

Υποοικογένεια: Schizosaccharomycetoideae

Γένος: *Schizosaccharomyces*

Διαίρεση: Deuteromycota (**Δευτερομύκητες** – στις ζύμες κατατάσσονται οι μονοκύτταροι Δευτερομύκητες)

Οικογένεια: Cryptococcaceae (“ατελείς” ζύμες που δεν σχηματίζουν σπόρια και αναπαράγονται με εκβλάστηση)

Γένος: *Brettanomyces*

Candida

Cryptococcus

Rhodotorula

Trichosporon

1.1.2.2 Σύντομη περιγραφή των κυριοτέρων γενών των ζυμών που απαντώνται στα τρόφιμα

Brettanomyces. Το πιο διαδεδομένο είδος είναι το *B. intermedius* που έχει ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξή του 1,8. Οι ζύμες του γένους *Brettanomyces* παράγουν οξικό οξύ από τη ζύμωση της γλυκόζης σε αερόβιες συνθήκες. Προκαλούν αλλοίωση της μπίρας, του κρασιού, των αναψυκτικών και των τουρσιών και ορισμένα είδη προκαλούν μεταζύμωση σε διάφορα είδη μπίρας.

Candida. Στο γένος αυτό έχουν επέλθει πολλές μεταβολές τελευταία. Σ’ αυτό έχουν συμπεριληφθεί τα ατελή γένη των Ασκομυκήτων καθώς επίσης και το γένος με την παλαιότερη ονομασία *Torulopsis* με την ακόλουθη ονομασία (μέσα σε παρένθεση αναφέρεται η παλαιότερη ονομασία):

Candida famata (*Torulopsis Candida*, *T. famata*)

Candida kefir (*Candida pseudotropicalis*, *T. kefir*, *Torula cremoris*)

Candida stellata (*Torulopsis stellata*)

Candida holmii (*Torulopsis holmii*)

Πολλά είδη του γένους *Candida* έχουν ταξινομηθεί τώρα στα γένη *Kluyveromyces* και *Pichia*. *Candida lipolytica* είναι η ατελής μορφή του *Saccharomycopsis lipolytica*.

Το είδος *C. tropicalis* είναι το πιο διαδεδομένο στα τρόφιμα. Τα είδη του γένους *Candida* απαντώνται συχνά στον κιμά και στα πουλερικά. Ορισμένα είδη συμμετέχουν στη ζύμωση των κόκκων του κακάο, είναι συστατικά των σπόρων του κεφίρ και απαντώνται σε διάφορα είδη μπίρας και σε χυμούς φρούτων.

Cryptococcus. Είναι η ατελής μορφή του γένους *Filobasidiella* και άλλων Βασιδιομυκήτων. Δεν ζυμώνουν τα σάκχαρα. Έχουν μορφή υαλώδη ή παράγουν κόκκινες ή πορτοκαλί χρωστικές. Μερικές φορές σχηματίζουν αρθροσπόρια. Απαντώνται στα φυτά, στο έδαφος, στα φρούτα, στα αλιεύματα και στο νωπό κιμά. Ορισμένα στελέχη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.

Debaryomyces. Μερικές φορές παράγει ψευδομυκήλιο. Είναι ένα από τα σημαντικότερα είδη ζυμών που απαντώνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το είδος *D. hansenii* περιλαμβάνει τα στελέχη που παλαιότερα συμπεριλαμβάνονταν στα είδη *D. subglobosus* και *Torulasporea hansenii* και είναι από τα πιο διαδεδομένα είδη στα τρόφιμα. Αναπτύσσεται σε συγκεντρώσεις NaCl 24% και σε τιμές ενεργότητας νερού $\geq 0,65$. Σχηματίζει μια γλοιώδη ουσία στην άλμη των τυροκομείων και σε διάφορα είδη τυριών και προκαλεί αλλοίωση σε συμπυκνωμένους χυμούς φρούτων και στο γιαούρτι.

Hanseniaspora. Είναι ζύμες που το κύτταρό τους καταλήγει σε οξύ άκρο, παράγουν εκβλαστήματα και στα δύο άκρα του κυττάρου με συνέπεια τα κύτταρα να έχουν συνήθως λεμονοειδές σχήμα. Οι ασκοί περιέχουν δύο έως τέσσερα σπόρια. Οι ατελείς μορφές του γένους *Hanseniaspora* κατατάσσονται στο γένος *Kloeckera*. Ζυμώνουν τα σάκχαρα και απαντώνται σε πολλά τρόφιμα και ειδικότερα σε τομάτες,

εσπεριδοειδή, φράουλες και συμμετέχουν στη ζύμωση των κόκκων του κακάο.

Issatchenkia. Παράγουν ψευδομυκήλιο. Ορισμένα είδη που παλαιότερα ανήκαν στο γένος *Pichia* ανήκουν τώρα στο γένος *Issatchenkia*. Η τέλεια μορφή του *Candida krusei* είναι *I. orientalis*. Σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα σχηματίζουν χαρακτηριστικό υμένα. Απαντώνται σε πολλά τρόφιμα.

Kluyveromyces. Ζύμες που παράγουν σφαιρικά ασκοσπόρια. Το είδος *K. marxianus* περιλαμβάνει τώρα τα παλαιότερα είδη *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. bulgaricus*, *Saccharomyces lactis* και *S. fragilis* και είναι το πιο διαδεδομένο είδος στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα είδη του γένους *Kluyveromyces* παράγουν β-γαλακτοσιδάση και προκαλούν ταχεία ζύμωση των σακχάρων, συμπεριλαμβανομένης και της λακτόζης. *K. marxianus* παράγει λακτάση από τον ορό του γάλακτος και είναι ένας από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας ζυμών από τον ορό του γάλακτος. Οι ζύμες του γένους *Kluyveromyces* απαντώνται σε πολλά είδη φρούτων και το είδος *K. marxianus* προκαλεί αλλοίωση σε πολλά είδη τυριών.

Pichia. Είναι το ευρύτερα διαδεδομένο γένος των ζυμών. Αναπαράγεται με πολύπλευρες εκβλαστήσεις και με ασκούς που περιέχουν συνήθως τέσσερα σφαιροειδή ή καπελοειδή σπόρια. Μερικές φορές σχηματίζουν ψευδομυκήλιο και αρθροσπόρια. *P. guilliermondii* είναι η τέλεια μορφή του *Candida guilliermondii*. Η ατελής μορφή του *P. membranaefaciens* είναι η *Candida valida*. Ορισμένα είδη του γένους *Pichia* σχηματίζουν χαρακτηριστικό υμένα σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα και έχουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή παραδοσιακών τροφίμων. Απαντώνται στα αλιεύματα, αναπτύσσονται στην άλμη κατά τη ζύμωση των ελιών και προκαλούν αλλοίωση σε πολλά είδη τουρσιών.

Rhodotorula. Είναι ατελείς μορφές των Βασιδιομυκήτων. Αναπαράγονται με πολύπλευρες εκβλαστήσεις. Δεν ζυμούν τα σάκχαρα. Τα πιο διαδεδομένα είδη στα τρόφιμα είναι *R. glutinis* και *R. mucilaginosa*. Παράγουν ροζ ή κόκκινες χρωστικές. Το γένος περιλαμβάνει πολλά ψυχρότροφα είδη που απαντώνται σε νωπά πουλερικά, στα αλιεύματα και σε βοδινό κρέας. Ορισμένα είδη αναπτύσσονται στο βούτυρο.

Saccharomyces. Ζύμες που παράγουν σφαιρικά σπόρια σε ασκούς και πολλαπλασιάζονται με πολύπλευρες εκβλαστήσεις. Δεν ζυμώνουν τη λακτόζη. Τα είδη *S. bisporus* και *S. rouxii* έχουν ταξινομηθεί τώρα στο γένος *Zygosaccharomyces* ενώ το παλαιότερο είδος *S. rosei* κατατάσσεται τώρα στο γένος *Torulaspota*. Όλες οι ζύμες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ψωμιού, μπίρας, κρασιού και σαμπάνιας ανήκουν στο είδος *S. cerevisiae*. Απαντώνται στους σπόρους του κεφίρ και έχουν απομονωθεί από πολλά τρόφιμα και μεταξύ αυτών αφυδατωμένα αλλαντικά και πολλά φρούτα. Ο *S. cerevisiae* σπάνια προκαλεί αλλοιώσεις. Ο *S. baillii* είναι μια ζύμη που προκαλεί αλλοιώσεις και δημιουργεί προβλήματα σε σάλτσα τομάτας, μαγιονέζα, διάφορες σάλτσες, αναψυκτικά και στα κρασιά. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο βενζοϊκό και σορβικό οξύ στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σαν χημικά συντηρητικά των τροφίμων.

Schizosaccharomyces. Ζύμες που παράγουν ασκοσπόρια και διαιρούνται με διαίρεση. Μερικές φορές παράγουν υφές και αρθροσπόρια. Οι ασκοί περιέχουν τέσσερα έως οκτώ σπόρια που έχουν μορφή κόκκου. Δεν σχηματίζουν καθόλου εκβλαστήσεις. Το πιο διαδεδομένο είδος στα τρόφιμα είναι το *S. rombe* που είναι οσμώφιλο και ανθεκτικό στα χημικά συντηρητικά.

Torulaspota. Αναπαράγεται με πολύπλευρες εκβλαστήσεις και με σφαιρικά σπόρια που παράγονται με ασκούς. Οι ζύμες του γένους

Torulaspota αποικοδομούν με έντονο μεταβολισμό τα σάκχαρα. Το πιο διαδεδομένο είδος είναι το *T. delbrueckii*.

***Trichosporon*.** Πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση και με σχηματισμό αρθροκονιδίων. Παράγει πραγματικό μυκήλιο. Δεν προκαλεί ή προκαλεί ασθενή ζύμωση των σακχάρων. Απαντάται στα νωπά οστρακοειδή και μαλακόστρακα, στον κιμά, στα πουλερικά, στο κατεψυγμένο πρόβειο κρέας κ.ά. Το πιο διαδεδομένο είδος είναι το *T. pullulans* το οποίο παράγει λιπάση.

***Zygosaccharomyces*.** Αναπαράγεται με πολύπλευρες εκβλαστήσεις και ασκοσπόρια. Ζυμώνει τα σάκχαρα με έντονο μεταβολισμό. Το πιο διαδεδομένο είδος στα τρόφιμα είναι το *Z. rouxii* που αναπτύσσεται σε τιμές ενεργότητας νερού $\geq 0,62$. Τα είδη του γένους *Zygosaccharomyces* προκαλούν αλλοίωση στη μαγιονέζα και σε διάφορες σάλτσες και ειδικά το *Z. bailii* που αναπτύσσεται σε pH 1,8 (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

1.1.2.3 Ομάδες ζυμών

Ζύμες επιφανείας. Ζύμες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια όξιων τροφίμων, προκαλούν οξειδωση των οργανικών οξέων και δημιουργούν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη λιγότερο οξυάντοχων μικροοργανισμών, οι οποίοι συνεχίζουν την αλλοίωση του τροφίμου. Ανήκουν στα γένη *Pichia*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia* και *Trichosporon*. Ορισμένα είδη του γένους *Pichia* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης και προκαλούν οξειδωσή της. Ορισμένες από τις ζύμες επιφανείας παράγουν μικρές ποσότητες αλκοόλης από την αποικοδόμηση των σακχάρων ενώ άλλες δεν παράγουν αλκοόλη.

Οσμώφιλες ζύμες. Ζύμες που αναπτύσσονται καλά σε περιβάλλον με υψηλή οσμωτική πίεση (π.χ. σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων ή αλάτων) και προκαλούν αλλοίωση σε αφυδατωμένα φρούτα, συμπυκνωμένους χυμούς φρούτων, μέλι και διάφορα σιρόπια που έχουν υψηλή συγκέντρωση σακχάρων. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται τα είδη *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii* και *Debaryomyces hansenii*.

Αλοάντοχες ζύμες. Ζύμες που αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού και απαντώνται συχνά στην άλμη των τυροκομείων, σε παστό κρέας και ψάρια και σε διάφορες σάλτσες. Από τις ζύμες επιφανείας μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού παρουσιάζει το είδος *Debaryomyces hansenii* που αναπτύσσεται στην άλμη των τυριών, του κρέατος και των λαχανικών. Ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού παρουσιάζει και το είδος *Zygosaccharomyces rouxii* το οποίο προκαλεί αλλοίωση σε διάφορες σάλτσες (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

1.2 Ο ρόλος των γαλακτικών βακτηρίων στα ζυμούμενα τρόφιμα

Τα γαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* και *Vagococcus*. Τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Vagococcus* είναι ομοζυμωτικά, τα βακτήρια των γενών *Leuconostoc* και *Carnobacterium* είναι ετεροζυμωτικά, ενώ το γένος *Lactobacillus* περιλαμβάνει ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά είδη (Πίνακας 1.2.1).

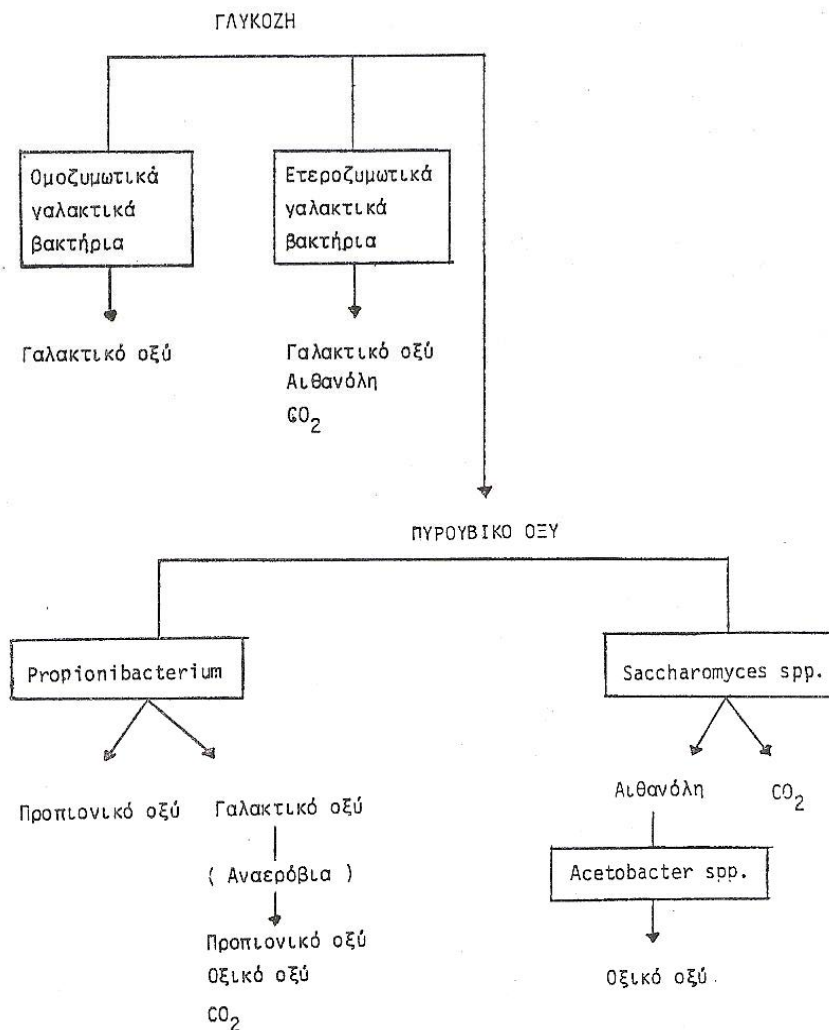
Πίνακας 1.2.1: Ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια³

Ομοζυμωτικά		Ετεροζυμωτικά	
Μικροοργανισμός	Ρακεμική μορφή γαλακτικού οξέος	Μικροοργανισμός	Ρακεμική μορφή γαλακτικού οξέος
<i>Lactobacillus</i>		<i>Lactobacillus</i>	
<i>L. acidophilus</i>	DL	<i>L. brevis</i>	DL
<i>L. bulgaricus</i>	D (-)	<i>L. buchneri</i>	DL
<i>L. casei</i>	L (+)	<i>L. cellobiosus</i>	DL
<i>L. curvatus</i>	DL	<i>L. fermentum</i>	DL
<i>L. delbrueckii</i>	D (-)		
<i>L. helveticus</i>	DL	<i>Leuconostoc</i>	
<i>L. lactis</i>	D (-)	<i>L. cremoris</i>	D (-)
<i>L. leichmannii</i>	D (-)	<i>L. dextranicum</i>	D (-)
<i>L. plantarum</i>	DL	<i>L. lactis</i>	D (-)
<i>L. salivarius</i>	L (+)	<i>L. mesenteroides</i>	D (-)
		<i>L. oenos</i>	D (-)
		<i>L. carnosum</i>	D (-)
<i>Pediococcus</i>		<i>Carnobacterium</i>	
<i>P. acidilactici</i>	DL	<i>C. divergens</i>	
<i>P. cerevisiae</i>	DL	<i>C. mobile</i>	
<i>P. pentosaceus</i>	DL	<i>C. gallinarum</i>	
<i>Streptococcus</i>		<i>C. piscicola</i>	
<i>S. bovis</i>	D (-)		
<i>S. thermophilus</i>	D (-)		
<i>Lactococcus</i>			
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	D (-)		
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	D (-)		
<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>			
<i>L. garvieae</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. raffinolactis</i>			
<i>Vagococcus</i>			
<i>V. fluvialis</i>			
<i>V. salmoninarum</i>			

Τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν τη γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85%, ενώ τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια μετατρέπουν τη γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ σε ποσοστό που φτάνει το 50% και επιπλέον παράγεται αιθανόλη, οξικό οξύ, γλυκερόλη και CO₂. Τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια έχουν ιδιαίτερη σημασία για την παραγωγή χαρακτηριστικών αρωματικών ουσιών στα τρόφιμα, όπως είναι η ακεταλδεΐδη και το διακετύλιο (Σχήμα 1.2.1).

³ Κοτζεκίδου – Ρούκα, Π. 'Μικροβιολογία Τροφίμων', 180

Σχήμα 1.2.1: Αποικοδόμηση της γλυκόζης από διάφορους μικροοργανισμούς⁴



Συνήθως στα ζυμούμενα τρόφιμα στην αρχή της ζύμωσης κυριαρχούν τα βακτήρια των γενών *Leuconostoc* και *Lactococcus* και στη συνέχεια στη μικροχλωρίδα του ζυμουμένου τροφίμου κυριαρχούν τα βακτήρια των γενών *Pediococcus* και *Lactobacillus*. Τα γαλακτικά βακτήρια δεν συμβάλλουν μόνο στη συντήρηση ορισμένων τροφίμων αλλά προσδίδουν στο προϊόν ομοιομορφία και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που δεν επιτυγχάνονται με άλλες μεθόδους επεξεργασίας των τροφίμων. Παλαιότερα, η συντήρηση των τροφίμων

⁴ Κοτζεκίδου – Ρούκα, Π. 'Μικροβιολογία Τροφίμων', 181

με γαλακτική ζύμωση ήταν μια εμπειρική διεργασία, κατά την οποία συνέβαιναν μεταβολές στην πρώτη ύλη, που είχαν σαν αποτέλεσμα τη συντήρησή της σε καλή κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μεγάλος αριθμός νωπών τροφίμων διατηρούνται με γαλακτική ζύμωση, όπως το γάλα, το κρέας, τα λαχανικά και τα φρούτα.

Τα ζυμούμενα τρόφιμα υπήρχαν από την αρχαιότητα, αλλά η διαπίστωση ότι οι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση έγινε στα τέλη του περασμένου αιώνα. Πρόσφατες έρευνες επιβεβαίωσαν ότι η καλή συντήρηση των ζυμουμένων τροφίμων οφείλεται στην οξίνιση που προκαλούν ορισμένοι μικροοργανισμοί λόγω μετατροπής των σακχάρων σε οργανικά οξέα. Η αποικοδόμηση των σακχάρων και η μείωση του pH είναι οι κύριες δράσεις των βακτηρίων στα ζυμούμενα τρόφιμα. Τα γαλακτικά βακτήρια, εκτός από τα οργανικά οξέα, παράγουν και άλλες ανασταλτικές ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Οι ουσίες αυτές παράγονται σε πολύ μικρές ποσότητες και είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διακετύλιο, οι βακτηριοσίνες κ.ά. (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή ζυμουμένων τροφίμων, όπως προαναφέρθηκε, και αποτελούν επίσης μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας. Πολυάριθμες έρευνες δείχνουν ότι τα γαλακτικά βακτήρια έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία των ανθρώπων (Ouweland et al., 2002; Saxelin et al., 2005).

Ένα από τα αποτελέσματα που έχει αναγνωριστεί είναι η προστασία ενάντια στις τοξίνες που περιέχονται στα τρόφιμα, όπως είναι οι ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι μυκοτοξίνες και τα είδη αντενεργά σε οξυγόνο (Knasmuller et al., 2001; Stidl et al., 2007a).

1.3 Ο ρόλος των ζυμών στα ζυμούμενα τρόφιμα

Κατά τη ζύμωση των τροφίμων χρησιμοποιούνται τα εξής είδη ζυμών: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida utilis* και *Kluyveromyces fragilis*. Ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται σαν ζύμη αρτοποιίας, στην παραγωγή μπύρας, κρασιού κ.ά. Ο *Saccharomyces uvarum* χρησιμοποιείται σαν ζύμη βυθού κατά την παραγωγή μπύρας, ενώ οι ζύμες *Candida utilis* και *Kluyveromyces fragilis* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιομάζας για διατροφή του ανθρώπου.

Στις ζυμώσεις που διεξάγονται από ζύμες το pH μειώνεται λόγω σχηματισμού CO₂, SO₂, κιτρικού οξέος, κετογλουταρικού οξέος κ.ά. Η μείωση του pH είναι σημαντική κατά την αρτοποίηση και την παραγωγή μπύρας, ενώ έχει μικρή σημασία κατά την παρασκευή κρασιού επειδή ο χυμός των σταφυλιών έχει χαμηλό pH (pH 3-4).

Στα τρόφιμα και ποτά που παράγονται με τη βοήθεια ζυμών επέρχονται πολλές μεταβολές στη θρεπτική αξία της πρώτης ύλης. Η συνολική περιεκτικότητα του τροφίμου σε θερμίδες μειώνεται λόγω της μετατροπής των σακχάρων σε διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη. Κάθε γραμμάριο ζυμουμένου σακχάρου με θρεπτική αξία σε θερμίδες περίπου 3,86 Kcal μετατρέπεται σε 0,45 g αλκοόλης με θρεπτική αξία 3,1 Kcal (6,93 Kcal/g αλκοόλης). Αυτό σημαίνει ότι σχεδόν 20% των θερμίδων που προέρχονται από τα σάκχαρα της πρώτης ύλης χάνεται. Το ίδιο συμβαίνει με το άμυλο. Κατά τη ζύμωση των τροφίμων με ζύμες έχουμε ένα “φυσικό” εμπλουτισμό του παραγόμενου τροφίμου με βιταμίνες και ιδιαίτερα με βιταμίνες της ομάδας B (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΜΥΚΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

2.1 Λίγα λόγια γενικά για τις μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες είναι μια “οικογένεια” χημικών ενώσεων που σχηματίζονται και εκκρίνονται από τους μύκητες στην λογαριθμική και στατική φάση ανάπτυξής τους. Είναι ετεροκυκλικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους με συγγενείς μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Για την επιστήμη της ασφάλειας τροφίμων ενδιαφέρει η υψηλή τοξικότητά τους, αλλά και η ανθεκτικότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι μυκοτοξίνες αναγνωρίζονται στην ανάλυση επικινδυνότητας των μελετών HACCP ως πιθανός κίνδυνος. Αποτελούν πιθανό κίνδυνο που σχετίζεται με τρόφιμα φυτικής προέλευσης, κυρίως στα σιτηρά, ξηρούς καρπούς και φρούτα (καλαμπόκι, σιτηρά, φυστίκια, μπανάνα, μήλο, σταφίδες, κτλ). Απαντώνται όμως και σε ζωϊκής προέλευσης τρόφιμα όπως το γάλα, τα αυγά, το συκώτι και άλλα, γεγονός που οφείλεται στην κατανάλωση μολυσμένων ζωοτροφών από τα ζώα.

Οι μυκοτοξίνες είναι προϊόντα του μεταβολισμού μυκήτων, που ανήκουν κυρίως στα γένη *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* και παρουσιάζουν τοξική δράση στον άνθρωπο, στα ζώα, στα ψάρια, στα φυτά και στους μικροοργανισμούς (ICMSF 1996). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερες από 400 μυκοτοξίνες, αλλά μόνο μερικές από αυτές έχουν απομονωθεί στα τρόφιμα (Murphy et al., 2006). Υπολογίζεται ότι το 25% των αγροτικών προϊόντων σε παγκόσμια κλίμακα είναι μολυσμένο με μυκοτοξίνες, προκαλώντας μεγάλες οικονομικές απώλειες (McLean and Dutton, 1995, Wang and Groorpan, 1999, Atroshi et al., 2002). Αν και η πρόληψη της επιμόλυνσης στους αγρούς από μυκοτοξίνες είναι ο κύριος σκοπός των βιομηχανιών τροφίμων, η μόλυνση διαφόρων προϊόντων με μύκητες του γένους *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* και *Penicillium* και με μυκοτοξίνες, είναι αναπόφευκτη κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η παραγωγή μυκοτοξίνης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, για παράδειγμα από την ενεργότητα νερού (a_w) του

αποθηκευμένου προϊόντος, την θερμοκρασία, τη σύνθεση του αέρα, την παρουσία χημικών συντηρητικών και τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις. Μία ολοκληρωμένη προσέγγιση για τον έλεγχο μερικών από αυτών των παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικό έλεγχο της φθοράς χωρίς να χρειάζεται υπερβολικός έλεγχος οποιουδήποτε παράγοντα (Varga et al., 2005). Αναλυτικότερα, οι παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών από τους μύκητες είναι:

1. θερμοκρασία (7,5-40° C)
2. υγρασία (>80% σχετική υγρασία)
3. φως (μεγαλύτερη παραγωγή σε απουσία φωτός)
4. pH (ιδανικό 4-4,6)
5. υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα 'φυτικής προέλευσης')
6. παρουσία μυκοστατικών (NaCl, σορβικό οξύ, καφεΐνη, θεοφυλλίνη, κ.ά.)

Τα ασφαλή όρια πρόσληψης μυκοτοξινών από τον άνθρωπο δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη πλήρως, παρ' όλα αυτά υπάρχουν όρια στις σχετικές νομοθεσίες για κάποιες μυκοτοξίνες σε κάποια τρόφιμα (αφλατοξίνες στο γάλα, ζεαραλενόνη στα σιτηρά, κ.ά.). Στον παγκόσμιο επιδημιολογικό χάρτη έχουν καταγραφεί νοσήματα που αποδίδονται στην κατανάλωση τροφίμων με παρουσία μυκοτοξινών.

Οι κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, οι φουμονισίνες, η πατουλίνη και οι ωχρατοξίνες (Kabak et al., 2006). Οι αφλατοξίνες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των επιβλαβών τους επιπτώσεων στην υγεία ανθρώπων και ζώων, συμπεριλαμβανομένων των καρκινογόνων, μεταλλαξιογόνων, τερατογόνων και ανοσοκατασταλτικών επιπτώσεων (Eaton and Gallagher, 1994). Παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* και *Aspergillus nominus*. Οι τέσσερις κύριες φυσικά

παραγόμενες αφλατοξίνες είναι οι B₁, B₂, G₁ και G₂, με τις δύο τελευταίες να περιέχονται με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε μολυσμένα τρόφιμα (Petchkongkaew et al., 2008).

Η ζεαραλενόνη (ZON) είναι μυκοτοξίνη που παράγεται από είδη του γένους *Fusarium*, τα οποία εκτιμώνται ως μύκητες του αγρού (Mortensen et al., 2006). Κυρίως παράγεται από το είδος *Fusarium graminearum* (Elmholt and Hestbjerg, 2000, Hestbjerg et al., 2002). Είναι αποδεδειγμένο ότι η τοξικότητα της ζεαραλενόνης έχει σοβαρές επιπτώσεις στα φυτά, στους ανθρώπους και στα οικόσιτα ζώα. Επιπρόσθετα, οι οιστρογονικές επιπτώσεις της ζεαραλενόνης έχουν μεγάλο ενδιαφέρον (Kuiper-Goodman et al., 1987, JECFA, 2000, JECFA, 2001, Withanage et al., 2001, Ehrlich et al., 2002).

Η πιο σημαντική από τις ωχρατοξίνες είναι η ωχρατοξίνη A (OTA), αφού είναι η περισσότερο τοξική και εντοπίζεται συχνότερα σε σχέση με τις ωχρατοξίνες B και C. Η OTA απομονώθηκε για πρώτη φορά στη Νότιο Αφρική το 1965 από το μύκητα *Aspergillus ochraceus*, στον οποίο οφείλεται και η μετέπειτα ονομασία της (van de Merwe et al., 1965). Το σύνολο των *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger* aggregate) και ο *Aspergillus carbonarius*, θεωρούνται υπεύθυνοι για την παραγωγή OTA στα σταφύλια (Abarca et al., 2001, Cabanes et al., 2002), αν και άλλοι ερευνητές θεωρούν ότι ο *Aspergillus niger* ανήκει στους μη ωχρατοξινογόνους μύκητες (Bejaoui et al., 2006). Το στέλεχος *Aspergillus westerdijkiae* NRRL 3174 θεωρείται, επίσης, ότι παράγει ωχρατοξίνη A (Petchkongkaew et al., 2008). Το γένος *Penicillium* και ειδικότερα ο μύκητας *Penicillium verrucosum* είναι επίσης παραγωγός ωχρατοξίνης A (Pitt, 1987). Γενικότερα τα είδη του γένους *Penicillium* εκτιμώνται ως μύκητες αποθηκών. Ο *Penicillium verrucosum* μπορεί να συναποτελέσει μέρος του εδαφικού οικοσυστήματος της Δανίας (Elmholt and Hestbjerg, 2000). Οι τοξίνες που παράγονται από μύκητες μπορούν να ελευθερωθούν στο εδαφικό περιβάλλον είτε λόγω έκκρισής

τους από τους μύκητες που ζουν στο έδαφος ή λόγω μόλυνσης φυτικού υλικού από μύκητες (Mortensen et al., 2006). Η OTA είναι παράγωγο της ισοκουμαρίνης, η οποία συνδέεται με την L-φαιτυλαλανίνη.

Η OTA ταξινομήθηκε το 1993 από το διεθνή οργανισμό έρευνας κατά του καρκίνου ως δυνητικά καρκινογόνος ουσία (κατηγορία 2B) (IARC 1993). Επίσης, η OTA συμπεριλαμβάνεται στους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες της ενδημικής νεφροπάθειας των Βαλκανίων (Balcan Endemic Nephropathy ή BEN), των όγκων της ουροφόρου οδού (Urinary Tract Tumors ή UTT) και πιθανώς και σε άλλες νεφροπάθειες του ανθρώπου (Abouzied et al., 2002). Η σημασία της OTA για τη δημόσια υγεία αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Είναι χαρακτηριστικό ότι, σύμφωνα με έρευνες σε χώρες της Κεντρικής Ευρώπης, το 90% των εξετασθέντων δειγμάτων αίματος ανθρώπων ήταν θετικό στην παρουσία OTA με συγκεντρώσεις > 0,1ppb (Petzinger and Weidenbach, 2002). Αν οι καταναλωτές λαμβάνουν χαμηλές συγκεντρώσεις της συγκεκριμένης μυκοτοξίνης για μεγάλο χρονικό διάστημα, τότε θα προκύψουν πολύ σοβαρότερα προβλήματα (Petchkongkaew et al., 2008).

Οι σπουδαιότερες μυκοτοξίνες και οι μύκητες που τις παράγουν είναι:

Μυκοτοξίνη	Μύκητες
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penicillium sp.</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>
Στεριγματοκουστίνη	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Ωχρατοξίνες	<i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Πατουλίνη	<i>Penicillium patulum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>
Κιτρινίνη	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium viridicatum</i>
Πενικιλλικό οξύ	<i>Penicillium martensii</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>

Ρουμπανοξίνη	<i>Penicillium rubrum</i>
Αλκαλοειδή εργοτισμού	<i>Claviceps purpurea</i>
T-Z τοξίνη	<i>Fusarium tricinctum</i>
Τριχοθεσίνες	<i>Fusarium graminearum, Fusarium roseum</i>

2.2 Ωχροτοξίνη Α και Ωχροτοξινογόνα γένη μυκήτων

Η ωχροτοξίνη Α (ΟΤΑ) είναι μία επικίνδυνη τοξίνη και αποτελεί προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού ορισμένων μυκήτων. Η ΟΤΑ έχει νεφροτοξική, ανοσοκατασταλτική, τερατογόνο, μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους (Smith & Moss, 1985) και θεωρείται ότι αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες της ενδημικής νεφροπάθειας του ανθρώπου στα Βαλκάνια (Γκόβαρης και συν., 2007). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η ΟΤΑ έχει και ηπατοτοξική δράση (Stormer, 1992) και αυξάνει την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Roschenthaler et al., 1981). Παράγεται από έναν αριθμό πανταχού παρόντων μυκήτων του γένους *Penicillium* και *Aspergillus*, οι οποίοι επιμολύνουν γεωργικά προϊόντα σε ολόκληρο τον κόσμο, είτε πριν από τη συγκομιδή τους είτε κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους (Moss, 1996, Galtier, 1999). Οι μύκητες των συγκεκριμένων γενών είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και έχουν απομονωθεί από αποσυντιθέμενη βλάστηση, από το έδαφος και από διάφορα τρόφιμα (Wegst and Lingens, 1983). Η ωχροτοξίνη Α παράγεται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium verrucosum*. Ο μύκητας *Aspergillus carbonarius* παράγει μικρές ποσότητες ωχροτοξίνης Α, ενώ οι *Aspergillus niger* και *Aspergillus japonicus* είναι μη ωχροτοξινογόνοι μύκητες (Bejaoui et al., 2006), αν και έχει γίνει μόνο δύο φορές αναφορά ότι ο *Aspergillus japonicus* είναι ωχροτοξινογόνος μύκητας (Dalcero et al., 2002, Battilani et al., 2003). Αλλά και για τον *Aspergillus carbonarius* οι απόψεις

διίστανται, καθώς ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι ανήκει στους μύκητες που παράγουν μεγάλες ποσότητες ωχρατοξίνης A (Davis and Diener, 1987, Zimmerli and Dick, 1996, Rousseau and Blateyron, 2002). Επιπλέον ορισμένοι ερευνητές θεωρούν ότι κάποια στελέχη του συνόλου των *Aspergillus niger* καθώς και ο μύκητας *Aspergillus alliaceus* είναι ωχρατοξινογόνοι. Κάποιοι άλλοι μύκητες, όπως ο *Aspergillus albertensis*, *A. auricomus*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. sclerotiorum*, *A. terreus* και ο *A. wentii* έχουν αναφερθεί ως παραγωγοί ωχρατοξίνης A, αλλά η παραγωγή τους δεν έχει ακόμη καλά εξακριβωθεί (Varga et al., 1996, Teren et al., 1996). Οι μύκητες *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* και *Penicillium verrucosum* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε διάφορα προϊόντα (αναφέρονται στη συνέχεια) κάτω από διαφορετικές συνθήκες υγρασίας, pH και θερμοκρασίας (Zimmerli and Dick, 1996).

Η Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας εκτιμά ότι περίπου το 25% των τροφίμων που καταναλώνει ο άνθρωπος και τα ζώα είναι μολυσμένα με μυκοτοξίνες και έχουν γίνει μεγάλες προσπάθειες για την αποτοξίκωσή τους με τη χρήση φυσικών και χημικών μεθόδων, χωρίς όμως αξιόλογα αποτελέσματα (Huwig et al., 2001, Shetty and Jespersen, 2006). Η ωχρατοξίνη A έχει ανιχνευτεί σε πολλά διαφορετικά προϊόντα, όπως δημητριακά (Jorgensen et al., 1996), καφέ (Pittet et al., 1996), μπύρα (κριθάρι για την παραγωγή μπύρας) (Visconti et al., 2000), σταφίδες (Mac Donald et al., 1999), σταφύλια, χυμό σταφυλιού, κρασί (Zimmerli & Dick, 1995), κακάο και σε διάφορα καρυκεύματα (JECFA, 2001, Birzele et al., 2000, Fazekas et al., 2002), φρούτα και ξηρούς καρπούς (Zimmerli and Dick, 1996). Η παρουσία της OTA στο μούστο και το κρασί σημειώθηκε για πρώτη φορά το 1996 στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Zimmerli και Dick (1996). Οι έρευνες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν την παρουσία της OTA στο μούστο και το κρασί και ιδιαίτερα στο κόκκινο (Burdaspal and Legarda, 1999, Cerruti et al., 2000, Festas et al., 2000). Η παρουσία της τοξίνης στα

τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης προέρχεται κυρίως από ζώα που έχουν προηγουμένως καταναλώσει ζωοτροφές μολυσμένες με ωχρατοξίνη Α. Τα αποτελέσματα ερευνών σε διάφορες χώρες έδειξαν ότι το χοιρινό κρέας είναι η πιο σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από την ΟΤΑ, σε σύγκριση με άλλα ζωϊκά τρόφιμα. Τα πλέον μολυσμένα με την τοξίνη ζωϊκά τρόφιμα βρέθηκαν να είναι τα κρεατοσκευάσματα από αίμα και νεφρούς χοίρου. Στο αγελαδινό γάλα ανιχνεύτηκε, επίσης, η παρουσία της ΟΤΑ αλλά σε μικρά ποσοστά, επειδή στα μηρυκαστικά η χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας τους μετατρέπει την ΟΤΑ σε ωχρατοξίνη α, η οποία θεωρείται μη τοξικός μεταβολίτης. Μέχρι σήμερα η Ευρωπαϊκή Ένωση δεν έχει θέσει επίσημα όρια για την παρουσία της ΟΤΑ στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, σε αντίθεση με την εφαρμογή ορίων για διάφορα άλλα προϊόντα φυτικής προέλευσης (Γκόβαρης και συν., 2007).

Η ανάπτυξη των μυκήτων που παράγουν ωχρατοξίνη Α εξαρτάται κυρίως από τις κλιματικές συνθήκες και είναι πιο συχνή σε χώρες με εύκρατο και τροπικό κλίμα (Zimmerli and Dick, 1996).

Η παρουσία της ΟΤΑ στο μούστο και το κρασί οφείλεται στην επιμόλυνση των σταφυλιών από τους μύκητες, οι οποίοι αναπτύσσονται τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή τους, ή κατά τη διάρκεια των σταδίων πριν την παρασκευή του κρασιού (Cecchini et al., 2006). Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία της ΟΤΑ στα σταφύλια οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη του *Aspergillus carbonarius* (Rousseau and Blateyron, 2002).

Η θερμοκρασία, η υγρασία, ο αερισμός, η περίοδος της μόλυνσης και η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών μυκήτων είναι ευνοϊκοί παράγοντες για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μυκοτοξίνης (Codex Alimentarius Commission, 1997, Scudamore et al., 1999).

Συνοπτικά στοιχεία όσον αφορά την παραγωγή της ΟΤΑ

Η ΟΤΑ παράγεται από διάφορους μύκητες που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A.*

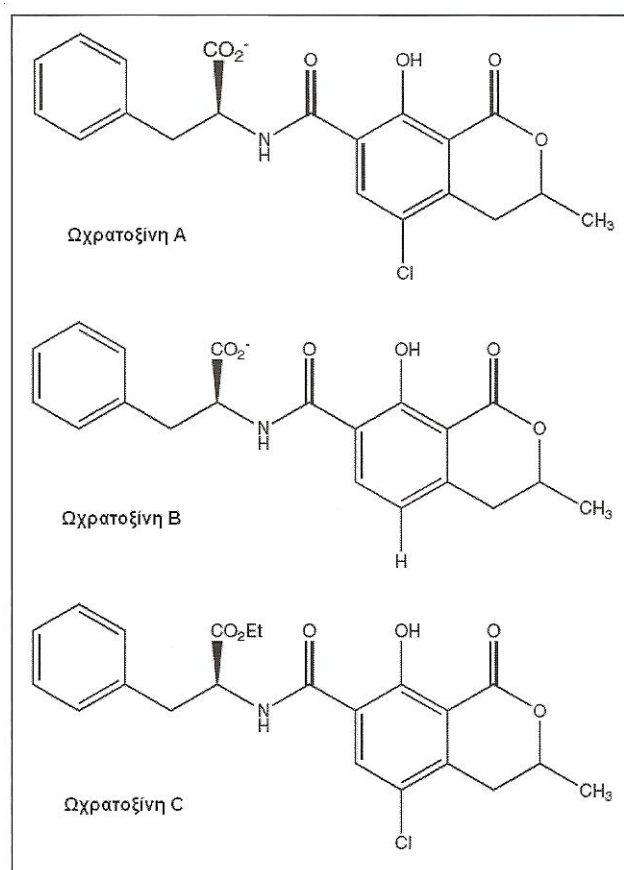
glaucus, *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotium*, *A. niger* κ.ά.) και *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. viridicatum*, *P. chrysogenum*) (Lai et al., 1970, Hesseltine et al., 1972, Ciegler et al., 1973, Land and Hult, 1987, Varga et al., 1996, Bennett and Klich, 2003). Η δυνατότητα παραγωγής OTA εξαρτάται από τα στελέχη των μυκήτων. Έτσι, το 90% των απομονωθέντων στελεχών *A. niger* μπορεί να παράγει OTA (Abarca et al., 2001), ενώ για τον *P. verrucosum* αναφέρεται ότι το 74% των στελεχών που απομονώθηκαν στην Ευρώπη μπορεί να παράγει OTA in vitro (Frisvad et al., 2005). Δύο, όμως, είναι τα κυριότερα είδη μυκήτων που απομονώνονται συχνότερα από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και ενοχοποιούνται για την παραγωγή OTA, οι *A. ochraceus* και *P. verrucosum*.

Ο *P. verrucosum* εντοπίζεται κυρίως στις ψυχρές κλιματικές ζώνες, ενώ ο *A. ochraceus* εντοπίζεται συνήθως σε τροπικά κλίματα (WHO, 1990, Marquardt and Frohlich, 1992). Η ιδανική θερμοκρασία για την παραγωγή της OTA κυμαίνεται από 12 έως 37° C για τον *A. ochraceus* και 4 έως 31° C για τον *P. verrucosum* (Northolt et al., 1979, Pitt et al., 2000). Ο Sweeney και οι συνεργάτες του (2000) αναφέρουν ότι ο *P. verrucosum* και ο *A. ochraceus* μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές Συντελεστή Ενεργού Ύδατος (ΣΕΥ) μέχρι 0,8 και 0,77, αντίστοιχα. Ο *A. ochraceus* μπορεί να αναπτυχθεί καλύτερα σε τρόφιμα, όπως φυστίκια και σόγια, ενώ η ανάπτυξη του *P. verrucosum* ευνοείται στο καλαμπόκι και τη βρώμη (Madhyastha et al., 1990, Hope et al., 2005).

2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες ωχρατοξίνης A

Η OTA περιγράφεται χημικά σαν μια ένωση φαινυλαλανίνης – κουμαρίνης (dihydroisiscoumarin) με διπλό αμιδικό δεσμό (EMAN 2005). Πρόκειται για μια σύνθετη οργανική ουσία. Σε αντίθεση με τις άλλες ωχρατοξίνες, η OTA διαθέτει ένα άτομο χλωρίου στη θέση C5 του δακτυλίου της κουμαρίνης, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα

(εικόνα 2.3.1). Η καρβοξυλική ομάδα της φαινυλανίνης παραμένει αδέσμευτη, με αποτέλεσμα η ΟΤΑ να αποτελεί ένα ασθενές οξύ ($pK_a=7,1$). Η ΟΤΑ είναι μια άχρωμη κρυσταλλική ένωση, μερικώς διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο, ενώ το άλας της με νάτριο είναι διαλυτό στο νερό. Επίσης, είναι εξαιρετικά ασταθής στην επίδραση του φωτός, με αποτέλεσμα να αποδομείται ακόμα και μετά από σύντομη έκθεση στο φως, ιδιαίτερα σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας, ενώ είναι σχετικά σταθερή στη θέρμανση (Γκόβαρης και συν., 2007).



Εικόνα 2.3.1: Χημικοί τύποι των ωχρατοξινών Α, Β και C⁵. **Ωχρατοξίνη Α:** (-)-N-[(5-χλωρο-8-υδροξυ-3-μεθυλ-1-οξο-7-ισοχρωμανυλ)καρβονυλ]-3-φαινυλ-αλανίνη (Fuchs et al., 2008)

⁵ Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. 'Ochratoxin A in foods of animal origin', 314

2.4 Τοξικότητα ωχρατοξίνης A

Η τοξικότητα της OTA στα ζώα και στους ανθρώπους έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία 30 χρόνια (Marquardt and Frohlich, 1992, Petzinger and Ziegler, 2000). Στους περισσότερους οργανισμούς, η OTA απορροφάται στο λεπτό έντερο και ιδιαίτερα στο πρόσθιο τμήμα του.

Η OTA έχει νεφροτοξική, ανοσοκατασταλτική, τερατογόνο, μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους (O'Brien and Dietrich, 2005). Όπως προαναφέρθηκε, έχει χαρακτηριστεί επίσημα ως δυνητικά καρκινογόνος ουσία. Η OTA είναι σαφώς ανοσοκατασταλτικός παράγοντας (Stormer and Lee, 1995) και παράλληλα αποτελεί δυνητικά τερατογόνο ουσία για μύες, επίμυες και κοτόπουλα (Huff, 1991). Επιδρά στο μεταβολισμό της γλυκόζης και αυξάνει τη συσσώρευση του γλυκογόνου στο ήπαρ διάφορων οργανισμών (Verma and Shalini, 1998). Αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης ηπατοκυτταρικών όγκων σε μύες και των δύο φύλων, ενώ προκαλεί νεφροκυτταρικά αδενώματα και καρκινώματα σε αρσενικούς μύες, καθώς και σε επίμυες ανεξαρτήτως φύλου (IARC, 1993). Ο μηχανισμός τοξικότητας της OTA στους διάφορους οργανισμούς αποδίδεται (Fink-Gremmels, 2005) στην ικανότητα της τοξίνης να προκαλεί νέκρωση και υπερπλασία των νεφρικών κυττάρων, στην αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών, στην απελευθέρωση ελευθέρων ριζών, στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων των νεφρικών κυττάρων και στη δραστηριοποίηση ενζύμων, που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο DNA των κυττάρων.

Ο σκύλος και ο χοίρος αποτελούν τα περισσότερο ευαίσθητα είδη στη δράση της OTA, ενώ οι αρουραίοι και τα ποντίκια είναι τα περισσότερο ανθεκτικά είδη (Marquardt and Frohlich, 1992).

Κατά την οξεία τοξίκωση από ΟΤΑ στα περισσότερα είδη οργανισμών, τα όργανά τους εμφανίζονται αιμορραγικά, ενώ παρουσιάζουν εναποθέσεις ινικής σε σπλήνα, ήπαρ, εγκέφαλο, νεφρούς και καρδιά. Παράλληλα, παρατηρούνται συχνά εντερίτιδες και νεκρώσεις σε ήπαρ, νεφρούς και λεμφοειδείς ιστούς (O'Brien and Dietrich, 2005).

Οι υποξείες και χρόνιες τοξικώσεις από ΟΤΑ προκαλούν νεφροπάθειες σε διάφορα είδη ζώων. Ο χοίρος είναι το πλέον ευαίσθητο ζώο στην εκδήλωση νεφροπάθειας από χρόνια δράση της ΟΤΑ. Η νεφροπάθεια των χοίρων από χρόνια μυκοτοξίκωση είναι ιδιαίτερα συχνή στις Σκανδιναβικές χώρες (Krogh et al., 1976, Curtui et al., 2001). Ο Krogh και οι συνεργάτες του (1974) αναφέρουν ότι η χορήγηση ΟΤΑ σε χοίρους μέσω της τροφής σε συγκεντρώσεις 200-4000 µg/kg είχε ως αποτέλεσμα την εκδήλωση νεφροπάθειας μετά από χρονικό διάστημα 4 μηνών, σε όλες τις χορηγούμενες συγκεντρώσεις της τοξίνης.

Στα πτηνά, η ΟΤΑ έχει μεγαλύτερη νεφροτοξική από ηπατοτοξική δράση (Biro et al., 2002). Η χρόνια επίδραση της τοξίνης στα πτηνά έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, μειωμένη ανάπτυξη των οστών και αναιμία (Marquardt and Frohlich, 1992).

Ελάχιστες αναφορές υπάρχουν για τη χρόνια επίπτωση της ΟΤΑ στα άλλα είδη παραγωγικών ζώων (O'Brien and Dietrich, 2005). Περιστατικά οξείας ή χρόνιας τοξίκωσης από ΟΤΑ δεν έχουν αναφερθεί για τα μηρυκαστικά. Η χλωρίδα της μεγάλης κοιλίας των προβάτων παρουσιάζει μικρότερη ικανότητα μεταβολισμού της ΟΤΑ σε σχέση με την αντίστοιχη των αγελάδων (Hohler et al., 1999). Ο Blank και οι συνεργάτες του (2003) αναφέρουν ότι η συγκέντρωση της ΟΤΑ στον ορό των προβάτων παρουσιάζει γραμμική συσχέτιση με τη χορηγούμενη συγκέντρωση της τοξίνης και προτείνουν ότι η χορήγηση μολυσμένης τροφής πρέπει να αποφεύγεται.

Η ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων (BEN) είναι μια πάθηση των νεφρών του ανθρώπου που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 στη Βουλγαρία, τη Ρουμανία και την πρώην Γιουγκοσλαβία (Tanchev et al., 1956, Danilovic et al., 1957, Fortza and Negoescu, 1961). Η ΟΤΑ θεωρείται ότι αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα της BEN. Αυτό οφείλεται στο ότι η τοξίνη απομονώνεται σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις από τα αποθηκευμένα τρόφιμα των προσβεβλημένων οικογενειών, βρίσκεται στο αίμα των προσβεβλημένων ατόμων σε συγκεντρώσεις ≥ 2 $\mu\text{g/l}$ και απομονώνεται συχνότερα από τα ούρα των κατοίκων στις περιοχές που ενδημεί η νόσος και μάλιστα, βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα άτομα που πάσχουν από BEN (Petkova-Bocharova and Castegnaro, 1991, Pfohl-Leszkowicz et al., 2002).

Τα κύρια χαρακτηριστικά της BEN είναι οι αμφοτερόπλευρες αλλοιώσεις του νεφρικού φλοιού. Στα προχωρημένα στάδια της νόσου, το μέγεθος και το βάρος των νεφρών μειώνονται σημαντικά, με διάχυτη ίνωση του νεφρικού φλοιού χωρίς συνήθως να συνοδεύονται από άλλες ενδείξεις φλεγμονής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΟΞΙΚΩΣΗ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α

3.1 Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης A από είδη του γένους *Aspergillus*

Για την προστασία της υγείας των καταναλωτών από την κατανάλωση μολυσμένων τροφών με ωχρατοξίνη A (για την τοξικότητα της οποίας έγινε αναφορά στο προηγούμενο κεφάλαιο), βιολογικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την αποτοξίκωση των μολυσμένων προϊόντων. Διάφορες φυσικές και χημικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν είχαν ποικίλο βαθμό επιτυχίας. Μικροοργανισμοί ή ένζυμα αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για την αποτοξίκωση των μυκοτοξινών. Βιολογικές προσεγγίσεις μελετώνται ευρέως (Sweeney and Dobson, 1998, Bata and Lasztity, 1999). Για παράδειγμα, για την αποτοξίκωση της φουμονισίνης χρησιμοποιήθηκε ένα ένζυμο από τον μικροοργανισμό *Exophiala spinifera* (Duvick et al., 1997, Blackwell et al., 1999). Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να διασπούν την ωχρατοξίνη A (Varga et al., 2005).

