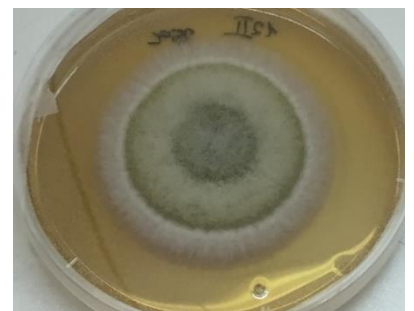


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΠΜΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μοριακή ταυτοποίηση και *in vitro* εκτίμηση της ανάπτυξης μυκήτων από αρτοσκευάσματα τύπου BRIOCHE



ΜΠΕΡΤΟΛΗ ΜΑΡΙΑ- ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΠΜΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μοριακή ταυτοποίηση και *in vitro* εκτίμηση
της ανάπτυξης μυκήτων από
αρτοσκευάσματα τύπου BRIOCHE

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ, ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ ΠΑΝΑΓΟΥ, ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΣΙΤΣΙΓΙΑΝΝΗΣ, ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΜΠΕΡΤΟΛΗ ΜΑΡΙΑ-ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα πρόσωπα που συντέλεσαν στη διεκπεραίωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και επιβλέπων μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή που τον προσέγγισα και μου ανέθεσε την παρούσα μελέτη, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του, τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου για τις πολύτιμες συμβουλές του και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Τσιτσιγιάννη, όντας επιβλέπων μου στη προπτυχιακή μου μελέτη, για όλα όσα μου δίδαξε και την πολύτιμη βοήθειά του.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια Διδάκτορα Ιφιγένεια Μακαρίτη και Μεταδιδάκτορα Αναστασία Καπετανάκου του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, για την αμέριστη υπομονή και πολύτιμη βοήθειά τους, τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους, τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τις χρήσιμες συμβουλές τους σε κάθε απορία μου και το ευχάριστο περιβάλλον.

Σε αυτό το σημείο οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου Μπεναρδή Πάνο, Τσαμπάση Μαρίνα, Σιγιάννη Ελευθερία, Λουκόπουλο Ηλία, καθώς και τις συμφοιτήτριες- φίλες μου για την υπομονή και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Τέλος, νιώθοντας ιδιαίτερη χαρά και τιμή θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μπερτόλη Σταματία και Μπερτόλη Απόστολο, για την αμέριστη συμπαράσταση και τη στήριξή τους στην υλοποίηση όλων των επιθυμιών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Γενικά.....	8
1.2. Αρτοσκευάσματα (Ορισμός-Χαρακτηριστικά)	10
1.3. Μύκητες	11
1.3.1. Γενικά.....	11
1.3.2. <i>Penicillium</i> sp.....	12
1.3.3. <i>Aspergillus</i> sp.....	14
1.3.4. <i>Cladosporium</i> sp.	15
1.3.5. <i>Eurotium</i> sp.....	16
1.3.6. <i>Wallemia sebi</i>	16
1.4. Μυκοτοξίνες	17
1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων	18
1.5.1. Αλληλεπίδραση a_w , pH και θερμοκρασίας.....	19
1.5.2. Επίδραση pH και a_w στην ανάπτυξη των μυκήτων	22
1.6. Πρόσθετα τροφίμων ως παρεμποδιστές	25
1.6.1. Μηχανισμός δράσης των συντηρητικών	27
1.7. Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων.....	28
1.8. Υπόθεση – Σκοπός Εργασίας	33
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός μυκήτων	35
2.1.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	35
2.1.2. Απομόνωση μυκήτων	35
2.1.3. Μοριακός χαρακτηρισμός μυκήτων	36
2.1.3.1. Προετοιμασία μυκηλίων για απομόνωση DNA (DNA Extraction)	36
2.1.3.2. Απομόνωση DNA (DNA Extraction)	36
2.1.3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction =PCR)	37
2.1.3.4. Καθαρισμός προϊόντων PCR , Αλληλούχηση και Ταυτοποίηση.....	39
2.2. <i>In vitro</i> μελέτη δυναμικού ανάπτυξης μυκήτων	40
2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	40
2.2.2. Προετοιμασία υλικών	42
2.2.3. Προετοιμασία εμβολίου.....	43
2.2.4. Γραφικός πειραματικός σχεδιασμός.....	43
2.3. <i>In situ</i> μελέτη δυναμικού αλλοίωσης των BRIOCHE	44

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
3.1. Απομόνωση και μορφολογική ταξινόμηση μυκήτων	45
3.2. Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων.....	49
3.3. <i>In vitro</i> μελέτη δυναμικού ανάπτυξης μυκήτων	53
3.4. <i>In situ</i> μελέτη δυναμικού αλλοίωσης των BRIOCHE	66
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα προϊόντα τύπου Brioche κατατάσσονται στα τρόφιμα Ενδιάμεσης Υγρασίας και δύναται να αλλοιωθούν από μύκητες με αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος.

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν: α) η μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων απομονωμένων από πρώτες ύλες και τελικά προϊόντα, β) η *in vitro* μελέτη των απομονωθέντων μυκήτων σε διαφορετικούς συνδυασμούς a_w και θερμοκρασιών, και γ) η *in situ* μελέτη του δυναμικού αλλοίωσης των μυκήτων του γένους *Penicillium* sp. σε αρτοποιήματα τύπου Brioche.

Φρέσκα προϊόντα τύπου Brioche με γέμιση πραλίνα, μπισκότο και φράουλα ή πρώτες ύλες (αλεύρι, γεμίσεις) αποστέλλονταν κάθε μέρα και αναλύονταν είτε την ημέρα που εστάλησαν είτε κατά τη συντήρησή τους (20-37°C, 50-60 ημέρες) για πιθανή εμφάνιση μυκήτων. 106 απομονώσεις μυκήτων ταυτοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές χρησιμοποιώντας την Internal Transcribed Spacer (ITS) περιοχή. Για το *in vitro* δυναμικό ανάπτυξης των μυκήτων μελετήθηκαν 42 από τις 106 απομονώσεις, εκπροσωπώντας τα κυρίαρχα γένη μυκήτων που ταυτοποιήθηκαν. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με σταγόνα εναιωρήματος σπορίων σε Malt Extract Agar (MEA) με pH 6.2 (ρυθμίστηκε με 1N NaOH) και a_w 0.99 (χωρίς γλυκερόλη) and 0.82 (ρυθμίστηκε με 37% v/v γλυκερόλη). Η χαμηλή a_w χρησιμοποιήθηκε για να προσομοιάσει τις αντίστοιχες τιμές a_w των προϊόντων τύπου Brioche και των πρώτων υλών. Η ανάπτυξη των μυκήτων παρακολουθήθηκε στους 25°C (προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης από τη βιομηχανία και στους 37°C (ως θερμοκρασία καταπόνησης) μετρώντας τη διάμετρο των μυκήτων για μέγιστο διάστημα 60 ημερών. Για το *in situ* δυναμικό αλλοίωσης των Brioche από τους μύκητες, επιλέχθηκαν πέντε (5) απομονώσεις του *Penicillium* sp., που παρουσίασαν υψηλότερο δυναμικό ανάπτυξης στην *in vitro* μελέτη στην a_w που προσομοίαζε τα προϊόντα τύπου Brioche, αναμείχθηκαν τα εναιωρήματα σπορίων των πέντε (5) απομονώσεων και εμβολιάστηκαν στο Brioche: πάνω, κάτω, πλάι, σοκολατάκια και γέμιση. Τα εμβολιασμένα Brioche συσκευάστηκαν σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Modified Atmosphere Packaging, MAP) σε: α) 80% N:20% CO₂, β) 80% N₂:10% CO₂:10% O₂ και γ) στον αέρα. Στη συνέχεια συντηρήθηκαν στους 25°C (προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης από τη βιομηχανία) και στους 15 και 37°C (θερμοκρασίες καταπόνησης) και τέλος, παρακολουθούνταν η τυχόν ανάπτυξη ορατού μυκηλίου.

Από την ταυτοποίηση προέκυψε ότι το 66% των μυκήτων ανήκει στο γένος *Penicillium* sp., το 22% στο *Cladosporium* sp. και το 7% στο *Aspergillus* sp. Από την *in vitro* μελέτη του δυναμικού ανάπτυξης παρατηρήθηκε ότι η υψηλή a_w επέτρεψε την ανάπτυξη όλων των απομονώσεων (n=42) στους 25°C, ενώ στους 37°C μόνο το 33% των απομονώσεων παρουσίασε δυναμικό ανάπτυξης, όπου οι περισσότερες από αυτές ανήκαν στο γένος *Penicillium* sp. Στο MEA με a_w 0.82 στους 37°C, δεν

αναπτύχθηκε καμία απομόνωση εκτός του *Aspergillus flavus*. Αντίθετα, στη θερμοκρασία συντήρησης 25°C και σε a_w 0.82, το 80% των απομονώσεων παρουσίασε δυναμικό ανάπτυξης. Στην *in situ* μελέτη του δυναμικού αλλοίωσης των Brioche, αποδείχθηκε ότι ο συνδυασμός της συσκευασίας με τροποποιημένες ατμόσφαιρες και η χρήση συντηρητικών από τη βιομηχανία, παρεμπόδισαν την αλλοίωση του προϊόντος και στις τρεις (3) μελετούμενες θερμοκρασίες συντήρησης (15°C, 25°C and 37°C).

ABSTRACT

Brioche-like products are considered to be intermediate moisture foods, which are significantly susceptible to fungal spoilage and sensory deterioration.

The aims of this study was the a) molecular identification of fungi isolated from filled brioche products and their raw materials, b) determination of *in vitro* growth potential of fungi and c) determination of the *in situ* spoilage potential in brioche products filled with biscuit.

Freshly produced praline-, biscuit- or strawberry- filled brioche or raw materials (flour, fillings) were supplied daily by the manufacturer and analyzed immediately or during their shelf life (20-37°C, 50-60 days) for fungal presence. A total of 106 fungal isolates were molecularly identified by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region. *In vitro* fungal growth of selected isolates (42 out of 106), representing the major fungal genera identified, was assessed with spot inoculation on Malt Extract Agar of pH 6.2 (adjusted with 1N NaOH) and a_w 0.99 (without glycerol) and 0.82 (adjusted with 37% v/v glycerol). The low a_w was studied to imitate the respective values of brioche and brioche fillings. Fungal growth was monitored at 25°C (recommended temperature by the industry) and 37°C (as temperature abuse) by measuring radial diameter for max. 60 days. For the *in situ* spoilage potential were selected the 5 isolates of *Penicillium* sp., were mixed together and inoculated in brioche (upper, bottom, side, choco chip and filling). The brioche were packed in MAP (Modified Atmosphere Packaging) a) 80% N₂: 20% CO₂ b) 80% N₂:10% CO₂:10% O₂ and c) in the air and were monitored at 25°C (recommended temperature by the industry) and 15°C and 37°C (as temperatures abuse) for 60 days.

66% of fungal isolates were identified as *Penicillium* sp., followed by 22% of *Cladosporium* sp. and 7% of *Aspergillus* sp. *In vitro* growth assessment revealed that high a_w permitted the growth of all isolates (n=42) at 25°C, whereas only 33% had a growth potential at 37°C, most of which belonged to genus of *Penicillium* sp. On brioche-like media (a_w 0.82), no growth was observed at all isolates except for an *Aspergillus flavus* isolate at 37°C. Contrary to temperature abuse conditions, more than 80% of the isolates, which included all the identified genera, were able to grow at 25°C and a_w 0.82, highlighting the potential visual deterioration of brioche products during their shelf life. *In situ* spoilage potential revealed that the combination of MAP and the preservatives added by the industry, were able to interfere the fungi growth in brioche products and even the products packed in air were shown no spoilage in all temperatures (15°C, 25°C and 37°C).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Τα ενδιάμεσης υγρασίας (Intermediate Moisture Foods, IMF) ή μέσης υγρασίας τρόφιμα, όπως μαρμελάδες, προϊόντα αρτοποιίας (π.χ. brioche) και γεμίσεις σοκολάτας, περιέχουν μεταξύ 20% και 50% κ.β. νερού. Επιπλέον, επαρκώς διαλυμένες ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα έχουν σκοπό τη μείωση της ενεργότητας νερού (a_w) κάτω από τα επίπεδα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Κατά συνέπεια, η σταθερότητα αυτών των προϊόντων βασίζεται κυρίως στην υψηλή οσμωτική πίεση που συνδέεται με τις προαναφερθείσες υψηλές ποσότητες διαλυτών ενώσεων στην υδατική φάση, οι οποίες επιφέρουν τιμές a_w μεταξύ 0.70 και 0.85. Η αλλοίωση σε αυτά τα προϊόντα δύναται να προέλθει από την ανάπτυξη ωσμόφιλων ζυμών και ξηροφιλικών μυκήτων (Martorell et al., 2010).

Αρκετές φορές το χρόνο γίνονται ανακλήσεις αυτών των προϊόντων από τον Ενιαίο Φορέα Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) για ποικίλους λόγους π.χ. σταφίδας σουλτανίνας λόγω υψηλών επιπέδων ωχρατοξίνης Α, αράπικα φιστίκια λόγω παρουσίας αφλατοξίνης στην πρώτη ύλη, δημητριακά προγεύματος (νιφάδες καλαμποκιού) λόγω αυξημένης συγκέντρωσης μυκοτοξίνης DON (Deoxynivalenol), κέικ με γέμιση φράουλα και κρουασάν λόγω ανάπτυξης μυκήτων πρασινωπής χροιάς στο εξωτερικό και εσωτερικό στρώμα του προϊόντος και παρουσία δυσάρεστης οσμής. (ΕΦΕΤ, Δελτία Τύπου, Ανακλήσεις)

Εκτός από τη χαμηλή ενεργότητα νερού, που αποτελεί σημαντικό εμπόδιο για την αποφυγή της ανάπτυξης αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας, άλλοι παράγοντες που λειτουργούν εξίσου παρεμποδιστικά είναι η χρήση οργανικών οξέων, η μείωση του pH, η χρήση συσκευασίας με τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP), ο ψεκασμός με αιθανόλη, η προσθήκη φυσικών χημικών συντηρητικών κ.ά. Συνδυασμός, δε, των παραπάνω παρεμποδιστικών παραγόντων, μπορεί να λειτουργήσουν προσθετικά ή συνεργιστικά για την αναστολή ανάπτυξης των μυκήτων. Τέτοιοι συνδυασμοί έχουν συνήθως προσδιοριστεί εμπειρικά με δοκιμές (challenging tests). Εντούτοις, από

βιομηχανικής άποψης, η ποσοτικοποίηση αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι πολύ ενδιαφέρουσα γιατί επιτρέπει την πρόβλεψη της σταθερότητας των προϊόντων (Vermeulen et al., 2012).

Η ανάπτυξη μυκήτων σε αρτοσκευάσματα έχει υπάρξει αντικείμενο πολλών μελετών. Τα γνωστότερα και πιο σημαντικά είδη μυκήτων από αυτά που συναντώνται σε αρτοσκευάσματα είναι τα είδη των γενών *Eurotium*, *Aspergillus* και *Penicillium*. Άλλα γένη που έχουν απομονωθεί από αρτοσκευάσματα είναι *Cladosporium*, *Mucor* και *Rhizopus*, αλλά εξαιτίας των απαιτήσεών τους για υψηλό a_w για την ανάπτυξή τους, είναι πιο σπάνιο για αυτούς τους μύκητες να επιμολύνουν τα αρτοποιήματα. (Abellana et al. , 2001)

Τόσο η ποιότητα όσο και η σταθερότητα των προϊόντων, επηρεάζονται από την ποιότητα των πρώτων υλών, τη συνταγή και τις συνθήκες συντήρησης. Η ανθεκτικότητα των προϊόντων αρτοποιίας με μεσαία και υψηλή υγρασία επηρεάζεται συχνά από την ανάπτυξη μυκήτων. Πολλά είδη είναι ικανά να αναπτυχθούν σε a_w ίση με 0.80, ενώ ορισμένα ξηρόφιλα είδη σε τιμή ίση ακόμη και με 0.65. Οι ζημιές που προκαλούνται από την ανάπτυξη των μυκήτων κυμαίνεται ανάμεσα σε 1% και 5% οικονομικές απώλειες ανάλογα με την εποχή, τον τύπο του προϊόντος και τον τρόπο παραγωγής (Hozova et al., 2000)



Εικόνα 1: Ενδιάμεσης Υγρασίας Τρόφιμα

1.2. Αρτοσκευάσματα (Ορισμός-Χαρακτηριστικά)

Ως «αρτοσκευάσματα» νοούνται τα προϊόντα τα οποία παρασκευάζονται κατ' ανάλογο τρόπο με τον άρτο, με απλό ή διπλό κλιβανισμό, διαφέρουν όμως απ' αυτόν προς την μακροσκοπική υφή και τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες.

Στην έννοια του όρου «αρτοπαρασκεύασμα» περιλαμβάνεται το είδος που παρασκευάζεται από αμιγή άλευρα δημητριακών ή πρόσμειξη αλεύρων δημητριακών, εφόσον η παρασκευή τους δεν εμπίπτει με την παρασκευή των ειδών ψωμιού.

Εκτός από τις πρώτες ύλες (Πίνακας 1) που επιτρέπονται για την παρασκευή του άρτου και για την παρασκευή των αρτοσκευασμάτων επιτρέπεται και η χρήση και άλλων πρώτων υλών από τις επιτρεπόμενες από τον παρόντα Κώδικα διατάξεις (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών Και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 112-2 Δημητριακά-Προϊόντα Εξ αυτών Έκδοση 2 / Μάιος 2011)



Εικόνα 2: Αρτοσκευάσματα

Πίνακας 1: Πρώτες ύλες αρτοσκευασμάτων

ΑΡΤΟΣ/ ΑΡΤΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ	
Γάλα και προϊόντα του	
Αυγά	
Φυσικές γλυκαντικές ύλες	

Γλεύκος	
Λιπαρές ύλες	
Αρτυματικές ύλες	

Όλες οι χρησιμοποιούμενες για την παρασκευή των αρτοσκευασμάτων πρώτες ύλες πρέπει να πληρούν τις για κάθε μία απ' αυτές διατάξεις και όρους του παρόντα Κώδικα (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών Και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 112-2 Δημητριακά-Προϊόντα Εξ αυτών Έκδοση 2 / Μάιος 2011).

Επιτρέπεται η χρήση συγκεκριμένων προσθέτων ανά προϊόν σύμφωνα με το άρθρο 33 του Κώδικα Τροφίμων, με σκοπό την διατήρηση της σταθερότητας, ποιότητας και ασφάλειας του τελικού προϊόντος κατά τη διάρκεια του εμπορικού χρόνου ζωής του.

1.3. Μύκητες

1.3.1. Γενικά

Οι μύκητες ευρύτερα ανήκουν στους ευκαρυωτικούς ετερότροφους μικροοργανισμούς, οι οποίοι δε διαθέτουν χλωροφύλλη και άρα δεν μπορούν να φωτοσυνθέσουν. Δε διαθέτουν άμυλο, αλλά συνθέτουν γλυκογόνο και σχηματίζουν νηματοειδείς διακλαδιζόμενες υφές, που ονομάζονται μυκήλια και παράγουν διαφόρων ειδών σπόρια. Οι μύκητες διακρίνονται από την ικανότητά τους να παράγουν αντιβιοτικά και άλλες ουσίες χρήσιμες στη βιομηχανία τροφίμων, όπως οργανικά οξέα και βιταμίνες, καθώς και για την ικανότητα παραγωγής ενζύμων που είναι απαραίτητα για την αποδόμηση της οργανικής ύλης στο φυσικό περιβάλλον. (Τζάμος, 2007)

Διαβιούν ως παράσιτα ή ως σαπρόφυτα και αναπαράγονται αγενώς ή εγγενώς. Και οι δύο τρόποι αναπαραγωγής προϋποθέτουν τον σχηματισμό σπορίων (spores) ή κονιδίων (conidia) επί απλών ή σύνθετων κονιδιοφόρων (conidiophores). Η ανάπτυξη των μυκήτων περιλαμβάνει την εκβλάστηση των σπορίων και την επέκταση των υφών

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

Οι σημαντικές ομάδες μυκήτων διακρίνονται στους: Ζυγομύκητες (Zygomycetes, τάξη της υποδιαίρεσης Eumycotina), Ασκομύκητες (Ascomycetes, υποδιαίρεση Ascomycotina) και Δευτερομύκητες (Deuteromycetes, υποδιαίρεση Deuteromycotina). Οι Ασκομύκητες και οι Δευτερομύκητες, εν αντιθέσει με τους Ζυγομύκητες παρουσιάζουν χωρισμένο, με διαφράγματα (σέπτα- septa), μυκήλιο (Καπετανάκου, 2012).

Η ανάπτυξη μυκήτων σε αρτοποιήματα αποτελεί συχνό φαινόμενο. Συνήθως τα γένη που αναπτύσσονται είναι τα *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Eurotium* sp. και *Wallemia sebi*.

1.3.2. *Penicillium* sp.

Το γένος *Penicillium* ανήκει στους ασκομύκητες και είναι μείζονος σημασίας στο φυσικό περιβάλλον, καθώς και στα τρόφιμα και στα φάρμακα. Ορισμένα είδη παράγουν πενικιλίνη, ένα μόριο που χρησιμοποιείται ως αντιβιοτικό και η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη ορισμένων ειδών βακτηρίων μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Τα είδη του γένους *Penicillium* είναι μύκητες που υπάρχουν παντού και προτιμούν

δροσερά και μέτρια κλίματα. Τα σαπροφυτικά είδη *Penicillium* και *Aspergillus* είναι από τους πιο γνωστούς εκπροσώπους της τάξης *Eurotiales* και ζουν κυρίως σε οργανικές βιοδιασπώμενες ουσίες.

Στην Αμερική οι μύκητες αυτοί είναι από τις κύριες αιτίες της αλλοίωσης των τροφίμων. Πολλά είδη παράγουν μυκοτοξίνες με υψηλό βαθμό τοξικότητας. Μερικά είδη έχουν μπλε χρώμα και συνήθως αναπτύσσονται σε παλιό πολυκαιρισμένο ψωμί, στο οποίο προσδίνουν ασαφή μπλε υφή. Η ικανότητα αυτών των ειδών του *Penicillium* να αναπτύσσονται σε σπόρους και άλλα αποθηκευμένα τρόφιμα εξαρτάται από την τάση τους να ευδοκιμούν σε χαμηλή υγρασία και τη γρήγορη αποίκισή τους με εναέρια διασπορά, ενώ οι σπόροι είναι αρκετά υγροί (Pitt et al., 2000). Το *Penicillium crustosum* είναι ο βασικός ο παραγωγός πενιτρίνης Α, που είναι μια ισχυρή νευροτοξίνη. Η τοξικότητα της πενιτρίνης Α σε ζώα έχει καταγραφεί και έχει πρόσφατα αναφερθεί και ένα συνδρόμο που προκαλεί τρέμουλο σε ανθρώπους. Όλες τα στελέχη του *P. crustosum* παράγουν την πενιτρίνη Α σε υψηλά επίπεδα, και άρα η παρουσία αυτών των ειδών σε τρόφιμα (ή ζωοτροφές) είναι προειδοποιητικό σημάδι. Η πενιτρίνη Α παράγεται σε υψηλά επίπεδα υγρασίας, $a_w \leq 0.92$, με βέλτιστη αυτή περίπου σε $a_w \leq 0.995$.

Εκτός από την σημασία τους στη βιομηχανία τροφίμων, τα είδη των *Penicillium* και *Aspergillus* χρησιμεύουν στην παραγωγή ενός υψηλού αριθμού βιοτεχνολογικά παραγόμενων ενζύμων και άλλων μακρομορίων, όπως γλυκονικό, κιτρικό και τρυγικό οξύ, καθώς και για πηκτινάσες, λιπάση, αμυλάση, κυτταρινάσες, και πρωτεάσες (Leitao, 2009).



Εικόνα 3: Κονιδιοφόρος του *Penicillium* sp.

1.3.3. *Aspergillus* sp.

Το γένος *Aspergillus* ανήκει στους ασκομύκητες. Σύμφωνα με τα γονοτυπικά (DNA) δεδομένα όλα τα μέλη του γένους *Aspergillus* είναι το πιθανότερο στενά συνδεδεμένα και θεωρούνται μέλη των Ασκομυκήτων. Τα είδη του γένους έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε υψηλή οσμωτική συγκέντρωση (υψηλή ζάχαρη, αλάτι, κ.λπ.), είναι εξαιρετικά αερόβια και βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα πλούσια σε οξυγόνο περιβάλλοντα, όπου συνήθως εμφανίζουν ορατή ανάπτυξη ως μεταχρωματισμός με κονιδιοφόρους επί της επιφανείας ενός υποστρώματος, ως αποτέλεσμα της υψηλής τάσης του οξυγόνου. Συνήθως, οι μύκητες αναπτύσσονται σε υποστρώματα πλούσια σε άνθρακα, όπως μονοσακχαρίτες (όπως η γλυκόζη) και πολυσακχαρίτες (όπως αμυλόζη). Τα είδη του *Aspergillus* είναι κοινοί επιμολυντές των αμυλούχων τροφίμων (όπως το ψωμί και οι πατάτες) και μπορούν να αναπτυχθούν μέσα ή πάνω σε πολλά φυτά και δέντρα.

Ο *A. fumigatus* ανήκει στα πιο κοινά είδη να προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο με ανοσοανεπάρκεια. Το 2008, ο *A. fumigatus* φάνηκε να έχει μια ετεροθαλικό, πλήρως λειτουργικό τον αναπαραγωγικό του κύκλο (O’Gorman et al., 2008). Ο *Aspergillus fumigatus* παράγει γλιοτοξίνη, όπου στοιχεία δείχνουν να είναι σημαντικός παράγοντας σε πνευμονολογικές ασθένειες ζώων και πουλιών. Ο *A. fumigatus* παράγει επίσης τη φουμαγγιλίνη, μια ένωση με αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δραστηριότητα (Pitt et al., 2009).

Ο *A. flavus* είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός καρκινογόνων αφλατοξινών σε καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο. Είναι επίσης ένα ευκαιριακό παθογόνο του ανθρώπου και των ζώων, προκαλώνταςaspergίλλωση σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Horn et al., 2009). Οι αφλατοξίνες παράγονται στα τρόφιμα κυρίως από δύο είδη του γένους *Aspergillus*, *A. flavus* και *A. parasiticus*. (ICMSF, 1996). Και οι δύο μύκητες αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10-12 °C έως 42-43°C με κάποια είδη *Aspergillus* να έχουν βέλτιστη θερμοκρασία 32-38 °C (Pitt et al., 2009). Οι αφλατοξίνες μπορούν να παραχθούν σε θερμοκρασίες 12-40 °C. Οι *A. flavus* και *A. parasiticus* μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα μεγάλο εύρος pH 2.1 με 11.2, με βέλτιστο αυτό μεταξύ pH 3.5 και 8 (Wheeler et al., 1991). Οι αφλατοξίνες μπορούν να

παραχθούν σε pH 3.5-8 (ICMSF, 1996), με βέλτιστο αυτό κοντά στο 6.0 (Buchanan & Ayres, 1976).

