



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ
ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

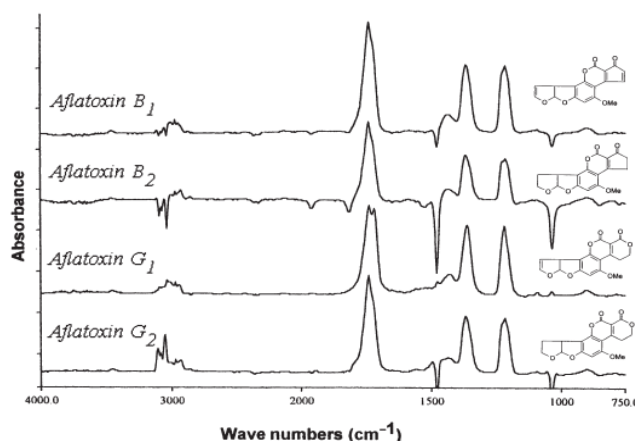
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΙΙΙ: ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΣΕ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΚΑΙ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟ
ΑΙΓΙΝΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ FTIR ΚΑΙ
RAMAN»



ΛΥΔΙΑ Χ. ΒΑΛΑΣΗ

ΑΘΗΝΑ 2016

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων

και

Διατροφής του Ανθρώπου

**Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών
Προϊόντων**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:

«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση III: ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

**«ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΣΕ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΚΑΙ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟ
ΑΙΓΙΝΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ FTIR ΚΑΙ
RAMAN»**

Λυδία Χ. Βαλάση

Επιβλέπων: Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής Γ.Π.Α

Αθήνα 2016

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων

και

Διατροφής του Ανθρώπου

**Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών
Προϊόντων**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:

«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση III: ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

**«ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΣΕ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΚΑΙ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟ
ΑΙΓΙΝΗΣ ΜΕ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ FTIR ΚΑΙ
RAMAN»**

Λυδία Χ. Βαλάση

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Στοφόρος Ν., Καθηγητής Γ.Π.Α

Ταραντίλης Α. Π., Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Πανάγου Ε., Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Αθήνα 2016

στους δικούς μου ανθρώπους

*«...όπου κι αν πας,
πήγαινε με όλη σου την καρδιά...»*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων και στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας Τροφίμων και σηματοδοτεί την ολοκλήρωση του κύκλου μεταπτυχιακών σπουδών μου στο τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Οφείλω ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη στον Καθηγητή κ. Γιαννιώτη Σταύρο, εισηγητή του θέματος της εργασίας μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών μου. Κατά τη διάρκεια δε εκπόνησης της εργασίας μου υπήρξε εμψυχωτής και ενθαρρυντής μου.

Νιώθω βαθιά ευγνωμοσύνη για τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παππά Χρήστο, που με το άρτιο επιστημονικό υπόβαθρό του, την ακρίβεια και σαφήνεια του λόγου του, με οδήγησε με υπομονή στα μαγευτικά μονοπάτια της έρευνας. Ήταν διαρκώς συνοδοιπόρος μου και διεύρυνε τη σκέψη μου.

Επίσης, νιώθω βαθιά υποχρέωση στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Πανάγου Ευστάθιο, του οποίου η παρέμβαση έπαιξε καταλυτικό ρόλο στην έναρξη υλοποίησης της διπλωματικής μου. Η συνεργασία μας ήταν άψογη και εποικοδομητική και μού έδωσε την ευκαιρία να μάθω την τεχνική FTIR – ATR.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Στοφόρο Νικόλαο για τις πολύτιμες και πολύπλευρες επιστημονικές γνώσεις και συμβουλές που μου έδωσε κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου και συγγραφής της εργασίας.

Σ' αυτό το πόνημα είχα τη δυνατότητα να βασιστώ στην υπευθυνότητα, την ορθή κρίση, τη γρήγορη και εύστοχη σκέψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ταραντίλη Πέτρου. Οι γόνιμες υποδείξεις του με βοήθησαν να υπερνικήσω τις δυσκολίες που αντιμετώπισα, γι' αυτό θέλω να εκφράσω τον απεριόριστο σεβασμό μου και την εκτίμησή μου.

Ευχαριστίες θέλω να δώσω στη Διδάκτορα κ. Γεωργιάδου Μαρία για τις χρήσιμες και πλήρεις οδηγίες που μου έδωσε κατά την πειραματική διαδικασία. Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω την κ. Καπάνταη Μαρία, την κ. Καλαντζή Ουρανία και την κ. Προξενιά Νίκη για την παραχώρηση του απαραίτητου εργαστηριακού εξοπλισμού για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Και την ομάδα του εργαστηρίου θέλω να ευχαριστήσω για τη συμπαράσταση και την αρμονική συνύπαρξη στον εργαστηριακό χώρο.

Τέλος, νιώθω χρέος μου να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος της Κατεύθυνσης ΙΙ, τόσο για τις γνώσεις που απλόχερα μού πρόσφεραν και συνέβαλαν στην επιστημονική μου κατάρτιση, όσο και για το ήθος τους που συνέβαλε στην πνευματική μου εξέλιξη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λυδία Βαλάση

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΣΕ ΚΕΛΥΦΩΤΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ ΑΙΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟ ΜΕ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ FTIR ΚΑΙ RAMAN

Οκτώβριος 2016

Τα κελυφωτά φιστίκια θεωρούνται ένας από τους πιο νόστιμους και διατροφικά άριστους ξηρούς καρπούς λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε ακόρεστα λιπαρά, μέταλλα, φυτικές πρωτεΐνες και αντιοξειδωτικές πολυφαινόλες. Ωστόσο, οι καρποί είναι πιθανό να μολυνθούν από τοξικογόνα στελέχη του μύκητα *Aspergillus sc Flavi* τα οποία παράγουν αφλατοξίνη, την πιο σημαντική ομάδα των μυκοτοξινών από τοξικολογική και οικονομική σκοπιά. Η διαλογή των μολυσμένων φιστικιών και του φιστικέλαιου είναι ένα εξαιρετικό εργαλείο για την απομάκρυνση καρπών στους οποίους η συγκέντρωση αφλατοξίνης ξεπερνά τα θεσμοθετημένα όρια και για τη διασφάλιση ότι τα μολυσμένα προϊόντα δε θα εισέλθουν στη τροφική αλυσίδα. Η παρούσα μελέτη ασχολείται με την ποιοτική και ποσοτική διαφοροποίηση μεταξύ υγιών και μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών και φιστικέλαιου Αιγίνης εφαρμόζοντας τις φασματοσκοπικές μεθόδους FTIR και Raman. Σκοπός της μελέτης είναι να διερευνηθεί εάν οι χρονοβόρες και υψηλού κόστους χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης της αφλατοξίνης μπορούν να αντικατασταθούν με τις μη καταστρεπτικές για το δείγμα και ταχείες μεθόδους FTIR και Raman. Για τον ανωτέρω σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις ομάδες δειγμάτων φιστικιών: α) υγιή β) φυσικώς μολυσμένα με αφλατοξίνη γ) τεχνητώς μολυσμένα με τοξικογόνα στελέχη του *Aspergillus flavus* και δ) τεχνητώς μολυσμένα με μη τοξικογόνα στελέχη του *Aspergillus flavus*. Κάθε δείγμα αλέσθηκε χονδροειδώς και ακολούθησε κοκκομετρία ($500\mu < \text{μέγεθος} < 800\mu$). Η περιεκτικότητα σε υγρασία και ολικό λίπος προσδιορίστηκαν με τις επίσημες μεθόδους 925.40 και 948.22 του AOAC, αντίστοιχα, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε η ποσότητα της αφλατοξίνης με HPLC. Στη συνέχεια, λήφθησαν φάσματα από 49 κοκκομετρημένα δείγματα και τα έλαιά τους με τις μεθόδους FTIR (τεχνικές DRIFTS και δισκίων ZnSe) και Raman. Τα φάσματα

υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το λογισμικό OMNIC 7.3 με τη βοήθεια της Χημειομετρίας (Διαχωριστική Ανάλυση) στο στατιστικό πρόγραμμα TQ Analyst προκειμένου να αναπτυχθούν μοντέλα για την ποιοτική και ποσοτική διάκριση μεταξύ υγιών και μολυσμένων φιστικιών. Για τον ποσοτικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα ανάλυσης της HPLC. Τα μοντέλα που λήφθηκαν μπορούν με επιτυχία να διαχωρίσουν ποιοτικά τα υγιή από τα μολυσμένα δείγματα. Για τα κονιορτοποιημένα δείγματα, παρατηρήθηκε 91,8% ποσοστό επιτυχίας και η μεγαλύτερη ακρίβεια για τη διαφοροποίηση επιτεύχθηκε σε δύο φασματικές περιοχές: $1770,17-1721,20\text{ cm}^{-1}$ και $3034,51-2820,65\text{ cm}^{-1}$. Για το φιστικέλαιο με τη μέθοδο FTIR, παρατηρήθηκε 83,4% ποσοστό επιτυχίας και η μεγαλύτερη ακρίβεια για τη διαφοροποίηση επιτεύχθηκε σε δύο φασματικές περιοχές: $1772,26-1683,55\text{ cm}^{-1}$ και $3035,41-2821,35\text{ cm}^{-1}$. Για το φιστικέλαιο με τη μέθοδο Raman, παρατηρήθηκε 85,7% ποσοστό επιτυχίας και η μεγαλύτερη ακρίβεια για τη διαφοροποίηση επιτεύχθηκε σε δύο φασματικές περιοχές: $1681,03-1626,46\text{ cm}^{-1}$ και $1491,25-1400,70\text{ cm}^{-1}$. Το μοντέλο για τον ποσοτικό διαχωρισμό παρουσίασε ικανοποιητικό συντελεστή συσχέτισης ($R^2 = 0,91981$), αλλά οι τιμές των RMSEC και RMSEP ήταν ιδιαίτερα υψηλές.

Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων

και

Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γ.Π.Α

Λέξεις κλειδιά: Ασπέργιλλοι · *Aspergillus flavus* · Αφλατοξίνες · Φιστίκια Αιγίνης · *Pistacia vera* · Διαλογή · Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier · Μέθοδος DRIFT · ZnSe · Raman · Διαχωριστική Ανάλυση

ABSTRACT

Lydia Valasi

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETECTION OF AFLATOXIN IN PISTACHIOS AND PISTACHIO OIL WITH THE FTIR AND RAMAN SPECTROSCOPY METHODS

October 2016

Pistachios are considered one of the most delicious and nutritionally excellent nuts due to their high content in unsaturated fat, minerals, vegetable protein and their antioxidant polyphenols. However, the nuts are likely to be affected by toxigenic fungal strains of *Aspergillus* sc *Flavi*, which produce aflatoxin, the most prominent group of mycotoxins in toxicological and economic terms. Sorting of contaminated pistachios and pistachio oil could be an excellent tool to remove nuts in which aflatoxin concentration is above legal limits and ensure that contaminated material does not enter the food chain. This study deals with the qualitative and quantitative separation of healthy and aflatoxin contaminated pistachios and pistachio oil applying the FTIR and Raman spectroscopy methods. The aim of the study is to investigate whether the time and cost consuming chromatographic analysis of aflatoxin could be replaced with the non-destructive for the sample and rapid FTIR and Raman methods. For the above purpose, four groups of pistachio samples were used: a) healthy b) naturally contaminated with aflatoxin c) artificially contaminated with toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and d) artificially contaminated with non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Each sample was finely ground and a particle size separation was followed ($500\mu < \text{size} < 800\mu$). Moisture and total fat content were determined according to the official 925.40 and 948.22 AOAC methods, respectively, while aflatoxin was measured by HPLC. Then, spectra of 49 ground samples and their oils were obtained using the FTIR (DRIFT and ZnSe techniques) and Raman methods. The above spectra were processed with OMNIC 7.3 software by means of Chemometrics (Discriminant Analysis) in the statistical TQ Analyst program in order to develop a model to discriminate qualitatively and quantitatively between healthy and contaminated pistachios. For the quantitative discrimination, HPLC analysis results were used. The obtained models could successfully classify qualitatively the healthy

from the aflatoxin contaminated samples. For ground samples, it was observed 91,8% success rate and the greatest accuracy for the differentiation was achieved in two spectral regions: 1770,17-1721,20 cm^{-1} and 3034,51-2820,65 cm^{-1} . For pistachio oil with the FTIR method, it was observed 83,4% success rate and the greatest accuracy for the differentiation was achieved in two spectral regions: 1772,26-1683,55 cm^{-1} and 3035,41-2821,35 cm^{-1} . For pistachio oil with the Raman method, , it was observed 85,7% success rate and the greatest accuracy for the differentiation was achieved in two spectral regions: 1681,03-1626,46 cm^{-1} και 1491,25-1400,70 cm^{-1} . The model for the quantitative discrimination showed satisfactory correlation coefficient ($R^2 = 0,91981$), but the values of RMSEC and RMSEP were high.

Laboratory of Food Process Engineering
and

Laboratory of General Chemistry of AUA

Keywords: *Aspergillus* · *Aspergillus flavus* · Aflatoxins · Pistachios · *Pistacia vera* · Sorting · Fourier Transformation Infra Red Spectroscopy · DRIFT Method · ZnSe · Raman · Discriminant Analysis

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	I
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	II
ABSTRACT.....	IV
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	XIII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	XV
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	XVIII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
A.1 ΟΙ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΟΙ.....	3
A.1.1 Γενικά στοιχεία Ασπέργιλλων.....	3
A.1.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Ασπέργιλλων.....	3
A.1.1.2 Κατηγοριοποίηση Ασπέργιλλων.....	4
A.1.1.3 Μορφολογία Ασπέργιλλων.....	5
A.1.2 Ιστορικά στοιχεία Ασπέργιλλων.....	5
A.1.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες Ασπέργιλλων.....	6
A.1.4 Βιομηχανική χρήση Ασπέργιλλων.....	7
A.1.5 Παθογένεια Ασπέργιλλων.....	8
A.1.6 Τα είδη <i>Aspergillus flavus</i> και <i>Aspergillus parasiticus</i>	9
A.1.6.1 <i>Aspergillus flavus</i>	10
A.1.6.1.1 Μορφολογία <i>Aspergillus flavus</i>	10
A.1.6.1.2 Σημασία του είδους <i>Aspergillus flavus</i>	10
A.1.6.1.3 Οικολογία του <i>Aspergillus flavus</i>	11
A.1.6.1.4 Ο <i>Aspergillus flavus</i> ως φυτοπαθογόνο και ζωοπαθογόνο.....	13
A.1.6.2 <i>Aspergillus parasiticus</i>	13
A.1.6.2.1 Οικολογία του <i>Aspergillus parasiticus</i>	13

A.2 ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	15
A.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ.....	15
A.2.2 Επιπτώσεις μυκοτοξινών στα ζώα και τους ανθρώπους.....	16
A.2.3 Οικονομικές επιπτώσεις μυκοτοξινών.....	17
A.3 ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ.....	18
A.3.1 Γενικά στοιχεία αφλατοξινών.....	18
A.3.2 Ιστορικά στοιχεία αφλατοξινών.....	19
A.3.3 Χημικές και φυσικές ιδιότητες αφλατοξινών.....	20
A.3.3.1 Χημικές ιδιότητες αφλατοξινών.....	20
A.3.3.2 Φυσικές ιδιότητες αφλατοξινών.....	22
A.3.3.3 Αφλατοξίνη B1.....	23
A.3.3.4 Αφλατοξίνη M1.....	25
A.3.4 Χημικές αντιδράσεις αφλατοξινών.....	26
A.3.5 Επιπτώσεις στα ζώα και τους ανθρώπους.....	28
A.3.5.1 Αφλατοξίκωση.....	28
A.3.5.1.1 Οξεία τοξικότητα.....	29
A.3.5.1.2 Χρόνια τοξικότητα.....	29
A.3.5.2 Μηχανισμός τοξικής δράσης αφλατοξινών.....	30
A.3.6 Οικονομικές επιπτώσεις αφλατοξινών.....	31
A.3.6.1 Συχνότητα παρουσίας αφλατοξινών.....	31
A.3.6.2 Παρουσία αφλατοξινών βάσει των προϊόντων.....	32
A.3.6.3 Παρουσία αφλατοξινών βάσει της γεωγραφικής περιοχής.....	33
A.3.7 Νομοθεσία για τις αφλατοξίνες.....	36
A.3.7.1 Ευρωπαϊκή νομοθεσία.....	37
A.3.7.2 Παγκόσμια νομοθεσία.....	40
A.4 Η ΦΙΣΤΙΚΙΑ.....	44
A.4.1 Ιστορικά στοιχεία φιστικιάς.....	44

A.4.2 Οικονομικά στοιχεία παραγωγής φιστικιών.....	46
A.4.3 Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών.....	48
A.4.4 Κατηγοριοποίηση φιστικιών.....	49
A.4.4.1 Χαρακτηριστικά και κριτήρια ποιότητας φιστικιών.....	49
A.4.5 Πορεία ανάπτυξης φιστικιών.....	50
A.4.6 Αναπτυξιακές απαιτήσεις φιστικιών.....	51
A.4.6.1 Κλιματικές απαιτήσεις.....	51
A.4.6.2 Υψομετρικές απαιτήσεις.....	51
A.4.6.3 Απαιτήσεις υγρασίας.....	51
A.4.6.4 Εδαφικές απαιτήσεις.....	52
A.4.6.5 Αρδευτικές απαιτήσεις.....	52
A.4.6.6 Απαιτήσεις κλαδέματος.....	52
A.4.6.7 Απαιτήσεις λίπανσης.....	52
A.4.6.8 Διατροφικές απαιτήσεις.....	53
A.4.7 Δείκτες ωριμότητας φιστικιών.....	53
A.4.8 Φυσιολογικά αναπτυξιακά προβλήματα φιστικιών.....	54
A.4.9 Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς.....	54
A.4.10 Μυκητιολογικές ασθένειες φιστικιάς.....	57
A.4.10.1 Προσβολή από τους μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i>	58
A.4.11 Επιπτώσεις των προ-συλλεκτικών παραγόντων στη διάσπαση του κελύφους των φιστικιών.....	59
A.4.12 Βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης φιστικιών.....	60
A.4.13 Στάδια παραγωγής φιστικιών.....	61
A.4.14 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης.....	64
A.4.14.1 Αιτίες παραγωγής αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια πριν τη συγκομιδή.....	66
A.4.14.2 Αιτίες παραγωγής αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια μετά τη	

συγκομιδή.....	68
A.4.15 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης.....	69
A.4.15.1 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή.....	69
A.4.15.2 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης κατά τη συγκομιδή.....	76
A.4.15.3 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης μετά τη συγκομιδή.....	77
A.4.16 Μέθοδοι παρεμπόδισης δημιουργίας και τεχνικές αποδόμησης, απενεργοποίησης και καταστροφής αφλατοξίνης και άλλων παθογόνων για το φιστίκι μικροοργανισμών.....	80
A.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ.....	89
A.5.1 Διαδικασία πριν την ανάλυση του αποξηραμένου καρπού για την ανίχνευση αφλατοξίνης.....	89
A.5.1.2 Αυτόματα συστήματα διαλογής.....	89
A.5.2 Ανάλυση προϊόντος για τον έλεγχο της ύπαρξης αφλατοξινών.....	94
A.5.2.2 Άλεση – Ομογενοποίηση.....	97
A.5.2.3 Εκχύλιση.....	98
A.5.2.4 Καθαρισμός.....	101
A.5.2.5 Ανίχνευση αφλατοξίνης.....	103
A.5.2.5.1 Αναφορικές ή επιβεβαιωτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό αφλατοξινών.....	104
A.5.2.5.2 Μέθοδοι ταχείας διαλογής για τον προσδιορισμό αφλατοξινών...	111
A.5.2.5.3 Πόλωση φθορισμού - Fluorescence Polarization (FP) για τον προσδιορισμό αφλατοξινών.....	115
A.5.2.5.4 Fluorescence Labelled Optical - Read Immuno Dipstick Assay (FLORIDA) για τον προσδιορισμό αφλατοξινών.....	116
A.5.2.5.5 Ανοσολογικοί βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών.....	117
A.5.2.5.6 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών	118

A.5.2.5.7 Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή - Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) για τον προσδιορισμό αφλατοξινών.....	119
A.5.2.5.8 Διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών μέσω απεικόνισης με ακτίνες X.....	120
A.5.2.5.9 Διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών βάσει του προφίλ των πτητικών ουσιών τους.....	121
A.5.2.5.10 Διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών βάσει οπτικής διαφοροποίησης.....	122
A.6 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ.....	123
A.6.1 Γενικά στοιχεία φασματοσκοπίας υπερόθρου (IR).....	123
A.6.1.1 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας υπερόθρου.....	123
A.6.1.2 Σημασία φασματοσκοπίας υπερόθρου.....	127
A.6.1.3 Εφαρμογές εγγύς υπέρυθρης φασματοσκοπίας (NIR).....	128
A.6.2 Φασματοσκοπία υπερόθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier.....	129
A.6.2.1 Σημασία FTIR.....	129
A.6.2.2 Τεχνικές λήψης φάσματος FTIR.....	130
A.6.2.3 Οργανολογία και λειτουργία φασματοφωτομέτρου FTIR.....	135
A.6.2.4 Μετασχηματισμός Fourier.....	140
A.6.2.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα FTIR.....	141
A.6.2.6 Χαρακτηριστικές παράμετροι της φασματοσκοπίας FTIR.....	142
A.6.3 Φασματοσκοπία FTIR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transform Infra Red Spectroscopy-DRIFTS).....	145
A.6.3.1 Αρχή λειτουργίας DRIFTS.....	145
A.6.3.2 Οργανολογία DRIFTS.....	147
A.6.3.3 Χαρακτηριστικές παράμετροι της τεχνικής DRIFTS.....	149
A.6.3.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα DRIFTS.....	150