Τρία είδη μυκήτων του γένους *Aspergillus* (είδη των μαύρων *Aspergilli*), ο *Aspergillus carbonarius*, το σύνολο των *Aspergillus niger* και ο *Aspergillus japonicus* έχει αποδειχτεί ότι έχουν την ικανότητα να διασπούν (υδρολύουν) την ωχρατοξίνη A (OTA) σε ωχρατοξίνη α (OTα). Ο *Aspergillus niger* θεωρείται ότι είναι το πρώτο ενδιαφέρον είδος όσον αφορά την αποτοξίκωση της ωχρατοξίνης A και ακολουθεί ο μύκητας *Aspergillus japonicus* (Bejaoui et al., 2006).

Όπως προαναφέρθηκε, η πρόληψη κατά της παραγωγής ωχρατοξίνης A και/ή η αποτοξίκωση των μολυσμένων προϊόντων είναι πρωταρχικής σημασίας για την προστασία της υγείας των καταναλωτών. Αρκετές φυσικές και χημικές μέθοδοι έχουν προταθεί για την απομάκρυνση των μυκοτοξινών (Sinha, 1998). Αν και μερικές από αυτές τις μεθόδους είναι πολλά υποσχόμενες [όζον (McKenzie et al., 1997), αλκαλικό υπεροξειδίο του υδρογόνου (Fouler et al., 1994), ή ακτινοβόληση με ακτίνες Γ (Refai et al., 1996)], άλλες δεν συνίστανται

για την αποτοξίκωση των μολυσμένων προϊόντων στην πράξη [επεξεργασία με υποχλώριο (Castegnaro et al., 1991), με αμμωνία (Chelkowski et al., 1982), ή θερμική επεξεργασία (Boudra et al., 1995)]. Βιολογικές προσεγγίσεις μελετώνται ευρέως (Sweeny & Dobson, 1998), αλλά καμία από αυτές δεν έχει εστιαστεί κατά κύριο λόγο στην αποτοξίκωση των χυμών σταφυλιού.

Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε αμπέλια της Γαλλίας, τα είδη των μαύρων *Aspergilli* αποτελούσαν τους κύριους μικροοργανισμούς των σταφυλιών στα οποία σχημάτιζαν αποικίες από την παραμονή τους στο χωράφι μέχρι τη συγκομιδή (Bejaoui et al., 2005).

Ο Bejaoui και οι συνεργάτες του (2006) μελέτησαν την αποτοξίκωση της ωχρατοξίνης Α από τα στελέχη *Aspergillus carbonarius* SA332, *Aspergillus japonicus* AX35 και *Aspergillus niger* GX312. Για όλα αυτά τα στελέχη, παράχθηκε ωχρατοξίνη α (ΟΤα), ένας μεταβολίτης παραγόμενος κατά την αποτοξίκωση (διάσπαση) της ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ). Συγκεκριμένα στο χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα SGM, όλα τα στελέχη διάσπασαν τουλάχιστον το 30% της ΟΤΑ, ενώ στο CYB μερικά στελέχη δεν μείωσαν την αρχική συγκέντρωση της τοξίνης. Ο *Aspergillus niger* παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα στην διάσπαση της ΟΤΑ και ακολούθησαν ο *Aspergillus japonicus* και ο *Aspergillus carbonarius*. Παρ' όλα αυτά, η ανάπτυξη των μυκήτων ήταν αρκετά διαφορετική στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Οι παραπάνω ερευνητές διαπίστωσαν ότι παρά την καλύτερη ανάπτυξη στο SGM, η αποδόμηση της ΟΤΑ ήταν σημαντικότερη στο θρεπτικό υπόστρωμα CYB για τα περισσότερα στελέχη.

Η απομάκρυνση της ΟΤΑ παρατηρήθηκε για όλα σχεδόν τα στελέχη των μαύρων *Aspergilli* και τα επίπεδα διάσπασης άγγιξαν το 98-99% σε ορισμένες περιπτώσεις (Bejaoui et al., 2006).

Ανεξάρτητα από τα είδη των μικροοργανισμών, η ΟΤΑ υδρολύθηκε σε ΟΤα, η οποία παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα

(Harwig, 1974). Ο μεταβολίτης αυτός είχε πρωτίτερα παρατηρηθεί για διαφορετικούς μικροοργανισμούς όπως πρωτόζωα (στην γαστροεντερική οδό των μηρυκαστικών) (Galtier & Alvinerie, 1976, Hult et al., 1976), στα βακτήρια *Acinetobacter calcoaceticus* (Hwang & Draughon, 1994), *Phenylobacter immobile* (Wegst & Lingens, 1983) και στο μύκητα *Aspergillus niger* (Xiao et al., 1996, Varga et al., 2000), όπως επίσης και στα μαύρα *Aspergilli* που απομονώθηκαν από πορτογαλικά σταφύλια (Abrunhosa et al., 2002). Διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ της ικανότητας διάσπασης της ΟΤΑ από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών καθώς και για τα ίδια στελέχη τα οποία όμως αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα (Bejaoui et al., 2006). Μία καρβοξυπεπτιδάση, η οποία κατά το παρελθόν βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να υδρολύει την ΟΤΑ σε ΟΤα (Deberghes et al., 1995), πιθανόν να εμπλέκεται στην αποδόμηση της ΟΤΑ. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχουν στοιχεία στην βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία του συγκεκριμένου ενζύμου στα *Aspergilli* (Bejaoui et al., 2006).

Για τα τρία είδη των μαύρων *Aspergilli*, η ΟΤΑ διασπάστηκε συνολικά σε ΟΤα, αλλά ακολουθώντας διαφορετικά προφίλ επίδοσης. Παρά την αρχική φάση προσαρμογής (lag phase), ο *Aspergillus niger* ήταν το γρηγορότερο είδος: μέσα σε 5 ημέρες το 99% της ΟΤΑ είχε διασπαστεί. Ο συγκεκριμένος μύκητας είναι ωφέλιμος όπου απαιτείται συνολική διάσπαση της ΟΤΑ. Στις περιπτώσεις όπου επιθυμείται μερική διάσπαση, ο *Aspergillus carbonarius* ή ο *Aspergillus japonicus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τις συγκεντρώσεις της ΟΤΑ κάτω από ένα μέγιστο επίπεδο ανοχής στο κρασί (2μg/l), το οποίο έχει καθιερωθεί από την Ευρωπαϊκή νομοθεσία (Bejaoui et al., 2006).

Τα τρία είδη των μαύρων *Aspergilli* έχουν επίσης την ικανότητα να διασπούν την ΟΤΑ σε μία άγνωστη ουσία που πιθανόν να προκύπτει από μία μετατροπή του δακτυλίου της ισοκουμαρίνης, όπως αναφέρουν

οι Galtier και Alvinerie (1976). Παρ' όλα αυτά, η διαδικασία αυτή παραμένει ακόμη άγνωστη.

Αν και οι Hwang και Draughon (1994) βρήκαν ότι ο *Aspergillus niger* δεν μπορεί να διασπάσει την ΟΤΑ, ο Varga και οι συνεργάτες του (2000) και ο Abrhuposα με τους συνεργάτες του (2002) βρήκαν στελέχη αυτού του είδους που είναι ικανά να μειώσουν τις συγκεντρώσεις της ΟΤΑ σε αρχικά μολυσμένα υποστρώματα.

Ο *Aspergillus niger* είναι ένας από τους λίγους μύκητες που έχει λάβει την ιδιότητα GRAS (generally recognized as safe) από τον Οργανισμό τροφίμων και επικίνδυνων ουσιών (λόγω της χαμηλής τοξικότητάς του) και κινεί το ενδιαφέρον για περαιτέρω χρησιμοποίησή του στην βιολογική εξάλειψη της ΟΤΑ στους χυμούς σταφυλιών και τον μούστο (Bejaoui et al., 2006). Εντούτοις, ο *Aspergillus japonicus*, που χρησιμοποιείται επίσης συχνά στη βιοτεχνολογία των μυκήτων, κινεί το ενδιαφέρον καθώς έχει αναφερθεί μόνο δύο φορές ως ωχρατοξινογόνος (Dalcero et al., 2002, Battilani et al., 2003).

3.2 Βακτηριακή διάσπαση ωχρατοξίνης Α

Η ωχρατοξίνη Α διασπάται επίσης από ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο του εδάφους. Το συγκεκριμένο βακτήριο αναπτύσσεται δαπανώντας φαινυλαλανίνη και για τον λόγο αυτό μελετήθηκε για την ικανότητά του να αξιοποιεί το μόριο της φαινυλαλανίνης της ωχρατοξίνης Α. Πρόκειται για το βακτήριο *Phenylobacterium immobile* (Wegst and Lingens, 1983).

Τέσσερις μεταβολίτες απομονώθηκαν από το κυτταρικό μέσο του *Phenylobacterium immobile* (Wegst and Lingens, 1983). Ο μεταβολίτης 2 δεν αποτελεί προϊόν της βακτηριακής διάσπασης της ωχρατοξίνης Α, αλλά σχηματίζεται από την διάσπαση του μεταβολίτη 1 με όξινο καταλύτη (Gibson et al., 1973, Wegst et al., 1981). Η ωχρατοξίνη Α

μεταβολίζεται ολοκληρωτικά από το βακτήριο κάτω από συνθήκες ανάπτυξης σε υπόστρωμα με L-φαινυλαλανίνη και ωχρατοξίνη A (Wegst and Lingens, 1983).

Το βακτήριο *Phenylobacterium immobile* δεν μπορεί να αναπτυχθεί έχοντας ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας την ωχρατοξίνη A. Πειράματα που έγιναν μελετώντας την ανάπτυξη με πηγές άνθρακα την L-φαινυλαλανίνη και την αντιπυρίνη, αποκάλυψαν ότι το βακτήριο δεν αναπτύσσεται σε καλλιέργειες με αντιπυρίνη αν το μέσο ανάπτυξης περιέχει ωχρατοξίνη A (20μg/ml). Σε υποστρώματα με L-φαινυλαλανίνη, οι καλλιέργειες έδειξαν κανονική ανάπτυξη ακόμα και αν εμπλουτίστηκαν με ωχρατοξίνη A. Η L-φαινυλαλανίνη αποτρέπει την παρεμποδιστική δράση της ωχρατοξίνης A (Wegst and Lingens, 1983). Παρόμοια αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν και από τον Roschenthaler και τους συνεργάτες του (1981), ο οποίος απέδειξε ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια ήταν ευαίσθητα στην μυκοτοξίνη. Επομένως, η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *Phenylobacterium immobile* από την ωχρατοξίνη A σταματά με την προσθήκη στο υπόστρωμα L-φαινυλαλανίνης (Wegst and Lingens, 1983). Ο παρεμποδιστικός μηχανισμός της συγκεκριμένης μυκοτοξίνης για το βακτήριο αυτό είναι όμοιος με τον μηχανισμό για το βακτήριο *Bacillus subtilis* (Roschenthaler et al., 1981).

Στελέχη του *Phenylobacterium immobile* έχουν απομονωθεί από εδάφη σε διαφορετικές τοποθεσίες σε ολόκληρο τον κόσμο. Επομένως, η μετατροπή της ωχρατοξίνης A σε παράγωγο ισοκουμαρίνης (μεταβολίτης 4) φαίνεται να είναι επίσης πολύ πιθανή στη φύση. Η μετατροπή αυτή απεικονίζει την αποτοξίκωση της μυκοτοξίνης, εφόσον η τοξικότητα του προϊόντος που προκύπτει από την διάσπαση βρέθηκε ότι είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη της ωχρατοξίνης A (Yamazaki et al., 1971).

3.3 Διάσπαση ωχρατοξίνης A σε εδαφικά-φυσικά υποστρώματα

Η βιοδιάσπαση της ωχρατοξίνης A οδηγεί στο σχηματισμό της μη-τοξικής ουσίας ωχρατοξίνης α (JECFA, 2001). Πειράματα με είδη του γένους *Aspergillus* έδειξαν σχεδόν ολοκληρωτική μετατροπή της τοξίνης σε ωχρατοξίνη α εντός 5 ημερών και μετά από 7 ημέρες η ωχρατοξίνη α διασπάστηκε περαιτέρω (Varga et al., 2000). Επιπρόσθετα, αποδείχτηκε ότι η διάσπαση ήταν ταχύτερη σε στερεά υποστρώματα απ' ό τι σε υγρά (Varga et al., 2000).

Πειράματα με είδη του γένους *Rhizopus* έδειξαν διάσπαση της ωχρατοξίνης A σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% εντός 16 ημερών (Varga et al., 2005). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι μύκητες που απομονώθηκαν από σταφύλια και αιωρήματα καλλιεργειών από διάφορα φυτικά κύτταρα ήταν ικανοί να διασπάσουν την OTA (Ruhland et al., 1996, Abrunhosa et al., 2002).

Η διάσπαση της ωχρατοξίνης A διαιρείται σε δύο ευδιάκριτες φάσεις: μία αρχική γρήγορη διάσπαση και ακολουθεί μία πιο αργή διάσπαση της τοξίνης (Eberbach, 1998, Madsen et al., 1999, Guo et al., 2000).

Όσον αφορά τα εδαφικά υποστρώματα, είναι γνωστό ότι η μικροβιακή δράση είναι υψηλότερη στην περιοχή της ρίζας σε σχέση με τον κύριο όγκο του εδάφους, κατά συνέπεια ταχύτεροι μηχανισμοί διάσπασης έχουν διαπιστωθεί σε φυτεμένα εδάφη (Jacobsen et al., 2004, Mortensen and Kure, 2003, Chekol et al., 2004). Γενικότερα, από πειράματα που έγιναν η διάσπαση της ωχρατοξίνης A ήταν ταχύτερη σε φυτεμένα εδάφη σε σχέση με εδάφη που δεν είχαν φυτευτεί (Mortensen et al., 2006).

3.4 Επίδραση των ζυμών στη συγκέντρωση ωχρατοξίνης A

Οι πρόσφατες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των πιθανών μηχανισμών διάσπασης της ωχρατοξίνης A στο μούστο και το κρασί (Castellari et al., 2001, Dumeau and Trione, 2002, Rousseau and Blateyron, 2002, Bejaoui et al., 2004, Garcia Moruno et al., 2005). Διάφοροι παράγοντες εκτιμήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν την OTA από το κρασί. Ο Castellari και οι συνεργάτες του (2001) βρήκαν ότι το καζεϊνούχο κάλιο και ο ενεργός άνθρακας παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα προσρόφησης της OTA. Η επεξεργασία του κόκκινου κρασιού στο οποίο έχει προστεθεί OTA με ενεργές ζύμες ή ιζήματα ζυμών, έχει επίσης εκτιμηθεί (Garcia Moruno et al., 2005). Άλλες μελέτες εκτιμούν ότι οι μύκητες του γένους *Aspergillus* διασπούν ορισμένες αφλατοξίνες, πιθανόν μέσω υπεροξειδασών των μυκήτων και ότι η ζύμωση με στελέχη ζυμών μπορεί να καταστρέψει την πατουλίνη (Lopez-Garcia and Park, 1998). Σχετικά με τον μηχανισμό της αποδόμησης, οι ερευνητές κάνουν λόγο για δράση κάποιου ενζύμου. Σε ένα πείραμα που πραγματοποιήθηκε, ο Scott και οι συνεργάτες του (1995) για τη ζύμωση ζύθου πρόσθεσαν μαζί με μία ποσότητα OTA και τρία διαφορετικά στελέχη ζυμών του γένους *Saccharomyces*. Μετά την πάροδο 8 ημερών η OTA μειώθηκε κατά 13%. Διαπιστώθηκε ότι οι ζύμες προσρόφησαν το 21% της συνολικά αφαιρούμενης ποσότητας OTA. Σε μία πρόσφατη έρευνα, ο Bejaoui και οι συνεργάτες του (2004) απέδειξαν ότι στελέχη ζυμών του γένους *Saccharomyces*, που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση στο κρασί, ήταν ικανά να απομακρύνουν την OTA από διαφορετικά συνθετικά υποστρώματα στα οποία είχε προστεθεί, καθώς επίσης και από τον χυμό κόκκινων σταφυλιών. Η δράση των ζυμών που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* στη συγκέντρωση της OTA σε μούστο, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, δεν έχει γίνει ακόμη γνωστή.

Τα είδη των ζυμών για τα οποία έχει αποδειχτεί (Cecchini et al., 2006) ότι μειώνουν την συγκέντρωση της ωχρατοξίνης Α είναι τα εξής:

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae x bayanus

Saccharomyces bayanus

Kloeckera apiculata

Torulasporea delbrueckii

Schizosaccharomyces pombe

Candida pulcherima

Saccharomyces ludwigii

Μηχανισμοί προσρόφησης της τοξίνης πιθανότατα να λαμβάνουν μέρος και να οδηγούν στην απομάκρυνσή της. Η προσρόφηση της ΟΤΑ διεξάγεται πιθανώς από τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών. Σύμφωνα με τον Huwig και τους συνεργάτες του (2001) τα κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και λιπίδια, διαθέτουν πολυάριθμες και εύκολα προσπελάσιμες θέσεις προσρόφησης, καθώς και διαφορετικούς μηχανισμούς προσρόφησης, π.χ. δεσμούς υδρογόνου, ιοντικές ή υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. Ο μηχανισμός προσρόφησης δεν έχει προσδιοριστεί καθώς έχει αναφερθεί ότι οι ζύμες 'σκοτώνουν' τις τοξίνες δεσμεύοντας αυτές με πολυσακχαρίτες και όχι με πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, κυτταρίνη ή γλυκογόνο (Radler and Schitt, 1987).

Ανεξάρτητα από τον μηχανισμό προσρόφησης, αναμφισβήτητο γεγονός είναι ότι η αλκοολική ζύμωση οδηγεί σε μείωση της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α όταν εκείνη προστεθεί τόσο σε λευκό όσο και σε κόκκινο μούστο. Πράγματι, η μέση μείωση της συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α σε λευκά και κόκκινα κρασιά ήταν αντίστοιχα 49% και 62% περίπου (Cecchini et al., 2006).

Πέρα από το φαινόμενο της προσρόφησης μεταξύ της ΟΤΑ και των κυττάρων των ζυμών, μία ανεξάρτητη αλληλεπίδραση μεταξύ της ΟΤΑ και φαινολικών ουσιών, ή μεταξύ αυτών και άλλων μεταβολικών ουσιών, παραγόμενων από τις ζύμες, είναι πιθανή. Οι μεταβολίτες αυτοί αλληλεπιδρώντας με φαινολικές ενώσεις πιθανόν να αυξάνουν την επιφάνεια δέσμευσης της ΟΤΑ (Cecchini et al., 2006). Ο Escot και οι συνεργάτες του (2001) απέδειξαν ότι οι φαινολικές ουσίες αλληλεπιδρούν με τις μαννοπρωτεΐνες, που παράγονται από τις ζύμες, και ότι η ποσότητα των μαννοπρωτεϊνών που ελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και από τον τύπο του μούστου. Μελέτη στον μούστο από κόκκινα σταφύλια έδειξε πως είναι πιθανό οι μαννοπρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν με τις πολυφαινόλες του μούστου και να αυξάνουν έτσι την ικανότητα προσρόφησης της ΟΤΑ (Cecchini et al., 2006).

Εφόσον προϊόντα αποδόμησης της ΟΤΑ δεν βρέθηκαν, στο πείραμα που πραγματοποίησε η Cecchini με τους συνεργάτες της (2006) σε μούστο από κόκκινα και λευκά σταφύλια, οι παραπάνω ερευνητές θεώρησαν ότι η ΟΤΑ δεν διασπάται από στελέχη ζυμών. Η απομάκρυνση της τοξίνης, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, πιθανόν να αποτελεί ένα φαινόμενο προσρόφησης από τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών.

Λαμβάνοντας υπόψη την αρχική συγκέντρωση της ΟΤΑ στον μούστο και την μέση μείωσή της από την ζύμωση, μπορεί να προβλεφθεί αν η τελική συγκέντρωση της τοξίνης στο κρασί είναι εντός των ορίων που προβλέπονται από την νομοθεσία.

3.5 Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης Α από γαλακτικά βακτήρια

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) αφαιρούν την ΟΤΑ από υγρά θρεπτικά υποστρώματα (Piotrowska and Zakowska,

2000, Piotrowska and Zakowska, 2005, Turbic et al., 2002, Skrinjar et al., 1996).

Το υψηλότερο ποσοστό μείωσης της OTA (97%) προκαλείται από το στέλεχος *Lactobacillus acidophilus* VM 20, ενώ τα στελέχη *Bifidobacterium longum* LA 02 και *Bifidobacterium longum* VM 14 προκαλούν περίπου 50% μείωση της OTA (Fuchs et al., 2008).

Μεταγενέστερα πειράματα έδειξαν ότι η 'δέσμευση' τέτοιων ουσιών (OTA) εξαρτάται από διαφορετικές παραμέτρους, όπως για παράδειγμα από την συγκέντρωση των τοξινών, την πυκνότητα του κυττάρου, την τιμή pH και από την βιωσιμότητα των βακτηρίων. Η μείωση των τοξινών από τα γαλακτικά βακτήρια έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των τοξικών τους ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων έχουν την ικανότητα της αποτοξίκωσης της ωχρατοξίνης A και μπορεί να φανούν χρήσιμα στην προστασία ανθρώπων και/ή ζώων εναντίον των δυσμενών επιπτώσεων της τοξίνης στην υγεία τους (Fuchs et al., 2008).

Σε ένα εύρος τιμών pH από 5 έως 8, αποδείχτηκε ότι η μέγιστη απομάκρυνση της OTA παρατηρήθηκε στην τιμή 5 για τα βακτήρια *Lactobacillus acidophilus* VM 20 και *Bifidobacterium animalis* VM 12. Επιπλέον, για τα συγκεκριμένα βακτήρια, η μέγιστη απομάκρυνση της OTA παρατηρήθηκε σε μικροβιακό φορτίο $\geq 10^8$ cfu/ml. Η εξάλειψη της ωχρατοξίνης A από υγρά θρεπτικά υποστρώματα, όπως προαναφέρθηκε εξαρτάται και από τη συγκέντρωσή της σε αυτά. Διαπιστώθηκε πως η OTA εξαλείφθηκε από το μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων ακόμα και όταν προστέθηκαν σε αυτό υψηλές δόσεις της τοξίνης (έως 500 $\mu\text{g/ml}$). Τέλος η βιωσιμότητα των κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς τα θερμικώς αδρανοποιημένα κύτταρα μόνο μία μέτρια μείωση της OTA (11%) μπορούν να προκαλέσουν (Fuchs et al., 2008).

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.5.α) αναγράφονται τα ποσοστά μείωσης της ωχρατοξίνης A καθώς και της πατουλίνης (PAT) σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα από διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων.

LAB-species	Strain	Reduction (%)			
		Patulin		Ochratoxin A	
		500 ng	1000 ng	500 ng	1000 ng
<i>B. adolescentis</i>	LA18	7 ± 1.09	5 ± 1.39**	7 ± 1.36	10 ± 2.02**
<i>B. animalis</i>	VM12	82 ± 3.07**	78 ± 1.65**	22 ± 0.23**	15 ± 1.34**
<i>B. animalis</i>	LA17	11 ± 5.56*	15 ± 3.32**	8 ± 3.18*	6 ± 1.02
<i>B. bifidum</i>	VM13	11 ± 3.61**	16 ± 1.43**	28 ± 1.68**	25 ± 0.90**
<i>B. breve</i>	LA14	6 ± 2.43	3 ± 2.25	16 ± 1.25**	17 ± 2.64**
<i>B. longum</i>	VM14	7 ± 2.91	4 ± 1.12	57 ± 4.60**	58 ± 3.39**
<i>B. longum</i>	LA02	4 ± 5.37	7 ± 2.77	52 ± 4.61**	54 ± 1.32**
<i>L. acidophilus</i>	VM19	4 ± 2.59	6 ± 2.42	18 ± 1.71**	12 ± 0.37**
<i>L. acidophilus</i>	VM20	21 ± 3.07**	18 ± 1.65**	97 ± 2.11**	96 ± 1.91**
<i>L. acidophilus</i>	VM05	19 ± 4.15**	19 ± 2.65**	32 ± 2.03**	31 ± 1.30**
<i>L. brevis</i>	VM21	16 ± 3.67**	16 ± 2.40**	4 ± 1.93	4 ± 1.58
<i>L. brevis</i>	VM22	3 ± 4.19	9 ± 1.63**	11 ± 1.49**	5 ± 1.82
<i>L. casei</i>	VM01	11 ± 1.96**	14 ± 2.01**	31 ± 1.72**	28 ± 1.09**
<i>L. casei casei</i>	VM25	3 ± 1.62	3 ± 1.41	12 ± 1.90**	15 ± 0.44**
<i>L. casei casei</i>	LA09	5 ± 1.10**	4 ± 2.01	5 ± 3.17	2 ± 1.27
<i>L. curvatus</i>	LA43	7 ± 1.94	6 ± 2.83	15 ± 1.72**	16 ± 2.42**
<i>L. curvatus</i>	LA42	18 ± 3.11*	17 ± 1.70**	20 ± 2.17**	14 ± 1.44**
<i>L. delbrueckii ssp. bulg.</i>	VM26	4 ± 3.28	7 ± 4.23	29 ± 3.40**	27 ± 2.38**
<i>L. delbrueckii ssp. bulg.</i>	VM27	13 ± 4.41**	10 ± 3.10**	18 ± 3.25**	13 ± 1.46**
<i>L. helveticus</i>	VM34	10 ± 2.49**	8 ± 2.40**	24 ± 2.18**	25 ± 2.80**
<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i>	VM32	7 ± 2.97	4 ± 1.94	34 ± 1.21**	34 ± 0.84**
<i>L. paraplantarum</i>	VM35	26 ± 3.45**	24 ± 2.00**	12 ± 3.23**	18 ± 2.55**
<i>L. paraplantarum</i>	LA07	20 ± 3.13**	16 ± 2.11**	3 ± 4.39	4 ± 1.15
<i>L. pentosus</i>	VM36	31 ± 3.26**	30 ± 2.98**	22 ± 7.45**	18 ± 7.46**
<i>L. plantarum</i>	VM37	34 ± 1.34**	39 ± 3.23**	43 ± 2.84**	44 ± 1.27**
<i>L. plantarum</i>	VM02	8 ± 2.26	8 ± 2.78**	36 ± 2.24**	33 ± 1.53**
<i>L. rhamnosus</i>	VM40	6 ± 1.96	6 ± .36	13 ± 3.89**	12 ± 2.16**
<i>L. rhamnosus</i>	VM04	4 ± 3.24	5 ± 1.64	3 ± 1.08	2 ± 1.27
<i>L. silvarius</i>	LA01	6 ± 3.80	7 ± 1.83	5 ± 2.23	9 ± 1.75**
<i>S. thermophilus</i>	VM42	21 ± 2.78**	19 ± 1.43**	13 ± .089**	12 ± 0.84**

Πίνακας 3.5.α: ^a Το μίγμα επώασης περιέχει 10⁹ cfu/ml και είτε 500 ng/ml ή 1000 ng/ml για τις δύο τοξίνες PAT και OTA. Το μίγμα επωάστηκε στους 37° C για 4h (Student's t-test, *P<=0.05, **P<=0.01) (Fuchs et al., 2008).⁶

Σε προηγούμενες μελέτες που έγιναν όσον αφορά την εξάλειψη της OTA, μόνο λίγα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων συγκαταλέχθηκαν. Ο Turbic και οι συνεργάτες του (2002) εξέτασαν μόνο δύο στελέχη του είδους *Lactobacillus rhamnosus*, ενώ οι Piotrowska και Zakowska

⁶ Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmuller, S. 'Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria', 1401

(2005) ερεύνησαν τις προστατευτικές ιδιότητες 29 στελεχών 9 διαφορετικών ειδών και βρήκαν ότι ένα στέλεχος του *Lactobacillus rhamnosus* έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και ακολούθησαν στελέχη του είδους *Lactobacillus acidophilus*. Τα στελέχη του είδους *Lactobacillus rhamnosus* θεωρούνται επίσης τα πιο αποτελεσματικά από μελέτες που έγιναν σχετικά με τη δέσμευση της αφλατοξίνης B₁ (AFB₁) (Haskard et al., 2001, Pierides et al., 2000, Peltonen et al., 2001).

Οι μηχανισμοί της αποτοξίκωσης δεν έχουν γίνει γνωστοί μέχρι σήμερα. Έχει αναφερθεί πως η αποτοξίκωση της ΟΤΑ γίνεται από αντιπροσωπευτικά είδη της μικροχλωρίδας των μηρυκαστικών μέσω διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού που οδηγεί στην απελευθέρωση φαινυλαλανίνης (Hult et al., 1976, Ozpinar et al., 1999).

Όπως προαναφέρθηκε τα σημαντικότερα αποτελέσματα στην αποτοξίκωση της ωχρατοξίνης Α έχουν παρατηρηθεί από στελέχη των ειδών *Lactobacillus acidophilus* και *Bifidobacterium animalis*. Και τα δύο είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων, κατά συνέπεια τα αποτελέσματα των ερευνών που έγιναν (Fuchs et al., 2008) μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη στρατηγικών για την αποτοξίκωση των φυτικά παραγόμενων μολυσμένων προϊόντων με ωχρατοξίνη Α με χρήση γαλακτικών βακτηρίων.

3.5.1 Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης Α από είδη του γένους *Bacillus*

Έρευνες έδειξαν ότι ένα είδος του γένους *Bacillus* είναι ικανό να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του είδους *Aspergillus flavus* και του στελέχους *Aspergillus westerdijkiae* NRRL 3174 και να απομακρύνει δύο τοξίνες (74% μείωση της AFB₁ και 92,5% μείωση της ΟΤΑ). Πρόκειται για το είδος *Bacillus licheniformis*. Η μείωση της ΟΤΑ οφείλεται στην διάσπασή της σε ΟΤα. Ένα ακόμη είδος του γένους

Bacillus που παρεμποδίζει την ανάπτυξη των δύο ειδών του γένους *Aspergillus* που προαναφέρθηκαν και διασπά το 85% της AFB₁ είναι το *Bacillus subtilis*. Η μείωση της αφλατοξίνης B₁ δεν σχετίζεται με την εμφάνιση κάποιου προϊόντος αποδόμησης. Το είδος *Bacillus licheniformis* μπορεί να αποτελέσει πηγή ενζύμου ικανού για τη διάσπαση της OTA σε τρόφιμα ή ζωοτροφές (Petchkongkaew et al., 2008).

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* ανήκουν στα θετικά κατά Gram, απόλυτα ή προαιρετικά αερόβια βακτήρια.

Συνοπτικά, όσον αφορά την OTA, μερικοί μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να την αποδομήσουν είναι οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* spp. (Bohm et al., 2000, Piotrowska and Wakowska, 2000), *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (Bohm et al., 2000), *Rhizopus* (Varga et al., 2005) and *Aspergillus niger* (Bejaoui et al., 2006).

Το υψηλότερο ποσοστό μείωσης της OTA (81%) επιτυγχάνεται από το στέλεχος *Bacillus licheniformis* CM 21, το οποίο παρεμποδίζει στον μεγαλύτερο βαθμό την ανάπτυξη του *Aspergillus westerdijkiae* NRRL 3174. Το στέλεχος αυτό του γένους *Bacillus* έχει επίσης την ικανότητα να διασπά πάνω από το 60% της αφλατοξίνης B₁ (Petchkongkaew et al., 2008).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το βακτήριο *Bacillus licheniformis* CM 21 διασπά την OTA εντός των 48 ωρών επώασης (διάρκεια φάσης ανάπτυξης του βακτηρίου: 36 ώρες), δεδομένου ότι η παραγωγή ωχρατοξίνης α αυξάνεται εντός του ίδιου χρονικού διαστήματος (Petchkongkaew et al., 2008).

Πολλές είναι οι αναφορές που περιγράφουν την αποδόμηση της OTA από την μικροβιακή χλωρίδα της γαστροεντερικής οδού των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των μικροβίων από βοοειδή και πρόβατα (Galtier and Alvinerie, 1976, Hult et al., 1976, Park et al.,

1988) και των μικροβίων που ζουν κυρίως στο τυφλό και παχύ έντερο των τρωκτικών (Madhyastha et al., 1992). Η εντερική μικροχλωρίδα των ανθρώπων μπορεί επίσης μερικώς να αποδομήσει την OTA (Akiyama et al., 1997). Τα είδη που είναι υπεύθυνα για την αποτοξίκωση της OTA δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί, αν και κυρίως τα πρωτόζωα θεωρείται ότι λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της βιομετατροπής στα μηρυκαστικά (Kiessling et al., 1984). Η διάσπαση της OTA έχει παρατηρηθεί στο γάλα ως αποτέλεσμα της δράσης των *Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Bifidobacterium* spp. (Skrinjar et al., 1996), ενώ δύο άλλα βακτήρια, το *Acinetobacter calcoaceticus* (Hwang and Draughon, 1994) και το *Phenylobacterium immobile* (Wegst and Lingens, 1983), μπορούν να μετατρέψουν την OTA στην πολύ λιγότερο τοξική ωχρατοξίνη α σε υγρές καλλιέργειες. Επιπλέον, πρόσφατες αναφορές περιγράφουν τη διάσπαση της OTA από μερικά στελέχη του γένους *Aspergillus* και *Pleurotus* και/ή των ενζύμων τους (Varga et al., 2000). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει παρατηρηθεί (Petchkongkaew et al., 2008) ότι η OTA αποτοξικώνεται ικανοποιητικά από ορισμένα στελέχη του γένους *Bacillus* και ειδικά από το *Bacillus licheniformis* CM 21, όπου κάτι τέτοιο δεν είχε μέχρι τώρα αναφερθεί γι' αυτά τα στελέχη. Ομοιότητες μεταξύ της κινητικής της διάσπασης της OTA από τον μύκητα *Aspergillus niger* και τα είδη του γένους *Bacillus* και η ανίχνευση του προϊόντος της αποδόμησης, ωχρατοξίνης α, στο διάλυμα ανάπτυξης του *Bacillus licheniformis*, συνιστούν ότι η δράση μιας καρβοξυπεπτιδάσης Α πιθανόν να είναι υπεύθυνη για την διάσπαση της OTA από τα παραπάνω είδη (Petchkongkaew et al., 2008).

Πρόσθετες μελέτες είναι σε εξέλιξη για τον προσδιορισμό των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία αποτοξίκωσης της ωχρατοξίνης Α από είδη του γένους *Bacillus*.

3.6 Αποτοξίκωση ωχρατοξίνης A από είδη του γένους *Rhizopus*

Η ωχρατοξίνη A αποδομείται επιτυχώς από τα είδη *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus homothallicus*, 2 στελέχη του είδους *Rhizopus oryzae* και από 4 ακόμη αγνώστης ταυτότητας στελέχη του γένους *Rhizopus*. Τα είδη του γένους *Rhizopus* έχουν την ικανότητα να διασπούν πάνω από το 95% της ωχρατοξίνης A εντός 16 ημερών. Για το είδος *Rhizopus stolonifer* έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να διασπάσει αποτελεσματικά την ωχρατοξίνη A σε ενυδατωμένο σιτάρι. Πολλές μελέτες είναι σε εξέλιξη για τον προσδιορισμό των ενζύμων και γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την αποτοξίκωση της ωχρατοξίνης A και για την μεταφορά αυτών των γονιδίων σε άλλα στελέχη του γένους *Rhizopus* ή μικρόβια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια για την αποτοξίκωση των δημητριακών (Varga et al., 2005).

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει ορισμένους μικροοργανισμούς που διασπούν την ωχρατοξίνη A (πίνακας 3.6.1).

Microbes or enzymes	Reference
Rumen microbes	Galtier and Alvinerie, 1976; Hult et al., 1976; Akiyama, 1997
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Westlake et al., 1987
<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	Skrinjar et al., 1996
<i>Acinetobacter</i> sp.	Hwang and Draughon, 1994
<i>Phenylobacterium</i> sp.	Wegst and Lingens, 1983
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i>	Varga et al., 2000
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i>	Abrunhosa et al., 2002
<i>A. niger</i> (lipase)	Stander et al., 2000
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Engelhardt, 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	Böhm et al., 2000
Carboxypeptidase A	Deberghes et al., 1995; Stander et al., 2001

Πίνακας 3.6.1: Μικροοργανισμοί που διασπούν την ωχρατοξίνη A⁷

Ενώ ο *Aspergillus niger* μπορεί να αποδομήσει πάνω από το 90% της OTA μετά από 6 ημέρες επώασης, τα είδη του γένους *Rhizopus* διασπούν περίπου το 90% της OTA σε 12 περίπου ημέρες (Varga et al., 2005). Ομοιότητες μεταξύ της κινητικής διάσπασης της OTA του *Aspergillus niger* και των ειδών του γένους *Rhizopus* και η ανίχνευση της ωχρατοξίνης α ως προϊόν αποδόμησης υποδεικνύουν ότι η δράση της καρβοξυπεπτιδάσης A πιθανόν να είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση της OTA από τα συγκεκριμένα είδη (Abrunhosa et al., 2002).

Μόνο το είδος *Rhizopus stolonifer* μπορεί να διασπάσει την OTA στο σιτάρι. Το είδος αυτό μπορεί να διασπάσει το 96,5% της OTA στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Άλλα είδη δεν είναι ικανά να διασπάσουν την OTA στο σιτάρι, πιθανόν επειδή δεν είναι το κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους ή γιατί το υπόστρωμα αυτό δεν ευνοεί την έκφραση

⁷ Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, J., Vagvolgyi, C. 'Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates', 322

των ενζύμων που είναι απαραίτητα για την αποδόμηση της τοξίνης (Varga et al., 2005).

Το γεγονός ότι το είδος *Rhizopus stolonifer* έχει την ικανότητα να διασπά την ΟΤΑ σε κόκκους σιταριού, είναι πολλά υποσχόμενο, εφόσον μπορεί να οδηγήσει στην βιολογική εξάλειψη της συγκεκριμένης μυκοτοξίνης. Όπως προαναφέρθηκε, ο παραπάνω μύκητας πιθανόν να παρέχει μία πηγή ενζύμων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτοξίκωση της ΟΤΑ σε γεωργικά προϊόντα που έχουν επιμολυνθεί με την τοξίνη αυτή (Varga et al., 2005).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ

4.1 Παρουσία της ωχρατοξίνης A στα τρόφιμα

Έρευνες που έγιναν σχετικά με τη συχνότητα και τη συγκέντρωση ωχρατοξίνης A σε δείγματα από τρόφιμα και στο ανθρώπινο αίμα, υποδεικνύουν ότι πολυάριθμα τρόφιμα έχουν μολυνθεί (IARC, 1993, Breitholtz-Emanuelsson et al., 1994). Προσφάτως, η Ευρωπαϊκή ένωση καθιέρωσε ως μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση OTA τα 2ppb στο κρασί (νόμος 123/2005, τον Ιανουάριο του 2005, ο οποίος τροποποίησε τον νόμο 466/2001 σε ό,τι αφορά την ωχρατοξίνη A) ξεκινώντας από την παραγωγή του 2005 (Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2005), ευελπιστώντας στη μείωση του συγκεκριμένου ορίου ακολουθώντας καινούριες τεχνολογικές και τοξικολογικές μεθόδους.

Θεωρείται ότι το 15% της συνολικής ποσότητας ωχρατοξίνης A που έχει εισέλθει στα τρόφιμα ανιχνεύεται στο κρασί (Codex Alimentarius Commission, 1998), το οποίο θεωρείται η δεύτερη κύρια πηγή ωχρατοξίνης A μετά από τα δημητριακά (Codex Alimentarius Commission, 1998). Επιπλέον, ο χυμός σταφυλιού έχει παρατηρηθεί ότι περιέχει περισσότερη OTA απ' ό,τι μερικά κρασιά και έτσι συμβάλλει στην πρόσληψη ωχρατοξίνης A από τα παιδιά (Zimmerli and Dick, 1996). Η μόλυνση των σταφυλιών και των προϊόντων τους με OTA μπορεί, κατά συνέπεια, να αποτελέσει σοβαρό πρόβλημα υγείας. Έχουν γίνει προσπάθειες για τον έλεγχο της μόλυνσης σε πολλές χώρες και ειδικά στις Ευρωπαϊκές (Ochra Wine Risk Project) (Bejaoui et al., 2006). Η παρουσία της OTA στα σταφύλια και τα προϊόντα τους αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1995 (Zimmerli and Dick, 1995). Έκτοτε, πραγματοποιήθηκαν πολλές διαφορετικές μελέτες για την εύρεση της προέλευσης της μόλυνσης αυτής σε ολόκληρο τον κόσμο (Bejaoui et al., 2005). Προσπάθειες επίσης έχουν γίνει για τον καθορισμό μιας συσχέτισης μεταξύ της παρουσίας ωχρατοξίνης A και των μυκήτων που απομονώνονται από τα σταφύλια. Ο μύκητας *Aspergillus carbonarius* και το σύνολο των στελεχών του μύκητα *Aspergillus niger* θεωρούνται οι

πρωτίστως υπεύθυνοι μύκητες για την παραγωγή ωχρατοξίνης Α στα σταφύλια και στα παραγόμενα προϊόντα (Serra et al., 2001, Cabanes et al., 2002, Sage et al., 2002). Πέρα από τους παραπάνω μύκητες, μελέτες (Bejaoui et al., 2005, Abarca et al., 1994, Bau et al., 2005, Cabanes et al., 2002) έδειξαν ότι και ο μύκητας *Aspergillus japonicus* συγκαταλέγεται σε αυτούς που αποτελούν κύρια πηγή ωχρατοξίνης Α στα σταφύλια. Η κυριότερη όμως πηγή ωχρατοξίνης Α στα σταφύλια θεωρείται ο μύκητας *Aspergillus carbonarius*. Γενικότερα, οι καρποί των σταφυλιών φέρουν υψηλό πληθυσμό μικροοργανισμών στην επιφάνεια στους οποίους περιλαμβάνονται κυρίως ζύμες και βακτήρια. Ο χυμός που εξάγεται από τη συμπίεση των σταφυλιών φέρει εκτός από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στην επιφάνεια του καρπού και μικροοργανισμούς που προέρχονται από το έδαφος. Μύκητες των γενών *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* κ.ά. αναπτύσσονται στους καρπούς των σταφυλιών (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2000).

Η ωχρατοξίνη Α συχνά ανιχνεύεται σε διάφορα προϊόντα, όπως στους δημητριακούς καρπούς (Jorgensen et al., 1996), στον καφέ (Pittet et al., 1996), στην σταφίδα (MacDonald et al., 1999), στην μπίρα (Visconti et al., 2000) και στο κρασί (Zimmerli and Dick, 1995). Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα επίπεδα ωχρατοξίνης Α στα διάφορα τρόφιμα πρέπει να μειωθούν τόσο όσο είναι τεχνολογικά εφικτό (Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 1997).

Αξιολογήσεις σχετικά με την μόλυνση κόκκων δημητριακών με μυκοτοξίνες έχουν αναφέρει υψηλές συγκεντρώσεις ζεαραλενόνης (ZON) και ωχρατοξίνης Α (OTA) σε διάφορες καλλιέργειες σε πολλές χώρες (Pohland et al., 1992, Placinta et al., 1999). Έχει αναφερθεί η περιεκτικότητα σε ζεαραλενόνη που κυμαίνεται από 0,001-8,04 mg/kg (σιτάρι), 0,016-0,095 mg/kg (βρώμη) και 0,004-15 mg/kg (κριθάρι) (Placinta et al., 1999). Η περιεκτικότητα σε ωχρατοξίνη Α είναι γενικώς μικρότερη σε σχέση με την περιεκτικότητα σε ζεαραλενόνη, π.χ. σε επίπεδα μεταξύ 0,01 και 5,0 mg/kg, παρόλο που έχουν αναφερθεί και

υψηλότερες περιεκτικότητες (Pohland et al., 1992). Η περιεκτικότητα της OTA σε μολυσμένα τρόφιμα, όπως το σιτάρι, συνήθως ποικίλλει μεταξύ των τιμών 0,10 και 0,89 μg/kg (JECFA, 2001).

Η παρουσία της OTA στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης μπορεί να προέλθει: άμεσα, λόγω της απευθείας επιμόλυνσής τους με τοξικούς μύκητες και έμμεσα, λόγω της κατανάλωσης από τα ζώα ζωοτροφών που περιέχουν OTA (Kuiper-Goodman and Scott, 1989) και που αποτελεί την πλέον συχνή μορφή μόλυνσης των τροφίμων (Matrella et al., 2006).

Λίγες σχετικά μελέτες έχουν δημοσιευτεί για την παρουσία της OTA στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης. Αντίθετα, οι περισσότερες μελέτες για την παρουσία της τοξίνης αφορούν στα δημητριακά και σε άλλα τρόφιμα φυτικής προέλευσης (Γκόβαρης και συν., 2007).

Από τα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, το χοιρινό κρέας, καθώς και τα κρεατοσκευάσματά του, θεωρούνται ως η πιο σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από την OTA (Curtui et al., 2001). Στους χοίρους, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις OTA εντοπίζονται στο αίμα, τους νεφρούς, το ήπαρ, τους μύες και το λίπος (Chiavaro et al., 2002α). Συνεπώς, τα κρεατοσκευάσματα που εμπεριέχουν αίμα και νεφρούς χοίρου πρέπει να θεωρούνται σημαντικός παράγοντας για πιθανή μόλυνση των καταναλωτών από την τοξίνη.

Οι μέσες συγκεντρώσεις της τοξίνης που ανιχνεύθηκαν σε κρεατοσκευάσματα από χοιρινό κρέας ήταν 0,052 μg/kg, ενώ συγκριτικά οι αντίστοιχες τιμές σε δημητριακά ήταν 0,94 μg/kg (JECFA, 2001).

Στα πλαίσια της Ε.Ε. πραγματοποιήθηκαν δύο επιστημονικά προγράμματα για την καταγραφή της παρουσίας της OTA στα τρόφιμα στις χώρες της Ένωσης (EU SCOOP task 3.2.2., 1997, EU SCOOP task 3.2.7., 2002) για τα χρονικά διαστήματα 1997-1999 και 2000-2002. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των δύο μελετών έδειξαν ότι σε σύνολο 1860 δειγμάτων κρέατος που εξετάστηκαν για την παρουσία της OTA (στοιχεία από Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία και Ηνωμένο Βασίλειο)

ανιχνεύτηκε σχετικά χαμηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων (18%). Το σύνολο των θετικών δειγμάτων προερχόταν από τρόφιμα χοιρινού κρέατος και η μέση συγκέντρωση τοξίνης σε αυτά ήταν 0,19 µg/kg. Στις ίδιες μελέτες, η συσχέτιση των συγκεντρώσεων της ΟΤΑ στο πλάσμα αίματος ανθρώπων από Γαλλία, Νορβηγία και Σουηδία με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της τοξίνης στα τρόφιμα, έδειξε ότι τα δημητριακά συνέβαλαν κατά 50% και ακολουθούσαν το κρασί με 13%, ο καφές με 10%, τα μπαχαρικά με 8%, άλλα τρόφιμα με 6%, η μπύρα με 5%, το κακάο με 4%, τα αποξηραμένα φρούτα με 3%, ενώ το κρέας συνέβαλε μόλις 1%.

Τα σφάγια των χοίρων θεωρούνται μολυσμένα όταν η συγκέντρωση της ΟΤΑ στους νεφρούς υπερβαίνει τα 25 µg/kg (Γκόβαρης και συν., 2007).

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για την παρουσία της ΟΤΑ στο κρέας των πτηνών έδειξε ότι το ποσοστό μόλυνσης είναι πολύ μικρό (EFSA, 2004). Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι είναι δυνατή η μεταφορά της τοξίνης από τη μολυσμένη τροφή των ορνίθων στα αυγά τους (Piskorska-Pliszczynska and Juszkiwicz, 1990).

Παρουσία της ΟΤΑ έχει αναφερθεί σε γάλα ανθρώπου, κουνελιού και ποντικιού (Skaug et al., 2001). Επίσης, έχει αναφερθεί η παρουσία της τοξίνης σε αγελαδινό γάλα, γεγονός που δείχνει ότι μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να ξεφύγουν από το μεταβολισμό της μεγάλης κοιλίας, να απορροφηθούν και να περάσουν στο γάλα (Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

5.1 Νομοθεσία μυκοτοξινών και ειδικότερα ωχρατοξίνης A

Από την ανακάλυψη των μυκοτοξινών στις αρχές της δεκαετίας του 1960, έχουν θεσπιστεί σε πολλές χώρες νομοθετικά μέτρα για την προστασία των καταναλωτών από τις βλαβερές επιπτώσεις των μυκοτοξινών. Έως το 2003, περίπου 40 χώρες είχαν θεσπίσει νομοθετικά ή με τη μορφή οδηγίας όρια για την ΟΤΑ σε τρόφιμα, κυρίως, φυτικής προέλευσης και στις ζωοτροφές (FAO, 2004).

Η Επιστημονική Επιτροπή για τα Τρόφιμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (SCF) έχει θεσπίσει ως μέγιστη ημερήσια δόση της ΟΤΑ τα 5 µg/kg (SCF, 1998). Στην Ε.Ε., ως μέγιστα όρια για την ΟΤΑ έχουν θεσπιστεί τα 5 µg/kg για τους δημητριακούς καρπούς, τα 3 µg/kg για τα προϊόντα που προέρχονται από τα δημητριακά και προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και τα 10 µg/kg για αποξηραμένα προϊόντα, όπως οι σταφίδες (Ε.Ε. Οδηγία 472/2002). Η μεταγενέστερη Οδηγία 123/2005 θέσπισε ως ανώτατο όριο τα 5 µg/kg για τον ψημένο καφέ, τα 10 µg/kg για τον διαλυτό καφέ, τα 2 µg/kg για το κρασί και τα 2 µg/kg για τον χυμό σταφυλιού και τον μούστο (Ε.Ε. Οδηγία 123/2005).

Νομοθετικά μέτρα για την ΟΤΑ στα τρόφιμα έχουν θεσπιστεί και σε άλλες χώρες της Ευρώπης και της Βορείου και Λατινικής Αμερικής, με όρια που ποικίλλουν από 3-50 µg/kg (FAO, 2004). Στην Ε.Ε. δεν έχουν θεσπιστεί ακόμη συγκεκριμένα όρια για την ωχρατοξίνη Α για τις ζωοτροφές, αλλά κάποιες χώρες (Εσθονία, Λιθουανία, Σλοβενία, Σουηδία) έχουν θεσπίσει όρια σε τοπικό επίπεδο (FAO, 2004). Εθνική νομοθεσία για την ΟΤΑ στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης υπάρχει σε 3 χώρες και συγκεκριμένα στη Δανία (νεφροί χοίρων ≤ 25 µg/kg), στην Εσθονία (ήπαρ χοίρων ≤ 20 µg/kg) και στην Ιταλία (χοιρινό κρέας και κρεατοσκευάσματα ≤ 1 µg/kg), (FAO, 2004).

Συμπερασματικά, προτείνεται να ενθαρρυνθεί η εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου που θα καταγράφουν την παρουσία της ΟΤΑ στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, δίνοντας ιδιαίτερη βαρύτητα στο

χοιρινό κρέας και στα κρεατοσκευάσματα που παρασκευάζονται από αυτό (Γκόβαρης και συν., 2007).

Μερικά από τα πιο βασικά νομοθετήματα που έχουν θεσπιστεί για τις μυκοτοξίνες είναι τα ακόλουθα:

Καν. (ΕΚ) 1881/2006: Καθορισμός μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα

Καν. (ΕΚ) 683/2004: Τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 όσον αφορά τις αφλατοξίνες και την ωχρατοξίνη Α σε τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και μικρά παιδιά

Καν. (ΕΚ) 466/2001: Καθορισμός μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 472/2002: της Επιτροπής, της 12ης Μαρτίου 2002, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 για τον καθορισμό μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 123/2005: της Επιτροπής, της 26ης Ιανουαρίου 2005, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ.466/2001 όσον αφορά την ωχρατοξίνη Α

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα μέγιστα επιτρεπτά όρια της ΟΤΑ σύμφωνα με τον κανονισμό 1881/2006.