Η Ασπεργίλλωση ανήκει σε μια ομάδα ασθενειών που προκαλούνται από είδη του γένους *Aspergillus*. Ο πιο κοινός υπότυπος μεταξύ των λοιμώξεων που συνδέονται με την ασπεργίλλωση είναι ο *A. fumigatus* (Bozkurt et al., 2008). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, βήχα, πόνο στο στήθος ή δύσπνοια, που παρατηρούνται και σε πολλές άλλες ασθένειες και έτσι η διάγνωση μπορεί να είναι δύσκολη. Συνήθως, μόνο ασθενείς με ήδη εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ή που έχουν υποστεί άλλες παθήσεις των πνευμόνων είναι ευαίσθητοι.



Εικόνα 4: Κονιδιοφόρος του *Aspergillus* sp.

1.3.4. *Cladosporium* sp.

Τα *Cladosporium cladosporioides* και *Clad. sphaerospermum* είναι κοινοί δευτερογενείς εισβολείς του φυτικού ιστού, τις περισσότερες φορές ζουν σαπροφυτικά και σπάνια προκαλούν ασθένειες. Ωστόσο, μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση μετά τη συγκομιδή, για παράδειγμα σε φράουλες, τομάτες, πεπόνια, πιπεριές και μελιτζάνες και μπορούν επίσης να προκαλέσουν αλλοίωση σε ένα περιορισμένο εύρος των επεξεργασμένων τροφίμων. Επειδή τα είδη του γένους *Cladosporium* είναι ικανά να αναπτύσσονται ακόμη και σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο -5°C, μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση προϊόντων υπό ψύξη, όπως κρέατα που διατηρούνται σε κοινή ψύξη και τυρί (Ailsa D. Hocking & Faedo, 1992). Τα ξηροσπόρια των ειδών του *Cladosporium*, και ιδιαίτερα του *Cladosporium*

cladosporioides, είναι εξαιρετικά κοινά στον αέρα και στο έδαφος, ως εκ τούτου συχνά μολύνουν τα δημητριακά, τους ξηρούς καρπούς και τα αποθηκευμένα προϊόντα (Hocking et al., 1994).



Εικόνα 5: Κονιδιοφόρος του *Cladosporium* sp.

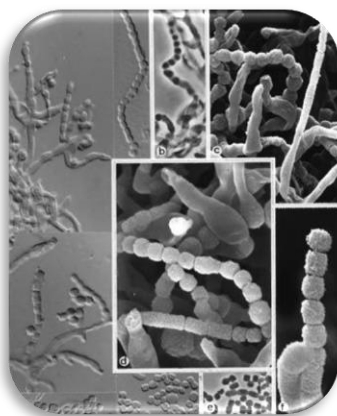
1.3.5. *Eurotium* sp.

Τα είδη του γένους *Eurotium* αποτελούν μορφές της εγγενούς αναπαραγωγής των μυκήτων του γένους *Aspergillus* (αγενής μορφή). Τα είδη του γένους *Eurotium* είναι πιθανό να είναι παρόντες, μαζί με γένη του *Aspergillus*, αν η ανάπτυξη τους είναι μακροπρόθεσμη και τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος είναι ευνοϊκά για τη μετατροπή τους στην εγγενή μορφή. Έχουν πολλές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων, όπως αλλεργίες και η τοξικότητα των *Eurotium* συνδέεται στενά με αυτή των *Aspergillus*. Μπορεί να βρεθεί σε υποστρώματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (ξηροφιλικό), σε αποθηκευμένους σπόρους, στα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, σε δέρμα και σε υλικά με επικάλυψη ρητίνης. (<https://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po?event=fungi&type=secondary&species=68&name=Eurotium>)

1.3.6. *Wallemia sebi*

Ο *Wallemia sebi* είναι υφομόκητας και βρίσκεται συνήθως στη σκόνη του αέρα, στο έδαφος και στα αποξηραμένα και αλμυρά τρόφιμα (ψωμί, κέικ, ζάχαρη, παστά

ψάρια, χουρμάδες, μπέικον, μαρμελάδες). Είναι ξηροφιλικός και ευδοκιμεί σε άνυδρα περιβάλλοντα ή υποστρώματα με χαμηλή a_w . Σε αυτά τα θρεπτικά ο *W. sebi* σχηματίζει καφέ αποικίες με μια λεπτή βελούδινη υφή. Τα κονίδια (αγενή σπόρια) παράγονται σε μεγάλες αλυσίδες και είναι συχνά σε ομάδες των τεσσάρων. Μόνο η αγενής μορφή παρατηρείται σε εργαστηριακή καλλιέργεια (Padamsee et al., 2012). Υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, ο *W. sebi* παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες προκαλούν αιμόλυση (Botić et al., 2012)



Εικόνα 6: Κονιδιοφόρος του *Wallemia sebi*

1.4. Μυκοτοξίνες

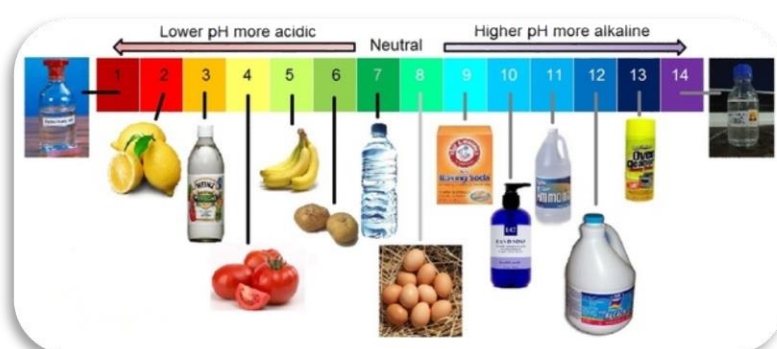
Όλες οι μυκοτοξίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους φυσικά προϊόντα (δηλαδή, μικρά μόρια) που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από μύκητες. Αυτοί οι μεταβολίτες συνθέτουν μια τοξινογενή και χημικά ετερογενή ομάδα, γιατί μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες ασθένειες σε ανθρώπους και άλλα σπονδυλωτά. Οι μυκοτοξίνες είναι δύσκολο να ταξινομηθούν λόγω των ποικίλων χημικών δομών τους και της βιοσυνθετικής προέλευσής τους, των πολλών βιολογικών επιδράσεών τους και της παραγωγής τους από διάφορα είδη μυκήτων (Bennett & Klich, 2003).

Μεγάλη ανησυχία για τις βιομηχανίες τροφίμων που σχετίζονται με την παραγωγή αρτοποιημάτων, αποτελεί η πιθανότητα παραγωγής μυκοτοξινών. Τα είδη του γένους *Eurotium* είναι συνήθως οι πρώτοι μύκητες που μπορούν να εποικίσουν ανεπαρκώς αποξηραμένα προϊόντα, αποθηκευμένα εμπορεύματα στα οποία

ωριμάζοντας αυξάνεται η ποσότητα διαθέσιμου νερού, επιτρέποντας σε άλλα είδη, όπως *Aspergillus* και *Penicillium*, να αναπτυχθούν. Τα είδη του *Eurotium* spp. δεν παράγουν σημαντικά επιβλαβείς μυκοτοξίνες (Hocking, 1988), αλλά είναι σημαντική η γνώση των συνθηκών κάτω από τις οποίες μπορούν τα είδη των *Aspergillus* και *Penicillium* να αναπτύσσονται και να επιμολύνουν τα αρτοποιήματα, διότι μερικά είδη παράγουν μυκοτοξίνες. Για παράδειγμα ο τοξινογόνος *Aspergillus flavus* έχει απομονωθεί από τα 3 από τα 15 συνολικά προϊόντα αρτοποιίας που είχαν αποθηκευτεί σε οικιακό περιβάλλον. Τοξινογόνα είδη του *Penicillium* spp. έχουν απομονωθεί από αλεύρι σίτου και ψωμί στις ΗΠΑ. Αρκετά είδη του γένους *Penicillium* παράγουν μυκοτοξίνες, συμπεριλαμβανομένου του *Penicillium chrysogenum* (Abellana et al., 2001).

1.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων

Η ανάπτυξη των μυκήτων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η a_w , το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση χημικών συντηρητικών, ή ακόμα και συνδυασμό αυτών των παραγόντων. Ορισμένα χημικά πρόσθετα όταν ενσωματώνονται στα τρόφιμα, μπορούν να λειτουργήσουν ως συντηρητικά, ακόμη και αν οι μηχανισμοί και οι στόχοι δεν είναι γνωστοί (Davidson et al., 2007). Τα οργανικά οξέα, όπως οξικό, γαλακτικό, προπιονικό, σορβικό και βενζοϊκό χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά των τροφίμων (Brul & Coote, 1999). Το σορβικό και το βενζοϊκό οξύ έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσης έναντι των μυκήτων (Davidson et al., 2007; Nielsen et al., 2000). Το βενζοϊκό οξύ και το βενζοϊκό νάτριο χρησιμοποιούνται σαν αντιμυκητιακοί παράγοντες (Davidson et al., 2007).



Εικόνα 7: pH- meter και προϊόντα καθημερινής χρήσης

1.5.1. Αλληλεπίδραση a_w , pH και θερμοκρασίας

Σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μυκήτων αποτελούν η a_w και η θερμοκρασία. Ο προσδιορισμός της τιμής της a_w χρησιμοποιείται συχνά για εκτιμήσεις επικινδυνότητας ανάπτυξης αλλοιωγόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών. Μαζί με άλλους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλος δείκτης πιθανής αναπαραγωγής ή επιβίωσης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών και σχηματισμού των μεταβολιτών τους στα τρόφιμα. Η a_w , ωστόσο, δεν είναι σταθερή και αλλάζει κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της αποθήκευσης των τροφίμων (Vytřasová et al., 2002)

Οι Gock et al. (2003) παρατήρησαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη των μυκήτων που εξέτασαν (μεταξύ αυτών ήταν και είδη των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*) ήταν σε pH μεταξύ 4.5 και 5.5 και σε a_w μεταξύ 0.92 και 0.89. Τα παραπάνω αποτελέσματα καθίστανται ιδιαίτερα χρήσιμα για τις βιομηχανίες τροφίμων προϊόντων ενδιάμεσης υγρασίας (IMF), όπως τα αρτοσκευάσματα που μελετώνται στην παρούσα μελέτη, ζαχαροπλαστικής και άλλων τροφίμων με παρόμοιες ιδιότητες (Gock et al., 2003). Ο Schmiedeknecht (1960) πρότεινε ότι οι ξηρόφιλοι μύκητες μπορούν να καταταχθούν με βάση τη βέλτιστη θερμοκρασία και την ελάχιστη a_w στις οποίες μπορούν να αναπτυχθούν είτε στα τρόφιμα (*in situ*) είτε σε εργαστηριακό θρεπτικό μέσο (*in vitro*).

Οι μύκητες μπορούν να διακριθούν σε υποκατηγορίες βάσει της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται σε χαμηλές τιμές a_w . Πιο συγκεκριμένα, μετρίως ξηροφιλικοί χαρακτηρίζονται οι μύκητες που δύνανται να αναπτυχθούν σε $a_w \geq 0.80$, ενώ ξηροφιλικοί αυτοί που παρουσιάζουν ανάπτυξη σε a_w έως και 0.61. Για πολλούς μύκητες, η εκβλάστηση των σπορίων τους παρατηρείται σε χαμηλότερη a_w σε σχέση με την ανάπτυξή τους. Οι Wheeler et al. (1988) αναφέρουν ότι η εκβλάστηση συνήθως ακολουθείται από την ανάπτυξη. Μελέτες απέδειξαν ότι η ελάχιστη a_w για εκβλάστηση για είδη του γένους *Penicillium* στους 25°C ήταν 0.82, η οποία είναι και η ελάχιστη a_w που αναφέρεται για τα περισσότερα ξηροφιλικά είδη του *Penicillium* (Hocking & Pitt, 1979; Pitt & Hocking, 1977).

Η αλληλεπίδραση που παρατηρείται μεταξύ του pH και της εκβλάστησης των σπορίων των μυκήτων είναι πολύπλοκη. Για είδη των ξηροφιλικών μυκήτων,

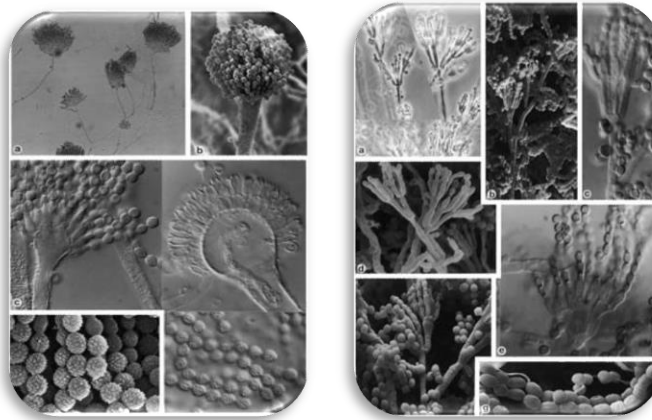
Penicillium και *Aspergillus*, το παρατηρούμενο βέλτιστο pH εκβλάστησης αυτών, είναι μεταξύ 4.5 και 5.5, με ελάχιστα παρατεταμένα εκβλάστηση σε pH 6.5-7.5. Οι ευνοϊκότερες τιμές του pH για την ανάπτυξη όλων των μυκήτων ήταν στο εύρος 4.5 και 5.5 σε σχέση με τις 6.5 και 7.5 και στις τρεις θερμοκρασίες (25, 30 ,37°C) που μελετήθηκαν από τους Gock et al. (2003), υποδεικνύοντας ότι αυτοί οι αλλοιωγόνι μύκητες των τροφίμων μπορούν να προσαρμοστούν και να αναπτυχθούν καλύτερα σε όξινη παρά σε ουδέτερες συνθήκες.

Οι Wheeler et al. (1991) ανέφεραν ότι υψηλή a_w , pH μεγαλύτερο του εύρους 4-8, είχε μικρή επίδραση σε επιλεγμένα είδη των ειδών των *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium* σε θερμοκρασίες 25, 30 και 37°C, αλλά ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε γρήγορα σε pH μικρότερο από 3.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) είναι συγκεντρωμένα τα είδη βασικών αλλοιωγόνων μυκήτων των τροφίμων και οι συνθήκες κατά τις οποίες μπορούν να επιμολύνουν το τρόφιμο.

Πίνακας 2: Στον πίνακα παρουσιάζονται οι πιο συχνά απαντώμενοι ξηροφιλικόι μύκητες σε αρτοσκευάσματα καθώς και οι ελάχιστες a_w στις οποίες μπορούν να αναπτυχθούν (Pitt, 1975)

Μύκητας	Ελάχιστη a_w	Θερμοκρασία (°C)
<i>Aspergillus flavus</i>	0.78	33
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.82	40
<i>Aspergillus sydowii</i>	0.78	25
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0.81	23
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.79	25
<i>Penicillium expansum</i>	0.83	23



Εικόνα 8: Κονιδιοφόρος Δεξιά: *Penicillium chrysogenum*, Αριστερά: *Aspergillus flavus* (www.mycobank.org)

Τα είδη του γένους *Cladosporium* έχουν ενδιάμεση ανάγκη σε νερό-υγρασία μεταξύ των μυκήτων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, για αυτό δύνανται να μολύνουν τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας όπως τα αρτοσκευάσματα. Τα *Cladosporium cladosporioides* και *Clad. sphaerospermum* σύμφωνα με τους Hocking et al. (1994) διαφέρουν ελάχιστα ως προς το ρυθμό ανάπτυξής τους. Το *Clad. cladosporioides* παρουσίασε βέλτιστη ανάπτυξη σε εύρος a_w 0.99-0.975, ενώ το *Clad. sphaerospermum* σε a_w 0.975-0.96. Το *Clad. cladosporioides* δεν αναπτύχθηκε σε $a_w \leq 0.855$, αλλά το *Clad. sphaerospermum* ήταν ξηρόφιλο, σύμφωνα με τον ορισμό που ανέφερε ο Pitt (1975), έχοντας την ικανότητα να αναπτύσσεται σε $a_w \leq 0.816$. Δημοσιευμένα αποτελέσματα αναφέρουν ότι και για τα δύο είδη *Clad. cladosporioides* και *Clad. herbarum*, η ελάχιστη a_w για την εκβλάστηση των σπορίων τους είναι μεταξύ 0.85 και 0.86 και η ελάχιστη a_w για ανάπτυξη είναι πλησίον του 0.88 (Magan & Lacey, 1984). Σύμφωνα με μελέτη των Hocking et al. (1994), το *Clad. cladosporioides* παρουσιάζει ελάχιστη για την ανάπτυξή του a_w 0.88, ενώ για την εκβλάστησή του a_w 0.815. Στην ίδια μελέτη, το *Clad. sphaerospermum* εκβλάστησε και αναπτύχθηκε σε a_w 0.815, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη αντοχή σε χαμηλότερη a_w , σε σχέση με άλλα είδη *Cladosporium*, που έχουν μελετηθεί.



Εικόνα 9: Ενεργόμετρο

1.5.2. Επίδραση pH και a_w στην ανάπτυξη των μυκήτων

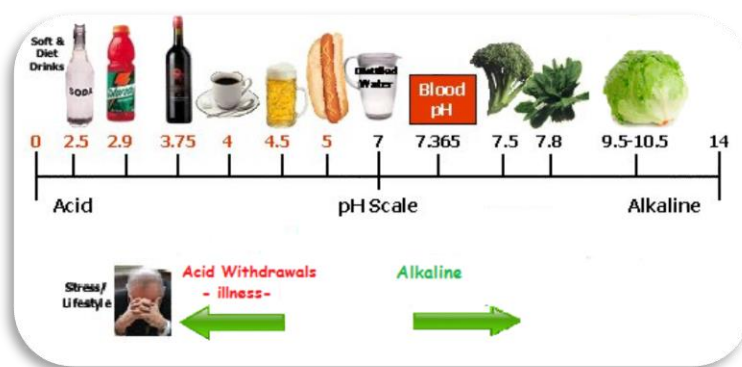
Τα είδη του γένους *Aspergillus* που εξετάστηκαν από τους Wheeler et al. (1991) έδειξαν μικρή ανεκτικότητα σε πολύ όξινο pH, με ρυθμούς ανάπτυξης σε pH 3.0 κατά 25-30% υψηλότερους από αυτούς σε pH 2.0. Για τον *Aspergillus flavus* αποδείχτηκε ότι το ελάχιστο pH στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν είναι 2.1, το βέλτιστο 3.3-7.1 και το υψηλότερο το pH 10 στους 25°C. Ο Olutiola (1976) παρατήρησε μια πιο έντονη επίδραση pH ως προς την ανάπτυξη και τη σποριοποίηση του *A. flavus*. Ο Olutiola (1976) βρήκε ότι ο *A. flavus* έχει μικρή σποριοποίηση σε όξινο μέσο με pH 2.5-3.5 και σε βασικό μέσο με pH 10.5, με βέλτιστο pH 7.5 για ανάπτυξη και pH 6.5 για σποριοποίηση. Οι Holmquist et al. (1983) ανέφεραν ότι η μέγιστη ανάπτυξη των *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι σε pH 5.0 και a_w 0.99 στους 33°C.

Τα είδη του γένους *Penicillium* είναι γνωστό ότι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH με κάποια ακόμη και σε $pH \leq 5$. Σε σχέση με τα γένη *Aspergillus* και *Fusarium*, το γένος *Penicillium* έχει υψηλότερη ικανότητα να αναπτύσσεται σε χαμηλό pH και επηρεάζεται λιγότερο σε τιμές pH κοντά στο 2.0. Τα είδη των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* είναι περισσότερο ανεκτικά σε χαμηλή a_w σε σχέση με τα υπόλοιπα γένη μυκήτων. Το *Penicillium brevicompactum* παρουσίασε μεγαλύτερη αντοχή σε χαμηλή a_w αναπτυσσόμενο στους 5°C.

Τα περισσότερα τρόφιμα έχουν εύρος pH 3 με 8 και σύμφωνα με τα δεδομένα των Wheeler et al. (1991) το pH έχει μικρή επιρροή στον αποικισμό των τροφίμων από συνήθεις μυκοτοξινογόνους μύκητες. Σε περιπτώσεις όπου το pH είναι σχεδόν

ουδέτερο, οι μύκητες θα πρέπει να ανταγωνιστούν και τα βακτήρια, ενώ σε υψηλές a_w οι μύκητες δεν είναι ανταγωνιστικοί σε μικτή καλλιέργεια. Ωστόσο, σε $a_w \leq 0.90$, οι μύκητες υπερισχύουν των βακτηρίων ανεξαρτήτως του pH (Wheeler et al., 1991).

Η φάση προσαρμογής για σποριοποίηση ποικίλει ανάλογα τις τιμές a_w , pH και θερμοκρασίας. Όταν η a_w είναι κοντά στο 1.00, η βλάστηση των σπορίων παρατηρείται σε μία με δύο ημέρες, αλλά η φάση προσαρμογής αυξάνεται καθώς η a_w μειώνεται και αυξάνεται περαιτέρω όταν το pH μειώνεται από 6.5 στο 4. Στον παρακάτω Πίνακα 4 φαίνονται για κάθε τιμή pH και θερμοκρασία οι ελάχιστες ενεργότητες νερού, στις οποίες παρατηρείται ανάπτυξη.



Εικόνα 10: pH διαφόρων τροφίμων

Πίνακας 3: Ελάχιστες ενεργότητες νερού για σποριοποίηση σε θερμοκρασίες από 5 °C έως 40 °C και σε στελέχη μυκήτων που απομονώθηκαν, και στην παρούσα μελέτη από τα brioche, σε pH 4 και 6.5

pH 6.5							
Θερμοκρασία (°C)	5	10	20	25	30	35	40
<i>Cladosporium</i>	0.90	0.86	0.86	0.86	0.90	0.97	N.G.
<i>cladosporioides</i>							
<i>Penicillium</i>	0.90	0.83	0.80	0.80	0.88	N.G.	N.G.
<i>brevicompectum</i>							
<i>Aspergillus</i>	N.G.	N.G.	0.96	0.94	0.94	0.86	0.88
<i>fumigatus</i>							

pH 4.0							
Θερμοκρασία (°C)	5	10	20	25	30	35	40
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	0.94	0.89	0.86	0.86	0.96	N.G.	N.G.
<i>Penicillium</i> <i>brevicompactum</i>	0.98	0.84	0.81	0.84	0.90	N.G.	N.G.
<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	N.G.	N.G.	0.98	0.96	0.95	0.87	0.91

* N.G., δεν υπήρξε σποριοποίηση μετά από 40 ημέρες επώασης

Παρόλο που οι Pitt & Christian (1968) και Hocking & Pitt (1979) ανέφεραν ότι η εκβλάστηση των σπορίων ακολουθούνταν από μυκηλιακή αύξηση, οι Magan & Lacey (1984) βρήκαν ότι η εκβλάστηση συμβαίνει συχνά και σε χαμηλή a_w , κάτι που δύναται να αποδοθεί στην ποικιλομορφία των στελεχών ή τις διαφορετικές πειραματικές τεχνικές, καθώς και τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 4)

Πίνακας 4: Σύγκριση των ελάχιστων ενεργοτήτων νερού για βλάστηση σπορίων συγκριτικά με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε προηγούμενες μελέτες (Magan and Lacey, 1984)

Στελέχη	Magan and Lacey (1984)		Προηγούμενες μελέτες		Βιβλιογραφία
	a_w	T(°C)	a_w	T(°C)	
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	0.86	25	0.85	22	Pelhate (1968)
<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	0.86	35	0.82	40	Ayerst (1969)
<i>Penicillium</i> <i>brevicompactum</i>	0.80	20-25	0.78	25	Hocking & Pitt (1979)

1.6. Πρόσθετα τροφίμων ως παρεμποδιστές

Τα περισσότερα σπόρια μυκήτων καταστρέφονται κατά τη διάρκεια του ψησίματος λόγω της θερμικής επεξεργασίας (Legan, 1993). Η επιμόλυνση των τελικών προϊόντων δύναται να προέλθει από την ατμόσφαιρα ή από επιφάνειες της βιομηχανίας κατά τη διάρκεια της ψύξης, του φινιρίσματος και της συσκευασίας (Fustier et al., 1998). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Seiler et al. (1988) διαφορετικά επίπεδα επιμόλυνσης έχουν και ανάλογη επίδραση στον εμπορικό χρόνο ζωής των προϊόντων (Legan, 1993).

Οι κυριότερες ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα αρτοποιήματα είναι τα οργανικά οξέα, σορβικό και προπιονικό οξύ, καθώς και τα φυτικά εκχυλίσματα δενδρολιβάνου (Πίνακας 5). Ο αριθμός των μικροοργανισμών που αναπτύσσουν ανθεκτικότητα έναντι των χημικών συντηρητικών συνεχώς αυξάνεται και οι μύκητες δεν αποτελούν εξαίρεση. Τέτοια συντηρητικά είναι το σορβικό και βενζοϊκό οξύ και χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την αποφυγή αλλοίωσης των προϊόντων (Schnürer & Magnusson, 2005).

Από τις αρχές της δεκαετίας του 80, έχει αρχίσει η χρήση χημικών ενώσεων στα τρόφιμα να δέχεται αυξημένη κριτική (Sofos & Busta, 1981). Για να ενισχυθεί η δράση του εκάστοτε συντηρητικού και να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών που θέλουν χρήση τους στα τρόφιμα να μειωθεί, θα πρέπει να γίνεται έλεγχος των παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων, όπως η θερμοκρασία, a_w , το pH και οι ατμοσφαιρικές συνθήκες (Abellana et al., 1999a; Abellana et al., 1999b; Abellana et al., 2000; Buchanan, 1993; Halouat & Debevere, 1997). Αυτή αποτελεί τη βασική ιδέα των συνδυασμένων μεθόδων, οι οποίες αποτελούνται από συνδυασμό διαφόρων παραμέτρων (εμπόδια) που μπορεί να δράσουν συνεργιστικά και να αναστείλουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας καταλήγοντας σε πιο σταθερά προϊόντα σε θερμοκρασία δωματίου (Chirife & Favetto, 1992; Leistner, 1992). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα των ασθενών οξέων ως συντηρητικών συνδέεται στενά με το pH και την a_w (Guynot et al., 2005; Seiler et al., 1988; Stratford & Anslow, 1998).