A.6.3.5	Επεξεργασία των φασμάτων IR.....	151
A.6.4	Raman.....	153
A.6.4.1	Αρχή λειτουργίας Raman.....	153
A.6.4.2	Οργανολογία Raman.....	154
A.6.4.3	Εφαρμογές Raman.....	155
A.6.5	Χημειομετρία.....	156
A.6.5.1	Διαχωριστική ανάλυση (Discriminant Analysis).....	156
A.6.5.2	Μερική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square – PLS Regression).....	157
A.6.5.3	Φασματοσκοπία Raman και Χημειομετρία.....	158
A.7	ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	159
B.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	160
B.1	ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.....	160
B.2	ΑΛΕΞΗ – ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	167
B.3	ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ.....	174
B.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΛΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ.....	177
B.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ.....	185
B.5.1	Ανάλυση κονιορτοποιημένων δειγμάτων με την τεχνική DRIFTS.....	185
B.5.2	Ανάλυση δειγμάτων φιστικέλαιου με την τεχνική δισκίων ZnSe.....	187
B.6	ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ RAMAN...190	
B.7	ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΜΕ HPLC.....	192
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	194
Γ.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ.....	194
Γ.2	ΑΠΟΛΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ MIR ΤΟΥ ΚΟΝΙΟΡΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ.....	196
Γ.3	ΑΠΟΛΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ.....	202
Γ.4	ΑΠΟΛΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ MIR ΤΟΥ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ.....	205

Γ.5 ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ RAMAN ΤΟΥ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ..	206
Γ.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ.....	207
Γ.6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΦΑΣΜΑ ΚΥΡΙΑΣ ΣΥΝΙΣΤΩΣΑΣ (PRINCIPAL COMPONENT SPECTRA).....	207
Γ.6.2 Απόσταση δείγματος από ένα πρότυπο.....	209
Γ.6.3 Εισαγωγή στοιχείων για στατιστική επεξεργασία.....	209
Γ.6.4 Ποσοστό επιτυχή διαχωρισμού.....	235
Γ.6.5 Αιτιολόγηση διαχωριστικής ανάλυσης με τα αφυδατωμένα δείγματα αντί των αποξηραμένων δειγμάτων.....	235
Γ.6.6 Αιτιολόγηση φάσματος Kubelka-Munk αντί φάσματος Average.....	236
Γ.6.7 Συμπληρωματικές πληροφορίες από τη μελέτη.....	239
Γ.6.7.1 Διαχωρισμός Healthy αφυδατωμένων vs. Healthy αποξηραμένων φιστικιών.....	239
Γ.6.7.2 Διαχωρισμός Naturally Contaminated αφυδατωμένων vs. Naturally Contaminated αποξηραμένων φιστικιών.....	239
Γ.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ.....	241
Γ.7.1 Αποτελέσματα ανίχνευσης αφλατοξίνης με τη μέθοδο HPLC.....	241
Γ.7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης στα κονιορτοποιημένα δείγματα με τη μέθοδο PLS.....	243
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	246
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	248
ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	248
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	251
ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ.....	252
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	253

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
3.1	Σύνοψη βασικών χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών αφλατοξινών.	22
3.2	Φυσικοχημικές ιδιότητες της αφλατοξίνης Β ₁ .	24
3.3	Αριθμός προειδοποιήσεων για επικίνδυνο φορτίο λόγω παρουσίας μυκοτοξινών, από το 2004 έως το 2013.	31
3.4	Αριθμός προειδοποιήσεων για τις μυκοτοξίνες ανά κατηγορία προϊόντος.	33
3.5	Μόλυνση τροφίμων από αφλατοξίνες σε διαφορετικές χώρες.	34
3.6	Μέγιστα όρια αφλατοξινών σε ξηρούς καρπούς.	39
3.7	Μέγιστα επιτρεπτά όρια για το σύνολο των αφλατοξινών και την αφλατοξίνη Μ ₁ σε τρόφιμα και ζωοτροφές σε παγκόσμιο επίπεδο.	42
4.1	Παραγωγή φιστικιών παγκοσμίως (σε τόνους).	46
4.2	Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών.	48
4.3	Σύσταση και θρεπτική αξία κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης.	49
4.4	Οι εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα.	55
4.5	Παραδείγματα παραγόντων βιοελέγχου που ελέγχουν τους μυκοτοξικογενείς μύκητες και τις μυκοτοξίνες.	74
5.1	Αναλυτικές μέθοδοι εμπορικά διαθέσιμες για την ανάλυση των μυκοτοξινών.	104
6.1	Σταθερές Δύναμης (κ) και Ανηγμένη Μάζα (μ) για διάφορα ατομικά ζεύγη.	126
6.2	Οι σπουδαιότερες εφαρμογές της IR.	128
6.3	Μερικές συνηθισμένες πηγές λέιζερ για φασματοσκοπία Raman.	155
Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		
1.1	Κατάταξη των υγιών δειγμάτων (H).	162
1.2	Κατάταξη των φυσικώς μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων (NC).	163
1.3	Κατάταξη των τεχνητώς μολυσμένων με αφλατοξικογόνο στέλεχος του <i>Aspergillus flavus</i> δειγμάτων (AC).	164
1.4	Κατάταξη των τεχνητώς μολυσμένων με μη-αφλατοξικογόνο στέλεχος του <i>Aspergillus flavus</i> δειγμάτων (ANT).	165
1.5	Κατάταξη των δειγμάτων διαλογής (OS).	166
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
1.1	Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία υγιών δειγμάτων (H).	194

1.2	Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία φυσικώς μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων (NC).	194
1.3	Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία τεχνητώς μολυσμένων με αφλατοξικογόνο στέλεχος του <i>Aspergillus flavus</i> δειγμάτων (AC).	195
1.4	Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία τεχνητώς μολυσμένων με μη-αφλατοξικογόνο στέλεχος του <i>Aspergillus flavus</i> δειγμάτων (ANT).	195
1.5	Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία δειγμάτων διαλογής (OS).	195
2.1	Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (Mid IR) του κονιορτοποιημένου φιστικιού Αιγίνης.	199
6.1	Κλάσεις δειγμάτων πρώτης μεθόδου διαχωριστικής ανάλυσης.	211
6.2	Ταξινόμηση δειγμάτων στις χωριζόμενες κλάσεις της μεθόδου διαχωριστικής ανάλυσης.	212
6.3	Κύριες συνιστώσες για τα κονιορτοποιημένα δείγματα.	218
6.4	Κύριες συνιστώσες για τα δείγματα φιστικέλαιου με FTIR.	219
6.5	Κύριες συνιστώσες για τα δείγματα φιστικέλαιου με Raman.	219
6.6	Αποστάσεις κονιορτοποιημένων δειγμάτων από τις κύριες συνιστώσες 1 και 2.	224
6.7	Αποστάσεις δειγμάτων φιστικέλαιου με FTIR από τις κύριες συνιστώσες 1 και 2.	225
6.8	Αποστάσεις δειγμάτων φιστικέλαιου με Raman από τις κύριες συνιστώσες 1 και 2.	226
6.9	Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης για τα κονιορτοποιημένα δείγματα με ποσοστό επιτυχίας 91,8%.	229
6.10	Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης για τα δείγματα φιστικέλαιου με FTIR με ποσοστό επιτυχίας 83,4%.	231
6.11	Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης για τα δείγματα φιστικέλαιου με Raman με ποσοστό επιτυχίας 85,7%.	233
7.1	Ποσότητα αφλατοξίνης στα φυσικώς μολυσμένα δείγματα.	241
7.2	Ποσότητα αφλατοξίνης στα τεχνητώς μολυσμένα με τοξικογόνα στελέχη δείγματα.	242
7.3	Ποσότητα αφλατοξίνης στα τεχνητώς μολυσμένα με μη τοξικογόνα στελέχη δείγματα.	243

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
1.1	Μορφολογία ειδών <i>Aspergillus</i> .	5
1.2	Αποικίες <i>A. flavus</i> και <i>A. parasiticus</i> σε τρυβλίο καλλιέργειας Petri.	9
1.3	Αποικία <i>A. flavus</i> σε τρυβλίο καλλιέργειας Petri.	12
1.4	Μορφολογία <i>A. flavus</i> σε μικροσκόπιο.	12
1.5	Αποικία <i>A. parasiticus</i> σε τρυβλίο καλλιέργειας Petri.	14
1.6	Μορφολογία <i>A. parasiticus</i> σε μικροσκόπιο.	14
2.1	Από τους μύκητες στη μυκοτοξίκωση.	17
3.1	Μορφολογία <i>Aspergillus</i> , από τον οποίο παράγονται οι αφλατοξίνες, σε μικροσκόπιο.	18
3.2	Χημικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών.	21
3.3	Χημική δομή αφλατοξίνης B ₁ .	23
3.4	Χημική δομή ιασμωνικού μεθυλεστέρα.	25
3.5	Χημική δομή αφλατοξίνης M ₁ .	26
3.6	Σχηματισμός ένωσης προσθήκης αφλατοξίνης B ₁ – γουανίνης.	30
3.7	Απορρίψεις φορτίων με τρόφιμα, στα σημεία εισόδου της ΕΕ, ανά κατηγορία κινδύνου.	32
4.1	Χαρακτηριστικά καρπού φιστικιού.	49
4.2	Προνύμφη navel orangeworm πέμπτου σταδίου.	56
4.3	Ενήλικο navel orangeworm.	56
4.4	Επίδραση της περιεκτικότητας υγρασίας των σπερμάτων σε σχέση με τον κίνδυνο μόλυνσης με αφλατοξίνη.	65
5.1	Σύστημα CVBS.	92
5.2	Σύστημα ABS.	94
5.3	Τυπικό διάγραμμα ροής προσδιορισμού αφλατοξινών.	96
5.4	Σχέδιο δειγματοληψίας και άλεσης-ομογενοποίησης για βρώσιμους καρπούς.	97
5.5	Βασικές αρχές λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας.	103
5.6	Κύρια στοιχεία που απαρτίζουν ένα σύστημα GC.	105
5.7	Στάδια κατά την ποσοτικοποίηση αφλατοξινών με HPLC.	109
5.8	Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης B ₁ σε όλο το εύρος από 0,01ng/ml έως 10ng/ml και έλεγχος δειγμάτων ανθρώπινων ούρων με την τεχνική ELISA.	112
5.9	Κιτ (προσυσκευασμένα αντιδραστήρια και μικροτιτλοδοτικές πλάκες) για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών σε τρόφιμα με την τεχνική ELISA.	113
6.1	Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπέρυθρου.	123
6.2	Σχηματική αναπαράσταση δονήσεων τάσης και κάμψης.	125
6.3	Πορεία υπέρυθρης ακτινοβολίας στη μέθοδο ATR (1)	131
6.4	Ανάκλαση στην κρίσιμη γωνία.	132
6.5	Πορεία υπέρυθρης ακτίνας στη μέθοδο ATR (2).	133
6.6	Πορεία υπέρυθρης ακτίνας στη μέθοδο ATR (3).	133
6.7	Πορεία υπέρυθρης ακτινοβολίας στην τεχνική της ολικής	134

	κατοπτρικής ανάκλασης.	
6.8	Πορεία υπέρυθρης ακτινοβολίας στην τεχνική της διάχυτης ανάκλασης.	134
6.9	Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FTIR της εταιρείας Nicolet.	135
6.10	Το συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από ένα διαχωριστή δέσμης και δύο κάτοπτρα.	137
6.11	Ιντερφερογράφημα.	137
6.12	Συγκεντρωτική αναπαράσταση λήψης φάσματος με φασματοσκοπία FTIR.	140
6.13	Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας IR με ένα δείγμα με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS).	145
6.14	Τα τρία είδη ανάκλασης υπέρυθρης ακτινοβολίας σε στερεό δείγμα με μορφή σκόνης.	146
6.15	Σχηματική αναπαράσταση αρχής λειτουργίας της τεχνικής DRIFTS.	147
6.16	Εξάρτημα φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης.	148
6.17	Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος και καμπίδια για τη λήψη φασμάτων με τεχνική DRIFTS.	148
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		
1.1	Φιστικοθραύστης.	166
2.1	Μπλέντερ.	167
2.2	Κόσκινο μεγέθους 500μm.	168
2.3	Κόσκινο μεγέθους 800μm.	169
2.4	Ψύκτρα καθαρισμού των κόσκινων.	169
2.5	Κοκκομετρία δείγματος που προηγουμένως έχει αλεσθεί χονδροειδώς.	170
2.6	Ζυγαριά με δύο δεκαδικά ψηφία.	170
2.7	Σακουλάκι αποθήκευσης με ερμητικό κλείσιμο.	171
2.8	Ταμπέλες καταγραφής του τύπου του δείγματος.	171
2.9	Κάψα ζύγισης.	172
2.10	Σακουλάκι αποθήκευσης με τυχαίο δείγμα.	173
2.11	Σακουλάκια αποθήκευσης με 10NC δείγματα.	173
3.1	Φούρνος.	175
3.2	Ξηραντήριο.	175
3.3	Ζυγαριά με 4 δεκαδικά ψηφία.	176
4.1	Συσκευή ημισυνεχούς εκχύλισης Soxhlet.	178
4.2	Λεπτομερής συνδεσμολογία συσκευής Soxhlet.	179
4.3	Καρτούσες (1).	181
4.4	Καρτούσες (2).	181
4.5	Συσκευή Soxhlet (1).	182
4.6	Συσκευή Soxhlet (2).	182
4.7	Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού.	183
4.8	Πριν την εκχύλιση του λίπους.	183
4.9	Μετά την εκχύλιση του λίπους.	184
5.1	Σύστημα της IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.	186
5.2	Υποδοχέας δείγματος που φέρει καμπίδιο.	186

5.3	Δισκίο ZnSe.	187
6.1	Μηχάνημα Raman για την ανάλυση φιστικέλαιου.	190
6.2	Γυάλινος τριχοειδής σωληνίσκος ως υποδοχέας δείγματος φιστικέλαιου	191
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
2.1	Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-1).	196
3.1	Φάσμα IR και δομές των αφλατοξινών B ₁ , B ₂ , G ₁ και G ₂ .	203
3.2	Φάσμα IR της αφλατοξίνης B ₁ .	203
3.3	Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-3).	204
3.4	Φάσμα FTIR φιστικιού Αιγίνης H-3 εμβολιασμένο με αφλατοξίνη.	204
3.5	Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης H-3 (μπλε γραμμή) και ίδιου δείγματος μολυσμένο με αφλατοξίνη (κόκκινη γραμμή).	204
4.1	Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-1).	205
5.1	Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-1).	206
6.1	Φάσματα κύριων συνιστωσών.	208
6.2	Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 1,2,3 κονιορτοποιημένων δειγμάτων.	220
6.3	Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 4,5,6 κονιορτοποιημένων δειγμάτων.	220
6.4	Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 7,8,9 κονιορτοποιημένων δειγμάτων.	221
6.5	Φάσμα FTIR κύριας συνιστώσας 10 κονιορτοποιημένων δειγμάτων.	221
6.5	Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 1,2,3 φιστικέλαιου.	222
6.7	Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 4,5,6 φιστικέλαιου.	222
6.8	Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 7,8,9 φιστικέλαιου.	222
6.9	Φάσμα FTIR κύριας συνιστώσας 10 φιστικέλαιου.	223
6.10	Φάσμα Raman κύριων συνιστωσών 1,2,3 φιστικέλαιου.	223
6.11	Φάσμα Raman κύριων συνιστωσών 4,5,6 φιστικέλαιου.	223
6.12	Φάσμα Raman κύριων συνιστωσών 7,8,9 φιστικέλαιου.	224
6.13	Φάσμα Raman κύριας συνιστώσας 10 φιστικέλαιου.	224

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
Π.Ο.Π	Protected Destination of Origin	Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης
ABS	Acoustic-Based Sorting	Διαλογή Βασισμένη σε Ήχο
ADI	Acceptable Daily Intake	Ανεκτή Ημερήσια Πρόσληψη
ALARA	As Low As Reasonably Achievable	Χαμηλότερο Δυνατό Επίπεδο
AOAC	Association of Analytical Communities	Σύλλογος Αναλυτικών Κοινοτήτων
ASE	Accelerated Solvent Extraction	Εκχύλιση Επιταχυνόμενου Διαλύτη
ATR	Attenuated Total Reflectance	Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση
BCD	Before Column Derivatization	Προ-στήλης Παραγωγοποίηση
CCFAC	Codex Committee on Food Additives and Contaminants	Επιτροπή Κώδικα για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές Τροφίμων
CE	Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση
CVBS	Computer Vision-Based Sorting	Διαλογή Βασισμένη σε Υπολογιστική Όραση
DRIFT	Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transformation	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Διάχυτης Ανάκλασης με Μετασχηματισμό κατά Fourier
DTGS	Deuterated TriGlycine Sulfate	Δευτεριωμένη Θεϊκή Τριγλυκίνη
ECD	Electron Capture Detector	Ανιχνευτής Συλλήψεως Ηλεκτρονίων
ELIFA	Enzyme-Linked ImmunoFiltration Assay	Δοκιμασία Ενζυμικής Ανοσοδιήθησεως
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Δοκιμασία Ενζυμικής Ανοσοπροσρόφησης
EPA	Environmental Protection Agency	Εταιρεία Περιβαλλοντικής Προστασίας
FAO	Food and Agriculture Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database	Οργανισμός Εταιρικής Βάσης Δεδομένων Τροφίμων και Γεωργίας
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Διαχείρισης Τροφίμων και Ποτών
FFT	Fast Fourier Transform	Γρήγορος Μετασχηματισμός Fourier
FID	Flame Ionization Detector	Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας
FIR	Far Infra Red	Άπω Υπέρυθρο
FLD	Fluorescence Detector	Ανιχνευτής Φθορισμού
FLORIDA	Fluorescence Labelled Optical – Read Immuno Dipstick Assay	Οπτικά Σημασμένος Φθορισμός – Δοκιμασία Ανοσοεμβαπτιζόμενης Ράβδου
FP	Fluorescence Polarization	Πόλωση Φθορισμού

FTIR	Fourier Transformation Infra Red	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier
GAP	Good Agricultural Practices	Ορθή Γεωργική Πρακτική
GC	Gas Chromatography	Αεριοχρωματογραφία
GHP	Good Hygiene Practice	Ορθή Πρακτική Υγιεινής
GMES	Global Monitoring for Environment and Security	Παγκόσμιο Περιβαλλοντικό Σύστημα Παρακολούθησης
GRAS	Generally Recognized As Safe	Γενικώς Αναγνωρισμένα Ως Ασφαλή
GSP	Good Storage Practice	Ορθή Αποθηκευτική Πρακτική
HBV	Hepatitis B Virus	Ιός ηπατίτιδας
HCC	HepatoCellular Carcinoma	Ηπατοκυτταρικός καρκίνος
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης
HSCAS	Hydrated Sodium Calcium AluminoSilicate	Φυλλοπυριτική Αργίλος
HS-SPME	Head Space - Solid Phase MicroExtraction	Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης
IACs	ImmunoAffinity Columns	Στήλες ανοσοσυγγένειας
IARC	International Agency for Research on Cancer	Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο
IPCS	International Programme on Chemical Safety	Διεθνές Πρόγραμμα για τη Χημική Ασφάλεια
IR	Infra Red	Υπέρυθρο
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Διεθνής Ένωση Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants	Κοινή Ειδική Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry	Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας
LOD	Limit Of Detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit Of Quantification	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού
MIPs	Molecularly Imprinted Polymers	Μοριακά Αποτυπωμένα Πολυμερή
MIR	Mid Infra Red	Μέσο Υπέρυθρο
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion	Διασπορά Στερεής Φάσης Μήτρας
NIR	Near Infra Red	Εγγύς Υπέρυθρο
NPLC	Normal-Phase Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία Κανονικής Φάσης
PBPB	Pyridinium Bromide Perbromide	Πυριδινικό Βρωμιούχο Υπερβρωμίδιο
PCA	Principal Component Analysis	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών
PCD	Post Column Derivatization	Μετά-στήλης Παραγωγοποίηση
PFE	Pressurized Fluid Extraction	Εκχύλιση με Πεπιεσμένο Υγρό

PLS	Partial Least Squares	Μερική Παλινδρόμηση Ελαχίστων Τετραγώνων
PPO	PolyPhenylene Oxide	Οξείδιο του προπυλενίου
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed	Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για Τρόφιμα και Ζωοτροφές
RH	Relative Humidity	Σχετική Υγρασία
RMS	Root Mean Square	Ρίζα του μέσου όρου του αθροίσματος των τετραγώνων
RMSEC	Root Mean-Squared Error of Calibration	Ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της βαθμονόμησης
RMSEP	Root MeanSquared Error of Prediction	Ρίζας του μέσου σφάλματος της πρόβλεψης
RMSEV	Root Mean-Squared Error of cross-Validation	Ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της διασταυρωμένης επικύρωσης
RPLC	Reversed-Phase Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης
RSN	Ratio Signal-to-Noise	Λόγος σήματος προς θόρυβο
SCF	Scientific Committee on Food	Επιστημονική Επιτροπή για τα Τρόφιμα
SPE	Screen-Printed-Electrodes	Ηλεκτρόδια Εκτυπωμένα σε Οθόνη
SPME	Solid Phase MicroExtraction	Εκχυλίσεις Στερεάς Φάσης
SPR	Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων
TFA	TriFluoroAcetic	Τριφθοροοξικό Οξύ
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
TSR	Total Specular Reflection	Ολική Κατοπτρική Ανάκλαση
UNEP	United Nations Environment Programme	Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης
USDA	United States Department of Agriculture	Τμήμα Γεωπονίας Ηνωμένων Πολιτειών
UVD	Ultra Violet Detector	Ανιχνευτής Υπεριώδους
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ZPD	Zero Path Difference	Διαφορά Μηδενικής Διαδρομής

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ενδιαφέρον σχετικά με την ποιότητα και τις μεθόδους παραγωγής των τροφίμων έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, εξαιτίας των αλλαγών στις διατροφικές συνήθειες και στην καταναλωτική συμπεριφορά, καθώς και λόγω αύξησης της εκβιομηχάνισης και παγκοσμιοποίησης της εφοδιαστικής αλυσίδας. Η ζήτηση για υψηλά επίπεδα ποιότητας και ασφάλειας στην παραγωγή των τροφίμων απαιτεί προφανώς υψηλά πρότυπα διασφάλισης ποιότητας και ελέγχου της επεξεργασίας των τροφίμων. Η ικανοποίηση της ζήτησης αυτής απαιτεί κατάλληλα αναλυτικά εργαλεία για την ανάλυση τροφίμων, τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά την παραγωγή.