Ωχρατοξίνη Α	Μέγιστα επιτρεπτά όρια (ppb)
Μη μεταποιημένα δημητριακά	5,0
Όλα τα προϊόντα που παράγονται από μη μεταποιημένα δημητριακά, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων με βάση τα δημητριακά και των δημητριακών που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων όσων προορίζονται για βρέφη	3,0
Σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή σταφίδα και σουλτανίνα)	10,0
Φρυγμένοι κόκκοι καφέ και φρυγμένος και αλεσμένος καφές, εξαιρουμένου του διαλυτού καφέ	5,0
Διαλυτός καφές (στιγμαιαίος καφές)	10,0
Οίνοι (συμπεριλαμβανομένων των αφρωδών οίνων, εξαιρουμένων των οίνων λικέρ και των οίνων με αλκοολικό τίτλο όχι μικρότερο του 15 % vol) και ποτά που προέρχονται από ζύμωση φρούτων	2,0
Αρωματισμένοι οίνοι, αρωματισμένα ποτά με βάση τον οίνο και αρωματισμένα κοκτέιλ αμπελοοινικών προϊόντων	2,0
Χυμός σταφυλιών, συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών, όπως αυτός ανασυστάθηκε, νέκταρ σταφυλιών, γλεύκος σταφυλιών και συμπυκνωμένος γλεύκος σταφυλιών όπως αυτός ανασυστάθηκε, οι οποίοι προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο	2,0
Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	0,50
Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	0,50
Ωμός καφές, ξηρά φρούτα εκτός από τις σταφίδες, μπίρα, κακάο και προϊόντα με βάση το κακάο, λικέρ, προϊόντα με βάση το κρέας, καρυκεύματα και γλυκόριζα	—

Πίνακας 5.1.1: Μέγιστα επιτρεπτά όρια ΟΤΑ (Καν.1881/2006)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σκοπός του πειράματος, που περιγράφεται στη συνέχεια, ήταν η μελέτη της επίδρασης συγκεκριμένων ειδών ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων στην αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A (OTA) σε εργαστηριακά υποστρώματα, με αποτέλεσμα τη βιολογική αποτοξίκωση των υποστρωμάτων αυτών από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Η βιολογική αποτοξίκωση των εργαστηριακών υποστρωμάτων από την ωχρατοξίνη A και περαιτέρω διαφόρων τροφίμων (από βιβλιογραφικές αναφορές), είναι ιδιαίτερα σημαντική, εφόσον οδηγεί σε λιγότερο τοξικά δευτερογενή προϊόντα, τα οποία είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους στα θρεπτικά αυτά υποστρώματα.

6.1 Υλικά και μέθοδοι

6.1.1 Ζύμες και γαλακτικά βακτήρια

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 16 στελέχη ζυμών, εκ των οποίων 3 στελέχη ανήκαν σε 3 διαφορετικά είδη του γένους *Hanseniaspora*, 1 στέλεχος ανήκε στο γένος *Kluyveromyces*, 2 στελέχη σε 2 διαφορετικά είδη του γένους *Pichia*, 3 στελέχη σε 3 διαφορετικά είδη του γένους *Issatchenkia*, 2 στελέχη σε δύο ίδια είδη του γένους *Zygosaccharomyces*, 2 στελέχη σε δύο ίδια είδη του γένους *Kazachstania*, 1 στέλεχος ανήκε στο γένος *Saccharomyces*, 1 στέλεχος στο γένος *Lachencea* και 1 άγνωστο στέλεχος (αγνώστου ταυτότητας). Όλες οι ζύμες απομονώθηκαν από κρασί.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 29 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (LAB), εκ των οποίων τα 7 ανήκαν στο ίδιο είδος του γένους *Bacillus*, 6 ανήκαν στο ίδιο είδος του γένους *Pediococcus*, 6 στο ίδιο είδος του γένους *Streptococcus*, 8 στο ίδιο είδος του γένους *Weissella* και 2 στελέχη ανήκαν σε 2 διαφορετικά είδη του γένους *Lactobacillus*. Η απομόνωση των γαλακτικών βακτηρίων έγινε από γλυκάνισο,

βασιλικό, αλεύρι, προζύμι, κατά το αρχικό στάδιο ζυμωτικών διαδικασιών, κατά το τελικό στάδιο ζυμωτικών διαδικασιών, από τον αφρό, ο οποίος προκύπτει από τη ζύμωση και από ζυμούμενα αλλαντικά.

Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα είδη των ζυμών και των γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η προέλευσή τους (πίνακας 6.1.1_α). Επιπλέον στον πίνακα αναγράφεται και μία αυθαίρετη κωδικοποίηση των μικροοργανισμών, ώστε να μπορούν να διαχωριστούν οι μικροοργανισμοί του ίδιου είδους, εφόσον δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

Πίνακας 6.1.1: Είδη και προέλευση ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

	ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
ZYMEΣ	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	A1	ΚΡΑΣΙ
	<i>Kluyveromyces dobzhankii</i>	A2	
	<i>Pichia fermentas</i>	A3	
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	A4	
	Αγνώστου ταυτότητας είδος	A5	
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	A6	
	<i>Issatchenkia terricola</i>	A7	

ZYMEΣ	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	A8	ΚΡΑΣΙ
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	A9	
	<i>Kazachstania hellenica</i>	A10	
	<i>Kazachstania hellenica</i>	A11	
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	A12	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A13	
	<i>Lachencea thermotolerans</i>	A14	
	<i>Pichia guilliermondii</i>	A15	
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	A16	
LAB	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1566	προζύμι
		1586	τελικό στάδιο ζύμωσης
		1405	γλυκάνισο
		1407	γλυκάνισο
		1399	βασιλικός
		1551	αρχικό στάδιο ζύμωσης
		1408	γλυκάνισο
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1541	αλεύρι
		1547	αφρός ζύμωσης

		1561	προζύμι	
LAB		1567	προζύμι	
		1575	προζύμι	
		1576	τελικό στάδιο ζύμωσης	
	<i>Streptococcus salivarius</i>		1477	προζύμι
			1484	προζύμι
			1519	τελικό στάδιο ζύμωσης
			1467	προζύμι
			1471	προζύμι
			1517	τελικό στάδιο ζύμωσης
		<i>Weissella cibaria</i>		1543
			1528	αλεύρι
			1539	αλεύρι
			1581	τελικό στάδιο ζύμωσης
			1571	προζύμι
			1580	τελικό στάδιο ζύμωσης
			1563	προζύμι
			1585	τελικό στάδιο ζύμωσης
		<i>Lactobacillus sake</i>	648	αλλαντικά ζύμωσης
		<i>Lactobacillus casei</i>	652	αλλαντικά ζύμωσης

Η επιλογή των συγκεκριμένων ζυμών για τη διεξαγωγή του πειράματος βασίστηκε στο γεγονός ότι πρόκειται για ζύμες οι οποίες απομονώθηκαν από κρασί όπου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα

προϊόντα παρουσίας ωχρατοξίνης A. Κατά συνέπεια, οι παραπάνω ζύμες που μελετήθηκαν, συμμετέχουν στη ζύμωση του κρασιού, δηλαδή σε ένα προϊόν που αποτελεί πιθανή πηγή ωχρατοξίνης A.

Όπως προαναφέρθηκε, τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκαν από γλυκάνισο, βασιλικό, αλεύρι, προζύμι, από το αρχικό στάδιο ζυμωτικών διαδικασιών, από το τελικό στάδιο ζυμωτικών διαδικασιών, τον αφρό ζύμωσης και από ζυμούμενα αλλαντικά. Η επιλογή των συγκεκριμένων γαλακτικών βακτηρίων βασίστηκε ομοίως στο γεγονός ότι πρόκειται για γαλακτικά βακτήρια τα οποία συμμετέχουν σε ζυμωτικές διαδικασίες, μιας και πολλά από τα προϊόντα που αποτελούν πιθανή πηγή ωχρατοξίνης A είναι ζυμούμενα (μπύρα, κρασί). Όσον αφορά τα γαλακτικά που απομονώθηκαν από γλυκάνισο και βασιλικό, επιλέχθηκαν αυθαίρετα για μελέτη πιθανής επίδρασής τους στη συγκέντρωση ωχρατοξίνης A.

Οι ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

6.1.1.1 Μεμονωμένα στελέχη και κοκτέιλ ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων

Οι παραπάνω μικροοργανισμοί εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στην αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A (OTA), όπου και είχε προστεθεί στα υγρά θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους, είτε ως μεμονωμένα στελέχη, είτε ως κοκτέιλ πολλών στελεχών μαζί.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις ζύμες, εξετάστηκαν ως μεμονωμένα στελέχη ως προς την επίδρασή τους σε μία αρχική συγκέντρωση 100 ppb ($\mu\text{g/ml}$) ωχρατοξίνης A, αλλά και ως κοκτέιλ ανά τέσσερα στελέχη. Ειδικότερα δημιουργήθηκαν τέσσερα κοκτέιλ, όπου

κάθε ένα περιείχε τέσσερις διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Τα κοκτέιλ αυτά ήταν τα εξής:

- το No1 όπου περιείχε τα είδη *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*
- το No2 όπου περιείχε τα είδη *Αγνώστου ταυτότητας είδος*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8)
- το No3 όπου περιείχε τα είδη *Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*
- το No4 όπου περιείχε τα είδη *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*.

Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις μελετήθηκε και κοκτέιλ που περιείχε και τις 16 ζύμες μαζί.

Όσον αφορά τα γαλακτικά βακτήρια, εξετάστηκαν ως κοκτέιλ ανά γένος και σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις ως κοκτέιλ που περιείχε και τα 29 γαλακτικά βακτήρια μαζί.

Η μελέτη των μικροοργανισμών ως προς την επίδρασή τους στην αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A στα υγρά θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους έγινε κατά κύριο λόγο στα κοκτέιλ τους, εφόσον ως μεμονωμένες περιπτώσεις δεν παρουσίασαν αξιόλογες μειώσεις στην αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A (ως μεμονωμένα στελέχη εξετάστηκαν μόνο οι ζύμες όπου από τα αποτελέσματα που προέκυψαν θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν στη συνέχεια οι μικροοργανισμοί μόνο ως κοκτέιλ και όχι ως μεμονωμένα στελέχη).

6.1.2 Ανανέωση ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων

Οι ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια ανανεώνονταν 24 ώρες πριν χρησιμοποιηθούν.

Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια των ζυμών γινόταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium. Για την παρασκευή του υποστρώματος Yeast Medium προσθέτονταν σε γυάλινη Duran 0,3g Malt Extract, 0,3g Yeast Extract, 0,5g Peptone Universal, 1g Glucose και 100ml απεσταγμένο νερό. Μετά την ανάδευση των παραπάνω συστατικών, προσθέτονταν σε 16 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (ίσους με τον αριθμό των ζυμών) από 5ml του υγρού θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το περιεχόμενο θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνονταν για 15min στους 121 °C.

Όσον αφορά τα γαλακτικά βακτήρια, η καλλιέργειά τους γινόταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS (MRS broth with Tween 80). Για την παρασκευή του υποστρώματος προσθέτονταν σε γυάλινη Duran 8,832g MRS broth with Tween 80 και 160ml απεσταγμένο νερό. Μετά από ανάδευση σε θερμαινόμενη εστία (50-60 °C), προσθέτονταν σε 29 δοκιμαστικούς σωλήνες (ίσους με τον αριθμό των γαλακτικών βακτηρίων) από 5ml του υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το περιεχόμενο θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνονταν για 15min στους 121 °C.

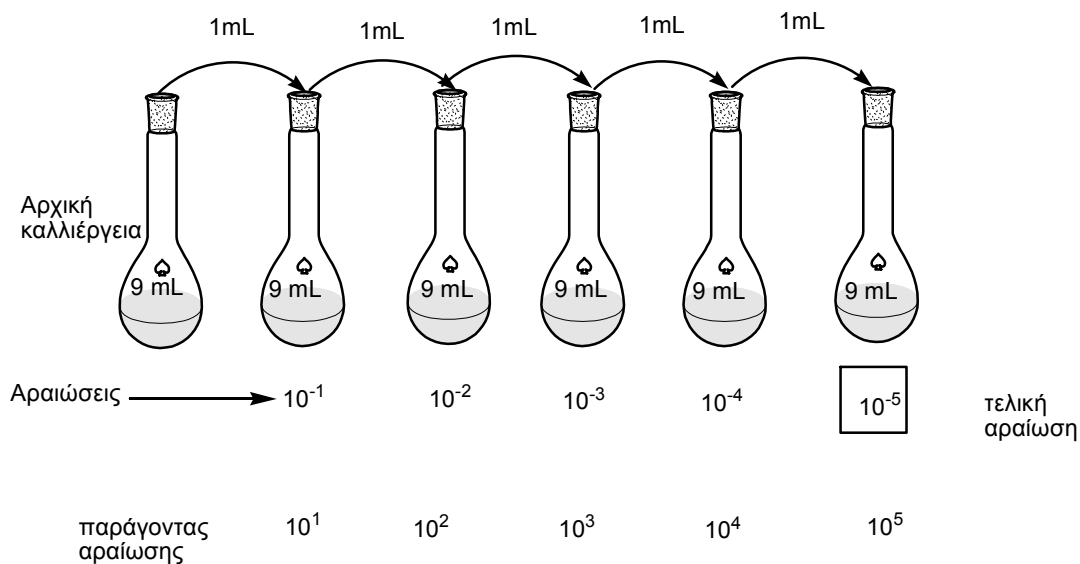
Μετά το πέρας της αποστείρωσης των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων και αφότου αυτά αποκτούσαν θερμοκρασία δωματίου, γινόταν ο εμβολιασμός των μικροοργανισμών με μικροβιολογικό κρίκο υπό αυστηρά ασηπτικές συνθήκες εντός του θαλάμου νηματικής ροής (Laminar Flow). Με τον μικροβιολογικό κρίκο γινόταν μεταφορά περίπου 10μl εμβολίου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με το αντίστοιχο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Μετά τον εμβολιασμό του αποστειρωμένου Yeast Medium και MRS broth στους δοκιμαστικούς σωλήνες με τις ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια αντίστοιχα, οι

μικροοργανισμοί επωάζονταν στους 30 °C για 24 ώρες. Μετά την πάροδο των 24 ωρών, οι ανανεωμένοι πλέον μικροοργανισμοί ήταν έτοιμοι να χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή του πειράματος.

6.1.2.1 Προσδιορισμός αρχικού μικροβιακού φορτίου σε τρυβλία Petri

Μετά την ανανέωση των ζυμών και των γαλακτικών βακτηρίων, δηλαδή μετά την πάροδο 24 ωρών στους 30 °C, έγινε καταμέτρηση του πληθυσμού τους σε τρυβλία Petri, ώστε να προσδιοριστεί το αρχικό μικροβιακό φορτίο των υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων που θα περιείχαν ωχρατοξίνη A (OTA) γνωστής συγκέντρωσης.

Για τον προσδιορισμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου των ζυμών έγινε επίστρωση τρυβλίων Petri υπό ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένο YGC – Agar (Yeast extract glucose chloramphenicol agar). Στη συνέχεια τα τρυβλία παρέμειναν για περίπου 20min, μέχρι να πήξει το θρεπτικό υλικό. Η μέθοδος προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου έγινε με την διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων. Κατά τις διαδοχικές αραιώσεις το αρχικό εμβόλιο αραιώνεται σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων καθένας από τους οποίους περιέχει από 9ml του ισοτονικού διαλύματος Ringer (μέσο αραιώσης). Στο παράδειγμα που φαίνεται στην εικόνα (εικόνα 6.1.2.1), σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ύστερα από μια επιτυχή αραιώση θα περιέχεται μόνο το ένα δέκατο των μικροβιακών κυττάρων σε σχέση με τον αμέσως προηγούμενο σωλήνα. Κατόπιν δείγματα από κάθε αραιώση (συγκεκριμένα 100μl) εμβολιάστηκαν στα τρυβλία Petri με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique). Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 25 °C για 3 ημέρες. Μετά την πάροδο 3 ημερών καταμετρήθηκαν οι σχηματιζόμενες αποικίες. Η καταμέτρηση αυτή χρησιμοποιήθηκε αργότερα για τον υπολογισμό των ζυμών στο αρχικό δείγμα (δηλαδή στον δοκιμαστικό σωλήνα με τον ανανεωμένο μικροοργανισμό).



Εικόνα 6.1.2.1: Βήματα διαδοχικής αραιώσης

Τα είδη των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου ήταν τα εξής: *Issatchenkia orientalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* (A8) και *Kazachstania hellenica* (A11). Από την καταμέτρηση των αποικιών προέκυψε ότι για το είδος *Issatchenkia orientalis* το αρχικό μικροβιακό φορτίο (του δοκιμαστικού σωλήνα με το συγκεκριμένο ανανεωμένο είδος και άρα και το αρχικό μικροβιακό φορτίο του δοκιμαστικού σωλήνα με το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium και την περιεχόμενη ωχρατοξίνη A) ήταν 10^8 cfu/ml. Αντίστοιχα, για το είδος *Saccharomyces cerevisiae* το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν 10^8 cfu/ml, για το είδος *Zygosaccharomyces bailii* (A8) το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν 10^7 cfu/ml και για το είδος *Kazachstania hellenica* (A11) το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν 10^7 cfu/ml.

Για τον προσδιορισμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου των γαλακτικών βακτηρίων εφαρμόστηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique), κατά την οποία 1ml εμβολίου από κάθε αραιώση (προηγήθηκε ομοίως η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων) τοποθετήθηκε σε τρυβλίο Petri, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, και στη

συνέχεια προστέθηκε στο τρυβλίο ποσότητα αποστειρωμένου MRS Agar (MRS Agar with Tween 80). Μετά την πήξη του θρεπτικού υλικού προστέθηκε στο τρυβλίο μία επιπλέον ποσότητα αποστειρωμένου MRS Agar. Αφού το θρεπτικό υλικό με το εμβόλιο ανακατεύτηκαν καλά, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 30 °C για 2-3 ημέρες. Μετά την πάροδο 3 ημερών καταμετρήθηκαν οι σχηματιζόμενες αποικίες.

Τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου ήταν τα εξής: *Bacillus thuringiensis* 1566, *Pediococcus pentosaceus* 1547, *Weissella cibaria* 1528 και *Streptococcus salivarius* 1477. Από την καταμέτρηση των αποικιών προέκυψε ότι για όλα τα παραπάνω στελέχη, το αρχικό μικροβιακό φορτίο (των δοκιμαστικών σωλήνων με τα συγκεκριμένα ανανεωμένα στελέχη και άρα και το αρχικό μικροβιακό φορτίο των δοκιμαστικών σωλήνων με το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS και την περιεχόμενη ωχρατοξίνη A) ήταν 10^7 cfu/ml.

Από τα παραπάνω προκύπτει επομένως ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο των δοκιμαστικών σωλήνων που περιείχαν ωχρατοξίνη A γνωστής συγκέντρωσης, ήταν περίπου 10^7 - 10^8 cfu/ml για κάθε ζύμη και 10^7 cfu/ml για κάθε γαλακτικό βακτήριο.

6.1.3 Παρασκευή εργαστηριακών θρεπτικών υποστρωμάτων ανάπτυξης

➤ ΥΓΡΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

- Όσον αφορά τις ζύμες, το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και πρόκειται για το **Yeast Medium**. Για την παρασκευή του χρειάστηκαν 0,3g Malt Extract (Malt Extract for microbiology, Merck Γερμανίας, Ref.1.05391.0500), 0,3g Yeast Extract (Yeast Extract for microbiology, Biolife Ιταλίας, Ref.4122202), 0,5g Universal Peptone (Universal Peptone M 66 for microbiology, Merck

- Για τα γαλακτικά βακτήρια, το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε παρασκευάστηκε ομοίως στο εργαστήριο και πρόκειται για το **MRS broth** (MRS broth with Tween 80, Biolife Ιταλίας, Ref.4017292). Για την παρασκευή του χρειάστηκαν 8,832g MRS broth with Tween 80 και 160ml απεσταγμένο νερό, η ανάμιξη των οποίων έγινε υπό θερμαινόμενη εστία στους 50-60 °C. Η τιμή του pH του υποστρώματος, κατά την παρασκευή του στους 25 °C, είναι 6,4+-0,2.

ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΩΣ ΑΡΑΙΩΤΙΚΟ ΜΕΣΟ

- Τόσο για τη μελέτη των ζυμών όσο και των γαλακτικών βακτηρίων χρειάστηκε η παρασκευή του αραιωτικού μέσου (**MRD** or Maximum Recovery Diluent, Biolife Ιταλίας, Ref.4016912). Για την παρασκευή του χρειάστηκαν 9,5g MRD και 1000ml απεσταγμένο νερό. Η τιμή του pH του αραιωτικού, κατά την παρασκευή του στους 25 °C, είναι 7,0+-0,1.

➤ ΣΤΕΡΕΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

- Για τις ζύμες παρασκευάστηκε στο εργαστήριο το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα **YGC-Agar** (Yeast extract glucose chloramphenicol agar FIL-IDF for microbiology, Merck Γερμανίας, Ref.1.16000.0500). Η τιμή του pH του υποστρώματος, κατά την παρασκευή του στους 25 °C, είναι 6,6+-0,2.
- Για τα γαλακτικά βακτήρια παρασκευάστηκε στο εργαστήριο το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα **MRS Agar** (MRS Agar with Tween 80, Biolife Ιταλίας, Ref.4017282). Η τιμή του pH του

°C, είναι 6,4+-

0,2.

Ακολουθούσε αποστείρωση όλων των υποστρωμάτων και του αραιωτικού μέσου στους 121°C για 15min. Μετά την αποστείρωση των YGC και MRS Agar, τα δύο αυτά υποστρώματα διατηρούνταν ρευστά στο υδατόλουτρο στους 45-50 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

6.1.4 Πρότυπο ωχρατοξίνης A (OTA) και χημικά αντιδραστήρια

6.1.4.1 Πρότυπο ωχρατοξίνης A (OTA)

Το πρότυπο ωχρατοξίνης A (Biopure Corporation Cambridge, USA) που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb (μg/ml).

6.1.4.2 Χημικά αντιδραστήρια

- **Διάλυμα εκχύλισης** (Μεθανόλη:Νερό = 80:20). Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο. Το διάλυμα εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε για την επαναιώρηση των βιομαζών των ζυμών. Συντηρείται για ένα περίπου μήνα στο ψυγείο στους 4 °C.
- **PBS buffer** (ρυθμιστικό διάλυμα για τη στήλη ωχρατοξίνης A). Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε στο εργαστήριο ως εξής: Σε 990ml απεσταγμένο νερό διαλύθηκαν 8g NaCl, 1,16g Na₂HPO₄*2H₂O, 0,2g KH₂PO₄ και 0,2g KCl. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος στο 7,4 και ακολούθησε προσθήκη επιπλέον 10ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα PBS χρησιμοποιήθηκε κατά τη διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων,

- **Διάλυμα έκπλυσης** (οξικό αμμώνιο 0,2M). Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε στο εργαστήριο ως εξής: Σε 1000ml νερού ειδικού για τις στήλες ανοσοσυγγένειας της ωχρατοξίνης A, δηλαδή νερού που χρησιμοποιείται ως κινητή φάση στην HPLC (όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο για τις στήλες ωχρατοξίνης A) διαλύθηκαν 15,416g οξικού αμμωνίου ($C_2H_7NO_2$). Το διάλυμα έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο όπου τα δείγματα περνούσαν από τις στήλες ανοσοσυγγένειας της ωχρατοξίνης A για τον καθαρισμό τους, δηλαδή για την απομάκρυνση όλων των υπολοίπων ουσιών των δειγμάτων εκτός της ωχρατοξίνης A.
- **Διάλυμα έκλουσης** ($CH_3OH:CH_3COOH = 98:2$). Τόσο η μεθανόλη (CH_3OH) όσο και το οξικό οξύ (CH_3COOH) που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του διαλύματος έκλουσης είναι ειδικά για την HPLC (όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο για τις στήλες ωχρατοξίνης A). Για την παρασκευή του διαλύματος έκλουσης αναμίχθηκαν 98ml CH_3OH και 2ml CH_3COOH . Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό της ωχρατοξίνης A από την ειδική στήλη ανοσοσυγγένειας και τη συλλογή της στα μικρά γυάλινα μπουκαλάκια που χρησιμοποιήθηκαν.

Γενικότερα, για την παρασκευή του PBS διαλύματος, του διαλύματος έκπλυσης και του διαλύματος έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες που αναγράφονται στο πρωτόκολλο για τις στήλες ανοσοσυγγένειας της ωχρατοξίνης A.

6.2 Πειραματικός σχεδιασμός

6.2.1 Μέρη πειράματος

- **1^ο ΜΕΡΟΣ:** Μελέτη της επίδρασης των μεμονωμένων στελεχών των ζυμών, των τεσσάρων κοκτέιλ τους ανά τέσσερα στελέχη, καθώς επίσης και των βιομαζών των κοκτέιλ των ζυμών στην αρχική συγκέντρωση των 100 ρrb ωχρατοξίνης A (OTA) που έχει επιτευχθεί στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium. Επιπλέον, στο 1^ο μέρος του πειράματος μελετήθηκε και η επίδραση των κοκτέιλ ανά γένος των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) στην αρχική συγκέντρωση των 100 ρrb ωχρατοξίνης A (OTA) που έχει επιτευχθεί στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, MRS broth.

ZYMEΣ

➤ Μεμονωμένα στελέχη

Αρχικά παρασκευάστηκε το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα των ζυμών, Yeast Medium, όπως ακριβώς αναφέρεται στην παράγραφο 6.1.3 και στη συνέχεια, σε 16 πλαστικούς σωλήνες (όσος και ο αριθμός των στελεχών) προστέθηκαν από 6ml του θρεπτικού αυτού υποστρώματος. Χρησιμοποιήθηκε ένας επιπλέον πλαστικός σωλήνας ως μάρτυρας-τυφλό, ο οποίος περιείχε ομοίως 6ml θρεπτικού υποστρώματος. Ακολούθησε αποστείρωση των σωλήνων με το περιεχόμενο Yeast Medium για 15min στους 121 °C.

Μετά την αποστείρωση και αφού το περιεχόμενο θρεπτικό υπόστρωμα των πλαστικών σωλήνων απέκτησε θερμοκρασία δωματίου, στους 16 σωλήνες καθώς και στο τυφλό προστέθηκε ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε η συγκέντρωσή της να είναι 100 ρrb (μg/ml). Για την προσθήκη ωχρατοξίνης A χρησιμοποιήθηκε πρότυπο συγκέντρωσης 10150 ρrb (μg/ml) και έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής.

Στη συνέχεια, ομοίως κάτω από ασηπτικές συνθήκες, έγινε ο εμβολιασμός των σωλήνων με τα μεμονωμένα στελέχη των ζυμών, τα οποία είχαν ανανεωθεί ακριβώς 24 ώρες πριν (εκτός από τον σωλήνα με το τυφλό διάλυμα που περιείχε μόνο το Yeast Medium και 100 ppb OTA). Ο εμβολιασμός έγινε με μικροβιολογικό κρίκο. Όπως ήδη αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.1.2.1, αμέσως μετά τον εμβολιασμό, το αρχικό μικροβιακό φορτίο των σωλήνων που περιείχαν ωχρατοξίνη A 100 ppb ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml για κάθε ζύμη.

Ακολούθησε επώαση των εμβολιασμένων πλέον πλαστικών σωλήνων με τα μεμονωμένα στελέχη ζυμών, καθώς και του τυφλού, στους 30 °C για 48 ώρες. Κατά τη διάρκεια των 2 ημερών παρατηρήθηκε ο σχηματισμός της βιομάζας από την ανάπτυξη των ζυμών.

Μετά την πάροδο των 2 ημερών έγινε φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 3.500 στροφές για 20min. Με την φυγοκέντριση διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από τη βιομάζα των ζυμών. Έτσι, από κάθε σωλήνα λήφθηκαν 4ml και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon. Στη συνέχεια έγινε επαναιώρηση των βιομαζών με 4ml διαλύματος εκχύλισης και ακολούθησε φυγοκέντριση των επαναιωρημένων βιομαζών ομοίως στις 3.500 στροφές για 20min. Μετά τη φυγοκέντριση των επαναιωρημένων βιομαζών και τον διαχωρισμό του υπερκειμένου από τη βιομάζα, λήφθηκαν 4ml υπερκειμένου και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon.

Μετρήθηκε το pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Τέλος, στα 4ml υπερκειμένου που λήφθηκαν από κάθε δείγμα μετά την **1^η φυγοκέντριση** προστέθηκαν 12ml διαλύματος PBS. Ακολούθησε ρύθμιση του pH κάθε δείγματος στο 7,4 και καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση των στηλών ωχρατοξίνης A. Μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων και την έκλουση της ωχρατοξίνης A, ακολούθησε χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) για τον ποσοτικό

προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A, δηλαδή της συγκέντρωσης που προέκυψε κατόπιν επώασης των ζυμών και του τυφλού για 2 ημέρες στους 30 °C. Το στάδιο των στηλών καθώς και η διαδικασία της υγρής χρωματογραφίας περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

➤ **Κοκτέιλ ανά 4 στελέχη και βιομάζες των κοκτέιλ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία και ανάλυση των τεσσάρων κοκτέιλ ζυμών όπου κάθε ένα περιείχε από τέσσερα διαφορετικά στελέχη, καθώς και των βιομαζών των ζυμών των τεσσάρων κοκτέιλ, ήταν ακριβώς η ίδια με αυτή για τα μεμονωμένα στελέχη ζυμών. Συγκεκριμένα έγινε:

- Παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium και προσθήκη 5ml αυτού σε 4 πλαστικούς σωλήνες (όσος και ο αριθμός των κοκτέιλ). Ως μάρτυρας-τυφλό χρησιμοποιήθηκε αυτό που παρασκευάστηκε για την ανάλυση των μεμονωμένων στελεχών. Ακολούθησε αποστείρωση των σωλήνων με το περιεχόμενο Yeast Medium για 15min στους 121 °C.
- Προσθήκη στους 4 σωλήνες ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε η συγκέντρωσή της να είναι 100 ppb (μg/ml). Για την προσθήκη ωχρατοξίνης A χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο συγκέντρωσης 10150 ppb (μg/ml) και έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής.
- Δημιουργία των τεσσάρων κοκτέιλ (No1, No2, No3 και No4) καθένα από τα οποία περιείχε τέσσερα διαφορετικά στελέχη (παράγραφος 6.1.1.1). Για την δημιουργία των τεσσάρων κοκτέιλ χρησιμοποιήθηκε μικροβιολογικός κρίκος με τον οποίο κάθε ένας από τους 4 πλαστικούς σωλήνες εμβολιάστηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, με 4 διαφορετικά στελέχη ζυμών. Αμέσως μετά τον εμβολιασμό, το αρχικό μικροβιακό φορτίο των 4 σωλήνων -

$7 \cdot 10^8$ cfu/ml

για κάθε ζύμη.

- Επώαση των κοκτέιλ στους 30 °C για 48 ώρες.
- Φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 3.500 στροφές για 20min μετά την πάροδο των 48 ωρών. Από κάθε σωλήνα λήφθηκαν 4ml υπερκείμενο και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon.
- Επαναιώρηση των βιομαζών των κοκτέιλ με 4ml διαλύματος εκχύλισης και φυγοκέντριση ομοίως στις 3.500 στροφές για 20min. Μετά τη φυγοκέντριση των επαναιωρημένων βιομαζών και τον διαχωρισμό του υπερκειμένου από τη βιομάζα, λήφθηκαν 4ml υπερκειμένου και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon.
- Μέτρηση του pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση, καθώς και του pH του υπερκειμένου (των 4ml) των επαναιωρημένων βιομαζών, δηλαδή του pH του υπερκειμένου μετά τη 2^η φυγοκέντριση.
- Ακολούθησε το στάδιο των στηλών, δηλαδή στα 4ml υπερκειμένου κάθε δείγματος που λήφθηκαν μετά την 1^η και 2^η φυγοκέντριση προστέθηκαν 12ml διαλύματος PBS. Ρυθμίστηκε το pH των δειγμάτων στο 7,4 και ακολούθησε ο καθαρισμός τους με τη χρήση των στηλών ωχρατοξίνης A.
- Χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A, δηλαδή της συγκέντρωσης που προέκυψε κατόπιν επώασης των κοκτέιλ για 2 ημέρες στους 30 °C.

ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB)

➤ Κοκτέιλ ανά γένος

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία και ανάλυση των πέντε κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων (LAB) ανά γένος ήταν η ακόλουθη:

- Παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS broth σε μία φιάλη Duran και αποστείρωσή του μαζί με άδειους πλαστικούς σωλήνες για 15min στους 121 °C.
- Προσθήκη στην αποστειρωμένη φιάλη Duran με το περιεχόμενο MRS broth τόση ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε η συγκέντρωσή της να είναι 100 ppb (μg/ml). Για την προσθήκη ωχρατοξίνης A χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο συγκέντρωσης 10150 ppb (μg/ml) και έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής.
- Προσθήκη στους άδειους αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες 5ml από το αποστειρωμένο MRS broth που περιέχει και 100 ppb OTA. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε 1 τυφλό διάλυμα καθώς και 1 τυφλό το οποίο δεν επωάστηκε όπως έγινε με τα υπόλοιπα δείγματα μετά την προετοιμασία τους, ώστε να διαπιστωθεί αν η επώαση των τυφλών διαλυμάτων επηρεάζει τη συγκέντρωση ωχρατοξίνης A. Το τυφλό που δεν επωάστηκε παρέμεινε στο ψυγείο μέχρι την ανάλυσή του με τις στήλες ανοσοσυγγένειας ωχρατοξίνης A και τη χρήση HPLC. Η προσθήκη των 5ml στους πλαστικούς σωλήνες έγινε ομοίως κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής.
- Δημιουργία των πέντε κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος. Για την δημιουργία τους χρησιμοποιήθηκε μικροβιολογικός κρίκος με τον οποίο όλα τα στελέχη του ίδιου γένους τοποθετήθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, στον ίδιο σωλήνα με το περιεχόμενο θρεπτικό υπόστρωμα και τα 100 ppb ωχρατοξίνης A. Έτσι παρασκευάστηκαν τα εξής κοκτέιλ: του γένους *Bacillus* με 7 στελέχη, του γένους *Pediococcus* με 6 στελέχη, του γένους *Streptococcus* με 6 στελέχη, του γένους *Weissella* με 8 στελέχη και του γένους *Lactobacillus* με 2 διαφορετικά είδη. Αμέσως μετά τον εμβολιασμό, το αρχικό μικροβιακό φορτίο των 5 σωλήνων -

⁷ cfu/ml για

κάθε γαλακτικό βακτήριο.

- Επώαση των κοκτέιλ στους 30 °C για 5 ημέρες.
- Φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 3.500 στροφές για 20min μετά την πάροδο των 5 ημερών. Από κάθε σωλήνα λήφθηκαν 4ml υπερκείμενο και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon.
- Μέτρηση του pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων.
- Ακολούθησε το στάδιο των στηλών, δηλαδή στα 4ml υπερκειμένου κάθε δείγματος που λήφθηκαν μετά την φυγοκέντριση προστέθηκαν 12ml διαλύματος PBS. Ρυθμίστηκε το pH των δειγμάτων στο 7,4 και ακολούθησε ο καθαρισμός τους με τη χρήση των στηλών ωχρατοξίνης A.
- Χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A, δηλαδή της συγκέντρωσης που προέκυψε κατόπιν επώασης των κοκτέιλ για 5 ημέρες στους 30 °C.

Σημείωση: Τα γαλακτικά βακτήρια αρχικά ήταν σε τρυβλία (MRS agar) και πριν χρησιμοποιηθούν ανανεώθηκαν σε MRS broth, δηλαδή εμβολιάστηκαν στο υγρό αυτό θρεπτικό υπόστρωμα αποικίες (η διαδικασία αυτή έγινε για κάθε τρυβλίο) με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το περιεχόμενο MRS broth και τους μικροοργανισμούς παρέμειναν στους 30 °C για 2 περίπου ημέρες. Έτσι τα γαλακτικά βακτήρια διατηρούνταν πλέον μόνο στο MRS broth και όχι σε τρυβλία.

- **2^ο ΜΕΡΟΣ:** Μελέτη της επίδρασης του **κοκτέιλ των 16 ζυμών**, κατόπιν επώασης **2 και 7 ημέρες στους 30 °C**, στην αρχική συγκέντρωση των **100 ppb ωχρατοξίνης A (OTA)** που έχει επιτευχθεί στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, *Yeast Medium*.

^ο μέρος του πειράματος μελετήθηκε και η επίδραση του **κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, κατόπιν επώασης 5 ημέρες στους 30 °C**, στην αρχική συγκέντρωση των 100 ppb ωχρατοξίνης A (OTA) που έχει επιτευχθεί στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, MRS broth.

ZYMEΣ

➤ **Κοκτέιλ των 16 ζυμών και επώαση για 2 και 7 ημέρες στους 30 °C**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη:

- Ανανέωση των ζυμών 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.
- Παρασκευή και αποστείρωση του υγρού θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium.
- Προσθήκη, υπό ασηπτικές συνθήκες, 5ml του αποστειρωμένου Yeast Medium σε δύο μικρούς πλαστικούς αποστειρωμένους σωλήνες.
- Προσθήκη, υπό ασηπτικές συνθήκες, στους σωλήνες με το αποστειρωμένο Yeast Medium τόση ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε η συγκέντρωσή της να είναι 100 ppb (μg/ml). Για την προσθήκη ωχρατοξίνης A χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο συγκέντρωσης 10000 ppb και για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε 1 τυφλό διάλυμα.
- Δημιουργία των κοκτέιλ των 16 ζυμών. Για την δημιουργία τους χρησιμοποιήθηκε μικροβιολογικός κρίκος με τον οποίο όλα τα ανανεωμένα στελέχη ζυμών τοποθετήθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, στους δύο σωλήνες με το περιεχόμενο θρεπτικό υπόστρωμα και τα 100 ppb ωχρατοξίνης A. Αμέσως μετά τον εμβολιασμό, το αρχικό μικροβιακό φορτίο των σωλήνων-κοκτέιλ των 16 ζυμών με τα 100 ppb ωχρατοξίνης A ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml για κάθε ζύμη.

- Επώαση του ενός κοκτέιλ για 2 ημέρες και του άλλου για 7 ημέρες στους 30 °C.
- Φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 3.500 στροφές για 20min μετά την πάροδο των 2 και 7 ημερών αντίστοιχα. Από κάθε σωλήνα λήφθηκαν 4ml υπερκείμενο και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon.
- Μέτρηση του pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων.
- Τέλος ακολούθησε το στάδιο των στηλών και της υγρής χρωματογραφίας (HPLC), όπως ακριβώς και στο 1^ο μέρος. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση των ημερών επώασης του κοκτέιλ των 16 ζυμών στην αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A των 100 ppb.

ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB)

- **Κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων και επώαση για 5 ημέρες στους 30 °C**
- Ανανέωση των γαλακτικών βακτηρίων 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με εκείνη των κοκτέιλ των 16 ζυμών, με τη διαφορά ότι το κοκτέιλ των 29 LAB επωάστηκε για 5 ημέρες στους 30 °C και το πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθεί συγκέντρωση 100 ppb ωχρατοξίνης A ήταν των 10150 ppb. Τέλος, άλλη μία διαφορά ήταν ότι για την ανάλυση του κοκτέιλ των 29 LAB χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά διαλύματα.

- **3^ο ΜΕΡΟΣ: Μελέτη της επίδρασης των κοκτέιλ των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη (σύνολο τέσσερα κοκτέιλ) στην αρχική συγκέντρωση των 100 ppb ωχρατοξίνης A (OTA) που έχει επιτευχθεί στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium και στο**

ZYMEΣ

➤ **Κοκτέϊλ ανά 4 στελέχη και 50 ppb ωχρατοξίνης A (OTA)**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη:

- Ανανέωση των ζυμών, οι οποίες παρέμειναν στους 30 °C για 41 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους, λόγω του ότι στις 24 ώρες κάποιες ζύμες δεν είχαν αναπτυχθεί.
- Παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium σε μία φιάλη Duran και αποστείρωσή του μαζί με άδειους πλαστικούς σωλήνες για 15min στους 121 °C.
- Προσθήκη στην αποστειρωμένη φιάλη Duran με το περιεχόμενο Yeast Medium τόση ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε η συγκέντρωσή της να είναι 50 ppb (μg/ml). Για την προσθήκη ωχρατοξίνης A χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο συγκέντρωσης 10150 ppb (μg/ml) και έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής.
- Προσθήκη στους άδειους αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες 5ml από το αποστειρωμένο Yeast Medium που περιέχει και 50 ppb OTA. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά διαλύματα. Η προσθήκη των 5ml στους πλαστικούς σωλήνες

- Δημιουργία των τεσσάρων κοκτέιλ ανά τέσσερα στελέχη ζυμών. Για την δημιουργία τους χρησιμοποιήθηκε μικροβιολογικός κρίκος. Αμέσως μετά τον εμβολιασμό, το αρχικό μικροβιακό φορτίο των σωλήνων-κοκτέιλ με τα 50 ppb ωχρατοξίνης A ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml για κάθε ζύμη.
 - Επώαση των κοκτέιλ στους 30 °C για 2 ημέρες.
 - Φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 3.500 στροφές για 20min μετά την πάροδο των 2 ημερών. Από κάθε σωλήνα λήφθηκαν 4ml υπερκείμενο και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες falcon.
 - Μέτρηση του pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων.
 - Τέλος ακολούθησε το στάδιο των στηλών και της υγρής χρωματογραφίας (HPLC), όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση των κοκτέιλ σε μία **μειωμένη αρχική συγκέντρωση** ωχρατοξίνης A των **50 ppb**.
- **Κοκτέιλ ανά 4 στελέχη και Yeast Medium με 100 ppb OTA και pH = 5**

Πριν τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος μελετήθηκε η μεταβολή του pH του Yeast Medium σε ένα σωληνάκι universal από μία αρχική τιμή 5, μετά από αποστείρωση για 15min στους 121 °C. Συγκεκριμένα, το pH του Yeast Medium στο σωληνάκι universal ρυθμίστηκε στο 5,01 πριν την αποστείρωση και μετά την αποστείρωση βρέθηκε ότι το pH ήταν ίσο με 4,97. Επομένως, η μεταβολή του pH του Yeast Medium μετά την αποστείρωση ήταν αμελητέα.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η ακόλουθη:

- Ανανέωση των ζυμών 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.
- Παρασκευή σε φιάλη Duran ορισμένης ποσότητας θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium και στη συνέχεια ρύθμιση του pH στην τιμή 5. Συγκεκριμένα, το pH του υποστρώματος πριν την αποστείρωση ήταν 5,03.
- Ακολούθησε αποστείρωση του υποστρώματος καθώς και μιας άδειας φιάλης Duran για 15min στους 121 °C.
- Μετά την αποστείρωση μεταγγίστηκε στην άδεια αποστειρωμένη φιάλη Duran ορισμένη ποσότητα από το αποστειρωμένο Yeast Medium (55 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 100 ppb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb.
- Ακολούθησε η γνωστή διαδικασία, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, για την μετέπειτα ανάλυση των ζυμών. Δηλαδή τοποθέτηση σε άδειους αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες 5 ml από το υπόστρωμα Yeast Medium των 100 ppb και με pH=5 και ακολούθως παρασκευή των τεσσάρων κοκτέιλ ζυμών (οι ζύμες είχαν ανανεωθεί 24 ώρες πριν) με χρήση μικροβιολογικού κρίκου, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε ζύμης στους πλαστικούς σωλήνες αμέσως μετά την παρασκευή των κοκτέιλ ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml. Τα κοκτέιλ παρέμειναν για 2 ημέρες στους 30 °C.
- Μετά την πάροδο των 2 ημερών, ακολούθησε, κατά τον γνωστό τρόπο, φυγοκέντριση των δειγμάτων, παραλαβή 4 ml υπερκείμενου από κάθε δείγμα, μέτρηση του pH κάθε υπερκείμενου, προσθήκη 12 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε κάθε ένα υπερκείμενο των 4 ml, στη συνέχεια καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση των στηλών ωχρατοξίνης A και τέλος ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης

Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η επίδραση των κοκτέιλ των ζυμών στην αρχική συγκέντρωση των **100 ppb ωχρατοξίνης A** στο υπόστρωμα ανάπτυξής τους στο οποίο μειώθηκε η τιμή του **pH στην τιμή 5**, με τη χρήση HCl συγκέντρωσης μικρότερης του 1N.

ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB)

➤ Κοκτέιλ ανά γένος και 50 ppb ωχρατοξίνης A (OTA)

- Ανανέωση γαλακτικών βακτηρίων. Πριν τη χρησιμοποίησή τους παρέμειναν για 24 ώρες στους 30 °C.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ακριβώς η ίδια με την περίπτωση των κοκτέιλ ζυμών και της συγκέντρωσης των 50 ppb OTA σε Yeast Medium. Η μοναδική διαφορά ήταν ότι χρησιμοποιήθηκε MRS broth ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των LAB, καθώς και το ότι μετά την παρασκευή των κοκτέιλ ανά γένος (σύνολο 5 κοκτέιλ), αυτά παρέμειναν για 5 ημέρες στους 30 °C. Η διαδικασία για την παρασκευή των κοκτέιλ, την επίτευξη των 50 ppb OTA σε αποστειρωμένο MRS broth, καθώς και η διαδικασία ανάλυσης των κοκτέιλ μετά την πάροδο των 5 ημερών επώασής τους στους 30 °C, μέχρι τον ποσοτικό προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης OTA, ήταν ακριβώς η ίδια με το πείραμα που πραγματοποιήθηκε για τα κοκτέιλ ζυμών σε Yeast Medium με ωχρατοξίνη A συγκέντρωσης 50 ppb. Τέλος, για την ανάλυση των κοκτέιλ των LAB χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά διαλύματα και το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε γαλακτικού βακτηρίου στους πλαστικούς σωλήνες αμέσως μετά την παρασκευή των κοκτέιλ ήταν 10^7 cfu/ml.

➤ **Κοκτέϊλ ανά γένος και MRS broth με 100 ppb OTA και pH = 5**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η ακόλουθη:

- Ανανέωση γαλακτικών βακτηρίων. Πριν τη χρησιμοποίησή τους παρέμειναν για 24 ώρες στους 30 °C.
- Παρασκευή ορισμένης ποσότητας θρεπτικού υποστρώματος MRS broth και τοποθέτηση μιας μικρής ποσότητας (20 ml) σε ένα σωληνάκι universal και της υπόλοιπης σε μία φιάλη Duran. Στη συνέχεια ρύθμιση του pH στην τιμή 5 τόσο στο σωληνάκι universal όσο και στη φιάλη Duran. Συγκεκριμένα, το pH του υποστρώματος πριν την αποστείρωση στη φιάλη Duran και στο σωληνάκι universal ρυθμίστηκε στην τιμή 5,03.
- Ακολούθησε αποστείρωση του υποστρώματος της φιάλης Duran και του universal για 15min στους 121 °C.
- Μετά την αποστείρωση μετρήθηκε το pH στο σωληνάκι universal και βρέθηκε ίσο με 5,03, δηλαδή η τιμή του δεν άλλαξε μετά την αποστείρωση. Στη συνέχεια, στη φιάλη Duran με το αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα και με pH ίσο με 5,03 προστέθηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 100 ppb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb.
- Ακολούθησε η γνωστή διαδικασία, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, για την μετέπειτα ανάλυση των γαλακτικών βακτηρίων. Δηλαδή τοποθέτηση σε άδειους αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες 5 ml από το υπόστρωμα MRS broth των 100 ppb και με pH=5,03 και ακολούθως παρασκευή των πέντε κοκτέϊλ γαλακτικών βακτηρίων (τα LAB είχαν ανανεωθεί 24 ώρες πριν) με χρήση μικροβιολογικού κρίκου, πάντα υπό ασηπτικές

⁷ cfu/ml. Τα κοκτέιλ παρέμειναν

για 5 ημέρες στους 30 °C.

- Μετά την πάροδο των 5 ημερών, ακολούθησε, κατά τον γνωστό τρόπο, φυγοκέντριση των δειγμάτων, παραλαβή 4 ml υπερκείμενου από κάθε δείγμα, μέτρηση του pH κάθε υπερκείμενου, προσθήκη 12 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε κάθε ένα υπερκείμενο των 4 ml, στη συνέχεια καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση των στηλών ωχρατοξίνης A και τέλος ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A κάθε δείγματος με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC). Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά διαλύματα.

Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η επίδραση των κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων στην αρχική συγκέντρωση των **100 prb ωχρατοξίνης A** στο υπόστρωμα ανάπτυξης τους στο οποίο μειώθηκε η τιμή του **pH στην τιμή 5**, με τη χρήση HCl συγκέντρωσης μικρότερης του 1N.

- **4^ο ΜΕΡΟΣ:** Μελέτη της επίδρασης των κοκτέιλ των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη (σύνολο τέσσερα κοκτέιλ) στην αρχική συγκέντρωση των **50 prb ωχρατοξίνης A (OTA)** που έχει επιτευχθεί στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, *Yeast Medium* και στο οποίο το **pH** έχει ρυθμιστεί στην τιμή **5**. Ακόμη μελετήθηκε και η επίδραση του κοκτέιλ των **16 ζυμών μαζί** στην αρχική συγκέντρωση των **50 prb ωχρατοξίνης A (OTA)** που έχει επιτευχθεί ομοίως στο θρεπτικό υπόστρωμα *Yeast Medium* και χωρίς καμία ρύθμιση του **pH (pH=6,5)**, καθώς επίσης και η επίδραση του κοκτέιλ των **16 ζυμών μαζί** στις αρχικές συγκεντρώσεις των **50 prb και 100 prb ωχρατοξίνης A (OTA)** που επιτεύχθηκαν στο υγρό θρεπτικό

ZYMEΣ (πριν τη χρησιμοποίησή τους οι ζύμες επωάστηκαν για 24 ώρες στους 30 °C)

- **Κοκτέιλ ανά 4 στελέχη και Yeast Medium με 50 ppb OTA και pH = 5**

Πριν τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος μελετήθηκε η μεταβολή του pH του Yeast Medium σε ένα σωληνάκι universal από μία αρχική τιμή 5, μετά από αποστείρωση για 15min στους 121 °C. Μετά την αποστείρωση βρέθηκε ότι το pH ήταν ίσο με 5,21. Επομένως, η μεταβολή του pH του Yeast Medium μετά την αποστείρωση ήταν αμελητέα.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η ίδια με την περίπτωση των κοκτέιλ ανά τέσσερα στελέχη, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε Yeast Medium με 100 ppb OTA και pH=5. Η μοναδική διαφορά ήταν η αρχική

συγκέντρωση ωχρατοξίνης A του θρεπτικού υποστρώματος, καθώς και το ότι για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά διαλύματα.

➤ **Κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί και Yeast Medium με 50 ppb OTA και pH = 6,5**

Ομοίως, πριν τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος μελετήθηκε η μεταβολή του pH του Yeast Medium σε ένα σωληνάκι universal από την κανονική του αρχική τιμή 6,5, μετά από αποστείρωση για 15min στους 121 °C. Μετά την αποστείρωση βρέθηκε ότι το pH ήταν ίσο με 6,52. Επομένως, το pH του Yeast Medium μετά την αποστείρωση δεν μεταβλήθηκε.

Και στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Παρασκευή σε φιάλη Duran και αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium για 15min στους 121 °C.
- Προσθήκη στη φιάλη Duran, υπό ασηπτικές συνθήκες, ποσότητας ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 50 ppb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb.
- Ακολούθησε η γνωστή διαδικασία, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, για την μετέπειτα ανάλυση των ζυμών. Στο κοκτέιλ που παρασκευάστηκε περιέχονταν και οι 16 ζύμες μαζί και το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε ζύμης αμέσως μετά την παρασκευή του κοκτέιλ ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml. Ο καθαρισμός των δειγμάτων και ακολούθως ο ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A έγινε κατά τον γνωστό τρόπο. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά διαλύματα.