Πίνακας 5: Πρόσθετα αρτοσκευασμάτων (Κώδικας Τροφίμων, Ποτών Και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, Άρθρο 112-2 Δημητριακά-Προϊόντα Εξ αυτών Έκδοση 2 / Μάιος 2011)

ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΑΡΤΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ		
ΠΡΟΣΘΕΤΟ	ΠΡΟΪΟΝ	ΑΝΩΤΑΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ
Σορβικά E200, E202, E203	Μερικώς ψημένα, προσσκευασμένα αρτοσκευάσματα για λιανική πώληση	2000 mg/kg
	Εκλεκτά αρτοσκευάσματα με ενεργότητα νερού μεγαλύτερη από 0,65	
	Παναρίσματα και σε μέγιστο ποσοστό 2000 mg/kg	
Προπιονικά E280, E281, E282, E283	Προσκευασμένα εκλεκτά αρτοσκευάσματα (συμπεριλαμβανομένων των αρτοσκευασμάτων ζαχαροπλαστικής), με ενεργότητα νερού άνω του 0,65	3000 mg/kg, 2000 mg/kg, <i>quantum satis</i> *, 2000 mg/kg εκφρασμένα σε προπιονικό οξύ, αντιστοίχως
	Προσκευασμένα rolls, buns και pitta και σε μέγιστο ποσοστό, εκφραζόμενο ως προπιονικό οξύ, 2000 mg/kg	
	Προσκευασμένο polsebrod, boller και dansk flutes	
Εκχυλίσματα δενδrolίβανου E392	Εκλεκτά αρτοσκευάσματα σε μέγιστο ποσοστό 200 mg/kg (εκφραζόμενα ως το σύνολο καρνοσόλης και	

	καρνοσικού οξέος) εκφραζόμενα επί της λιπαρής ύλης	
--	--	--

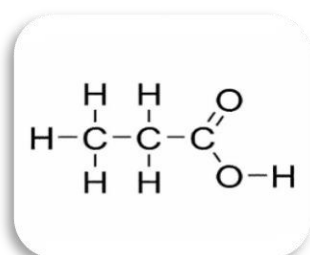
*Η έκφραση «*quantum satis*» σημαίνει ότι δεν ορίζεται ανώτατο επίπεδο. Ωστόσο τα πρόσθετα πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με την ορθή πρακτική παρασκευής, σε επίπεδο που δεν υπερβαίνει το επίπεδο που είναι αναγκαίο για την επίτευξη του επιδιωκόμενου σκοπού και υπό την προϋπόθεση ότι δεν παραπλανούν τον καταναλωτή.

1.6.1. Μηχανισμός δράσης των συντηρητικών

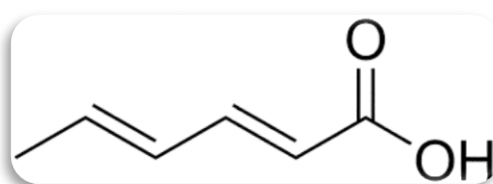
Τα συνηθέστερα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα είναι τα ασθενή οργανικά οξέα, για παράδειγμα, οξικό, βενζοϊκό και σορβικό όξύ. Αυτά τα μόρια παρεμποδίζουν ανάπτυξη μυκήτων και βακτηρίων, ενώ το σορβικό οξύ παρεμποδίζει και την εκβλάστηση βακτηριακών σπορίων (Sofos & Busta, 1981; Blocher & Busta, 1985).

Στο διάλυμα των συντηρητικών, τα ασθενή οργανικά οξέα εξαρτώνται από το pH μεταξύ αδιάστατης και δισταμένης κατάστασής τους. Τα συντηρητικά παρουσιάζουν τη βέλτιστη παρεμποδιστική ικανότητά τους σε χαμηλό pH, επειδή αυτό ευνοεί την παραγωγή της αδιάστατης μορφής του, η οποία δύναται να διαπεράσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη και έτσι μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο. Όταν το μόριο μπει στο κύτταρο, όπου το εσωτερικό pH του κυττάρου είναι υψηλότερο από το εξωτερικό, τότε δίσταται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των φορτισμένων ανιόντων και κατιόντων, τα οποία δεν μπορούν να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη. Ως εκ τούτου, η ανασταλτική δράση πιστεύεται ότι οφείλεται στην αδιάστατη μορφή του μορίου. Το μόριο του συντηρητικού διαχέεται μέσα στο κύτταρο μέχρι να επέλθει σταδιακή ισορροπία με το pH σε όλη τη μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των φορτισμένων ιόντων μέσα στο κύτταρο (Booth & Kroll, 1989).

Ως εκ τούτου, η αναστολή της ανάπτυξης από ένα ασθενές οξύ συντηρητικό έχει προταθεί ότι οφείλεται σε μία σειρά δράσεων, συμπεριλαμβανομένων τη διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης την αναστολή των βασικών μεταβολικών αντιδράσεων, την καταπόνηση στην ενδοκυτταρική ομοιόσταση του pH και της συσσώρευσης τοξικών ανιόντων (Brul & Coote, 1999).



Εικόνα 11: Προπιονικό οξύ



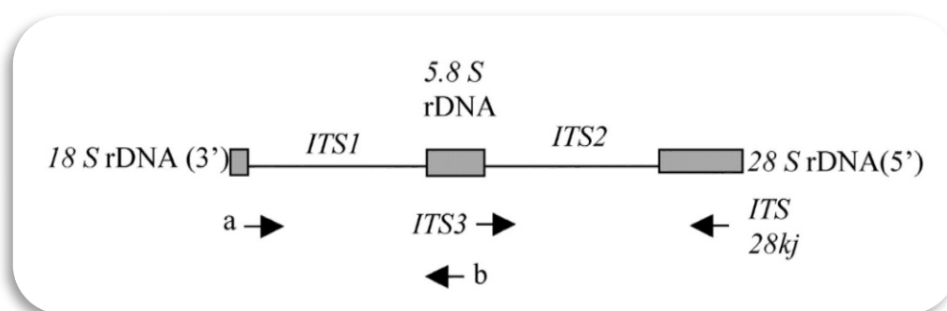
Εικόνα 12: Σορβικό όξυ

1.7. Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία τεχνική που αναπτύχθηκε το 1985 για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA. Αυτή η τεχνική επέτρεψε την ακριβή αναγνώριση και γρήγορη ανίχνευση των ειδών χωρίς την ανάγκη για απομόνωση καθαρών καλλιεργειών (Sartori et al., 2010)

Η πλήρης ITS περιοχή σε μύκητες έχει ένα μέσο μήκος 500 και 600 ζευγών βάσεων (bp) για ασκομύκητες και βασιδιομύκητες, αντίστοιχα, και ένα μέσο μήκος των 600 bp σε όλες τις μυκητιακές γενεαλογικές σειρές (Porter & Golding, 2011). Η ταυτοποίηση και ταξινόμηση των μυκήτων βασίζεται σε παραδοσιακές αναλύσεις

των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών δομών και τα χαρακτηριστικά τους μπορεί να αλλάξουν σημαντικά ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι με σκοπό τη ταυτοποίηση και διαφοροποίηση των μικροοργανισμών (Jimenez et al., 1999; Mirhosseini et al., 2010). Το ριβοσωμικό DNA (rDNA) αποτελεί ενδιαφέροντα στόχο για τις φυλογενετική διαφοροποίηση των μυκήτων, δεδομένου ότι κωδικοποιεί μια υψηλά πολυμορφική περιοχή 600-800 bp ITS (Internal Transcribed Spacers), η οποία χρησιμοποιείται και για τη διαφοροποίηση πολλών ειδών ζυμών και μυκήτων (Anderson & Cairney, 2004; Anderson & Parkin, 2007; Larena et al., 1999). Η πλήρης ITS περιοχή σε μύκητες έχει ένα μέσο μήκος 500 και 600 ζευγών βάσεων (bp) για ασκομύκητες και βασιδιομύκητες, αντίστοιχα, και ένα μέσο μήκος των 600 bp σε όλες τις μυκητιακές γενεαλογικές σειρές (Porter & Golding, 2011).



Εικόνα 13: ITS περιοχή

Η ταξινόμηση των ειδών του γένους *Penicillium* είναι πολύπλοκη λόγω του μεγάλου αριθμού ειδών, τα οποία έχουν παρόμοια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Cardoso et al., 2007). Αυτό παρατηρήθηκε στα αποτελέσματα της μελέτης των Pinto et al. (2012) , αφού η μορφολογική ανάλυση έδειξε, ότι όλοι οι απομονωμένοι μύκητες, που ανήκουν στο γένος *Penicillium* έχουν πράσινες αποικίες και εμφάνιση βαμβακιού. Η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ITS περιοχή μεταξύ αυτών των μυκήτων, δεν έδειξε ικανοποιητική διάκριση, αφού υπήρχε πολύ χαμηλός βαθμός της ITS μεταβλητότητας, όπως στο παρελθόν αναφέρθηκαν οι Cardoso et al. (2007).

Εκ των υστέρων, οι μοριακές πληροφορίες έχουν αποδειχθεί πολύ χρήσιμες προσπάθειες μυκητολογικής ταξινόμησης, φυλογενετικής τεκμηρίωσης, οριοθέτησης των ειδών και ταυτοποίησης (π.χ. Begerow et al., 1997; Hibbett et al., 2007; James et al., 2006; Kõljalg et al., 2005). Πολλοί μορφολογικοί χαρακτήρες που στο παρελθόν φαινόταν να είναι ενδεικτικοί της συγγένειας ορισμένων ειδών, τώρα φαίνεται να μην είναι κατατοπιστικοί (Hibbett et al., 2007; Lumbsch & Huhndorf, 2007). Αυτό συνέβαλε σε διάφορες ριζικές ταξινομικές αναθεωρήσεις κατά το παρελθόν και κατά μέσο όρο σε συνωνυμικό ποσοστό 2,5: 1 για κάθε αποδεκτό είδος (Hawksworth, 2001). Παρόλες, αυτές τις εξελίξεις στη συστηματική ταξινόμηση των μυκήτων (Stajich et al., 2009), ακόμη δεν παρέχεται όλη η απαραίτητη γνώση για τη μυκητιακή ποικιλομορφία. Μόνο 5% των υπολογιζόμενων 1.5 εκατομμυρίου ειδών των υπαρχόντων μυκήτων έχουν περιγραφεί (Hawksworth, 2001) και δεδομένα αλληλούχησης είναι διαθέσιμα μόνο για το 1% των ειδών μυκήτων (Nilsson et al., 2009).

Σύμφωνα με τους Chase et al. (2005) η Internal Transcribed Spacer (ITS) περιοχή είναι ο πιο συχνός δείκτης για αλληλούχηση των μυκήτων και συχνά χρησιμοποιείται για τη συστηματική, φυλογενετική ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο μικρότερο από είδος. Παρά την καθολική τους χρήση, δεν αποτελεί μια περιοχή της οποίας η αλληλουχία δύναται να χρησιμοποιηθεί ως καθολική ταυτότητα των μυκήτων. Ενδοειδική (Intraspecific), καθώς και διειδική (interspecific) μεταβλητότητα είναι γνωστό ότι συμβαίνει (Simon & Weiß, 2008; Smith et al., 2007) και δύναται να περιπλέξει τις προσπάθειες που γίνονται για την ταυτοποίηση των ειδών (Begerow et al., 2010)

Ακόμη και με τις πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας των ειδών που επιτρέπουν την αλληλούχηση κατά μήκος όλης της ITS περιοχής, παραμένει επιθυμητό για τις μετααναλυτικές μελέτες (ταυτοποίηση) που αφορούν τη μελέτη των μυκήτων, να αποκλείσουν την περιοχή 5.8S από το rRna οπερόνιο. Η συμπερίληψη των συντηρημένων περιοχών στην ακολουθία του DNA είναι γνωστό ότι αυξάνει τον κίνδυνο σχηματισμού χίμαιρας κατά την PCR (Haas et al., 2011). Ως εκ τούτου, γενικά, χρησιμοποιείται είτε η ITS1 είτε η ITS2 περιοχή σε οικολογικές μελέτες με σκοπό τον χαρακτηρισμό κοινοτήτων μυκήτων. Οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν στις μετααναλυτικές μελέτες πρέπει να μπορούν

αποτελεσματικά να ενισχύσουν τις περιοχές στόχους του DNA, εξειδικευμένα, υπό την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων μη ειδικών στόχων DNA και παρεμποδιστικών ουσιών, όπως τα χουμικά οξέα, τα οποία μπορεί να έχουν εξαχθεί μαζί με το DNA (Kosch & Summers, 2013).

Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας ενίσχυσης των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στις μετααναλυτικές μελέτες είναι σημαντική, επειδή δύνανται να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα υπέρ των πιο εύκολα ενισχύσιμων αλληλουχιών κατά τη διάρκεια αντιδράσεων PCR (Engelbrektson et al., 2010; Jumpponen, 2007; Polz & Cavanaugh, 1998). Επιπλέον, το ζεύγος εκκινητών πρέπει να καλύπτει ένα μεγάλο μέρος από τα μελετούμενα είδη και να παράγει αξιόπιστα αποτελέσματα, δεδομένου ότι οι επίπεδο μετα-ανάλυσης χρησιμοποιείται ένα μόνο ζεύγος εκκινητών για τη χαρτογράφηση της μικροβιακή ποικιλότητα. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι εκκινητές στη μυκητιακή οικολογία για την ταυτοποίηση μυκήτων σε επίπεδο είδους δημοσιεύτηκαν από τους (White et al., 1990) και είναι οι εξής: ITS1, ITS2, ITS3 και ITS4 και κατά τους (Gardes & Bruns, 1993) οι: ITS1F και ITS4B. Ενώ οι εκκινητές που αναπτύχθηκαν από τους White et al. (1990) είχαν ένα μεγάλο φάσμα, οι ITS1F και ITS4B είχαν αναπτυχθεί για να είναι ειδικά για τους μύκητες και τους βασιδιομύκητες αντίστοιχα (Gardes & Bruns, 1993). Ο ITS1F είναι αυτός που συνδυάζεται πιο συχνά με τον ITS2 για να ενισχυθεί η ITS1 περιοχή του μυκητιακού rRNA οπερονίου και ο ITS3 συνδυάζεται συχνά με τον ITS4 για ενισχυθεί η ITS2 περιοχή. Αυτά τα ζεύγη των εκκινητών έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία είκοσι χρόνια (Amend et al., 2010; Buée et al., 2014; Ghannoum et al., 2010; Jumpponen and Jones, 2009; Jumpponen et al., 2010; Tedersoo et al., 2010).

Η ενίσχυση και αλληλούχηση των μικρών, πρότυπων DNA περιοχών (metabarcoding) γίνεται όλο και πιο δημοφιλές εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των μυκητιακών κοινοτήτων. Παρόλο αυτά, στις περισσότερες τέτοιου είδους μελέτες, οι εκκινητές χρησιμοποιούνται χωρίς να έχουν δοκιμαστεί για την αποτελεσματικότητά τους να ενισχύουν τις ετερογενείς DNA περιοχές, το οποίο μπορεί να επιδράσει στην οπτική που έχει αποκτηθεί για τις ήδη μελετημένες μυκητιακές κοινότητες. Ενώ οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι εκκινητές στις μυκητιακές μετααναλυτικές μελέτες σχεδιάστηκαν τη δεκαετία του 90 για την ταυτοποίηση των ειδών ενός περιορισμένου αριθμού ειδών στόχων, οι περιβαλλοντικές μετααναλυτικές μελέτες

γενικά στοχεύουν στο χαρακτηρισμό διαφορετικών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα (Beeck et al., 2014).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ευρέως στη μυκητολογία για φυλογενετικές αναλύσεις ή την ταυτοποίηση των ειδών. Δεδομένης της ηλικίας του βασιλείου των μυκήτων και της γενετικής τους ποικιλομορφίας, είναι απίθανο ότι ένας μοριακός δείκτης του συστήματος ταυτοτήτων να είναι ικανός να ταυτοποιήσει κάθε δείγμα ή καλλιέργεια σε επίπεδο είδους. Οι ακολουθίες των ITS έχουν χρησιμοποιηθεί για διαφορετικά είδη που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί και περιέχουν γένη *Pezizomycotina* με μικρότερο αναδιπλασιασμό, όπως γένη με οικονομική σημασία, π.χ. *Cladosporium* (Schubert et al., 2007), *Penicillium* (Skouboe et al., 1999) και *Fusarium* (O'Donnell and Cigelnik, 1997). Όσον αφορά στους Ασκομύκητες (συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων του γένους *Aspergillus*), είναι γενικά ανώτερα σε *rRNA* (Schoch et al., 2009). Εξειδικευμένες βάσεις αναγνώρισης χρησιμοποιούν μοριακούς δείκτες, όπως ο παράγοντας επιμήκυνσης 1-α (*1F*) για το *Fusarium* (O'Donnell et al., 2010) και της β-τουμπουλίνης για το *Penicillium* (Frisvad and Samson, 2004). Στα γένη του *Aspergillus*, οι ITS αλληλουχίες είναι συντηρημένες μεταξύ των κρίσιμων μυκοτοξινογόνων ειδών σημαντικών για τη βιομηχανία και την ιατρική, επομένως κρίνεται απαραίτητη η χρήση επιπλέον γονιδιακών δεικτών (Geiser et al., 2007) (Schoch et al., 2012).

Σε μελέτη των Le Lay et al. (2016) χρησιμοποιήθηκαν οι ITS εκκινητές για όλες τις απομονώσεις της μελέτης, ITS4 και ITS5 (White et al., 1990), η μερική β-τουμπουλίνη (Bt2a και Bt2b) (Glass and Donaldson, 1995) για τα είδη *Aspergillus* και *Penicillium* και η ακτίνη (ACT-512F και ACT-783R) (Carbone and Kohn, 1999) για τα είδη του *Cladosporium*.

1.8. Υπόθεση – Σκοπός Εργασίας

Τα αρτοσκευάσματα είναι προϊόντα, τα οποία ανήκουν στα τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας (Intermediate Moisture Foods, IMF), τα οποία χαρακτηρίζονται από a_w 0.65 - 0.90). Οι μύκητες είναι μικροοργανισμοί που προσαρμόζονται πολύ εύκολα σε ποικίλα περιβάλλοντα, όπως σε χώρους αποθήκευσης και διακίνησης πρώτων υλών, όπου μπορούν να ευδοκιμήσουν και μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι βασικοί μύκητες που αναπτύσσονται σε αυτά τα προϊόντα ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* (Pitt & Hocking, 2009).

Οι μύκητες αναπτύσσονται στα τρόφιμα ενδιάμεσης ενεργότητας και συνήθως σε $a_w \leq 0.70$ αναστέλλεται η ανάπτυξή τους. Τα είδη των ξηρόφιλων μυκήτων, *Penicillium* και *Aspergillus*, έχουν βέλτιστο pH εκβλάστησης μεταξύ 4.5 και 5.5, με ελάχιστα παρατεταμένη εκβλάστηση σε pH 6.5-7.5. Σύμφωνα με τους Gock et al. (2003) οι ευνοϊκότερες τιμές του pH για την ανάπτυξη όλων των μυκήτων είναι 4.5 - 5.5 σε εύρος θερμοκρασίας 25-37°C, υποδεικνύοντας ότι αυτοί οι αλλοιωγόντοι μύκητες των τροφίμων μπορούν να προσαρμοστούν και να αναπτυχθούν καλύτερα σε όξινες παρά σε ουδέτερες συνθήκες.

Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των μυκήτων σε ποικίλα θρεπτικά υποστρώματα, με τη χρήση κλειδών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση μυκήτων, έως και επίπεδο είδους, αλλά παραμένει μία πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί συνήθως ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Επιπλέον, οι μικρές και δυσδιάκριτες φαινοτυπικές διαφορές, κυρίως σε επίπεδο ειδών, καθιστούν ακόμη πιο δύσκολη την ταξινόμηση συγγενών ειδών. Έτσι, τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί και εφαρμοστεί ευρύτατα οι μοριακές τεχνικές, με σκοπό την ταυτοποίηση των μυκήτων. Οι γενικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι οι ITS1-ITS4, οι οποίοι καλύπτουν μεγάλο εύρος μελετούμενων περιοχών στη μυκητιακή κοινότητα και δίνουν πληροφορία για το γένος των μυκήτων και σε κάποιες περιπτώσεις ακόμη και για το είδος αυτών.

Τα αρτοποιήματα τύπου brioche, πρόκειται για προϊόντα ενδιάμεσης υγρασίας, στα οποία κύρια αλλοιωγόνος χλωρίδα είναι οι μύκητες. Με σκοπό την αποφυγή αλλοίωσης των προϊόντων αυτών και τη διατήρηση της ποιότητας των τελικών προϊόντων καθ' όλη τη διάρκεια του εμπορικού χρόνου ζωής τους, εφαρμόζεται

συνδυασμός παραγόντων που δύνανται να παρεμποδίσουν τη μικροβιακή ανάπτυξη όπως προπιονικό ασβέστιο και ψεκασμός του τελικού προϊόντος με αιθανόλη πριν τη συσκευασία. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Δρεμέτσικα, Πτυχιακή εργασία, 2015) απομονώθηκε αριθμός μυκήτων από προϊόντα brioche, α' ύλες και επιφάνειες της βιομηχανίας στα πλαίσια εκτίμησης α) της υγιεινολογικής κατάστασης του περιβάλλοντος της βιομηχανίας και β) τον εμπορικό χρόνο ζωής προϊόντων brioche.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν: α) η μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων απομονωμένων από πρώτες ύλες και τελικά προϊόντα, β) η *in vitro* μελέτη των απομονωθέντων μυκήτων σε διαφορετικούς συνδυασμούς α_w και θερμοκρασιών, και γ) η *in situ* μελέτη του δυναμικού αλλοίωσης των μυκήτων του γένους *Penicillium sp.* σε αρτοποιήματα τύπου Brioche.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση και χαρακτηρισμός μυκήτων

2.1.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Η απομόνωση των μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε συνέχεια προηγούμενης πειραματικής μελέτης, όπου προϊόντα τύπου Brioche α) συντηρήθηκαν στους 20 και 37°C β) παραλαμβάνονταν την ημέρα παραγωγής τους φρέσκα γ) α' ύλες. Στη συνέχεια οι μύκητες απομονώθηκαν σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά θρεπτικά εργαστηριακά υλικά και ακολούθησε χαρακτηρισμός τους βάσει μοριακών μεθόδων.

2.1.2. Απομόνωση μυκήτων

Οι μύκητες απομονώνονταν είτε απευθείας από το προϊόν, αν υπήρχε ορατό μυκήλιο (στην περίπτωση των δειγμάτων υπό συντήρηση), είτε από εργαστηριακό θρεπτικό υλικό RBC (LABM™, Bury, UK), στο οποίο επωάστηκαν για 5 ημέρες στους 25°C. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν οι μεμονωμένοι διαφορετικοί μύκητες σε μη επιλεκτικό υλικό MEA (Malt Extract Agar, LABM™, Bury, UK) και επωάστηκαν για τουλάχιστον 7 ημέρες στους 25°C. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες υπό ασηπτικές συνθήκες σε MEA έως ότου παραληφθεί ο μεμονωμένος μύκητας, ελεύθερος επιμολύνσεων. Η συλλογή των σπορίων έγινε με προσθήκη στο τρυβλίο 10ml διαλύματος 0.1 v/v % Tween80 και στη συνέχεια το stock γινόταν σε διάλυμα 60 v/v % γλυκερόλης.

2.1.3. Μοριακός χαρακτηρισμός μυκήτων

2.1.3.1. Προετοιμασία μυκηλίων για απομόνωση DNA (DNA Extraction)

Για τη διεξαγωγή του DNA Extraction, το μυκήλιο των μυκήτων λήφθηκε από υγρή καλλιέργεια αυτών σε θρεπτικό μέσο Malt Extract Broth (MEB) (Lab M), Bury UK). Πιο συγκεκριμένα, 10μL εναιωρήματος μυκήτων από το stock με τη γλυκερόλη εμβολιάστηκαν σε 20mL MEB σε τρυβλία Petri και επώαστηκαν για 72h στους 25°C. η συλλογή του μυκηλίου πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Μετά την παραλαβή του, το μυκήλιο, στεγνώθηκε σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και μεταφέρθηκε με τη βοήθεια οδοντογλυφίδας σε σωλήνα erpendorf και διατηρήθηκε στους -20°C μέχρι να γίνει η απομόνωση του DNA.

2.1.3.2. Απομόνωση Η DNA (DNA Extraction)

Η εξαγωγή του DNA είναι το πρώτο βήμα της μοριακής ταυτοποίησης των μυκήτων. Στο μυκήλιο, που συλλέχθηκε από το υγρό θρεπτικό μέσο, προστέθηκαν αρχικά 500μL Lysis Buffer και ομογενοποιήθηκαν με vortex, ενώ επώαστηκαν ακολούθως σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Το Lysis Buffer επιφέρει τη λύση των κυττάρων του μύκητα.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 150μL CH₃COOK (pH 4.8) και έγινε σύντομο vortex. Το CH₃COOK βοηθά στη μείωση της αλκαλικότητας του διαλύματος. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 13000rpm για 5min. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο (630μL) σε νέο σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρήθηκε στις 13000rpm για 5min. Για την κατακρήμνιση και παραλαβή του DNA, το υπερκείμενο (600μL) μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf και προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης (600μL). Πραγματοποιήθηκε ανάδευση του διαλύματος και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, ενώ στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13000rpm για 5min.

Ακολούθως της φυγοκέντρησης απορρίφθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκε στο ίζημα 300μL αιθανόλης (70% v/v), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα

ισοπροπανόλης και τέλος φυγοκεντρήθηκε στις 13000rpm για 5min. Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Τέλος, το ίζημα διαλύθηκε σε 50μL HPLC H₂O, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση DNA φωτομετρικά (IMPLEN®- Nanophotometer). Η φύλαξη του DNA έλαβε χώρα στους -20 °C.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA είναι τα εξής:

Διάλυμα λύσης (Lysis buffer)

400mM Tris HCl [pH 8.0]

60mM Ethylene Diaminetetra Acetic Acid EDTA [pH 8.0]

150mM NaCl

1% Sodium Dodecyl Sulfate

CH₃COOK (pH 4.8)

3M Potassium Acetate

5M Glacial Acetic Acid

2.1.3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction =PCR)

Με την PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών, primers), καθένα από τα οποία είναι συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
2. Προσαρμογή των εκκινητών στο μονόκλωνο πλέον DNA (annealing)
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και πραγματοποιείται από ειδικά μηχανήματα τους

θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers). Οι αντιδράσεις (Πίνακας 6) του παρόντος πειράματος πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα ProFlex PCR System (Applied Biosystems®, Waltham, Massachusetts, USA). Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ήταν οι ITS1-ITS4 (White et al., 1990) (Πίνακας 7) με το οποίο ενισχύεται τμήμα της ITS περιοχής μήκους 600bp. Ακολουθήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα: αρχική αποδιάταξη του DNA 95° C για 2min, 35 κύκλοι: 95° C για 30sec, 55°C για 30sec, 72° C για 1min.