Τα τρόφιμα είναι εξαιρετικά περίπλοκα συστήματα. Αυτό έχει προφανείς συνέπειες για τα αναλυτικά εργαλεία και τις στρατηγικές που πρέπει να αναπτυχθούν για την ανάλυση αυτών των ετερογενών συστημάτων. Τα συστήματα τροφίμων αποτελούνται, κυρίως, από νερό, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη και άλλα συστατικά που υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως βιταμίνες, μέταλλα. Όλα αυτά τα συστατικά μπορεί να συνεισφέρουν στο φάσμα απορρόφησης που λαμβάνεται στη μέσο-υπέρυθρη περιοχή, αν και, στην πράξη, τα κύρια συστατικά (νερό, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη) κυριαρχούν. Επειδή η ετερογένεια των τροφίμων οδηγεί σε σημαντική φασματική πολυπλοκότητα, κατά την εφαρμογή των αναλυτικών τεχνικών χρησιμοποιούνται ισχυρές μαθηματικές μέθοδοι, γνωστές ως Χημειομετρία. Τέτοιες μέθοδοι ανάλυσης δεδομένων επιτρέπουν την εξαγωγή πολύτιμων πληροφοριών από μεγάλα και πολύπλοκα σύνολα δεδομένων.

Ενώ οι υπάρχουσες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών χαρακτηρίζονται από υψηλή ακρίβεια και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα. Ως εκ τούτου, έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη γρήγορων και ευαίσθητων μεθόδων ακριβείας μειωμένου κόστους. Από αυτές τις αναδυόμενες μεθόδους, φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transformation Infra Red, FTIR) και η φασματοσκοπία Raman, έχουν πολλά ελκυστικά χαρακτηριστικά, όπως εύκολη λειτουργία, μικρή απαίτηση σε αναλώσιμα, χαμηλό κόστος, υψηλή ταχύτητα ανάλυσης, και ελάχιστη έως καθόλου προετοιμασία του δείγματος, παράγοντας αφθονία ποιοτικών και ποσοτικών πληροφοριών σχετικά με τη χημική δομή των μορίων στα τρόφιμα.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η διερεύνηση αντικατάστασης των υπάρχοντων μεθόδων ανάλυσης αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια και φιστικέλαια από τις τεχνικές FTIR και Raman σε συνδυασμό με τη Χημειομετρία και η δυνατότητα ενσωμάτωσης των τελευταίων στη βιομηχανία τροφίμων για την απόρριψη μολυσμένων με αφλατοξίνη, σε επίπεδα ανώτερα των επιτρεπτών ορίων, κελυφωτών φιστικιών και φιστικέλαιων.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 ΟΙ ΑΣΠΕΡΓΙΛΛΟΙ

A.1.1 Γενικά στοιχεία Ασπέργιλλων

Οι Ασπέργιλλοι (*Aspergillus*) είναι το πιο κοσμοπολίτικο γένος μυκήτων με μεγάλο αριθμό ειδών και με ικανότητα να αναπτύσσεται σε όλη την υφήλιο από τις αρκτικές ως τις τροπικές χώρες, πρακτικά σε κάθε υπόστρωμα που περιέχει υγρασία και κάποια οργανική ουσία (Μπαλατσούρας, 2006).

Τα χαρακτηριστικά των Ασπέργιλλων συγκεντρώνουν ιδιαίτερο γεωργικό, καλλιεργητικό, βιομηχανικό, φαρμακευτικό, παθολογικό και επιστημονικό ενδιαφέρον (Γεωργιάδου, 2009). Σε γενικές γραμμές, τα πλεονεκτήματά τους ευνοούν τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, τη βιοτεχνολογία (παραγωγή ενζύμων) και τη φαρμακοβιομηχανία, ενώ τα μειονεκτήματά τους επικεντρώνονται σε προσβολή γεωργικών προϊόντων, καταστροφή καλλιεργειών, βιοσύνθεση μυκοτοξινών και παθογένεια (Μπαλατσούρας, 2006).

A.1.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Ασπέργιλλων

Πλεονεκτήματα

Οι Ασπέργιλλοι συνθέτουν ουσίες που αξιοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα, όπως ένζυμα (πηκτινολυτικά, λιπάσες, πρωτεάσες, γλυκοαμυλάση), οργανικά οξέα (κιτρικό, γλυκονικό, γαλλικό) και αμινοξέα (θρυπτοφάνη) (Μπαλατσούρας, 2006).

Επιπρόσθετα, κατέχουν σημαντικό ρόλο στο οικοσύστημα, διότι εμπλέκονται στην αποδόμηση ενός μεγάλου εύρους φυσικών οργανικών υποστρωμάτων. Η ποικιλομορφία των ενζύμων και των οργανικών οξέων που χρησιμοποιούν ως θρεπτικά συστατικά (θρεπτική ευελιξία) συμπληρώνεται από τη μεταβολική τους ικανότητα να εκκρίνουν πολλούς χαμηλού μοριακού βάρους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι θεωρείται ότι είναι σημαντικοί στα επικοινωνιακά σήματα του οικοσυστήματος (Γεωργιάδου, 2009).

Επίσης, πολλά είδη Ασπέργιλλων λαμβάνουν ενεργό μέρος στη ζαχαροποίηση του αμύλου προκειμένου να παραχθεί σιρόπι για αλκοολική ζύμωση και παραγωγή ανατολίτικων παραδοσιακών ποτών και τροφίμων (Μπαλατσούρας, 2006).

Μειονεκτήματα

Ορισμένα είδη Ασπέργιλλων μπορεί να αναπτυχθούν και να εξελιχθούν σε ευκαιριακό παθογόνο για τον άνθρωπο και τα ζώα. Με τον όρο «ευκαιριακό παθογόνο» ορίζεται το παθογόνο είδος που προκαλεί ευκαιριακή λοίμωξη, δηλαδή λοίμωξη που προσβάλλει έναν οργανισμό μόνο κάτω από ειδικές συνθήκες, όπως ανοσολογική ανεπάρκεια ή άλλες καταστάσεις που καταβάλλουν τους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού. Επιπλέον, κάποια είδη Ασπέργιλλων συνθέτουν επικίνδυνες για τον άνθρωπο και τα ζώα μυκοτοξίνες.

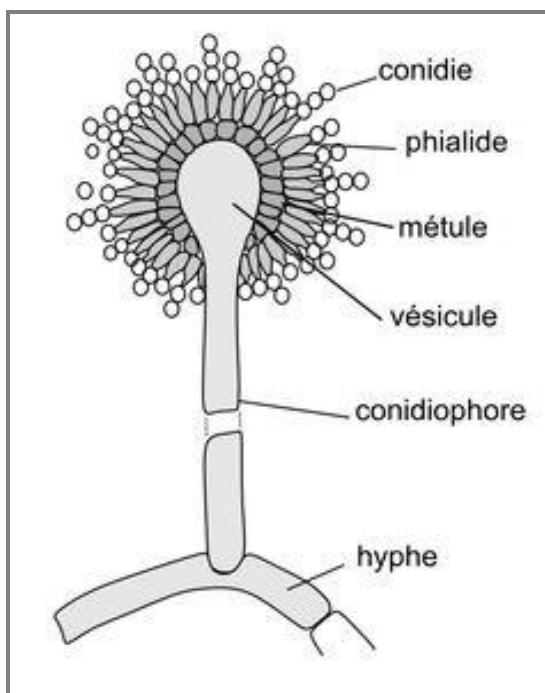
Τα τρόφιμα τα οποία αλλοιώνονται από τα διάφορα είδη Ασπέργιλλων είναι οι λιπαρές ουσίες, τα τυριά, τα κρεμμύδια και τα σκόρδα (τα οποία αλλοιώνονται με μαύρη σήψη) και οι σπόροι των δημητριακών (οι οποίοι χάνουν με τη μυκητίαση τη βλαστική τους ικανότητα) (Μπαλατσούρας, 2006).

A.1.1.2 Κατηγοριοποίηση Ασπέργιλλων

Οι Ασπέργιλλοι διακρίνονται στους τοξικογόνους και τους μη τοξικογόνους μύκητες. Οι τοξικογόνοι μύκητες κατατάσσονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα είναι οι «μύκητες του χωραφιού» και παράγουν μυκοτοξίνες πριν από τη συγκομιδή του εκάστοτε προϊόντος. Η δεύτερη ομάδα είναι γνωστή ως «μύκητες αποθήκευσης» και προκαλεί ασθένειες μετά τη συγκομιδή. Και στις δύο περιπτώσεις, προκαταρκτική πηγή αυτών των μυκήτων είναι το περιβάλλον. Η εισβολή των μυκήτων σε ένα προϊόν πριν από τη συγκομιδή καθορίζεται κυρίως από τους μύκητες-ξενιστές και από άλλες βιολογικές αλληλεπιδράσεις (π.χ. έντομα), ενώ οι μυκητιάσεις μετά τη συγκομιδή διέπονται από παράγοντες όπως έλλειψη θρεπτικών ουσιών απαραίτητων για το προσβαλλόμενο προϊόν, φυσικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία) που ευνοούν τη μυκητιακή προσβολή και βιοτικούς παράγοντες (έντομα, ανταγωνιστική αλληλεπίδραση) (Faulkner, 2014).

A.1.1.3 Μορφολογία Ασπέργιλλων

Η καρποφορία του γένους *Aspergillus* είναι χαρακτηριστική. Η μορφολογία του παρουσιάζεται στην εικόνα 1.1. Συγκροτείται από τον κονιδιοφόρο (conidiophore) ο οποίος είναι κάθετος, εκφύεται από το κύτταρο της βάσης, διευρύνεται στο ανώτερο άκρο και καταλήγει σε διόγκωση (vescicle). Στην επιφάνεια της τελευταίας εκφύονται στηρίγματα (phialides), σε μία ή δύο επάλληλες σειρές, τα άκρα των οποίων υποβαστάζουν σειρές από κονίδια (conidia). Τα στηρίγματα είναι φιαλοειδή γι' αυτό και τα κονίδια λέγονται και φιαλοσπόρια. Τα τελευταία είναι σφαιρικά ή σφαιροειδή (globose) και είναι χρώματος πράσινου, διαφόρου τόνου που μπορεί να φτάνει ως το ελαφρώς μαύρο (*Aspergillus niger*) (Μπαλατσούρας, 2006).



Εικόνα 1.1. Μορφολογία ειδών *Aspergillus*.

A.1.2 Ιστορικά στοιχεία Ασπέργιλλων

Οι Ασπέργιλλοι αναφέρονταν, συνήθως έμμεσα από τη μεταβολική τους δραστηριότητα, ως παράγοντες σήψης και αποδόμησης. Αναφέρονται από την αρχαία Ελλάδα (Νίκανδρος ο Κολοφώνιος, 185 π.Χ) ως και στην Εβραϊκή Βίβλο (Λευιτικό,

Κεφ. 13-14). Η πρώτη γνωστή αξιοποίηση των Ασπέργιλλων για ωφελιμιστικούς σκοπούς ήταν στην Κίνα περίπου πριν από 2000 χρόνια, όπου τους χρησιμοποιούσαν για την ενίσχυση της γεύσης του ρυζιού, της σόγιας και άλλων φυτικών προϊόντων βοηθώντας έτσι την περαιτέρω ζύμωσή τους από ζύμες και βακτήρια. Παρόμοιες ζυμώσεις υιοθετήθηκαν και σε άλλες γειτονικές περιοχές, όπως Ινδονησία, Ιαπωνία, Κορέα και σε άλλες περιοχές της Ασίας. Η επιστημονική έρευνα των Ασπέργιλλων, αλλά και άλλων μυκήτων, ξεκίνησε αμέσως μετά την ανακάλυψη του μικροσκοπίου. Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* πρωτοαναφέρθηκαν το 1729 από τον Ιταλό βοτανολόγο Pier A. Micheli (1679-1737) στο «Nova Plantarum Genera». Ο Micheli ήταν ο πρώτος που διέκρινε τις χαρακτηριστικές κονιδιοφόρους κεφαλές του γένους αυτού και λόγω της ιδιότητάς του – ήταν ιερέας – ονόμασε αυτούς τους μύκητες Ασπέργιλλους, διότι στα λατινικά *Aspergillum* είναι το θρησκευτικό σκεύος (αγιαστούρα) που χρησιμοποιούνταν στους αγιασμούς στη Ρωμαιοκαθολική Εκκλησία, με το οποίο προσομοίασε τις αποικίες του μύκητα. Ήδη από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα οι Ασπέργιλλοι άρχισαν να αναγνωρίζονται ως λοιμογόνοι παράγοντες του ανθρώπου και των ζώων και ως δραστικοί παράγοντες στις διαδικασίες αποσύνθεσης και στις ζυμώσεις. Τελικά, οι Ασπέργιλλοι ως ξεχωριστό γένος μυκήτων πήραν οριστική μορφή από τον Wehmer το 1901 (Γεωργιάδου, 2009).

A.1.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες Ασπέργιλλων

Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν ένα πλήθος βιολογικά ενεργών χημικών ενώσεων (Γεωργιάδου, 2009). Τετρακόσιοι δευτερογενείς μεταβολίτες με τοξικογενή δυνατότητα παράγονται από εκατό μύκητες αυτού του γένους (Tsitsigiannis, Dimakopoulou, Antoniou & Tjamos, 2012). Τυπικά, ο όρος «δευτερογενής μεταβολίτης» χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα χαμηλού μοριακού βάρους «μη απαραίτητα» φυσικά προϊόντα, τα οποία συνήθως παράγονται αφότου σταματήσει η πρωτογενής ανάπτυξη. Στους δευτερογενείς μεταβολίτες ανήκουν αντιβιοτικά, μυκοτοξίνες, ανοσοκατασταλτικές ενώσεις και παράγοντες μείωσης της χοληστερόλης. Λόγω της βιοσυνθετικής τους προέλευσης, χημικά ταξινομούνται ως πολυκετίδια, μη-ριβοσωμικά πεπτιδία, τερπενοειδή κ.ά. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σχηματίζονται στα τελευταία στάδια της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης. Οι συνθήκες

περιβάλλοντος που απαιτούνται για την παραγωγή σπορίων μυκήτων και για το δευτερογενή μεταβολισμό τους είναι παρόμοιες. Η παραγωγή σπορίων μυκήτων και ο σχηματισμός προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού πραγματοποιούνται στο ίδιο περίπου χρονικό διάστημα.

Δύο από τις πιο σημαντικές ενώσεις δευτερογενούς μεταβολισμού των Ασπέργιλλων είναι η λοβαστατίνη και η αφλατοξίνη. Η πρώτη συνεισφέρει θετικά στην ανθρώπινη ζωή διότι χρησιμοποιείται ευρέως για τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα στη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας, μειώνοντας τον κίνδυνο καρδιακών προσβολών. Αντίθετα, η δεύτερη θεωρείται μία από τις πιο ισχυρές καρκινογόνες ουσίες γι' αυτό και είναι η πιο καλά μελετημένη μυκοτοξίνη (Γεωργιάδου, 2009).

A.1.4 Βιομηχανική χρήση Ασπέργιλλων

Πολλές και διαφορετικές βιομηχανικές διεργασίες βασίζονται σε διάφορα είδη του γένους *Aspergillus*. Οι Ασπέργιλλοι είναι σημαντικοί στη βιομηχανία οινοπνευματωδών, στη φαρμακοβιομηχανία και στην ενζυμική βιομηχανία. Οι παλαιότερες διεργασίες σχετίζονται με παραδοσιακές ζυμώσεις τροφίμων στις Ασιατικές χώρες. Σε αυτά τα ζυμούμενα προϊόντα και ποτά περιλαμβάνονται πάστα σόγιας (miso), σάλτσα σόγιας (shoyu), οίνος ρυζιού (sake), οινοπνευματώδη ποτά (shochu) και ξύδι από ρύζι (yonezu). Η πιο διαδεδομένη διεργασία είναι τα koji: μίγμα από σιτάρι, ρύζι ή άλλα σιτηρά με ή χωρίς σόγια, όπου κατάλληλα είδη Ασπέργιλλων αναπτύσσονται και εκκρίνουν ένζυμα τα οποία διασπών τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες και άλλες οργανικές ενώσεις. Το αποτέλεσμα είναι ένα εύγευστο προϊόν για ανθρώπινη κατανάλωση και διαθέσιμο για περαιτέρω ζύμωση από ζύμες και οξυγαλακτικά βακτήρια. Επιπλέον, πολλά ένζυμα που έχουν εκκριθεί από Ασπέργιλλους έχουν απομονωθεί και έχουν ευρεία βιομηχανική χρήση (π.χ. αμυλάσες). Μία άλλη σημαντική χρήση των Ασπέργιλλων στη βιομηχανία είναι η παραγωγή κιτρικού οξέος. Για δεκαετίες, το είδος *Aspergillus niger* θεωρείται το βιολογικό εργοστάσιο παραγωγής κιτρικού οξέος για μαζική παραγωγή και χρήση του στη βιομηχανία αναψυκτικών και ποτών (Γεωργιάδου, 2009).

A.1.5 Παθογένεια Ασπέργιλλων

Η ικανότητα των Ασπέργιλλων να αναπτύσσονται σε πολλά και διαφορετικά υποστρώματα σε μεγάλο σχετικά εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών έδωσε τη δυνατότητα σε ορισμένα είδη να αποικούν τόσο ζωντανούς όσο και νεκρούς ζωϊκούς ιστούς. Συμπεριφέρονται, δηλαδή, τόσο ως παράσιτα όσο και ως σαπρόφυτα. Τρεις τύποι ασθενειών προκαλούνται από τους Ασπέργιλλους (Γεωργιάδου, 2009):

A) Τοξίκωση

Η τοξίκωση είναι αποτέλεσμα της κατάποσης τροφής μολυσμένης με τοξικούς μεταβολίτες του μύκητα. Η τοξίκωση παίρνει το όνομά της ανάλογα με το όνομα της τοξίνης από την οποία προκαλείται η ασθένεια (π.χ. από την αφλατοξίνη προκαλείται η αφλατοξίκωση).

Οι τοξικοί μεταβολίτες που παράγονται από ορισμένα είδη *Aspergillus* επηρεάζουν τον άνθρωπο και τα ζώα με δύο τρόπους. Πρώτον, τα παθογόνα είδη παράγουν εξωτοξίνες και ενδοτοξίνες κατά την ανάπτυξή τους σε ζωντανούς ιστούς. Δεύτερον, τα σαπροφυτικά ή παθογόνα είδη που αναπτύσσονται σε υποστρώματα τα οποία αργότερα χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα από τον άνθρωπο και τα ζώα είναι δυνατό να παράγουν τοξικές ουσίες, οι οποίες απορροφώνται κατά την πέψη και δρουν σε διάφορα συστήματα του σώματος. Οι ασθένειες που προκαλούνται με το δεύτερο τρόπο δράσης ονομάζονται «μυκοτοξικώσεις» ή πιο συγκεκριμένα για τις αφλατοξίνες «αφλατοξικώσεις». Η δράση αυτών των τοξινών στο σώμα ποικίλλει από μείωση της ανάπτυξης (τοξίνη από *Aspergillus glaucus*) μέχρι καρκινογένεση και θνησιμότητα (τοξίνη από *Aspergillus flavus*) (Γεωργιάδου, 2009).