- **Κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί και Yeast Medium με 50 ppb OTA και pH = 5, καθώς και Yeast Medium με 100 ppb OTA και pH = 5**

Η ανάλυση του κοκτέιλ των 16 ζυμών έγινε κατά τον γνωστό τρόπο με τη μόνη διαφορά ότι στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης Yeast Medium το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 5 πριν αποστειρωθεί και ακολούθως, μετά την αποστείρωσή του επιτεύχθηκε σε αυτό συγκέντρωση ωχρατοξίνης A 50 ppb με τη χρήση του προτύπου συγκέντρωσης 10150 ppb. Με τον ίδιο τρόπο επιτεύχθηκε σε αποστειρωμένο Yeast Medium με pH=5 συγκέντρωση ωχρατοξίνης A 100 ppb.

ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB) (πριν τη χρησιμοποίησή τους τα LAB επωάστηκαν για 24 ώρες στους 30 °C)

- **Κοκτέιλ ανά γένος και MRS broth με 50 ppb OTA και pH = 5**

Πριν τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος μελετήθηκε η μεταβολή του pH του MRS broth σε ένα σωληνάκι universal από μία αρχική τιμή 5, μετά από αποστείρωση για 15min στους 121 °C. Μετά την αποστείρωση βρέθηκε ότι το pH ήταν ίσο με 5,1. Επομένως, η μεταβολή του pH του MRS broth μετά την αποστείρωση ήταν αμελητέα.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η ίδια με την περίπτωση των κοκτέιλ ανά γένος, τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε MRS broth με 100 ppb OTA και pH=5. Η μοναδική διαφορά ήταν η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A του θρεπτικού υποστρώματος.

➤ **Κοκτέιλ των 29 LAB μαζί και MRS broth με 50 ppb OTA και pH = 6,1**

Και στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Παρασκευή σε φιάλη Duran και αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος MRS broth για 15min στους 121 °C.
- Προσθήκη στη φιάλη Duran, υπό ασηπτικές συνθήκες, ποσότητας ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 50 ppb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb.
- Ακολούθησε η γνωστή διαδικασία, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, για την μετέπειτα ανάλυση των γαλακτικών βακτηρίων. Στο κοκτέιλ που παρασκευάστηκε περιέχονταν και τα 29 LAB μαζί και το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε LAB αμέσως μετά την παρασκευή του κοκτέιλ ήταν 10^7 cfu/ml. Ο καθαρισμός των δειγμάτων και ακολούθως ο ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A έγινε κατά τον γνωστό τρόπο. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 τυφλά διαλύματα.

➤ **Κοκτέιλ των 29 LAB μαζί και MRS broth με 50 ppb OTA και pH = 5, καθώς και MRS broth με 100 ppb OTA και pH = 5**

Η ανάλυση του κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων έγινε κατά τον γνωστό τρόπο με τη μόνη διαφορά ότι στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης MRS broth το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 5 πριν αποστειρωθεί και ακολούθως, μετά την αποστείρωσή του επιτεύχθηκε σε αυτό συγκέντρωση ωχρατοξίνης A 50 ppb με τη χρήση του προτύπου συγκέντρωσης 10150 ppb. Με τον ίδιο τρόπο επιτεύχθηκε σε αποστειρωμένο MRS broth με pH=5 συγκέντρωση ωχρατοξίνης A 100 ppb.

- **5^ο ΜΕΡΟΣ:** Μελέτη της επίδρασης του κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50 rrb ωχρατοξίνης A (OTA), η οποία επιτεύχθηκε στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium, μετά από επώαση του κοκτέιλ για 2 ημέρες στους 30 °C. Ομοίως και για την περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, μελετήθηκε η επίδραση του κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50 rrb ωχρατοξίνης A (OTA), η οποία επιτεύχθηκε στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, MRS broth, μετά από επώαση του κοκτέιλ για 5 ημέρες στους 30 °C.

ZYMEΣ

- Κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί και μετά από επώαση για 2 ημέρες στους 30 °C επίτευξη συγκέντρωσης 50 rrb OTA στο υπόστρωμα ανάπτυξης Yeast Medium

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η ακόλουθη:

- Ανανέωση των ζυμών 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.
- Παρασκευή ορισμένης ποσότητας θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium και τοποθέτηση 5ml υποστρώματος σε μικρό πλαστικό σωλήνα.
- Αποστείρωση του πλαστικού σωλήνα με το θρεπτικό υπόστρωμα για 15min στους 121 °C. Παράλληλα αποστειρώθηκαν και 2 τυφλά διαλύματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του κοκτέιλ.
- Μετά την αποστείρωση του δείγματος (και των τυφλών διαλυμάτων), δημιουργήθηκε το κοκτέιλ όπου στον σωλήνα με τα 5ml αποστειρωμένου υποστρώματος εμβολιάστηκαν και οι 16 ζύμες, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη βοήθεια του

$7 \cdot 10^8$ cfu/ml.

- Επώαση του κοκτέιλ (και των τυφλών διαλυμάτων) για 2 ημέρες στους 30 °C.
- Μετά την πάροδο των 2 ημερών έγινε φυγοκέντριση του δείγματος και των 2 τυφλών διαλυμάτων, κατά την οποία, για την περίπτωση του κοκτέιλ, διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από τη βιομάζα.
- Λήψη 4ml υπερκειμένου από κάθε σωλήνα και τοποθέτησή τους σε πλαστικούς σωλήνες falcon. Στη συνέχεια στους σωλήνες falcon προστέθηκε ποσότητα ωχρατοξίνης A (OTA) ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 50 ppb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb.
- Ακολούθησε το στάδιο των στηλών ωχρατοξίνης A, δηλαδή προσθήκη στους σωλήνες falcon 12ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS, ρύθμιση του pH στο 7,4 και καθαρισμός των δειγμάτων.
- Τέλος, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των δειγμάτων.

Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η επίδραση του **κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50 ppb ωχρατοξίνης A, η οποία επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης τους κατόπιν επώασης του κοκτέιλ για 2 ημέρες στους 30 °C.**

ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB)

- **Κοκτέιλ των 29 LAB μαζί και μετά από επώαση για 5 ημέρες στους 30 °C επίτευξη συγκέντρωσης 50 ppb OTA στο υπόστρωμα ανάπτυξης MRS broth**
- Ανανέωση των γαλακτικών βακτηρίων 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν ακριβώς η ίδια με την περίπτωση του κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί όπου η συγκέντρωση των 50 ppb OTA επιτεύχθηκε στο Yeast Medium κατόπιν επώασης του κοκτέιλ για 2 ημέρες στους 30 °C.

Η μοναδική διαφορά ήταν το υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων MRS broth, καθώς και το ότι προτού προστεθεί η ωχρατοξίνη A, το κοκτέιλ των 29 LAB επωάστηκε για 5 αντί για 2 ημέρες στους 30 °C. Τέλος, το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε LAB αμέσως μετά την παρασκευή του κοκτέιλ ήταν 10^7 cfu/ml. Για την ανάλυση του κοκτέιλ χρησιμοποιήθηκε ένα τυφλό διάλυμα.

- **6^ο ΜΕΡΟΣ:** Μελέτη της επίδρασης του κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50 ppb ωχρατοξίνης A (OTA), η οποία επιτεύχθηκε σε MRD (Maximum Recovery Diluent), το οποίο χρησιμοποιήθηκε έναντι του Yeast Medium. Το MRD χρησιμοποιήθηκε ούτως ώστε να μελετηθεί η πιθανότητα διάσπασης μεγαλύτερου ποσοστού ωχρατοξίνης A από τις ζύμες όταν βρεθούν σε ένα φτωχότερο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης, όπως είναι το MRD σε αντίθεση με το Yeast Medium. Δηλαδή μελετήθηκε η πιθανότητα διάσπασης μεγαλύτερου ποσοστού ωχρατοξίνης A από τις ζύμες, εφόσον θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως κύριο συστατικό για τον μεταβολισμό τους, καθώς θα αναπτύσσονταν σε ένα φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα. Ομοίως και για την περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, μελετήθηκε η επίδραση του κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50 ppb ωχρατοξίνης A (OTA), η οποία επιτεύχθηκε σε MRD, το οποίο χρησιμοποιήθηκε έναντι του MRS broth για τον ίδιο ακριβώς λόγο για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε και στις ζύμες.

ZYMEΣ

➤ **Κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί και επίτευξη συγκέντρωσης 50 rrb OTA στο υπόστρωμα ανάπτυξης MRD**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η ακόλουθη:

- Ανανέωση των ζυμών 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.
- Αμέσως μετά την πάροδο 24 ωρών, από κάθε μία από τις 16 ανανεωμένες ζύμες λήφθηκε 1ml και τοποθετήθηκε σε μία άδεια αποστειρωμένη φιάλη Duran. Έτσι, συνολικά η φιάλη Duran περιείχε 16ml. Ακολούθησε ανάδευση της φιάλης. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε ζύμης στη φιάλη Duran αμέσως μετά την προσθήκη σε αυτή του 1ml από κάθε ανανεωμένη ζύμη (κοκτέιλ 16 ζυμών) ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml.
- Λήψη 5ml από το σύνολο των 16ml και τοποθέτησή τους σε έναν μικρό πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα. Φυγοκέντριση των 5ml στις 3.500 στροφές για 20min. Μετά τη φυγοκέντριση, απόρριψη όλου του υπερκειμένου και επαναιώρηση της βιομάζας με 5ml αποστειρωμένου MRD. Ακολούθησε ανάδευση της επαναιωρημένης βιομάζας.
- Λήψη 1ml από το σύνολο των 5ml της επαναιωρημένης βιομάζας και προσθήκη του σε 100ml κρύου και αποστειρωμένου MRD στο οποίο προηγήθηκε προσθήκη ποσότητας ωχρατοξίνης A ώστε η συγκέντρωση να είναι ίση με 50 rrb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 rrb.
- Επώαση της φιάλης Duran, που περιείχε 1ml του συνόλου της επαναιωρημένης βιομάζας των 16 ζυμών, 100ml αποστειρωμένου MRD και ωχρατοξίνη A συγκέντρωσης 50 rrb, για 2 ημέρες στους 30 °C.

Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες.

- Μετά την πάροδο των 2 ημερών, λήφθηκαν 5ml από τη φιάλη Duran και τοποθετήθηκαν σε έναν αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα.
- Ακολούθησε φυγοκέντριση και λήψη 4ml.
- Τέλος, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A του δείγματος (χωρίς να προηγηθεί καθαρισμός του δείγματος με το στάδιο των στηλών ωχρατοξίνης A).

Για την ανάλυση του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 3 τυφλά διαλύματα (διαλύματα MRD).

ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB)

- **Κοκτέιλ των 29 LAB μαζί και επίτευξη συγκέντρωσης 50 ppb OTA στο υπόστρωμα ανάπτυξης MRD**
- Ανανέωση των γαλακτικών βακτηρίων 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν ακριβώς η ίδια με την περίπτωση του κοκτέιλ των 16 ζυμών σε MRD ως υπόστρωμα ανάπτυξης, το οποίο περιείχε ωχρατοξίνη A συγκέντρωσης 50 ppb.

Οι μοναδικές διαφορές ήταν το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε LAB αμέσως μετά την προσθήκη σε μία άδεια αποστειρωμένη φιάλη Duran 1ml από κάθε ένα από τα 29 ανανεωμένα γαλακτικά βακτήρια (κοκτέιλ 29 LAB), το οποίο ήταν 10^7 cfu/ml, καθώς και ο χρόνος επώασης της φιάλης Duran, που περιείχε 1ml του συνόλου της επαναιωρημένης βιομάζας των 29 LAB, 100ml αποστειρωμένου

MRD και ωχρατοξίνη A συγκέντρωσης 50 ppb, ο οποίος ήταν 5 ημέρες στους 30 °C.

- **7^ο ΜΕΡΟΣ:** Μελέτη της επίδρασης του κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50 ppb ωχρατοξίνης A (OTA), η οποία επιτεύχθηκε σε **YGC-Agar** (Yeast extract glucose chloramphenicol agar). Το YGC-Agar χρησιμοποιήθηκε ούτως ώστε να μελετηθεί το ποσοστό διάσπασης ωχρατοξίνης A από το σύνολο των ζυμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (ανάπτυξη του συνόλου των ζυμών σε τρυβλία). Ομοίως και για την περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, μελετήθηκε η επίδραση του κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50 ppb ωχρατοξίνης A (OTA), η οποία επιτεύχθηκε σε **MRS Agar**, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον ίδιο ακριβώς λόγο για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε και το YGC-Agar στις ζύμες.

ZYMEΣ

- **Κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί και επίτευξη συγκέντρωσης 50 ppb OTA σε YGC-Agar (ανάπτυξη σε τρυβλία)**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η ακόλουθη:

- Ανανέωση των ζυμών 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.
- Παρασκευή ορισμένης ποσότητας θρεπτικού υποστρώματος Yeast Medium και τοποθέτηση 5ml σε ένα μικρό πλαστικό σωλήνα.
- Αποστείρωση του πλαστικού σωλήνα με το θρεπτικό υπόστρωμα για 15min στους 121 °C.

- Παρασκευή του κοκτέιλ όπου στον σωλήνα με τα 5ml αποστειρωμένου υποστρώματος εμβολιάστηκαν και οι 16 ανανεωμένες ζύμες, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε ζύμης αμέσως μετά την παρασκευή του κοκτέιλ ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml.
- Παρασκευή και αποστείρωση για 15min στους 121 °C ορισμένης ποσότητας YGC-Agar.
- Αφού το θρεπτικό υπόστρωμα YGC-Agar απέκτησε θερμοκρασία δωματίου (προτού πήξει), προστέθηκε σε αυτό, υπό ασηπτικές συνθήκες, ποσότητα ωχρατοξίνης A ώστε η συγκέντρωση να είναι ίση με 50 ppb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb.
- Ακολούθησε στρώσιμο του YGC-Agar σε τρυβλία, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες.
- Μετά την πήξη του υλικού στα τρυβλία, αυτά εμβολιάστηκαν, με τη χρήση μικροβιολογικής πιπέτας, με 100μl από το κοκτέιλ των 16 ζυμών και εφαρμόστηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique). Ομοίως, το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε ζύμης από το σύνολο των 16 ζυμών αμέσως μετά τον εμβολιασμό τους στα τρυβλία ήταν 10^7 - 10^8 cfu/ml.
- Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 2 ημέρες στους 30 °C.
- Μετά την πάροδο των 2 ημερών, τα δείγματα εκχυλίστηκαν με διάλυμα εκχύλισης (Μεθανόλη:Νερό = 80:20). Συγκεκριμένα, το υλικό κάθε τρυβλίου ομογενοποιήθηκε (η ομογενοποίηση διήρκεσε 6min) και κατόπιν μετρήθηκε το βάρος του ομογενοποιημένου υλικού σε ζυγαριά. Στη συνέχεια, το βάρος πολλαπλασιαζόμενο με τον αριθμό 4 παρείχε την ποσότητα σε ml του διαλύματος εκχύλισης που έπρεπε να προστεθεί στο ομογενοποιημένο υλικό. Τέλος, ακολούθησε διήθηση του

- Καθαρισμός του διηθήματος με τη χρήση των στηλών ωχρατοξίνης A, εφαρμόζοντας τη γνωστή διαδικασία, αφότου σε 4ml διηθήματος προστέθηκαν 12ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε σωλήνες falcon και το pH ρυθμίστηκε στο 7,4.
- Τέλος, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των δειγμάτων.

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε 1 τυφλό (τρυβλίο με YGC-Agar και 50 ppb OTA).

ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (LAB)

- **Κοκτέιλ των 29 LAB μαζί και επίτευξη συγκέντρωσης 50 ppb OTA σε MRS Agar (ανάπτυξη σε τρυβλία)**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος ήταν όμοια με εκείνη του κοκτέιλ των 16 ζυμών. Δηλαδή:

- Ανανέωση των γαλακτικών βακτηρίων 24 ώρες πριν τη χρησιμοποίησή τους στους 30 °C.
- Παρασκευή ορισμένης ποσότητας θρεπτικού υποστρώματος MRS broth και τοποθέτηση 5ml σε ένα μικρό πλαστικό σωλήνα.
- Αποστείρωση του πλαστικού σωλήνα με το θρεπτικό υπόστρωμα για 15min στους 121 °C.
- Παρασκευή του κοκτέιλ όπου στον σωλήνα με τα 5ml αποστειρωμένου υποστρώματος εμβολιάστηκαν και τα 29 ανανεωμένα LAB, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε γαλακτικού βακτηρίου αμέσως μετά την παρασκευή του κοκτέιλ ήταν 10^7 cfu/ml.

- Παρασκευή και αποστείρωση για 15min στους 121 °C ορισμένης ποσότητας MRS Agar.
- Αφότου το θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar απέκτησε θερμοκρασία δωματίου (προτού πήξει), προστέθηκε σε αυτό, υπό ασηπτικές συνθήκες, ποσότητα ωχρατοξίνης A ώστε η συγκέντρωση να είναι ίση με 50 ppb. Το πρότυπο ωχρατοξίνης A που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 10150 ppb.
- Εφαρμόστηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique). Δηλαδή τοποθέτηση 1ml από το κοκτέιλ των 29 LAB σε τρυβλία, με τη χρήση μικροβιολογικής πιπέτας, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες, στρώσιμο των τρυβλίων με το MRS Agar με την περιεχόμενη ωχρατοξίνη A και μετά την πήξη του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε δεύτερο στρώσιμο των τρυβλίων με το MRS Agar. Ομοίως, το αρχικό μικροβιακό φορτίο κάθε γαλακτικού βακτηρίου από το σύνολο των 29 LAB αμέσως μετά τον εμβολιασμό τους στα τρυβλία ήταν 10^7 cfu/ml.
- Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 5 ημέρες στους 30 °C.
- Μετά την πάροδο των 5 ημερών, τα δείγματα εκχυλίστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, όπως προαναφέρθηκε για τις ζύμες.
- Καθαρισμός των διηθημάτων που προέκυψαν από το προηγούμενο στάδιο, με τη χρήση των στηλών ωχρατοξίνης A, εφαρμόζοντας τη γνωστή διαδικασία, αφότου σε 4ml κάθε διηθήματος προστέθηκαν 12ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε σωλήνες falcon και το pH ρυθμίστηκε στο 7,4.
- Τέλος, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των δειγμάτων.

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε 1 τυφλό (τρυβλίο με MRS Agar και 50 ppb OTA).

Σημείωση: Για όλα τα παραπάνω μέρη του πειράματος πραγματοποιήθηκε από μία επανάληψη.

6.2.2 Προσδιορισμός της ωχρατοξίνης A

6.2.2.1 Καθαρισμός των δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων, προτού γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός της ωχρατοξίνης A με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας (HPLC), έγινε με ειδικές στήλες καθαρισμού της ωχρατοξίνης A (OchraStar – Immunoaffinity Columns, Code:COIAC2000, Romer Labs Diagnostic GmbH – Austria) (εικόνα 6.2.2.1α).



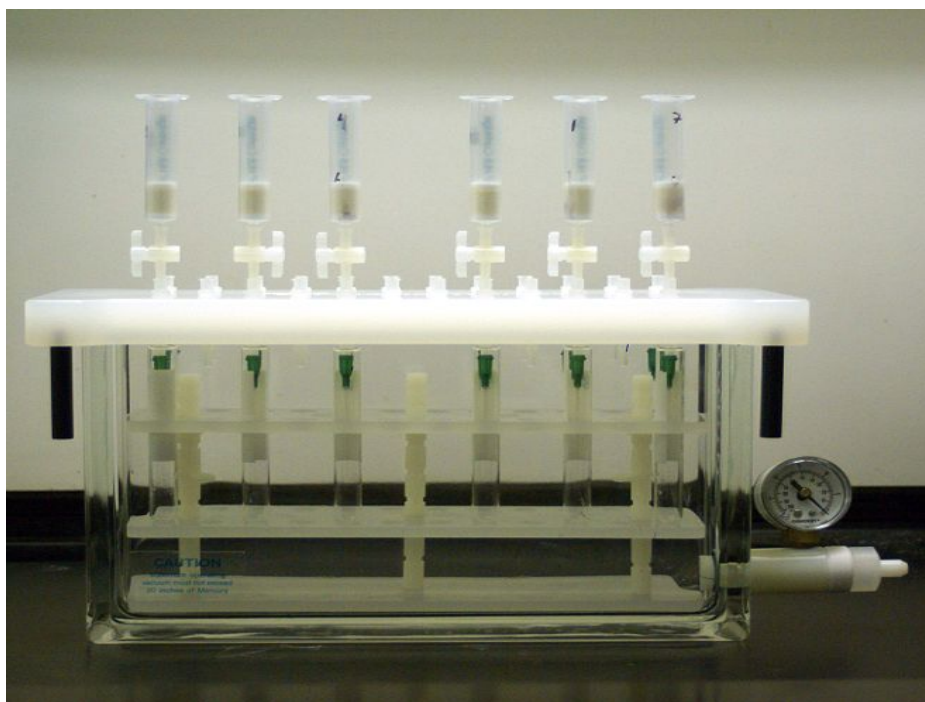
Εικόνα 6.2.2.1α: Στήλες ανοσοσυγγένειας καθαρισμού δείγματος OchraStar^{TM8}

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των στηλών ανοσοσυγγένειας ωχρατοξίνης A, από κάθε δείγμα λαμβάνονταν 4ml (μετά από το στάδιο της φυγοκέντρισης, όπως ήδη έχει αναφερθεί) και στην ποσότητα αυτή προσθέτονταν 12ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (για το διάλυμα αυτό έχει γίνει αναφορά στην παράγραφο 6.1.4.2), με αποτέλεσμα για κάθε δείγμα ο τελικός όγκος να είναι 16ml. Κατόπιν ρύθμισης του pH κάθε δείγματος στην τιμή 7,4, σύμφωνα πάντα με το πρωτόκολλο των στηλών, γινόταν καθαρισμός των 16ml με τη χρήση των ειδικών στηλών καθαρισμού της ωχρατοξίνης A.

Χρησιμοποιώντας για κάθε δείγμα μία σύριγγα των 50ml, το έμβολο της οποίας τοποθετούνταν στο πάνω μέρος της στήλης μετά

⁸ www.romerlabs.com, 'Ochratoxins Clean Up-StarTM Immunoaffinity columns (IAC)', 1

από αφαίρεση του πορτοκαλί καπακιού, το δείγμα περνούσε από τη σύριγγα και στη συνέχεια από τη στήλη, υπό συνθήκες κενού (solid phase extraction) (εικόνα 6.2.2.1β).



Εικόνα 6.2.2.1β: Χαρακτηριστική εξαγωγή στερεάς φάσης (solid phase extraction). Τα φυσιγγία στάζουν στο δοχείο, όπως φαίνεται στο κατώτερο μέρος του οργάνου, όπου συλλέγονται τα 'απόβλητα' κατά τον καθαρισμό του δείγματος, δηλαδή όλες οι περιττές ουσίες πέραν της ωχρατοξίνης Α. Μία βαλβίδα κενού με τον μετρητή χρησιμοποιείται για να ελέγξει το κενό που εφαρμόζεται στο δοχείο.⁹

Συνεπώς, πάνω από τις στήλες, όπως φαίνονται στην παραπάνω εικόνα, τοποθετούνταν οι σύριγγες των 50ml και κατόπιν δημιουργίας κενού (solid phase extraction), τα δείγματα περνούσαν μέσα από τις σύριγγες και στη συνέχεια μέσα από τις στήλες, όπου γινόταν ο καθαρισμός τους.

Ένα πολύ σημαντικό σημείο ήταν η διέλευση του δείγματος από τη στήλη με συγκεκριμένη ροή, ώστε να κατακρατηθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερο ποσό ωχρατοξίνης Α. Για το λόγο αυτό, η ρύθμιση της ροής του δείγματος γινόταν με τις άσπρες βαλβίδες, όπως φαίνονται στην

⁹ From Wikipedia, the free encyclopedia, 'Solid phase extraction', 1

εικόνα. Επιθυμητή ροή ήταν εκείνη όπου το δείγμα περνούσε από τη στήλη σταγόνα-σταγόνα (1-3 ml/min, σύμφωνα με το πρωτόκολλο).

Μετά από τη διέλευση όλου του δείγματος μέσα από τη στήλη ανοσοσυγγένειας ωχρατοξίνης A, ακολούθησε το στάδιο της πλύσης του δείγματος. Η πλύση γινόταν με 2 δόσεις των 10ml του διαλύματος έκπλυσης, δηλαδή οξικού αμμωνίου 0,2M (για το διάλυμα αυτό έχει γίνει αναφορά στην παράγραφο 6.1.4.2). Κάθε δόση των 10ml του διαλύματος έκπλυσης περνούσε ομοίως πρώτα από τη σύριγγα και στη συνέχεια από τη στήλη. Μετά τη διέλευση και της 2^{ης} δόσης του διαλύματος έκπλυσης, έπρεπε να περάσει αέρας μέσα από τη στήλη και αυτό γινόταν με το άνοιγμα των άσπρων στροφίγγων. Είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι μόνο σε αυτό το στάδιο έπρεπε να περάσει αέρας από την στήλη.

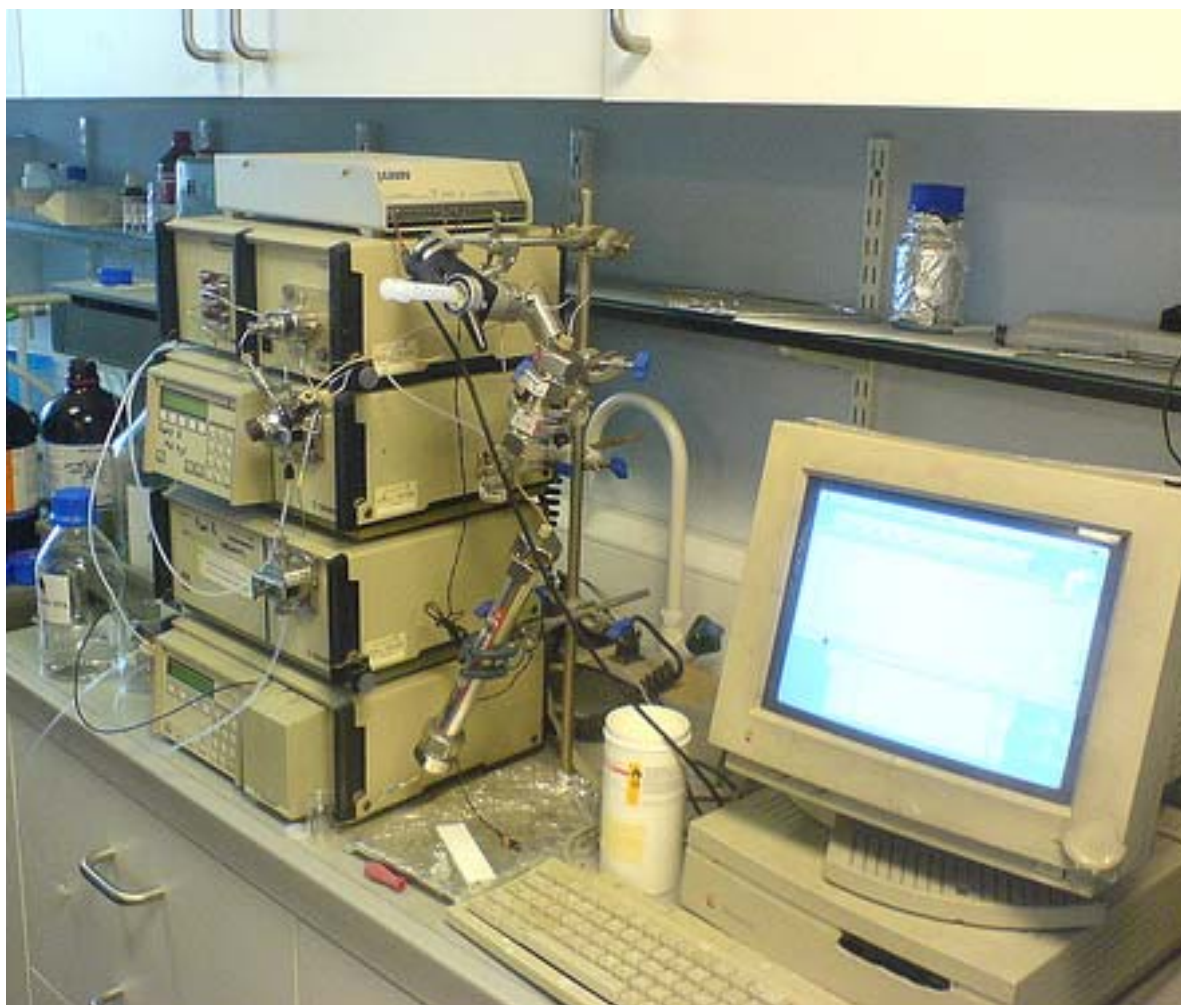
Μετά από το στάδιο της πλύσης, ακολούθησε το στάδιο της έκλουσης της ωχρατοξίνης A. Αφού απομακρύνθηκε το δοχείο συλλογής των περιττών ουσιών του δείγματος πέραν της ωχρατοξίνης A, καθώς και οι σύριγγες των 50ml και τοποθετήθηκε το ειδικό στατό με τα μπουκαλάκια συλλογής της ωχρατοξίνης A, δημιουργήθηκαν ξανά συνθήκες κενού. Ακολούθησε προσθήκη στις στήλες συνολικά 2ml διαλύματος έκλουσης, δηλαδή μεθανόλης HPLC : οξικού οξέος HPLC σε αναλογία 98:2 (για το διάλυμα έκλουσης έχει γίνει αναφορά στην παράγραφο 6.1.4.2). Η προσθήκη του συνολικού όγκου των 2ml του διαλύματος έκλουσης έγινε τμηματικά σε 3 δόσεις και κάθε δόση έπρεπε να παραμένει στη στήλη για μερικά δευτερόλεπτα, με κλειστή τη στροφή, ώστε να έρχεται για λίγο σε επαφή με το gel που περιείχε κάθε στήλη. Έτσι, μετά από τη διέλευση και του διαλύματος έκλουσης από τις στήλες, είχαν συλλεχθεί συνολικά σε κάθε μπουκαλάκι 2ml διαλύματος που περιείχε και την ωχρατοξίνη A, για κάθε δείγμα.

Από το τελικό δείγμα των 2ml διαλύματος ωχρατοξίνης A, ποσότητα 100μl εκχεόταν στην συσκευή της HPLC.

6.2.2.2 Λίγα λόγια για τη συσκευή της HPLC

Όσον αφορά τη συσκευή της HPLC (εικόνα 6.2.2.2α) που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος καθώς και τις συνθήκες λειτουργίας αυτής:

- Ακολουθήθηκε η μέθοδος των Moller et al. (2003).
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector) με θάλαμο έγχυσης χωρητικότητας 100μl.
- Συνδυασμός διαλυτών (νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ : 49/49/2), όπου αποτελούν την κινητή φάση.
- Στήλη (column) (Resteck Pinnacle II, 250x4,6 mm, C18, 4μm)
- Ανιχνευτής φθορισμομετρικός (detector) (Lachrom Merck Hitachi, L-7485) με διέγερση στα 333nm (Ex) και εκπομπή στα 460nm (Em).
- Αντλία (σύστημα παροχής κινητής φάσης-pump) (Lachrom Merck Hitachi, L-7100). Ρυθμίζεται η αναλογία χρήσης των διαλυτών (νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ : 49/49/2) και ο ισοκρατικός ρυθμός ροής 1 ml/min.
- Καταγραφέας (recorder or data system).



Εικόνα 6.2.2.2α: Σύστημα HPLC¹⁰

¹⁰ Holding, A. 'Macintosh II HPLC Setup', 1

6.2.2.3 Ποσοτική ανάλυση με χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης της ωχρατοξίνης A ενός δείγματος (λόγω διάσπασης της αρχικής συγκέντρωσής της από ζύμες και γαλακτικά βακτήρια) γίνεται γνωρίζοντας το εμβαδό της ουσίας αυτής και με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν. Οι καμπύλες βαθμονόμησης των πρότυπων διαλυμάτων προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις της ωχρατοξίνης A των διαλυμάτων αυτών (γνωστές συγκεντρώσεις) συναρτήσει των εμβαδών της τοξίνης στα διαλύματα. Με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) παίρνουμε το λεγόμενο **χρωματογράφημα** της ωχρατοξίνης A ενός δείγματος, δηλαδή στην οθόνη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή παίρνουμε ένα διάγραμμα χρόνου συναρτήσει σήματος. Από το χρωματογράφημα υπολογίζεται το εμβαδόν της κορυφής της ωχρατοξίνης A. Το εμβαδό μιας χρωματογραφικής κορυφής είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συστατικού και όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιείται για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ωχρατοξίνης A στο σύνολο των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

Οι αναλύσεις όλων των δειγμάτων καθώς και των προτύπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν με τη συσκευή της HPLC. Με μικροσύριγγα των 500μl λαμβάνονταν κάθε φορά 100μl του δείγματος των 2ml και εισάγονταν στη συσκευή προς μέτρηση. Η ποσότητα των 2ml είχε συλλεχθεί από το στάδιο έκλουσης της ωχρατοξίνης A (αναφορά έγινε στην παράγραφο 6.2.2.1). Πριν από κάθε ένεση συνήθως προηγούνταν 5-6 πλύσεις με μεθανόλη ειδική της συσκευής HPLC. Αξίζει να σημειωθεί ότι η λήψη δείγματος με τη σύριγγα γινόταν με προσοχή για την αποφυγή του σχηματισμού φυσαλίδων στο

εσωτερικό αυτής. Σε περίπτωση που συνέβαινε κάτι τέτοιο θα σήμαινε ότι είχε εγκλωβιστεί αέρας με άμεσα συνεπακόλουθα: α) τη λήψη μικρότερης ποσότητας δείγματος και β) τη λήψη ανεπιθύμητων κορυφών στα χρωματογραφήματα.

Κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης

A) Κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη από πρότυπα διαλύματα ωχρατοξίνης A (OTA), τα οποία παρασκευάστηκαν επιτυχάνοντας σε **Yeast Medium** συγκεντρώσεις 4,785, 18,588, 35,8, 66,66 και 111,53ppb OTA. Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων των συγκεντρώσεων ωχρατοξίνης A που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιήθηκε πρότυπο ωχρατοξίνης A συγκέντρωσης 10150ppb (μg/ml). Έτσι, γνωρίζοντας τις συγκεντρώσεις της ωχρατοξίνης A των προτύπων διαλυμάτων και βάση του εμβαδού της κορυφής της ωχρατοξίνης A που υπολογιζόταν από το χρωματογράφημα της συσκευής HPLC, κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη για το Yeast Medium. Αξίζει να σημειωθεί ότι το Yeast Medium είχε αποστειρωθεί πριν την προσθήκη σε αυτό των διαφόρων ποσοτήτων ωχρατοξίνης A για την επίτευξη των παραπάνω συγκεντρώσεων. Η αποστείρωση έγινε καθαρά για τυπικούς λόγους, εφόσον το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρωνόταν και για τα 'άγνωστα' δείγματα.

B) Κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη από πρότυπα διαλύματα ωχρατοξίνης A (OTA), τα οποία παρασκευάστηκαν επιτυχάνοντας σε **MRS broth** συγκεντρώσεις, ομοίως, 4,785, 18,588, 35,8, 66,66 και 111,53ppb OTA. Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων των συγκεντρώσεων ωχρατοξίνης A που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιήθηκε, ομοίως, πρότυπο ωχρατοξίνης A συγκέντρωσης 10150ppb (μg/ml). Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για το MRS broth προέκυψε με τον ίδιο τρόπο, όπως ακριβώς κατασκευάστηκε και η πρότυπη καμπύλη για το Yeast Medium. Το MRS broth είχε

αποστειρωθεί πριν την προσθήκη σε αυτό των διαφόρων ποσοτήτων ωχρατοξίνης A για την επίτευξη των παραπάνω συγκεντρώσεων, για τον ίδιο ακριβώς λόγο για τον οποίο αποστειρώθηκε και το Yeast Medium.

Γ) Κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη από πρότυπα διαλύματα ωχρατοξίνης A (OTA), τα οποία παρασκευάστηκαν επιτυχάνοντας σε **κινητή φάση** (νερό/ακετονιτρίλιο/οξικό οξύ : 49/49/2) συγκεντρώσεις 0,25, 0,761, 2,03, 3,55, 5,075, 10,15, 20,3, 101,5, 203 και 483,3ppb OTA. Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων των συγκεντρώσεων ωχρατοξίνης A που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιήθηκε, ομοίως, πρότυπο ωχρατοξίνης A συγκέντρωσης 10150ppb (μg/ml). Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για την κινητή φάση προέκυψε με τον ίδιο τρόπο, όπως ακριβώς κατασκευάστηκαν και οι δύο προηγούμενες πρότυπες καμπύλες. Η συγκεκριμένη πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε για να εξεταστεί κατά πόσο ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης (Yeast Medium, MRS broth και κινητή φάση) επηρέασε το εμβαδόν της ωχρατοξίνης A στα διαλύματα ίδιων συγκεντρώσεων. Επιπλέον, η πρότυπη καμπύλη κινητής φάσης κατασκευάστηκε ώστε να προσδιοριστεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ωχρατοξίνης A ενός δείγματος, καθώς και για τον έλεγχο της σωστής λειτουργίας του ανιχνευτή της συσκευής HPLC.

Σημείωση: Τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών του Yeast Medium και του MRS broth καθαρίστηκαν από τις ειδικές στήλες καθαρισμού της ωχρατοξίνης A, όπως όριζε το πρωτόκολλο των συγκεκριμένων στηλών (OchraStar – Immunoaffinity Columns, Code:COIAC2000, Romer Labs Diagnostic GmbH – Austria). Φυσικά, τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της κινητής φάσης δεν απαιτούσαν καθαρισμό, εφόσον η συσκευή της

HPLC χρησιμοποιούσε τη συγκεκριμένη κινητή φάση κατά την λειτουργία της.

Επίδραση υποστρώματος στο ποσοστό ανάκτησης OTA

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του υποστρώματος στο ποσοστό ανάκτησης, προστέθηκε τόσο σε Yeast Medium (αποστειρωμένο) όσο και σε MRS broth (αποστειρωμένο) ποσότητα ωχρατοξίνης A ώστε να επιτευχθούν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις των 5 και 50ppb. Για την προσθήκη ωχρατοξίνης A στα δύο υποστρώματα χρησιμοποιήθηκε πρότυπο συγκέντρωσης 10150ppb (μg/ml). Τα δείγματα των 5 και 50ppb OTA τόσο του Yeast Medium όσο και του MRS broth αναλύθηκαν με τη συσκευή της HPLC αφού προηγουμένως καθαρίστηκαν από τις ειδικές στήλες καθαρισμού της ωχρατοξίνης A και κατόπιν υπολογίστηκε το ποσοστό ανάκτησης της OTA για τα δύο υποστρώματα.

6.2.2.4 Στατιστική επεξεργασία

A) Υπολογισμός του ποσοστού ανάκτησης (recovery)

Το ποσοστό της ανάκτησης (recovery) υπολογίζεται από τη σχέση $(C2/C1)*100$, όπου C1 είναι η αρχική συγκέντρωση και C2 η μετρούμενη συγκέντρωση του δείγματος σε OTA.

B) Υπολογισμός της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSDr)

Στο συγκεκριμένο πείραμα υπολογίζεται η σχετική τυπική απόκλιση με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (Relative Standard Deviation, RSDr: όπου ο δείκτης r δηλώνει την επαναληψιμότητα από το αρχικό γράμμα της λέξης repeatability). Ο υπολογισμός της γίνεται με βάση τη σχέση $(Sr/X)*100$,

όπου S_r η τυπική απόκλιση υπολογιζόμενη με βάση τα ληφθέντα αποτελέσματα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και \bar{X} ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των μετρήσεων.

Γ) Στατιστική επεξεργασία

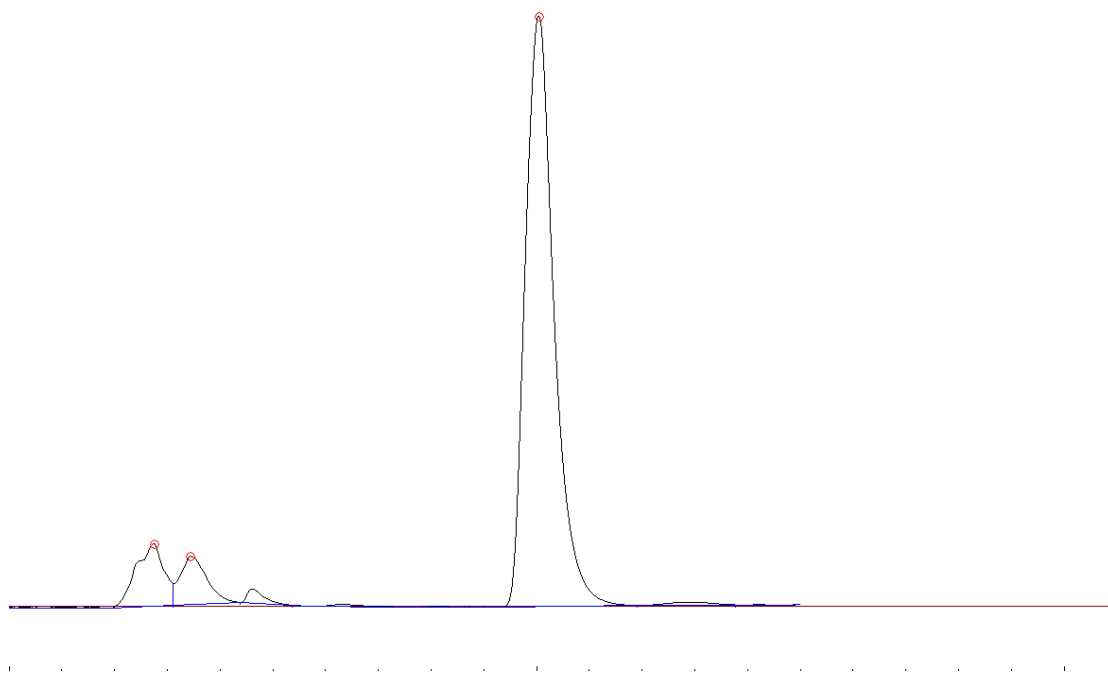
Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS, έκδοση 16.0. Με τη βοήθεια του συγκεκριμένου στατιστικού προγράμματος αποδείχτηκε, όπως αναφέρεται αναλυτικότερα στο επόμενο κεφάλαιο, ότι όλα τα δείγματα δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Παρουσίαση αποτελεσμάτων

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων ωχρατοξίνης A όλων των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος, όπως ήδη έχει αναφερθεί στην παράγραφο 6.2.2.3, έγινε γνωρίζοντας τα εμβαδά της ωχρατοξίνης A των δειγμάτων και με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης (πρότυπες καμπύλες) των πρότυπων ουσιών. Οι καμπύλες βαθμονόμησης των πρότυπων ουσιών προέκυψαν από τις συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών συναρτήσει των εμβαδών τους. Με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) λήφθηκε το λεγόμενο **χρωματογράφημα** της ωχρατοξίνης A κάθε δείγματος, αφού προηγουμένως κάθε ένα δείγμα καθαρίστηκε με χρήση ειδικών στηλών καθαρισμού, ώστε να απομακρυνθούν όλες οι ανεπιθύμητες ουσίες και να παραμείνει μόνο η ωχρατοξίνη A. Από το χρωματογράφημα υπολογίστηκε το εμβαδόν της κορυφής της ωχρατοξίνης A κάθε δείγματος. Η παρακάτω εικόνα (εικόνα 7.1.α) απεικονίζει το χρωματογράφημα της ωχρατοξίνης A ενός πρότυπου διαλύματος Yeast Medium συγκέντρωσης 66,66ppb.



Εικόνα 7.1.α: Χρωματογραφική απεικόνιση ωχρατοξίνης A πρότυπου διαλύματος Yeast Medium συγκέντρωσης 66,66ppb (οι δύο μικρότερες κορυφές της εικόνας αποτελούν ουσίες της χρησιμοποιούμενης κινητής φάσης).

Καμπύλες βαθμονόμησης

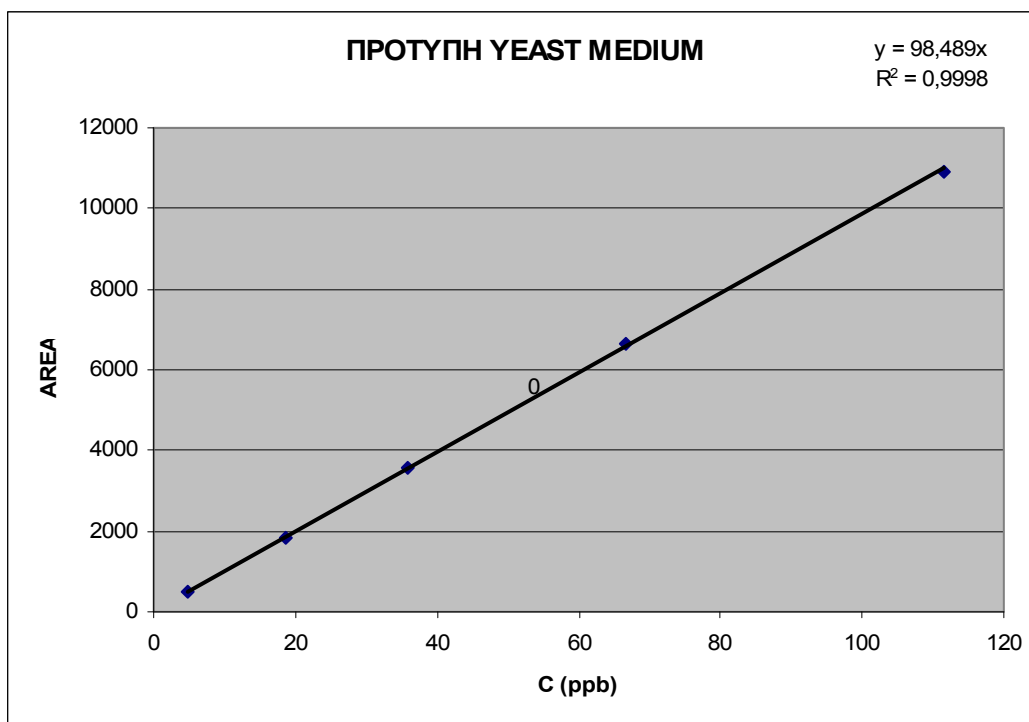
- Πρότυπη καμπύλη Yeast Medium

Οι συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης Α των πρότυπων διαλυμάτων Yeast Medium που χρησιμοποιήθηκαν και τα εμβαδά αυτής που προέκυψαν με τη χρήση της συσκευής HPLC παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.α.

C (ppb)	AREA	AVERAGE
4,785	528,7524	512,2278
	512,0454	
	495,8856	
18,588	1776,277	1813,6580
	1836,0754	
	1828,6216	
35,8	3546,0784	3547,0327
	3547,7108	
	3547,3088	
66,66	6628,352	6661,7389
	6569,2142	
	6787,6506	
111,53	11065,079	10921,0452
	10899,8618	
	10798,1948	

Πίνακας 7.1.α: Συγκεντρώσεις και εμβαδά ωχρατοξίνης Α πρότυπων διαλυμάτων Yeast Medium.

Η πρότυπη καμπύλη Yeast Medium είναι η ακόλουθη:



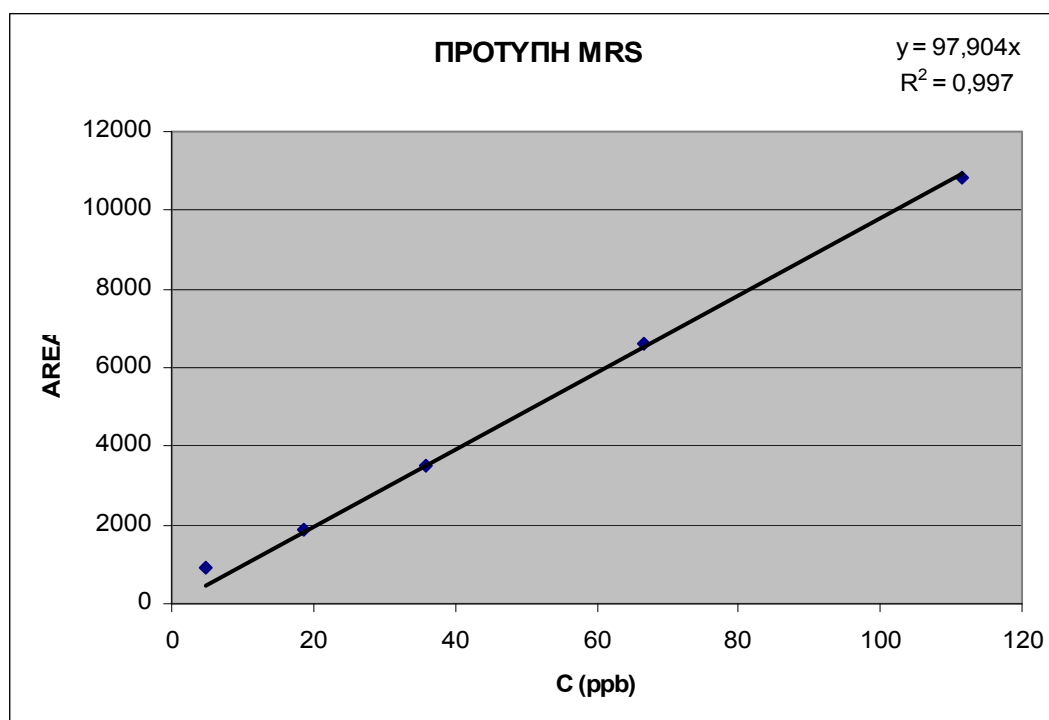
- **Πρότυπη καμπύλη MRS broth**

Οι συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A των πρότυπων διαλυμάτων MRS που χρησιμοποιήθηκαν και τα εμβαδά αυτής που προέκυψαν με τη χρήση της συσκευής HPLC παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.β.

C (ppb)	AREA	AVERAGE
4,785	862,336	895,9059
	906,7996	
	918,582	
18,588	1884,0012	1879,4067
	1852,1532	
	1902,0658	
35,8	3534,3436	3515,0922
	3629,6006	
	3381,3324	
66,66	6686,565	6595,5729
	6539,1652	
	6560,9884	
111,53	10871,7458	10846,3299
	10799,3758	
	10867,868	
	10867,868	

Πίνακας 7.1.β: Συγκεντρώσεις και εμβαδά ωχρατοξίνης A πρότυπων διαλυμάτων MRS.

Η πρότυπη καμπύλη MRS είναι η ακόλουθη:



- **Πρότυπη καμπύλη κινητής φάσης**

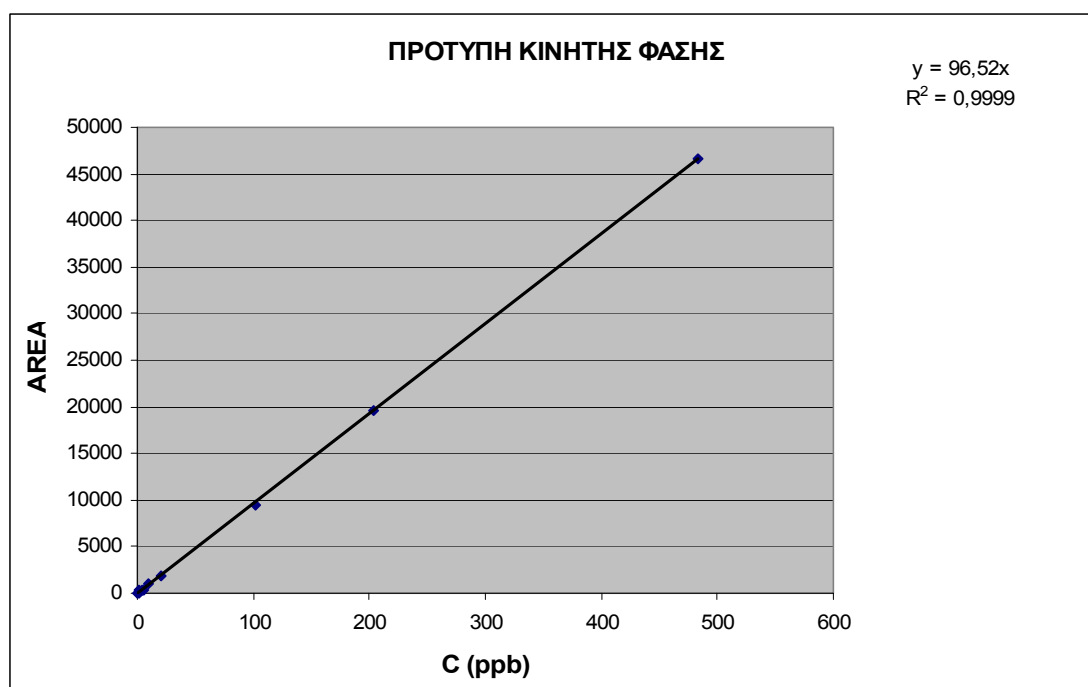
Οι συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A των πρότυπων διαλυμάτων κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκαν και τα εμβαδά αυτής που προέκυψαν με τη χρήση της συσκευής HPLC παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.γ.