Η ενίσχυση της περιοχής ITS 1–5.8S–ITS 2, χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ταυτοποίηση των μυκήτων και είναι ικανή να διαχωρίσει όλους τους μύκητες τουλάχιστον σε επίπεδο γένους και σε κάποιες περιπτώσεις σε επίπεδο είδους. Η περιοχή ITS1 έχει μεγαλύτερη παραλλακτικότητα σε σχέση με την ITS2 και συνήθως για την ταυτοποίηση των μυκήτων χρησιμοποιείται με την ITS4 περιοχή.

Πίνακας 6: Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

Αντιδραστήρια PCR (Αρχική συγκέντρωση)	Όγκος στην τελική αντίδραση PCR (25μL)	Τελικές συγκεντρώσεις όγκων
10X DNA Buffer	2.5μl	1X
ITS1 (10μM)	1.25 μl	0.5 μM
ITS4 (10μM)	1.25 μl	0.5 μM
dNTPs (10mM)	0.5 μl	0.2 mM
Taq Polymerase (5U/μL)	0.1 μl	0.5 U/μL
H ₂ O	18.4 μl	
DNA (50-200 ng/μL)	1 μl	

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών ITS1-ITS4

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Τα προϊόντα PCR στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής αгарόζης 1% w/v, ενώ ως δείκτης μοριακών βαρών

χρησιμοποιήθηκε ο 2log DNA-Ladder (NEB, New England Biolabs) Στη συνέχεια έγινε χρώση της πηκτής αναρόζης βύθισή της σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (5μg/mL) και στη συνέχεια παρατηρήθηκε σε θάλαμο υπό υπεριώδη (Ultraviolet, UV) ακτινοβολίας.

2.1.3.4. Καθαρισμός προϊόντων PCR , Αλληλούχηση και Ταυτοποίηση

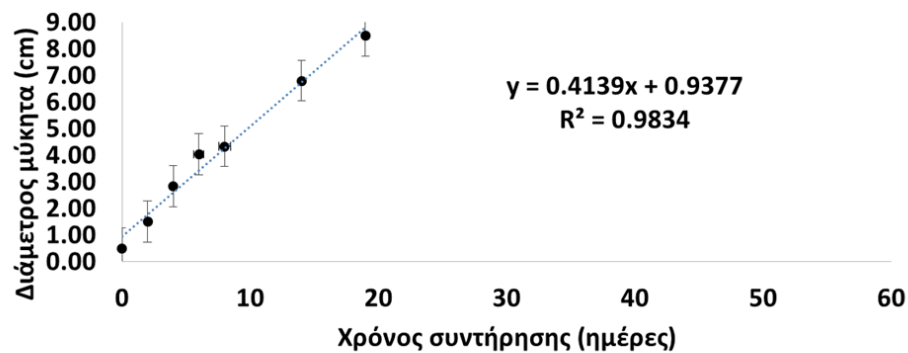
Για τη διαδικασία της αλληλούχησης απαιτείται όσο το δυνατόν πιο καθαρό DNA και για το λόγο πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων PCR. Στα εναπομείναντα 20μl του προϊόντος PCR προστέθηκαν 80μl αποστειρωμένου νερού (HPLC), ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10μl (1/10V) 3M οξικό νάτριο (CH_3COONa) και 250μl (2,5V) παγωμένης αιθανόλης 100% v/v. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση των erpendorfs 20-30 φορές και διατηρήθηκαν στους -80°C για 1 h. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα για 30min στους 4°C στις 13000rpm και ακολούθως απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Κατόπιν προστέθηκαν 600μl παγωμένης αιθανόλης 70%(v/v) και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5min στις 13000rpm στους 4°C . Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα δείγματα αφέθηκαν για στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Τέλος, για την επαναδιάλυση του καθαρισμένου DNA προστέθηκαν 15μl αποστειρωμένου HPLC νερού και στη συνέχεια η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά όπως περιγράφεται παραπάνω. Στη συνέχεια, τα καθαρισμένα δείγματα απεστάλησαν σε εξωτερικό εργαστήριο για αλληλούχηση (CEMIA, Λάρισα, Ελλάδα), στη συνέχεια τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επεξεργάστηκαν στη διαδικτυακή βάση δεδομένων ncbi με το BLAST και τέλος, προέκυψαν οι πιθανοί μύκητες από την αλληλουχημένη σειρά βάσεων με φθίνουσα σειρά ομοιότητας.

2.2. *In vitro* μελέτη δυναμικού ανάπτυξης μυκήτων

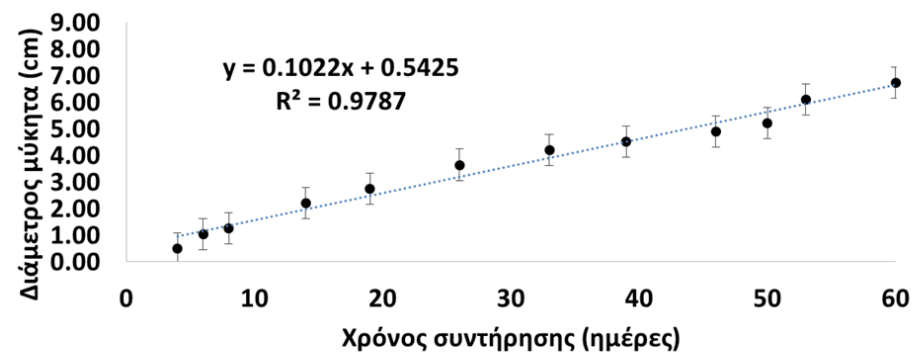
2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την *in vitro* ανάπτυξη μυκήτων χρησιμοποιήθηκε το Malt Extract Agar (MEA) τροποποιημένο ως προς α) το pH σε 6.15-6.2 (με χρήση 1N NaOH) και β) την ενεργότητα νερού a_w 0.99 και 0.82-0.83 (με χρήση 37% v/v γλυκερόλης) με σκοπό να προσομοιάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προϊόντος Brioche, από το οποίο πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των εν λόγω μυκήτων. Το σύνολο των απομονώσεων που εμβολιάστηκαν σε MEA και μελετήθηκε η *in vitro* ανάπτυξή τους ήταν 42. Κάθε απομόνωση μύκητα εμβολιάστηκε μεμονωμένα στο θρεπτικό υλικό, (10^3 σπόρια). Πιο συγκεκριμένα για την a_w 0.99 εμβολιαζόταν μία σταγόνα εναιωρήματος ανά τρυβλίο σε 3 τρυβλία κάθε φορά, ενώ για την a_w 0.82 εμβολιαζόταν δύο σταγόνες εναιωρήματος σε ένα τρυβλίο και μία σταγόνα σε δεύτερο τρυβλίο. Συνολικά υπήρχαν τρεις (3) τεχνικές επαναλήψεις για κάθε περίπτωση. Κάθε φορά τα εμβολιασμένα τρυβλίο κλείνονταν αεροστεγώς με Parafilm® και μετά σε σακούλες και τοποθετούνταν προς επώαση στους 25 και 37°C για διάρκεια 60 ημερών, όση είναι και η διάρκεια ζωής του brioche. Οι 25°C χρησιμοποιήθηκαν λόγω του ότι αποτελούν την προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης του προϊόντος και οι 37°C ως θερμοκρασία καταπόνησης.

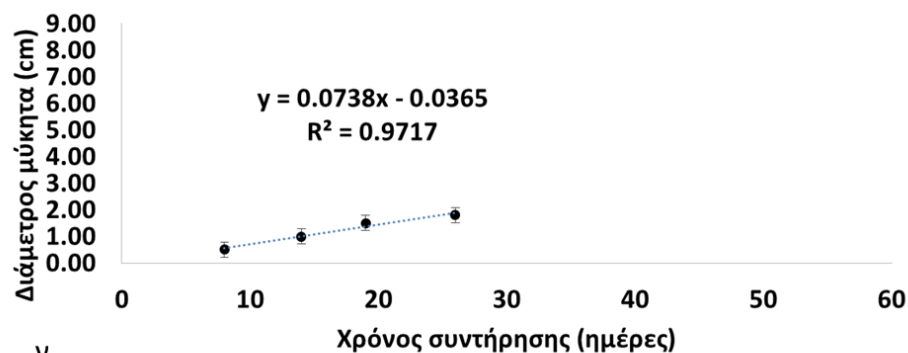
Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γίνονταν μετρήσεις της διαμέτρου των μυκήτων και κάθε φορά υπολογιζόταν η μέση διάμετρος, καθώς και η τυπική απόκλιση που πρόκυπτε από τις μετρήσεις. Ως μέγιστη διάμετρος ήταν αυτή του τρυβλίου, δηλαδή 8.5cm. Τα δεδομένα σχημάτισαν καμπύλες ανάπτυξης, από τις οποίες υπολογίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης (κλίση ευθείας) υπολογίστηκε από την προσαρμογή ενός γραμμικού μοντέλου στα σημεία της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα (Γράφημα 1) για το κάθε στέλεχος και αυτό βοήθησε στην επιλογή των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στον πειραματικό σχεδιασμό του *in situ* πειράματος.



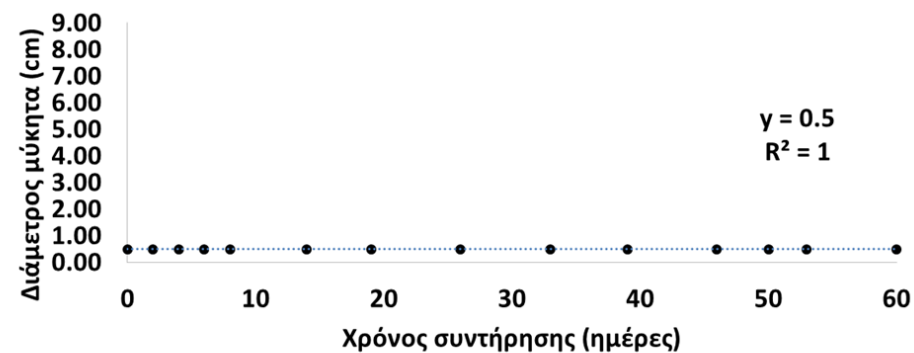
α.



β.



γ.



δ.

Γράφημα 1: Καμπύλες ανάπτυξης του *Penicillium* sp. (101) α. στους 25°C σε a_w 0.99, β. στους 25°C a_w σε 0.82, γ. στους 37°C σε a_w 0.99 και δ. στους 37°C σε a_w 0.82 και υπολογισμός του ρυθμού ανάπτυξης σε καθένα από τα παραπάνω.

2.2.2. Προετοιμασία υλικών

Ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε όπως προαναφέρθηκε το ΜΕΑ, στο οποίο ρυθμίστηκε το pH και η a_w . Πιο συγκεκριμένα η ρύθμιση του pH, έγινε με την προσθήκη NaOH (1N) βάσει του Πίνακα 8, ο οποίος περιγράφει πώς διαμορφώνεται το pH του θρεπτικού τελικού μετά την αποστείρωση.

Πίνακας 8: Δοκιμές ρύθμισης του επιθυμητού pH.

ΜΕΑ pH <u>ΠΡΙΝ</u> ΤΗΝ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ	ΜΕΑ pH <u>ΜΕΤΑ</u> ΤΗΝ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ
8.15	6.43
7.24	6.06
7.06	5.88
7.54	6.15
6.71	5.71

Σύμφωνα με τον Πίνακα 8 το pH πριν την αποστείρωση ρυθμιζόταν στο 7.54, ώστε να επιτυγχάνεται το pH- στόχος (6.1-6.2) μετά από την αποστείρωση.

Όσον αφορά την a_w έγιναν δοκιμές για την ρύθμιση του ΜΕΑ στο 0.82-0.83 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας γλυκερόλης. Η a_w του θρεπτικού υλικού είναι 0.99 χωρίς τη γλυκερόλη. Οι δοκιμές που έγιναν ήταν οι εξής:

Πίνακας 9: Δοκιμές ρύθμισης της επιθυμητής a_w .

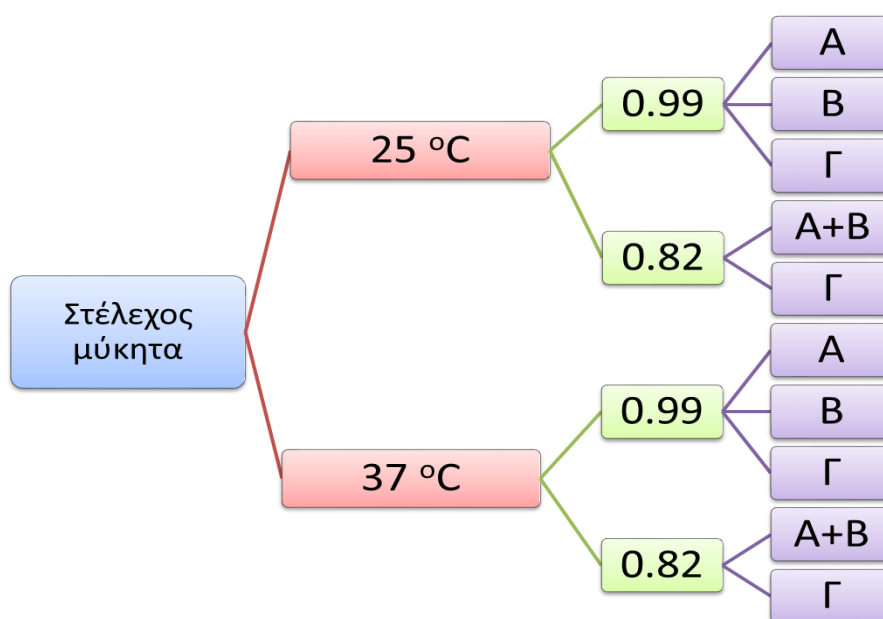
glycerol % (v/v)	a_w
0	0.9874
10	0.9705
20	0.9286
25	0.8881
30	0.8789
40	0.8223
42	0.8123
45	0.7653
47	0.7382
50	0.7186

Από τις παραπάνω δοκιμές (Πίνακας 9) ότι η ποσότητα 37% (v/v) γλυκερόλης (a_w 0.84) ήταν η επιθυμητή (δεδομένου ότι για την απορρόφηση του εμβολίου απαιτούνταν παραμονή στο θάλαμο νηματικής ροής για περίπου 20min με αποτέλεσμα να μειωθεί περαιτέρω η a_w και να προκύψει η επιθυμητή 0.82-0.83).

2.2.3. Προετοιμασία εμβολίου

Για κάθε εμβολιασμό η προετοιμασία του εμβολίου διαρκούσε 7 ημέρες. Αρχικά εμβολιάζονταν 10ml εναιωρήματος σπορίων (από στοκ) σε ΜΕΑ υπό ασηπτικές συνθήκες και επωάζονταν για 7 ημέρες στους 25°C με σκοπό τη συλλογή σπορίων. Στη συνέχεια η συλλογή των σπορίων πραγματοποιούνταν σε θάλαμο νηματικής ροής με την προσθήκη 10ml διαλύματος 0.1% (v/v) Tween 80, το οποίο βοηθά στο διαχωρισμό των σπορίων από τυχών συσσωματώματα. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης σπάτουλας τα σπόρια αποκολλούνταν από το μυκήλιο και μετάβαιναν στην υδατική φάση. Το εναιώρημα των σπορίων μεταφερόταν με σωλήνες Falcon (χωρητικότητας 50ml) μέσα από αποστειρωμένη γάζα που λειτουργούσε ως φίλτρο κατακράτηση τμημάτων μυκηλίου και θρεπτικού υποστρώματος. Κατόπιν, αραιωνόταν το αρχικό εναιώρημα με Ringer, ώστε να έχουμε 10^6 σπόρια, ώστε τα 10μl εμβολίου να έχουν 10^3 σπόρια.

2.2.4. Γραφικός πειραματικός σχεδιασμός



2.3. *In situ* μελέτη δυναμικού αλλοίωσης των BRIOCHE

Για την *in situ* μελέτη του δυναμικού αλλοίωσης των μυκήτων στα προϊόντα τύπου Brioche χρησιμοποιήθηκαν Brioche με γέμιση μπισκότο και επιλέχθηκαν 5 στελέχη του γένους *Penicillium* sp. Οι πέντε (5) απομονώσεις των *Penicillium* sp. που επιλέχθηκαν αντιστοιχούν σε αυτές με τον υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξής τους στα εργαστηριακά υλικά που προσομοιάζαν το προϊόν Brioche (a_w 0.82) (*in vitro* μελέτη του δυναμικού ανάπτυξης των μυκήτων). Η προετοιμασία του εμβολίου πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.3. και το επίπεδο του εμβολίου ήταν 10^3 σπόρια.

Ο εμβολιασμός έγινε σε πέντε (5) σημεία στο τρόφιμο: Πάνω, Κάτω, Πλάι, Σοκολατάκια (choco chips) και γέμιση, γιατί οι αρχικές απομονώσεις των μυκήτων απομονώθηκαν από αυτά τα σημεία των Brioche. Για όλες τις περιπτώσεις, εκτός της γέμισης, πραγματοποιούνταν τοπικός εμβολιασμός και με χρήση πιπέτας τοποθετούνταν το εμβόλιο (2μl) σε βάθος 1-2mm από την επιφάνεια του τροφίμου. Όσον αφορά στη γέμιση, εμβολιάστηκε ώστε να επιτευχθεί 100 σπόρια/ g και ακολούθησε ανάδευσή της για ομογενοποίηση του εμβολίου. Στη συνέχεια άδεια Brioche γεμίστηκαν με 15 g της εμβολιασμένης γέμισης.

Τέλος, συσκευάστηκαν σε σακούλες υπό Τροποποιημένες Ατμόσφαιρες (MAP), όπως συσκευάζονται και στη βιομηχανία και εγχύθηκαν δύο (2) μείγματα αερίων και αέρας. Στην α) περίπτωση παρουσιάζεται η προτεινόμενη αναλογία αερίων για τη συσκευασία των Brioche, στη β) η αναλογία που πετυχαίνει η βιομηχανία και η γ) αντικατροπτίζει το ιδανικό περιβάλλον ατμόσφαιρας για ανάπτυξη των μυκήτων, λόγω ότι είναι αερόβιοι

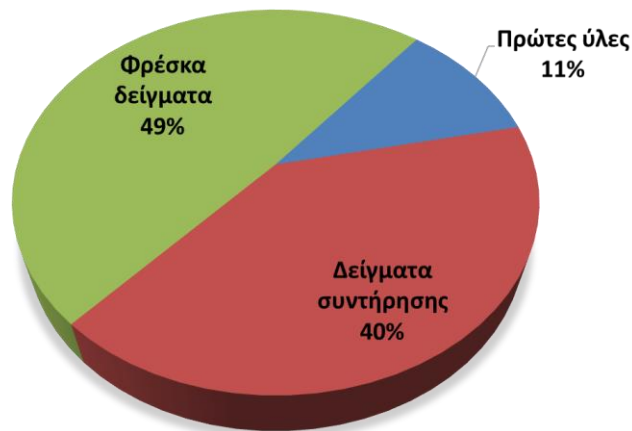
α) με 80% N_2 : 20% CO_2 , όπως είναι το προτεινόμενο για αυτά τα τρόφιμα β) 80% N_2 : 10% CO_2 : 10% O_2 γ) αέρα. Στη συνέχεια συντηρήθηκαν στους 15, 25 και 37°C, όπου οι 25°C αποτελούν την προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης του προϊόντος και οι 15 και 37°C θερμοκρασίες καταπόνησης και τέλος, παρακολουθούνταν η τυχόν ανάπτυξη ορατού μυκηλίου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Απομόνωση και μορφολογική ταξινόμηση μυκήτων

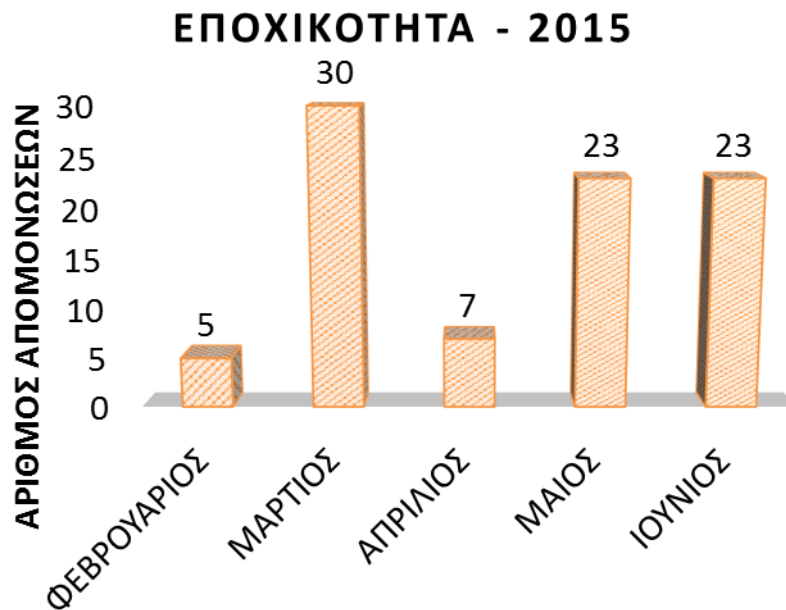
Οι μύκητες είναι η βασική αλλοιωγόνος χλωρίδα των τροφίμων ενδιάμεσης υγρασίας, τα οποία σύμφωνα με τον FAO είναι τρόφιμα με ενεργότητα νερού a_w 0.65-0.90 και χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα κατά τη συντήρησή τους. Στα τρόφιμα αυτά συγκαταλέγονται και τα προϊόντα τύπου Brioche με pH 6-6.3 και a_w με εύρος 0.82-0.85. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Dremetsika et al, unpublished data) προσδιορίστηκε ο χρόνος ζωής προϊόντων Brioche με διαφορετικές γεμίσεις (φράουλα, μπισκότο, πραλίνα), σε δύο (2) θερμοκρασίες συντήρησης (20°C και 37°C) και ορίστηκε σε >55 ημέρες. Στην ίδια μελέτη ερευνήθηκε η μικροβιολογική κατάσταση των εν λόγω προϊόντων την ημέρα της παραγωγής τους, καθώς και των α' υλών σε βάθος χρόνου περίπου τεσσάρων (4) μηνών (φρέσκα δείγματα). Οι μύκητες αναγνωρίστηκαν ως η βασική αλλοιωγόνος μικροβιακή χλωρίδα των προϊόντων Brioche που δύνανται να υποβαθμίσουν ποιοτικά το προϊόν. Με σκοπό να χαρακτηριστούν οι αλλοιωγόνοι μύκητες απομονώθηκαν συνολικά 106 μύκητες από τα προϊόντα Brioche τόσο κατά τη διάρκεια της συντήρησής τελικών προϊόντων στους 20°C και 37°C όσο και από τα φρέσκα δείγματα (δειγματοληψία την ημέρα παραγωγής τους) και από α' ύλες (Γράφημα 2). Οι απομονώσεις των μυκήτων πραγματοποιούνταν είτε κατά την ορατή ανάπτυξη μυκηλίου στο τελικό προϊόν ή την α' ύλη ή από τα εργαστηριακά θρεπτικά υλικά, με σκοπό να χαρακτηριστούν και οι «εν δυνάμει» αλλοιωγόνοι μύκητες.

Απομονώσεις μυκήτων (n=106)



Γράφημα 2: Πηγές απομόνωσης μυκήτων

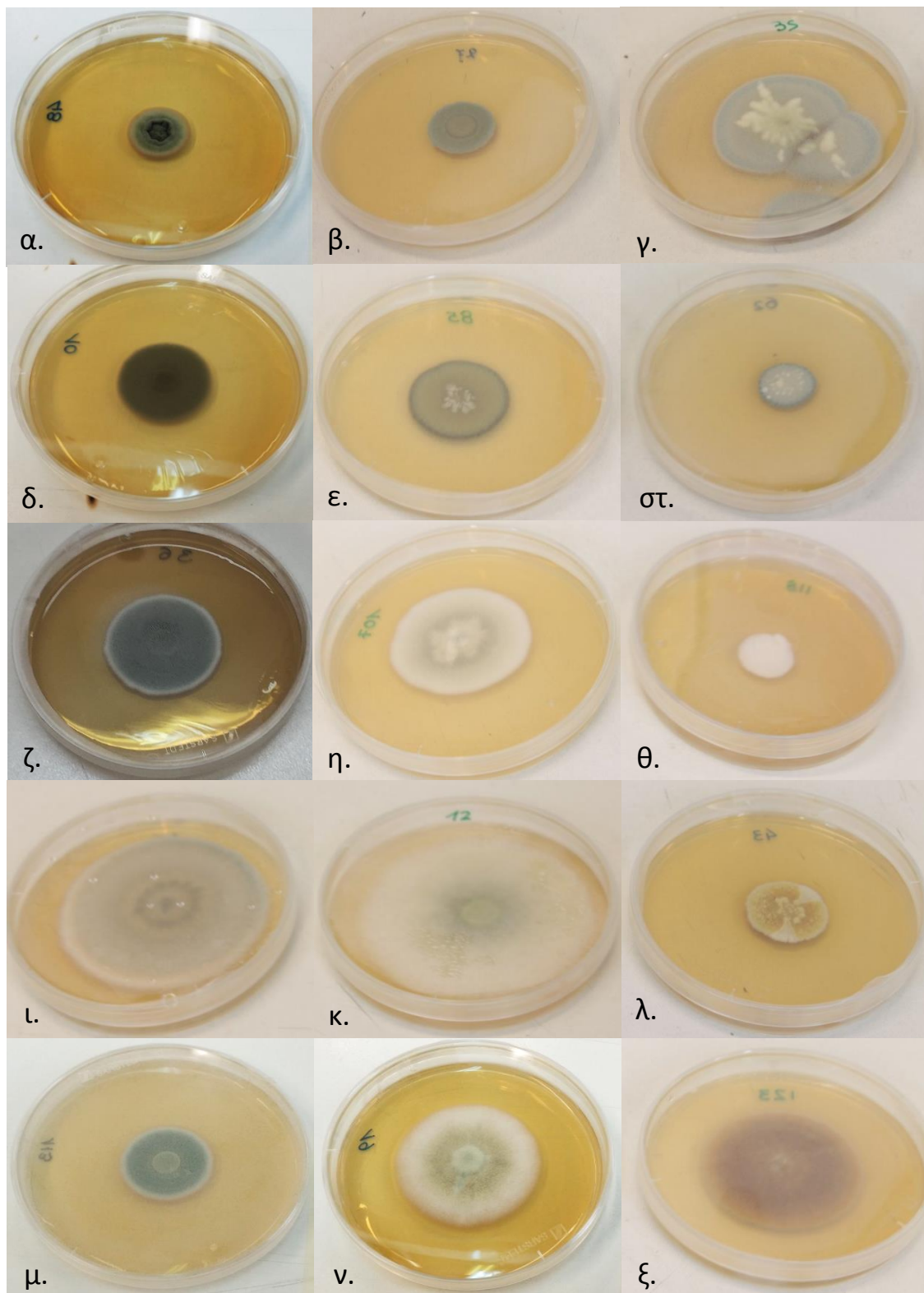
Συνολικά απομονώθηκαν 106 μύκητες, εκ των οποίων η πλειοψηφία των απομονώσεων προήλθε από τα φρέσκα δείγματα (49%). Οι μύκητες αυτοί αποτελούν «εν δυνάμει» αλλοιωγόνους μύκητες, αφού δεν είχαν προλάβει να αναπτυχθούν (καθότι φρέσκα) και να υποβαθμίσουν το προϊόν. Εξίσου υψηλό ποσοστό μυκήτων (40%) απομονώθηκαν από τα δείγματα συντήρησης κατά τη διάρκεια του χρόνου ζωής τους. Σημαντικές είναι και οι απομονώσεις προερχόμενες από τις α' ύλες (11%), καθότι αυτές δύνανται να αποτελέσουν την πηγή επιμόλυνσης και υποβάθμισης των τελικών προϊόντων (Γράφημα 2).