B) Λοίμωξη

Οι λοιμώξεις από Ασπέργιλλους (ασπεργιλλώσεις) είναι το αποτέλεσμα της εισβολής του μύκητα σε ζωντανούς ιστούς. Ορισμένα είδη Ασπέργιλλων (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*) γίνονται ευκαιριακά παθογόνα σε ανοσοκατεσταλμένους (Γεωργιάδου, 2009).

Γ) Αλλεργία

Η αλλεργία σχετίζεται με την εισπνοή κονιδίων ή με άλλη μορφή επαφής με το μύκητα (Γεωργιάδου, 2009).

A.1.6 Τα είδη *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*

Ο Niles και άλλοι ανέφεραν ότι τα αφλατοξικογόνα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* αναπτύσσονται άριστα υπό θερμοκρασία 35-38 °C, εκκρίνουν τη μεγαλύτερη ποσότητα μυκοτοξίνης στους 24-30 °C, ενώ δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασία κάτω των 5 °C και σε $a_w < 0,77$ (Μπαλατσούρας, 2006). Οι αποικίες τους σε τρυβλίο καλλιέργειας Petri απεικονίζονται στην εικόνα 1.2.



Εικόνα 1.2. Αποικίες *A. flavus* και *A. parasiticus* σε τρυβλίο καλλιέργειας Petri.

A.1.6.1 *Aspergillus flavus*

A.1.6.1.1 Μορφολογία *Aspergillus flavus*

Ο *A. flavus* αποτελείται από δύο ομάδες με βάση το μέγεθος των σκληρωτίων του: στελέχη L (Ομάδα I) με σκληρώτια > 400 mm σε διάμετρο και στελέχη S (Ομάδα II) με σκληρώτια < 400 mm σε διάμετρο. Η λέξη «σκληρώτιο» προέρχεται από τη λέξη σκληρό. Το σκληρώτιο είναι μια συμπαγής σκληρή μάζα μυκηλίου που περιέχει αποθέματα τροφής και είναι σημαντικό για την αναπαραγωγή των μυκήτων. Και τα δύο στελέχη *A. flavus* παράγουν στελέχη αφλατοξινών B₁ και B₂, αλλά το στέλεχος *A. flavus* S μπορεί, επίσης, να παράγει αφλατοξίνες G₁ και G₂. Τα στελέχη S είναι γεωγραφικά κατανομημένα σε όλο τον κόσμο, αλλά σπάνια συναντώνται στις Ηνωμένες Πολιτείες (Faulkner, 2014).

A.1.6.1.2 Σημασία του είδους *Aspergillus flavus*

Από την ανακάλυψη των αφλατοξινών, ο *A. flavus* έχει γίνει ο πιο συχνά αναφερόμενος μικροοργανισμός στα τρόφιμα. Αυτό αντανακλά τη σημασία του στον τομέα της υγείας και της οικονομίας (Faulkner, 2014). Τα είδη της ομάδας του *A. flavus* είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Απομονώνονται συχνά από εδάφη, κυρίως των τροπικών και υποτροπικών περιοχών, από ζωοτροφές και φυτικά υλικά σε αποσύνθεση, από αποθηκευμένους σπόρους και σιτηρά και από διάφορα άλλα προϊόντα (φρούτα, αποξηραμένους καρπούς κ.ά.).

Ο *A. flavus* συνεισφέρει στις διεργασίες της αποσύνθεσης σε υψηλά επίπεδα υγρασίας, γι' αυτό και δεν παίζει κυρίαρχο ρόλο σε σχέση με άλλα είδη μυκήτων που απαιτούν χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας (Γεωργιάδου, 2009). Το σημαντικό χαρακτηριστικό του είναι η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών στο ανώτερο μεσοφιλικό εύρος (Μπαλατσούρας, 2006). Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών από στελέχη του *A. flavus* μετά από παρατήρηση ότι ορισμένες ουσίες του μεταβολισμού του (ασπεργιλλικό οξύ, υδροξυ-ασπεργιλλικό οξύ, φλαβισίνη, φλαβακόλη, φλαβασίνη, παρασιτισίνη, αουραντιδίνη) εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση. Λόγω της ικανότητας

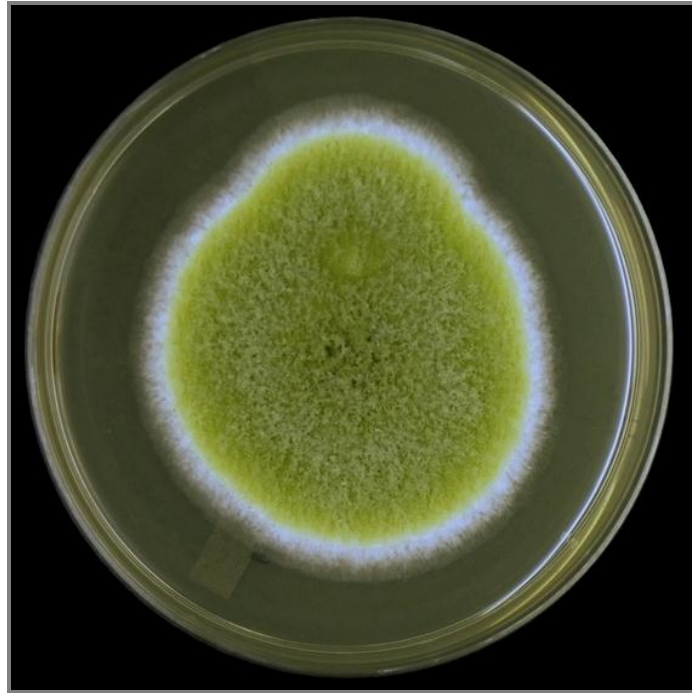
αυτής της ομάδας των μυκήτων να παράγουν κογικό οξύ (kojic acid), μελέτες έχουν γίνει για τη χρήση τους σε διαδικασίες ζύμωσης και στην παρεμπόδιση της ενζυματικής αμαύρωσης διάφορων τροφίμων. Άλλες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για τη χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή βιταμινών, παραγόντων ανάπτυξης και άλλων χημικών ουσιών (π.χ. στεροειδών, λιπών, πρωτεϊνών) (Γεωργιάδου, 2009).

A.1.6.1.3 Οικολογία του *Aspergillus flavus*

Ο *A. flavus* ανήκει στο υπογένος *Circumdati* sc *Flavi*. Τα είδη αυτού του τμήματος υπάρχουν περισσότερο στις υποτροπικές ζεστές κλιματικές περιοχές με μία τάση να εμφανίζονται πιο συχνά σε περιοχές με υψηλή βροχόπτωση, θερμοκρασία και υγρασία. Απομονώνεται κυρίως από καλλιεργούμενα εδάφη, αλλά μπορεί να βρεθεί σε διάφορα υποστρώματα, όπως δασικά εδάφη. Ο *A. flavus* συναντάται κυρίως σε θερμοκρασίες 26-35 °C (Γεωργιάδου, 2009). Η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A. flavus* θεωρούνται οι 25 °C για τους ξηρούς καρπούς εδάφους (Faulkner, 2014). Ο *A. flavus*, καθώς και το συγγενές του είδος *A. parasiticus*, είναι τα πιο συχνά ευρισκόμενα είδη παραγωγής αφλατοξινών. Αν και τα δυο είδη μπορεί να βρεθούν σε σπόρους βαμβακιού, καλαμποκιού, φιστικιών και άλλων ξηρών καρπών, ο *A. flavus* είναι το πιο κυρίαρχο είδος.

Ο *A. flavus* είναι ένα ανταγωνιστικό σαπρόφυτο, φυτοπαράσιτο και ζωοπαράσιτο. Αναπτύσσεται σε φυτικά υλικά τόσο πάνω όσο και μέσα στο έδαφος. Επιπροσθέτως, εμφανίζει ένα πλούσιο προφίλ σε δευτερογενείς μεταβολίτες, περιλαμβάνοντας διάφορες μυκοτοξίνες. Γνωστές μυκοτοξίνες που παράγονται από τον *A. flavus* είναι οι εξής: κυκλοπιαζονικό οξύ, ασπερτοξίνη, αφλατρέμη, ασπεργιλλικό οξύ και αφλατοξίνες. Οι τελευταίες, οι οποίες είναι τοξικές και καρκινογόνες, συσσωρεύονται στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Λόγω των επιπτώσεών τους στην υγεία έχουν γίνει πολλές έρευνες από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, οι οποίες εστιάζουν στην κατανόηση της βιολογίας και οικολογίας του πληθυσμού αυτού του μύκητα, καθώς και του δευτερογενούς μεταβολισμού του. Γι' αυτό το λόγο ο μύκητας αυτός έχει περιγραφεί πολύ περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο είδος Ασπεργιλλων και η βιοσύνθεση αφλατοξίνης είναι ένα από τα πιο καλά περιγραφόμενα μονοπάτια δευτερογενούς μεταβολισμού στους μύκητες. Επιπλέον, λόγω και της πρόσφατης

ανακάλυψης της αλληλουχίας του γονιδιώματός του χρησιμοποιείται ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας, οικολογίας και παθογένειας ολόκληρου του είδους (Γεωργιάδου, 2009). Στις εικόνες 1.3 και 1.4 φαίνονται η αποικία *A. flavus* σε τρυβλίο και η μορφολογία του σε μικροσκόπιο, αντίστοιχα.



Εικόνα 1.3. Αποικία *A. flavus* σε τρυβλίο καλλιέργειας Petri.



Εικόνα 1.4. Μορφολογία *A. flavus* σε μικροσκόπιο.

A.1.6.1.4 Ο *Aspergillus flavus* ως φυτοπαθογόνο και ζωοπαθογόνο

Ο *A. flavus* είναι ένα προαιρετικό παθογόνο των αναπτυσσόμενων καρπών, κυρίως του αραβόσιτου, του βαμβακιού, της αραχίδας και των ξηρών καρπών. Η αποίκισή του συχνά απαιτεί το φυτό-ξενιστή να έχει κατασταλαμμένη άμυνα. Η παρουσία του κυρίως σχετίζεται με τραυματισμένους καρπούς όπου μπορεί να εισβάλει και να τους μολύνει με αφλατοξίνη. Αν και είναι προαιρετικό παθογόνο είναι πολύ καλά προσαρμοσμένο στην αποίκιση καρπών, επομένως, παρουσία του *A. flavus* λίγοι άλλοι μύκητες προσβάλλουν και αποικίζουν καρπούς. Αυτή η καλή προσαρμογή υποδηλώνει ότι ο *A. flavus* έχει μία μοναδική ομάδα γονιδίων απαραίτητη για την αποίκιση στους καρπούς, ή διαφορετικά, έχει ικανότητες ανταγωνιστικής υπεροχής. Γενικά, λίγοι καρποί ενός δέντρου ή ενός φυτού μολύνονται με τον *A. flavus*, αλλά, δυστυχώς, ακόμα και ένας περιορισμένος αποικισμός μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή αφλατοξίνης σε συγκεντρώσεις πάνω από το θεσμοθετημένο αποδεκτό όριο. Μόλυνση μπορεί να προκληθεί και σε μετασυλλεκτικό στάδιο εάν οι καρποί ή οι ζωοτροφές δεν αποθηκευθούν σε κατάλληλο περιβάλλον.

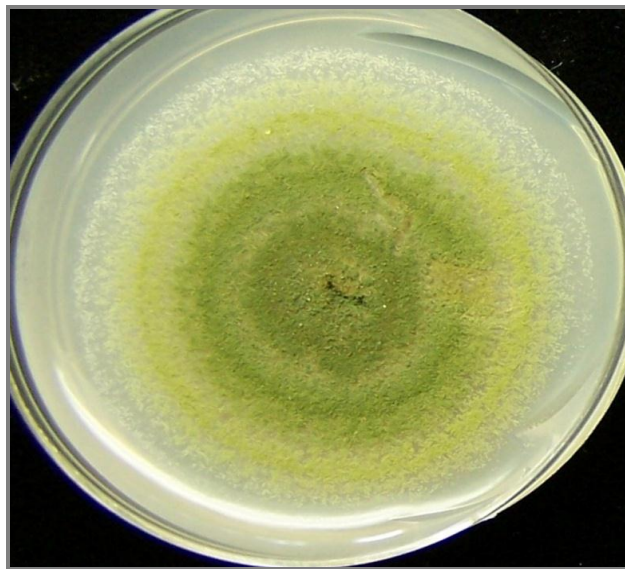
Ο *A. flavus* μπορεί να είναι και προαιρετικός ζωοπαθογόνος προκαλώντας ασθένειες στα ζώα και τους ανθρώπους. Είναι το δεύτερο παθογόνο αίτιο της ασπεργίλλωσης στους ανθρώπους και ο βασικός παθογόνος παράγοντας της χρόνιας ρινικής μόλυνσης (chronic indolent invasive sinonasal infection) σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Λόγω αύξησης των κρουσμάτων ασθενών με AIDS ή ασθενών με μεταμόσχευση οργάνου έχουν αυξηθεί και τα περιστατικά ασπεργίλλωσης στα νοσοκομεία. Η θνησιμότητα από τις μολύνσεις με Ασπέργιλλους είναι υψηλή λόγω του περιορισμένου αριθμού αντιμυκητιακών φαρμάκων, καθώς και της παρουσίας στελεχών ανθεκτικών στα υπάρχοντα φαρμακευτικά σκευάσματα (Γεωργιάδου, 2009).

A.1.6.2 *Aspergillus parasiticus*

A.1.6.2.1 Οικολογία του *Aspergillus parasiticus*

Ο *A. parasiticus* αναπτύσσεται σε φυτικά υλικά τόσο πάνω όσο και μέσα στο έδαφος. Έχει μία ελαφρώς χαμηλότερη άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξίνης σε σχέση με τον *A. flavus*, γεγονός το οποίο εξηγεί γιατί βρίσκεται

περισσότερο στην αραχίδα (υπόγειος καρπός) απ' ό τι σε υπέργειους καρπούς (π.χ. κελυφωτά φιστίκια) (Γεωργιάδου, 2009). Η βέλτιστη θερμοκρασία για παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A. parasiticus* έχει βρεθεί 25-30 °C. Συγκεκριμένα, είναι 27,8 °C και 27,3 °C σε pH 5,9 και 5,5, αντίστοιχα. Επίσης, καθώς οι θερμοκρασίες αυξάνονται υπάρχει μια αλλαγή στις αναλογίες της αφλατοξίνης B₁ και G₁ που παράγονται από τον *A. parasiticus*, με μείωση της αφλατοξίνης G₁ (Faulkner, 2014). Στις εικόνες 1.5 και 1.6 φαίνονται η αποικία *A. parasiticus* σε τρυβλίο και η μορφολογία του σε μικροσκόπιο, αντίστοιχα.



Εικόνα 1.5. Αποικία *A. parasiticus* σε τρυβλίο καλλιέργειας Petri.



Εικόνα 1.6. Μορφολογία *A. parasiticus* σε μικροσκόπιο.

A.2 ΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

A.2.1 Γενικά στοιχεία μυκοτοξινών

Η ανάγκη του ανθρώπου για τροφή είναι συνυφασμένη με την ίδια του την ύπαρξη. Παράλληλα, όμως, τα τρόφιμα αποτελούν οικοσύστημα ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών, αλλοιογόνων αλλά και παθογόνων για τον άνθρωπο. Εφόσον επικρατήσουν κατάλληλες συνθήκες οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται και συνεπώς το τρόφιμο αλλοιώνεται και μολύνεται. Μεταξύ αυτών των μικροοργανισμών, οι μύκητες αποτελούν μια ιδιαίτερος σημαντική ομάδα, διότι όχι μόνο αλλοιώνουν το τρόφιμο αλλά παράγουν και μυκοτοξίνες (Γεωργιάδου, 2009).

Ως «μυκοτοξίνες» ορίζονται οι τοξικές ουσίες που παράγονται από μύκητες, οι οποίοι εισβάλλουν σε καλλιέργειες στο χωράφι και οι οποίοι μολύνουν τα γεωργικά προϊόντα, όταν οι συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξή τους.

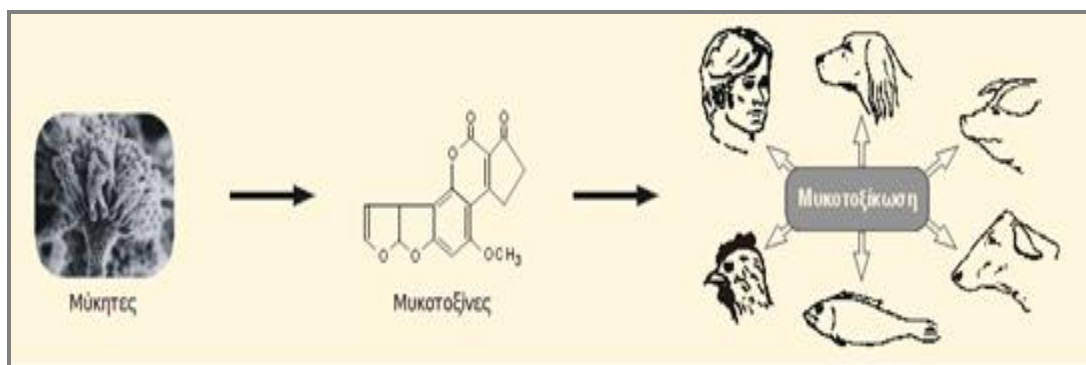
Τα δεδομένα που προκύπτουν από το GMES (Global Monitoring for Environment and Security - Παγκόσμιο Περιβαλλοντικό Σύστημα Παρακολούθησης) των FAO (Food and Agriculture Organization - Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας), WHO (World Health Organization – Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας) και UNEP (United Nations Environment Programme – Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών), καθώς και τα εθνικά δεδομένα για μόλυνση από μυκοτοξίνες έδειξαν ότι η μόλυνση των τροφίμων και των ζωοτροφών από μυκοτοξίνες θεωρείται παγκοσμίως ένα σοβαρό ζήτημα ασφάλειας, λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία και των οικονομικών συνεπειών (WHO, 1998).

A.2.2 Επιπτώσεις μυκοτοξινών στα ζώα και τους ανθρώπους

Τα ζώα εκτροφής που πλήττονται περισσότερο από μυκοτοξίνες είναι τα πουλερικά, οι χοίροι, τα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής και οι ίπποι (WHO, 1998).

Η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων σε μύκητες μπορεί να οδηγήσει σε «μυκοτοξίκωση» (εικόνα 2.1), μια παθολογική κατάσταση που μπορεί να εκδηλωθεί με μια μεγάλη ποικιλία συμπτωμάτων, όπως (Lillard-Roberts, 2004):

- Αναπνευστική δυσκολία, βήχας, φτάρνισμα, ρινίτιδα
- Δυσκολία στην κατάποση, αίσθημα πνιγμού, βλενώδη πτύελα
- Κάψιμο στο λάρυγγα και στους πνεύμονες
- Ναυτία, διάρροια, οξείς κοιλιακοί πόνοι
- Πόνοι στην κύστη, στο ήπαρ, στο σπλήνα ή στα νεφρά
- Οδυνηρή ούρηση, σκοτεινόχρωμα ούρα
- Ασθματικές καταστάσεις
- Άσχημη γεύση στο στόμα
- Πρησμένοι λεμφαδένες
- Προβλήματα θυρεοειδούς
- Αναφυλαξία, αλλεργίες κάθε είδους
- Πονοκέφαλοι
- Δυσκολία στην ομιλία, άνοια
- Απώλεια μνήμης
- Άγχος, κατάθλιψη, ταχυκαρδία, σύγχυση, κόπωση
- Διαταραχές στις τιμές χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων
- Υψηλή πίεση, ρινορραγίες
- Έντονη εφίδρωση κατά τον ύπνο
- Καρδιακή αρρυθμία
- Χρόνια κόπωση
- Προβλήματα όρασης
- Βοή στα αυτιά, προβλήματα ισορροπίας, βαρηκοΐα
- Πνευμονίες, πνευμονικά οιδήματα
- Απότομες μεταβολές σωματικού βάρους
- Απώλεια τριχοφυΐας, εύθραυστα νύχια
- Αστάθεια στη βάδιση
- Προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα - αποβολές
- Μυϊκή δυσκαμψία
- Καρκίνος
- Θάνατος σε ακραίες περιπτώσεις



Εικόνα 2.1. Από τους μύκητες στη μυκοτοξίκωση.