C(ppb)	AREA	AVERAGE
0,25	22,1336	23,375733
	22,3588	
	25,6348	
0,761	74,555	76,7704
	82,3026	
	73,4536	
2,03	372,5184	384,38913
	388,1818	
	392,4672	
3,55	287,7908	282,7372
	277,334	
	283,0868	
5,075	391,262	391,56193
	385,0228	
	398,401	
10,15	944,4664	943,05453
	939,4226	

	945,2746	
20,3	1823,5988	1835,3988
	1844,618	
	1837,9796	
101,5	9465,6130	9489,0809
	9504,8360	
	9496,7936	
203	19711,8352	19625,3291
	19697,8516	
	19466,3004	
483,3	46129,8432	46705,8292
	45563,7252	
	45733,8720	
	45568,0878	
	46796,7042	
	50442,7428	

Πίνακας 7.1.γ: Συγκεντρώσεις και εμβαδά ωχρατοξίνης Α πρότυπων διαλυμάτων κινητής φάσης.

Η πρότυπη καμπύλη κινητής φάσης είναι η ακόλουθη:



Από την πρότυπη καμπύλη κινητής φάσης διαπιστώνουμε ότι το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της ωχρατοξίνης Α ήταν 2ppb, εφόσον στις μικρότερες συγκεντρώσεις των 0,25 και 0,761ppb που εξετάστηκαν, η κορυφή της ωχρατοξίνης Α δεν ήταν εμφανής.

Από τις τρεις πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν, παρατηρούμε ότι οι κλίσεις τους καθώς και το R^2 , το οποίο τείνει στη μονάδα και για τις τρεις καμπύλες, δεν διαφέρουν κατά πολύ. Επομένως, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης (Yeast Medium, MRS broth και κινητή φάση) δεν επηρέασε το εμβαδόν της ωχρατοξίνης A στα διαλύματα ίδιων συγκεντρώσεων.

Ποσοστό ανάκτησης ωχρατοξίνης A

Η διαδικασία για τον υπολογισμό του ποσοστού ανάκτησης της ωχρατοξίνης A (recovery) για τα υποστρώματα Yeast Medium και MRS broth έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 6.2.2.3. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

ppb Y.M.	AREA	C (ppb στα 2ml)	C αρχ. (ppb στα 4ml)	AVERAGE	RECOVERY (%)
5	1100,8512	11,18	5,59	5,66	113,30
	1133,9742	11,51	5,76		
	1112,7724	11,30	5,65		
50	8676,9056	88,10	44,05	43,82	87,63
	8483,7474	86,14	43,07		
	8731,7412	88,66	44,33		
ppb MRS	AREA	C (ppb στα 2ml)	C αρχ. (ppb στα 4ml)	AVERAGE	RECOVERY (%)
5	1126,3116	11,50	5,75	5,35	107,05
	992,8776	10,14	5,07		
	1024,9856	10,47	5,23		
50	8868,2772	90,58	45,29	45,95	91,91
	9064,0254	92,58	46,29		
	9062,1504	92,56	46,28		

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το ποσοστό ανάκτησης και για τις δύο συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A των 5 και 50ppb, τόσο για το Yeast Medium όσο και για το MRS broth, είναι πολύ υψηλό, γεγονός που επιβεβαιώνει την ακρίβεια της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της ωχρατοξίνης A ενός δείγματος.

- **1^ο ΜΕΡΟΣ:**

- **Μεμονωμένα στελέχη ζυμών + 100ppb ΟΤΑ**

Μετρήθηκε το pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που προαναφέρθηκε στην παράγραφο 6.2.1. Οι τιμές pH των δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.1.

Είδος	Κωδικοποίηση	pH υπερκειμένου μετά την 1 ^η φυγοκέντριση
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	A1	5,18
<i>Kluyveromyces dobzhankii</i>	A2	5,13
<i>Pichia fermentas</i>	A3	5,17
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	A4	5,86
Άγνωστο (δεν έχει ταυτοποιηθεί)	A5	5,16
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	A6	5,04
<i>Issatchenkia terricola</i>	A7	5,21
	A7 (επαν.)	4,76
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	A8	4,53
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	A9	4,97
<i>Kazachstania hellenica</i>	A10	5,25
<i>Kazachstania hellenica</i>	A11	4,76
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	A12	4,9
	A12 (επαν.)	4,88
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A13	5,19
<i>Lachencea thermotolerans</i>	A14	4,9
<i>Pichia guilliermondii</i>	A15	4,63
<i>Issatchenkia orientalis</i>	A16	5,09
	A16 (επαν.)	4,62
Τυφλά (Yeast Medium)		pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1		6,51

Πίνακας 7.1.1: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση κυμαινόταν στις τιμές 4,53-5,86.

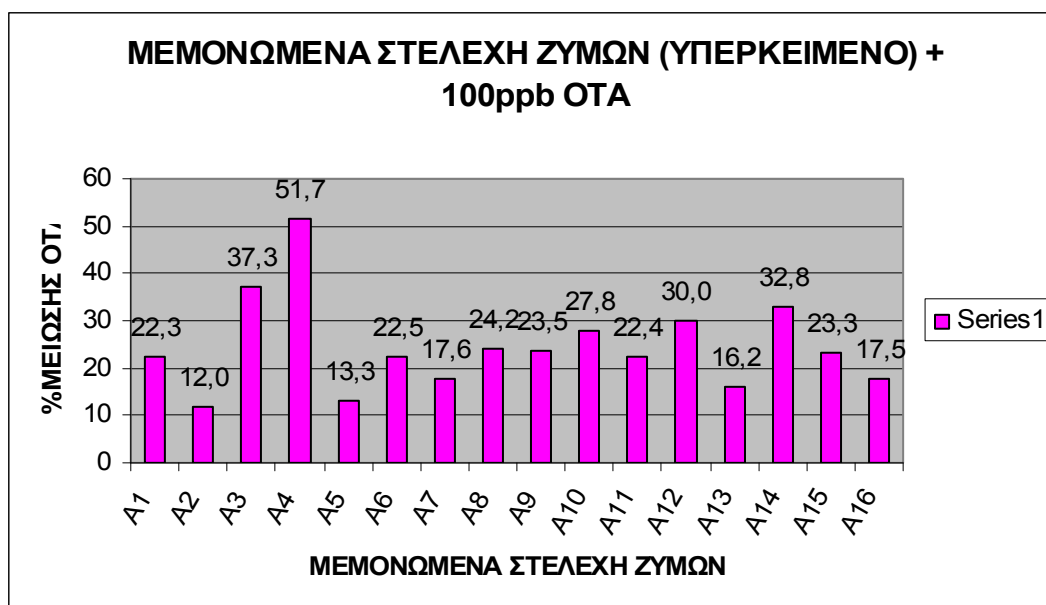
Με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) υπολογίστηκε το ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A από την επίδραση των ζυμών στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb κατόπιν επώασής τους σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium για 2 ημέρες στους 30 °C. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν τα εξής:

ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΩΝ (ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ)	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	85,9881	-
A1	66,8452	22,2622
A2	75,6891	11,9773
A3	50,0458	37,3226
A4	38,5920	51,6673
A5	74,5672	13,2820
A6	66,6300	22,5125
A7	59,2305	31,1178
A7 (επαν.)	82,3990	4,1740
A8	65,1460	24,2384
A9	65,7750	23,5068
A10	62,1034	27,7768
A11	66,6981	22,4333
A12	45,2965	47,3224
A12 (επαν.)	75,0190	12,7565
A13	72,0595	16,1983
A14	57,7897	32,7934
A15	65,9131	23,3462
A16	61,4124	28,5804
A16 (επαν.)	80,3828	6,5187

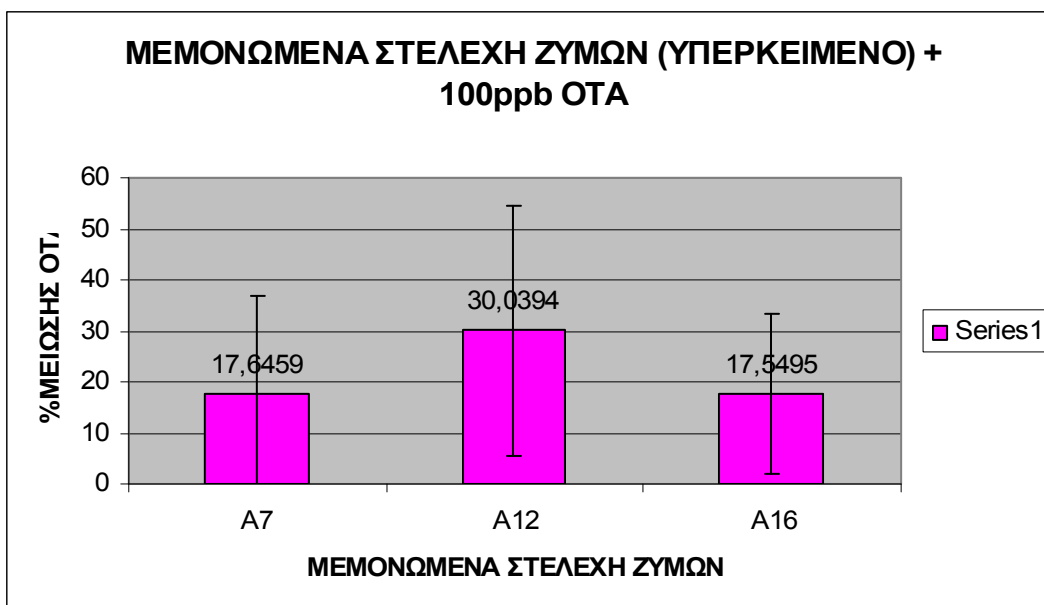
Για την επανάληψη του συγκεκριμένου πειράματος επιλέχθηκαν τα είδη *Issatchenkia terricola*, *Hanseniaspora opuntiae* και *Issatchenkia orientalis*, διότι παρουσίασαν αρκετά υψηλά ποσοστά μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης των 100ppb ωχρατοξίνης A. Για τα συγκεκριμένα είδη ζυμών έχουμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΩΝ (ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ)	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
A7	17,6459	19,0522
A12	30,0394	24,4418
A16	17,5495	15,6000

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Για τα είδη *Issatchenkia terricola*, *Hanseniaspora opuntiae* και *Issatchenkia orientalis*, τα αποτελέσματα των οποίων ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, έχουμε τα παρακάτω ραβδογράμματα:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium, εμφανίζει το είδος *Issatchenkia occidentalis* (51,7%) και ακολουθεί το είδος *Pichia fermentas* (37,3%), ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το είδος *Kluyveromyces dobzhankii* (12%).

➤ **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη → 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.2.

Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη		pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
No 1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	4,95
	<i>Kluyveromyces dobzhankii</i>	
	<i>Pichia fermentas</i>	
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	
No 2	Άγνωστο (δεν έχει ταυτοποιηθεί)	4,64
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
	<i>Issatchenkia terricola</i>	
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A8)	
No 3	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A9)	4,75
	<i>Kazachstania hellenica</i> (A10)	

	<i>Kazachstania hellenica (A11)</i>	
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	
No 4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,64
	<i>Lachencea thermotolerans</i>	
	<i>Pichia guilliermondii</i>	
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	
Τυφλό (Yeast Medium)		pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1		6,51

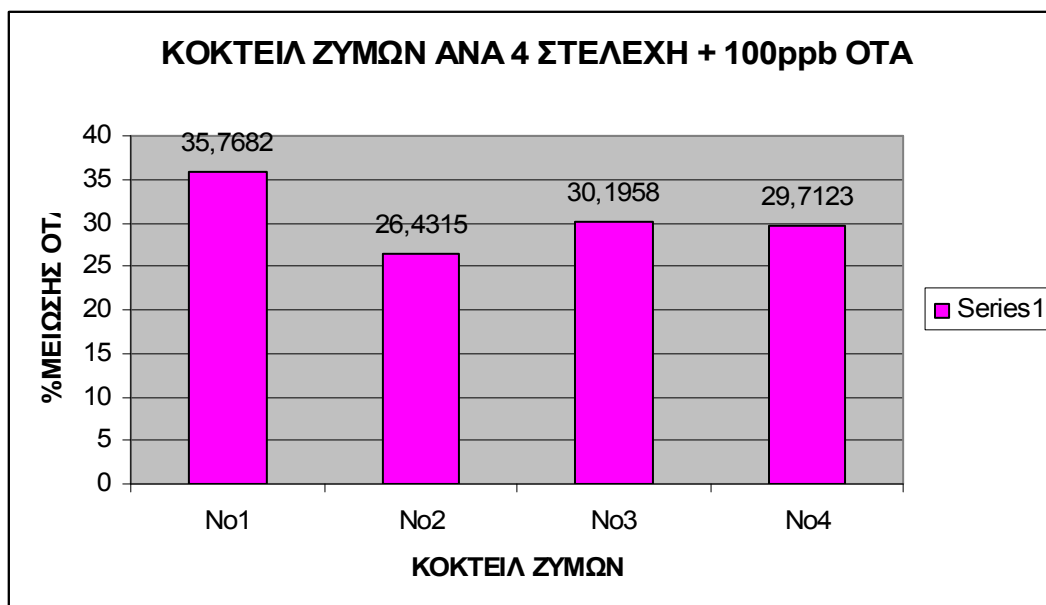
Πίνακας 7.1.2: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση κυμαινόταν στις τιμές 4,64-4,95.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	85,9881	-
No1	76,4359	35,7682
No2	87,5465	26,4315
No3	83,0670	30,1958
No4	83,6423	29,7123

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium, εμφανίζει το 1^ο κοκτέιλ ζυμών (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas*, *Issatchenkia occidentalis*) και είναι περίπου 35,77%. Ακολουθεί το 3^ο κοκτέιλ ζυμών (*Zygosaccharomyces bailii* A9, *Kazachstania hellenica* A10, *Kazachstania hellenica* A11 και *Hanseniaspora oruntiae*) με ποσοστό μείωσης 30,2% περίπου, το 4^ο κοκτέιλ (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*) με ποσοστό μείωσης 29,71% περίπου, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το 2^ο κοκτέιλ ζυμών (Αγνώστου ταυτότητας είδος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*, *Zygosaccharomyces bailii* A8) και είναι περίπου 26,43%.

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε από την αρχή και έδωσε τα εξής αποτελέσματα:

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.3.

Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη		pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντρωση
No 1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	4,25
	<i>Kluyveromyces dobzhankii</i>	
	<i>Pichia fermentas</i>	
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	
No 1 επαν.		4,26
No 2	Άγνωστο (δεν έχει ταυτοποιηθεί)	4,24
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
	<i>Issatchenkia terricola</i>	
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A8)	
No 2 επαν.		4,26
No 3	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A9)	4,13
	<i>Kazachstania hellenica</i> (A10)	
	<i>Kazachstania hellenica</i> (A11)	
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	
No 3 επαν.		4,45
No 4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,38
	<i>Lachencea thermotolerans</i>	
	<i>Pichia guilliermondii</i>	
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	
No 4 επαν.		4,43
Τυφλό (Yeast Medium)		pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1		6,26
T2		6,22

Πίνακας 7.1.3: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση κυμαινόταν στις τιμές 4,13-4,45. Δηλαδή μετά την πάροδο των 2 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH του Yeast Medium μειώθηκε κατά 2,4 βαθμούς περίπου κατά την ανάπτυξη των ζυμών σε σχέση με την κανονική τιμή pH του Yeast Medium (6,5).

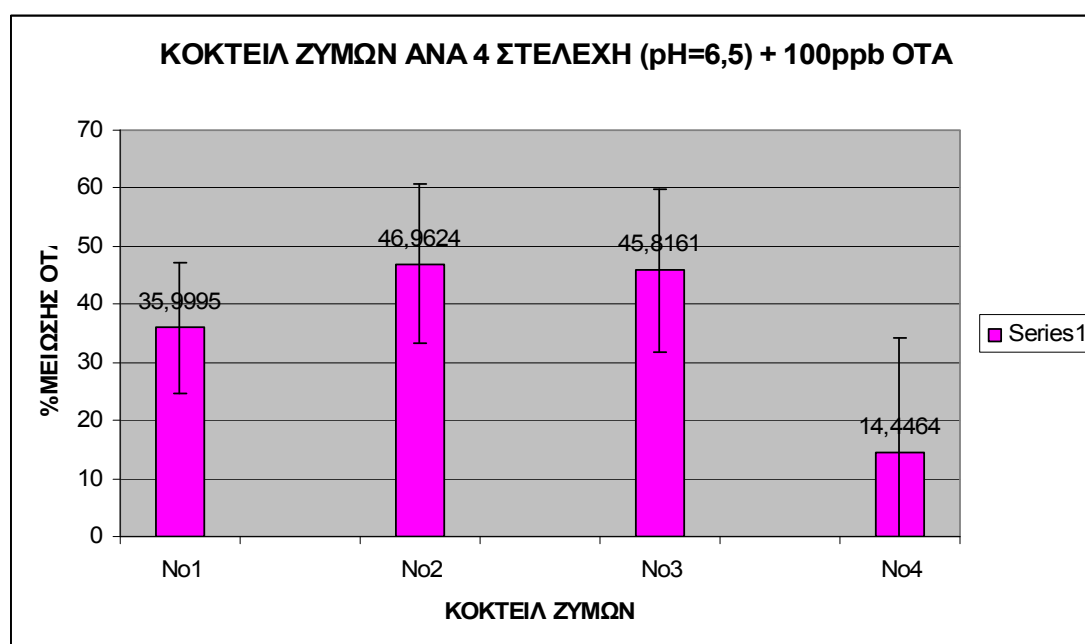
Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη στην

αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	128,5591	-
T2	98,2478	-
No1	81,6265	28,0211
No1 επαν.	63,5310	43,9779
No2	71,1098	37,2948
No2 επαν.	49,1830	56,6300
No3	50,2493	55,6898
No3 επαν.	72,6435	35,9424
No4	81,2319	28,3691
No4 επαν.	112,8095	0,5237

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
No1	35,9995	11,2831
No2	46,9624	13,6721
No3	45,8161	13,9635
No4	14,4464	19,6896

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα (του ίδιου πειράματος), το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium, εμφανίζει το 2^ο κοκτέιλ ζυμών και είναι περίπου 46,96%, ακολουθεί το 3^ο κοκτέιλ ζυμών με ποσοστό μείωσης περίπου 45,82%, το 1^ο κοκτέιλ με ποσοστό μείωσης περίπου 36%, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το 4^ο κοκτέιλ ζυμών και είναι περίπου 14,45%.

➤ **Βιομάζες των κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη → 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 2^η φυγοκέντριση (χρησιμοποιήθηκαν τα κοκτέιλ του πίνακα 7.1.2), της οποίας προηγήθηκε επαναιώρηση των βιομαζών των τεσσάρων κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη με διάλυμα εκχύλισης, όπως ακριβώς αναφέρεται στην παράγραφο 6.2.1, παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.4. Ουσιαστικά οι τιμές pH των υπερκειμένων που λήφθηκαν από την φυγοκέντριση των επαναιωρημένων βιομαζών, διαμορφώνονται από το διάλυμα εκχύλισης.

Βιομάζες των κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη		pH υπερκειμένου μετά την 2η φυγοκέντριση
No 1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Kluyveromyces dobzhankii</i> <i>Pichia fermentas</i> <i>Issatchenkia occidentalis</i>	6,85
No 2	Αγνωστο (δεν έχει ταυτοποιηθεί) <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Issatchenkia terricola</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A8)	6,50
No 3	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A9) <i>Kazachstania hellenica</i> (A10) <i>Kazachstania hellenica</i> (A11) <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	6,66
No 4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lachencea thermotolerans</i>	6,85

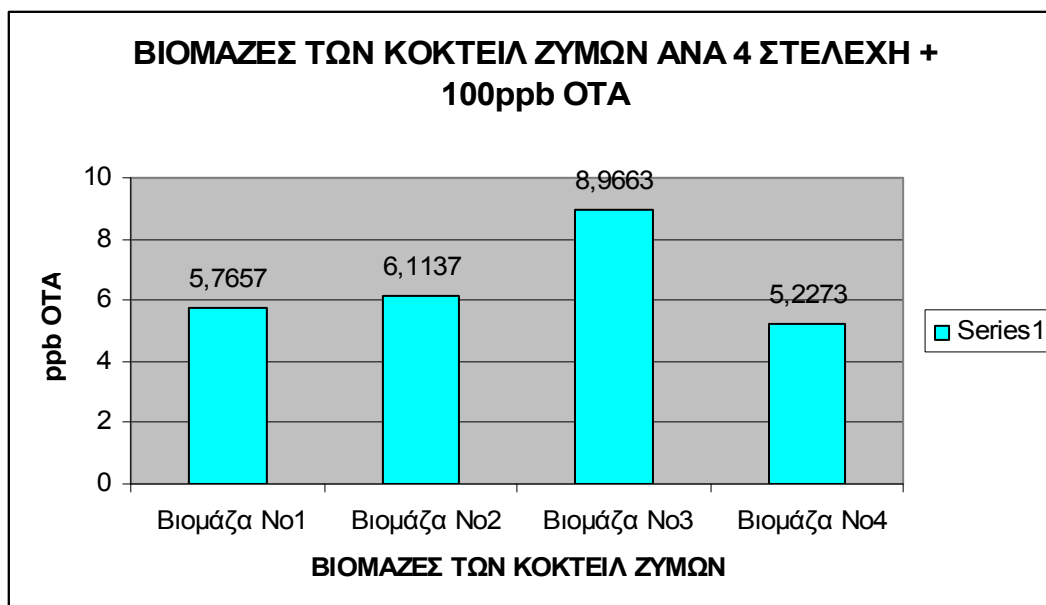
	<i>Pichia guilliermondii</i>	
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	
Τυφλό (Yeast Medium)		pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1		6,51

Πίνακας 7.1.4: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 2^η φυγοκέντρωση.

Ο σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η μελέτη της πιθανής κατακράτησης ποσότητας ωχρατοξίνης A στη βιομάζα των κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη, λόγω της οποίας να προκαλείται μείωση της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium για 2 ημέρες στους 30 °C. Οι ποσότητες ωχρατοξίνης A που βρέθηκαν στις βιομάζες των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν οι εξής:

ΒΙΟΜΑΖΕΣ ΤΩΝ ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml
T1	85,9881
Βιομάζα No1	5,7657
Βιομάζα No2	6,1137
Βιομάζα No3	8,9663
Βιομάζα No4	5,2273

Οι συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A των βιομαζών των κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Από τα ραβδογράμματα πράγματι διαπιστώνουμε ότι στη βιομάζα των κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη κατακρατείται ποσότητα ωχρατοξίνης Α, με αποτέλεσμα να προκαλείται μείωση της αρχικής συγκέντρωσης των 100ppb για κάθε κοκτέιλ. Παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα ωχρατοξίνης Α κατακρατείται στη βιομάζα του 3^{ου} κοκτέιλ με συγκέντρωση 8,97ppb περίπου, ακολουθεί το 2^ο κοκτέιλ, η βιομάζα του οποίου περιέχει ωχρατοξίνη Α συγκέντρωσης 6,11ppb περίπου, το 1^ο κοκτέιλ με συγκέντρωση 5,77ppb περίπου ωχρατοξίνης Α και τέλος με μικρή διαφορά ακολουθεί το 4^ο κοκτέιλ, η βιομάζα του οποίου περιέχει ωχρατοξίνη Α συγκέντρωσης 5,23ppb περίπου.

➤ **Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος → 100ppb ΟΤΑ**

Ομοίως, μετρήθηκε το pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση. Οι τιμές pH των δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.5.

Κοκτέιλ LAB	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντρωση
Κοκτέιλ Bacillus (1)	3,86
Κοκτέιλ Bacillus (2)	3,85
Κοκτέιλ Pediococcus (1)	3,89
Κοκτέιλ Pediococcus (2)	3,88
Κοκτέιλ Weissella (1)	4,03
Κοκτέιλ Weissella (2)	4,05
Κοκτέιλ Lactobacillus (1)	3,92
Κοκτέιλ Lactobacillus (2)	3,91
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	6,04
T2	6,12
T3	6,09
T4	6,09
Τυφλό (MRS broth χωρίς επώαση)	pH
T	6,12

Κοκτέιλ Στρεπτόκοκκων	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντρωση
Κοκτέιλ Streptococcus (1)	3,89
Κοκτέιλ Streptococcus (2)	3,9
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	6,19
T2	6,2

Πίνακας 7.1.5: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH των κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων μετά την 1^η φυγοκέντρωση ήταν αρκετά όξινο και κυμαινόταν στις τιμές 3,85-4,05.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης Α καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ΑΝΑ ΓΕΝΟΣ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	88,3062	-
Τυφλό χωρίς επώαση	83,5883	-
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (1)	62,7628	28,9259
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (2)	74,7366	15,3664
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (1)	77,7726	11,9284
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (2)	69,2991	21,5240
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (1)	72,6328	17,7489
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (2)	72,8187	17,5384
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (1)	68,8808	21,9977
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (2)	68,0537	22,9344

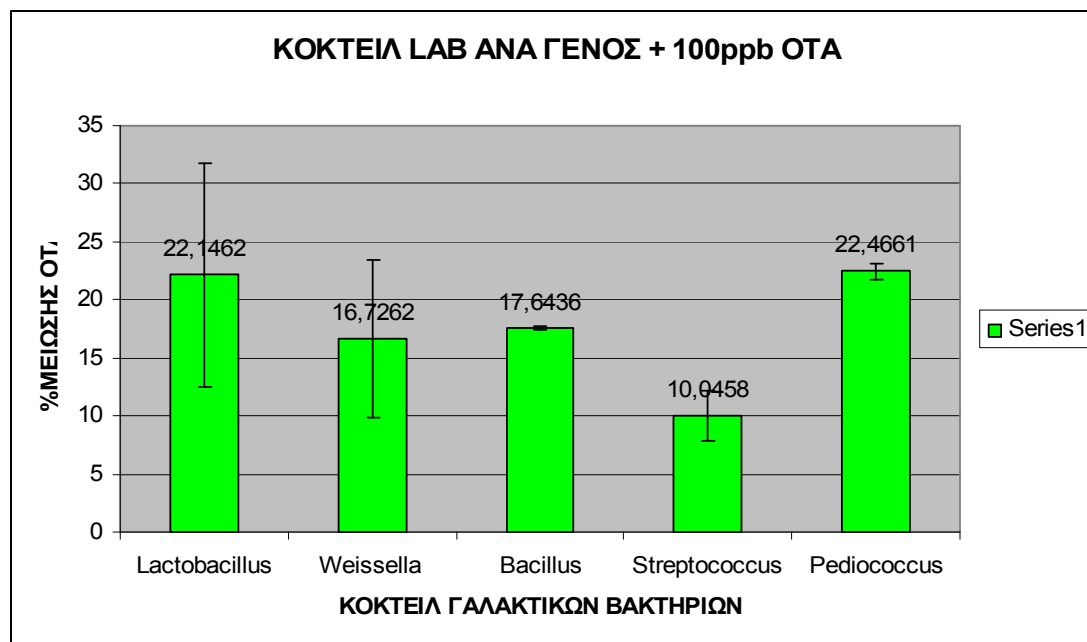
ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ΑΝΑ ΓΕΝΟΣ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i>	22,1462	9,5880
Κοκτέιλ <i>Weissella</i>	16,7262	6,7851
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i>	17,6436	0,1488
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i>	22,4661	0,6623

Όσον αφορά το γένος των στρεπτόκοκκων έχουμε τα εξής αποτελέσματα:

ΚΟΚΤΕΙΛ ΓΕΝΟΥΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	84,8225	-
T2	88,8311	-
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (1)	76,7642	11,5892
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (2)	79,4444	8,5024

ΚΟΚΤΕΙΛ ΓΕΝΟΥΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i>	10,0458	2,1827

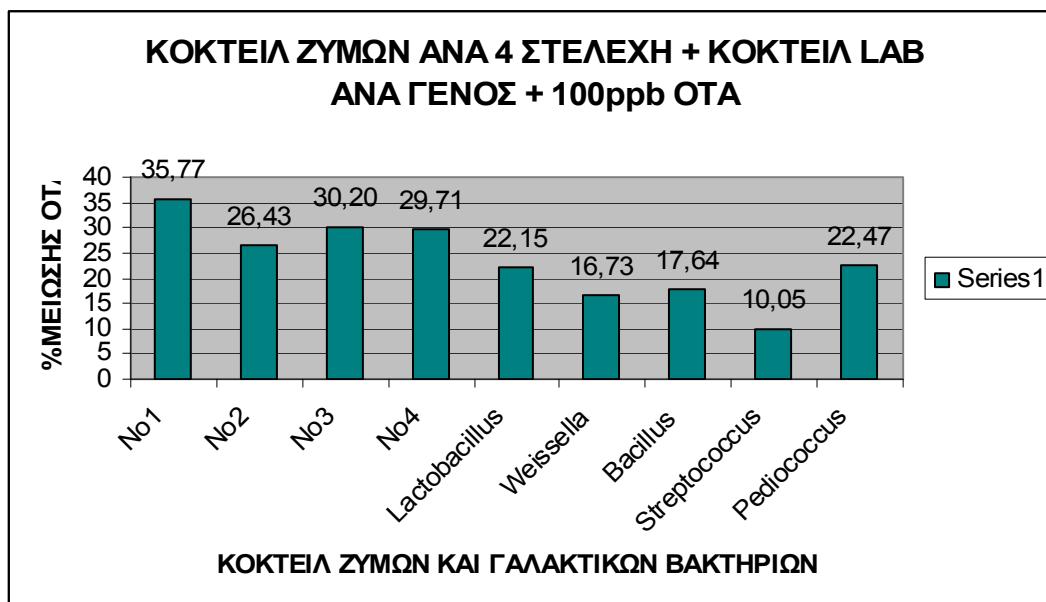
Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, MRS broth, εμφανίζει το γένος των πεδιόκοκκων και είναι περίπου 22,47%. Ακολουθούν τα γένη των γαλακτοβάκιλλων, βάκιλλων και στη συνέχεια το γένος *Weissella*, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το γένος των στρεπτόκοκκων και είναι περίπου 10,05%.

- **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και Κοκτέιλ LAB ανά γένος → 100ppb ΟΤΑ**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α, αρχικής συγκέντρωσης 100ppb, για τα κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι οι ζύμες εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια.

- **2^ο ΜΕΡΟΣ:**

- **Κοκτέιλ 16 ζυμών → 2 ημέρες επώασης στους 30 °C + 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.6.

Κοκτέιλ 16 ζυμών	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση (επώαση στους 30° C για 2ημ.)
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	4,48
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1η επαν.)	4,49

Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1	6,56

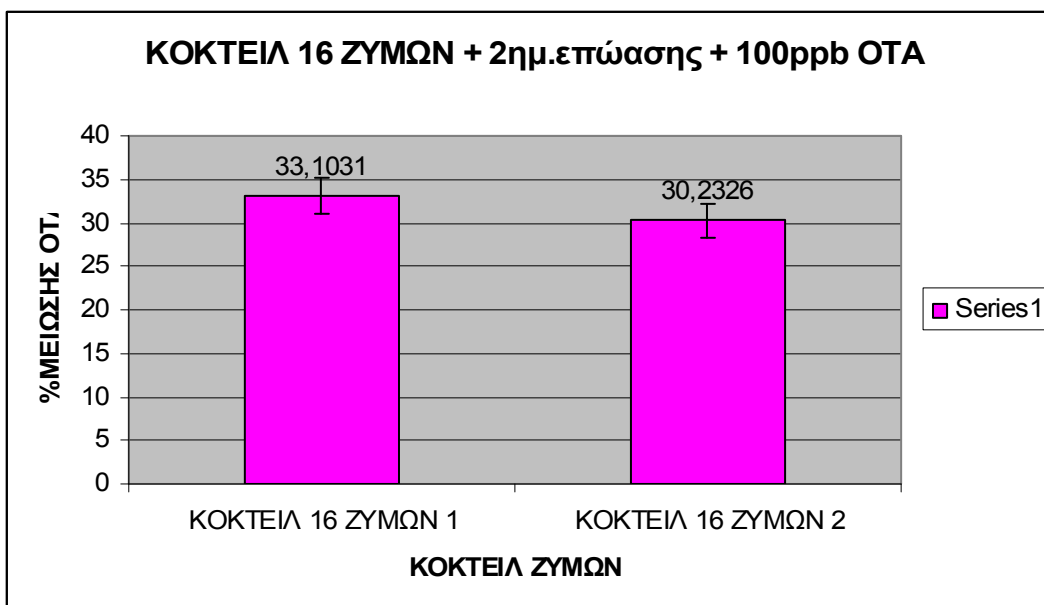
Πίνακας 7.1.6: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση (προηγήθηκε επώαση των δειγμάτων για 2 ημέρες στους 30° C) κυμαινόταν στις τιμές 4,48-4,49.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση όλων των ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 16 ΖΥΜΩΝ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	85,9881	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	57,5233	33,1031	2,0298
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	59,9916	30,2326	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, Yeast Medium, κατόπιν επώασης για 2 ημέρες στους 30° C, κυμαίνεται στις τιμές 30,23-33,1% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών → 7 ημέρες επώασης στους 30 °C + 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.7.

Κοκτέιλ 16 ζυμών	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση (επώαση στους 30° C για 7ημ.)
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	4,38
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1η επαν.)	4,45
Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 7ημ.)
T1	6,56

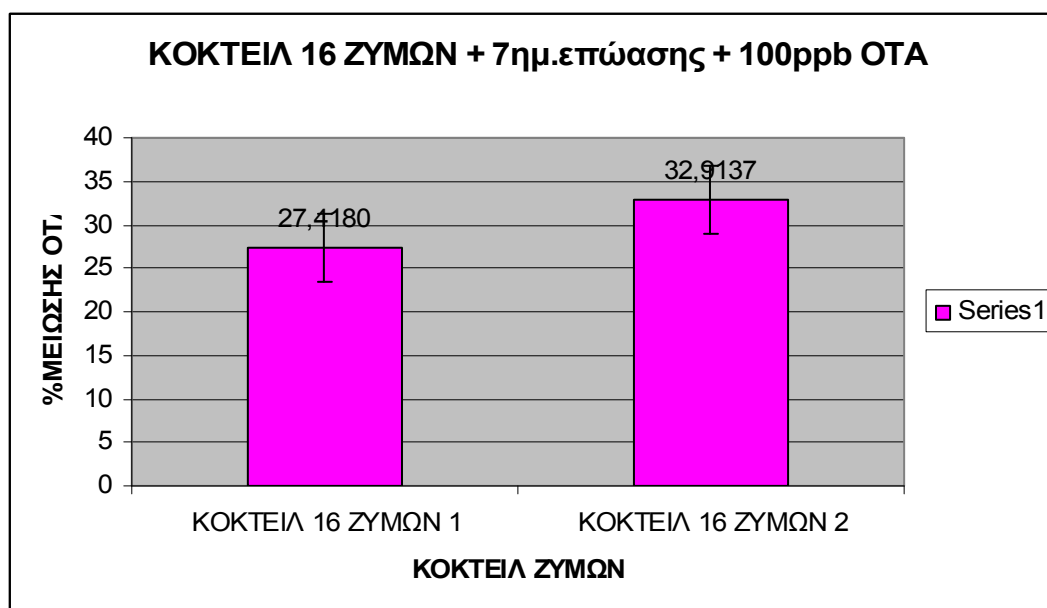
Πίνακας 7.1.7: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση (προηγήθηκε επώαση των δειγμάτων για 7 ημέρες στους 30° C) κυμαινόταν στις τιμές 4,38-4,45. Επομένως, διαπιστώνουμε ότι η μεγαλύτερη διάρκεια επώασης έχει ως αποτέλεσμα μία μικρή μείωση της τιμής του pH.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση όλων των ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium για 7 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 16 ΖΥΜΩΝ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 7ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	85,9881	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	62,4118	27,4180	3,8860
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	57,6863	32,9137	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των 100ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, Yeast Medium, κατόπιν επώασης για 7 ημέρες στους 30° C, κυμαίνεται στις τιμές 27,42-32,91% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων → 5 ημέρες επώασης στους 30 °C + 100ppb OTA**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.8.

Κοκτέιλ 29 LAB	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 29 LAB (1)	3,93
Κοκτέιλ 29 LAB (2)	3,93
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	6,19
T2	6,2

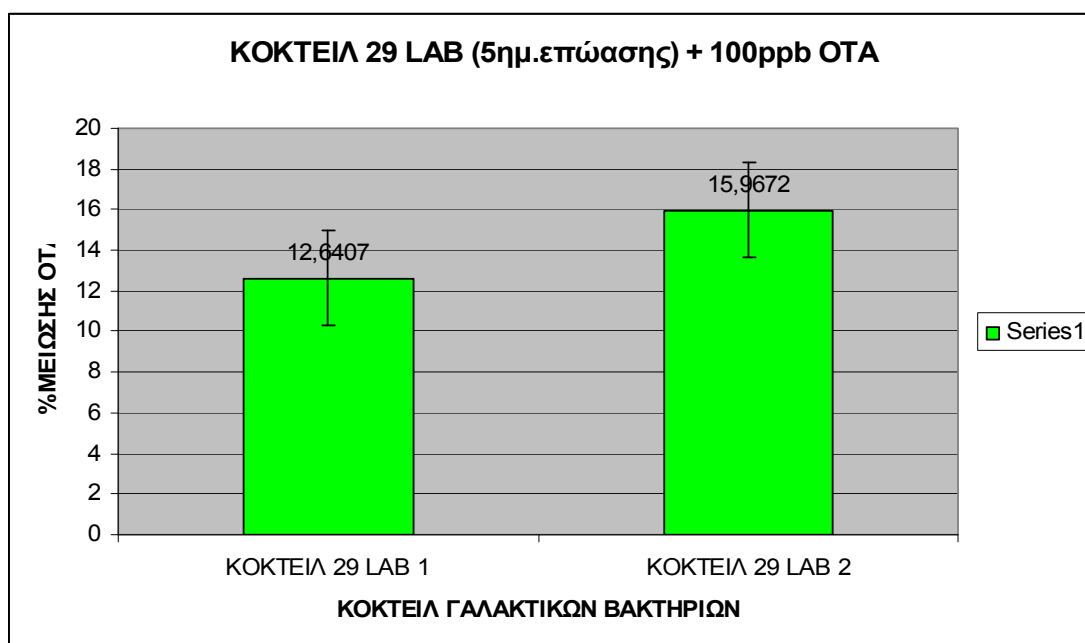
Πίνακας 7.1.8: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Ομοίως και στην περίπτωση των κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, παρατηρούμε, από τον παραπάνω πίνακα, ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση ήταν αρκετά όξινο και ίσο με την τιμή 3,93.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση όλων των γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 29 LAB + 100ppb ΟΤΑ (5ημ. επώασης)	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30°C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	84,8225	-	-
T2	88,8311	-	-
ΚΟΚΤΕΙΛ LAB 1	75,8513	12,6407	2,3522
ΚΟΚΤΕΙΛ LAB 2 (1η επαν)	72,9630	15,9672	

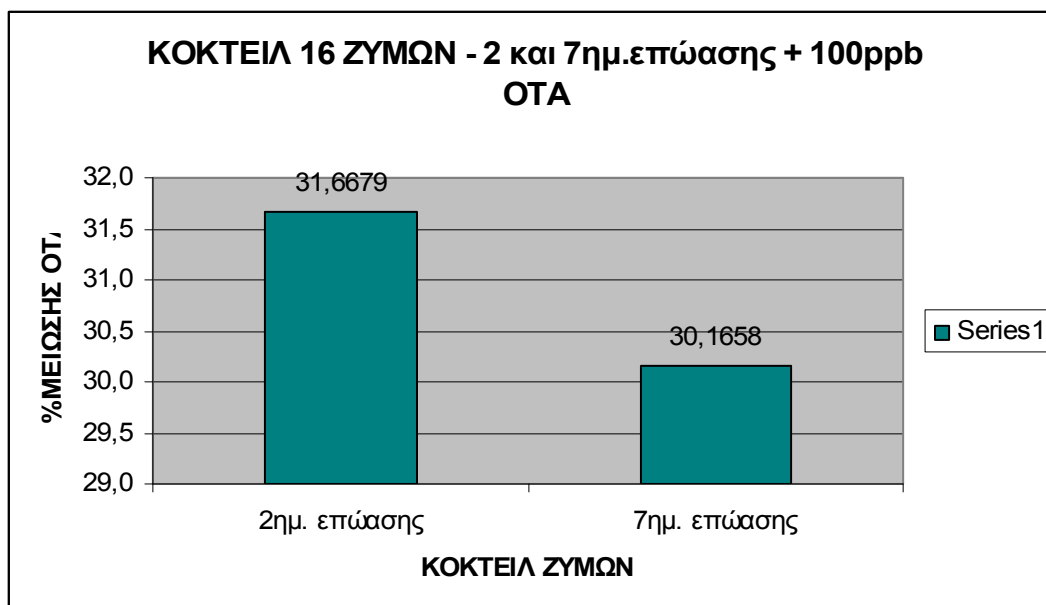
Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι η παρουσία και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί μειώνει την αρχική συγκέντρωση των 100ppb ωχρατοξίνης Α κατά ένα ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ του 12,64% και 15,97% περίπου, κατόπιν φυσικά επώασής τους για 5 ημέρες στους 30 °C.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών → 2 και 7 ημέρες επώασης στους 30 °C + 100ppb ΟΤΑ**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α, αρχικής συγκέντρωσης 100ppb, για τα κοκτέιλ 16 ζυμών στις 2 και 7 ημέρες επώασης στους 30° C, απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι οι ζύμες στις 2 ημέρες επώασης στους 30° C εμφανίζουν λίγο υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τις ζύμες των 7 ημερών επώασης στην ίδια θερμοκρασία. Επομένως, η διάρκεια επώασης για την περίπτωση των ζυμών δεν επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α.

- **3^ο ΜΕΡΟΣ:**

- **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη → pH=5 + 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.9.

Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη		pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
No 1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	4,34
	<i>Kluyveromyces dobzhankii</i>	
	<i>Pichia fermentas</i>	
	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	
No 1 επαν.		4,37
No 2	<i>Άγνωστο (δεν έχει ταυτοποιηθεί)</i>	4,09

	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
	<i>Issatchenkia terricola</i>	
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A8)	
No 2 επαν.		4,1
No 3	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (A9)	4,11
	<i>Kazachstania hellenica</i> (A10)	
	<i>Kazachstania hellenica</i> (A11)	
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	
No 3 επαν.		4,17
No 4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,34
	<i>Lachencea thermotolerans</i>	
	<i>Pichia guilliermondii</i>	
	<i>Issatchenkia orientalis</i>	
No 4 επαν.		4,35
Τυφλό (Yeast Medium)		pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1		5,02

Πίνακας 7.1.9: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

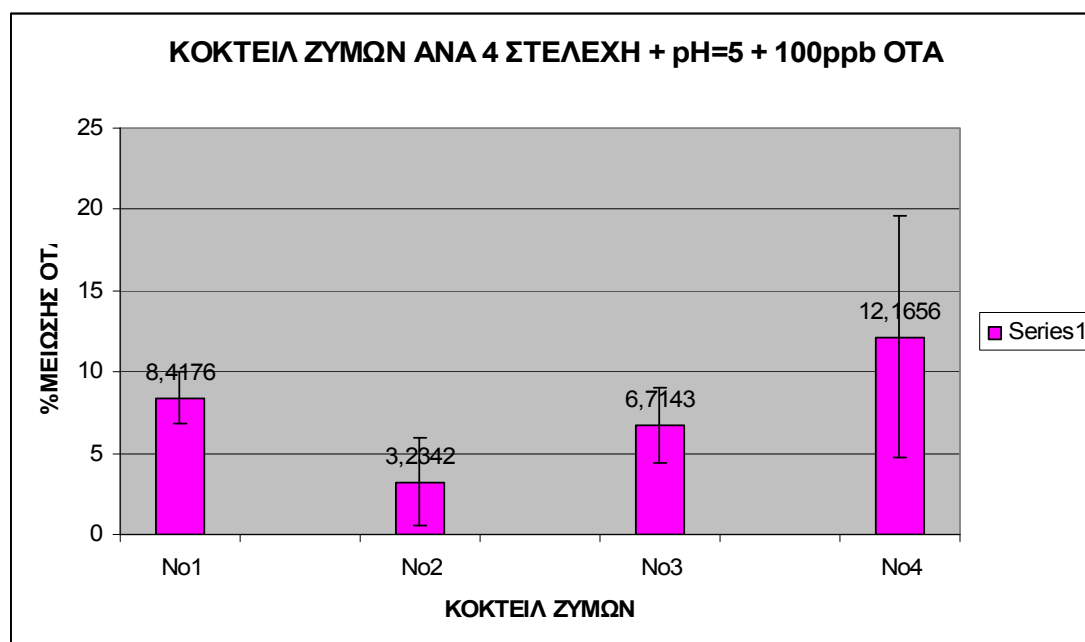
Για τα κοκτέιλ των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση είναι λιγότερο όξινο σε σχέση με αυτό του κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος καθώς και του κοκτέιλ και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί. Συγκεκριμένα, το pH κυμαινόταν στις τιμές 4,09-4,37, δεδομένου ότι προτού τα δείγματα επωαστούν είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5. Δηλαδή μετά την πάροδο των 2 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH μειώθηκε κατά λιγότερο από 1 βαθμό κατά την ανάπτυξη των ζυμών.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium με pH=5 για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	88,36891	-
No1	79,95210	9,524619
No1 επαν.	81,90870	7,310495
No2	83,84273	5,121907
No2 επαν.	87,17902	1,346502
No3	81,00647	8,331479
No3 επαν.	83,86466	5,097094
No4	82,29053	6,878405
No4 επαν.	72,94599	17,452874

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
No1	8,4176	1,5656
No2	3,2342	2,6696
No3	6,7143	2,2871
No4	12,1656	7,4773

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium, με pH=5, εμφανίζει το 4^ο κοκτέιλ ζυμών (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia*

guilliermondii, *Issatchenkia orientalis*) και είναι περίπου 12,17%. Ακολουθεί το 1^ο κοκτέιλ ζυμών (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas*, *Issatchenkia occidentalis*) με ποσοστό μείωσης 8,42% περίπου, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το 2^ο κοκτέιλ ζυμών (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*, *Zygosaccharomyces baillii* (A8)) και είναι περίπου 3,23%.

➤ **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη → 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.10.

Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
No 1	4,49
No 1 επαν.	4,43
No 2	4,16
No 2 επαν.	4,09
No 3	4,23
No 3 επαν.	4,44
No 4	4,49
No 4 επαν.	4,52
Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1	6,2
T2	6,19

Πίνακας 7.1.10: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

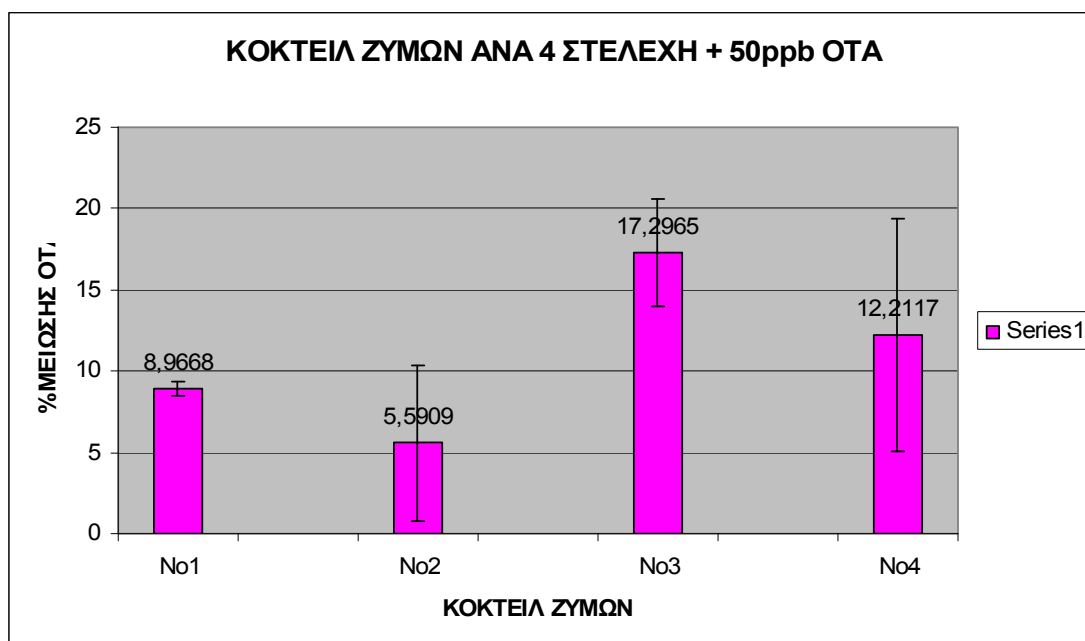
Για τα κοκτέιλ των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση κυμαίνονταν στις τιμές 4,09-4,52.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	33,8824	-
T2	41,3393	-
No1	34,3556	8,6550
No1 επαν.	34,1211	9,2787
No2	34,2292	8,9913
No2 επαν.	36,7870	2,1905
No3	31,9799	14,9717
No3 επαν.	30,2312	19,6212
No4	31,1113	17,2811
No4 επαν.	34,9246	7,1424

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
No1	8,9668	0,4410
No2	5,5909	4,8089
No3	17,2965	3,2877
No4	12,2117	7,1691

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium, εμφανίζει το 3^ο κοκτέιλ ζυμών και είναι περίπου 17,3%, ακολουθεί το 4^ο κοκτέιλ με ποσοστό περίπου 12,21%, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το 2^ο κοκτέιλ και είναι περίπου 5,59%.

➤ **Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος → pH=5 + 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.11.