Γράφημα 3: Εποχικότητα εμφάνισης μυκήτων Φεβρουάριος-Ιούνιος 2015

Σύμφωνα με το Γράφημα 3 οι περισσότερες απομονώσεις μυκήτων τοποθετούνται χρονικά στους μήνες Μάιο και Ιούνιο, εποχή που συμπίπτει και με αυξημένη παραγωγή των προϊόντων δεδομένης της ζήτησης στην αγορά. Σύμφωνα με τη μελέτη των De Clercq et al., 2014 η πτώση της υγειονομικής κατάστασης της βιομηχανίας και των τελικών προϊόντων της σε περιόδους αυξημένης παραγωγής, δύνανται να οφείλονται στη μη προσαρμογή των πρακτικών εξυγίανσης και καθαρισμού των χώρων και των μηχανημάτων της βιομηχανίας. Υψηλότερα ποσοστά αιωρούμενων σπορίων μυκήτων παρατηρούνται κατά τους θερινούς μήνες λόγω της διασποράς των σπορίων και τη μεταφορά τους μαζί με τη γύρη (De Clercq et al., 2014).

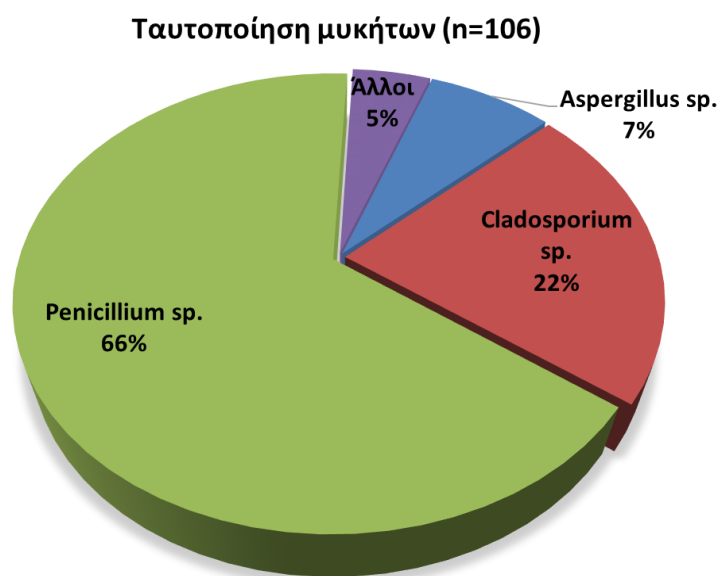
Οι απομονωθέντες μύκητες ταξινομήθηκαν αρχικά, βάσει των μακροσκοπικά μορφολογικών τους χαρακτηριστικών σε εννέα (9) βασικές ομάδες. Παρ' όλα αυτά από το σύνολο των απομονώσεων περίπου το 40% διακρίνονταν από μεγάλη μορφολογική παραλλακτικότητα και δεν μπορούσαν τα καταταχθούν σε κάποια από τις παραπάνω ομάδες (No Group). (Γράφημα 4α-ξ).



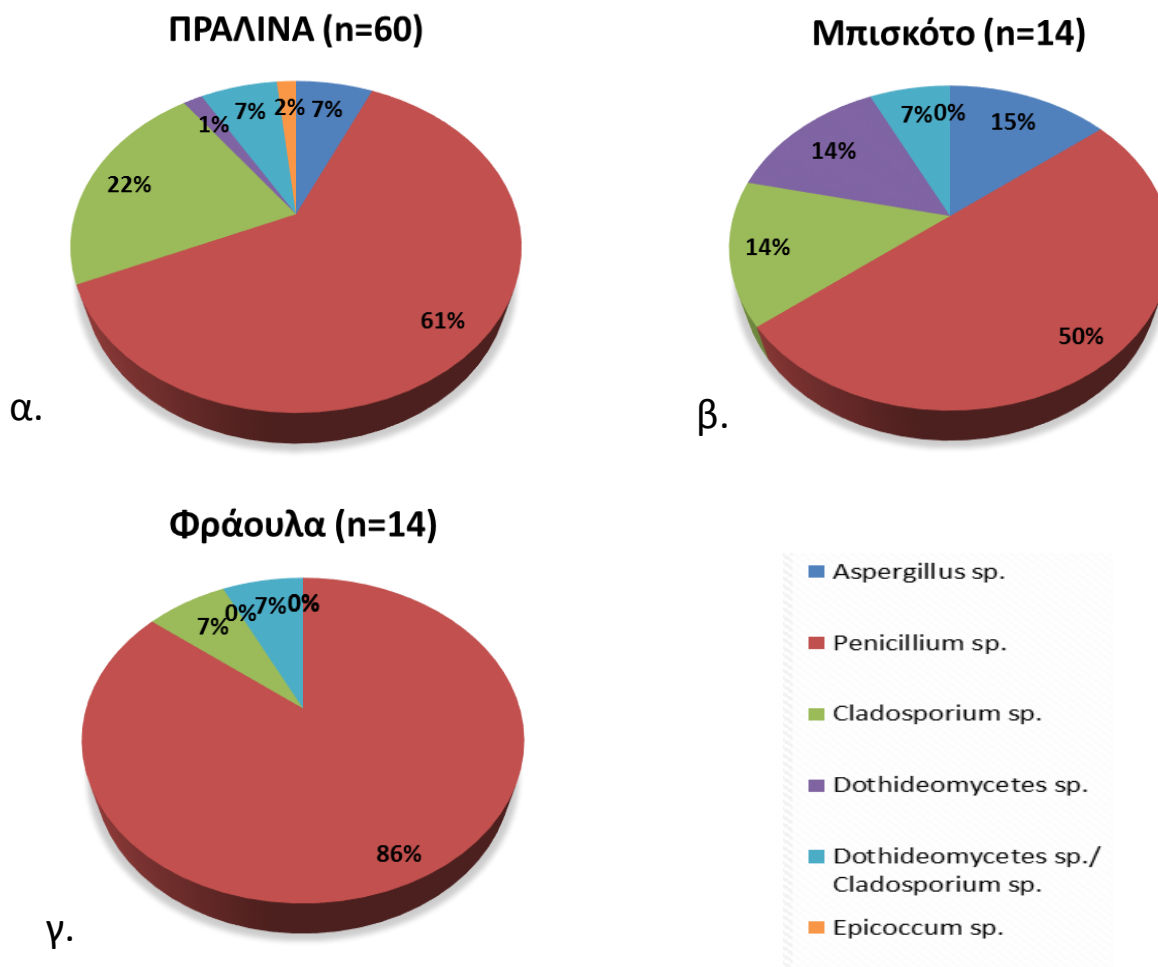
Γράφημα 4: α. Group 1, β. Group 2, γ. Group 3, δ. Group 4, ε. Group 5, στ. Group 6, ζ. Group 7, η. Group 8, θ. Group 9, ι-ξ. No Group

3.2. Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων

Η μορφολογική ταξινόμηση των απομονωθέντων μυκήτων αποτέλεσε έναν προκαταρκτικό τρόπο ομαδοποίησης αυτών και έτσι τέθηκε η αναγκαιότητα ταυτοποίησής τους μέσω μοριακών μεθόδων. Αρχικά απομονώθηκε το DNA των μυκήτων, στη συνέχεια ακολούθησε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), καθαρισμός των προϊόντων και τελικά αλληλούχηση βάσεων του DNA.



Γράφημα 5: Κατανομή των απομονώσεων μυκήτων (n= 106) με βάση το γένος ανεξαρτήτως πηγής απομόνωσης.



Γράφημα 6: Κατανομή των απομονώσεων μυκήτων (n=86) με βάση το γένος στα διαφορετικά προϊόντα Brioche με γέμιση πραλίνα (α), μπισκότο (β) και φράουλα (γ) .

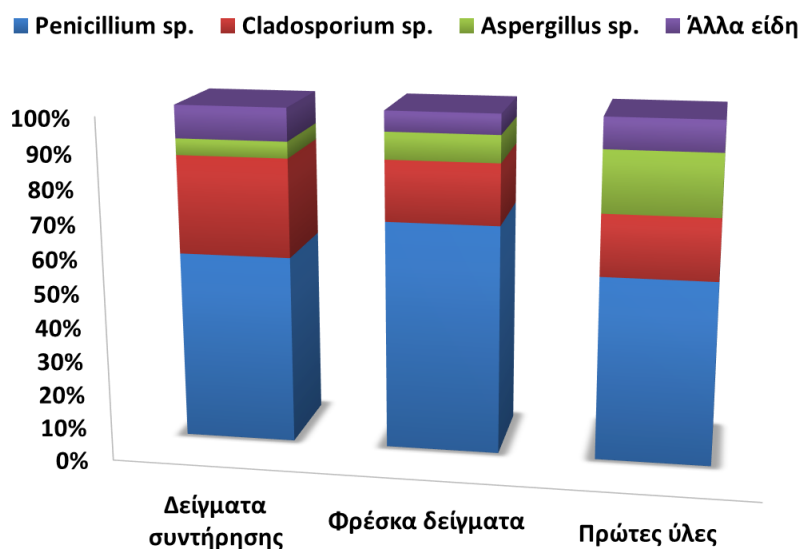
Σύμφωνα με το Γράφημα 5, τα κυρίαρχα γένη των μυκήτων που απομονώθηκαν από τα προϊόντα τύπου Brioche και από α' ύλες, ήταν τα *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. και *Aspergillus* sp. Τα είδη των γενών αυτών είναι γνωστό ότι αποτελούν συχνούς επιμολυντές των τροφίμων ενδιάμεσης υγρασίας (όπως τα προϊόντα τύπου Brioche), λόγω ότι παράγουν ξηροσπόρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να αναπαράγονται στην a_w του τροφίμου και να μεταφέρονται με τον αέρα επιμολύνοντας το περιβάλλον της βιομηχανίας (De Clercq et al., 2014).

Η πλειοψηφία των απομονωθέντων μυκήτων προήλθε από τελικά προϊόντα Brioches με γέμιση πραλίνα (Γράφημα 6α), κάτι που δε δύναται να σχετιστεί άμεσα με το είδος της γέμισης, δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα προϊόντα αποτέλεσαν και την πλειοψηφία των δειγμάτων προς ανάλυση. Στα προϊόντα τύπου Brioches με γέμιση μπισκότο (Γράφημα 6β) ανιχνεύτηκαν και μύκητες της κλάσης Dothideomycetes, οι οποίοι ανήκουν στην ίδια κλάση με το *Cladosporium* sp.. Τα δύο αυτά παραπάνω γένη μαζί με είδη τους γένους *Ericocccum* sp., που απομονώθηκε από την πραλίνα (Γράφημα 6α), επιβιώνουν στο έδαφος, καθώς και σε αποσυντεθειμένη οργανική ύλη φυτών (Schol-Schwarz, 1959) και τα σπόριά τους μεταφέρονται με τον αέρα στο περιβάλλον (De Clercq et al., 2014), γι' αυτό είναι πολύ πιθανή η επιμόλυνση χώρων βιομηχανίας, ειδικά σε αυτούς που υπάρχουν παράθυρα σύνδεσης με το εξωτερικό περιβάλλον. Εκτός από το *Penicillium* sp., το *Cladosporium* sp. αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό γένος μυκήτων που βρίσκονται στο εσωτερικό και εξωτερικό περιβάλλον τους και έχουν αερομεταφερόμενα σπόρια (Bensch et al., 2015). Στο περιβάλλον της βιομηχανίας μόλυνση προϊόντων αρτοποιίας λαμβάνει χώρα συνήθως μετά τη θερμική επεξεργασία (ψήσιμο), δεδομένου ότι η θερμότητα θανατώνει τα πιθανά σπόρια που μπορεί να έχουν αποικίσει το ζυμάρι (Razafinarivo et al., 2016).

Η ετερογένεια της περιοχής ITS 1–5.8S–ITS 2, που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των απομονωθέντων μυκήτων, είναι ικανή να διαχωρίσει όλους τους μύκητες τουλάχιστον σε επίπεδο γένους και σε κάποιες περιπτώσεις σε επίπεδο είδους. Πιο συγκεκριμένα, η διακριτική ικανότητα της εν λόγω μεθόδου για το γένος *Aspergillus* sp. (Magnani et al., 2005; Schoch et al., 2012) φτάνει σε επίπεδο είδους. Για τα *Penicillium* sp. και *Cladosporium* sp. η ετερογένεια της περιοχής ITS 1–5.8S–ITS 2 δεν δύναται να διαχωρίσει τους μύκητες σε επίπεδο είδους (Jagielski et al., 2016). Για τον προσδιορισμό του είδους στο *Cladosporium* sp. χρησιμοποιείται η περιοχή της ακτίνης (*act*) και του γονιδίου *tef* (translation elongation factor 1a) (Segers et al., 2015), ενώ για το γένος *Penicillium* sp., χρησιμοποιείται η περιοχή του γονιδίου της β-τουμπουλίνης (*benA*) (Visagie, Houbraken, et al., 2014).

Τα προϊόντα τύπου Brioches, ως τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας δύνανται να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των ειδών του *Aspergillus* sp. Τα τρόφιμα αυτά με a_w 0.82-0.83 και pH περίπου 6, αποτελούν ιδανικό περιβάλλον ανάπτυξης των μυκήτων αυτών, όπως αναφέρεται και στη μελέτη των (De Clercq et al., 2014) για άλλα

τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας με τα ίδια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Η ικανότητα ανάπτυξης των μυκήτων του γένους *Aspergillus* sp. ακόμη και σε ακραίες συνθήκες (a_w 0.82 και θερμοκρασία 37°C), τους καθιστούν επικίνδυνους επιμολυντές για τα Brioche, καθότι υπό εύρος θερμοκρασιών 12-40°C και $a_w \geq 0.86$, ορισμένα είδη (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*) (Pitt & Hocking, 2009), δύνανται να παράξουν τοξίνες που δρουν αρνητικά στην υγεία των ανθρώπων (Milhome, Lima, Lima, Lima, & Sousa, 2014). Είδη τους γένους *Aspergillus* sp. (*A. cretensis*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. sydowii*, *A. versicolor*) απομονώθηκαν από προϊόντα με γέμιση πραλίνα και μπισκότο και αυτό πιθανότατα οφείλεται στο pH των προϊόντων αυτών (pH 6-6.3) (Utharalakshmi & Ganesh Kumar, 2014). Αντίθετα από Brioche με γέμιση φράουλα, όπου το pH κυμαίνεται από 4.5 έως 5, δεν απομονώθηκαν μύκητες του γένους *Aspergillus* sp..



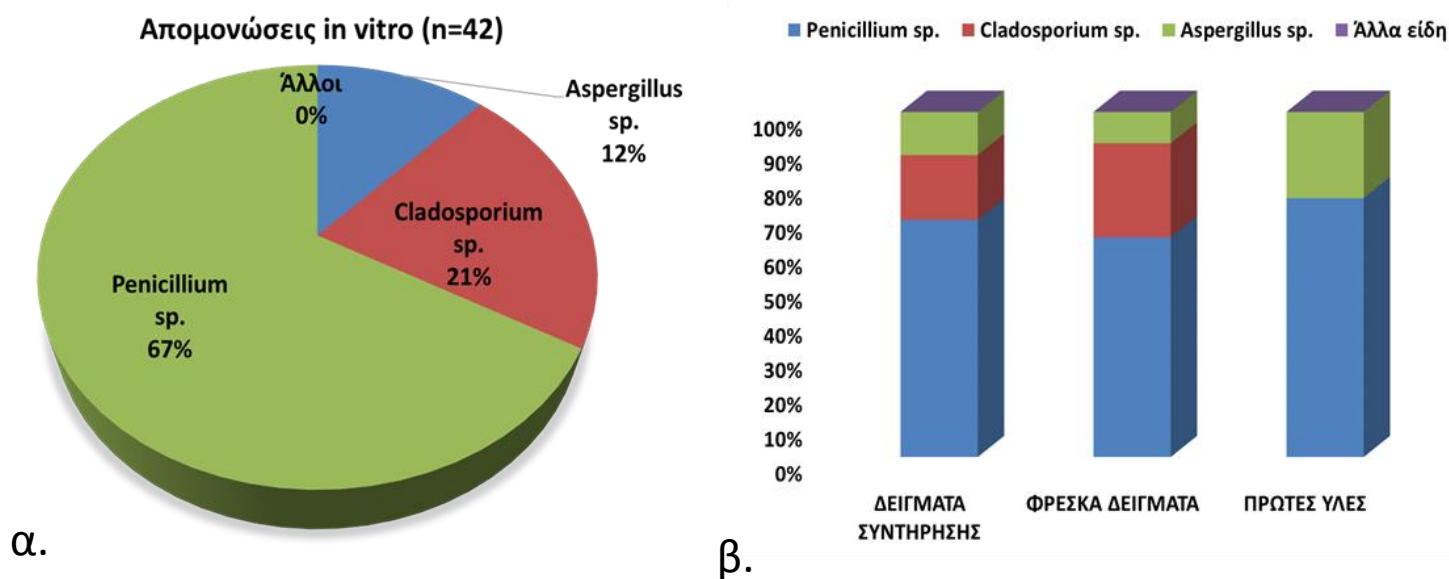
Γράφημα 7: Κατανομή των απομονώσεων μυκήτων (n= 106) με βάση το γένος για τα δείγματα συντήρησης, τα φρέσκα δείγματα και τις πρώτες ύλες.

Στο Γράφημα 7 απεικονίζεται το ποσοστό από το κάθε γένος μύκητα από τα τρία (3) κυρίαρχα, καθώς και από τα υπόλοιπα, που έχει απομονωθεί από τα δείγματα της συντήρησης, τα φρέσκα δείγματα και από τις πρώτες ύλες. Τα *Penicillium* sp. είναι αυτά που απομονώθηκαν κατά 50 έως 60% και στις τρεις (3) περιπτώσεις δειγμάτων. Από 20 έως 30% απομονώθηκαν μύκητες του γένους

Cladosporium sp. για κάθε κατηγορία δειγμάτων και *Aspergillus* sp. 5 έως 20% από τις πρώτες ύλες. Τα υπόλοιπα γένη απομονώθηκαν σε ποσοστό 5 με 10% και δεν ήταν αυτοί που αποτέλεσαν τη βασική αλλοιωγόνο χλωρίδα των προϊόντων τύπου Brioche.

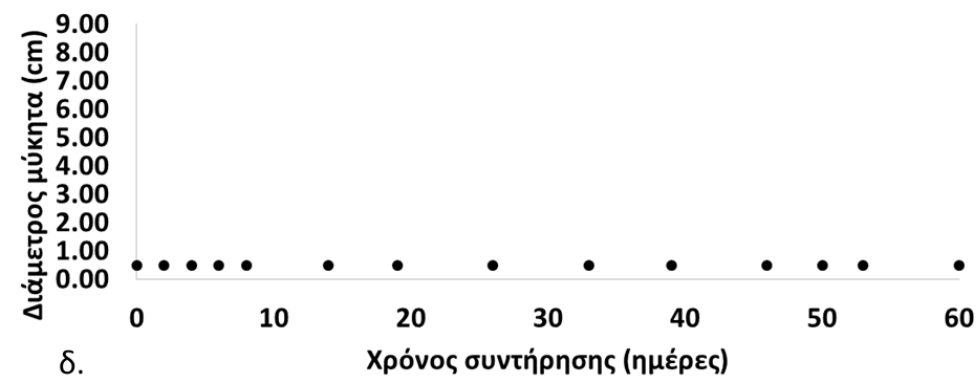
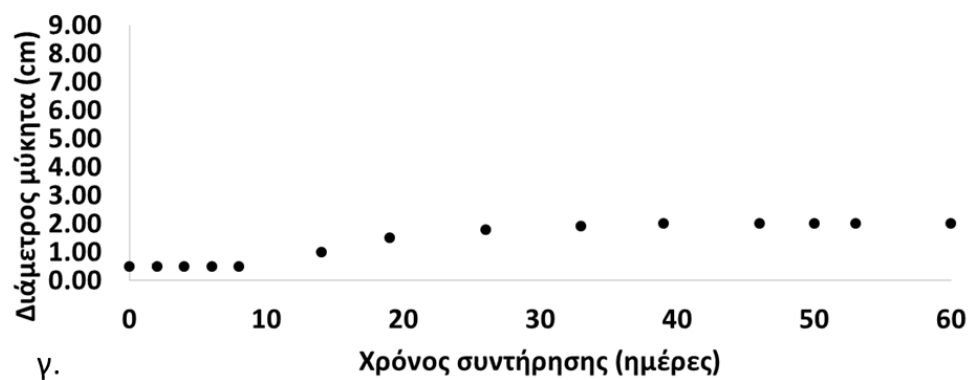
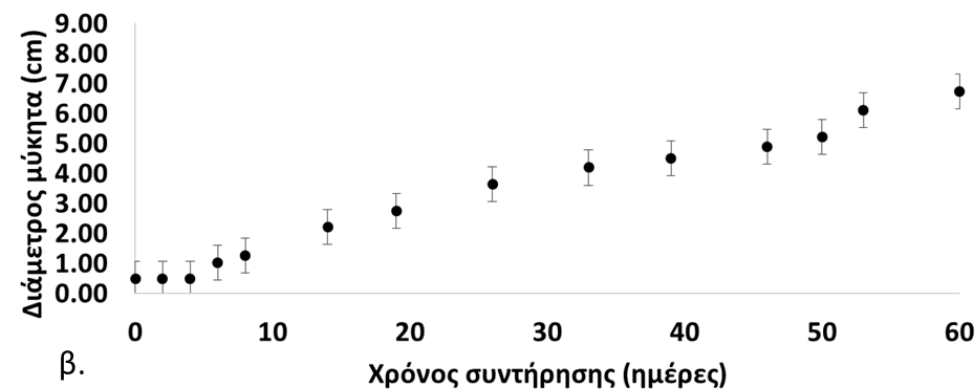
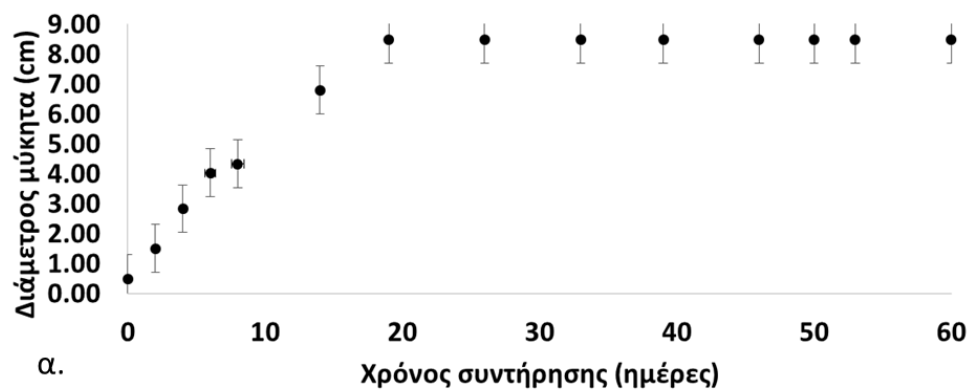
3.3. *In vitro* μελέτη δυναμικού ανάπτυξης μυκήτων

Με σκοπό την περαιτέρω ομαδοποίηση των απομονωθέντων στελεχών εντός κάθε γένους, ως προς την ικανότητα αλλοίωσης των προϊόντων τύπου Brioche, μελετήθηκε *in vitro* δυναμικό ανάπτυξης αυτών σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα που προσομοιάζαν τις συνθήκες του τροφίμου (pH , a_w). Πιο συγκεκριμένα, για την *in vitro* μελέτη ανάπτυξης δυναμικού των μυκήτων, όπως αναφέρεται εκτενώς στα Υλικά και Μέθοδοι (Κεφάλαιο 2.2.), χρησιμοποιήθηκε το MEA (Malt Extract Agar) ως εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα με συνδυασμούς συνθήκων (pH 6.2, a_w 0.82 και 0.99 και $T = 25$ και $37^\circ C$). Το pH 6.2 που χρησιμοποιήθηκε αντιστοιχεί στο pH του τροφίμου Brioche με γέμιση πραλίνα και μπισκότο, από τα οποία απομονώθηκε και μεγαλύτερος αριθμός μυκήτων. Η ενεργότητα νερού, a_w 0.99 αντιστοιχεί στην βέλτιστη για την ανάπτυξη των μυκήτων τιμή, ενώ η a_w 0.82 προσομοιάζει το περιβάλλον του τελικού προϊόντος (ζύμη και γέμιση). Επιπλέον η $T = 25^\circ C$ αντιστοιχεί στην προτεινόμενη από τη βιομηχανία θερμοκρασία συντήρησης, ενώ η $T = 37^\circ C$ αποτελεί μια θερμοκρασία καταπόνησης, στην οποία μπορεί να εκτεθούν τα προϊόντα ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών. Οι απομονώσεις μυκήτων που επιλέχθηκαν για αυτό το μέρος της μελέτης ήταν 42. Η επιλογή έγινε με βάση την ομαδοποίηση των μυκήτων με κριτήριο τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά τους (παράγραφος 3.1.). Πιο συγκεκριμένα, με σκοπό να προσδιοριστεί το δυναμικό ανάπτυξης όσο το δυνατόν περισσότερων αντιπροσωπευτικών απομονώσεων μυκήτων επιλέχθηκαν 1-2 απομονώσεις από τις εννέα (9) παραπάνω ομάδες καθώς και όλες αυτές που δεν άνηκαν σε κάποια ομάδα βάσει των μακροσκοπικών χαρακτηριστικών τους.