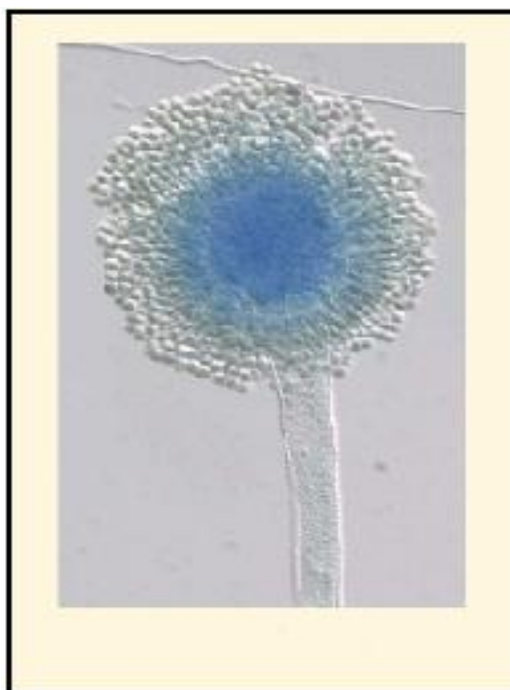
A.2.3 Οικονομικές επιπτώσεις μυκοτοξινών

Συνδυασμός των μυκοτοξινών μπορεί να προκαλέσει μεγαλύτερη απώλεια στην παραγωγή σε σχέση με κάθε μία από τις μυκοτοξίνες ξεχωριστά. Οι οικονομικές απώλειες έχουν συσχετισθεί σε όρους μειωμένης παραγωγικότητας, αναπαραγωγικές επιδράσεις, ευπάθεια σε λοιμώξεις με αποτέλεσμα αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα τελικά (WHO, 1998). Σύμφωνα με εκτιμήσεις του FAO, το 25%, σε παγκόσμια κλίμακα, των φυτικών γεωργικών προϊόντων παρουσιάζουν μολύνσεις από μυκοτοξίνες (ICRISAT, 2016).

Α.3 ΟΙ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

Α.3.1 Γενικά στοιχεία αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες θεωρούνται οι πιο επικίνδυνες μυκοτοξίνες λόγω των επιπτώσεών τους στην ανθρώπινη υγεία και στις εμπορικές καλλιέργειες (Faulkner, 2014). Παράγονται από μύκητες της ομάδας *Aspergillus* sc *Flavi* και κυρίως, από τα είδη *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, που συναντώνται κατά βάση στη βιομηχανία φιστικιού προκαλώντας τεράστιες απώλειες. Η μορφολογία *Aspergillus* σε μικροσκόπιο απεικονίζεται στην εικόνα 3.1. Φυσιολογικά όλοι οι Ασπέργιλλοι παράγουν αφλατοξίνη (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* και *Emericella venezuelensis*), εκτός αν πρόκειται για μη τοξικογόνα στελέχη λόγω κάποιας γενετικής ανωμαλίας - μετάλλαξης. Δηλαδή παρουσία μύκητα δε συνεπάγεται απαραίτητα παραγωγή αφλατοξίνης (WHO, 1998). Έχει αποδειχθεί ότι συγκαλλιέργεια τοξινογόνων και μη ειδών *Aspergillus* μπορεί να μηδενίσει την παραγωγή αφλατοξίνης. Επίσης, για παραγωγή αφλατοξίνης απαιτείται μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας νερού απ' ό τι για την ανάπτυξη του μύκητα (Μπαλατσούρας, 2006).



Εικόνα 3.1. Μορφολογία *Aspergillus*, από τον οποίο παράγονται οι αφλατοξίνες, σε μικροσκόπιο.

Επειδή οι τέσσερις βασικές αφλατοξίνες (B₁, B₂, G₁, G₂) απομονώθηκαν αρχικά από καλλιέργειες του *A. flavus*, τα πρώτα γράμματα του μύκητα («A» και «fla») χρησιμοποιήθηκαν για την ονομασία των τοξινών. Οι αφλατοξίνες M₁, M₂, P₁, Q₁, B_{2a} και G_{2a}, που παράγονται σε μικρότερες ποσότητες, απομονώθηκαν στην πορεία από καλλιέργειες των *A. flavus* και *A. parasiticus*. Ο *A. flavus* παράγει τις B₁ και B₂, καθώς και κάποιες συγγενείς ενώσεις, όπως τη M₁, ενώ ο *A. parasiticus* παράγει τις B₁, B₂, G₁ και G₂. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην απουσία των γονιδίων *norB* και *cypA* στον *A. flavus*, τα οποία είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση της ομάδας G των αφλατοξινών (Γεωργιάδου, 2009).

A.3.2 Ιστορικά στοιχεία αφλατοξινών

Το πρόβλημα των αφλατοξινών αναγνωρίστηκε ως σημαντικό διατροφικό πρόβλημα όταν το 1960 προκλήθηκε σοβαρή ασθένεια (νέκρωση του ήπατος) στα πουλερικά και κυρίως στις γαλοπούλες (turkeys) στη Μ. Βρετανία, από την οποία πέθαναν περίπου 100.000 πτηνά. Αρχικά, τα αίτια αυτής της περιεργής ασθένειας ήταν άγνωστα και έτσι η ασθένεια ονομάστηκε «Turkey X disease – ασθένεια X» (ICRISAT, 2016). Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η αιτία της ασθένειας ήταν ένα συστατικό της διατροφής των πτηνών, οι αραχίδες, σε ποσοστό από 0,5-16%, οι οποίες είχαν μολυνθεί από το μύκητα *A. flavus*, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται σε αυτό τον καρπό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του. Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής αποκάλυψε μία σειρά φθοριζόντων ουσιών, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως μυκοτοξίνες και στη συνέχεια, μετονομάστηκαν αφλατοξίνες.

Εξάρσεις μυκοτοξίκωσης προκλήθηκαν τον επόμενο χρόνο (1961) σε βοοειδή και χοίρους που είχαν ήδη διατραφεί με μολυσμένο γεύμα αραχίδας.

Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α., παρατηρήθηκε μία έξαρση καρκίνου του ήπατος (hepatoma) στις πέστροφες, το οποίο αργότερα αποδόθηκε στη μόλυνση από αφλατοξίνες ενός μίγματος βαμβακόσπορου, συστατικού της διατροφής αυτών των ψαριών.

Στην Ινδία, το 1974, καταγράφηκε η πιο σοβαρή έξαρση ηπατίτιδας στους ανθρώπους λόγω αφλατοξίκωσης (οξεία τοξικότητα από αφλατοξίνες). Στην εν λόγω περίπτωση, η αφλατοξίκωση προήλθε από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού από

αφλατοξίνες σε επίπεδα από 0,25 έως 15 mg/kg και οι 108 από τους 397 ασθενείς πέθαναν.

Πιο πρόσφατα, στην Κένυα το 2005, το πρόβλημα της αφλατοξίνης επανεμφανίστηκε οδηγώντας τουλάχιστον 125 ανθρώπους στο θάνατο από κατανάλωση καλαμποκιού μολυσμένου με αφλατοξίνη (Γεωργιάδου, 2009).

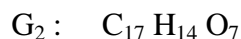
A.3.3 Χημικές και φυσικές ιδιότητες αφλατοξινών

A.3.3.1 Χημικές ιδιότητες αφλατοξινών

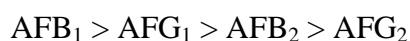
Από χημική άποψη, οι αφλατοξίνες είναι σταθερά παράγωγα διφουρανοκουμαρίνης, χαρακτηρίζονται από διϋδροφουρανικά ή τετραϋδροφουρανικά τμήματα συγχωνευμένα σε ένα υποκατεστημένο τμήμα κουμαρίνης. Πρόκειται για μία ομάδα υψηλά οξυγονωμένων ετεροκυκλικών ενώσεων, χαμηλού μοριακού βάρους, προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων του γένους *Aspergillus* (Smita, Mishra, 2009). Οι αφλατοξίνες είναι τερατογενείς, μεταλλαξιογόνες, καρκινογενείς και ανοσοκατασταλτικές ενώσεις, εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα (οξεία και χρόνια) και καταστρέφονται σε $T = 237 - 306 \text{ }^\circ\text{C}$ (ICRISAT, 2016).

Στην οικογένεια των αφλατοξινών ανήκουν περίπου 20 διαφορετικές ως προς τη δομή τοξίνες. Στην εικόνα 3.2 παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών. Οι ενώσεις που απομονώνονται συχνότερα είναι οι B_1 , B_2 , G_1 και G_2 , οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες τους M_1 και M_2 στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα και οι μεταβολίτες P_1 και Q_1 στο ήπαρ και τα ούρα πολλών θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Μεταξύ αυτών, οι G αφλατοξίνες διαφέρουν χημικά από τις B αφλατοξίνες λόγω της παρουσίας ενός 3-γαλακτονικού δακτυλίου αντί ενός κυκλοπεντενονικού δακτυλίου. Επίσης, στις αφλατοξίνες B_1 και G_1 υπάρχει ένας 8,9 διπλός δεσμός στον τερματικό φουρανικό δακτύλιο, ο οποίος δεν υπάρχει στις B_2 και G_2 . Η μικρή αυτή διαφορά στη χημική τους δομή σχετίζεται με μία πολύ σημαντική αλλαγή στη δράση τους. Οι αφλατοξίνες B_1 και G_1 θεωρούνται πολύ πιο τοξικές από τις B_2 και G_2 , οι οποίες αποτελούν τα διϋδροπαράγωγά τους (Γεωργιάδου, 2009).

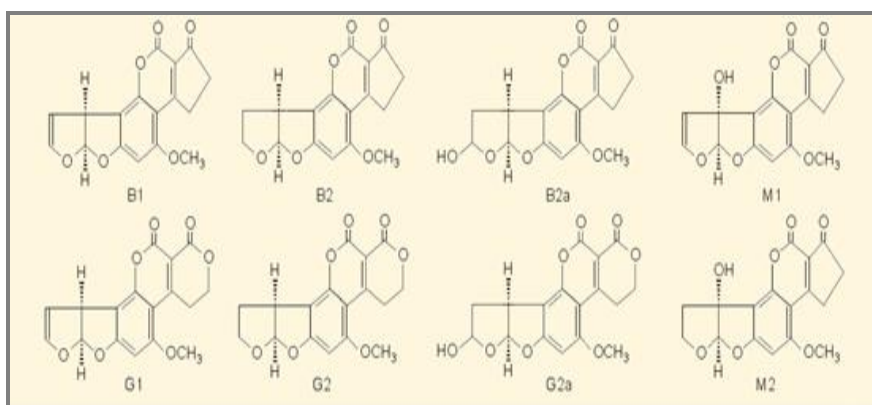
Στα κελυφωτά φιστίκια υπάρχουν οι B₁, B₂, G₁, G₂. Ο μοριακός τους τύπος είναι (Cornell University, 2015):



Η σειρά κατάταξης της τοξικότητας των αφλατοξινών είναι η εξής (Faulkner, 2014):



Οι υψηλώς συζευγμένες και σταθερές ρίζες στη δομή των αφλατοξινών προσδίδουν τη χαρακτηριστική χημική ιδιότητα των διαλυμάτων τους να φθορίζουν υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Από την ιδιότητα αυτή προκύπτει το γράμμα που χαρακτηρίζει τις αφλατοξίνες B και G. Έτσι, οι αφλατοξίνες B (B₁, B₂, B_{2a}) χαρακτηρίζονται από έντονο κυανό (B: blue) φθορισμό ($\lambda_{em,max} = 425$ nm), ενώ οι αφλατοξίνες G (G₁, G₂, G_{2a}) από έντονο πράσινο (G: green) φθορισμό ($\lambda_{em,max} = 450$ nm). Η B_{2a} είναι προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στη B₁. Η G_{2a} είναι προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στη G₁. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μικρές διαφοροποιήσεις στη δομή τους, οι οποίες διαχωρίζουν τα διάφορα είδη των αφλατοξινών έχουν δραστική επίδραση στις αναφερόμενες ιδιότητες φθορισμού. Συγκεκριμένα, τα B₂ και G₂ παράγωγα φθορίζουν πολύ πιο ισχυρά απ' ό,τι τα ακόρεστα ομόλογά τους B₁ και G₁ (Γεωργιάδου, 2009).



Εικόνα 3.2. Χημικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών.

A.3.3.2 Φυσικές ιδιότητες αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες είναι κρυσταλλικές ουσίες, ελεύθερα διαλυτές σε ελαφρά πολικούς ή μέτρια πολικούς διαλύτες, όπως στο χλωροφόρμιο, στη μεθανόλη, στο διμεθυλοσουλφοξείδιο, στην ακετόνη και στο ακετονιτρίλιο, ενώ στο νερό διαλύονται μέχρι 10-20 mg/L. Αντίθετα είναι αδιάλυτες σε μη πολικούς διαλύτες. Αυτή η χαρακτηριστική τους φυσική ιδιότητα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εκχύλισης του δείγματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης.

Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά σταθερές απουσία φωτός και κυρίως υπεριώδους ακτινοβολίας. Ένα διάλυμα αφλατοξίνης που προετοιμάζεται με χλωροφόρμιο ή βενζένιο είναι σταθερό για χρόνια, εφ' όσον διατηρηθεί στο σκοτάδι και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Γεωργιάδου, 2009).

Στον πίνακα 3.1, που ακολουθεί, συνοψίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των κυριότερων αφλατοξινών:

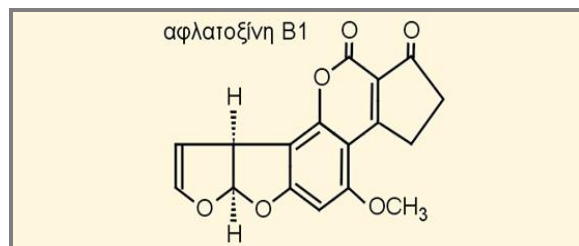
Πίνακας 3.1. Σύνοψη βασικών χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών αφλατοξινών.

Αφλατοξίνη	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος, g/mol	Σημείο τήξης, °C	Πηγές και Ιδιότητες
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,28	268-269	Παράγεται από τον <i>A. flavus</i> και τον <i>A. parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm). Θεωρείται ως η ισχυρότερη καρκινογόνος ουσία για το ήπαρ.
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,29	286-289	Παράγεται από τον <i>A. flavus</i> και τον <i>A. parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός (425 nm).
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,28	244-246	Παράγεται από τον <i>A. parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,29	237-240	Παράγεται από τον <i>A. parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός (450 nm).

M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,28	299	Μεταβολίτης της Β ₁ στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο μητρικό γάλα σε ποσότητες ng.
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,29	293	Μεταβολίτης της Β ₂ στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο γάλα (και σε γαλακτοκομικά προϊόντα) βοοειδών που τρέφονται με τροφές μολυσμένες με Β ₂ .
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,29	240	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στη Β ₁ . Κυανός φθορισμός (425 nm).
G _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346,29	190	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στη G ₁ . Πράσινος φθορισμός (450 nm).

A.3.3.3 Αφλατοξίνη Β₁

Η AFB₁, η χημική δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της οποίας απεικονίζονται στην εικόνα 3.3 και στον πίνακα 3.2 αντίστοιχα, είναι γονιδιοτοξική και μεταλλαξιογόνος ουσία και έχει χαρακτηριστεί από τον IARC (International Agency for Research on Cancer - Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο) ως το ισχυρότερο ανθρώπινο καρκινογόνο (ομάδα 1) (Faulkner, 2014). Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η καρκινογόνος δράση της είναι περίπου 1000 φορές ισχυρότερη του βενζοπυρενίου, ενός πολυκυρηνικού υδρογονάνθρακα που αποτελεί το δραστικότερο μεταλλαξιογόνο συστατικό του καπνού των τσιγάρων (ICRISAT, 2016).

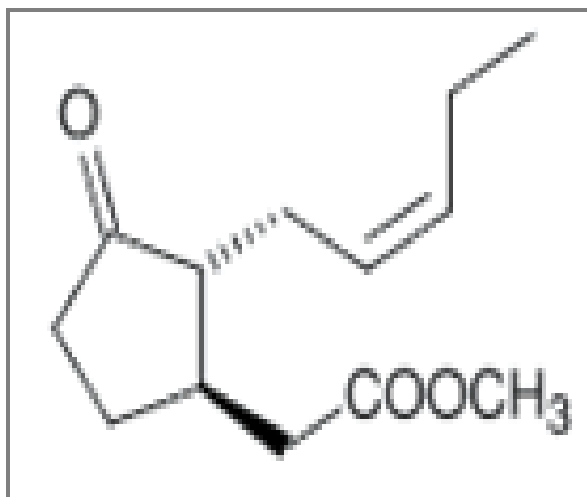


Εικόνα 3.3. Χημική δομή αφλατοξίνης Β₁.

Πίνακας 3.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες της αφλατοξίνης B₁.

Εμφάνιση	Υποκίτρινο έως κίτρινο άοσμο κρυσταλλικό στερεό
Μοριακός τύπος	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
Σχετική μοριακή μάζα	312,28 g/mol
Σημείο τήξης	268-269 °C
LD50	0,4 mg/kg
Διαλυτότητα	Ελαφρά διαλυτή στο νερό Ευδιάλυτη σε οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη, χλωροφόρμιο, ακετόνη, ακετονιτρίλιο)
Συμπληρωματικές πληροφορίες	Φωτοευαίσθητη ουσία που πρέπει να φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια στους -20 °C Τα διαλύματά της σε ακετονιτρίλιο, τολουόλιο/ακετονιτρίλιο (9+1), βενζόλιο/ακετονιτρίλιο (98+2) και μεθανόλη είναι σταθερά στους 0 °C για περισσότερο από ένα χρόνο

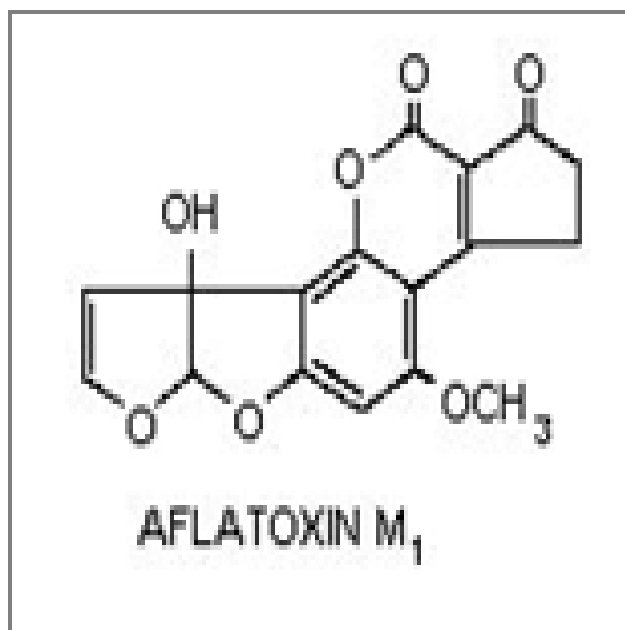
Σε μια ερευνητική συνεργασία του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων και του Εργαστηρίου Βιοχημείας ΕΚΠΑ διαπιστώθηκε ότι ένας αμυντικός παράγοντας των φυτών (μια φυτοαλεξίνη), ο ιασμωνικός μεθυλεστέρας, που παράγει το φυτό όταν υφίσταται εξωτερικές επιθέσεις (stress), όπως είναι μια προσβολή από τοξικογόνο μύκητα, άλλοτε αναστέλλει και άλλοτε διεγείρει τη βιοσύνθεση της AFB₁ σε θρεπτικό υλικό αλλά και σε ελιές (Vergopoulou, Galanopoulou, Markaki, 2001· Markaki, Velivassaki, Giannitsis, Galanopoulou, 2006). Η χημική δομή του ιασμωνικού μεθυλεστέρα απεικονίζεται στην εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.4. Χημική δομή ιασμωνικού μεθυλεστέρα.

A.3.3.4 Αφλατοξίνη M₁

Οι αφλατοξίνες είναι θερμικά σταθερές. Έτσι, μπορεί να μολύνουν τα γαλακτοκομικά και ζυμούμενα προϊόντα παρά την παστερίωση και αποστείρωση που αυτά έχουν υποστεί (Faulkner, 2014). Η αφλατοξίνη M₁, η δομή της οποίας φαίνεται στην εικόνα 3.4, είναι 4-υδροξυ αφλατοξίνη B₁ (δηλαδή υδροξυλιωμένο παράγωγο του μεταβολισμού της αφλατοξίνης B₁) (Cornell University, 2015). Η φυσική εμφάνιση της αφλατοξίνης M₁ στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αυξάνεται ολοένα και περισσότερο. Μια περίληψη των παγκόσμιων δεδομένων που συγκεντρώθηκαν από το 1980 σχετικά με την εμφάνιση της αφλατοξίνης M₁ στο γάλα των ανθρώπων και των ζώων, στο τυρί και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα έδειξαν ότι τα επίπεδα μόλυνσης δε φαίνεται να είναι σοβαρός κίνδυνος για την υγεία, αλλά τα προγράμματα παρακολούθησης εξακολουθούν να παραμένουν η κύρια στρατηγική για παροχή προστασίας του καταναλωτή (WHO, 1998). Ακόμα κι αν η AFM₁ είναι λιγότερο τοξική απ' ό τι η AFB₁, ταξινομείται από το IARC ως πιθανό καρκινογόνο Ομάδας 2B για τον άνθρωπο (Faulkner, 2014).



Εικόνα 3.5. Χημική δομή αφλατοξίνης M₁.