Κοκτέιλ LAB ανά γένος	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (1)	3,72
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (2)	3,65
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (1)	3,63
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (2)	3,64
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (1)	3,71
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (2)	3,72

Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (1)	3,78
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (2)	3,8
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (1)	3,7
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (2)	3,71
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	5,15
T2	5,17

Πίνακας 7.1.11: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

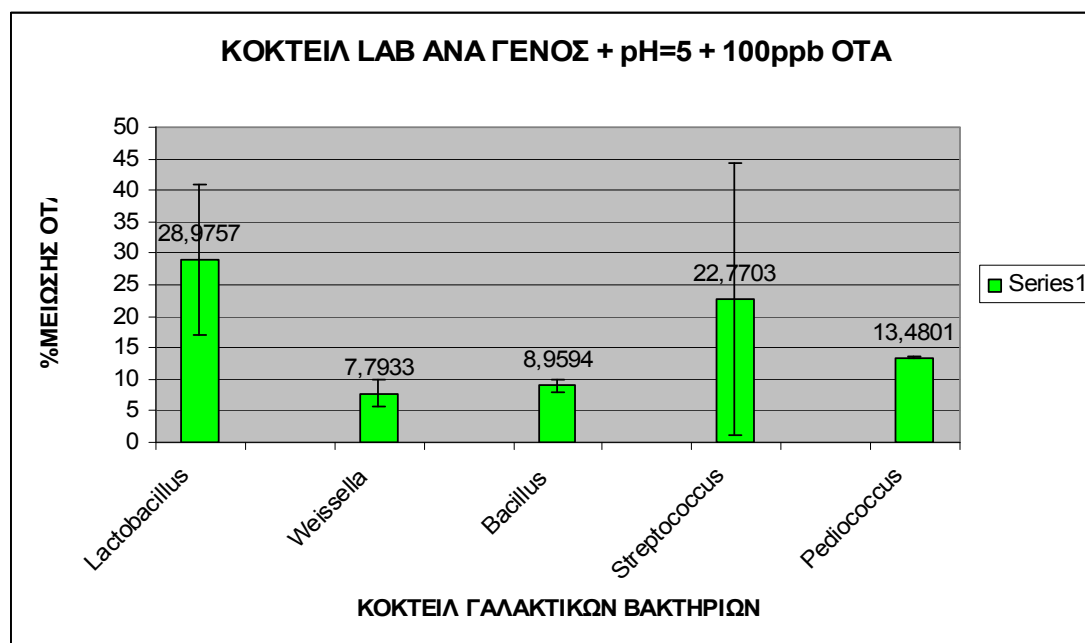
Για τα κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση κυμαινόταν στις τιμές 3,63-3,8.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth με pH=5 για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ΑΝΑ ΓΕΝΟΣ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	87,3568	-
T2	82,8630	-
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (1)	53,2579	37,4245
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (2)	67,6395	20,5269
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (1)	77,2102	9,2817
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (2)	79,7438	6,3049
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (1)	76,9453	9,5930
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (2)	78,0238	8,3258
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (1)	52,7470	38,0248
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (2)	78,7132	7,5158
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (1)	73,6213	13,4985
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (2)	73,6527	13,4617

ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ANA ΓΕΝΟΣ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i>	28,9757	11,9484
Κοκτέιλ <i>Weissella</i>	7,7933	2,1049
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i>	8,9594	0,8960
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i>	22,7703	21,5732
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i>	13,4801	0,0260

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, MRS broth, με pH=5, εμφανίζει το γένος των γαλακτοβάκιλλων και είναι περίπου 28,98%. Ακολουθούν τα γένη των στρεπτόκοκκων, πεδίοκοκκων και βάκιλλων, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το γένος *Weissella* και είναι περίπου 7,79%.

➤ **Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος → 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.12.

Κοκτέιλ LAB ανά γένος	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ Bacillus (1)	3,85
Κοκτέιλ Bacillus (2)	3,89
Κοκτέιλ Pediococcus (1)	3,86
Κοκτέιλ Pediococcus (2)	3,88
Κοκτέιλ Weissella (1)	4,01
Κοκτέιλ Weissella (2)	4,06
Κοκτέιλ Lactobacillus (1)	3,95
Κοκτέιλ Lactobacillus (2)	3,95
Κοκτέιλ Streptococcus (1)	3,89
Κοκτέιλ Streptococcus (2)	3,89
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	5,99
T2	6

Πίνακας 7.1.12: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

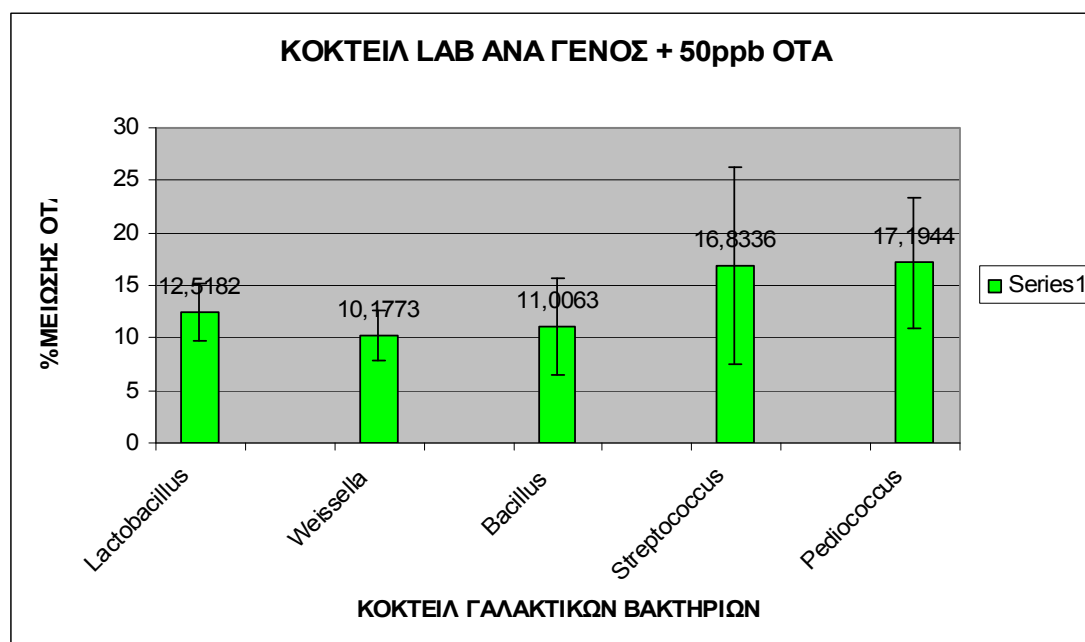
Για τα κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση κυμαινόταν στις τιμές 3,85-4,06.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ANA ΓΕΝΟΣ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	38,3073	-
T2	39,9921	-
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (1)	35,0024	10,5934
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (2)	33,4953	14,4430
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (1)	34,5090	11,8536
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (2)	35,8216	8,5009
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (1)	36,1174	7,7453
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (2)	33,5641	14,2673
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (1)	35,1517	10,2121
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (2)	29,9671	23,4550
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (1)	34,1457	12,7817
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (2)	30,6906	21,6071

ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ANA ΓΕΝΟΣ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i>	12,5182	2,7220
Κοκτέιλ <i>Weissella</i>	10,1773	2,3708
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i>	11,0063	4,6118
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i>	16,8336	9,3641
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i>	17,1944	6,2405

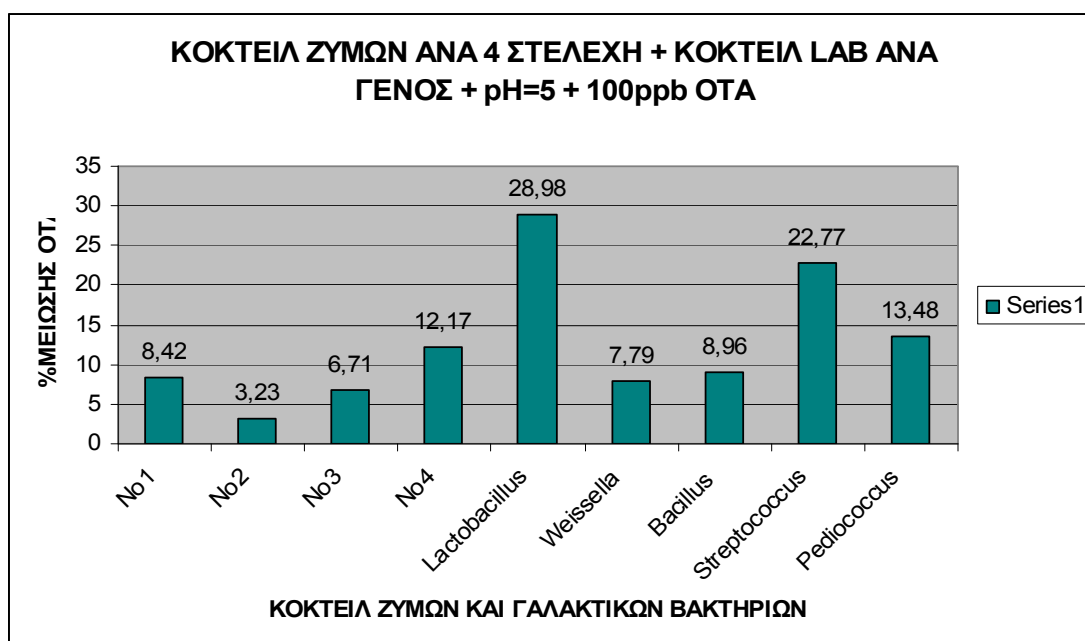
Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, MRS broth, εμφανίζει το γένος των πεδιόκοκκων και είναι περίπου 17,19%. Ακολουθούν τα γένη των στρεπτόκοκκων, γαλακτοβάκκιλων και βάκιλλων, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το γένος *Weissella* και είναι περίπου 10,18%.

➤ **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και Κοκτέιλ LAB ανά γένος → pH=5 + 100ppb ΟΤΑ**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α, αρχικής συγκέντρωσης 100ppb, για τα κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα με pH=5, απεικονίζονται ως εξής:

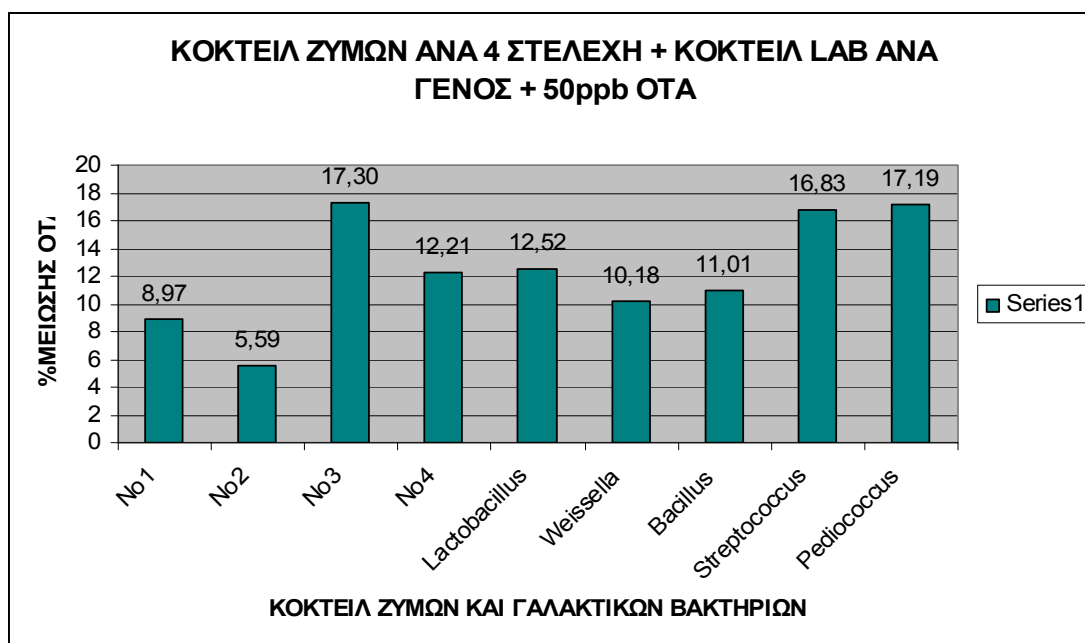


Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι τα γένη *Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Pediococcus* εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τα υπόλοιπα γένη

γαλακτικών βακτηρίων και σε σχέση με τις ζύμες, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

➤ **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και Κοκτέιλ LAB ανά γένος → 50ppb OTA**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A, αρχικής συγκέντρωσης 50ppb, για τα κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα, απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι το 3^ο κοκτέιλ ζυμών (*Zygosaccharomyces baillii* A9, *Kazachstania hellenica* A10, *Kazachstania hellenica* A11 και *Hanseniaspora oruntiae*) εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης A σε σχέση με τα υπόλοιπα κοκτέιλ ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων και ακολουθούν τα γένη *Streptococcus* και *Pediococcus* των γαλακτικών βακτηρίων, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

- **4^ο ΜΕΡΟΣ:**

- **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη → pH=5 + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.13.

Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντρωση
No 1	4,23
No 1 επαν.	4,06
No 2	4,07
No 2 επαν.	4,08
No 3	4,03
No 3 επαν.	3,91
No 4	4,21
No 4 επαν.	4,11
Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1	5,04
T2	5,04

Πίνακας 7.1.13: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση κυμαινόταν στις τιμές 3,91-4,23, δεδομένου ότι προτού τα δείγματα επωαστούν είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5. Δηλαδή μετά την πάροδο των 2 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH μειώθηκε κατά 1 βαθμό περίπου κατά την ανάπτυξη των ζυμών.

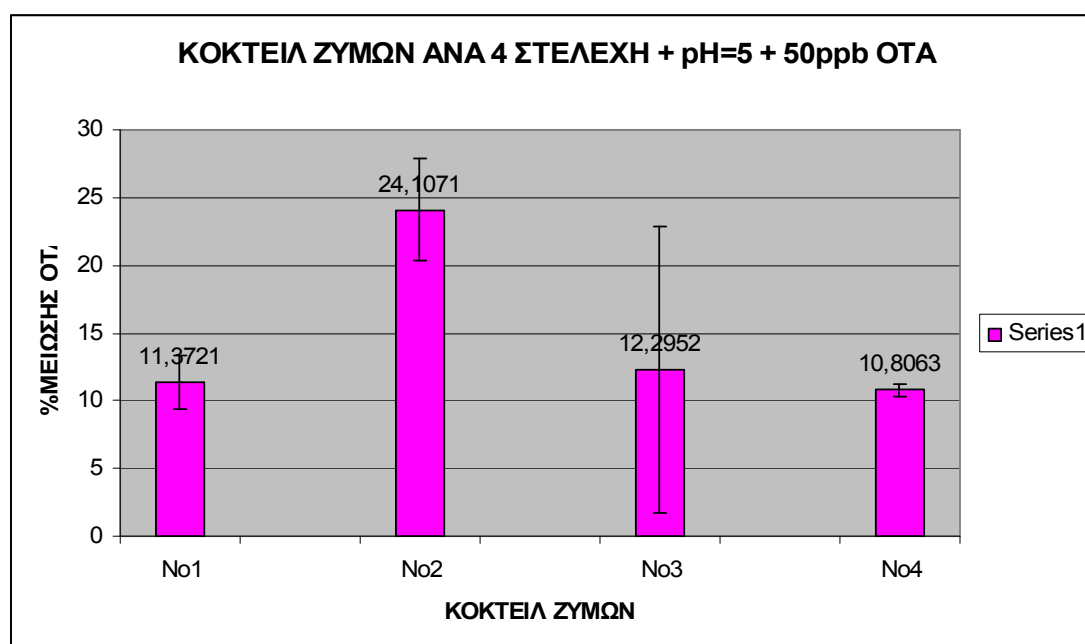
Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των ζυμών ανά τέσσερα στελέχη στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε

θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium με pH=5 για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	50,0826	-
T2	48,4201	-
No1	44,3402	9,9716
No1 επαν.	42,9607	12,7725
No2	38,6858	21,4524
No2 επαν.	36,0708	26,7618
No3	39,5190	19,7606
No3 επαν.	46,8727	4,8298
No4	43,7667	11,1361
No4 επαν.	44,0915	10,4766

ΚΟΚΤΕΙΛ ΖΥΜΩΝ ΑΝΑ 4 ΣΤΕΛΕΧΗ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
No1	11,3721	1,9805
No2	24,1071	3,7543
No3	12,2952	10,5577
No4	10,8063	0,4663

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των 50ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, Yeast Medium, με pH=5, εμφανίζει το 2^ο κοκτέιλ ζυμών και είναι περίπου 24,11%. Ακολουθούν το 3^ο και 1^ο κοκτέιλ, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το 4^ο κοκτέιλ και είναι περίπου 10,81%.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών → pH=6,5 + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.14.

Κοκτέιλ 16 ζυμών	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	4,23
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1η επαν.)	4,21
Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1	6,19
T2	6,21

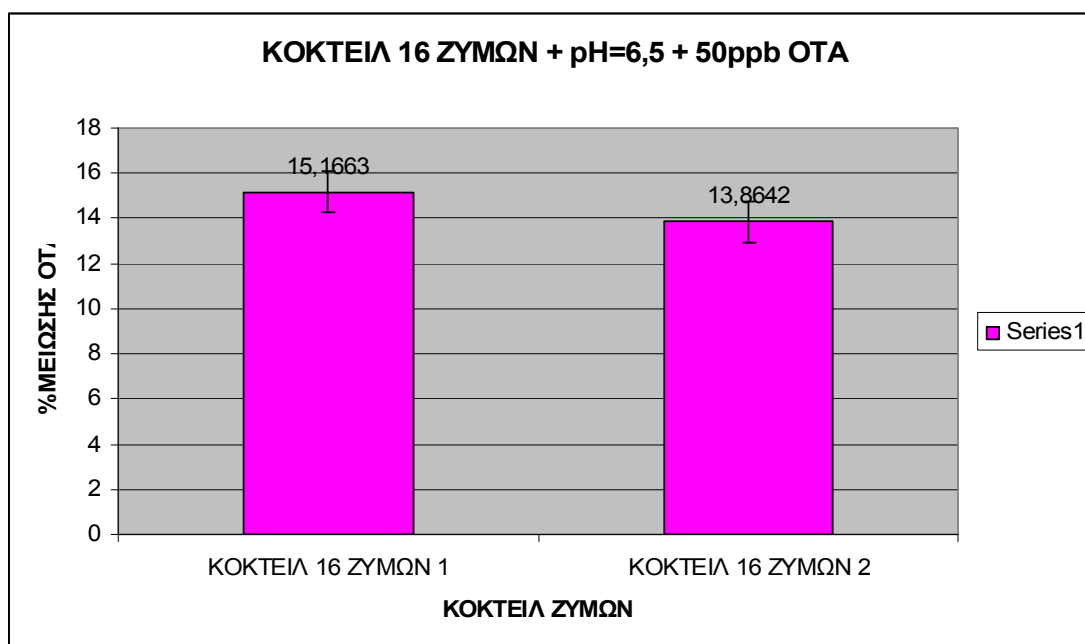
Πίνακας 7.1.14: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση κυμαινόταν στις τιμές 4,21-4,23. Δηλαδή μετά την πάροδο των 2 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH του Yeast Medium μειώθηκε κατά 2,3 βαθμούς περίπου κατά την ανάπτυξη των ζυμών σε σχέση με την κανονική τιμή pH του Yeast Medium (6,5).

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium (pH=6,5) για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 16 ΖΥΜΩΝ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	45,1563	-	-
T2	46,7512	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	38,9843	15,1663	0,9207
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	39,5827	13,8642	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, Yeast Medium (pH=6,5), κυμαίνεται στις τιμές 13,86-15,17% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών → pH=5 + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.15.

Κοκτέιλ 16 ζυμών	ρΗ υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντρωση
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	3,95
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1η επαν.)	3,92
Τυφλά (Yeast Medium)	ρΗ (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1	5,04
T2	5,04

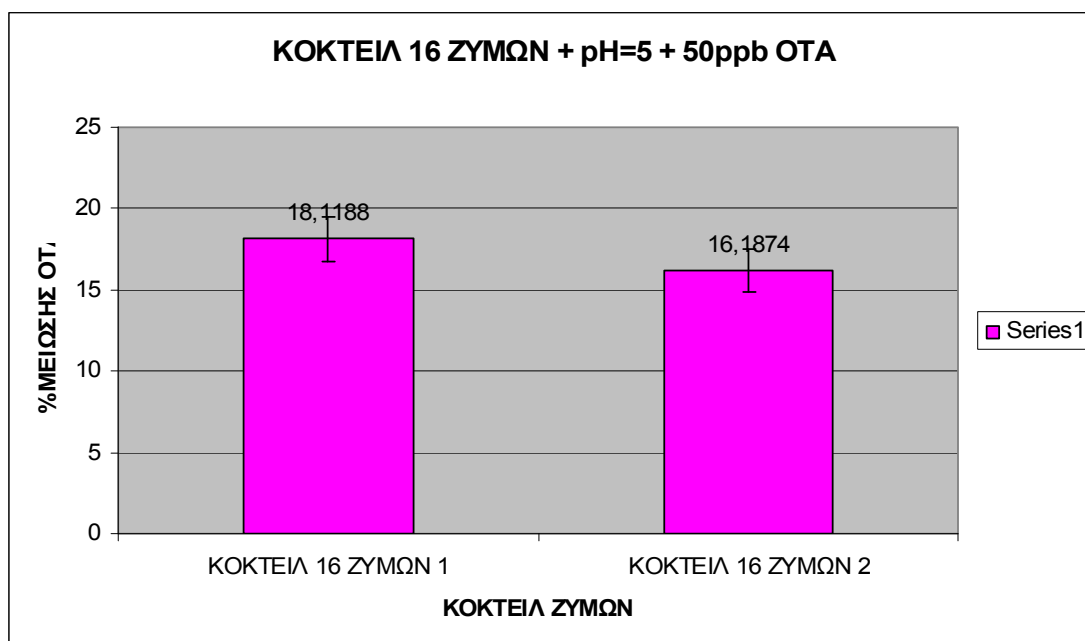
Πίνακας 7.1.15: ρΗ των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το ρΗ μετά την 1^η φυγοκέντρωση κυμαινόταν στις τιμές 3,92-3,95, δεδομένου ότι προτού τα δείγματα επωαστούν είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5. Δηλαδή μετά την πάροδο των 2 ημερών στους 30 °C, η τιμή του ρΗ μειώθηκε κατά 1,1 βαθμό περίπου κατά την ανάπτυξη των ζυμών.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium με ρΗ=5 για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 16 ΖΥΜΩΝ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	50,0356	-	-
T2	48,6193	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	40,3899	18,1188	1,3657
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	41,3426	16,1874	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, Yeast Medium, με pH=5, κυμαίνεται στις τιμές 16,19-18,12% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών → pH=5 + 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.16.

Κοκτέιλ 16 ζυμών	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	3,97
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1η επαν.)	3,9
Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1	5,06
T2	5,06

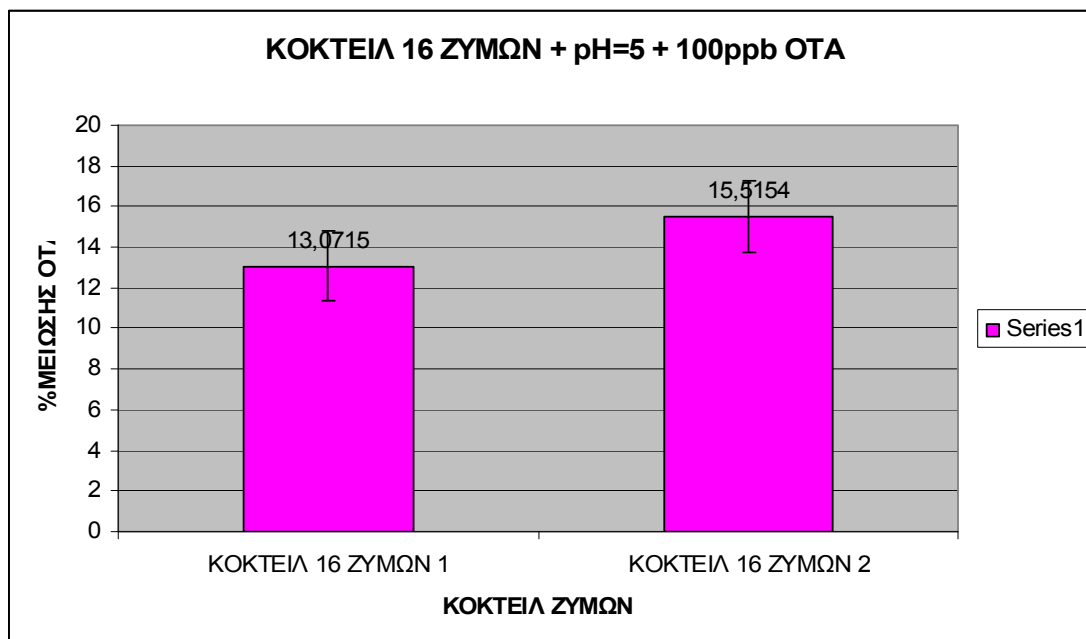
Πίνακας 7.1.16: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση κυμαινόταν στις τιμές 3,9-3,97, δεδομένου ότι προτού τα δείγματα επωαστούν είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5. Δηλαδή μετά την πάροδο των 2 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH μειώθηκε κατά 1 βαθμό περίπου κατά την ανάπτυξη των ζυμών.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium με pH=5 για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 16 ΖΥΜΩΝ	OTA ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	93,2810	-	-
T2	87,1757	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	78,4342	13,0715	1,7281
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	76,2291	15,5154	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, Yeast Medium, με pH=5, κυμαίνεται στις τιμές 13,07-15,52% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος → pH=5 + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.17.

Κοκτέιλ LAB ανά γένος	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ Bacillus (1)	3,73
Κοκτέιλ Bacillus (2)	3,69
Κοκτέιλ Pediococcus (1)	3,73
Κοκτέιλ Pediococcus (2)	3,66
Κοκτέιλ Weissella (1)	3,69
Κοκτέιλ Weissella (2)	3,64
Κοκτέιλ Lactobacillus (1)	3,6
Κοκτέιλ Lactobacillus (2)	3,64
Κοκτέιλ Streptococcus (1)	3,6
Κοκτέιλ Streptococcus (2)	3,72

Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	4,89
T2	4,9

Πίνακας 7.1.17: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

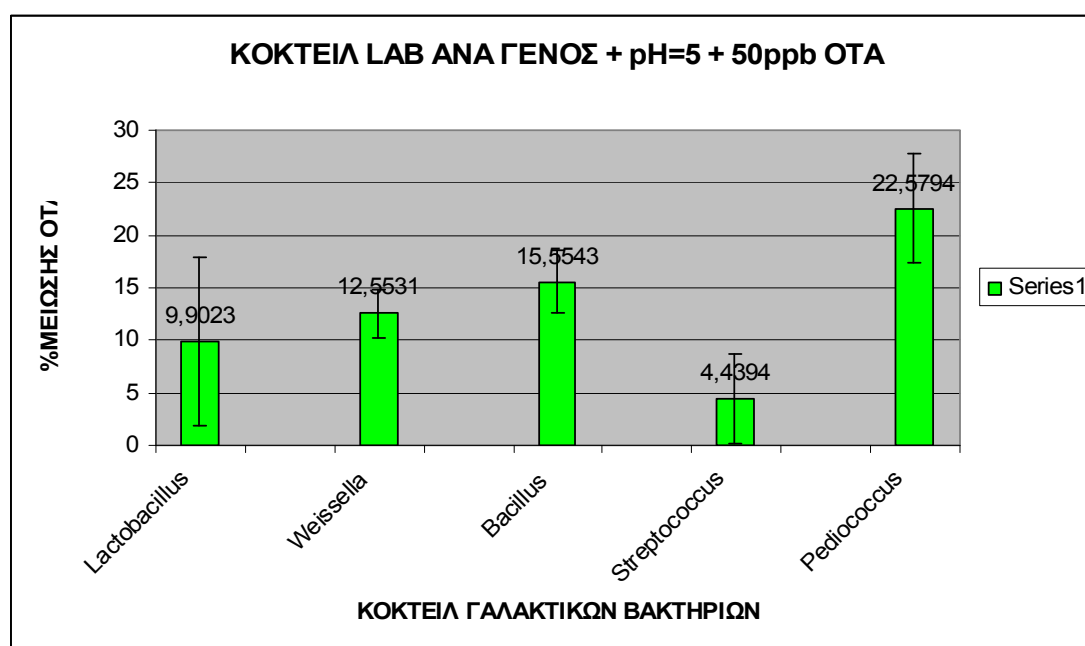
Για τα κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση κυμαινόταν στις τιμές 3,6-3,73, δεδομένου ότι προτού τα δείγματα επωαστούν είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5. Δηλαδή μετά την πάροδο των 5 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH μειώθηκε κατά 1,5 βαθμό περίπου κατά την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth με pH=5 για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ΑΝΑ ΓΕΝΟΣ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ
T1	39,5830	-
T2	41,1787	-
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (1)	34,0953	15,5656
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i> (2)	38,6691	4,2390
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (1)	34,6416	14,2128
Κοκτέιλ <i>Weissella</i> (2)	35,9819	10,8935
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (1)	34,9555	13,4355
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i> (2)	33,2443	17,6730
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (1)	39,8194	1,3902
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i> (2)	37,3569	7,4886
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (1)	32,7570	18,8798
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i> (2)	29,7692	26,2789

ΚΟΚΤΕΙΛ LAB ANA ΓΕΝΟΣ	AVERAGE % ΜΕΙΩΣΗΣ	RSDr
Κοκτέιλ <i>Lactobacillus</i>	9,9023	8,0091
Κοκτέιλ <i>Weissella</i>	12,5531	2,3471
Κοκτέιλ <i>Bacillus</i>	15,5543	2,9963
Κοκτέιλ <i>Streptococcus</i>	4,4394	4,3122
Κοκτέιλ <i>Pediococcus</i>	22,5794	5,2320

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, MRS broth, με pH=5, εμφανίζει το γένος των πεδιόκοκκων και είναι περίπου 22,58%. Ακολουθεί το γένος των βάκιλλων, το γένος *Weissella* και οι γαλακτοβάκκιλοι, ενώ το μικρότερο ποσοστό μείωσης εμφανίζει το γένος των στρεπτόκοκκων και είναι περίπου 4,44%.

➤ **Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων → pH=6,1 + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.18.

Κοκτέιλ 29 LAB	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 29 LAB 1	3,85
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	3,87
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	6,06
T2	6,06

Πίνακας 7.1.18: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

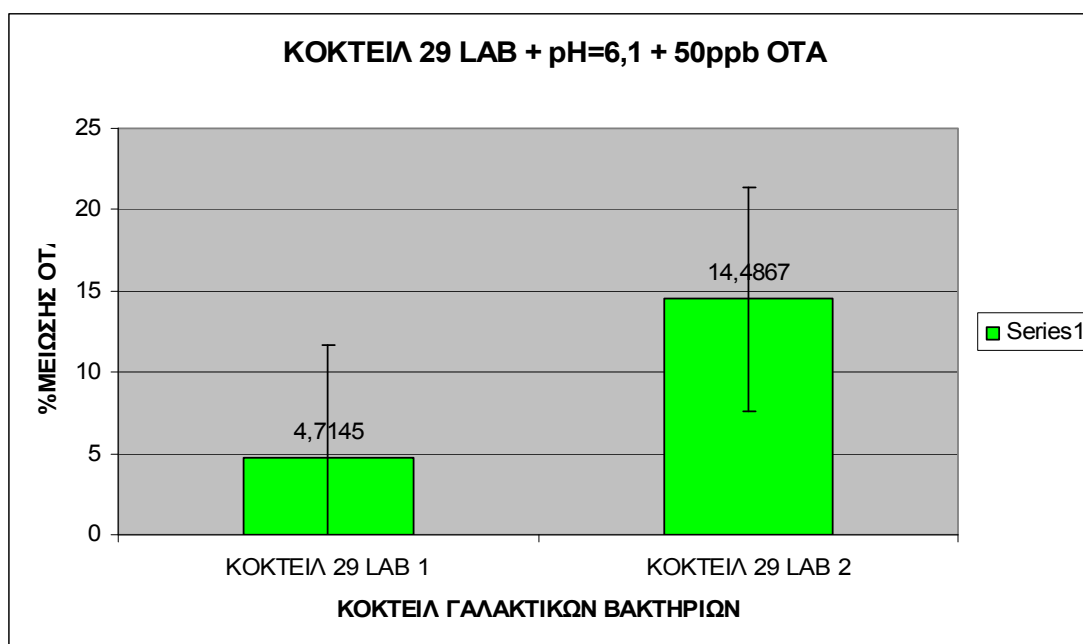
Για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση κυμαινόταν στις τιμές 3,85-3,87. Δηλαδή μετά την πάροδο των 5 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH του MRS broth μειώθηκε κατά 2,3 βαθμούς περίπου κατά την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με την κανονική τιμή pH του MRS broth (6,1).

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth (pH=6,1) για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 29 LAB	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	45,6222	-	-

T2	46,0734	-	-
Κοκτέιλ 29 LAB 1	43,6863	4,7145	6,9100
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	39,2060	14,4867	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, MRS broth (pH=6,1), κυμαίνεται στις τιμές 4,71-14,49% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων → pH=5 + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.19.

Κοκτέιλ 29 LAB	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 29 LAB 1	3,67
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	3,67

Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	4,89
T2	4,90

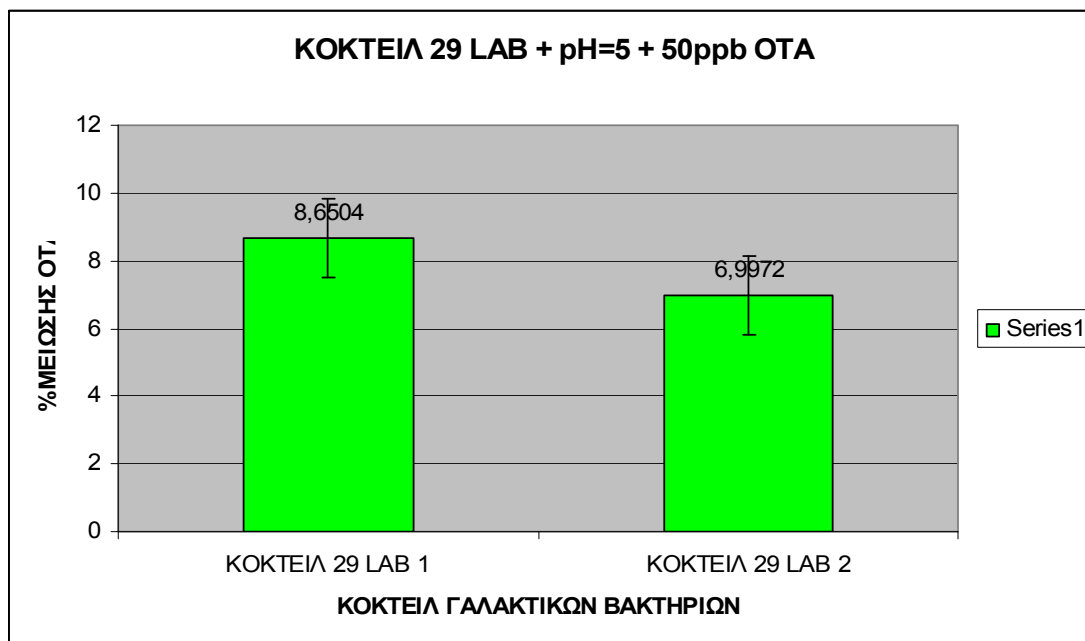
Πίνακας 7.1.19: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση ήταν ίσο με 3,67, δεδομένου ότι προτού τα δείγματα επωαστούν είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5. Δηλαδή μετά την πάροδο των 5 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH μειώθηκε κατά 1,3 βαθμούς περίπου κατά την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth με pH=5 για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 29 LAB	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	39,5830	-	-
T2	41,1787	-	-
Κοκτέιλ 29 LAB 1	36,8877	8,6504	1,1690
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	37,5553	6,9972	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, MRS broth, με pH=5, κυμαίνεται στις τιμές 7-8,65% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων → pH=5 + 100ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.20.

Κοκτέιλ 29 LAB	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντρωση
Κοκτέιλ 29 LAB 1	3,64
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	3,68
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	4,88
T2	4,87

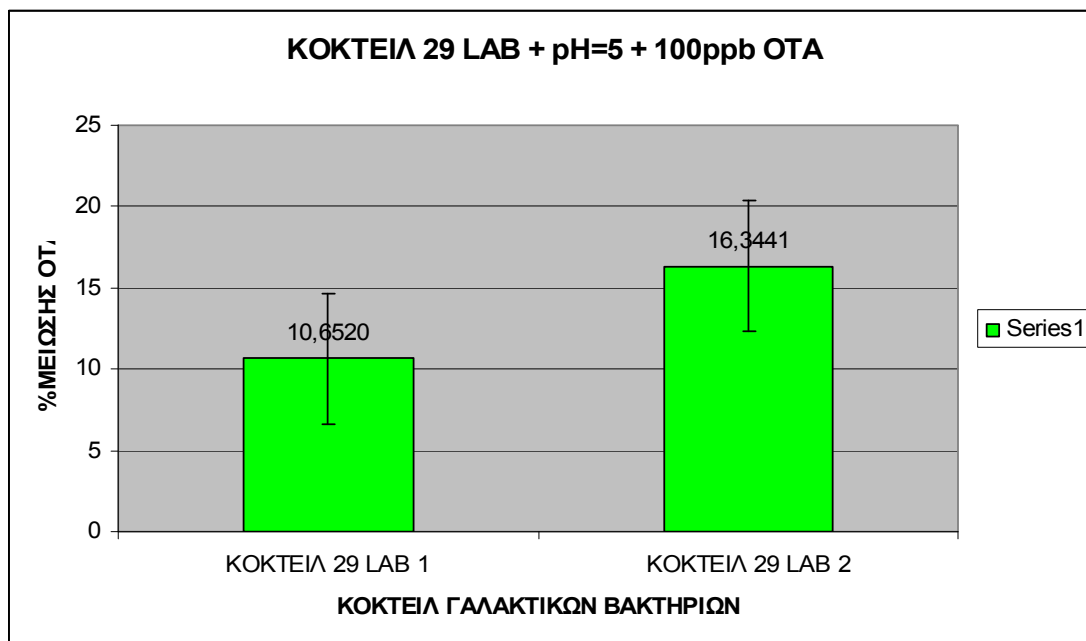
Πίνακας 7.1.20: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση κυμαινόταν στις τιμές 3,64-3,68, δεδομένου ότι προτού τα δείγματα επωαστούν είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5. Δηλαδή μετά την πάροδο των 5 ημερών στους 30 °C, η τιμή του pH μειώθηκε κατά 1,4 βαθμούς περίπου κατά την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 100ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth με pH=5 για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 29 LAB	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	94,4144	-	-
T2	82,2413	-	-
Κοκτέιλ 29 LAB 1	78,9192	10,6520	4,0249
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	73,8915	16,3441	

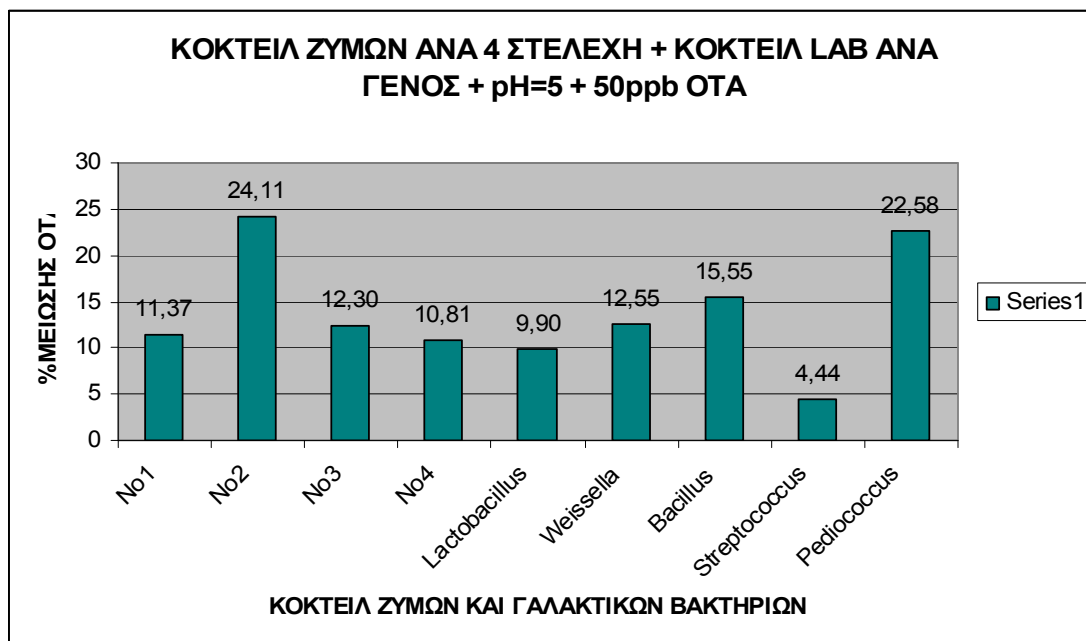
Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 100ppb για τα κοκτέιλ και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, MRS broth, με pH=5, κυμαίνεται στις τιμές 10,65-16,34% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και Κοκτέιλ LAB ανά γένος → pH=5 + 50ppb ΟΤΑ**

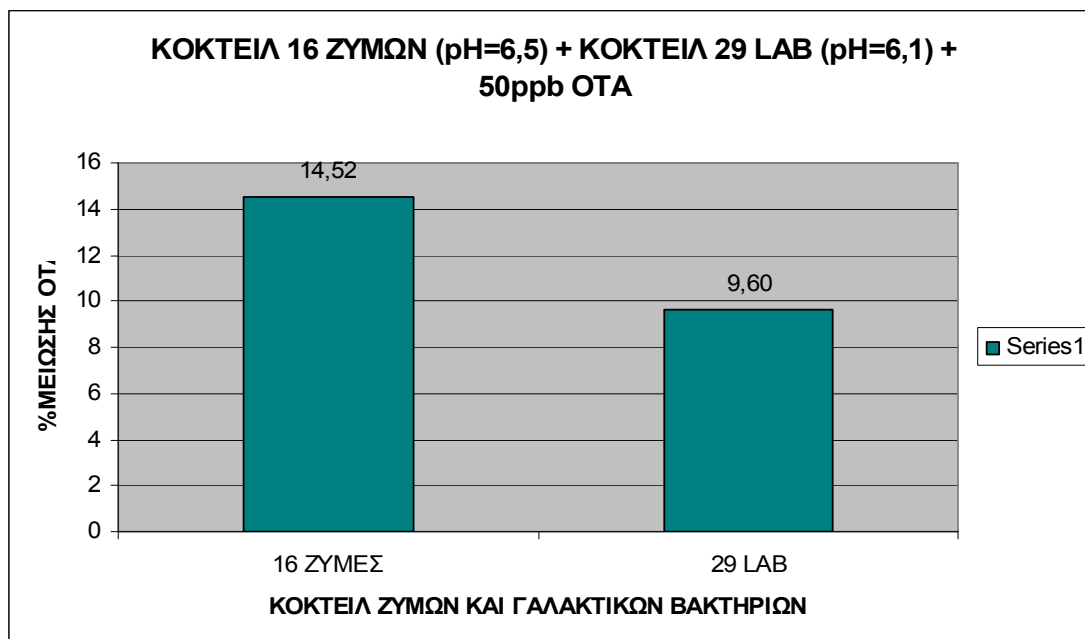
Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α, αρχικής συγκέντρωσης 50ppb, για τα κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη και γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα με pH=5, απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι το 2^ο κοκτέιλ ζυμών (Αγνώστου ταυτότητας είδος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*, *Zygosaccharomyces bailii* A8), καθώς και το γένος *Pediococcus* των γαλακτικών βακτηρίων εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τα υπόλοιπα γένη γαλακτικών βακτηρίων και τα υπόλοιπα κοκτέιλ ζυμών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών (pH=6,5) και Κοκτέιλ 29 LAB (pH=6,1) → 50ppb ΟΤΑ**

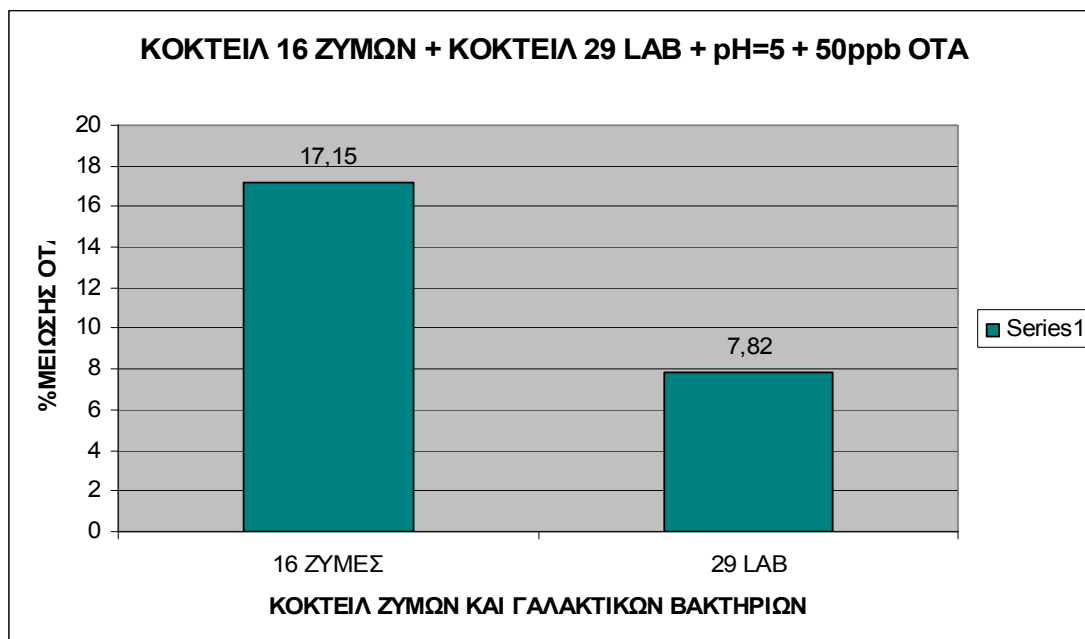
Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α, αρχικής συγκέντρωσης 50ppb, για τα κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα, απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι οι ζύμες εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών και Κοκτέιλ 29 LAB → pH=5 + 50ppb ΟΤΑ**

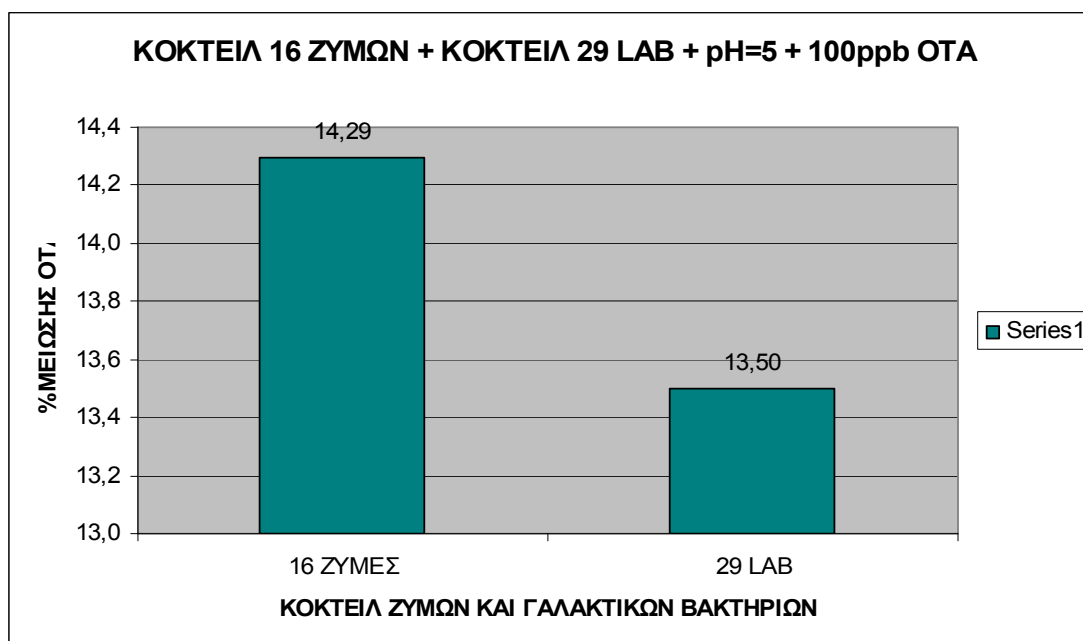
Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α, αρχικής συγκέντρωσης 50ppb, για τα κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα με pH=5, απεικονίζονται ως εξής:



Ομοίως και στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε ότι οι ζύμες εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών και Κοκτέιλ 29 LAB → pH=5 + 100ppb ΟΤΑ**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α, αρχικής συγκέντρωσης 100ppb, για τα κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα με pH=5, απεικονίζονται ως εξής:



Στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε ότι οι ζύμες εμφανίζουν λίγο υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

- **5^ο ΜΕΡΟΣ:**

- **Κοκτέιλ 16 ζυμών → Μετά από επώαση για 2 ημέρες στους 30° C: 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση και αφού προηγήθηκε εμβολιασμός με 50ppb ΟΤΑ αμέσως μετά την επώαση, παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.21.

Κοκτέιλ 16 ζυμών	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	4,29
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1η επαν.)	4,31

Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.: 50ppb OTA)
T1	6,39
T2	6,42

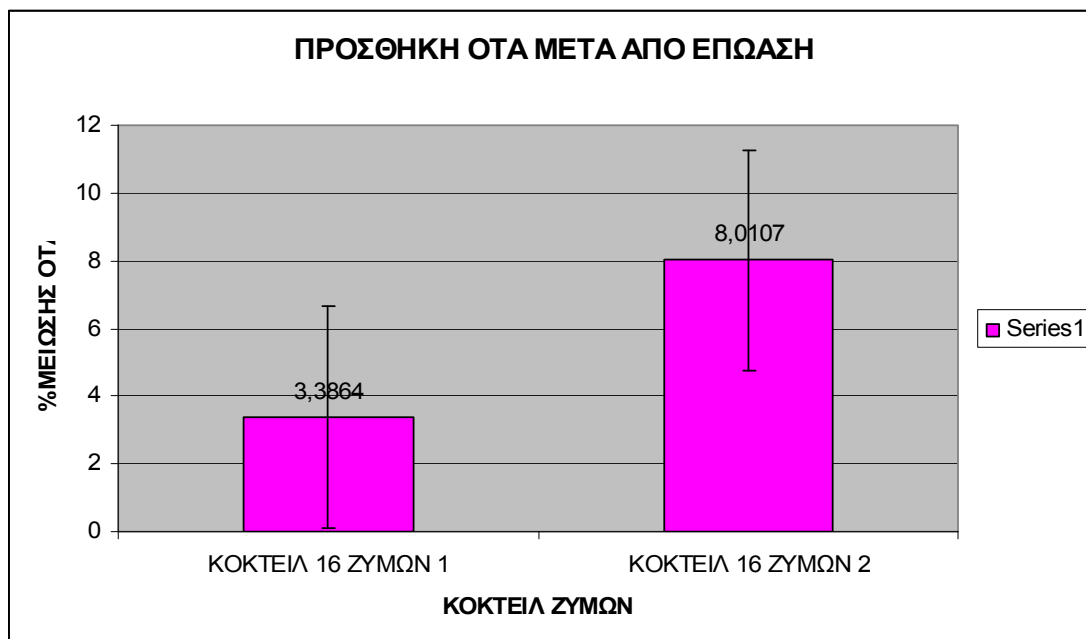
Πίνακας 7.1.21: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση και αφού προηγήθηκε εμβολιασμός με 50ppb OTA αμέσως μετά την επώαση για 2 ημέρες στους 30 °C, κυμαινόταν στις τιμές 4,29-4,31.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 16 ζυμών μαζί στην συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, η οποία επιτεύχθηκε κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Medium για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 16 ΖΥΜΩΝ	OTA ppb ΤΕΛΙΚΗ στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ OTA	RSDr
T1	47,9419	-	-
T2	51,4909	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	48,0328	3,3864	3,2699
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	45,7337	8,0107	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί, όπου επιτεύχθηκε κατόπιν επώασης στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, Yeast Medium, κυμαίνεται στις τιμές 3,39-8,01% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων → Μετά από επώαση για 5 ημέρες στους 30° C: 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση και αφού προηγήθηκε εμβολιασμός με 50ppb ΟΤΑ αμέσως μετά την επώαση, παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.22.