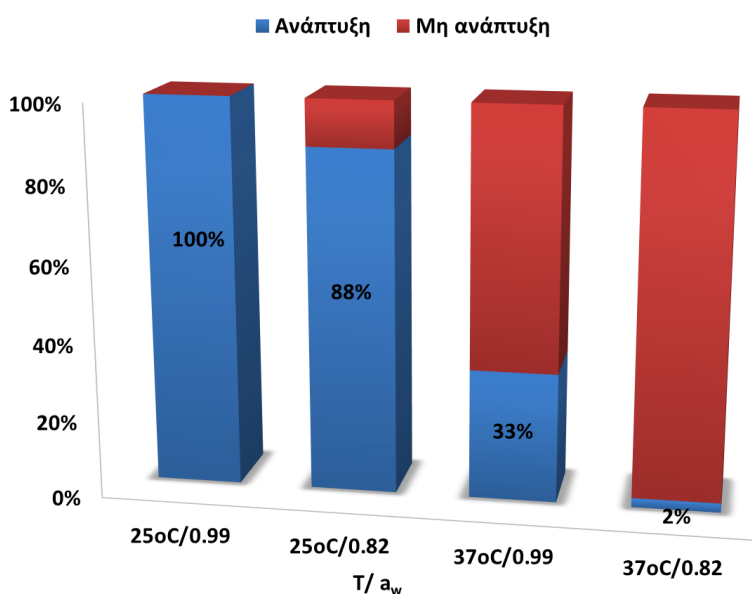
Γράφημα 8: Κατανομή των απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* μελέτη του δυναμικού ανάπτυξης των μυκήτων (n=42) (α) με βάση το γένος των μυκήτων και (β) με βάση το γένος των μυκήτων για κάθε πηγή απομόνωσης (δείγματα συντήρησης, τα φρέσκα δείγματα και τις πρώτες ύλες).

Στο Γράφημα 8α απεικονίζονται τα ποσοστά των τριών (3) κυρίαρχων γενών μυκήτων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* μελέτη του δυναμικού ανάπτυξης των μυκήτων. Στο Γράφημα 8β απεικονίζεται το ποσοστό από το κάθε γένος μύκητα από τα τρία (3) κυρίαρχα, καθώς και από τα υπόλοιπα, που έχει απομονωθεί από τα δείγματα της συντήρησης, τα φρέσκα δείγματα και από τις πρώτες ύλες. Τα ποσοστά αυτά είναι ανάλογα με αυτά του Γραφήματος 4, όπου αναφέρονται τα αντίστοιχα ποσοστά για το σύνολο των απομονώσεων.



Γράφημα 9: Καμπύλες ανάπτυξης του *Penicillium sp.* (101) α. στους 25°C σε a_w 0.99, β. στους 25°C a_w σε 0.82, γ. στους 37°C σε a_w 0.99 και δ. στους 37°C σε a_w 0.82.

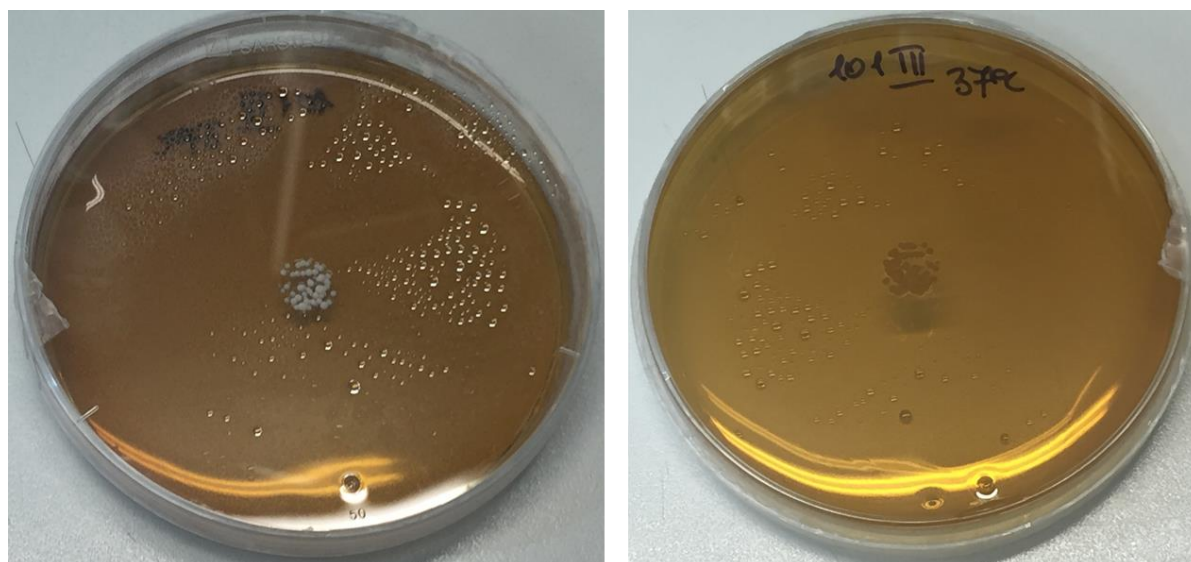
Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μυκήτων πραγματοποιούνταν με μέτρηση της διαμέτρου τους ανά τακτά χρονικά διαστήματα για διάστημα 60 ημερών, ενώ η αποτύπωσή τους σε γράφημα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας καμπύλης ανάπτυξης για κάθε απομόνωση. Ως μέγιστη διάμετρος ορίστηκε η διάμετρος κυκλικού τρυβλίου, που ισούται με 8.5cm. Ο ρυθμός ανάπτυξης (κλίση ευθείας) υπολογίστηκε από την προσαρμογή ενός γραμμικού μοντέλου στα σημεία της καμπύλης ανάπτυξης του μύκητα (Υλικά και Μέθοδοι 2.2.1. και Γράφημα 9).



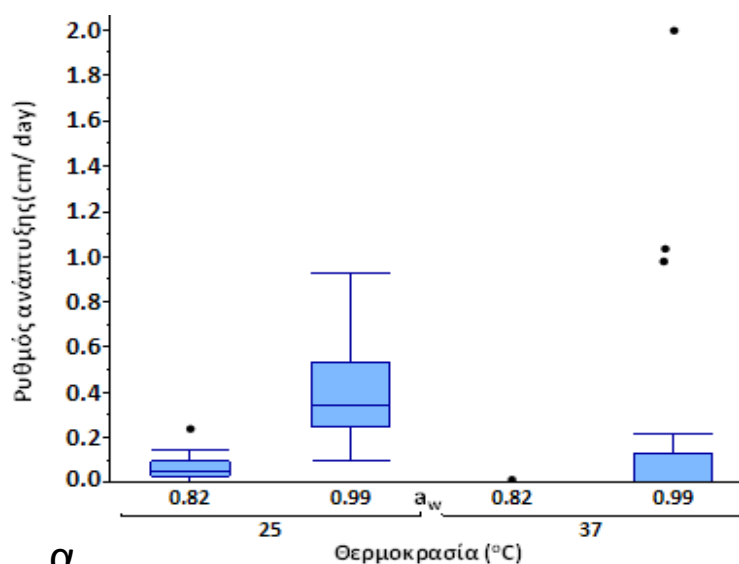
Γράφημα 10: Ποσοστό των απομονώσεων μυκήτων που εμφανίζουν ανάπτυξη (μπλε)/ μη ανάπτυξη(κόκκινο) υπό διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας και a_w .

Όλοι οι υπό μελέτη μύκητες ($n=42$) αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 25°C σε συνδυασμό με την a_w 0.99, δεδομένου ότι αποτελούν τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης. Το 88% των μυκήτων παρουσίασαν δυναμικό ανάπτυξης στους 25°C σε υλικά που προσομοιάζουν το προϊόν Brioche. Αντίθετα, ικανότητα ανάπτυξης στους 37°C και a_w 0.99 εμφάνισε το 33% των υπό μελέτη μυκήτων, στο οποίο εκτός από είδη του γένους *Aspergillus* sp. περιλαμβάνονταν και ορισμένα είδη του γένους *Penicillium* sp., πλην όμως με χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης, δεδομένου ότι η θερμοκρασία αυτή είναι ιδιαίτερα καταπονητική για αυτούς (Visagie, Houbraken, et al., 2014) (Γράφημα 10). Η υψηλή θερμοκρασία όμως σε συνδυασμό με a_w , 0,82 είχε

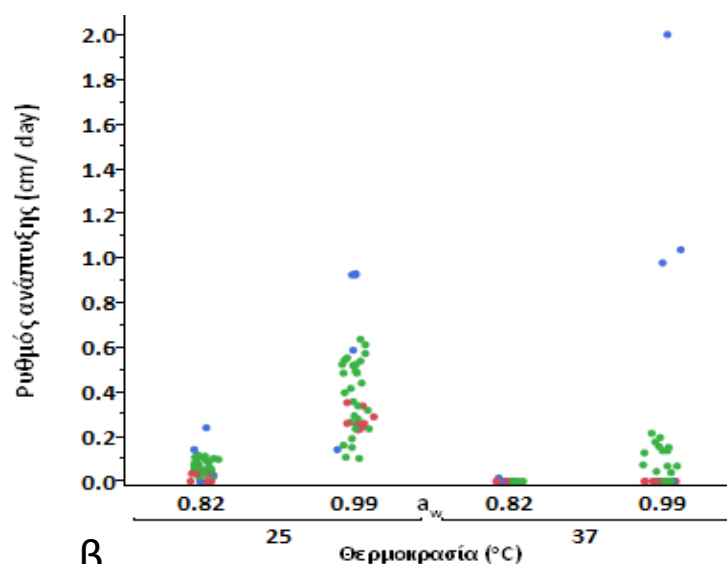
ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μόνο του 2% των υπό μελέτη μυκήτων, όπου ανήκει το γένος *Aspergillus* sp., όπως *A. flavus* σε αυτή την περίπτωση. Ο *A. flavus* είναι γνωστό ότι δύναται να αναπτυχθεί και σε υψηλή θερμοκρασία έως και 45°C και σε a_w έως 0.78 (Pitt & Hocking, 2009). (Γράφημα 11)



Γράφημα 11: Ανάπτυξη του *Penicillium* sp. (101) σε a_w 0.99 μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 37°C. Επάνω όψη (αριστερά), κάτω όψη (δεξιά)



α.

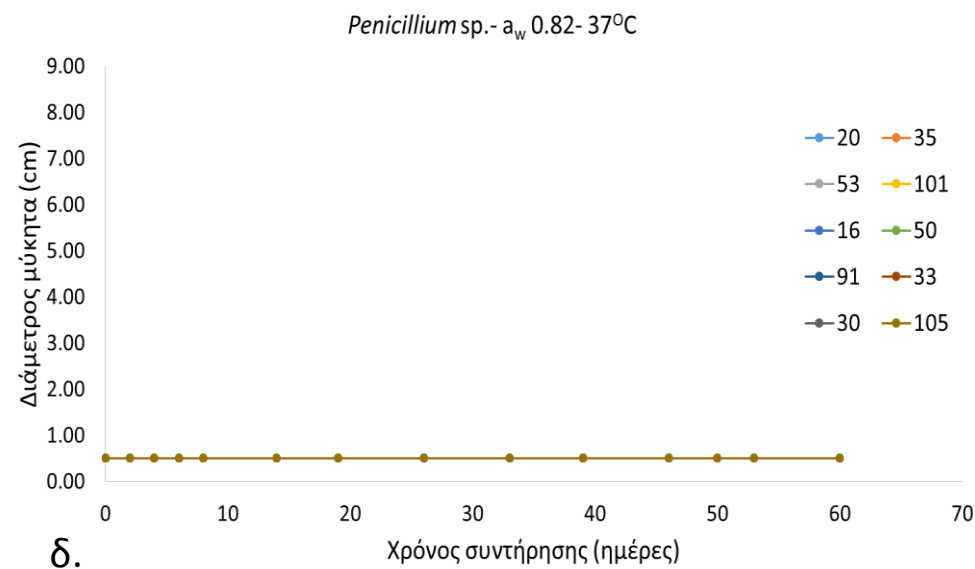
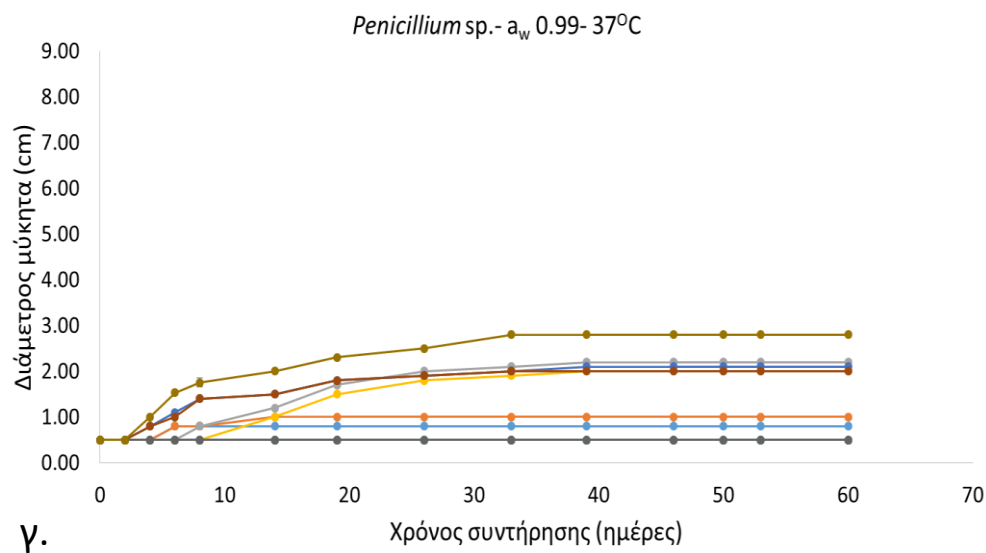
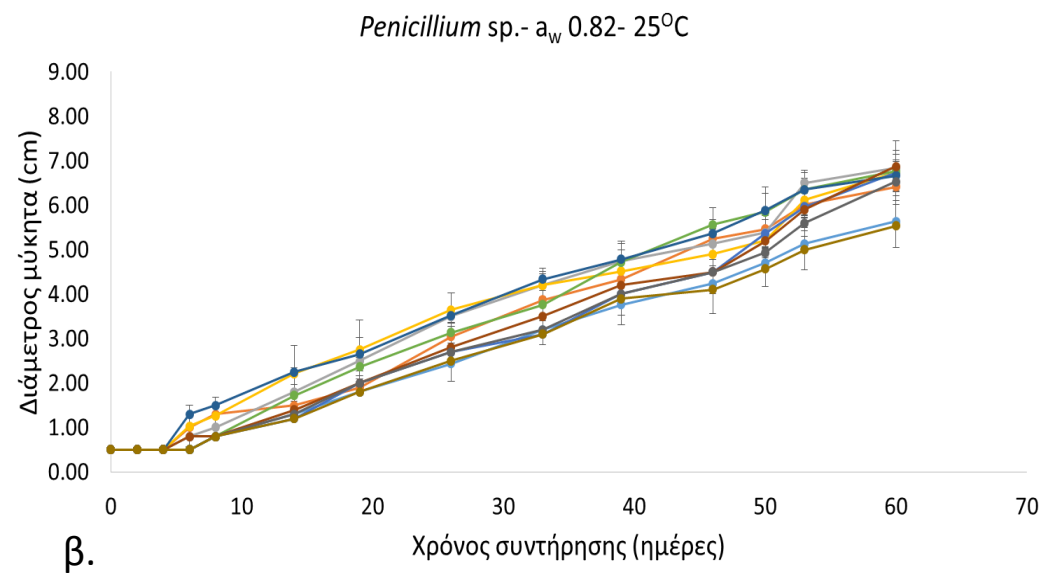
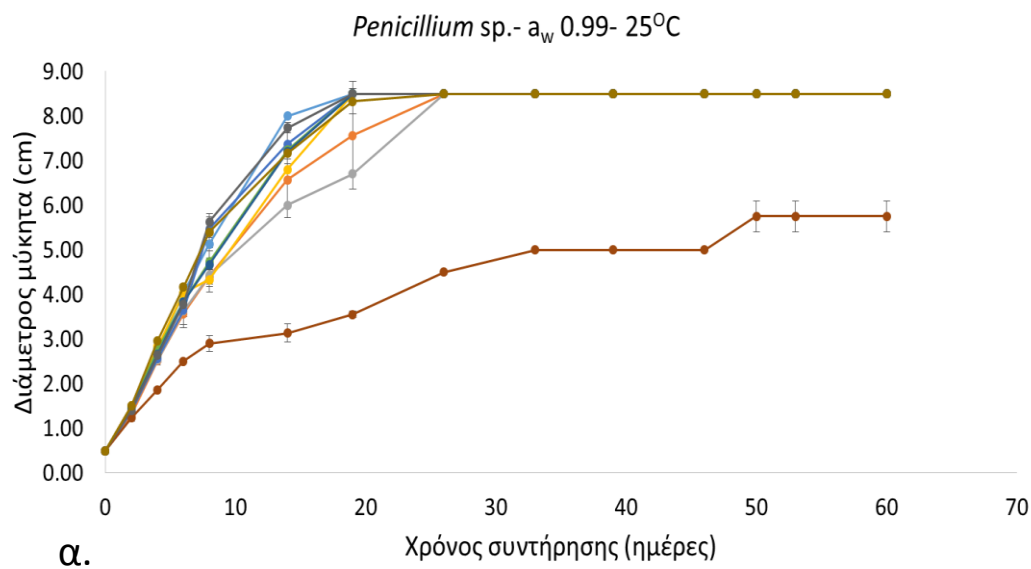


β.

Γράφημα 12α-β: Ετερογένεια μεταξύ των ειδών στο δυναμικό ανάπτυξης των μυκήτων υπό διαφορετικούς συνδυασμούς T / a_w . (α) Τα μπλε κουτιά αναφέρονται στο διατεταρτομοριακό εύρος (IQR) για όλες τις απομονώσεις μυκήτων ανά T/a_w , ενώ η οριζόντια γραμμή αναφέρεται στο μέσο (β) Οι Χρωματιστές τελείες αντιπροσωπεύουν τους ρυθμούς ανάπτυξης των απομονώσεων των γενών *Penicillium* (πράσινο), *Cladosporium* (κόκκινο) και *Aspergillus* (μπλε).

Στα γραφήματα 12α-β παρουσιάζεται η ετερογένεια των μελετούμενων γενών μυκήτων σε διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας και a_w . Παρατηρώντας τα γραφήματα φαίνεται ότι η a_w 0.99 ευνοεί την ανάπτυξη όλων των μυκήτων στους 25°C και αρκετών στους 37°C. Στην a_w 0.82 παρουσιάζουν υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης οι ξηροφιλικοί μύκητες.

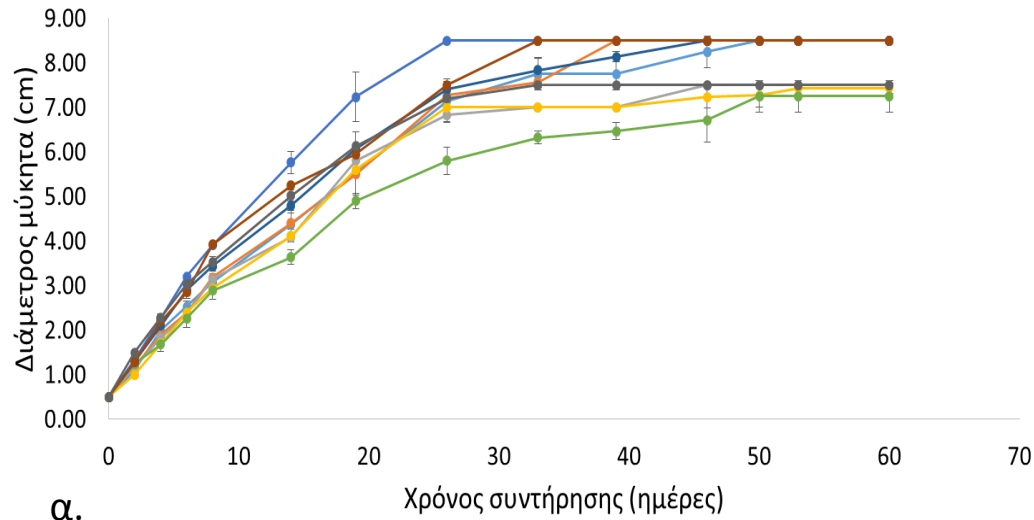
Στο Γράφημα 12α φαίνεται ότι το εύρος ανάπτυξης των περισσότερων μυκήτων είναι 0.2-0.5 σε η a_w 0.99 στους 25°C, ενώ σε a_w 0.82 στην ίδια θερμοκρασία το εύρος είναι 0-0.2, λόγω της παρεμποδιστικής δράσης που ασκεί στο θρεπτικό υπόστρωμα με τη χαμηλή a_w . Στην a_w 0.99 στους 37°C ο ρυθμός ανάπτυξης κυμαίνεται σε 0-0.2, καθότι στη θερμοκρασία αυτή αναπτύσσονται τα θερμοφιλά στελέχη από το κάθε γένος. Στο Γράφημα 12β παρατηρείται η διασπορά των στελεχών των μυκήτων στους συνδυασμούς θερμοκρασιών και a_w . Εξαιρέσεις σε όλες τις περιπτώσεις αποτελούν στελέχη του γένους *Aspergillus* sp. (μπλε τελείες), τα οποία φαίνεται ότι ειδικά στους 37°C σε a_w 0.99 έχουν πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και αυτό επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες των (Kosegarten, Ramírez-Corona, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2016; Pitt & Hocking, 2009).



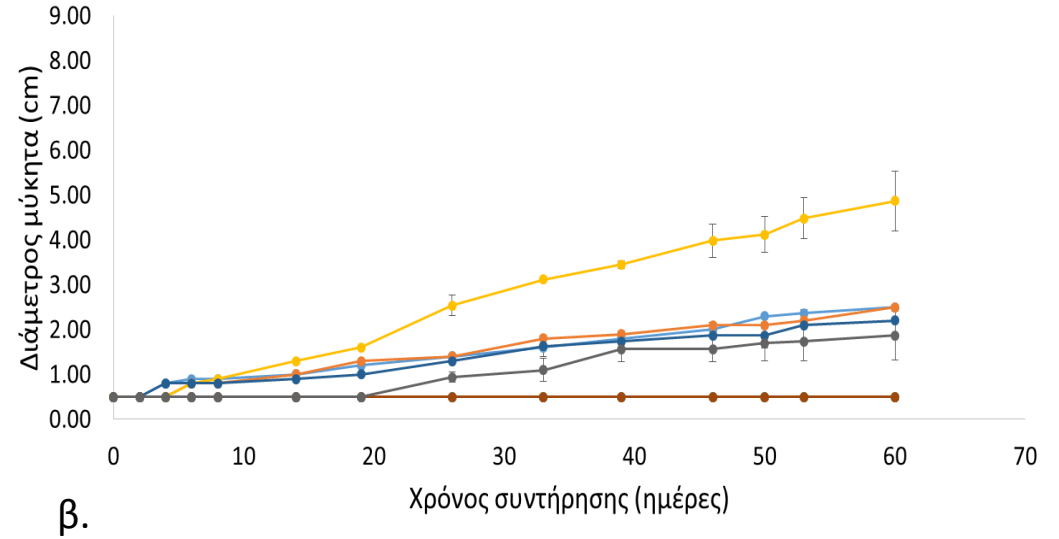
Γράφημα 13: Καμπύλες ανάπτυξης των δέκα (10) πιο ταχέως αναπτυσσόμενων στελεχών του γένους *Penicillium* sp. στους 25°C σε a_w 0.99 (α), στους 25°C a_w σε 0.82 (β), στους 37°C σε a_w 0.99 (γ) και στους 37°C σε a_w 0.82 (δ). Κάθε σειρά δεδομένων αναφέρεται σε διαφορετικό κωδικό απομόνωσης (20, 35, 53, 101, 16, 50, 91, 33, 30, 105)

Οι μύκητες του γένους *Penicillium* sp. είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενα σε εσωτερικά και εξωτερικά περιβάλλοντα (Visagi et al., 2014). Στα Γραφήματα 13α-δ απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης για τις δέκα (10) πιο ταχέως αναπτυσσόμενες απομονώσεις του γένους *Penicillium* sp. σε θερμοκρασία 25°C, 37°C και a_w 0.99 , 0.82. Ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης για αυτά τα είδη είναι οι 25°C (Optimum, 2009), όπως φαίνεται και από το Γράφημα 13α, όπου η πλειοψηφία έφτασε τη μέγιστη διάμετρο (8.5cm) μετά από 25 μέρες συντήρησης. Σε Brioche-τύπου εργαστηριακά υλικά όμως παρατηρείται μία υστέρηση στο ρυθμό ανάπτυξης των *Penicillium* sp. που επιτυγχάνουν όμως τη μέγιστη διάμετρο μετά από >60 ημέρες συντήρησης. Αντίθετα, αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης (37°C) είχε ως αποτέλεσμα τόσο μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης για όλα τα υπό μελέτη penicillia καθώς και μικρότερη μέγιστη διάμετρο. Πιο συγκεκριμένα η μέγιστη διάμετρός τους δεν ξεπέρασε τα 2.5cm (Γράφημα 13γ). Συνδυασμός, δε, υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλής a_w δεν επέτρεψε την ανάπτυξη κανενός υπό μελέτη *Penicillium* sp.. Επομένως, πιθανή θερμοκρασιακή καταπόνηση (αύξηση της θερμοκρασίας), όπως παρουσιάζεται και από το Γράφημα 13δ, δε θα οδηγούσε σε ποιοτική υποβάθμιση των προϊόντων τύπου Brioche από μύκητες του γένους *Penicillium* sp., λόγω της ανικανότητας ανάπτυξής τους σε υψηλές θερμοκρασίας στην a_w που έχουν τα Brioche.