A.3.4 Χημικές αντιδράσεις αφλατοξινών

Η επίδραση διάφορων χημικών και φυσικών παραγόντων στις αφλατοξίνες έχει εξετασθεί αρκετά ώστε να διαπιστωθεί το κατά πόσο είναι δυνατόν να απαλλαχθούν οι τροφές από αυτές με κάποια χημική ή φυσική διαδικασία. Η επίδραση των παραγόντων αυτών έχει ως εξής (Γεωργιάδου, 2009):

Αλκάλια

Καταστρέφουν τις αφλατοξίνες με υδρόλυση του λακτονικού τους δακτυλίου. Ωστόσο φαίνεται ότι η υδρόλυση αυτή είναι αντιστρεπτή, αφού έχει αποδειχθεί ότι συντελείται επανακυκλοποίηση (επανασχηματισμός λακτονικού δακτυλίου) κατόπιν οξίνισης (παρουσία οξέος). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (100 °C) τα αλκάλια αποσπών τη μεθοξυλική ομάδα (-OCH₃) από τον αρωματικό δακτύλιο (ICRISAT, 2016). Παρόμοια σειρά αντιδράσεων θεωρείται ότι πραγματοποιείται με την αμμωνία και διάφορες αμίνες (Γεωργιάδου, 2009).

Οξέα

Ισχυρά ανόργανα οξέα μετατρέπουν τις αφλατοξίνες B₁ και G₁ στις B_{2a} και G_{2a}, αντίστοιχα, με προσθήκη ύδατος στο διπλό δεσμό του ακραίου φουρανικού δακτυλίου

(προσθήκη καταλυόμενη από οξύ) (ICRISAT, 2016). Παρουσία οξικού ανυδρίτη και υδροχλωρικού οξέος η αντίδραση προχωρεί περαιτέρω δίνοντας αιθόξυ-παράγωγα. Παρόμοιες ενώσεις προσθήκης των AFB₁ και AFG₁ σχηματίζονται με μυρμηκικό οξυ-θειονυλοχλωρίδιο, οξικό οξυ-θειονυλοχλωρίδιο και τρι-φθοροοξικό οξύ (Γεωργιάδου, 2009).

Οξειδωτικά μέσα

Οξειδωτικά μέσα, όπως υποχλωριώδες νάτριο, υπερμαγγανικό κάλιο, χλώριο, υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπερβορικό νάτριο αντιδρούν με τις αφλατοξίνες και αλλοιώνουν το μόριό τους, γεγονός που φαίνεται από την εξαφάνιση του χαρακτηριστικού φθορισμού τους. Τα προϊόντα οξείδωσης δεν έχουν ταυτοποιηθεί συστηματικά (ICRISAT, 2016).

Αναγωγικά μέσα

Με υδρογόνωση οι αφλατοξίνες B₁ και G₁ μετατρέπονται στις αφλατοξίνες B₂ και G₂, αντίστοιχα. Με ισχυρότερα αναγωγικά μέσα, όπως το τετραϋδροβορικό νάτριο (NaBH₄), ανοίγει ο λακτονικός δακτύλιος, ακολουθείται αναγωγή της οξικής ομάδας και έπειτα, ανάγεται η κετονική ομάδα (-C=O-) του κυκλοπεντενικού δακτυλίου των αφλατοξινών B₁ και B₂ (προς -CH₂-) παρέχοντας τις αφλατοξινές RB₁ και RB₂ (Reduced B₁, B₂) (ICRISAT, 2016).

Θερμότητα

Οι αφλατοξίνες σε ξηρή μορφή παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα στη θέρμανση έως το σημείο τήξεως. Αντίθετα, σε υγρή μορφή και σε υψηλές θερμοκρασίες σύντομα καταστρέφονται, πιθανώς με υδρόλυση της λακτονικής ομάδας και στη συνέχεια με αποκαρβοξυλίωση (ICRISAT, 2016). Τέτοιου είδους καταστροφή των αφλατοξινών μπορεί να συμβεί στους ελαιώδεις καρπούς, στα ψημένα φιστίκια ή σε υδατικά διαλύματα με pH=7. Παρόλο που τα προϊόντα της αντίδρασης δεν έχουν εξεταστεί λεπτομερώς φαίνεται ότι αυτού του είδους η μεταχείριση έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου της λακτόνης με πιθανή αποκαρβοξυλίωση σε υψηλές θερμοκρασίες (Γεωργιάδου, 2009).

A.3.5 Επιπτώσεις στα ζώα και τους ανθρώπους

Οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ο πιο σημαντικός χρόνιος παράγοντας διατροφικού κινδύνου, υψηλότερος από τα συνθετικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι αφλατοξίνες έχουν συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες στα ζώα και στους ανθρώπους (Cornell University, 2015). Οι τοξικές συνέπειες (αφλατοξίκωση) της κατάποσης των αφλατοξινών σε ανθρώπους και ζώα εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων πρόσληψης, της διάρκειας έκθεσης, της ηλικίας, των μηχανισμών μεταβολισμού και άμυνας και της ευαισθησίας του κάθε οργανισμού (Faulkner, 2014).

A.3.5.1 Αφλατοξίκωση

Η «αφλατοξίκωση» είναι το αποτέλεσμα μόλυνσης από κατάποση μεσαίας έως υψηλής δόσης αφλατοξίνης μέσω της τροφής. Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιπτώσεις αφλατοξίκωσης. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται λόγος για έντονης μορφής ενδοτοξίνωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα απ' ευθείας βλάβη του ήπατος με επακόλουθη ασθένεια ή θάνατο, ενώ στη δεύτερη περίπτωση γίνεται λόγος για χρόνια έκθεση με εκδήλωση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων. Ανάλογα με τα επίπεδα και τη διάρκεια της έκθεσης στις αφλατοξίνες παρατηρούνται οι εξής συνέπειες στην υγεία (Γεωργιάδου, 2009):

A) οι υψηλές δόσεις έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθενειών οξείας μορφής και θάνατο, συνήθως λόγω κίρρωσης του ήπατος

B) η χρόνια έκθεση οδηγεί κατά κύριο λόγο στην υποβάθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, επιφέρει ανορεξία και μειώνει την αναπαραγωγικότητα

Γ) κάθε είδους έκθεση δρα αθροιστικά όσον αφορά τον κίνδυνο για την εκδήλωση καρκίνου

Η ευαισθησία του κάθε ατόμου στην αφλατοξίκωση εξαρτάται από τη δόση της αφλατοξίνης, τη διάρκεια της έκθεσης, την ικανότητα του κάθε οργανισμού να αποτοξινώσει τις αφλατοξίνες μέσω βιοχημικών διεργασιών, την ηλικία (οι νέοι άνθρωποι είναι πιο ευαίσθητοι από τους ηλικιωμένους), το φύλο (τα επίπεδα της τεστοστερόνης), το βάρος, τη διατροφή, την ανοσολογική κατάσταση και την έκθεση σε λοιμώδεις παράγοντες, όπως ιογενής ηπατίτιδα ή παρασιτική μόλυνση (Faulkner, 2014).

Τυπικά συμπτώματα αφλατοξίκωσης σε ανθρώπους είναι ο πολλαπλασιασμός του χοληφόρου σωλήνα, η κεντρολοβιώδης νέκρωση, η λιπώδης διήθηση του ήπατος, οι γενικότερες ηπατικές αλλοιώσεις και τα ηπατώματα (Γεωργιάδου, 2009). Κλινικά σημάδια αφλατοξίκωσης σε ζώα περιλαμβάνουν γαστρεντερική δυσλειτουργία, μειωμένη αναπαραγωγικότητα, αναιμία και ίκτερο (Cornell University, 2015).

A.3.5.1.1 Οξεία τοξικότητα

Η οξεία τοξικότητα προκαλείται από την απορρόφηση μέτριας έως μεγάλης ποσότητας αφλατοξινών. Ως φαινόμενο παρατηρείται τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Το συκώτι αποτελεί το βασικό όργανο στόχο. Έχουν παρατηρηθεί, επίσης, επιπτώσεις στους πνεύμονες, στο μυοκάρδιο, στα νεφρά και στον εγκέφαλο (Γεωργιάδου, 2009). Περιπτώσεις οξείας τοξικότητας σε ανθρώπους μετά από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων έχουν αναφερθεί από πολλά μέρη του κόσμου, με περισσότερα κρούσματα σε Ταϊβάν, Ουγκαντα, Κένυα, Ινδία, Μαλαισία και Ταϋλάνδη. Γενικά, το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από έμετο, κοιλιακό πόνο, πνευμονικό οίδημα, σπασμούς, αιμορραγία, κόμα και θάνατο (Cornell University, 2015).

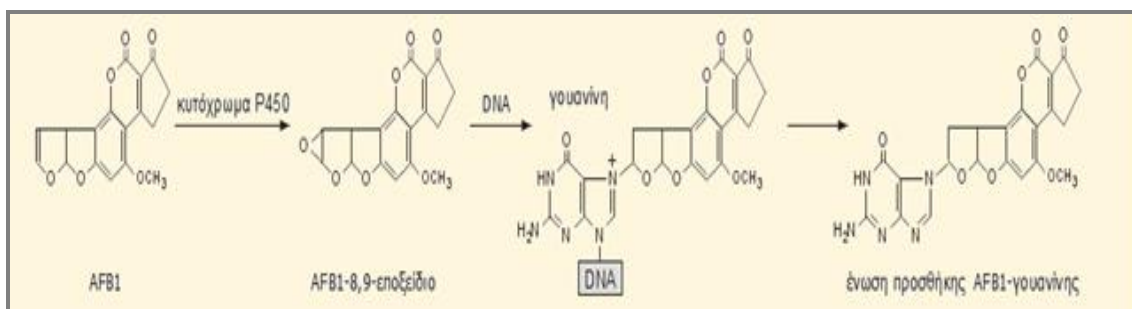
A.3.5.1.2 Χρόνια τοξικότητα

Η χρόνια τοξικότητα οφείλεται σε μακράς διάρκειας έκθεση σε χαμηλές έως μέτριου μεγέθους ποσότητες αφλατοξινών. Τα ζώα εξαιτίας της μικρής διάρκειας ζωής δεν παρουσιάζουν χρόνια τοξικότητα. Η χρόνια τοξικότητα στον άνθρωπο εκδηλώνεται με το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, την ανοσοκαταστολή, την ηπατίτιδα Β, τον ίκτερο, την κίρρωση του ήπατος και άλλες ήπιες, αργής εξέλιξης παθολογικές καταστάσεις.

Παράλληλα θεωρείται ότι η παρατεταμένη έκθεση στις αφλατοξίνες εμπλέκεται στην εμφάνιση του συνδρόμου Reye's με συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας και εκφυλισμού των λιπών στα σπλάγχνα των παιδιών, οδηγεί στην ασθένεια γνωστή ως «Ινδική παιδική κίρρωση» (cirrhosis of Indian childhood), σχετίζεται με το φαινόμενο Kwashiorkor, επιφέρει μείωση στους ρυθμούς ανάπτυξης και αναπαραγωγιμότητας, προκαλεί δυσφορία και ανοσοκαταστολή (Georgiadou, 2009).

A.3.5.2 Μηχανισμός τοξικής δράσης αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες στον οργανισμό με την επίδραση των ενζύμων της ομάδας του κυτοχρώματος P450 μεταβολίζονται στο ήπαρ προς διάφορα προϊόντα μεταξύ των οποίων βρίσκεται και μια εποξειδική ένωση. Ο μεταβολίτης αυτός σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με τη γουανίνη (G) του DNA και του RNA (εικόνα 3.5), γεγονός που οδηγεί σε αποπουρίνωση και θραύση της αλυσίδας των νουκλεϊνικών οξέων με αποτέλεσμα να διακοπεί η σύνθεση απαραίτητων πρωτεϊνών και DNA σε ιστούς ζωτικών οργάνων, όπως στο ήπαρ, στα έντερα και στον μυελό των οστών (ICRISAT, 2016).



Εικόνα 3.6. Σχηματισμός ένωσης προσθήκης αφλατοξίνης B₁ – γουανίνης

(Egner et al., 2001 · Smela, Currier, Bailey, Essigmann, 2001).

Η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από ηπατικές νόσους. Έρευνες έδειξαν ότι κατά τη μόλυνση με τον ιό ηπατίτιδας (Hepatitis B Virus - HBV), η έκθεση σε αφλατοξίνες αυξάνει τον κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HepatoCellular Carcinoma - HCC). Ο ιός HBV καθιστά δύσκολο τον μεταβολισμό των αφλατοξινών από τα ηπατοκύτταρα και έτσι, η ένωση προσθήκης αφλατοξίνης M₁-DNA παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο

ήπαρ αυξάνοντας την πιθανότητα βλάβης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Θεωρείται ότι ο εμβολιασμός κατά της ηπατίτιδας των κατοίκων περιοχών της Ασίας και της Αφρικής, όπου ενδημεί ο ιός HBV, μειώνει σημαντικά τις ηπατικές βλάβες σε πληθυσμούς που συχνά τρέφονται με μουχλιασμένα τρόφιμα (Williams, Phillips, Jolly, Stiles, Jolly, Aggarwal, 2004).

Ο προσδιορισμός των αφλατοξινών στον άνθρωπο γίνεται με δύο τεχνικές. Στην πρώτη μετρείται η ένωση προσθήκης AFM₁-γουανίνης στα ούρα. Η παρουσία αυτού του προϊόντος μεταβολισμού δείχνει έκθεση σε αφλατοξίνες κατά τις προηγούμενες 24 ώρες. Παρόλα αυτά δεν είναι αρκετά καλή μέθοδος λόγω της διάσπασης της ένωσης προσθήκης με το χρόνο. Η δεύτερη τεχνική στηρίζεται στον προσδιορισμό της ένωσης προσθήκης AFB₁-αλβουμίνης στο πλάσμα του αίματος. Ο προσδιορισμός είναι ακριβέστερος και είναι θετικός κατά 90% στα θετικά δείγματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μακροχρόνιες εκθέσεις, αφού παραμένει θετικός για δύο με τρεις μήνες μετά την έκθεση σε αφλατοξίνες.

A.3.6 Οικονομικές επιπτώσεις αφλατοξινών

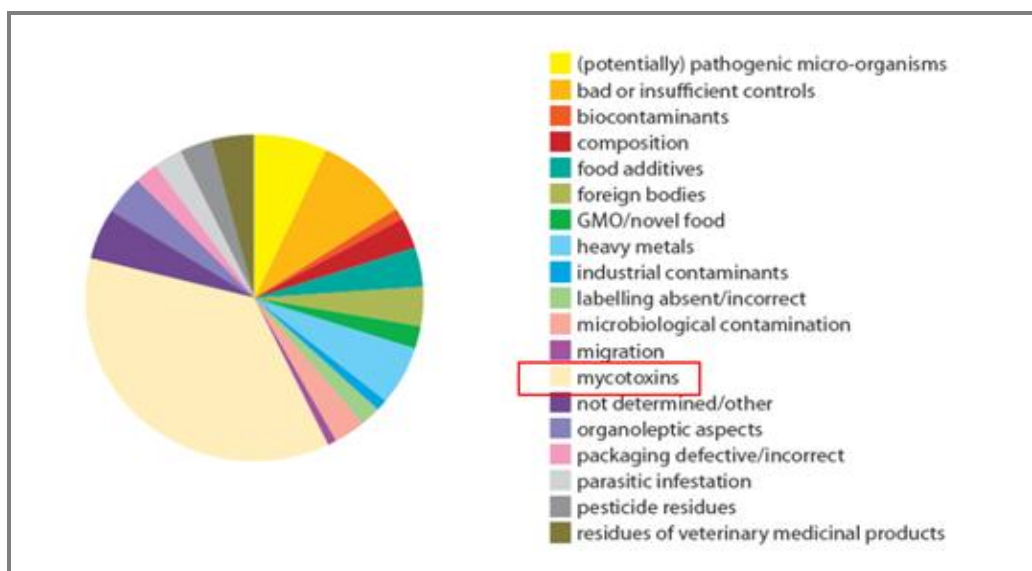
A.3.6.1 Συχνότητα παρουσίας αφλατοξινών

Η συχνότητα παρουσίας αφλατοξινών στα εγχώρια και τα εισαγόμενα τρόφιμα στην Ευρωπαϊκή Ένωση μπορεί να αξιολογηθεί με χρήση των στοιχείων που υποβάλλονται από το RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Οι μυκοτοξίνες, και ιδιαίτερα οι αφλατοξίνες, είναι η πιο επικίνδυνη κατηγορία χημικών κινδύνων με το μεγαλύτερο αριθμό ειδοποιήσεων RASFF στο εσωτερικό της ΕΕ την τελευταία δεκαετία (πίνακας 3.3 και εικόνα 3.5), απεικονίζοντας ένα συμπληρωματικό κόστος στην παραγωγή τροφίμων και απώλεια του εισοδήματος παραγωγών και διανομέων (Faulkner, 2014).

Πίνακας 3.3. Αριθμός προειδοποιήσεων για επικίνδυνο φορτίο λόγω παρουσίας μυκοτοξινών, από το 2004 έως το 2013 (στοιχεία από το RASFF).

Κίνδυνος	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Aflatoxins	839	946	801	705	902	638	649	585	484	341

Deoxynivalenol (DON)				10	4	3	2	11	4	8
Fumonisin	14	2	15	9	2	1	3	4	4	7
Ochratoxin A	27	42	54	30	20	27	34	35	32	54
Patulin		6	7		3					
Zearalenone			1	6	2					
Total mycotoxins	880	996	878	760	933	669	688	635	528	410



Εικόνα 3.7. Απορρίψεις φορτίων με τρόφιμα, στα σημεία εισόδου της ΕΕ, ανά κατηγορία κινδύνου (στοιχεία από το RASFF, 2009).

A.3.6.2 Παρουσία αφλατοξινών βάσει των προϊόντων

Η παρουσία αφλατοξινών αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα στα δημητριακά, τα οποία διακρίνονται στα σιτηρά (καλαμπόκι, ρύζι, σιτάρι, κεχρί, σόργο, κριθάρι, αραβόσιτο) και τα οσπριοειδή (φασόλια). Πρόβλημα ύπαρξης αφλατοξινών αντιμετωπίζουν και οι ελαιούχοι σπόροι (σόγια, ηλιόσπορος, βαμβάκι), το αλεύρι σίτου, οι ξηροί καρποί (αραχίδα, κελυφωτά φιστίκια, αμύγδαλα, καρύδια, φουντούκια), τα αποξηραμένα φρούτα (σταφίδες), τα μπαχαρικά (τσίλι, μαύρο πιπέρι, κορίαντρο,

τζίντζερ, κουρκούμη, πάπρικα, μοσχοκάρυδο), οι καρποί δέντρων (σύκα), τα γαλακτοκομικά προϊόντα (αυγά, τυρί, γάλα, γιαούρτι), η μύρα και άλλα προϊόντα τροφίμων (Faulkner, 2014). Ο αριθμός των ειδοποιήσεων RASFF για τα μολυσμένα με μυκοτοξίνες προϊόντα φαίνεται στον πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Αριθμός προειδοποιήσεων για τις μυκοτοξίνες ανά κατηγορία προϊόντος (στοιχεία RASFF, 2012).

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

A.3.6.3 Παρουσία αφλατοξινών βάσει της γεωγραφικής περιοχής

Ο χαρακτήρας του προβλήματος της αφλατοξίνης διαφέρει ανά περιοχή (Faulkner, 2014). Η εμφάνιση των αφλατοξινών επηρεάζεται από ορισμένους περιβαλλοντικούς

παράγοντες, γι' αυτό η έκταση της μόλυνσης ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική θέση, τις γεωργικές και αγρονομικές πρακτικές και την ευαισθησία των εμπορευμάτων στην εισβολή των μυκήτων κατά τις περιόδους προ της συγκομιδής, αποθήκευσης και επεξεργασίας (Cornell University, 2015). Η έκθεση σε αφλατοξίνες διαφέρει μεταξύ των χωρών κυρίως λόγω των διαφορετικών διατροφικών συνθηκών. Ωστόσο, σε μεταβλητές περιβαλλοντικές συνθήκες, η μόλυνση από αφλατοξίνες μπορεί να διαφέρει στην ίδια τοποθεσία από το ένα έτος στο άλλο (Faulkner, 2014). Η μόλυνση των ξηρών καρπών με αφλατοξίνη είναι ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τόσο οι χώρες παραγωγής όσο και οι χώρες εισαγωγής του προϊόντος. Μερικά παραδείγματα μόλυνσης τροφίμων από αφλατοξίνες σε διαφορετικές χώρες φαίνονται στον πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Μόλυνση τροφίμων από αφλατοξίνες σε διαφορετικές χώρες (Faulkner, 2014).