Κοκτέιλ 29 LAB	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 29 LAB 1	3,83
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	3,88
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.: 50ppb ΟΤΑ)
T1	6,22

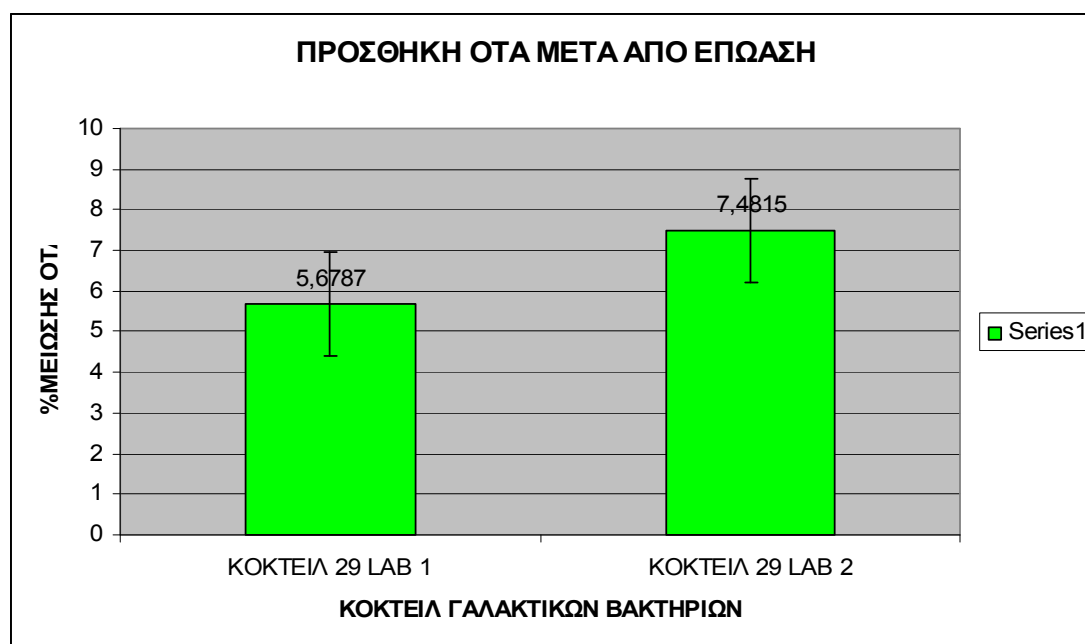
Πίνακας 7.1.22: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση και αφού προηγήθηκε εμβολιασμός με 50ppb ΟΤΑ αμέσως μετά την επώαση για 5 ημέρες στους 30 °C, κυμαινόταν στις τιμές 3,83-3,88.

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης Α καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, η οποία επιτεύχθηκε κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS broth για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 29 LAB	ΟΤΑ ppb ΤΕΛΙΚΗ στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	49,6101	-	-
Κοκτέιλ 29 LAB 1	46,7929	5,6787	1,2747
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	45,8985	7,4815	

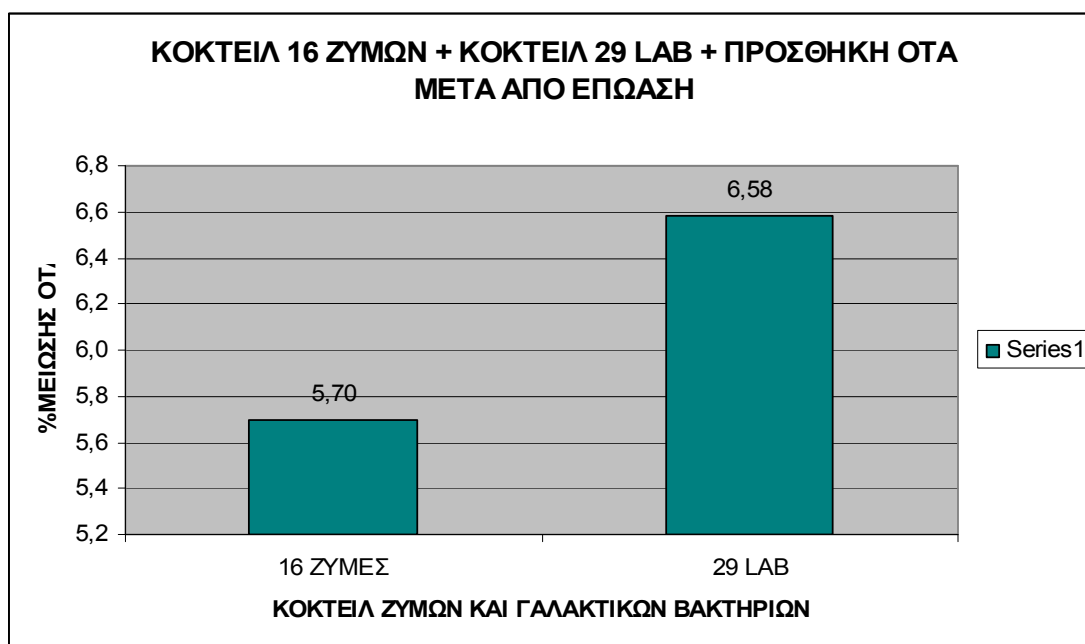
Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί, όπου επιτεύχθηκε κατόπιν επώασης στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξής τους, MRS broth, κυμαίνεται στις τιμές 5,68-7,48% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών και Κοκτέιλ 29 LAB → Μετά από επώαση για 2 και 5 ημέρες αντίστοιχα στους 30° C: 50ppb ΟΤΑ**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A, αρχικής συγκέντρωσης 50ppb, για τα κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα, απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι τα γαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν λίγο υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης A σε σχέση με τις ζύμες, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

- **6^ο ΜΕΡΟΣ:**

- **Κοκτέιλ 16 ζυμών → MRD + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων (με MRD ως θρεπτικό υπόστρωμα) μετά την 1^η φυγοκέντριση, παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.23.

Κοκτέιλ 16 ζυμών	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντριση
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	6,92
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1η επαν.)	6,94
Κοκτέιλ 16 ζυμών 3 (2η επαν.)	6,97
Τυφλά (Yeast Medium)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 2ημ.)
T1	7,04
T2	7,03
T3	7,05

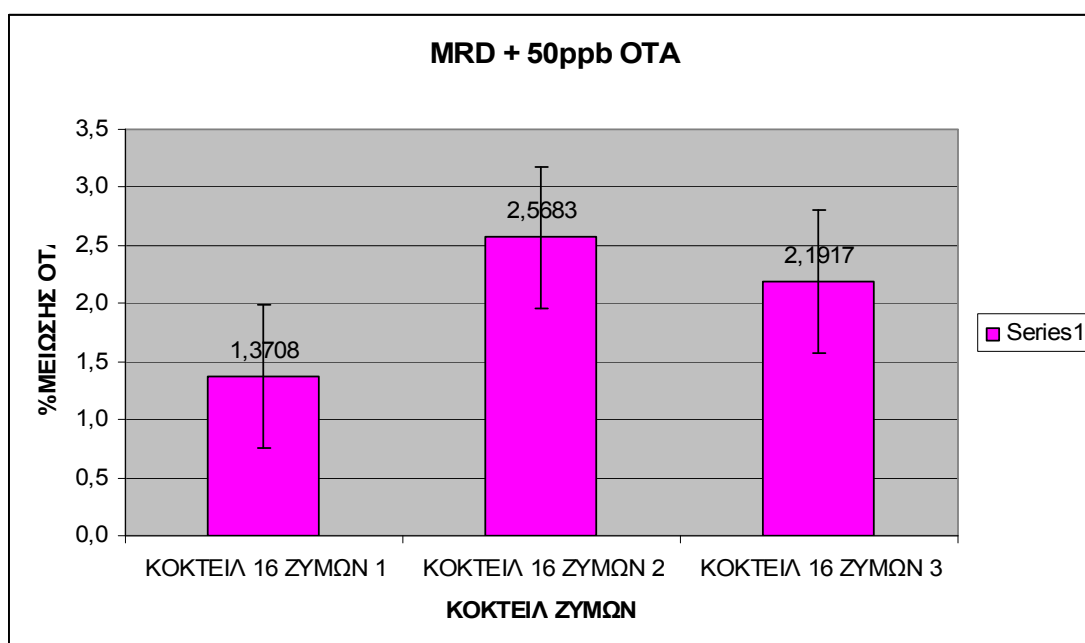
Πίνακας 7.1.23: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντριση.

Για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών, στα οποία χρησιμοποιήθηκε MRD ως θρεπτικό υπόστρωμα, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντριση, κυμαινόταν στις τιμές 6,92-6,97. Συγκρίνοντας με το pH των τυφλών, διαπιστώθηκε ότι μετά την πάροδο 2 ημερών επώασης στους 30 °C, η τιμή του pH των δειγμάτων μειώθηκε ελάχιστα (κατά 0,1 βαθμό περίπου κατά την ανάπτυξη των ζυμών).

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRD για 2 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΪΛ 16 ΖΥΜΩΝ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	23,4691	-	-
T2	23,1084	-	-
T3	22,7318	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	22,7864	1,3708	0,6123
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	22,5097	2,5683	
Κοκτέιλ 16 ζυμών 3 (2 ^η επαν.)	22,5967	2,1917	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί σε θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης MRD, κυμαίνεται στις τιμές 1,37-2,57% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων → MRD + 50ppb ΟΤΑ**

Οι τιμές pH του υπερκειμένου (των 4ml) των δειγμάτων (με MRD ως θρεπτικό υπόστρωμα) μετά την 1^η φυγοκέντριση, παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1.24.

Κοκτέιλ 29 LAB	pH υπερκειμένου μετά την 1η φυγοκέντρωση
Κοκτέιλ 29 LAB 1	6,88
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	6,92
Κοκτέιλ 29 LAB 3 (2η επαν.)	6,82
Τυφλά (MRS broth)	pH (μετά από επώαση στους 30° C για 5ημ.)
T1	6,91
T2	6,85
T3	6,80

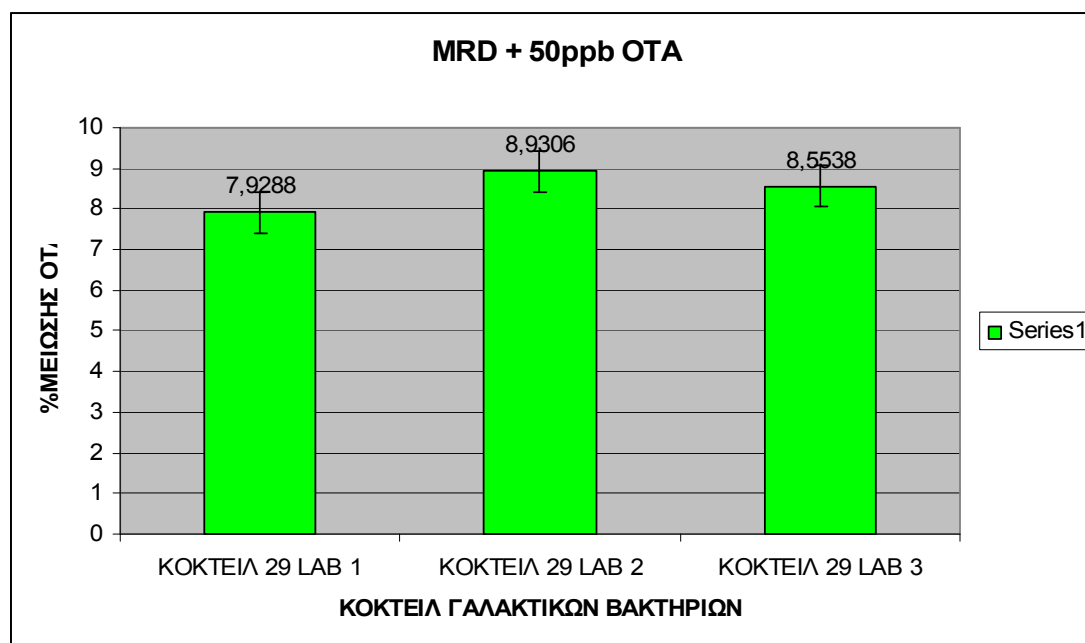
Πίνακας 7.1.24: pH των υπερκειμένων των δειγμάτων μετά την 1^η φυγοκέντρωση.

Για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, στα οποία χρησιμοποιήθηκε MRD ως θρεπτικό υπόστρωμα, από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το pH μετά την 1^η φυγοκέντρωση, κυμαινόταν στις τιμές 6,82-6,92. Συγκρίνοντας με το pH των τυφλών, διαπιστώθηκε ότι μετά την πάροδο 5 ημερών επώασης στους 30 °C, η τιμή του pH των δειγμάτων μειώθηκε ελάχιστα (κατά 0,1 βαθμό περίπου κατά την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων).

Οι τελικές συγκεντρώσεις ωχρατοξίνης A καθώς και τα ποσοστά μείωσής της από την επίδραση και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRD για 5 ημέρες στους 30 °C, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας, ήταν τα εξής:

ΚΟΚΤΕΙΛ 29 LAB	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	22,2906	-	-
T2	22,8363	-	-
T3	22,8355	-	-
Κοκτέιλ 29 LAB 1	20,8579	7,9288	0,5060
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	20,6310	8,9306	
Κοκτέιλ 29 LAB 3 (2η επαν.)	20,7163	8,5538	

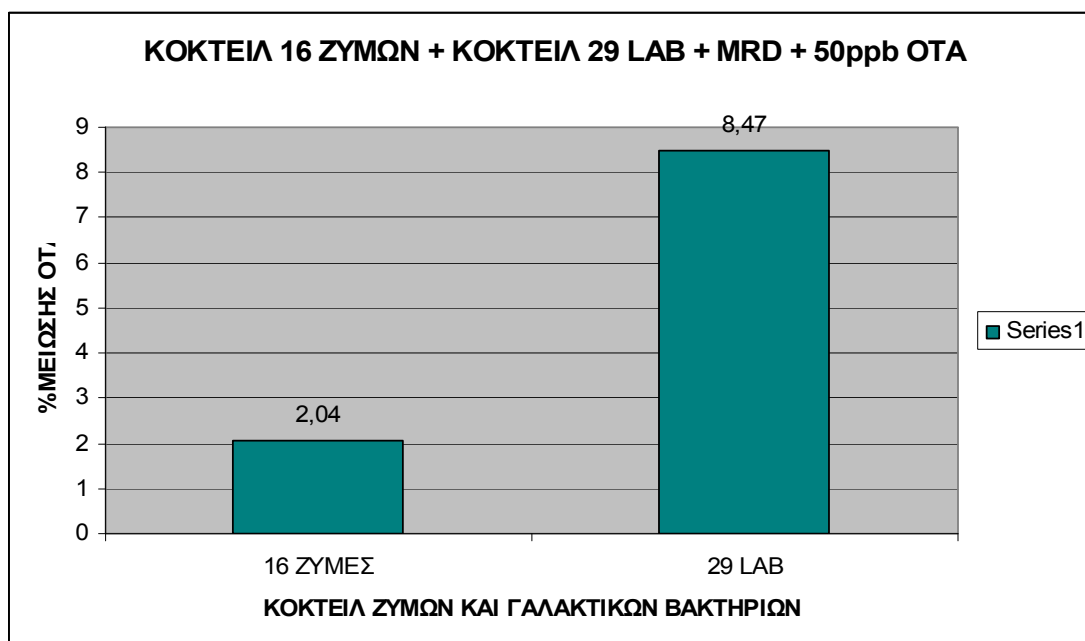
Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί σε θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης MRD, κυμαίνεται στις τιμές 7,93-8,93% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών και Κοκτέιλ 29 LAB → MRD + 50ppb OTA**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A, αρχικής συγκέντρωσης 50ppb, για τα κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων, σε θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης MRD, απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι τα γαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τις ζύμες, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος.

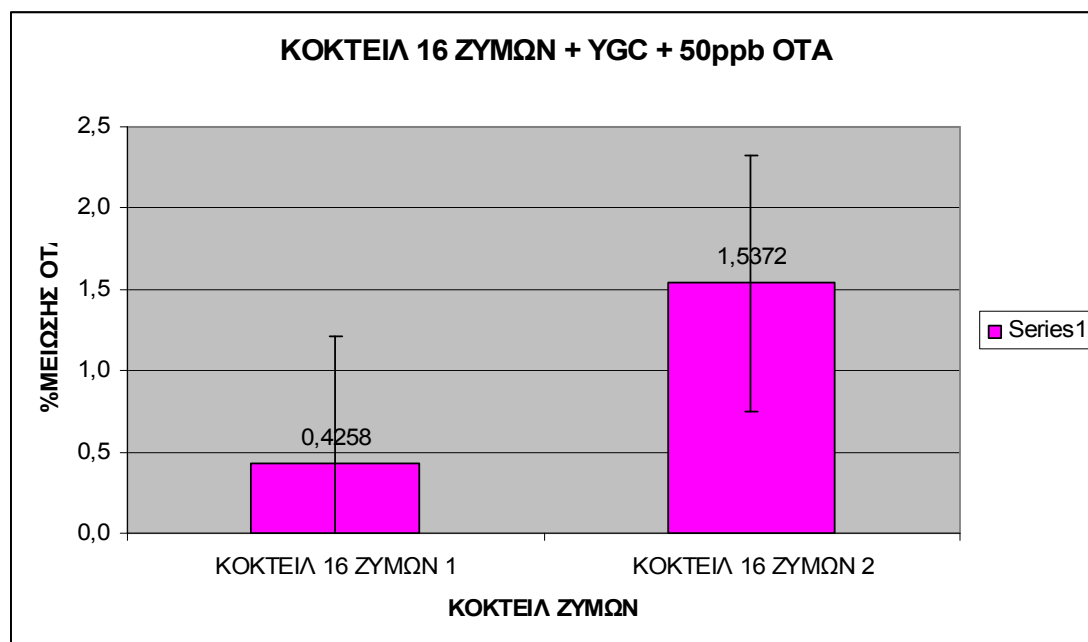
- **7^ο ΜΕΡΟΣ:**

- **Κοκτέιλ 16 ζυμών → YGC + 50ppb ΟΤΑ**

Εξετάζοντας το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α από την επίδραση και των 16 ζυμών μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα YGC για 2 ημέρες στους 30 °C, λήφθηκαν με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας τα εξής αποτελέσματα:

ΚΟΚΤΕΙΛ 16 ΖΥΜΩΝ	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 2ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	5,5836	-	-
Κοκτέιλ 16 ζυμών 1	5,5598	0,4258	0,7859
Κοκτέιλ 16 ζυμών 2 (1 ^η επαν.)	5,4977	1,5372	

Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης Α απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



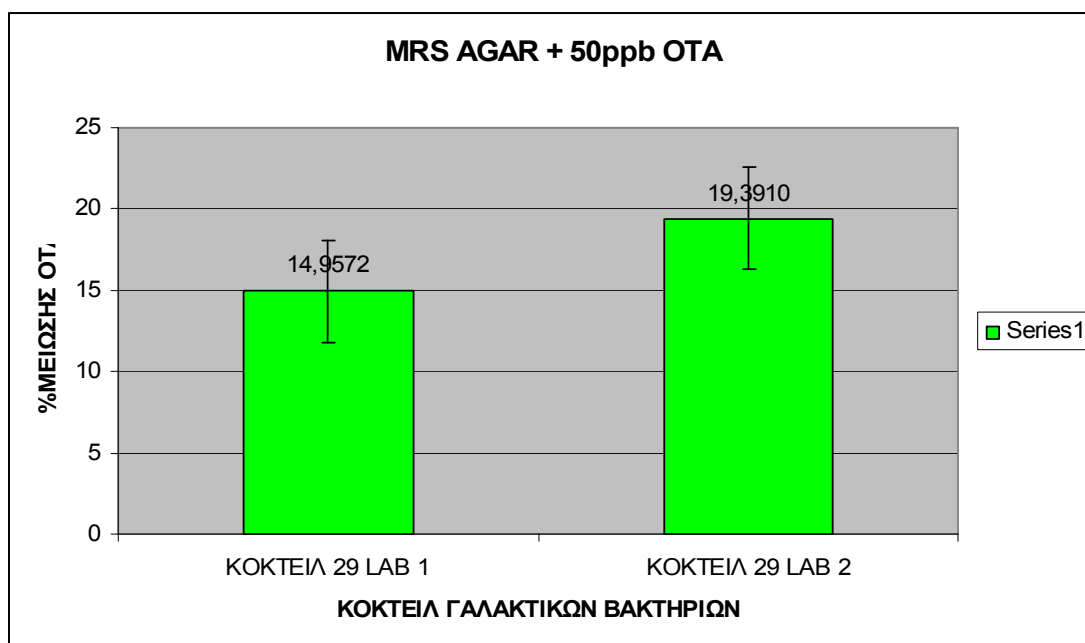
Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 16 ζυμών μαζί σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης, YGC, κυμαίνεται στις τιμές 0,43-1,54% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων → MRS Agar + 50ppb ΟΤΑ**

Εξετάζοντας το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης ωχρατοξίνης Α από την επίδραση και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί στην αρχική συγκέντρωση των 50ppb για κάθε κοκτέιλ, κατόπιν επώασης σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar για 5 ημέρες στους 30 °C, λήφθηκαν με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας τα εξής αποτελέσματα:

ΚΟΚΤΕΙΛ 29 LAB	ΟΤΑ ppb ΜΕΤΑ 5ημ. στους 30 °C στα 4ml	% ΜΕΙΩΣΗΣ ΟΤΑ	RSDr
T1	5,2088	-	-
Κοκτέιλ 29 LAB 1	4,4297	14,9572	3,1352
Κοκτέιλ 29 LAB 2 (1η επαν.)	4,1987	19,3910	

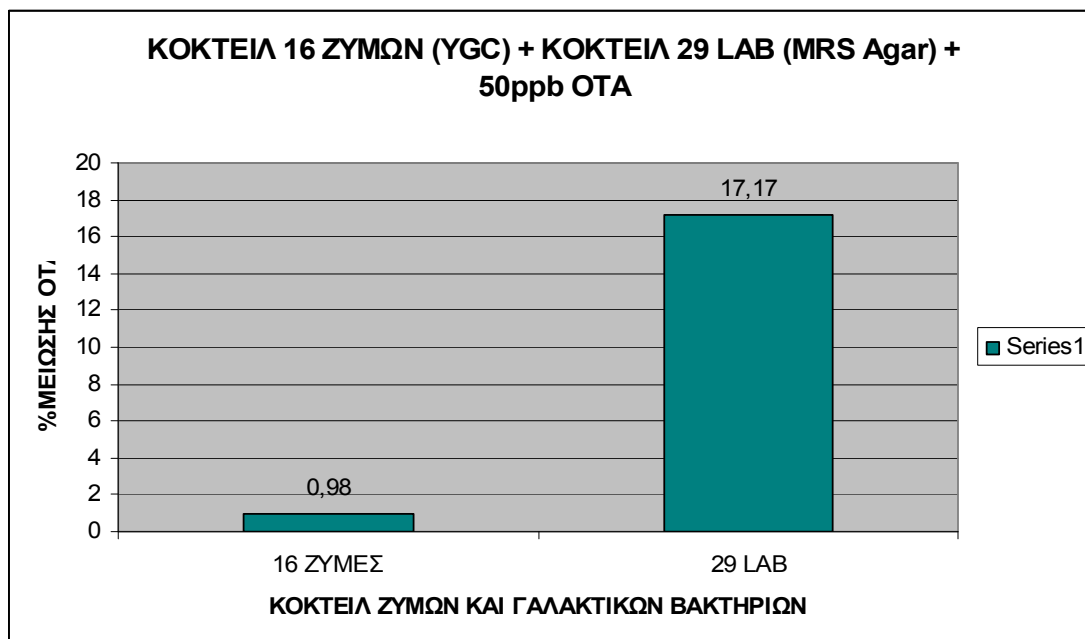
Τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A απεικονίζονται και με τη μορφή ραβδογραμμάτων ως εξής:



Παρατηρούμε ότι το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A των 50ppb για τα κοκτέιλ και των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης, MRS Agar, κυμαίνεται στις τιμές 14,96-19,39% περίπου.

➤ **Κοκτέιλ 16 ζυμών και Κοκτέιλ 29 LAB → YGC και MRS Agar αντίστοιχα + 50ppb OTA**

Συνολικά τα ποσοστά μείωσης ωχρατοξίνης A, αρχικής συγκέντρωσης 50ppb, για τα κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων, σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης YGC και MRS Agar αντίστοιχα, απεικονίζονται ως εξής:



Από τα παραπάνω ραβδογράμματα παρατηρούμε ότι στην περίπτωση των στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων ανάπτυξης, τα γαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν πολύ υψηλότερο ποσοστό μείωσης ωχρατοξίνης Α σε σχέση με τις ζύμες.

7.1.1 Αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων όλου του πειραματικού μέρους, κρίθηκε απαραίτητο τα αποτελέσματα να χωριστούν σε 10 ομάδες.

- **1^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος (pH=6,1) + 50ppb ΟΤΑ
2. Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος (pH=6,1) + 100ppb ΟΤΑ
3. Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος + pH=5 + 50ppb ΟΤΑ

4. Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος + pH=5 + 100ppb
ΟΤΑ

Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα (% μείωσης ωχρατοξίνης A) των τεσσάρων παραπάνω περιπτώσεων, μελετήθηκε μεμονωμένα κατά πόσο ο παράγοντας «επανάληψη» (του πειραματικού μέρους) επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 16.0 έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	16,693 ^a	1	16,693	,253	,618	,007
Intercept	9227,014	1	9227,014	139,759	,000	,786
replicate	16,693	1	16,693	,253	,618	,007
Error	2508,786	38	66,021			
Total	11752,492	40				
Corrected Total	2525,478	39				

a. R Squared = ,007 (Adjusted R Squared = -,020)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	16,693	1	16,693	,253	,618	,007
Error	2508,786	38	66,021			

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από τους παραπάνω πίνακες παρατηρούμε ότι το $F=0,253$ για τον παράγοντα «επανάληψη» είναι μεγαλύτερο από το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, συνεπώς ο παράγοντας «επανάληψη» του συγκεκριμένου πειραματικού μέρους δεν είναι στατιστικά σημαντικός, δηλαδή η επαναληψιμότητα δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Τα αποτελέσματα των τεσσάρων περιπτώσεων της 1^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν ξανά στατιστικά για να μελετηθεί επιπλέον κατά πόσο το γένος των γαλακτικών βακτηρίων, η αρχική συγκέντρωση

ωχρατοξίνης A, το pH και η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	2525,478 ^a	39	64,756	.	.	1,000
Intercept	9227,014	1	9227,014	.	.	1,000
STRAINS	336,106	4	84,026	.	.	1,000
pH	9,506	1	9,506	.	.	1,000
ppb	146,306	1	146,306	.	.	1,000
replicate	16,693	1	16,693	.	.	1,000
STRAINS * pH	36,000	4	9,000	.	.	1,000
STRAINS * ppb	341,263	4	85,316	.	.	1,000
STRAINS * replicate	235,928	4	58,982	.	.	1,000
pH * ppb	1,901	1	1,901	.	.	1,000
pH * replicate	127,235	1	127,235	.	.	1,000
ppb * replicate	203,311	1	203,311	.	.	1,000
STRAINS * pH * ppb	612,713	4	153,178	.	.	1,000
STRAINS * pH * replicate	86,576	4	21,644	.	.	1,000
STRAINS * ppb * replicate	282,965	4	70,741	.	.	1,000
pH * ppb * replicate	9,332	1	9,332	.	.	1,000
STRAINS * pH * ppb * replicate	79,644	4	19,911	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	
Total	11752,492	40				
Corrected Total	2525,478	39				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	336,106	4	84,026	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	

The F tests the effect of STRAINS. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από τον παραπάνω πίνακα, η τιμή του F δηλώνει ότι το «γένος των γαλακτικών βακτηρίων» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	9,506	1	9,506	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of pH. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «pH» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	146,306	1	146,306	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of ppb. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Ομοίως, η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	16,693	1	16,693	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ξανά ότι ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

15. STRAINS * pH * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

STR AINS	pH	ppb	replic ate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
1	5	50	1	13,440	.	.	.
			2	17,670	.	.	.
		100	1	9,590	.	.	.
			2	8,330	.	.	.
	6.1	50	1	7,750	.	.	.
			2	14,270	.	.	.
		100	1	17,750	.	.	.
			2	17,540	.	.	.
2	5	50	1	18,880	.	.	.
			2	26,280	.	.	.
		100	1	13,500	.	.	.
			2	13,460	.	.	.
	6.1	50	1	12,780	.	.	.
			2	21,610	.	.	.
		100	1	22,000	.	.	.
			2	22,930	.	.	.
3	5	50	1	1,390	.	.	.
			2	7,490	.	.	.
		100	1	38,020	.	.	.
			2	7,520	.	.	.
	6.1	50	1	10,210	.	.	.
			2	23,450	.	.	.
		100	1	11,590	.	.	.
			2	8,500	.	.	.
4	5	50	1	14,210	.	.	.
			2	10,890	.	.	.
		100	1	9,280	.	.	.
			2	6,300	.	.	.
	6.1	50	1	11,850	.	.	.
			2	8,500	.	.	.
		100	1	11,930	.	.	.
			2	21,520	.	.	.
5	5	50	1	15,570	.	.	.
			2	4,240	.	.	.
		100	1	37,420	.	.	.
			2	20,530	.	.	.
	6.1	50	1	10,590	.	.	.
			2	14,440	.	.	.
		100	1	28,930	.	.	.
			2	15,370	.	.	.

Όπου strain 1: γένος *Bacillus*, strain 2: γένος *Pediococcus*, strain 3: γένος *Streptococcus*, strain 4: γένος *Weissella*, strain 5: γένος *Lactobacillus*

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση του γένους των γαλακτικών βακτηρίων με το pH, την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A και την επαναληψιμότητα του πειράματος δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

- **2^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη (pH=6,5) + 50ppb OTA
2. Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη (pH=6,5) + 100ppb OTA
3. Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη + pH=5 + 50ppb OTA
4. Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη + pH=5 + 100ppb OTA

Τα αποτελέσματα των τεσσάρων αυτών περιπτώσεων της 2^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά για να μελετηθεί κατά πόσο τα στελέχη των ζυμών σε κοκτέιλ των τεσσάρων, η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, το pH και η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	6876,857 ^a	31	221,834	.	.	1,000
Intercept	9549,275	1	9549,275	.	.	1,000
STRAINS	341,952	3	113,984	.	.	1,000
pH	1204,791	1	1204,791	.	.	1,000
ppb	631,990	1	631,990	.	.	1,000
replicate	28,294	1	28,294	.	.	1,000
STRAINS * pH	409,299	3	136,433	.	.	1,000
STRAINS * ppb	137,504	3	45,835	.	.	1,000
STRAINS * replicate	270,177	3	90,059	.	.	1,000
pH * ppb	2022,639	1	2022,639	.	.	1,000
pH * replicate	9,957	1	9,957	.	.	1,000
ppb * replicate	2,106	1	2,106	.	.	1,000
STRAINS * pH * ppb	945,612	3	315,204	.	.	1,000
STRAINS * pH * replicate	325,100	3	108,367	.	.	1,000
STRAINS * ppb * replicate	73,023	3	24,341	.	.	1,000
pH * ppb * replicate	2,803	1	2,803	.	.	1,000
STRAINS * pH * ppb * replicate	471,611	3	157,204	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	
Total	16426,132	32				
Corrected Total	6876,857	31				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	341,952	3	113,984	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	

The F tests the effect of STRAINS. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από τον παραπάνω πίνακα, η τιμή του F δηλώνει ότι τα «στελέχη των ζυμών σε κοκτέιλ των τεσσάρων» δεν επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	1204,791	1	1204,791	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	

The F tests the effect of pH. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «pH» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	631,990	1	631,990	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of ppb. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Ομοίως, η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	28,294	1	28,294	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος, ομοίως, δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

15. STRAINS * pH * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

STR AINS	pH	ppb	replic ate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
1	5	50	1	9,970	.	.	.
			2	12,770	.	.	.
		100	1	9,520	.	.	.
			2	7,310	.	.	.
	6.5	50	1	8,660	.	.	.
			2	9,280	.	.	.
		100	1	28,020	.	.	.
			2	43,980	.	.	.
2	5	50	1	21,450	.	.	.
			2	26,760	.	.	.
		100	1	5,120	.	.	.
			2	1,350	.	.	.
	6.5	50	1	8,990	.	.	.
			2	2,190	.	.	.
		100	1	37,290	.	.	.
			2	56,630	.	.	.
3	5	50	1	19,760	.	.	.
			2	4,830	.	.	.
		100	1	8,330	.	.	.
			2	5,100	.	.	.
	6.5	50	1	14,970	.	.	.
			2	19,620	.	.	.
		100	1	55,690	.	.	.
			2	35,940	.	.	.
4	5	50	1	11,140	.	.	.
			2	10,480	.	.	.
		100	1	6,880	.	.	.
			2	17,450	.	.	.
	6.5	50	1	17,280	.	.	.
			2	7,140	.	.	.
		100	1	28,370	.	.	.
			2	,520	.	.	.

Όπου strain 1: κοκτέιλ No1 (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*), strain 2: κοκτέιλ No2 (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8)), strain 3: κοκτέιλ No3 (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*), strain 4: κοκτέιλ No4 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*)

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση των στελεχών των ζυμών σε κοκτέιλ των τεσσάρων με το pH, την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A και την επαναληψιμότητα του πειράματος δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

- **3^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων (pH=6,1) + 50ppb OTA
2. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων (pH=6,1) + 100ppb OTA
3. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + pH=5 + 50ppb OTA
4. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + pH=5 + 100ppb OTA

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 3^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά για να μελετηθεί κατά πόσο η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, το pH και η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	128,545 ^a	7	18,364	.	.	1,000
Intercept	1022,650	1	1022,650	.	.	1,000
pH	3,341	1	3,341	.	.	1,000
ppb	53,820	1	53,820	.	.	1,000
replicate	36,765	1	36,765	.	.	1,000
pH * ppb	,466	1	,466	.	.	1,000
pH * replicate	10,283	1	10,283	.	.	1,000
ppb * replicate	,099	1	,099	.	.	1,000
pH * ppb * replicate	23,771	1	23,771	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	
Total	1151,195	8				
Corrected Total	128,545	7				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	3,341	1	3,341	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	

The F tests the effect of pH. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «pH» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	53,820	1	53,820	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	

The F tests the effect of ppb. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Ομοίως, η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	36,765	1	36,765	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

7. pH * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

pH	ppb	replicate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5	50	1	8,650	.	.	.
		2	7,000	.	.	.
	100	1	10,650	.	.	.
		2	16,340	.	.	.
6.1	50	1	4,710	.	.	.
		2	14,490	.	.	.
	100	1	12,640	.	.	.
		2	15,970	.	.	.

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση του pH με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A και την επαναληψιμότητα του πειράματος δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

- **4^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ 16 ζυμών (pH=6,5) + 50ppb OTA
2. Κοκτέιλ 16 ζυμών (pH=6,5) + 100ppb OTA
3. Κοκτέιλ 16 ζυμών + pH=5 + 50ppb OTA
4. Κοκτέιλ 16 ζυμών + pH=5 + 100ppb OTA

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 4^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά για να μελετηθεί κατά πόσο η αρχική

συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, το pH και η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	420,629 ^a	7	60,090	.	.	1,000
Intercept	3013,208	1	3013,208	.	.	1,000
pH	108,486	1	108,486	.	.	1,000
ppb	102,102	1	102,102	.	.	1,000
replicate	1,674	1	1,674	.	.	1,000
pH * ppb	200,200	1	200,200	.	.	1,000
pH * replicate	2,761	1	2,761	.	.	1,000
ppb * replicate	,994	1	,994	.	.	1,000
pH * ppb * replicate	4,410	1	4,410	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	
Total	3433,837	8				
Corrected Total	420,629	7				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	108,486	1	108,486	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	

The F tests the effect of pH. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και για την περίπτωση των ζυμών, η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «pH» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	102,102	1	102,102	.	.	1,000
Error	,000	0	.	.	.	

The F tests the effect of ppb. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Ομοίως, η τιμή του F δηλώνει ότι ο παράγοντας «αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α» δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	1,674	1	1,674	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α.

7. pH * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

pH	ppb	replicate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5	50	1	18,120	.	.	.
		2	16,190	.	.	.
	100	1	13,070	.	.	.
		2	15,520	.	.	.
6.5	50	1	15,170	.	.	.
		2	13,860	.	.	.
	100	1	33,100	.	.	.
		2	30,230	.	.	.

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση του pH με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α και την επαναληψιμότητα του πειράματος δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α.

- **5^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ 16 ζυμών + Πριν από επώαση: 50ppb ΟΤΑ
2. Κοκτέιλ 16 ζυμών + Μετά από επώαση: 50ppb ΟΤΑ

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 5^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά για να μελετηθεί κατά πόσο η χρονική

στιγμή προσθήκης ωχρατοξίνης A στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, δηλαδή κατά πόσο η προσθήκη ωχρατοξίνης A πριν και μετά την επώαση των κοκτέιλ των ζυμών στους 30° C για 2 ημέρες, επιδρά στο ποσοστό μείωσής της. Για τον ίδιο λόγο μελετήθηκαν επίσης η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ όλων των παραγόντων αλληλεπίδραση. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	89,234 ^a	3	29,745	.	.	1,000
Intercept	408,646	1	408,646	.	.	1,000
CODE	77,704	1	77,704	.	.	1,000
ppb	,000	0
replicate	2,739	1	2,739	.	.	1,000
CODE * ppb	,000	0
CODE * replicate	8,791	1	8,791	.	.	1,000
ppb * replicate	,000	0
CODE * ppb * replicate	,000	0
Error	,000	0
Total	497,881	4				
Corrected Total	89,234	3				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	77,704	1	77,704	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of CODE. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από την τιμή του F του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι η χρονική στιγμή προσθήκης ωχρατοξίνης A στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της. Δηλαδή η προσθήκη ωχρατοξίνης A είτε πριν είτε μετά την επώαση των κοκτέιλ (CODE), δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση στο ποσοστό μείωσής της.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	2,739	1	2,739	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

7. CODE * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

CODE	ppb	replicate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
16Z,ME	50	1	3,390	.	.	.
		2	8,010	.	.	.
16Z,ΠΕ	50	1	15,170	.	.	.
		2	13,860	.	.	.

Όπου ME: Μετά από επώαση, ΠΕ: Πριν από επώαση

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση της χρονικής στιγμής προσθήκης ωχρατοξίνης A στο Yeast Medium με την επαναληψιμότητα του πειράματος, αλλά και με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσής της. Η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A επιλέχθηκε να είναι 50ppb, εφόσον τα προηγούμενα πειράματα απέδειξαν πως η τιμή εκείνης δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της.

- **6^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + Πριν από επώαση: 50ppb OTA
2. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + Μετά από επώαση: 50ppb OTA

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 6^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά, όπως ακριβώς έγινε για τις ζύμες, για να μελετηθεί κατά πόσο η χρονική στιγμή προσθήκης ωχρατοξίνης A στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, δηλαδή κατά πόσο η προσθήκη ωχρατοξίνης A πριν και μετά την επώαση των κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων στους 30° C για 5 ημέρες, επιδρά στο ποσοστό μείωσής της. Για τον ίδιο λόγο μελετήθηκαν επίσης η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ όλων των παραγόντων αλληλεπίδραση. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	58,565 ^a	3	19,522	.	.	1,000
Intercept	261,792	1	261,792	.	.	1,000
CODE	9,120	1	9,120	.	.	1,000
ppb	,000	0
replicate	33,524	1	33,524	.	.	1,000
CODE * ppb	,000	0
CODE * replicate	15,920	1	15,920	.	.	1,000
ppb * replicate	,000	0
CODE * ppb * replicate	,000	0
Error	,000	0
Total	320,357	4				
Corrected Total	58,565	3				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	9,120	1	9,120	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of CODE. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από την τιμή του F του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι η χρονική στιγμή προσθήκης ωχρατοξίνης A στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της. Δηλαδή η προσθήκη ωχρατοξίνης A είτε πριν είτε μετά την

επώαση των κοκτέιλ (CODE), δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση στο ποσοστό μείωσής της.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	33,524	1	33,524	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και για την περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

7. CODE * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

CODE	ppb	replicate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
29L,ME	50	1	5,680	.	.	.
		2	7,480	.	.	.
29L,ΠΕ	50	1	4,710	.	.	.
		2	14,490	.	.	.

Όπου ME: Μετά από επώαση, ΠΕ: Πριν από επώαση

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση της χρονικής στιγμής προσθήκης ωχρατοξίνης A στο MRS broth με την επαναληψιμότητα του πειράματος, αλλά και με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσής της. Η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A επιλέχθηκε να είναι 50ppb για τον ίδιο ακριβώς λόγο που επιλέχθηκε και για τις ζύμες.

- **7^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ 16 ζυμών + Yeast Medium + 50ppb OTA
2. Κοκτέιλ 16 ζυμών + MRD + 50ppb OTA
3. Κοκτέιλ 16 ζυμών + YGC + 50ppb OTA

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 7^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά για να μελετηθεί κατά πόσο το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών (Yeast Medium, MRD και YGC), η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	241,115 ^a	6	40,186	.	.	1,000
Intercept	194,730	1	194,730	.	.	1,000
SUBSTRATUM	227,605	2	113,803	.	.	1,000
ppb	,000	0
replicate	,199	2	,099	.	.	1,000
SUBSTRATUM * ppb	,000	0
SUBSTRATUM * replicate	2,027	2	1,014	.	.	1,000
ppb * replicate	,000	0
SUBSTRATUM * ppb * replicate	,000	0
Error	,000	0
Total	438,063	7				
Corrected Total	241,115	6				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	238,888	2	119,444	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of SUBSTRATUM. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από την τιμή του F του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των ζυμών, δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α. Δηλαδή είτε χρησιμοποιηθεί Yeast Medium είτε MRD ή YGC, δεν παρουσιάζεται σημαντική επίδραση στο ποσοστό μείωσης της τοξίνης.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	11,482	2	5,741	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

7. SUBSTRATUM * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

SUB STR AT...	ppb	replicate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	50	1	15,170	.	.	.
		2	13,860	.	.	.
		3	. ^a	.	.	.
2	50	1	1,370	.	.	.
		2	2,570	.	.	.
		3	2,190	.	.	.
3	50	1	,430	.	.	.
		2	1,540	.	.	.
		3	. ^a	.	.	.

a. This level combination of factors is not observed, thus the corresponding population marginal mean is not estimable.

Όπου Substratum 1: Yeast Medium, Substratum 2: MRD, Substratum 3: YGC

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση του χρησιμοποιούμενου θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης των ζυμών με την επαναληψιμότητα του πειράματος, αλλά και με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσής της. Η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A επιλέχθηκε να είναι 50ppb, εφόσον τα προηγούμενα πειράματα απέδειξαν πως η τιμή εκείνης δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσής της.

- **8^η Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + MRS broth + 50ppb ΟΤΑ

2. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + MRD + 50ppb OTA

3. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + MRS Agar + 50ppb
OTA

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 8^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά, όπως ακριβώς έγινε για τις ζύμες, για να μελετηθεί κατά πόσο το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων (MRS broth, MRD και MRS Agar), η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	156,981 ^a	6	26,164	.	.	1,000
Intercept	829,006	1	829,006	.	.	1,000
SUBSTRATUM	90,150	2	45,075	.	.	1,000
ppb	,000	0
replicate	38,567	2	19,283	.	.	1,000
SUBSTRATUM * ppb	,000	0
SUBSTRATUM * replicate	19,579	2	9,790	.	.	1,000
ppb * replicate	,000	0
SUBSTRATUM * ppb * replicate	,000	0
Error	,000	0
Total	1047,650	7				
Corrected Total	156,981	6				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	98,835	2	49,418	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of SUBSTRATUM. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από την τιμή του F του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων, δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Δηλαδή είτε

χρησιμοποιηθεί MRS broth είτε MRD ή MRS Agar, δεν παρουσιάζεται σημαντική επίδραση στο ποσοστό μείωσης της τοξίνης.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	47,252	2	23,626	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και για την περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

7. SUBSTRATUM * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

SUB STR AT...	ppb	replicate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	50	1	4,710	.	.	.
		2	14,490	.	.	.
		3	. ^a	.	.	.
2	50	1	7,930	.	.	.
		2	8,930	.	.	.
		3	8,550	.	.	.
3	50	1	14,960	.	.	.
		2	19,390	.	.	.
		3	. ^a	.	.	.

a. This level combination of factors is not observed, thus the corresponding population marginal mean is not estimable.

Όπου Substratum 1: MRS broth, Substratum 2: MRD, Substratum 3: MRS Agar

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση του χρησιμοποιούμενου θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων με την επαναληψιμότητα του πειράματος, αλλά και με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσής της. Η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A επιλέχθηκε να είναι 50ppb για τον ίδιο ακριβώς λόγο που επιλέχθηκε και για τις ζύμες.

- **9^η Ομάδα:**

1. Μεμονωμένα στελέχη ζυμών + 100ppb ΟΤΑ
2. Κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη + 100ppb ΟΤΑ
3. Κοκτέιλ 16 ζυμών + 100ppb ΟΤΑ

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 9^{ης} ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά για να μελετηθεί κατά πόσο τα στελέχη των ζυμών ή οι ομάδες-κοκτέιλ των ζυμών, η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	5854,752 ^a	28	209,098	.	.	1,000
Intercept	13943,620	1	13943,620	.	.	1,000
STRAINS	4175,899	20	208,795	.	.	1,000
ppb	,000	0
replicate	609,349	1	609,349	.	.	1,000
STRAINS * ppb	,000	0
STRAINS * replicate	1495,660	7	213,666	.	.	1,000
ppb * replicate	,000	0
STRAINS * ppb * replicate	,000	0
Error	,000	0
Total	28454,317	29				
Corrected Total	5854,752	28				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	3749,743	20	187,487	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of STRAINS. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από την τιμή του F του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα στελέχη των ζυμών, είτε ως μεμονωμένες περιπτώσεις, είτε ως κοκτέιλ ανά τέσσερα στελέχη ή κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί, δεν επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Δηλαδή είτε εμβολιαστούν σε Yeast Medium μεμονωμένα στελέχη ζυμών, είτε κοκτέιλ ζυμών ανά τέσσερα στελέχη ή και οι 16 ζύμες μαζί, δεν παρουσιάζεται σημαντική επίδραση στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	183,193	1	183,193	.	.	1,000
Error	,000	0	.			

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

7. STRAINS * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

STR AINS	ppb	replic ate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	100	1	22,260	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
2	100	1	11,980	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
3	100	1	37,320	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
4	100	1	51,670	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
5	100	1	13,280	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
6	100	1	22,510	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
7	100	1	31,120	.	.	.
		2	4,170	.	.	.
8	100	1	24,240	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
9	100	1	23,510	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
10	100	1	27,780	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
11	100	1	22,430	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
12	100	1	47,320	.	.	.
		2	12,760	.	.	.
13	100	1	16,200	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
14	100	1	32,790	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
15	100	1	23,350	.	.	.
		2	. ^a	.	.	.
16	100	1	28,580	.	.	.
		2	6,520	.	.	.
17	100	1	28,020	.	.	.
		2	43,980	.	.	.
18	100	1	37,290	.	.	.
		2	56,630	.	.	.
19	100	1	55,690	.	.	.
		2	35,940	.	.	.
20	100	1	28,370	.	.	.
		2	,520	.	.	.
21	100	1	33,100	.	.	.
		2	30,230	.	.	.

a. This level combination of factors is not observed, thus the corresponding population marginal mean is not estimable.

Όπου Strain 1: *Hanseniaspora guilliermondii*, 2: *Kluyveromyces dobzhankii*, 3: *Pichia fermentas*, 4: *Issatchenkia occidentalis*, 5: Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, 6: *Hanseniaspora uvarum*, 7: *Issatchenkia terricola*, 8: *Zygosaccharomyces bailii* (A8), 9: *Zygosaccharomyces bailii* (A9), 10: *Kazachstania hellenica* (A10), 11: *Kazachstania hellenica* (A11), 12: *Hanseniaspora opuntiae*, 13: *Saccharomyces cerevisiae*, 14: *Lachencea thermotolerans*, 15: *Pichia guilliermondii*, 16: *Issatchenkia orientalis*, 17: κοκτέιλ No1 (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*), 18: κοκτέιλ No2 (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8)), 19: κοκτέιλ No3 (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*), 20: κοκτέιλ No4 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*), 21: κοκτέιλ των 16 ζυμών

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση των στελεχών των ζυμών, είτε ως μεμονωμένες περιπτώσεις, είτε ως κοκτέιλ ανά τέσσερα στελέχη ή κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί, με την επαναληψιμότητα του πειράματος, αλλά και με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A, δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσής της. Η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A επιλέχθηκε να είναι 100ppb.

Τα αποτελέσματα των τριών περιπτώσεων της 9ης ομάδας μελετήθηκαν ξανά στατιστικά για να εξεταστεί μεμονωμένα κατά πόσο ο παράγοντας «στελέχη ζυμών» (μεμονωμένα ή κοκτέιλ) επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	3749,743 ^a	20	187,487	,713	,745	,640
Intercept	19074,230	1	19074,230	72,491	,000	,901
CODE	3749,743	20	187,487	,713	,745	,640
Error	2105,009	8	263,126			
Total	28454,317	29				
Corrected Total	5854,752	28				

a. R Squared = ,640 (Adjusted R Squared = -,258)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	3749,743	20	187,487	,713	,745	,640
Error	2105,009	8	263,126			

The F tests the effect of CODE. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από τους παραπάνω πίνακες παρατηρούμε ότι το $F=0,713$ για τον παράγοντα «στελέχη ζυμών» είναι μεγαλύτερο από το επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, συνεπώς ο παράγοντας «στελέχη ζυμών» του συγκεκριμένου πειραματικού μέρους δεν είναι στατιστικά σημαντικός. Επομένως, είτε εμβολιαστούν σε Yeast Medium μεμονωμένα στελέχη ζυμών, είτε κοκτέιλ ζυμών ανά τέσσερα στελέχη ή και οι 16 ζύμες μαζί, το ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α δεν διαφέρει σημαντικά, όπως ήδη έχει αναφερθεί.

- **10¹¹ Ομάδα:**

1. Κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος + 100ppb ΟΤΑ
2. Κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων + 100ppb ΟΤΑ

Τα αποτελέσματα των περιπτώσεων αυτών της 10¹¹ ομάδας επεξεργάστηκαν στατιστικά, όπως ακριβώς έγινε για τις ζύμες, για να μελετηθεί κατά πόσο τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων, είτε σε κοκτέιλ ανά γένος είτε σε κοκτέιλ και των 29 στελεχών μαζί, η επαναληψιμότητα του πειράματος, καθώς και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών έδωσε τους εξής πίνακες:

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:reduction

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	373,131 ^a	11	33,921	.	.	1,000
Intercept	3559,374	1	3559,374	.	.	1,000
STRAINS	224,437	5	44,887	.	.	1,000
ppb	,000	0
replicate	,755	1	,755	.	.	1,000
STRAINS * ppb	,000	0
STRAINS * replicate	147,939	5	29,588	.	.	1,000
ppb * replicate	,000	0
STRAINS * ppb * replicate	,000	0
Error	,000	0
Total	3932,505	12				
Corrected Total	373,131	11				

a. R Squared = 1,000 (Adjusted R Squared = .)

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	224,437	5	44,887	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of STRAINS. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Από την τιμή του F του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα στελέχη των γαλακτικών βακτηρίων, είτε ως κοκτέιλ ανά γένος είτε ως κοκτέιλ και των 29 στελεχών μαζί, δεν επιδρούν στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A. Δηλαδή είτε εμβολιαστούν σε MRS broth κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος ή και τα 29 γαλακτικά βακτήρια μαζί, δεν παρουσιάζεται σημαντική επίδραση στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A.

Univariate Tests

Dependent Variable:reduction

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Contrast	,755	1	,755	.	.	1,000
Error	,000	0

The F tests the effect of replicate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Και για την περίπτωση των γαλακτικών βακτηρίων, ο παράγοντας «επαναληψιμότητα» του πειράματος δεν επιδρά στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α.

7. STRAINS * ppb * replicate

Dependent Variable:reduction

STR AINS	ppb	replic ate	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	100	1	17,750	.	.	.
		2	17,540	.	.	.
2	100	1	22,000	.	.	.
		2	22,930	.	.	.
3	100	1	11,590	.	.	.
		2	8,500	.	.	.
4	100	1	11,930	.	.	.
		2	21,520	.	.	.
5	100	1	28,930	.	.	.
		2	15,370	.	.	.
6	100	1	12,640	.	.	.
		2	15,970	.	.	.