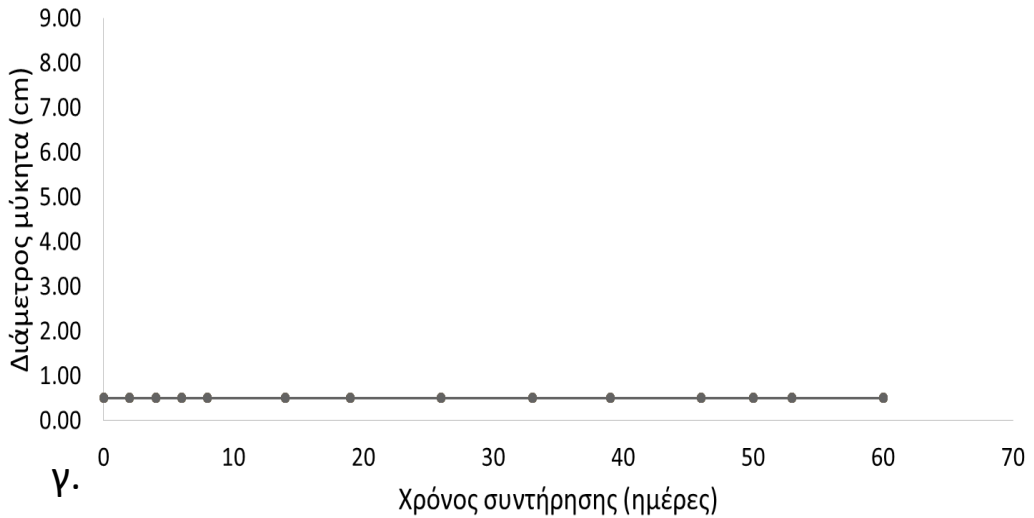
Cladosporium sp.- a_w 0.99- 25°C



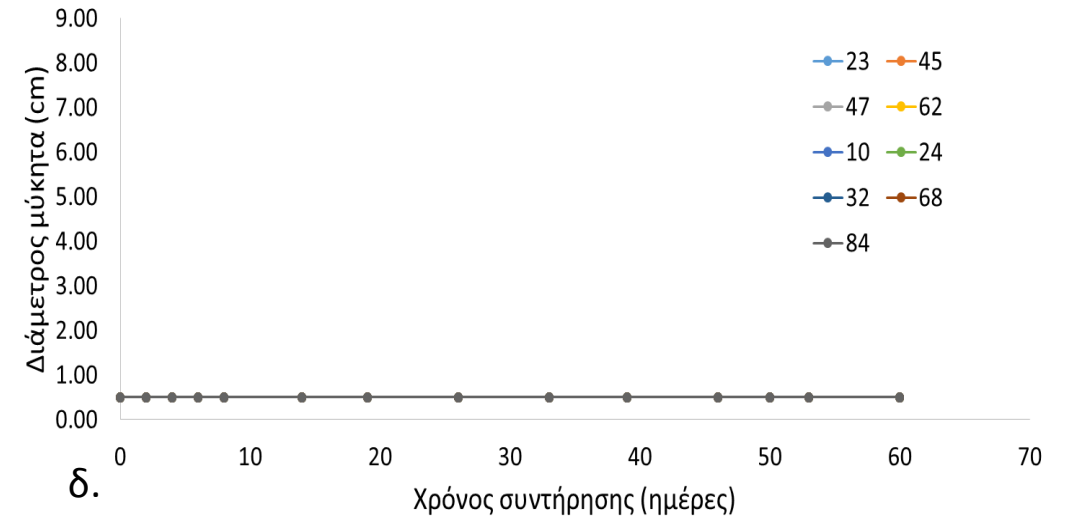
Cladosporium sp.- a_w 0.82- 25°C



Cladosporium sp.- a_w 0.99- 37°C

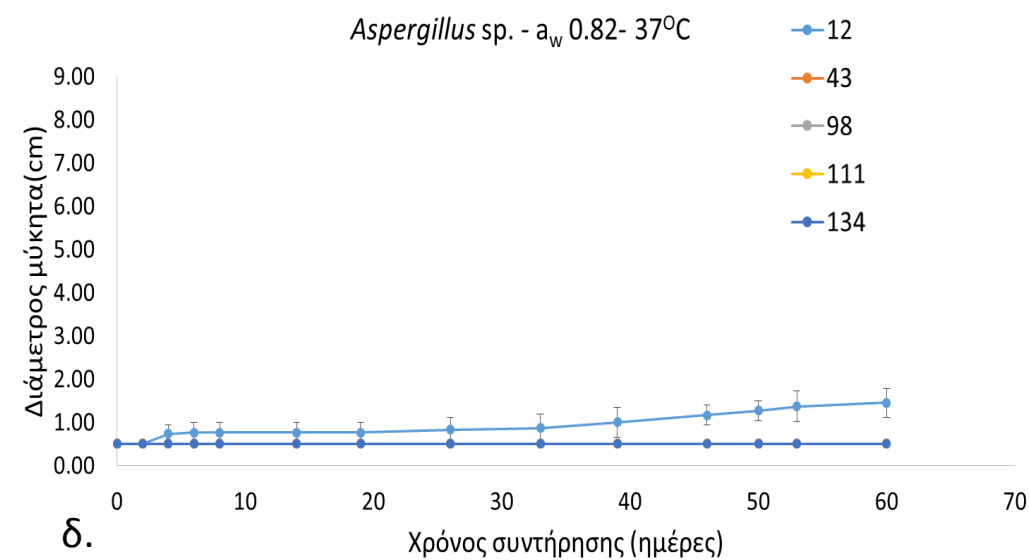
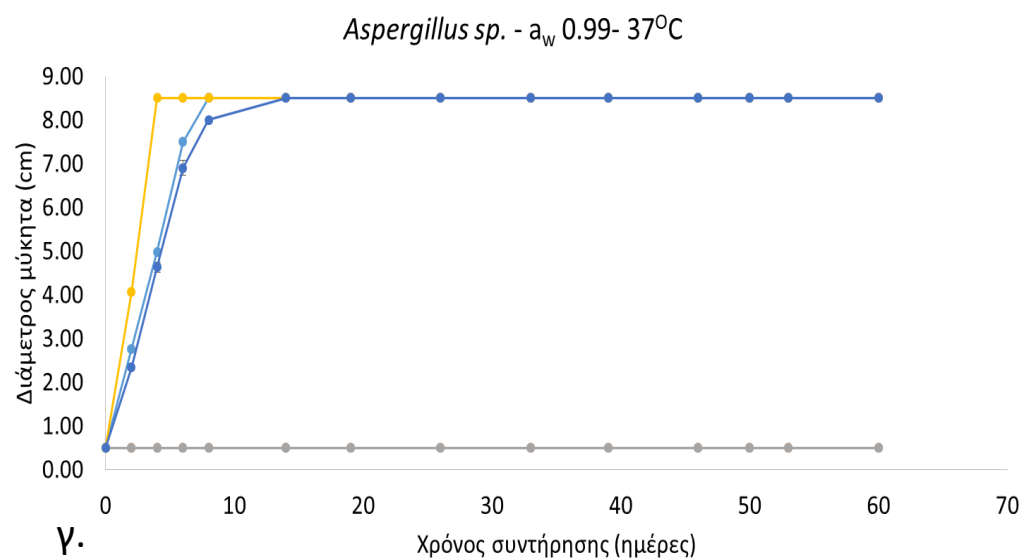
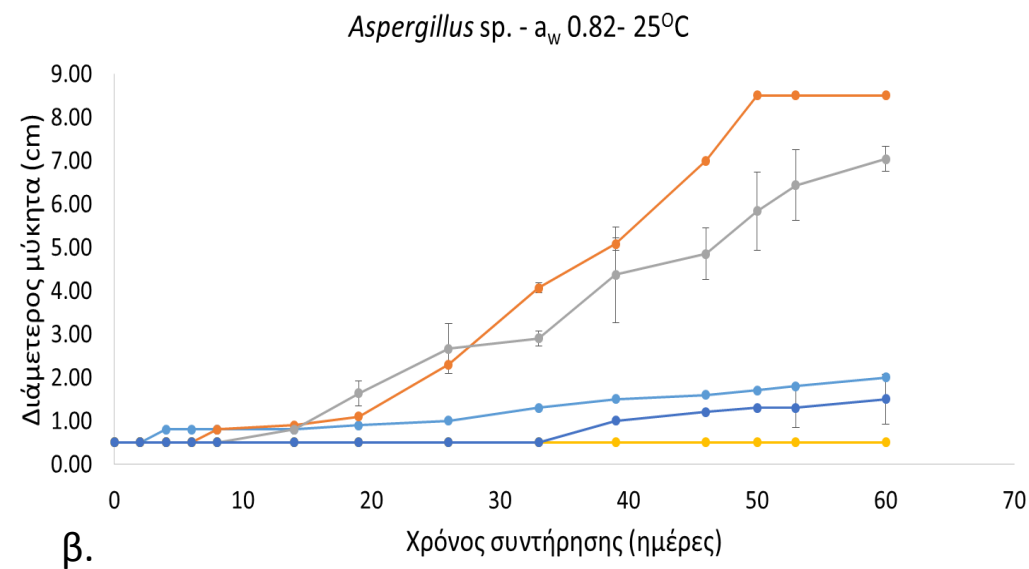
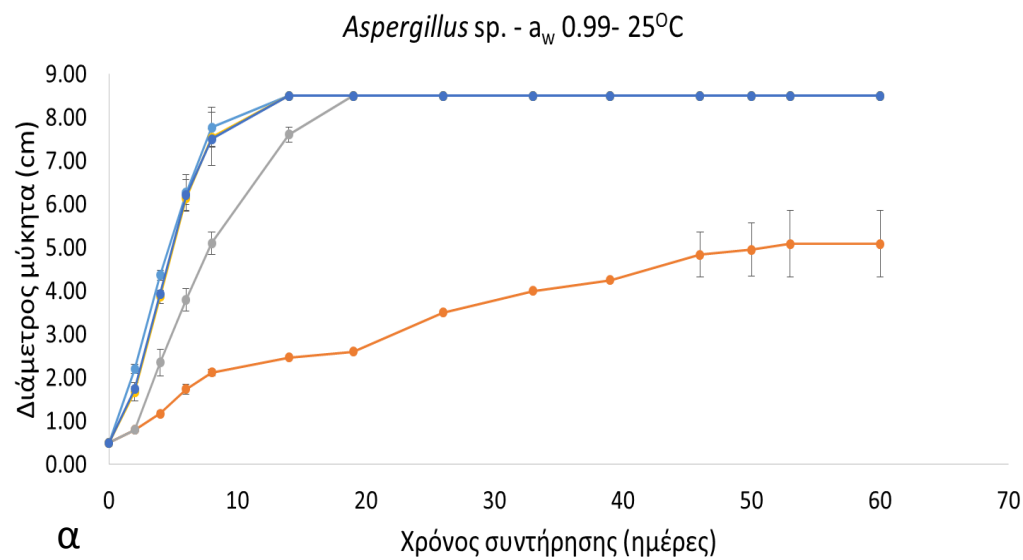


Cladosporium sp.- a_w 0.82- 37°C



Γράφημα 14: Καμπύλες ανάπτυξης στελεχών του γένους *Cladosporium* sp. στους 25°C σε a_w 0.99 (α), στους 25°C a_w σε 0.82 (β), στους 37°C σε a_w 0.99 (γ) και στους 37°C σε a_w 0.82 (δ). Κάθε σειρά δεδομένων αναφέρεται σε διαφορετικό κωδικό απομόνωσης (23, 45, 47, 62, 10, 24, 32, 68, 84)

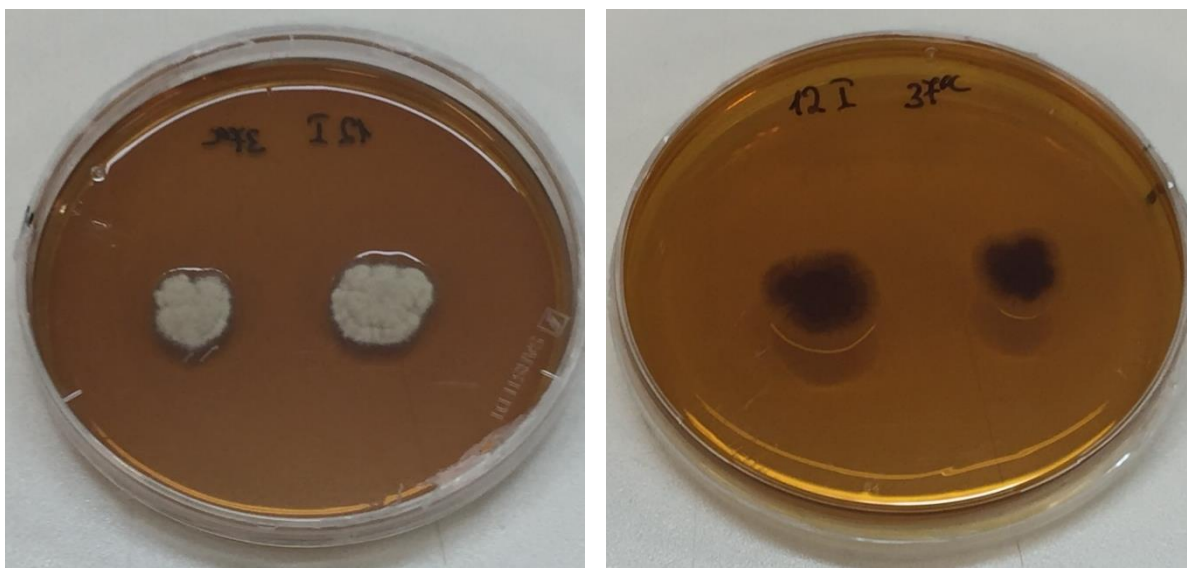
Όσον αφορά στο δυναμικό ανάπτυξης απομονώσεων του γένους *Cladosporium* sp. (Γράφημα 14α-δ), συντήρηση στους 25°C και a_w 0.99 είχε ως αποτέλεσμα την επίτευξη της μέγιστης διαμέτρου τους περίπου στις 30 ημέρες. Σε Brioché-τύπου εργαστηριακά υλικά (a_w 0.82) οι εν λόγω μύκητες παρουσίασαν δυναμικό ανάπτυξης, πλην όμως, χαμηλότερο από ότι στους 25°C σε a_w 0.99. Οι μύκητες του γένους *Cladosporium* αποτελούν γνωστούς επιμολυντές των αρτοποιημάτων με ελάχιστη για ανάπτυξη a_w 0.82-0.87 (Segers et al., 2015). Αντίθετα πιθανή θερμοκρασιακή καταπόνηση σε θερμοκρασία 37°C θα παρεμπόδιζε πλήρως την ανάπτυξη των συγκεκριμένων απομονώσεων του γένους *Cladosporium*, ανεξαρτήτως a_w (Γράφημα 14γ-δ), γεγονός που συμφωνεί και με πρόσφατες μελέτες (Razafinarivo et al., 2016). Από την προηγούμενη μελέτη παρατηρήθηκε ότι, η θερμοκρασιακή καταπόνηση που υπέστησαν είδη του γένους *Cladosporium* sp. σε θερμοκρασίες 30 και 37°C σε θρεπτικό υπόστρωμα ΜΕΑ, είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα, όπως συνέβη και στην παρούσα μελέτη.



Γράφημα 15: Καμπύλες ανάπτυξης απομονώσεων του γένους *Aspergillus* sp. στους 25°C σε a_w 0.99 (α), στους 25°C a_w σε 0.82 (β), στους 37°C σε a_w 0.99 (γ) και στους 37°C σε a_w 0.82(δ). Κάθε σειρά δεδομένων αναφέρεται σε διαφορετικό κωδικό απομόνωσης (12, 43, 98, 111, 134)

Στα Γράφηματα 15α-δ παρουσιάζεται η ικανότητα ανάπτυξης απομονώσεων του γένους *Aspergillus* sp. υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και a_w . Σε a_w 0.99, που είναι βέλτιστη για την ανάπτυξή τους (Huang, Chapman, Wilson, & Hocking, 2009) στην πλειοψηφία τους οι απομονώσεις έφτασαν τη μέγιστη διάμετρό τους σε 15-20 μέρες συντήρησης στους 25°C. Στο Brioché-τύπου εργαστηριακό υλικό (Γράφημα 15β) στους 25°C, μία απομόνωση έφτασε τη μέγιστη διάμετρο περίπου στις 45 μέρες και άλλο ένα αν συνεχιζόταν η συντήρηση σε > 60 ημέρες. Εν αντιθέσει με τις υπόλοιπες απομονώσεις, οι οποίες παρουσίασαν μηδενικό έως χαμηλό δυναμικό ανάπτυξης. Σε a_w 0.99 στους 37°C, οι 4 από τις 5 απομονώσεις παρουσίασαν τον υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και από τις 42 απομονώσεις που μελετήθηκαν *in vitro* και για τα τρία (3) γένη, ενώ στην ίδια θερμοκρασία σε a_w 0.82, μόνο ένας μύκητας κατάφερε να παρουσιάσει δυναμικό ανάπτυξης.

Ο *Aspergillus flavus* (#12) (Γράφημα 15) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους επιμολυντές στη βιομηχανία. Κατά τη συντήρηση στους 37°C παρουσίασε πολύ υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, γιατί σύμφωνα με τη μελέτη των (Kosegarten et al., 2016) η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 35°C. Σύμφωνα με το Γράφημα 15δ, όπου απεικονίζονται οι συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον του Brioché για τους 37°C, ο *Aspergillus flavus* ήταν η μοναδική απομόνωση που παρουσίασε δυναμικό αύξησης (Γράφημα 16). Ο *Aspergillus flavus* θεωρείται ιδιαίτερα εύκολα προσαρμοζόμενο ξηροφιλικό είδος και αυτό συμφωνεί και με τη μελέτη των (Abellana et al., 2001), οι οποίοι βρήκαν ότι για την ανάπτυξή του η ελάχιστη a_w είναι 0.82 στους 25°C και 0.80 στους 37°C.

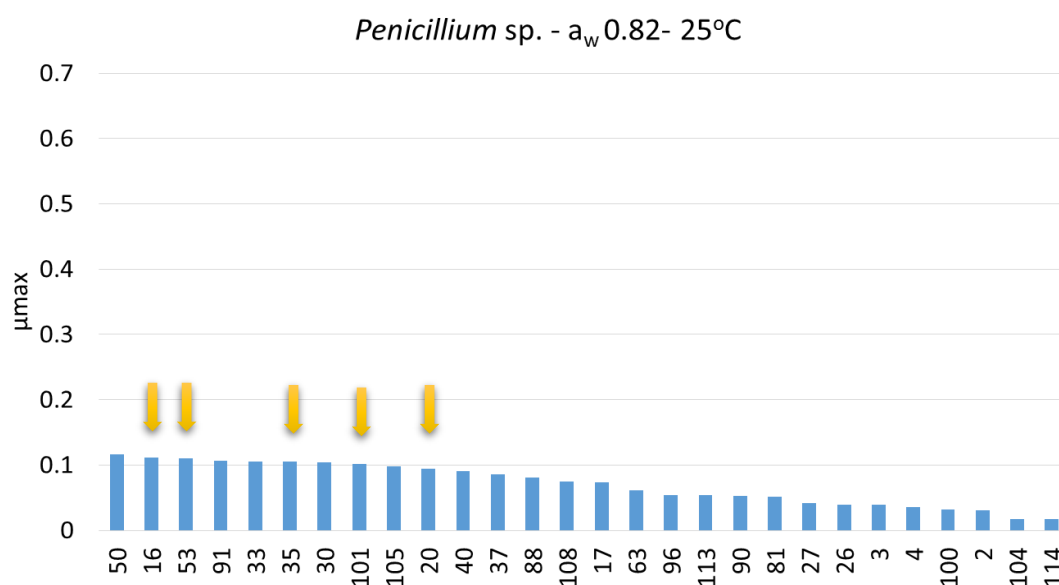


Γράφημα 16: Ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* (12) σε a_w 0.82 μετά από 60 ημέρες συντήρησης στους 37°C. Επάνω όψη (αριστερά), κάτω όψη (δεξιά).

Σε συνθήκες που προσομοιάζουν τα Brioche και θερμοκρασία συντήρησης 25°C, οι απομονώσεις 43 και 98 που αντιστοιχούν στους *Aspergillus pseudoglaucus* και *Aspergillus cretensis* παρουσίασαν το υψηλότερο δυναμικό αύξησης (Γράφημα 15β). Ο *Aspergillus pseudoglaucus* είναι η νεότερη ονομασία για τον *Eurotium repens*, ο οποίος απομονώνεται σε μεγάλη συχνότητα από τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας. Σύμφωνα με τον (Pitt & Hocking, 2009), θερμοκρασία 25-27°C, ελάχιστη a_w 0.72 και ουδέτερο pH, όπως άλλωστε έχει χρησιμοποιηθεί και στην παρούσα μελέτη (pH 6.15), αποτελούν τις ιδανικότερες συνθήκες ανάπτυξης για τον *Aspergillus pseudoglaucus*. Όσον αφορά στον *Aspergillus cretensis*, ανήκει στους κίτρινους ασπέργιλλους και είναι ένα είδος προερχόμενο από την Κρήτη και σχετικά πρόσφατα ταυτοποιημένο (1985). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες (Visagie, Varga, et al., 2014) υψηλότερη ανάπτυξη έχει σε χαμηλή a_w και θερμοκρασία 25-30°C. Τέλος, από την παραπάνω μελέτη επιβεβαιώνεται και η μη ανάπτυξή του στους 37°C στα Γραφήματα 15γ-δ, όπου η θερμοκρασία έδρασε ανασταλτικά.

3.4. *In situ* μελέτη δυναμικού αλλοίωσης των BRIOCHE

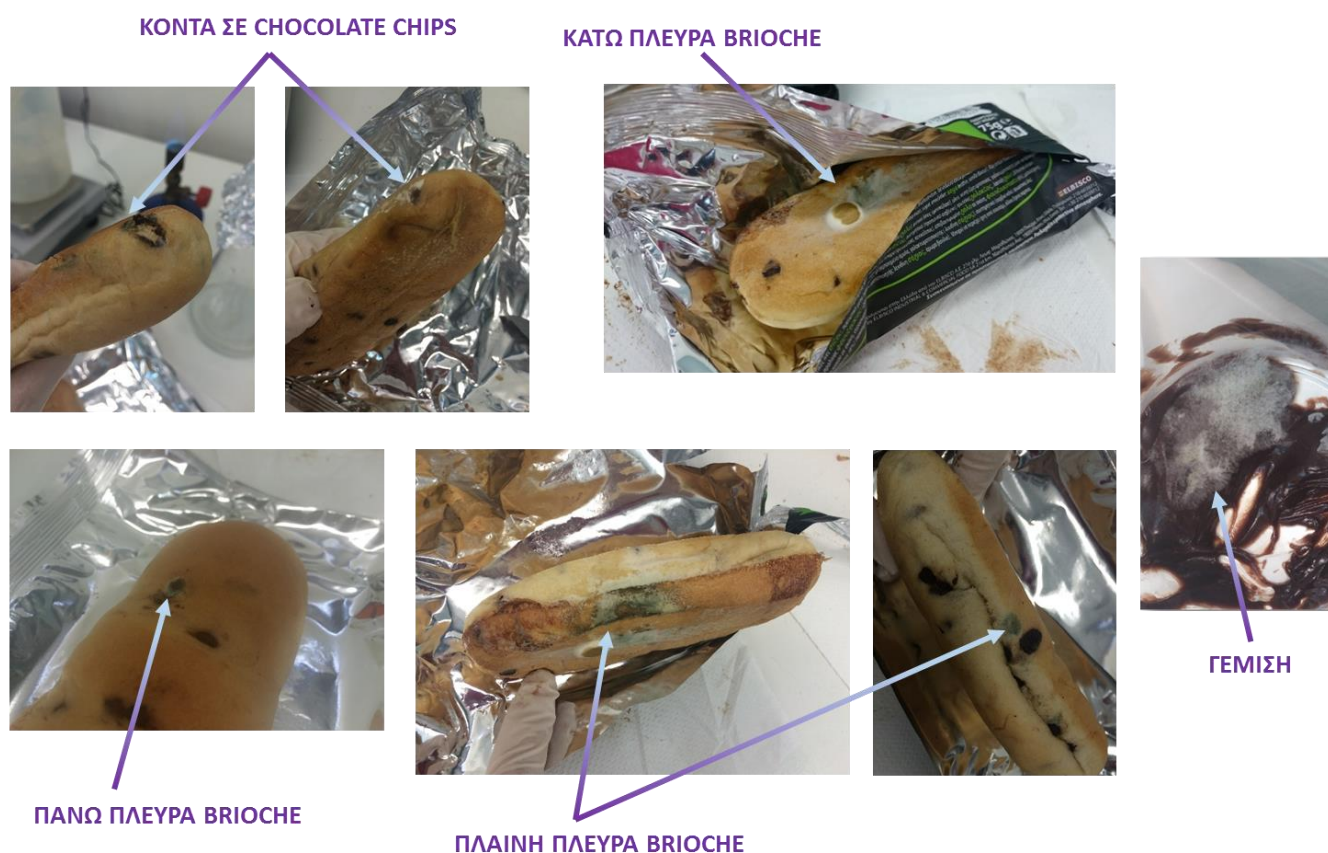
Η ταυτοποίηση των μυκήτων που έγινε στην αρχή της μελέτης, έδειξε ότι τα προϊόντα τύπου Brioché και οι πρώτες ύλες παρουσίασαν αλλοίωση ή «εν δυνάμει» αλλοίωση, κυρίως από είδη του γένους *Penicillium* sp.. Από την *in vitro* μελέτη του πειράματος, παρατηρήθηκε ότι όλες οι απομονώσεις του *Penicillium* sp., παρουσίασαν δυναμικό αλλοίωσης στο θρεπτικό υπόστρωμα που προσομοίαζε τα προϊόντα τύπου Brioché.



Γράφημα 17: Ρυθμός ανάπτυξης μυκήτων του γένους *Penicillium* sp. σε a_w 0.82 και στους 25 °C.