Countries	Commodity	Contamination rate
Australia	Peanut	381 µg/kg
	Straw/silage	17 µg/kg
Bangladesh	Maize	33 µg/kg
	Groundnut	65 µg/kg
Botswana	Peanut	To 64 µg/kg
	Peanut butter	0,3 – 23 µg/kg
Brazil	Corn	0,2 – 129 ppb
	Peanuts and products	43-1099 ppb
China	Corn	9 – 1396 ppb
Egypt	Hazelnut	25 – 175 ppb
	Soybean	5-35 ppb
	Walnut	15-25 ppb
Gambia	Ground nut source	162 ppb
Ghana	Kernels	5,7 – 22168

India	Pistachio nuts	15 – 259 µg/kg
	Dry slices of quince	96 – 8164 µg/kg
	Maize	>30 ppb
	Peanut	275 µg/kg
Malaysia	Wheat flour	25,6 – 289 µg/kg
	Peanut	1 – 378 µg/kg
	Maize	106 µg/kg
Nepal	Peanut, Corn flakes	>30 ppb
	Peanut butter, Vegetable oil	>30 ppb
Nigeria	Yam chips	4 – 186 µg/kg
	Pre-harvest maize	3 – 138 µg/kg
	Shelled mellon	5 – 20 µg/kg
	Corn and corn based snacks	25 - 770 µg/kg
Philippines	Rice bran and rice hull	0,27 – 11 µg/kg
	Corn	130 µg/kg
Senegal	Peanut	40 ppb
Sudan	Peanut butter and peanut	87,4 – 197,3 µg/kg
Thailand	Corn	73 µg/kg
	Peanut oil	102 µg/kg
Turkey	Red pepper	1,1 – 97,5 ppb

Λόγω του ότι ο αριθμός των προϊόντων τα οποία είναι δυνατόν να μολυνθούν με αφλατοξίνες είναι μεγάλος, η ζημιά εκτιμάται σε πολλά δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο (Maragos, 2006). Εκθέσεις από την αυστραλιανή βιομηχανία φιστικιού έδειξαν ότι, από την ετήσια παραγωγή των 40.000-50.000 τόνων με ετήσια ακαθάριστη αξία 40 εκατομμύρια δολάρια, οι απώλειες που οφείλονται σε αφλατοξίνες είναι 10% της σοδειάς σε μια καλή σεζόν, ενώ σε μία κακή σεζόν

περισσότερο από το 50% των φορτίων που λαμβάνονται περιέχει απαράδεκτα επίπεδα αφλατοξίνης (WHO, 1998). Επίσης, στις ΗΠΑ, οι μολύνσεις των γεωργικών προϊόντων με αφλατοξίνες κοστίζουν ετησίως στους παραγωγούς περίπου 100 εκατομμύρια δολάρια, ενώ μόνο από τις αφλατοξίνες στα αράπικα φιστίκια, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις ΗΠΑ για την παρασκευή φιστικοβούτυρου, το ετήσιο κόστος είναι περίπου 26 εκατομμύρια δολάρια (ICRISAT, 2016).

A.3.7 Νομοθεσία για τις αφλατοξίνες

Η εκτίμηση του κινδύνου κατανάλωσης μιας ουσίας βασίζεται στη σύγκριση του επιπέδου της ουσίας το οποίο δεν έχει επιπτώσεις στον οργανισμό (με βάση την αξιολόγηση τοξικολογικών δεδομένων) με τα εκτιμώμενα επίπεδα έκθεσης. Στην περίπτωση των αφλατοξινών, ωστόσο, που έχουν ταξινομηθεί από τον IARC ως το ισχυρότερο καρκινογόνο για τον άνθρωπο (ομάδα 1), αυτή η προσέγγιση δεν μπορεί να ακολουθηθεί λόγω του ότι το κρίσιμο αποτέλεσμα είναι η καρκινογένεση και δε θεωρείται ότι υπάρχει κατώτατο όριο ούτε μπορεί να οριστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (Acceptable Daily Intake - ADI). Δεν μπορούν να καθοριστούν όρια συγκέντρωσης χωρίς επιπτώσεις για τα γονιδιοτοξικά καρκινογόνα. Κάθε μικρή δόση θα έχει αναλογικά μικρή πιθανότητα επίπτωσης. Η έκθεση του πληθυσμού σε κάποιο επίπεδο αφλατοξινών έχει γίνει ανεκτή, αφού αυτές κατατάσσονται από την Ευρωπαϊκή νομοθεσία στους φυσικούς ρυπαντές τροφίμων (Καν. 1881/2006 τροποποίηση Καν. 165/2010) (Faulkner, 2014).

Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις, καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus* και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι αφλατοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Γεωργιάδου, 2009). Επομένως, με σκοπό τη διαφύλαξη της υγείας των καταναλωτών, συνιστάται το επίπεδο των προσμείξεων στα τρόφιμα να μειωθεί στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο, έτσι ώστε να είναι ALARA (As Low As Reasonably Achievable) για τον καθορισμό μέγιστων αποδεκτών ποσοτήτων αφλατοξινών στα τρόφιμα (Faulkner, 2014).

Η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των αφλατοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων συγκεντρώσεων

απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντων, όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνω με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές.

Για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλα σώματα. Μία περίληψη για την τοξικολογική εκτίμηση των αφλατοξινών με αναφορά στην επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον πραγματοποιείται με τη συνεργασία μεταξύ των ακόλουθων οργανισμών (Γεωργιάδου, 2009):

- Διεθνές Πρόγραμμα για τη Χημική Ασφάλεια
(International Programme on Chemical Safety – IPCS)
- Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου
(International Agency on Research on Cancer – IARC)
- Κοινή FAO/WHO Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων
(Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants – JECFA)

Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα (Scientific Committee on Food - SCF). Επιπρόσθετα, αρκετές ομάδες εργασίας και ειδικές επιτροπές με εξουσιοδότηση από όλα τα κράτη μέλη προετοιμάζουν τις προτάσεις (Γεωργιάδου, 2009).

A.3.7.1 Ευρωπαϊκή νομοθεσία

Η έκθεση σε αφλατοξίνες δεν αποτελεί πρόβλημα μόνο για τις αγροτικές κοινότητες των αναπτυσσόμενων χωρών, αλλά μπορεί, επίσης, να είναι ένα πρόβλημα για τις πλούσιες χώρες, αν τους λείπουν τα νομοθετικά μέτρα για τον έλεγχο των επιπέδων αφλατοξινών στα τρόφιμα (Abdulkadar, Al-Ali, Al-Jedah, 2000).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τα μέγιστα επίπεδα αφλατοξινών B₁, M₁, και για το σύνολο των αφλατοξινών B₁, B₂, G₁ και G₂ στα τρόφιμα καθορίζονται στον Κανονισμό (EC) n° 1881/2006, όπως τροποποιήθηκε από τον Κανονισμό (EU) n° 165/2010 και τον

κανονισμό (ΕΥ) n° 1058/2012. Η μέγιστη τιμή που θεσπίστηκε το 2010 από την Ευρωπαϊκή Ένωση για κελυφωτά φιστίκια που προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα ήταν 8,0 µg/kg για την B₁ και 10,0 µg/kg για το άθροισμα των B₁, B₂, G₁ και G₂. Από την άλλη πλευρά, η μόλυνση από αφλατοξίνες στις ζωοτροφές ρυθμίζεται από τον Κανονισμό n° 574/2011 της 16ης Ιουνίου 2011 σχετικά με τις ανεπιθύμητες ουσίες στις ζωοτροφές. Ο εν λόγω κανονισμός ορίζει ότι η μέγιστη περιεκτικότητα AFB₁, που σχετίζεται με ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12%, κυμαίνεται από 5 έως 20 µg/kg (Faulkner, 2014).

Ωστόσο, η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες σε διάφορα τρόφιμα. Έτσι, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερόμενες σε αφλατοξίνες για συγκεκριμένα προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων. Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις αφλατοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανομένης υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που προαναφέρθηκαν (Γεωργιάδου, 2009).

Τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα, το 2010, για κελυφωτά φιστίκια Αιγίνης που προορίζονται να υποστούν κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από κάθε κατανάλωση από τον άνθρωπο ή χρήση ως συστατικά τροφίμων ήταν 12,0 µg/kg για τη B₁ και 15,0 µg/kg για το άθροισμα των B₁, B₂, G₁ και G₂.

Στις παρτίδες που έχουν ανιχνευθεί αφλατοξίνες, μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία, θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης των τροφίμων με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από αφλατοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνση των αφλατοξινών (Γεωργιάδου, 2009). Ο πίνακας 3.6 παρουσιάζει τα μέγιστα όρια αφλατοξινών για κάθε είδος ξηρού καρπού που θέτει η ΕΕ (Harris, 2013).

Πίνακας 3.6. Μέγιστα όρια αφλατοξινών σε ξηρούς καρπούς (Harris, 2013).

Country/region	Maximum aflatoxin levels (µg/kg)		
	Nuts	Sum of B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	AF B ₁
Europe	<i>To be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs</i>		
	Ground nuts (peanuts) and other oilseeds with the exception of those for crushing for refined vegetable oil production	15	8
	Hazelnuts and Brazil nuts	15	12
	Almonds and pistachios		
	Other tree nuts	10	5
	<i>Intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs</i>		
	Almonds and pistachios	10	8
	Hazelnuts and Brazil nuts	10	5
	Groundnuts (peanuts) and other oilseeds and processed products, with the exception of crude vegetable oils destined for refining or refined vegetable oils	4	
USA	Brasil nuts, peanuts, peanut products, pistachios	20	

	Peanut products for animal feeds	20 to 300	
Canada	Nuts and nut products	15	
China	Peanuts and peanut products		20
Hong Kong	Peanuts and peanut products	20	20
India	Nuts and nut products	30	
Indonesia	Nuts and nut products	35	20
	Peanuts and peanut products	20	15

A.3.7.2 Παγκόσμια νομοθεσία

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία αφλατοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει σε εντατικούς ελέγχους όσον αφορά την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και την καθιέρωση ορίων, όπως και στην ΕΕ. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις αφλατοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως. Στις ανεπτυγμένες χώρες του κόσμου, όπου η διάρκεια ζωής έχει αυξηθεί σε συνδυασμό με τη βελτίωση της ποιότητας ζωής, παρατηρείται μεγαλύτερη προσπάθεια όσον αφορά τον έλεγχο των αφλατοξινών. Αντίθετα, στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναπτυσσόμενων χωρών, κύριο μέλημα αποτελεί η καταπολέμηση της φτώχειας και των ασθενειών με αποτέλεσμα να μην έχουν καθιερωθεί, ευρέως, κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες γενικότερα ή να μην είναι το ίδιο αυστηροί.

Εντούτοις, αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών φορέων παρατηρούνται διαφορετικά όρια ανάμεσα στα διάφορα κράτη (Γεωργιάδου, 2009). Το 1995, οι παρτίδες φιστικιού δηλώνονταν κατάλληλες ή ακατάλληλες για ανθρώπινη κατανάλωση με βάση το επιβεβλημένο από την κυβέρνηση

ανώτατο όριο των 20 µg/kg για συνολικές αφλατοξίνες (B_1, B_2, G_1, G_2) (Abdulkadar, Al-Ali, Al-Jedah, 2000). Το 1999, σε μια προσπάθεια να εναρμονίσει τις τρέχουσες τιμές ανοχής για την αφλατοξίνη που υπήρχαν σε διάφορες χώρες, η ομάδα έρευνας για τις μυκοτοξίνες των WHO, FAO και CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) πρότεινε ανώτατο όριο 15 µg/kg για τις συνολικές αφλατοξίνες (B_1, B_2, G_1, G_2) στα αράπικα φιστίκια (WHO, 1998). Το 2004, σύμφωνα με τον FAO, το φάσμα των ορίων της AFB_1 και των συνολικών αφλατοξινών (B_1, B_2, G_1, G_2) σε όλο τον κόσμο ήταν 1-20 ng/g προϊόντος και 0-35 ng/g προϊόντος, αντίστοιχα (Mahmoudi, Norian, Katirae, Pajohi-Alamoti, Emami, 2014).

Πλέον, στις ΗΠΑ, σύμφωνα με τον FDA (Food and Drug Administration – Οργανισμός Διαχείρισης Τροφίμων και Ποτών), το μέγιστο επιτρεπτό όριο για την παρουσία αφλατοξινών ανέρχεται στα 20 µg/kg για όλα τα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, για σιτηρά και καλαμπόκι που προορίζονται για ζωοτροφές σε νεαρά ζώα και ιδιαίτερα κοτόπουλα, ενώ το όριο μπορεί να φθάσει τα 200-300 µg/kg για τις αφλατοξίνες στις ζωοτροφές που προορίζονται για μεγάλα ζώα (αγελάδες, χοίρους) (ICRISAT, 2016). Για τα κελυφωτά φιστίκια στα κράτη της ΕΕ το μέγιστο επιτρεπτό όριο είναι τα 8µg/kg για την AFB_1 και 10 µg/kg για το άθροισμα των αφλατοξινών, όπως προαναφέρθηκε. Αυτό σημαίνει ότι στην ΕΕ τα όρια είναι δυο φορές χαμηλότερα απ’ ότι στις Η.Π.Α. Παράλληλα ο αρμόδιος αμερικανικός φορέας έχει θέσει ως όριο για την AFM_1 στο γάλα και τα συναφή προϊόντα την τιμή 0.5 µg/L, ενώ στην ΕΕ η αντίστοιχη τιμή είναι 0.05 µg/L (Γεωργιάδου, 2009). Το προτεινόμενο από τον Codex όριο των 0,05 µg/L, που επικρατεί στις περισσότερες χώρες, συνάντησε κριτική, επειδή τόσο χαμηλό επίπεδο αυξάνει το κόστος της ανάλυσης από τη μία πλευρά, ενώ οδηγεί σε σοβαρές διαταραχές το διεθνές εμπόριο των ζωοτροφών (WHO, 1998). Στην πράξη, τα διαφορετικά όρια, που έχουν θεσπιστεί στις διάφορες χώρες του κόσμου, προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, εις βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών (Γεωργιάδου, 2009). Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια για το σύνολο των αφλατοξινών και την αφλατοξίνη M_1 σε τρόφιμα και ζωοτροφές σε παγκόσμιο επίπεδο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.7).

Πίνακας 3.7. Μέγιστα επιτρεπτά όρια για το σύνολο των αφλατοξινών και την αφλατοξίνη M₁ σε τρόφιμα και ζωοτροφές σε παγκόσμιο επίπεδο. Όπου GCC: Saudi Arabia, United Arab Emirates, Kuwait, Bahrain, Oman, Yemen και Qatar (Γεωργιάδου, 2009)

Country	Food	Sum of B1+B2+G1+G2 (µg/kg)	M1 (µg/kg)
Australia/New Zealand	Peanuts Tree nuts	15	-
Canada	Nut and nut products	15	
	Animal feeding stuffs	20	-
Codex, GCC, Nigeria	Peanuts, almonds, shelled Brazil nuts, hazelnuts, pistachios intended for further processing	15	-
Nigeria	Almonds, hazelnuts, pistachios, shelled Brazil nuts, «ready to eat»	10	-
USA	Brazil nuts, peanuts and peanut products, pistachio products	20	-
	Dairy products	-	0,5
	Feedstuff ingredients	20	
	Cottonseed meal intended for beef cattle, swine or mature poultry	300	-
	Corn and peanut products intended for breeding beef cattle, swine or mature poultry	100	-
	Corn and peanut products intended for finishing swine of 100 lbs or more	200	-
	Corn and peanut products intended	300	-

	for finishing beef cattle		
South Africa	Peanuts	15	-
	Milk	-	0,05
Codex, GCC, Kenya, USA	Milk	-	0,5
Argentina	Milk, liquid including milk used in the manufacture of milk and milk products and reconstituted milk	-	0,5
	Milk powder		5
Mexico	Milk	-	0,05

A.4 Η ΦΙΣΤΙΚΙΑ

A.4.1 Ιστορικά στοιχεία φιστικιάς

Η φιστικιά *Pistacia vera* είναι το μόνο είδος από τα 11 του γένους *Pistacia* που παράγει βρώσιμους καρπούς με κέλυφος (Ferguson, Polito, Kallsen, 2005). Το είδος *Pistacia vera* φύεται άγριο στην Κεντρική Ασία και τη Μέση Ανατολή καλύπτοντας τεράστιες ορεινές και πεδινές εκτάσεις (Mahmoudi et al., 2014). Η περιοχή στην οποία αναπτύσσεται αρχίζει από το Ιράν και το Αφγανιστάν και επεκτείνεται μέσω Τουρκμενιστάν, Ουζμπεκιστάν, Τατζικιστάν και Κιργιστάν μέχρι τη δυτική όχθη της λίμνης Ισσίκ-Κουλ. Καλλιεργείται πλέον σε διάφορα μέρη του κόσμου που χαρακτηρίζονται από ζεστό και ξηρό κλίμα (Γεωργιάδου, 2009), όπως την Κίνα, τη Συρία, το Λίβανο, την Παλαιστίνη, την Ινδία, την Τουρκία, τη νότια Ευρώπη (Ελλάδα), τις ξηροθερμικές χώρες της Αφρικής (Τυνησία) και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, στη δυτική ακτή (Καλιφόρνια). Με βάση τις στατιστικές του FAO, το Ιράν είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός φιστικιού στον κόσμο. Το 2004, παρήχθησαν στο Ιράν περίπου 190.000 Mt φιστικιού, οι οποίοι ανέρχονται σε 63,33% της παραγωγής φιστικιού στον κόσμο (Mahmoudi et al., 2014).

Η πρώτη αναφορά στη φιστικιά στην αρχαία ελληνική γραμματεία θεωρείται ότι έγινε τον 4^ο και 3^ο αιώνα π.Χ από το Θεόφραστο (Περί Φυτών Ιστορία, IV, 4,7). Ο Θεόφραστος γράφει ότι στην Ινδική και στη Βακτρία (Αφγανιστάν) φύεται ένα δένδρο όμοιο με την τέρμινθον (τερέβινθον) ως προς τα φύλλα και τους κλάδους, διαφορετικό, όμως, ως προς τον καρπό. Οι καρποί μοιάζουν με τα αμύγδαλα, αλλά είναι μικρότεροι και το κέλυφός τους δεν είναι τραχύ. Στη γεύση είναι πολύ νοστιμότεροι από τα αμύγδαλα και γι' αυτό προτιμώνται. Ο Θεόφραστος περιγράφει το δένδρο χωρίς να το ονομάζει. Το όνομα «πιστάκια» (από την περσική λέξη πίστα που σημαίνει φιστίκι) απαντάται για πρώτη φορά στο Νίκανδρο (Θηριακά, 891) τον 2^ο αιώνα π.Χ, ο οποίος επίσης τονίζει την ομοιότητα των καρπών με τα αμύγδαλα (Γεωργιάδου, 2009). Η φιστικιά εισήχθη στην Ευρώπη κατά την έναρξη της χριστιανικής εποχής (Ferguson et al., 2005). Ο Διοσκουρίδης τον 1^ο αιώνα μ.Χ αναφέρει ότι τα φιστίκια παράγονται στη Συρία και έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες (Περί Ύλης Ιατρικής, Λόγος Πρώτος, 124). Για τα φιστίκια γράφει και ο Αθηναίος τον 2^ο αιώνα μ.Χ (Δειπνοσοφισταί): τα φιστίκια,

τα οποία προσφέρονται στο τραπέζι των σοφών, σύμφωνα με τα τότε γνωστά, παράγονται στη Συρία και στην Αραβία. Ο καρπός είναι λευκόφαιος, μακρός, πράσινος στο εσωτερικό και ενώ είναι λιγότερο χυμώδης από τον σπόρο της κουκουναριάς είναι περισσότερο εύγευστος από αυτόν. Αν και τα φιστίκια ήταν γνωστά ήδη στους αρχαίους Έλληνες και εκτιμούνταν για τη νόστιμη γεύση τους, δεν είναι γνωστός σήμερα ο χρόνος εισαγωγής και καλλιέργειας της φιστικιάς στην Ελλάδα. Είναι ενδιαφέρον ότι εισήχθη στη Ρώμη περίπου το 30 μ.Χ. και ταυτόχρονα στην Ισπανία (Πλίνιος, XV, 83,91). Ο Γεννάδιος (1914) ο οποίος ερεύνησε το θέμα αυτό αναφέρει ότι κατά τις πρώτες δεκαετίες του 19^{ου} αιώνα το φιστίκι ήταν «οπωρικών» της Ασίας και η φιστικιά δεν απαντιόταν στην Ελλάδα. Ο ίδιος γράφει ότι το 1856 καλλιεργούνταν στη Ζάκυνθο και μεμονωμένα δένδρα υπήρχαν και σε άλλα μέρη της Ελλάδας (Γεωργιάδου, 2009).