Όπου strain 1: γένος *Bacillus*, strain 2: γένος *Pediococcus*, strain 3: γένος *Streptococcus*, strain 4: γένος *Weissella*, strain 5: γένος *Lactobacillus*, strain 6: κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων

Τέλος από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι και η αλληλεπίδραση των στελεχών των γαλακτικών βακτηρίων, είτε ως κοκτέιλ ανά γένος είτε ως κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων μαζί, με την επαναληψιμότητα του πειράματος, αλλά και με την αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α, δεν επιδρά σημαντικά στο ποσοστό μείωσής της. Η αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α επιλέχθηκε, όπως και στις ζύμες, να είναι 100ppb.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην περίπτωση των **μεμονωμένων στελεχών των ζυμών**, κάθε ένα από τα οποία επώαστηκε για 2 ημέρες στους 30° C σε Yeast Medium που περιείχε ωχρατοξίνη A αρχικής συγκέντρωσης **100ppb**, παρατηρούμε ότι το pH του διαλύματος ανάπτυξης μειώθηκε από την τιμή 6,5, που ήταν πριν την επώαση, στην τιμή 4,5-5,9 μετά την επώαση. Κατά την ανάπτυξη επομένως των ζυμών, μειώθηκε η τιμή του pH του διαλύματος ανάπτυξής τους (Yeast Medium). Όσον αφορά το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης ωχρατοξίνης A, μετά την πάροδο των 2 ημερών επώασης στους 30° C, παρατηρήθηκε ότι το είδος *Issatchenkia occidentalis* παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό (51,7%), ενώ το μικρότερο ποσοστό παρουσίασε το είδος *Kluyveromyces dobzhankii* (12%). Η σειρά των ειδών των ζυμών από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A (OTA) είναι η εξής:

Issatchenkia occidentalis* > *Pichia fermentas* > *Lachencea thermotolerans* > *Hanseniaspora opuntiae* > *Kazachstania hellenica* (A10) > *Zygosaccharomyces bailii* (A8) > *Zygosaccharomyces bailii* (A9) > *Pichia guilliermondii* > *Hanseniaspora uvarum* > *Kazachstania hellenica* (A11) > *Hanseniaspora guilliermondii* > *Issatchenkia terricola* > *Issatchenkia orientalis* > *Saccharomyces cerevisiae* > Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος > *Kluyveromyces dobzhankii

Όσον αφορά τα **κοκτέιλ ζυμών που παρασκευάστηκαν ανά 4 στελέχη** και με αρχική συγκέντρωση ωχρατοξίνης A **100ppb**, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στο pH του διαλύματος ανάπτυξής τους μετά την πάροδο των 2 ημερών επώασης, σε σχέση με αυτό των μεμονωμένων στελεχών. Αυτό ήταν αναμενόμενο εφόσον ο πληθυσμός στα κοκτέιλ ήταν μεγαλύτερος. Η σειρά των κοκτέιλ των ζυμών από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης A είναι η εξής:

No1 (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*) > **No3** (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*) > **No4** (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*) > **No2** (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8))

Η επανάληψη του πειράματος για τα κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη με αρχική συγκέντρωση ΟΤΑ 100ppb, έδωσε σχετικά διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η σειρά των κοκτέιλ από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης ήταν η εξής:

No2 (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8)) > **No3** (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*) > **No1** (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*) > **No4** (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*)

Οι μεγαλύτερες αποκλίσεις παρατηρήθηκαν στο 1^ο και 2^ο κοκτέιλ, ενώ το 3^ο κοκτέιλ παρέμεινε σταθερό στην 2^η θέση.

Για τις βιομάζες των κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη (με αρχική συγκέντρωση ΟΤΑ 100ppb) παρατηρήθηκε ότι κατακρατείται ποσότητα ΟΤΑ, με αποτέλεσμα τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης ΟΤΑ των 100ppb. Η σειρά των κοκτέιλ των ζυμών από τη μεγαλύτερη προς τη μικρότερη συγκέντρωση ΟΤΑ των βιομαζών τους είναι η εξής:

No3 (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*) > **No2** (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*,

***Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8)) > No1 (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*) > No4 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*)**

Για τα **κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος** με αρχική συγκέντρωση OTA **100ppb** παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στο pH του διαλύματος ανάπτυξής τους (MRS broth) μετά την πάροδο των 5 ημερών επώασης στους 30° C, σε σχέση τόσο με τα κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη όσο και με τα μεμονωμένα στελέχη ζυμών. Επιπλέον, μετρήθηκε το pH διαλύματος MRS μετά από επώαση για 5 ημέρες στους 30° C, αλλά και χωρίς επώαση. Παρατηρήθηκε ότι το pH του MRS broth δεν διαφέρει είτε επωαστεί είτε όχι. Όσον αφορά το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης OTA των 100ppb, μετά την πάροδο των 5 ημερών επώασης στους 30° C, η σειρά των κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό είναι η εξής:

Pediococcus* > *Lactobacillus* > *Bacillus* > *Weissella* > *Streptococcus

Συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης OTA των **κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη** με τα **κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος** με αρχική συγκέντρωση OTA **100ppb**, παρατηρούμε ότι **οι ζύμες εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά μείωσης σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια.**

Σχετικά με τα κοκτέιλ των 16 ζυμών, η επώασή τους για 7 ημέρες στους 30° C είχε ως αποτέλεσμα μικρότερο pH του διαλύματος ανάπτυξής τους σε σχέση με την επώαση για 2 ημέρες στην ίδια θερμοκρασία. Επομένως, η μεγαλύτερη διάρκεια επώασης των ζυμών οδηγεί σε μικρότερη τιμή pH του διαλύματος ανάπτυξής τους. Η μείωση αυτή της τιμής του pH δεν είναι όμως ιδιαίτερα σημαντική, τουλάχιστον για τις 5 επιπλέον ημέρες επώασης. Το ποσοστό μείωσης της OTA για

τα κοκτέιλ των 16 ζυμών με 2 ημέρες επώασης δεν διέφερε σημαντικά με το ποσοστό για τα κοκτέιλ με 7 ημέρες επώασης. Δηλαδή, η διάρκεια επώασης δεν επηρέασε το ποσοστό μείωσης της αρχικής συγκέντρωσης OTA των 100ppb. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ζύμες δεν αναπτύχθηκαν ιδιαίτερα στο διάστημα των 5 επιπλέον ημερών επώασης, συνεπώς δεν διάσπασαν επιπλέον ποσότητα ωχρατοξίνης A για τις ανάγκες του μεταβολισμού τους.

Τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων σε σύγκριση με τα κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος, με αρχική συγκέντρωση OTA 100ppb, παρουσίασαν μικρότερα ποσοστά μείωσης OTA, με εξαίρεση το γένος των στρεπτόκοκκων. Επομένως, η παρουσία μεγαλύτερου πληθυσμού γαλακτικών βακτηρίων (29 LAB) δεν οδήγησε σε μεγαλύτερη διάσπαση της OTA.

Για τα κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη σε Yeast Medium με pH=5 και 100ppb OTA, η κατάταξή τους από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης OTA είναι η εξής:

No4 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*) > **No1** (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*) > **No3** (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*) > **No2** (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8))

Μειώνοντας την αρχική συγκέντρωση OTA σε 50ppb (σε Yeast Medium με pH=6,5), η σειρά των κοκτέιλ των ζυμών ανά 4 στελέχη από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης OTA είναι η εξής:

No3 (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*) > **No4**

(*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*) > **No1** (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*) > **No2** (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8))

Παρατηρούμε ότι το 3^ο κοκτέιλ, με τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης OTA σε 50ppb, εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσής της σε αντίθεση με την περίπτωση των 100ppb σε Yeast Medium με pH=5, ενώ τα υπόλοιπα κοκτέιλ ζυμών δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες διαφορές με την προηγούμενη περίπτωση. Επομένως, η μείωση της αρχικής συγκέντρωσης OTA σε 50ppb δεν επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό μείωσής της μετά την πάροδο των 2 ημερών επώασης των κοκτέιλ στους 30° C.

Για τα κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος σε **MRS broth με pH=5 και 100ppb OTA**, η κατάταξή τους από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης OTA είναι η εξής:

Lactobacillus* > *Streptococcus* > *Pediococcus* > *Bacillus* > *Weissella

Μειώνοντας την αρχική συγκέντρωση OTA σε **50ppb** (σε **MRS broth με pH=6,1**), η σειρά των κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης OTA είναι η εξής:

Pediococcus* > *Streptococcus* > *Lactobacillus* > *Bacillus* > *Weissella

Παρατηρούμε ότι με τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης OTA σε 50ppb, η σειρά των γαλακτικών βακτηρίων από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης μετά την πάροδο των 5 ημερών επώασης παρέμεινε σχεδόν η ίδια. Η μοναδική διαφορά ήταν στο γένος

Lactobacillus (3^ο κατά σειρά) και στο γένος *Pediococcus* (1^ο κατά σειρά).

Συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης της OTA που εμφανίζουν τα **κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη** με αυτά που εμφανίζουν τα **κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος** στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης με **pH=5** και αρχική συγκέντρωση OTA **100ppb**, παρατηρούμε ότι τα γένη ***Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Pediococcus*** των γαλακτικών βακτηρίων, με την συγκεκριμένη σειρά, **εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης OTA.**

Ομοίως, συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης της OTA που εμφανίζουν τα **κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη** με αυτά των **κοκτέιλ των γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος** στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης με αρχική συγκέντρωση OTA **50ppb**, παρατηρούμε ότι το **3^ο κοκτέιλ ζυμών (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*)** εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό μείωσης OTA και στη συνέχεια ακολουθούν τα γένη ***Streptococcus* και *Pediococcus*** των γαλακτικών βακτηρίων.

Για τα **κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη** σε **Yeast Medium** με **pH=5** και αρχική συγκέντρωση OTA **50ppb**, η σειρά από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης OTA μετά την πάροδο των 2 ημερών επώασης είναι η εξής:

No2 (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8)) > **No3** (*Zygosaccharomyces bailii* (A9), *Kazachstania hellenica* (A10), *Kazachstania hellenica* (A11) και *Hanseniaspora opuntiae*) > **No1** (*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Pichia fermentas* και *Issatchenkia occidentalis*) > **No4** (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lachencea thermotolerans*, *Pichia guilliermondii* και *Issatchenkia orientalis*)

Όπως προαναφέρθηκε, η σειρά των **κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη σε Yeast Medium με pH=5 και αρχική συγκέντρωση OTA 100ppb** είναι η εξής:

No4 > No1 > No3 > No2

Δηλαδή η σειρά είναι ακριβώς η αντίστροφη σε σχέση με την περίπτωση ίδιου pH, αλλά μειωμένης κατά το ήμισυ αρχικής συγκέντρωσης OTA (50ppb).

Συγκρίνοντας τα κοκτέιλ των 16 ζυμών σε Yeast Medium (pH=6,5) με αρχική συγκέντρωση OTA 50ppb με τα κοκτέιλ των 16 ζυμών σε Yeast Medium (pH=6,5) αλλά με αρχική συγκέντρωση OTA 100ppb, παρατηρούμε ότι για την περίπτωση των 50ppb τα ποσοστά μείωσης ήταν κατά το ήμισυ περίπου μικρότερα (κυμαίνονταν στις τιμές 13,86-15,17%) σε σχέση με την περίπτωση των 100ppb (κυμαίνονταν στις τιμές 30,23-33,1%). Δηλαδή προκύπτει ότι **για την περίπτωση των κοκτέιλ των 16 ζυμών, χωρίς καμία ρύθμιση του pH του υποστρώματος ανάπτυξής τους, μικρότερη αρχική συγκέντρωση OTA συνεπάγεται και μικρότερο ποσοστό μείωσής της.**

Αντίστοιχα, για τα **κοκτέιλ των 16 ζυμών** σε Yeast Medium με pH=5 και αρχική συγκέντρωση OTA 50ppb, τα ποσοστά μείωσης κυμαίνονταν στις τιμές 16,19-18,12% περίπου. Δηλαδή **μειώνοντας το pH του θρεπτικού υποστρώματος των ζυμών κατά 1,5 βαθμό (από 6,5) και διατηρώντας σταθερή την αρχική συγκέντρωση OTA (50ppb), παρατηρούμε μία μικρή αύξηση του ποσοστού μείωσής της.**

Κρατώντας το **pH** του υποστρώματος ανάπτυξης των ζυμών σταθερό στην τιμή **5** και αυξάνοντας την αρχική συγκέντρωση σε OTA στην τιμή **100ppb**, παρατηρούμε ότι **για τα κοκτέιλ των 16 ζυμών**, τα ποσοστά μείωσης κυμαίνονταν στις τιμές 13,07-15,52% περίπου. Δηλαδή **τα ποσοστά μείωσης μειώθηκαν (όχι σε μεγάλο βαθμό) σε σχέση με την περίπτωση του Yeast Medium με pH=5 και αρχική**

συγκέντρωση OTA 50ppb. (Το αντίστροφο συνέβαινε στην περίπτωση που το pH του Yeast Medium παρέμενε σταθερό στην αρχική του τιμή 6,5).

Για τα κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος σε MRS broth με pH=5 και αρχική συγκέντρωση OTA 50ppb, η σειρά από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο ποσοστό μείωσης OTA μετά την πάροδο των 5 ημερών επώασης είναι η εξής:

Pediococcus* > *Bacillus* > *Weissella* > *Lactobacillus* > *Streptococcus

Όπως προαναφέρθηκε, η σειρά των κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος σε MRS broth με pH=5 και αρχική συγκέντρωση OTA 100ppb είναι η εξής:

Lactobacillus* > *Streptococcus* > *Pediococcus* > *Bacillus* > *Weissella

Επομένως, διατηρώντας το pH του υποστρώματος ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων στην τιμή 5 και μειώνοντας την τιμή της αρχικής συγκέντρωσης OTA σε 50ppb, παρατηρούμε διαφορές στα ποσοστά μείωσής της για όλα τα γένη γαλακτικών βακτηρίων.

Συγκρίνοντας τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων σε MRS broth (pH=6,1) με αρχική συγκέντρωση OTA 50ppb με τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων σε MRS broth (pH=6,1) αλλά με αρχική συγκέντρωση OTA 100ppb, παρατηρούμε ότι για την περίπτωση των 50ppb τα ποσοστά μείωσης ήταν μικρότερα (κυμαίνονταν στις τιμές 4,71-14,49%) σε σχέση με την περίπτωση των 100ppb (κυμαίνονταν στις τιμές 12,64-15,97%). Δηλαδή και για την περίπτωση των κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, χωρίς καμία ρύθμιση του pH του υποστρώματος ανάπτυξής τους, προκύπτει ότι μικρότερη αρχική συγκέντρωση OTA συνεπάγεται και μικρότερο ποσοστό μείωσής της.

Αντίστοιχα, για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων σε MRS broth με **pH=5** και αρχική συγκέντρωση OTA 50ppb, τα ποσοστά μείωσης κυμαίνονταν στις τιμές 7-8,65% περίπου.

Κρατώντας το pH του υποστρώματος ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σταθερό στην τιμή 5 και αυξάνοντας την αρχική συγκέντρωση σε OTA στην τιμή 100ppb, παρατηρούμε ότι **για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων**, τα ποσοστά μείωσης κυμαίνονταν στις τιμές 10,65-16,34% περίπου. Δηλαδή τα ποσοστά μείωσης αυξήθηκαν σε σχέση με την περίπτωση του MRS broth με pH=5 και αρχική συγκέντρωση OTA 50ppb. Διαπιστώνουμε επομένως ό,τι είχαμε διαπιστώσει και για την περίπτωση που το pH του MRS broth παρέμενε σταθερό στην αρχική του τιμή 6,1. Δηλαδή, **μικρότερη αρχική συγκέντρωση OTA έχει ως αποτέλεσμα και μικρότερο ποσοστό μείωσής της**.

Συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης OTA των **κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη** με τα **κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος** στα αντίστοιχα υποστρώματα ανάπτυξης με **pH=5** και αρχική συγκέντρωση OTA **50ppb**, παρατηρούμε ότι **το 2^ο κοκτέιλ ζυμών (Αγνώστου ταυτότητας στέλεχος, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola* και *Zygosaccharomyces bailii* (A8)) και ακολούθως το γένος *Pediococcus* των γαλακτικών βακτηρίων εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης OTA**.

Ομοίως, συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης OTA των **κοκτέιλ 16 ζυμών (pH=6,5)** με τα **κοκτέιλ 29 γαλακτικών βακτηρίων (pH=6,1)** με αρχική συγκέντρωση OTA **50ppb**, παρατηρούμε ότι **οι ζύμες εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά μείωσης σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια**.

Για τα **κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων**, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα με **pH=5** και αρχική συγκέντρωση OTA **50ppb**, παρατηρούμε ότι, ομοίως, **οι ζύμες εμφανίζουν**

υψηλότερα ποσοστά μείωσης ΟΤΑ σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια.

Για τα **κοκτέιλ 16 ζυμών και 29 γαλακτικών βακτηρίων**, στα αντίστοιχα θρεπτικά υποστρώματα με **pH=5** και αρχική συγκέντρωση ΟΤΑ **100ppb**, παρατηρούμε ότι, και στην περίπτωση αυτή, **οι ζύμες εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά μείωσης σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια, χωρίς όμως να διαφέρουν κατά πολύ.**

Συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης ΟΤΑ για τα κοκτέιλ 16 ζυμών στα οποία η προσθήκη ποσότητας ΟΤΑ, ώστε η αρχική συγκέντρωση να είναι 50ppb, έγινε πριν την επώαση των κοκτέιλ για 2 ημέρες στους 30° C, με τα κοκτέιλ των 16 ζυμών στα οποία η προσθήκη ΟΤΑ, ώστε να επιτευχθεί αρχική συγκέντρωση ομοίως 50ppb, έγινε μετά την επώαση των κοκτέιλ για 2 ημέρες στην ίδια θερμοκρασία, παρατηρούμε ότι **τα ποσοστά μείωσης ήταν μεγαλύτερα στα κοκτέιλ 16 ζυμών όπου η προσθήκη ΟΤΑ έγινε πριν από την επώαση.** Πράγματι παρατηρούμε ότι τα ποσοστά μείωσης στα κοκτέιλ 16 ζυμών όπου η προσθήκη ΟΤΑ έγινε μετά από την επώαση για 2 ημέρες, κυμαίνονταν στις τιμές 3,39-8,01%. Συμπεραίνουμε επομένως, ότι όταν η ΟΤΑ προστεθεί μετά την πάροδο των 2 ημερών επώασης, διασπάται σε αρκετά μικρό ποσοστό από το σύνολο των 16 ζυμών, ενώ κατά την διάρκεια των 2 ημερών επώασης όπου οι ζύμες αναπτύσσονται, διασπάται αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα ΟΤΑ για τον μεταβολισμό τους.

Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουμε και για τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, συγκρίνοντας τα ποσοστά μείωσης ΟΤΑ για τα κοκτέιλ όπου η ΟΤΑ προστέθηκε πριν την επώασή τους για 5 ημέρες στους 30° C με τα κοκτέιλ όπου η ΟΤΑ προστέθηκε μετά την πάροδο των 5 ημερών επώασης. Όταν η ΟΤΑ προστεθεί μετά την πάροδο των 5 ημερών επώασης, διασπάται σε αρκετά μικρό ποσοστό (ποσοστό μείωσης 5,68-7,48% περίπου) από το σύνολο των 29 γαλακτικών βακτηρίων, ενώ κατά την διάρκεια των 5 ημερών επώασης όπου τα

γαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται, διασπάζεται αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα ΟΤΑ για τον μεταβολισμό τους.

Συγκρίνοντας τα κοκτέιλ των 16 ζυμών με τα κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων, παρατηρούμε ότι τα γαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν λίγο υψηλότερο ποσοστό μείωσης ΟΤΑ (6,58%) σε σχέση με τις ζύμες (5,70%), στην περίπτωση όπου η ΟΤΑ προστεθεί κατόπιν επώασης 2 ημερών για τις ζύμες και 5 ημερών για τα γαλακτικά βακτήρια.

Τα ποσοστά μείωσης ΟΤΑ για τα **κοκτέιλ των 16 ζυμών σε 3 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης** ήταν τα εξής:

- Χρησιμοποιώντας θρεπτικό υπόστρωμα **Yeast Medium**, το σύνολο των 16 ζυμών εμφάνισε ποσοστό μείωσης ΟΤΑ που κυμαινόταν στις τιμές 13,86-15,17% περίπου.
- Χρησιμοποιώντας θρεπτικό υπόστρωμα **MRD**, το σύνολο των 16 ζυμών εμφάνισε ποσοστό μείωσης ΟΤΑ που κυμαινόταν στις τιμές 1,37-2,57% περίπου.
- Τέλος, χρησιμοποιώντας στερεό θρεπτικό υπόστρωμα **YGC**, και οι 16 ζύμες εμφάνισαν ποσοστό μείωσης ΟΤΑ που κυμαινόταν στις τιμές 0,43-1,54% περίπου.

Η σειρά των θρεπτικών υποστρωμάτων εμφάνισης από τα υψηλότερα προς τα χαμηλότερα ποσοστά μείωσης ΟΤΑ είναι η εξής:

Yeast Medium > MRD > YGC

Παρατηρούμε ότι παρόλο που το Yeast Medium είναι ένα πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των ζυμών, αυτές διασπούν μεγαλύτερες ποσότητες ΟΤΑ προστιθέμενης σε αυτό σε σύγκριση με τα άλλα δύο υποστρώματα, που ενώ είναι φτωχότερα σε ουσίες, οι ζύμες δεν διασπούν σημαντικές ποσότητες ΟΤΑ για τις ανάγκες του μεταβολισμού τους. Επιπλέον παρατηρούμε ότι στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα YGC, το σύνολο των 16 ζυμών εμφανίζει τα μικρότερα

ποσοστά μείωσης OTA σε σύγκριση με τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα Yeast Medium και MRD.

Το αντίστοιχο πείραμα για τα **ΚΟΚΤΕΪΛ ΤΩΝ 29 ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ** έδωσε τα εξής αποτελέσματα:

- Ποσοστό μείωσης OTA σε θρεπτικό υπόστρωμα **MRS broth**: κυμαίνεται στις τιμές 4,71-14,49% περίπου.
- Ποσοστό μείωσης OTA σε θρεπτικό υπόστρωμα **MRD**: κυμαίνεται στις τιμές 7,93-8,93% περίπου.
- Ποσοστό μείωσης OTA σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα **MRS Agar**: κυμαίνεται στις τιμές 14,96-19,39% περίπου.

Αντίθετα με τις ζύμες, για τα γαλακτικά βακτήρια η σειρά των θρεπτικών υποστρωμάτων εμφάνισης από τα υψηλότερα προς τα χαμηλότερα ποσοστά μείωσης OTA είναι η εξής:

MRS Agar > MRS broth > MRD

Παρατηρούμε ότι στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar, το σύνολο των 29 γαλακτικών βακτηρίων εμφανίζει τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης OTA σε σύγκριση με τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα MRS broth και MRD.

Όμοια με τις ζύμες, παρόλο που το MRS broth είναι ένα πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, αυτά διασπούν μεγαλύτερες ποσότητες OTA προστιθέμενης σε αυτό σε σύγκριση με το MRD, που ενώ είναι φτωχότερο σε ουσίες, τα γαλακτικά βακτήρια δεν διασπούν σημαντικές ποσότητες OTA για τις ανάγκες του μεταβολισμού τους.

Επομένως, διαπιστώνουμε πως ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών, τα αποτελέσματα διαφέρουν ως προς τα ποσοστά μείωσης της OTA στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξής τους.

Συγκρίνοντας τα **κοκτέιλ των 16 ζυμών** με τα **κοκτέιλ των 29 γαλακτικών βακτηρίων**, παρατηρούμε ότι τα **γαλακτικά βακτήρια εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό μείωσης OTA (8,47%) σε σχέση με τις ζύμες (2,04%)**, στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί **MRD** ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους.

Για την περίπτωση των **στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων ανάπτυξης (YGC, MRS Agar)**, παρατηρούμε ομοίως ότι τα **γαλακτικά βακτήρια (MRS Agar) εμφανίζουν υψηλότερο, κατά πολύ, ποσοστό μείωσης OTA (17,17%) σε σχέση με τις ζύμες (YGC) (0,98%)**.

Η στατιστική επεξεργασία όλων των αποτελεσμάτων του πειράματος έδειξε ότι η επαναληψιμότητά του, η τιμή της αρχικής συγκέντρωσης OTA στα θρεπτικά υποστρώματα ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων, το pH των θρεπτικών υποστρωμάτων ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων, καθώς και η μεταξύ των παραγόντων αυτών αλληλεπίδραση, δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στο ποσοστό μείωσης της ωχρατοξίνης Α. Επιπλέον, από την στατιστική επεξεργασία προέκυψε ότι η χρονική στιγμή προσθήκης OTA στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης τόσο των ζυμών όσο και των γαλακτικών βακτηρίων, δεν επιδρά σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στο ποσοστό μείωσής της. Στατιστικά μη σημαντική είναι και η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης των ζυμών (Yeast Medium, MRD και YGC) και των γαλακτικών βακτηρίων (MRS broth, MRD και MRS Agar) στο ποσοστό μείωσης της OTA. Τέλος, σύμφωνα πάντα με τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας, τα στελέχη των ζυμών, είτε ως μεμονωμένες περιπτώσεις, είτε ως κοκτέιλ ανά τέσσερα στελέχη ή κοκτέιλ των 16 ζυμών μαζί, δεν επιδρούν σε σημαντικό βαθμό στο ποσοστό μείωσης της OTA. Δηλαδή, είτε εμβολιαστούν σε Yeast Medium μεμονωμένα στελέχη ζυμών, είτε κοκτέιλ ζυμών ανά 4 στελέχη ή και οι 16 ζύμες μαζί, οι διαφορές στα ποσοστά μείωσης της OTA δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Ομοίως, τα στελέχη των γαλακτικών

βακτηρίων, είτε ως κοκτέιλ ανά γένος είτε ως κοκτέιλ και των 29 στελεχών μαζί, δεν επιδρούν σε σημαντικό βαθμό στο ποσοστό μείωσης της OTA. Δηλαδή, είτε εμβολιαστούν σε MRS broth κοκτέιλ γαλακτικών βακτηρίων ανά γένος ή και τα 29 γαλακτικά βακτήρια μαζί, οι διαφορές στα ποσοστά μείωσης της OTA δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ABARCA, M.L., ACCENSI, F., BRAGULAT, M.R. and CABANES, F.J. (2001).
Ochratoxin A producing black *Aspergilli* in dried vine fruits. In *Book of Abstracts Bioactive Fungal Metabolites Impact and Exploitation*, pp. 38.
Swansea, UK
- ABARCA, M.L., ACCENSI, F., BRAGULAT, M.R. and CABANES, F.J. (2001).
Current importance of ochratoxin A – producing *Aspergillus* spp. *J. Food Protect.* 64: 903-906
- ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CASTELLA, G. and CABANES, F.J.
(1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2650-2652
- ABOUZIED, M.M., HORVATH, A.D., PODLESNY, P.M., REGINA, N.P.,
METODIEV, V.D., KAMENOVA-TOZEVA, R.M., NIAGOLOVA, N.D.,
STEIN, N.D., PETROPOYLOS, E.A. and GANEV, V.S. (2002).
Ochratoxin concentrations in food and feed from a region with Balkan
Endemic Nephropathy. *Food Addit Contamin.* 19: 755-764
- ABRUNHOSA, L., SERRA, R. and VENANCIO, A. (2002). Biodegradation of
ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* 50:
7493-7496
- AKIYAMA, H., TOYODA, M., KATO, M., IGIMI, S. and KUMAGAI, S. (1997).
The degradation of several mycotoxins by human intestinal microflora
cultured by continuous flow culture system. *Mycotoxins* 44: 21-27
- ATROSHI, F., RIZZO, A., WESTERMACK, T. and ALI-VEHMAS, T. (2002).
Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicol.* 180: 151-167
- BATA, A. and LASZTITY, R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated

food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 223-228

BATTILANI, P., PIETRI, A., BERTUZZI, A.T., LANGUASCO, L., GIORNI, P. and KOZAKIEWICZ, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *J. Food Protec.* 66: 633-636

BAU, M., BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L., MINUES, S. and CABANES, F.J. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine and grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 125-130

BEJAOUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P. and LEBRIHI, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microb.* 97: 1038-1044

BEJAOUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P. and LEBRIHI, A. (2005). Fungal flora and ochratoxin A production during wine grape maturation in French vineyards during three years. *Int. J. Food Microbiol.*, in press.

BEJAOUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P. and LEBRIHI, A. (2005). Conidia of Black Aspergilli as New Biological Adsorbents for Ochratoxin A in Grape Juices and Musts. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8224-8229

BEJAOUI, H., MATHIEU, F., TAILLANDIER, P. and LEBRIHI, A. (2006). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiol. Lett.* 255: 203-208

BENNETT, J.W. and KLICH, M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497-516

BIRO, K., SOLTI, L., BARNA-VETRO, I., BAGO, G., GLAVITS, R., SZABO, E.

- and FINK-GREMMELS, J. (2002). Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathol.* 31: 141-148
- BIRZELE, B., PRANGE, A. and KRAMER, J. (2000). Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of levels in relation to storage parameters. *Food Addit. Contam.* 17: 1027-1035
- BJORKROTH, J. and HOLZAPFEL, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*, p. 267-319. In M. Dworkin (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, vol. 4, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, NY
- BLACKWELL, B.A., GILLIAM, J.T., SAVARD, M.E., MILLER, D.J. and DUVICK, J.P. (1999). Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B₁ (AP₁) by cultures of *Exophiala spinifera*. *Nat. Toxins* 7: 31-38
- BLANK, R., ROLFS, J.P., SUDEKUM, K-H, FROHLICH, A.A., MARQUARDT, R.R. and WOLFFRAM, S. (2003). Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood levels and excretion of the mycotoxin in sheep. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6899-6905
- BOHM, J., GRAJEWSKI, J., ASPERGER, H., CECON, B., RABUS, B. and RAZZAZI, E. (2000). Study on biodegradation of some A- and B-trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin Res.* 16A: 70-74
- BOUDRA, H., LE BARS, P. and LE BARS, J. (1995). Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1156-1158
- BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A., MINERVINI, F., HULT, K. and

- VISCONTI, A. (1994). Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Nat. Toxins* 2: 366-370
- BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A., OLSEN, M., OSKARSSON, A., PALMINGER, I. and HULT, K.V. (1993). Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 76: 842-846
- BURDASPAL, P.A. and LEGARDA, T.M. (1999). Ochratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en Espana y otros, payses europeos. *Alimentaria enero-febrero*: 107-113
- CABANES, F.J., ACCENSI, F., BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L., CASTELLA, G., MINGUEZ, S. and PONS, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *Int. J. Food Microbiol.* 79: 213-215
- CASTEGNARO, M., BAREK, J., FREMY, J.M., LAFONTAINE, M., MIRAGLIA, M., SANSONE, E.G. and TELLING, G.M. (1991). *Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: Some Mycotoxins*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
- CASTELLARI, M., VERSARI, A., FAGIANI, A., PARPINELLO, G.P. and GALASSI, S. (2001). Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3917-3921
- CECCHINI, F., MORASSUT, M., MORUNO, E.G. and DI STEFANO, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology* 23: 411-417
- CERRUTI, G., D'AMATO, A. and ZUCCHETTI, M. (2000). Sulla presenza di ocratossina A, nitrato e nitrito nel vino. *Imbottigliamento* 5: 39-43

- CHEKOL, T., VOUGH, L.R. and CHANEY, R.L. (2004). Phytoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: the rhizosphere effect. *Environ. Int.* 30: 799-804
- CHELKOWSKI, J., SZEBIOTKO, K., GOLINSKI, P., BACHOWSKI, M., GODLEWSKA, B., RADOMYRSKA, W. and WIEWIOROWSKA, M. (1982). Mycotoxins in cereal grain. 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung* 26: 1-7
- CHIAVARO, E., LEPIANI, A., COLLA, F., BETTONI, P., PARI, E. and SPOTTI, E. (2002 α). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorometric method. *Food Addit. Contamin.* 19: 575-581
- CIEGLER, A., FENNEL, D.I., SANSING, G.A., DETROY, R.W. and BENNETT, G.A. (1973). Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: Classification into subgroups. *Appl. Microbiol.* 26: 271-278
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (1997). Revised position paper on ochratoxin A. Codex Committee on Food Additives and Contaminants. CX/FAC 98/16
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (1998). Position paper on ochratoxin A. CX/FAC 99/14
- CURTUI, V.G. and GAREIS, M. (2001). A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and BBB in blood serum of swine. *Food Addit. Contamin.* 17: 635-643
- CURTUI, V.G., GAREIS, M., USLEBER, E. and MARTLBAUER, E. (2001). Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxin A and B and zearalenone. *Food Addit. Contamin.* 8: 730-738

- DALCERO, A., MAGNOLI, C., HALLAK, C., CHIACHIERA, S.M., PALACIO, G. and ROSA, CAR. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Add. Contam.* 19: 1065-1072
- DANILOVIC, V., DJURILLIC, M., MOKRANJAC, M. and STOJIMIROVIC, B. (1957). *Presse Med.* 65: 2039-2040
- DAVIS, N.D. and DIENER, U.L. (1987). Mycotoxins. In: Beuchat, L.R. (Ed.), Food and Beverage Mycology, second ed. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 517-570
- DEBERGHES, P., BETBEDER, A.M., BOISARD, F., BLANC, R., DELABLY, J.F., KRIVOBOK, S., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F. and CREPPY, E.E. (1995). Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Res.* 11: 37-47
- DUMEAU, F. and TRIONE, D. (2002). Influence de differents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. *Rev. Enol.* 95: 37-38
- DUVICK, J., ROOD, T. and WANG, X. (1997). Fumonisin detoxification enzymes. US Patent No. 5716820
- EATON, D.L. and GALLAGHER, E.P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 135-172
- EBERBACH, P. (1998). Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) in four soils. *Pestic. Sci.* 52: 229-240
- EC (European Commission) (1997) SCOOP, task 3.2.2. Assessment of

dietary intake of ochratoxin A by the population in EU member states. European Commission, Directorate-General for Industry, Reports on tasks for scientific co-operation EUR 17523 EN. Revised version, November 1997

EC (European Commission) (2002) SCOOP, task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Reports on tasks for scientific operation. January. http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf

E.E. Οδηγία No 123/2005 (2005) European Commission 2005. Commission regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union* L25: 3-5

E.E. Οδηγία No 472/2002 (2002) European Commission 2002. Commission regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. (*Official Journal of the European Union* L 75 of 16.3.2002)

EFSA. (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* 39: 1-27

EHRlich, V., DARROUDI, F., UHL, M., STEINKELLNER, H., GANN, M., MAJER, B.J., EISENBAUER, M. and KNASMULLER, S. (2002). Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1085-1090

ELMHOLT, S. and HESTBJERG, H. (2000). Field ecology of the ochratoxin A-producing *Penicillium verrucosum*: survival and resource colonisation in soil. *Mycopathologia* 147: 67-81

- EMAN (European Mycotoxin Awareness Network). (2005). Fact sheets on evaluation and risk issues, fact sheet 1, decontamination, processing effect and risk analysis aspects. Available online at: <http://193.132.190.215/eman2/index.asp>
- ENGELHARDT, G. (2002). Degradation of ochratoxin A and B by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Mycotoxin Res.* 18: 37-43
- ESCOT, S., FEUILLAT, M., DULAU, L. and CHARPENTIER, C. (2001). Release of polysaccharides by yeast and the influence of polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7: 153-159
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- FAZEKAS, B., TAR, A.K. and ZOMBORSKY-KOVACS, M. (2002). Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Vet. Hung.* 50: 177-188
- FESTAS, I., HERBERT, P., SANTOS, L., CABRAL, M., BARROS, P. and ALVES, A. (2000). Ochratoxin A in some Portuguese wines: method validation and screening in Port Wine and Vinho Verde. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 150-154
- FINK-GREMMELS, J. (2005). Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in Food: Recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June-1 July 2005. *Food Addit. Contam.* 22: 1-5
- FORTZA, N. and NEGOESCU, M. (1961). *Cercet Med.* 1:217-221

- FOULER, S.G., TRIVEDI, A.B. and KITABATAKE, N. (1994). Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. *J. AOAC Int.* 77, 3: 631-637
- FRISVAD, J.C., LUND, F. and ELMHOLT, S. (2005). Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. *J. Appl. Microbiol.* 98: 684-692
- FUCHS, S., SONTAG, G., STIDL, R., EHRLICH, V., KUNDI, M. and KNASMULLER, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1398-1407
- GALTIER, P. (1999). Biotransformation and fate of mycotoxins. *J. Toxicol-Toxin Rev.* 18: 295-312
- GALTIER, P. and ALVINERIE, M. (1976). In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial microflora. *Ann. Rech. Vet.* 7: 91-98
- GARCIA MORUNO, E., SANLORENZO, C., BOCCACCINO, B. and DI STEFANO, R. (2005). Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 73-76
- GIBSON, D.T., ROBERTS, R.L., WELLS, M.C. and KOBAL, V.M. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50: 211-219
- GOVARIS, A., SOLOMAKOS, N. and PEXARA, A. (2007). Ochratoxin A in foods of animal origin. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 58(4): 313-320
- GUO, L., JURY, W.A., WAGENET, R.J. and FLURY, M. (2000). Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. *J. Contam. Hydrol.* 43: 45-62

- G.U.U.E. IT Gazzetta ufficiale dell' Unione europea. (2005). Regolamento (CE) N. 123/2005. 26/gennaio/2005, L 257/3
- HARWIG, J. (1974). Ochratoxin A and related metabolites. *Mycotoxins* (Purchase IFH, eds), pp. 345-367. Elsevier, Amsterdam.
- HASKARD, C.A., EL-NEZAMI, H., KANKAANPAA, P., SALMINEN, S. and AHOKAS, J. (2001). Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3086-3091
- HESEL TINE, C.W., VANDEGRAFT, E.E., FENNELL, D.I., SMITH, M.L. and SHOTWELL, O.L. (1972). Aspergilli as ochratoxin producers. *Mycol.* 64: 539-550
- HESTBJERG, H., NIELSEN, K.F., THRANE, U. and ELMHOLT, S. (2002). Production of tricothecenes and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on common laboratory media and a soil organic matter agar: an ecological interpretation. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7593-7599
- HOHLER, D., SUDEKUM, K-H., WOLFFRAM, S., FROHLICH, A.A. and MARQUARDT, R.R. (1999). Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep. *J. Anim. Sci.* 77: 1217-1223
- HOLDING, A. (2006). Macintosh II HPLC Setup. Flickr – Photo Sharing, p.1
- HOPE, R., ALDRED, D. and MAGAN, N. (2005). Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 295-300
- <http://en.wikipedia.org> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2009)

http://en.wikipedia.org/wiki/Solid_Phase_Extraction (τελευταία επίσκεψη
Μάιος 2009)

<http://foodsafety.pblogs.gr/2008/10/mykotoxines.html> (τελευταία επίσκεψη
Μάιος 2009)

<http://www.elog.gr/nomothets/quality.html> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2009)

<http://www.moh.gov.cy/moh/mphs/phs.nsf> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2009)

<http://www.romerlabs.com> (τελευταία επίσκεψη Μάιος 2009)

HUFF, J.E. (1991). Carcinogenicity of ochratoxin A in experiments animals. In Mycotoxins Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumour, eds. Castegnaro M, Plestina R, Chernozemsky in, Bartsch H, pp 229-244. IARS, Lyon

HULT, K., TEILLING, A. and GATENBECK, S. (1976). Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 443-444

HUWIG, A., FREIMUND, S., KAPELLI, O. and DULTER, H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122: 179-188

HWANG, C.A. and DRAUGHON, F.A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Food Protec.* 57: 410-414

IARC (1993). Ochratoxin A. In IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, pp. 489-521. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer

ICMSF (1996). Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: Roberts TA, Baird-Parker AC,

Tompkin RB, editors. Microorganisms in foods 5: microbiological specifications of food pathogens. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. London

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). 1993.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 56. IARC Working Group, World Health Organisation, Lyon, France, pp. 489-521

JACOBSEN, A.M., MORTENSEN, G.K. and HANSEN, H.C.B. (2004).

Degradation and mobility of linear alkylbenzene sulfonate and nonylphenol in sludge-amended soil. *J. Environ. Qual.* 33: 232-240

JECFA, (2000). Zearalenone. *WHO Food Additive Series 44*

JECFA, (2001). Ochratoxin A. *WHO Food Additive Series 47*

JORGENSEN, K., RASMUSSEN, G. and THORUP, I. (1996). Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Addit. Contam.* 13: 95-104

KABAK, B., DOBSON, A.D.W. and VAR, I. (2006). Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46: 593-619

KIESSLING, K.H., PETTERSON, H., SANDHOLM, K. and OLSEM, M. (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenon, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1070-1073

KROGH, P., AXELSEN, N.H., ELLING, F., GYRD-HANSEN, N., HALD, B., HYLDGAARD-JENSEN, J., LARSEN, A.E., MADSEN, A., MORTENSEN, H.P., MOLLER, T., PETERSEN, O.K., RAVNSKO, V., ROSTGAARG, M. and AALUND, O. (1974). Experimental porcine

nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A contaminated feed. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 246:1

KROGH, P., ELLING, F., GYRD-HANSEN, N., HALD, B., LARSEN, A.E., LILLEHOJ, E.B., MADSEN, A., MORTENSEN, H.P. and RAVNSKOV, U. (1976). Experimental porcine nephropathy: changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxine A. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica.* 84: 429

KUIPER-GOODMAN, T. and SCOTT, P.M. (1989). Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: Aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 68: 1017-1024

KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M. and WATANABE, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin Zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7: 253-306

LAI, M., SEMENIUK, G. and HESSELTINE, C.W. (1970). Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in synthetic medium. *Appl. Microbiol.* 19: 542-544

LAND, C.J. and HULT, K. (1987). Mycotoxin production by some wood associated *Penicillium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 4: 41-44

LOPEZ-GARCIA, R. and PARK, D.L. (1998). Effectiveness of post-harvest procedures in management of mycotoxin hazard. In: Bhatnagar, D., Sinha, S. (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcell Dekker, New York, pp. 407-433

MAC DONALD, S., WILSON, P., BARNES, K., DAMANT, A., MASSEY, R., MORTBY, E. and SHEPHERD, M.J. (1999). Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Addit. Contam.* 16: 253-260

- MADHYASTHA, M.S., MARQUARDT, R.R. and FROHLICH, A.A. (1992). Hydrolysis of ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 468-472
- MADHYASTHA, M.S., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A., PLATFORD, G. and ABRAMSON, D. (1990). Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1506-1510
- MADSEN, P.L., THYME, J.B., HENRIKSEN, K., MOLDRUP, P. and ROSLEV, P. (1999). Kinetics of di-(2-ethylhexyl)phthalate mineralization in sludge-amended soil. *Environ. Sci. Technol.* 33: 2601-2606
- MARQUARDT, R.R. and FROHLICH, A.A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988
- MATRELLA, R., MONACI, L., MILILLO, M.A., PALMISANO, F. and TANTILLO, M.G. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Cont.* 17: 114-117
- McKENZIE, K.S., SARR, A.B., MAYURA, K., et al. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxic.* 35: 807-820
- McLEAN, M. and DUTTON, M.F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmac. Ther.* 65: 163-192
- MOLLER, T.E. and NYBERG, M. (2003). Ochratoxin A in raisins and currants: basic extraction procedure used in two small marketing surveys of the occurrence and control of the heterogeneity of the toxins in samples. *Food Additives and Contaminants* 20, No. 11, pp. 1072-1076

- MORTENSEN, G.K. and KURE, L.K. (2003). Degradation of nonylphenol in spiked soils and in soils treated with organic waste products. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 718-721
- MORTENSEN, G.K., STROBEL, B.W. and HANSEN, H.C.B. (2006). Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. *Chemosphere* 62: 1673-1680
- MOSS, M.O. (1996). Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 135: 5-9
- MURPHY, P.A., HENDRICH, S., LANDGREN, C. and BRYANT, C.M. (2006). Food Mycotoxins: An update. *J. Food Sci.* 71: R51-R65
- NORTHOLT, M.D., VAN EGMOND, H.P. and PAULSCH, W.E. (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Protect.* 42: 485-490
- O'BRIEN, E. and DIETRICH, D.R. (2005). Ochratoxin A: The continuing enigma. *Crit. Rev. Toxicol.* 35: 33-60
- OZPINAR, H., AUGONYTE, G. and DROCHNER, W. (1999). Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an in vitro system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7: 1-9
- PARK, D.L., LEE, L.S., PRICE, R.L. and POHLAND, A.E. (1988). Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 71: 685-703
- PELTONEN, K., EL-NEZAMI, H., HASKARD, C.A., AHOKAS, J. and SALMINEN, S. (2001). Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 84: 2152-2156
- PETCHKONGKAEW, A., TAILLANDIER, P., GASALUCK, P. and LEBRIHI, A.

- (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thuanao): screening for aflatoxin B₁ and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 104: 1495-1502
- PETKOVA-BOCHAROVA, T. and CASTEGNARO, M. (1991). Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria, in: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H (Eds.), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Scientific Publications No. 115, IARC, Lyon 1991, pp. 135-137
- PETZINGER, E. and WEIDENBACH, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livest Prod. Sci.* 76: 245-250
- PETZINGER, E. and ZIEGLER, K. (2000). Ochratoxin A from a toxicological prospective. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 23: 91-98
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I.N. and CASTEGNARO, M. (2002). *Food Addit. Contam.* 19: 282-302
- PIERIDES, M., EL-NEZAMI, H., PELTONEN, K., SALMINEN, S. and AHOKAS, J. (2000). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *J. Food Protect.* 63: 645-650
- PIOTROWSKA, M. and ZAKOWSKA, Z. (2000). The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Prog. Biotechnol.* 17: 307-310
- PIOTROWSKA, M. and ZAKOWSKA, Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Pol. J. Microbiol.* 54: 279-286
- PISKORSKA-PLISZCZYNSKA, J. and JUSZJIEWICZ, T. (1990). Tissue deposition and passage into eggs of ochratoxin A in Japanese quail. *Environm. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10: 8-10

- PITT, J.L. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 266-269
- PITT, J.J., BASILICO, J.C., ABARCA, M.L. and LOPEZ, C. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol.* 38: 41-46
- PITTET, A., TORNARE, D., HUGGETT, A. and VIANI, R. (1996). Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column clean-up procedure. *J. Agr. Food Chem.* 44: 3564-3569
- PLACINTA, C.M., D'MELLO, J.P.F. and MACDONALD, A.M.C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 21-37
- POHLAND, A.E., NESHEIM, S. and FRIEDMAN, L. (1992). Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.* 64: 1029-1046
- RADLER, F. and SCHITT, M. (1987). Killer toxins of yeasts: inhibition of fermentation and their adsorption. *J. Food Prot.* 50: 234-238
- REFAI, MK., AZIZ, NH., EL-FAR, F. and HASSAN, AA. (1996). Detection of ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by γ -radiation. *Appl. Radiat. Isot.* 47: 617-621
- ROSCENTHALER, R., CREPPY, E.E., LORKOWSKI, G. and DIRHEIMER, G. (1981). *Forum Mikrobiol.* 5: 262-270
- ROUSSEAU, J. and BLATEYRON, L. (2002). Ochratoxine A dans les vins: pas de solutions curative sur vin, priorite a la maitrise sanitaire au vignoble. *Rev. Enol.* 104: 14-16
- RUHLAND, M., ENGELHARDT, G. and WALLNOFER, P.R. (1996).

Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspended cultures of different crop plants. *Mycopathologia* 134: 97-102

SAGE, L., KRIVOBOK, S., DELBOS, E., SEIGLE-MURANDI, F. and CREPPY, E.E. (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1306-1311

SCF (1998). Opinion on ochratoxin A. Expressed on 17 September 1998, the Scientific Committee on Food, the European Commission. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out14_en.html

SCOTT, P.M., KANHERE, S.R., LAWRENCE, G.A., DALEY, E.F. and FARBER, J.M. (1995). Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B-1 and B-2. *Food Addit. Contam.* 12: 31-40

SCUDAMORE, K.A., PATEL, S. and BREEZE, V. (1999). Surveillance of stored grains from the 1997 harvest in the UK for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 16: 281-290

SERRA, R., KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, N. and VENANCIO, A. (2001). Isolation of filamentous fungi from grapes and study of ochratoxin A production in grape and must by indigenous *Aspergillus*. Proceedings: *Bioactive Fungal metabolites-impact and exploitation*, p.93, Swansea, UK

SHETTY, P. and JESPERSEN, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 48-55

SINHA, KK. (1998). Detoxification of mycotoxins and food safety. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* (Sinha KK and Bhatnagar D, eds), pp.381-406. Marcel Dekker, New York.

- SKAUG, M.A., HELLAND, I., SOLVOLL, K. and SAUGSTAD, O.D. (2001). Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Addit. Contamin.* 18: 321-327
- SKRINJAR, M., RASIC, J.L. and STOJICIC, V. (1996). Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiol. (Praha)* 41: 26-28
- SMITH, JE. and MOSS, MO. (1985). *Mycotoxins. Formation and Significance.* Wiley, Chichester, UK.
- STANDER, M.A., BORNSCHEUER, T., HENKE, E. and STEYN, P.S. (2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5736-5739
- STANDER, M.A., STEYN, P.S., VAN DER WESTHUIZEN, F.H. and PAYNE, B.E. (2001). A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 302-304
- STORMER, F.C. (1992). Ochratoxin A – A mycotoxin of concern. In *Handbook of applied mycology. Vol: 5. Mycotoxins in ecological systems*, Bhatnager, D., Lillehoj, E.B., Arora, D.K., Eds., Marcel Dekker: pp. 403-432, New York
- STORMER, F.C. and LEE, T. (1995). Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicol.* 95: 45-50
- SWEENEY, M.J. and DOBSON, A.D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 141-158
- SWEENEY, M.J., WHITE, S. and DOBSON, A.D.W. (2000). Mycotoxins in agriculture and food safety. *Irish J. Agric. Food Res.* 39: 235-244

- TANCHEV, I., EVSTATIEV, Z.V., DOROSIEV, G., PENCHEVA, Z.H. and ZVETKOV, G. (1956). *Savr. Med.* 7: 14-29
- TEREN, J., VARGA, J., HAMARI, Z., RINYU, E. and KEVEI, F. (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134: 171-176
- TURBIC, A., AHOKAS, J.T. and HASKARD, C.A. (2002). Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit. Contam.* 19: 144-152
- VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S. and FOURIE, L. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. Nature.* 205: 1112-1113
- VARGA, J., KEVEI, E., RINYU, E., TEREN, J. and KOZAKIEWICZ, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4461-4464
- VARGA, J., RIGO, K. and TEREN, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 1-7
- VARGA, J., PETERI, Z., TABORI, K., TEREN, J. and VAGVOLGYI, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 99: 321-328
- VERMA, R.J. and SHALINI, M. (1998). Hyperglycemia induced in rabbits exposed to ochratoxin. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 60: 626-631
- VISCONTI, A., PASCALE, M. and CENTONZE, G. (2000). Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 888: 321-326

WANG, J. and GROOPMAN, J.D. (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutat.*

Res. 424: 167-181

WEGST, W. and LINGENS, F. (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A.

FEMS Microbiol. Lett. 17: 341-344

WEGST, W., TITTMANN, U., EBERSPACHER, J. and LINGENS, F. (1981).

Biochem. J. 194: 679-684

WESTLAKE, K., MACKIE, R.I. and DUTTON, M.F. (1987). Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 613-614

WITHANAGE, G.S.K., MURATA, H. and KOYAMA, T. (2001). Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. *Vet. Human Toxicol.* 43: 6-10

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1990). Environmental health criteria 105: Selected mycotoxins: Ochratoxins, trichothecenes, ergot. Geneva: WHO

XIAO, H., MARQUARDT, RR., FROHLICH, AA. and LING, YZ. (1996).

Metabolites of ochratoxins in rat urine and in culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 648-655

YAMAZAKI, M., SUZUKI, S., SAKAKIBARA, Y. and MIYAKI, K. (1971). *Jap. J.*

Med. Sci. Biol. 24: 245

ZIMMERLI, B. and DICK, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence

detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and swiss data. *J. Chromatogr. B* 666: 85-99

ZIMMERLI, B. and DICK, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13: 655-668

ΚΟΤΖΕΚΙΔΟΥ – ΡΟΥΚΑ, Π. (2000). 'Μικροβιολογία Τροφίμων'. Θεσσαλονίκη