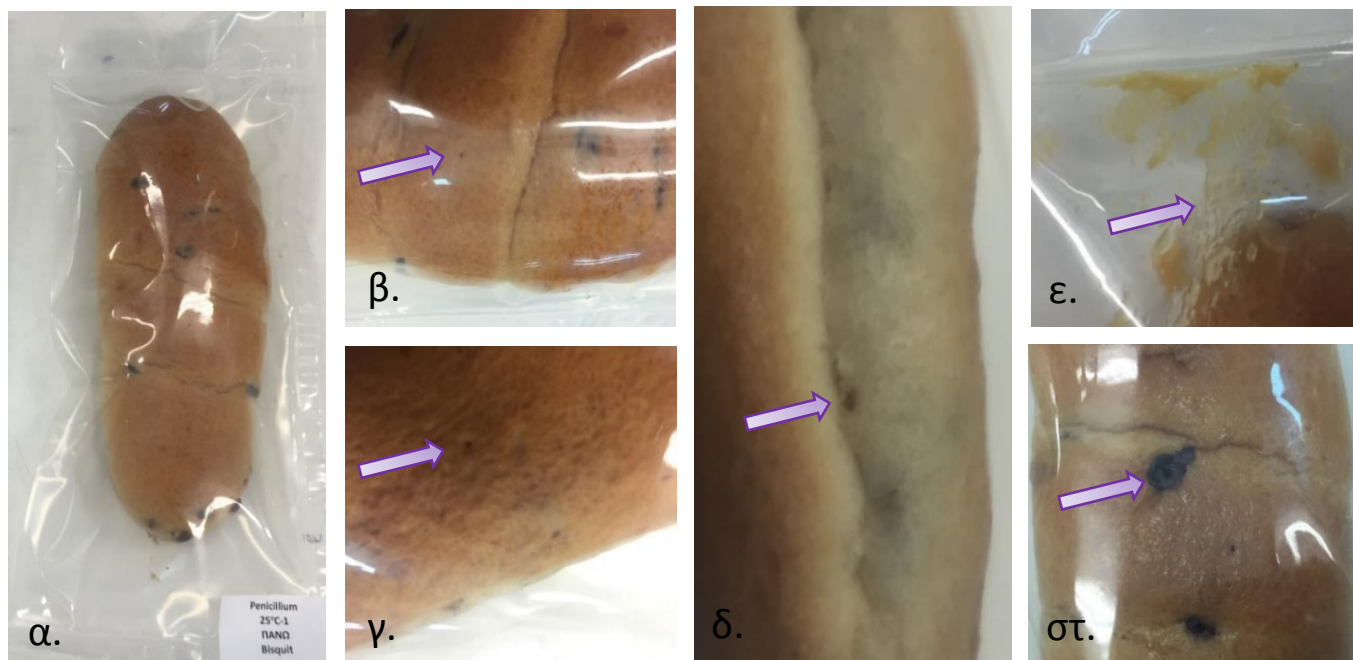
Ο ρυθμός ανάπτυξης που παρουσίασε η κάθε απομόνωση αποτυπώνεται από το Γράφημα 17 και για τη συνέχεια του πειράματος με βάση το παραπάνω γράφημα επιλέχθηκαν πέντε (5) (16, 20, 35, 53, 101) απομονώσεις του είχαν υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και η απομόνωσή τους προέρχονταν από διαφορετικό προϊόν (Brioché, πρώτες ύλες). Για την *in situ* μελέτη του δυναμικού αλλοίωσης των Brioché, χρησιμοποιήθηκαν φρέσκιας παραγωγής προϊόντα brioché με γέμιση μπισκότο ή χωρίς γέμιση. Στα Brioché εμβολιάστηκε εναιώρημα σπορίων πέντε (5) διαφορετικών στελεχών του γένους *Penicillium* sp., στα σημεία από όπου έγινε η

αρχική απομόνωση των μυκήτων (πάνω, κάτω, πλάι, choco chips και γέμιση) από προηγούμενη μελέτη (Dremetsika et al, unpublished data) (Γράφημα 18).



Γράφημα 18: Σημεία αρχικών απομονώσεων μυκήτων από προϊόντα τύπου Brioche και πρώτες ύλες

Η συσκευασία πραγματοποιήθηκε α) υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες 80% N_2 : 20% CO_2 , η οποία αποτελεί την σύσταση αερίων – στόχο στη βιομηχανία, β) υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες 80% N_2 : 10% CO_2 : 10% O_2 , αναλογία αερίων που επιτυγχάνει η βιομηχανία κατά τη συσκευασία των προϊόντων και γ) στον αέρα, με σκοπό να μελετηθεί αν η σύσταση του προϊόντος (σορβικό κάλιο ως συντηρητικό) δύναται να παρεμποδίσει την ανάπτυξη των μυκήτων του γένους *Penicillium* sp. και συνεπώς την αλλοίωση του τελικού προϊόντος. Τέλος, τα δείγματα για συντηρήθηκαν στους 15, 25 και 37°C μέχρι τη λήξη του προϊόντος 50-60 ημέρες και παρακολουθούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για εμφάνιση αλλοίωσης (ορατή ανάπτυξη μυκήτων).



Γράφημα 19: α. Συσκευασμένο Brioche σε MAP, β-στ. Εμβολιασμένα σε διαφορετικά σημεία Brioche, πάνω μέρος (β), κάτω μέρος (γ), πλαϊνή επιφάνεια (δ), γέμιση (ε) και choco chips (στ)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Γράφημα 19α-στ) ακόμη και μετά από 60 ημέρες συντήρησης ανεξαρτήτως θερμοκρασίας δεν παρατηρήθηκε ορατή ανάπτυξη των μυκήτων στο τελικό προϊόν Brioche. Η συνδυαστική χρήση εμποδίων όπως συσκευασία σε MAP, καθώς και τα συντηρητικά (σορβικό κάλιο) που υπάρχουν στη ζύμη του προϊόντος, αλλά και στη γέμιση, συνέβαλλαν στη διατήρηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με τη μελέτη των (Abellana et al., 2000) σε τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας τα υψηλά ποσοστά CO₂, κατά τη συσκευασία του προϊόντος δύνανται να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα αυξανόμενη της συγκέντρωσης του CO₂, αυξανόταν και η φάση προσαρμογής του μύκητα με αποτέλεσμα να καθυστερεί η ανάπτυξή του μύκητα. Λόγω του ότι οι μύκητες των γενών *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. και *Aspergillus* sp. είναι αερόβιοι (Milanesi et al., 2015), το υψηλό ποσοστό του CO₂ σε συσκευασία τροφίμου, αποτελεί

παρεμποδιστικό παράγοντα για την ανάπτυξή τους. Σε συνθήκες συσκευασίας 80% N₂ : 10% CO₂ : 10% O₂, καθώς και με αέρα οι μύκητες δεν παρουσίασαν αλλοίωση του προϊόντος. Αυτό δύναται να οφείλεται στην παρουσία συντηρητικού σε συνδυασμό με τις τροποποιημένες ατμόσφαιρες, την *a_w* και την καλή υγειονομική κατάσταση του προϊόντος στην πρώτη περίπτωση, ενώ στη δεύτερη η *a_w* και η παρουσία συντηρητικού σε συνδυασμό με την εφαρμογή σωστών υγειονομικών πρακτικών κατά τη μεταχείριση του προϊόντος, έδρασαν ανασταλτικά στην εμφάνιση αλλοίωσης.

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, ορισμένα στελέχη του γένους *Aspergillus* sp. παράγουν τοξίνες και εκτός από την ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος, προκαλούν και σοβαρά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων. Σύμφωνα με τους (Pitt & Hocking, 2009), στην περίπτωση των φιστικιών, τα οποία ανήκουν στα τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας, δεν παράχθηκαν αφλατοξίνες στους 30°C με την παρουσία στη συσκευασία του προϊόντος, 20% O₂ και τουλάχιστον 60% CO₂. Τα αποτελέσματα αυτά καθίστανται χρήσιμα για τη βιομηχανία και για την ασφάλεια των καταναλωτών, διότι πετυχαίνοντας στη βιομηχανική συσκευασία ποσοστό CO₂ από 60% και πάνω, διασφαλίζεται η υγεία των ανθρώπων, καθώς και η παρεμπόδιση αλλοίωσης του τροφίμου.

Στο συγκεκριμένο προϊόν τύπου Brioche περιέχεται ως συντηρητικό σορβικό κάλιο, το οποίο είναι ασθενές οξύ και σε συνδυασμό με το pH 6 (όσο περίπου αυτό του τελικού προϊόντος), και τη χρήση συσκευασίας σε MAP, έχει την ικανότητα να παρεμποδίσει την αλλοίωση του τροφίμου από μύκητες. (Guynot et al., 2002). Συμπερασματικά, ο συνδυασμός πολλαπλών εμποδίων που τίθενται από τη βιομηχανία επαρκεί για την αναστολή της ανάπτυξης ορατών μυκήτων και συνεπώς τη διατήρηση της ποιότητας του προϊόντος κατά τη διάρκεια του εμπορικού χρόνου ζωής του. Επομένως θα πρέπει να γίνουν αλυσιδωτές αστοχίες για την ορατή ανάπτυξη μυκήτων στο τελικό προϊόν και συνεπώς την πρόωρη υποβάθμισή του. Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι πιθανές αυτές αστοχίες που δύναται να οδηγήσουν στην υποβάθμισή του Brioche. Λόγω του συνδυαστικού ελέγχου των αστοχιών αυτών, την περίοδο της *in situ* μελέτης είχε ως αποτέλεσμα στην παρεμπόδιση αλλοίωσης των προϊόντων από τον ηθελημένο εμβολιασμό με μύκητες.

Πίνακας 10: Παράγοντες ή αστοχίες που δύναται να επηρέασαν το δυναμικό αλλοίωσης των προϊόντων Brioche κατά την περίοδο των εμπορικών προβλημάτων.

Παράγοντες που δύναται να επηρεάσουν το δυναμικό αλλοίωσης των μυκήτων σε προϊόντα Brioche	Περίοδος εμπορικών προβλημάτων	<i>In situ</i> μελέτη δυναμικού αλλοίωσης των Brioche
Συσκευασία	Απρ 2015 – Φεβ 2016	✓
Υγειονομικές Πρακτικές	Απρ 2015 – Σεπ 2015	✓
Ψεκασμός με αιθανόλη (100% v/v)	✓	✓
pH	✓	✓
Συντηρητικό	✓	✓

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρότι σύμφωνα με την *in vitro* μελέτη, οι μύκητες έχουν δυναμικό ανάπτυξης σε υποστρώματα που προσομοιάζουν το προϊόν Brioche (pH, aw), το δυναμικό αλλοίωσης αυτών σε πραγματικά προϊόντα (*in situ* μελέτη) μπορεί να είναι μικρότερο, γεγονός που οφείλεται στο συνδυασμό πολλαπλών εμποδίων που εφαρμόζεται στο τελικό προϊόν από τη βιομηχανία (π.χ. συντηρητικά, ψεκασμός με αιθανόλη, συσκευασία σε MAP).

Συνεπώς, θα πρέπει να υπάρξει συνδυασμός πολλαπλών αστοχιών που αφορούν τόσο την υγειονομική κατάσταση όσο και την παραγωγική διαδικασία στη βιομηχανία, ώστε να παρατηρηθεί ποιοτική υποβάθμισή του τελικού προϊόντος Brioche από μύκητες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abellana, M., Bened??, J., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (1999). Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 87(3), 371–380. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00828.x>
- Abellana, M., Magrí, X., Sanchis, V., & Ramos, A. . (1999). Water activity and temperature effects on growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1), 97–103. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00131-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00131-2)
- Abellana, M., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Nielsen, P. V. (2000). Effect of modified atmosphere packaging and water activity on growth of *Eurotium amstelodami* , *E. chevalieri* and *E. herbariorum* on a sponge cake analogue.
- Abellana, M., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2001). Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3), 151–157. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00596-7](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00596-7)
- Amend, A. S., Seifert, K. A., & Bruns, T. D. (2010). Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology*, 19(24), 5555–65. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x>
- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: Increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6(8), 769–779. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x>
- Anderson, I. C., & Parkin, P. I. (2007). Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 248–253. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.08.005>
- Begerow, D., Bauer, R., & Oberwinkler, F. (1997). Phylogenetic studies on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences of smut fungi and related taxa. *Canadian Journal of Botany*, 75(12), 2045–2056. <http://doi.org/10.1139/b97-916>
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., & Maier, W. (2010). Current state and

- perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 99–108. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2585-4>
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516. <http://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497>
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., de Jesus Yez-Morales, M., & Crous, P. W. (2015). Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 82, 23–74. <http://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.001>
- Blocher, J. C., & Busta, F. F. (1985). Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. *Journal of Applied Bacteriology*, 59(5), 469–478. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb03347.x>
- Botić, T., Kunčič, M. K., Sepčić, K., Knez, Ž., & Gunde-Cimerman, N. (2012). Salt induces biosynthesis of hemolytically active compounds in the xerotolerant food-borne fungus *Wallemia sebi*. *FEMS Microbiology Letters*, 326(1), 40–46. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02428.x>
- Bozkurt, M. K., Özçelik, T., Saydam, L., & Kutluay, L. (2008). [A case of isolated aspergillosis of the maxillary sinus]. *Kulak Burun Bogaz Ihtisas Dergisi : KBB = Journal of Ear, Nose, and Throat*, 18(1), 53–55. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/18443405>
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 1–17. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)
- Buchanan, R. L. (1993). Predictive food microbiology. *Trends in Food Science & Technology*, 4(1), 6–11. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(05\)80004-4](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(05)80004-4)
- Buchanan, R. L., & Ayres, J. C. (1976). EFFECT OF SODIUM ACETATE ON GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION BY *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 at pH Initial pH, 41(August 2006). <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb01117.x>
- Buée, A. M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., ... Mur, C. (2014). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an high fungal diversity unexpectedly. *New Phytologist*, 184(2), 449–456.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A Method for Designing Primer Sets for Speciation

- Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556.
<http://doi.org/10.2307/3761358>
- Cardoso, P. G., De Queiroz, M. V., Pereira, O. L., & De Araújo, E. F. (2007). Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 71–77. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100015>
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., & Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1889–1895. Retrieved from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/360/1462/1889.abstract>
- Chirife, J., & Favetto, G. J. (1992). Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25(5), 389–396. [http://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90114-K](http://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90114-K)
- Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., ... Roussos, S. (2006). Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 286–291. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.005>
- Dantigny, P., GUILMART, A., & BENSOUSSAN, M. (n.d.). Predictive mycology: some definitions. *Cryptogamie. Mycologie*, 24(4), 377–383. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15410321>
- Davidson, P. M., & Taylor, T. M. (2007). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition*. (L. R. Beuchat & M. P. Doyle, Eds.). American Society of Microbiology. <http://doi.org/10.1128/9781555815912>
- De Clercq, N., Van Coillie, E., Van Pamel, E., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., & Vlaemynck, G. (2014). Detection and identification of xerophilic fungi in Belgian chocolate confectionery factories. *Food Microbiology*, 46, 322–328. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.012>
- Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K. C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *The ISME Journal*, 4(5), 642–647. <http://doi.org/10.1038/ismej.2009.153>

- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). *Penicillium* subgenus *Penicillium* - A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*.
- Fustier, P., Lafond, A., Champagne, C. P., & Lamarche, F. (1998). Effect of inoculation techniques and relative humidity on the growth of molds on the surfaces of yellow layer cakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 192–196.
- GARDES, M., & BRUNS, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59, 1–10. <http://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathogens*, 6(1). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- Glass, L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes, 61(4), 1323–1330.
- Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Poulos, P. G. (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 11–19. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00166-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00166-6)
- Gougouli, M., & Koutsoumanis, K. P. (2012). Modeling germination of fungal spores at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 153–161. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.030>
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sala, D., Sanchis, V., & Marín, S. (2002). Combined effects of weak acid preservatives, pH and water activity on growth of *Eurotium* species on a sponge cake. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 39–46. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00751-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00751-6)

- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2005). Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5). *International Journal of Food Microbiology*, 101(1-2), 161–168.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.003>
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., ... Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21(3), 494–504. <http://doi.org/10.1101/gr.112730.110>
- Halouat, A. E., & Debevere, J. M. (1997). Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. *International Journal of Food Microbiology*, 35(1), 41–48.
[http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01219-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01219-6)
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547.
<http://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hocking, A. D. (1988). Moulds and yeasts associated with foods of reduced water activity: ecological interactions. Elsevier Applied Science Publishers.
- Hocking, A. D., & Faedo, M. (1992). Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged Cheddar cheese during maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 16(2), 123–130. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90005-N](http://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90005-N)
- Hocking, A. D., Miscamble, B. F., & Pitt, J. I. (1994). Water relations of *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Curvularia lunata* and *Curvularia pallescens*. *Mycological Research*, 98(1), 91–94.
[http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80344-4](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80344-4)
- Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (1979). Water relations of some *Penicillium* species at 25 °C. *Transactions of the British Mycological Society*, 73(1), 141–145.
[http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(79\)80084-4](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(79)80084-4)
- Holmquist, G. U., Walker, H. W., & Stahr, H. M. (1983). Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48(3), 778–782.

- <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14897.x>
- Horn, B. W., Moore, G. G., & Carbone, I. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101(3), 423–429. <http://doi.org/10.3852/09-011>
- Hozova, B., Kukurova, I., Turicova, R., & Dodok, L. (2000). Sensory Quality of Stored Croissant-Type Bakery Products, 20(3), 105–112.
- Huang, Y., Chapman, B., Wilson, M., & Hocking, A. D. (2009). Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 179–185. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.024>
- Jagielski, T., Sandoval-denis, M., Yu, J., Yao, L., Baku, Z., Kalita, J., ... Stadler, M. (2016). Molecular taxonomy of scopulariopsis-like fungi with description of new clinical and environmental species, *O*. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.014>
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., ... Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), 818–822. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature05110>
- Jimenez, L., Bosko, Y., Smalls, S., Ignar, R., & English, D. (1999). Molecular detection and identification of *Aspergillus niger* contamination in cosmetic/ pharmaceutical raw materials and finished materials. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 7(1), 39–46. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4581.1999.tb00370.x>
- Jumpponen, A. (2007). Soil Fungal Communities Underneath Willow Canopies on a Primary Successional Glacier Forefront: rDNA Sequence Results Can Be Affected by Primer Selection and Chimeric Data. *Microbial Ecology*, 53(2), 233–246. <http://doi.org/10.1007/s00248-004-0006-x>
- Jumpponen, A., & Jones, K. L. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, 184(2), 438–448. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02990.x>
- Jumpponen, A., Jones, K. L., Mattox, J. D., & Yaege, C. (2010). Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular Ecology*, 19(SUPPL. 1), 41–

53. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04483.x>
- Kõljalg, U., Larsson, K. H., Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., ... Ursing, B. M. (2005). UNITE: A database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 166(3), 1063–1068. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01376.x>
- Kosch, T. A., & Summers, K. (2013). Techniques for minimizing the effects of PCR inhibitors in the chytridiomycosis assay. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 230–236. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12041>
- Kosegarten, C. E., Ramírez-Corona, N., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2016). Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detectio. *International Journal of Food Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>
- L. HAWKSWORTH, D. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1·5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432. <http://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Larena, I., Salazar, O., González, V., Julián, M. C., & Rubio, V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75(2), 187–194. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00154-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00154-6)
- Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G., & Coton, E. (2016). In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control*, 60, 247–255. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>
- Legan, J. D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32(1-3), 33–53. [http://doi.org/10.1016/0964-8305\(93\)90038-4](http://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90038-4)
- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25(2), 151–158. [http://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90158-2](http://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90158-2)
- Leitao, A. L. (2009). Potential of penicillium species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(4), 1393–

1417. <http://doi.org/10.3390/ijerph6041393>
- Lumbsch, H. T., & Huhndorf, S. M. (2007). Whatever happened to the pyrenomycetes and loculoascomycetes? *Mycological Research*, 111(9), 1064–1074. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.04.004>
- Magan, N., & Lacey, J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1), 83–93. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4)
- Magnani, M., Fernandes, T., Prete, C. E. C., Homechim, M., Ono, E. Y. S., Vilas-Boas, L. A., ... Fungaro, M. H. P. (2005). Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agricola*, 62(1), 45–49. <http://doi.org/10.1590/S0103-90162005000100009>
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 234–242. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.014>
- Milanesi, C., Cresti, M., Costantini, L., Gallo, M., Gallo, G., Crognale, S., ... Franco, B. (2015). Spoilage of oat bran by sporogenic microorganisms revived from soil buried 4000 years ago in Iranian archaeological site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104(0), 83–91. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.016>
- Milhome, M. A. L., Lima, C. G., Lima, L. K. De, Lima, F. A. F., & Sousa, D. O. B. (2014). Occurrence of aflatoxins in cashew nuts produced in northeastern Brazil. *Food Control*, 42, 34–37. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.033>
- Mirhosseini, S. Z., Seidavi, A., Shivazad, M., Chamani, M., Sadeghi, A. A., & Pourseify, R. (2010). Detection of *Clostridium* sp. and its Relation to different ages and gastrointestinal segments as Measured by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1), 69–76. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100009>
- Nielsen, P. V., & de Boer, E. (2000). Food preservatives against fungi. In *Introduction to food- and airborne fungi* (Eds.: R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad and O.

- Filtenborg*) (pp. 357–363). Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., & Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters*, 296(1), 97–101. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01618.x>
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103–116. <http://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Sarver, B. A. J., Balajee, S. A., Schroers, H. J., ... Geiser, D. M. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3708–3718. <http://doi.org/10.1128/JCM.00989-10>
- O'Gorman, C., Fuller, H., & Dyer, P. (2008). F1000Prime recommendations of: Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. Retrieved from <http://f1000.com/1131923>
- Olutiola, P. O. (1976). Some environmental and nutritional factors affecting growth and sporulation of *Aspergillus flavus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 131–136. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80102-7](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80102-7)
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS ONE*, 9(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>
- Optimum, T. (2009). Pertumbuhan *Optimum Penicillium* spp . dan *Cunninghamella* spp . yang Diisolasi dari Pakan dan Efek Toksiknya pada Mencit (*Mus musculus*), 32(1).
- Padamsee, M., Kumar, T. K. A., Riley, R., Binder, M., Boyd, A., Calvo, A. M., ... Aime, M. C. (2012). The genome of the xerotolerant mold *Wallemia sebi* reveals adaptations to osmotic stress and suggests cryptic sexual reproduction. *Fungal Genetics and Biology*, 49(3), 217–226. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.01.007>
- Pinto, J., Cristina, F., Lima, D. B. De, Agustini, B. C., Dallagassa, B., Shimabukuro, M. F., ... Bonfim, B. (2012). Morphological and Molecular Identification of Filamentous

- Fungi Isolated from Cosmetic Powders. *Brazilian Archives of Biology and Technology, An International Journal*, 55(December), 897–901.
- Pitt, J. I., Basilico, J. C., Abarca, M. L., & Lopez, C. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi, 41–46.
- Pitt, J. I., & Christian, J. H. B. (1968). Water Relations of Xerophilic Fungi Isolated from Prunes. *Applied Microbiology*, 16(12), 1853–1858.
- Pitt, J. I., & Hocking, a D. (1977). Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology*, 101(1), 35–40. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science+Business Media, LLC 2009 (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10), 3724–3730.
- Porter, T. M., & Brian Golding, G. (2011). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? *New Phytologist*, 192(3), 775–782. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03838.x>
- Razafinarivo, J., Jany, J.-L., Crous, P. W., Looten, R., Gaydou, V., Barbier, G., ... Vasseur, V. (2016). Cladosporium lebrasiae, a new fungal species isolated from milk bread rolls in France. *Fungal Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.04.006>
- Rossi, F., Gaio, E., & Torriani, S. (2010). Staphylococcus aureus and Zygosaccharomyces bailii as primary microbial contaminants of a spoiled herbal food supplement and evaluation of their survival during shelf life. *Food Microbiology*, 27(3), 356–362. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.011>
- Sartori, D., Taniwaki, M. H., Iamanaka, B., & Fungaro, M. H. P. (2010). Molecular Diagnosis of Ochratoxigenic Fungi. In Y. Gherbawy & K. Voigt (Eds.), *Molecular Identification of Fungi* (pp. 195–212). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8_10
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., & Bensoussan, M. (2001). A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2), 63–69. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00471-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00471-8)

- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1-3), 70–78. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>
- Schoch, C. L., Seifert, K. a., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. a., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 1–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoch, C. L., Sung, G. H., Lopez-Girard, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., ... Spatafora, J. W. (2009). The ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224–239. <http://doi.org/10.1093/sysbio/syp020>
- Schol-Schwarz, M. B. (1959). The genus *Epicoccum* Link. *Transactions of the British Mycological Society*, 42(2), 149–IN3. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(59\)80024-3](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(59)80024-3)
- Schubert, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C. F., ... Crous, P. W. (2007). Biodiversity in the *Cladosporium* herbarum complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*, 58(1998), 105–156. <http://doi.org/10.3114/sim.2007.58.05>
- Segers, F. J. J., Meijer, M., Houbraken, J., Samson, R. A., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2015). Xerotolerant *Cladosporium sphaerospermum* Are Predominant on Indoor Surfaces Compared to Other *Cladosporium* Species. *PLoS ONE*, 10(12), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0145415>
- Seiler, H. G., Sigel, H., & Sigel, A. (1988). Handbook on toxicity of inorganic compounds. Retrieved from http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:20015779
- Simon, U. K., & Weiß, M. (2008). Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Molecular Biology and Evolution*, 25(11), 2251–2254. <http://doi.org/10.1093/molbev/msn188>
- SKOUBOE, P., FRISVAD, J. C., TAYLOR, J. W., LAURITSEN, D., BOYSEN, M., & ROSSEN, L. (1999). Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of

- terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research*, 103(07), 873–881.
<http://doi.org/null>
- Smith, M. E., Douhan, G. W., & Rizzo, D. M. (2007). Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland. *Mycorrhiza*, 18(1), 15–22. <http://doi.org/10.1007/s00572-007-0148-z>
- Stajich, J., Berbee, M. L., Blackwell, M., Hibbett, D. S., James, T. Y., Spatafora, J. W., & Taylor, J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology*, 19(18), R840–R845.
<http://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.004>
- Stratford, M., & Anslow, P. A. (1998). Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic “weak acid preservative.” *Letters in Applied Microbiology*, 27(4), 203–206. <http://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00424.x>
- Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., ... Kõljalg, U. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist*, 188(1), 291–301. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03373.x>
- Utharalakshmi, N., & Ganesh Kumar, A. (2014). Production of cellulase by *Aspergillus* Sp. Under solid state fermentation. *International Journal of ChemTech Research*, 6(12), 5142–5145. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84909971920&partnerID=tZOtx3y1>
- Vermeulen, A., Daelman, J., Van Steenkiste, J., & Devlieghere, F. (2012). Screening of different stress factors and development of growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF). *Food Microbiology*, 32(2), 389–396.
<http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.019>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343–371.
<http://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Visagie, C. M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsub??, S., Yilmaz, N., ... Samson, R. A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli

- (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, 78(1), 1–61.
<http://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.001>
- Vytršová, J., Přibánová, P., & Marvanová, L. (2002). Occurrence of xerophilic fungi in bakery gingerbread production. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 91–96. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00626-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00626-2)
- Wheeler, K. A., Hurdman, B. F., & Pitt, J. I. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 12(2-3), 141–149. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90063-U](http://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90063-U)
- Wheeler, M. H., & Bell, A. A. (1988). Melanins and Their Importance in Pathogenic Fungi. In M. R. McGinnis (Ed.), *Current Topics in Medical Mycology* (pp. 338–387). New York, NY: Springer New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4612-3730-3_10
- White, T. J., Bruns, S., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. <http://doi.org/citeulike-article-id:671166>
- Αναστασία, Κ. (2012). Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών των *Aspergillus* και *Penicillium* sp. και παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα Αναστασία Ε. Καπετανάκου. *Διδακτορική Διατριβή*.
- ΕΦΕΤ, 2013-2015. Δελτία Τύπου, Ανακλήσεις.
http://www.efet.gr/portal/page/portal/efetnew/news/news_per_category?par_newCatId=24
- Τζάμος Ελευθέριος, 2007. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Σταμούλη
<https://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po?event=fungi&type=secondary&species=68&name=Eurotium>