Η φιστικιά στην Ελλάδα συνδέεται με το νησί της Αίγινας. Λόγω της κοντινής απόστασης από τη θάλασσα και του φτωχού εδάφους του τόπου τα διάφορα είδη ξηρών καρπών δεν ευδοκιμούν, με εξαίρεση το φιστίκι. Είναι η κύρια καλλιέργεια στο νησί. Ο καρπός ονομάζεται «αιγινίτικο φιστίκι», ώστε να διακρίνεται από το «αραβικό φιστίκι», και είναι προϊόν Π.Ο.Π (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης) από το 1997. Στην Ελλάδα, ο πρώτος οργανωμένος φιστικεώνας ιδρύθηκε το 1860 σε ένα προάστιο της Αθήνας, το Ψυχικό Αττικής, από το βιομήχανο της σοκολάτας Δ. Παυλίδη (Chitzanidis, 2010). Ο διευθυντής του Δημοσίου Δενδροκομείου (Βοτανικός), Ορφανίδης, το 1869, άρχισε να πολλαπλασιάζει τη φιστικιά και να συνιστά την καλλιέργειά της και το έργο του συνέχισε ο διάδοχός του Π. Γεννάδιος (Γεωργιάδου, 2009). Το 1890 η υπηρεσία USDA (United States Department of Agriculture - Τμήμα Γεωπονίας Ηνωμένων Πολιτειών) εισήγαγε το φιστίκι στις ΗΠΑ. Εισήχθη στην Καλιφόρνια το 1904 (Ferguson et al., 2005). Στη χώρα μας, ο πρώτος εμπορικός φιστικεώνας της Αίγινας ιδρύθηκε από το Νικόλαο Πέρογλου γύρω στο 1896. Η συμβολή του Πέρογλου δεν ήταν το γεγονός ότι ίδρυσε τον πρώτο φιστικεώνα στην Αίγινα. Ήταν η προσπάθεια που έκανε, όλη του τη ζωή, να επεκτείνει την καλλιέργεια του δέντρου στο νησί και στην Ελλάδα. Η Αίγινα ήταν ένα πολύ φτωχό νησί και πίστευε ακράδαντα ότι αυτή η καλλιέργεια θα αποτελούσε τον κύριο οικονομικό πόρο για τους ανθρώπους.

Η καλλιέργεια του δέντρου επεκτάθηκε στο νησί και δημιουργήθηκαν φυτώρια για να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις. Μεταξύ των δύο Παγκοσμίων Πολέμων, η Αίγινα έγινε η πιο σημαντική περιοχή στην Ελλάδα για την ανάπτυξη φιστικιού. Στις δεκαετίες του 1950 και 1960 η καλλιέργεια φιστικιών επεκτάθηκε σε όλη τη χώρα από το νότο στο βορρά και στα νησιά. Η Αίγινα δεν είναι πλέον η κύρια περιοχή παραγωγής φιστικιών στην Ελλάδα, αλλά ιστορικά παραμένει η περιοχή από την οποία ξεκίνησε η παραγωγή φιστικιού. Κελυφωτά φιστίκια καλλιεργούνται και στα Μέγαρα, το Μαρκόπουλο, τη Φθιώτιδα, σε περιοχές της Εύβοιας, της Κορινθίας, της Βοιωτίας (Chitzanidis, 2010), στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλία, Χαλκιδική, Ροδόπη), στην Κρήτη και στις Κυκλάδες (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.2 Οικονομικά στοιχεία παραγωγής φιστικιών

Οι σημαντικότεροι λόγοι για τους οποίους η καλλιέργεια της φιστικιάς έχει επεκταθεί παγκοσμίως και αποτελεί αντικείμενο διεθνούς ενδιαφέροντος είναι ότι είναι ένα καρποφόρο δένδρο με μικρές απαιτήσεις ως προς το έδαφος και το κλίμα, ενώ ο καρπός του, το κελυφωτό φιστίκι, θεωρείται ένας από τους πιο εύγεστους και διατροφικά άριστους καρπούς. Σύμφωνα με τη FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database) (4/8/2014), από το 2006 ως το 2012, η παγκόσμια παραγωγή κελυφωτών φιστικιών αυξήθηκε από 594.257 τόνους σε 1.005.436 τόνους, ένα ποσοστό της τάξης του 69% (Γεωργιάδου, 2015). Η παραγωγή φιστικιών στις κυριότερες φιστικοπαραγωγούς χώρες φαίνονται στον πίνακα 4.1 (Γεωργιάδου, 2009).

Πίνακας 4.1. Παραγωγή φιστικιών παγκοσμίως (σε τόνους) (Γεωργιάδου, 2015).

Χώρα	Έτος			
	2006	2008	2010	2012
Ιράν	250000	446647	446647	472097
ΗΠΑ	107955	126100	236775	231000
Τουρκία	110000	120113	128000	150000
Κίνα	36000	40000	58000	74000
Συρία	73183	52066	57471	57195

Ελλάδα	8233	8100	8998	10000
Ιταλία	1024	2000	3115	2850
Αφγανιστάν	2457	3300	2000	2000
Τυνησία	2700	2500	2300	1400
Αυστραλία	1000	1800	1000	1792
Πακιστάν	632	773	663	659
Κιργιστάν	500	759	800	888
Ιορδανία	-	618	623	675
Ακτή Ελεφαντοστού	162	200	242	288
Ουζμπεκιστάν	203	190	200	225
Μαδαγασκάρη	220	254	187	223
Μαρόκο	65	69	78	80
Μεξικό	4	21	71	38
Κύπρος	12	24	19	17
Μαυρίκιος	5	7	6	6
Αζερμπαϊτζάν	15	3	2	3

Το Ιράν παραδοσιακά κατέχει την 1^η θέση σε παραγωγή (47%). Τη 2^η θέση σε παραγωγή κατέχουν οι Η.Π.Α. (23%) με αλματώδη αύξηση της παραγωγής τους από το 2000 και μετά, δεδομένου ότι οι πρώτες εντατικές καλλιέργειες φιστικιάς φυτεύτηκαν το 1975 στην Καλιφόρνια. Την 3^η θέση σε παραγωγή κατέχει η Τουρκία (15%) με σταθερή σχετικά παραγωγή και ακολουθεί η Κίνα (7%) και η Συρία (6%). Η Ελλάδα (1%) κατέχει την 6^η θέση στην παγκόσμια παραγωγή κελυφωτού φιστικιού και την 1^η στην Ευρώπη με συνεχή ανοδική τάση από το 1996 και μετά.

Η φιστικιά αποτελεί μια μικρή καλλιέργεια για την Ελλάδα, αν και η έκταση που καταλαμβάνει έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με τα στοιχεία της Icar Group, στα έτη 1998-2005, τα κελυφωτά φιστικά κάλυψαν μόλις το 12% της εγχώριας παραγωγής ξηρών καρπών, ενώ στις εξαγωγές αποτελούν το δεύτερο σε θέση ξηρό καρπό, μετά την αμυγδαλόπιχα (Γεωργιάδου, 2015).

A.4.3 Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών

Η χημική σύσταση των φιστικιών μπορεί να διαφοροποιείται μεταξύ των ποικιλιών και να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής που καλλιεργείται, τη σύσταση του εδάφους και τις καλλιεργητικές πρακτικές (Γεωργιάδου, 2015). Ωστόσο, αποδεικνύεται ότι γενικότερα τα φιστίκια έχουν μεγάλη πυκνότητα σε θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων φυτικών πρωτεϊνών, διαιτητικών ινών και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ), και είναι χαμηλά σε κορεσμένα λίπη. Παρέχουν μια εξαιρετική πηγή πολλών βασικών μετάλλων, όπως μαγνήσιο (Mg), σίδηρο (Fe), ασβέστιο (Ca), φώσφορο (P), κάλιο (K), ψευδάργυρο (Zn), χαλκό (Cu) και μαγγάνιο (Mn) (Harris, 2013), καθώς και βιταμίνες A, B₁, B₂, B₆ (πίνακες 4.2, 4.3). Τα κελυφωτά φιστίκια προσφέρουν υψηλό ποσό αντιοξειδωτικών πολυφαινόλων (Mahmoudi et al., 2014) και είναι η μοναδική πηγή, μεταξύ των καρπών με κέλυφος, καροτενοειδών συμπεριλαμβανομένων του β-καροτενίου, της λουτεΐνης και της ζεαξανθίνης (Harris, 2013).

Πίνακας 4.2. Σύσταση και θρεπτική αξία φιστικιών (Γεωργιάδου, 2009).

Συστατικό	Περιεκτικότητα ανά 100 g ψίχας
Υδωρ (g)	5,6
Πρωτεΐνες (g)	19,6
Λίπη (g)	53,2
Υδατάνθρακες (g)	19,0
Ίνες (g)	2,2
Τέφρα (g)	3,0
Σάκχαρα (g)	6,1
Θερμίδες	594
Σχέση μη κορεσμένων/κορεσμένα λιπαρά οξέα	8,1
Βιταμίνες	
A (LU.)	230
Θειαμίνη (mg)	0,67
Νιασίνη (mg)	1,4
Βιταμίνη C (mg)	0
Ανόργανα στοιχεία (mg)	
Ca	131
P	500
Fe	7,3
K	972
Mg	158

Πίνακας 4.3. Σύσταση και θρεπτική αξία κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης (Γεωργιάδου, 2009).

Συστατικό	Περιεκτικότητα ανά 100g ψίχας
Πρωτεΐνες (g)	19,5
Λίπη (g)	53,6
Υδατάνθρακες (g)	19,4
Θερμίδες	594

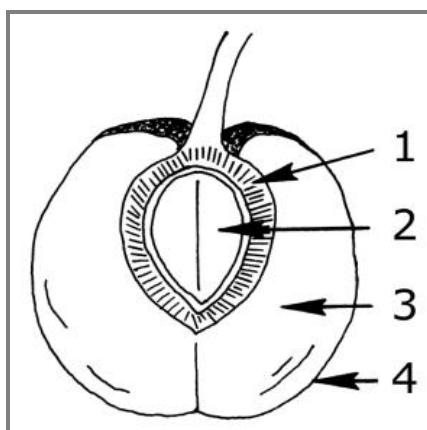
A.4.4 Κατηγοριοποίηση φιστικιών

Υπάρχουν κατηγορίες φιστικιών με κέλυφος και χωρίς κέλυφος που καθορίζονται κυρίως από το μέγεθος του πυρήνα, το βαθμό ξηρότητας, την απουσία ξένων σωμάτων και ελαττωμάτων που προκαλούνται από έντομα και μύκητες. Τα φιστίκια χωρίς κέλυφος είναι τα λεγόμενα «αράπικα φιστίκια», το ενδοκάρπιο του καρπού της αραχίδας που αναπτύσσεται μέσα στη γη (Ferguson et al., 2005).

Η μεγαλύτερη ποσότητα φιστικιών διατίθεται στην κατανάλωση με το κέλυφος, αλατισμένα και ψημένα. Σαν ψίχα χρησιμοποιείται, κυρίως, στη ζαχαροπλαστική (παγωτά, πάστες, ζαχαρωτά φιστίκια, μαντολάτα κ.λ.π.) και στην αλλαντοποιία (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.4.1 Χαρακτηριστικά και κριτήρια ποιότητας φιστικιών

Στο φιστίκι ένα εξωκάρπιο και ένα σαρκώδες μεσοκάρπιο περιβάλλουν το σκληρό αλλά σχετικά λεπτό ενδοκάρπιο που περικλείει το βρώσιμο σπόρο (Ferguson et al., 2005). Τα χαρακτηριστικά του καρπού του φιστικιού απεικονίζονται στην εικόνα 4.1:



Εικόνα 4.1. Χαρακτηριστικά καρπού φιστικιού, όπου:

- 1: ενδοκάρπιο ή κέλυφος
- 2: σπέρμα
- 3: μεσοκάρπιο
- 4: εξωκάρπιο ή περικάρπιο ή φλοιός

Μια σημαντική πτυχή της ποιότητας του προϊόντος με κέλυφος είναι ένα κέλυφος το οποίο είναι ελεύθερο από χρώση. Αυτό δεν ενδιαφέρει μόνο για αισθητικούς λόγους. Η χρώση του κελύφους είναι, επίσης, ένας δείκτης της ανάπτυξης παθογόνων οργανισμών και προβλημάτων από τα έντομα πριν από την συγκομιδή (Ferguson et al., 2005).

Η συγκομιδή σε βέλτιστη ωριμότητα, αποφεύγοντας τις καθυστερήσεις μεταξύ της συγκομιδής και του ξεφλουδίσματος, και η ξήρανση σε 4-6% υγρασία είναι σημαντικοί παράγοντες στη διασφάλιση καλής ποιότητας φιστικιών (Harris, 2013).

Τα κριτήρια ποιότητας πυρήνα περιλαμβάνουν μια σταθερή, τραγανή υφή (η οποία επηρεάζεται αρνητικά από ανεπαρκή ξήρανση μετά τη συγκομιδή ή από αποθήκευση σε πολύ υψηλή σχετική υγρασία), μία γλυκιά, λιπαρή γεύση και ελευθερία από τάγγιση. Οι πυρήνες έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά (περίπου 45%, κατά βάρος) και ακατέργαστη πρωτεΐνη (περίπου 30%). Τα συνολικά χαμηλού μοριακού βάρους επίπεδα σακχάρου είναι 3 έως 4%, αλλά τα αναγωγικά σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη) αντιπροσωπεύουν μόνο περίπου το 10% της συνολικής ζάχαρης (Ferguson et al., 2005).

A.4.5 Πορεία ανάπτυξης φιστικιών

Η βλάστηση αρχίζει να εκπύσσεται στα άρρενα δένδρα από τις αρχές Μαρτίου και στα θήλεα από τα τέλη Μαρτίου και ολοκληρώνεται στα τέλη Απριλίου με μέσα Μαΐου. Ο καρπός μετά το δέσιμό του, τον Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο αυξάνει σε μέγεθος, ενώ το σπέρμα δεν αναπτύσσεται κατά το διάστημα αυτό. Μέχρι το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο παραμένει μαλακό και ο καρπός είναι ευάλωτος σε προσβολές εντόμων. Από το τέλος Ιουνίου το ενδοκάρπιο γίνεται σκληρό και αρχίζει να αναπτύσσεται (διεύρυνση πυρήνα) και φτάνει το τελικό του μέγεθος στα μέσα Αυγούστου (Γεωργιάδου, 2009). Όταν αναπτύσσεται ο πυρήνας, το χρώμα του μετατρέπεται σε κόκκινο-μωβ και διαχωρίζεται εύκολα από το κέλυφος, το κέλυφος σκληραίνει και ο φλοιός μαλακώνει (Georgiadou, Dimou, Yanniotis, 2012). Συνήθως οι

καρποί δεν ωριμάζουν όλοι μαζί. Οι πρώτοι ώριμοι καρποί εμφανίζονται στις αρχές με τα μέσα Αυγούστου. Λόγω της διαδοχικής τους ωρίμανσης οι καρποί πρέπει να συγκομίζονται δύο φορές, μερικές δε φορές και τρεις. Στην πράξη, όμως, η συγκομιδή γίνεται μονομιάς (Γεωργιάδου, 2009). Σε γενικές γραμμές, τα φιστίκια συλλέγονται από τα μέσα Σεπτεμβρίου έως τα μέσα Οκτωβρίου (Harris, 2013).

A.4.6 Αναπτυξιακές απαιτήσεις φιστικιών

A.4.6.1 Κλιματικές απαιτήσεις

Περιοχές κατάλληλες για την παραγωγή φιστικιού χαρακτηρίζονται από ζεστά, ξηρά καλοκαίρια και ήπιους χειμώνες (Ferguson et al., 2005).

A.4.6.2 Υψομετρικές απαιτήσεις

Σε γενικές γραμμές, η φιστικιά αναπτύσσεται καλά μέχρι υψόμετρο 650 μέτρα και δεν πρέπει να φυτεύεται σε υψόμετρο άνω των 800 μέτρων (Γεωργιάδου, 2009), όπου η ζέστη του καλοκαιριού είναι συνήθως ανεπαρκής για την πλήρη ανάπτυξη του πυρήνα (Ferguson et al., 2005).

A.4.6.3 Απαιτήσεις υγρασίας

Τα κελυφωτά φιστίκια είναι ανθεκτικά στην ξηρασία και μπορεί να επιβιώσουν σε σκληρά κλίματα ελλείψει άρδευσης (Harris, 2013). Η υψηλή υγρασία επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη της φιστικιάς. Καιρός υγρός και βροχερός την άνοιξη επηρεάζει την επικονίαση και μειώνει την καρπόδεση. Παράλληλα, οι συχνές βροχοπτώσεις κατά το καλοκαίρι και οι υγρές συνθήκες, πριν ή κατά την περίοδο της συγκομιδής, ευνοούν την ανάπτυξη ασθενειών και υποβαθμίζουν την ποιότητα των καρπών. Ακόμα, ο υγρός και ο ζεστός καιρός κατά τη βλαστική περίοδο των δένδρων ευνοεί την ανάπτυξη μυκητολογικών ασθενειών (Γεωργιάδου, 2009). Η φιστικιά μπορεί να χρησιμοποιήσει μέχρι 220 L νερού ανά ημέρα κατά τη διάρκεια του πιο ζεστού τμήματος της ημέρας (Harris, 2013).

A.4.6.4 Εδαφικές απαιτήσεις

Όσον αφορά το έδαφος, τα κελυφωτά φιστίκια μπορεί να καλλιεργηθούν με επιτυχία σε πολλούς τύπους εδάφους (Ferguson et al., 2005). Ωστόσο, προτιμούν τα σχετικά βαθιά, καλά αποστραγγιζόμενα, μέσης σύστασης εδάφη, με υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο (Γεωργιάδου, 2009). Ανέχονται, όμως, τα ελαφρώς όξινα, αλκαλικά ή αλατούχα εδάφη (Ferguson et al., 2005). Νόστιμα φιστίκια παράγονται σε εδάφη στραγγισμένα, ασβεστώδη και με μέση σύσταση (Γεωργιάδου, 2009). Σε περιοχές με ρηχά σκληρά εδάφη, το μέγεθος των δένδρων και η παραγωγικότητα είναι περιορισμένα (Ferguson et al., 2005).

A.4.6.5 Αρδευτικές απαιτήσεις

Η φιστικιά είναι ανθεκτική στην ξηρασία, δίνει, όμως, μεγαλύτερη παραγωγή όταν ποτίζεται. Το πότισμα δίνει καλύτερα αποτελέσματα όταν γίνεται Ιούνιο με Αύγουστο (Γεωργιάδου, 2009). Τα συστήματα αρδύσεως που εφαρμόζονται είναι οι αρδευτικές πλημμύρες, οι λεκάνες, τα αυλάκια, οι εκτοξευτήρες, η άρδευση κατά σταγόνες (στάγδην) και υπόγεια (Harris, 2013).

A.4.6.6 Απαιτήσεις κλαδέματος

Το κλάδεμα πρέπει να γίνεται αργά το χειμώνα και πριν από το ξεκίνημα των οφθαλμών. Γενικά, πρέπει να είναι ελαφρό και να αποσκοπεί στη διατήρηση του σχήματος και στην ανανέωση του καρποφόρου ξύλου. Από πλευράς φυτοπροστασίας έχει μεγάλη σημασία κατά το κλάδεμα να αφαιρούνται όλοι οι ξηροί κλάδοι και όσοι είναι προσβεβλημένοι από έντομα και ασθένειες και να καταστρέφονται με καύση (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.6.7 Απαιτήσεις λίπανσης

Η λίπανση αποτελεί καθοριστικής σημασίας καλλιεργητική επέμβαση για την παραγωγικότητα των δένδρων της φιστικιάς, αφού μέσω αυτής επιδιώκεται η συμπλήρωση της φυσικής γονιμότητας του εδάφους, έτσι ώστε τα δένδρα να έχουν στη

διάθεσή τους εγκαίρως όλα τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, σε επαρκείς ποσότητες και σε αναλογίες ανταποκρινόμενες στις φυσιολογικές τους ανάγκες. Μολονότι τα προγράμματα λίπανσης διαφοροποιούνται λίγο ή πολύ από φυτεία σε φυτεία, από έτος σε έτος, σε γενικές γραμμές τα στοιχεία N, P και K χορηγούνται σε ίση περίπου αναλογία ή με το P ελαττωμένο. Σπουδαία και εντελώς μοναδική επίδραση ασκεί στη γονιμότητα του εδάφους, η οργανική ουσία «χούμος». Η ευεργετική επίδραση του χούμου αφορά κατά κύριο λόγο τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους – πορώδες, υδατοχωρητικότητα, αερισμό – γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη και λειτουργία του ριζικού συστήματος των δένδρων (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.6.8 Διατροφικές απαιτήσεις

Η διατροφική κατάσταση της φιστικιάς παρακολουθείται κατά κύριο λόγο με ανάλυση φύλλων. Τα κελυφωτά φιστίκια είναι ευαίσθητα σε ανεπάρκειες ψευδαργύρου, χαλκού και βορίου (Harris, 2013).

A.4.7 Δείκτες ωριμότητας φιστικιών

Η φιστικιά είναι δένδρο βραδείας ανάπτυξης (Γεωργιάδου, 2009). Χαρακτηρίζεται από μια μακρά νεανική περίοδο (Ferguson et al., 2005). Οι χρόνοι μεταξύ της φύτευσης και της πρώτης συγκομιδής είναι πέντε έως έξι έτη (Harris, 2013). Εισέρχεται σε αξιόλογη καρποφορία από το όγδοο έτος της ηλικίας της (Γεωργιάδου, 2009), φέρει πλήρως καρπούς (μέγιστες αποδόσεις) μεταξύ 10 έως 12 ετών (Ferguson et al., 2005) και η παραγωγική ζωή της υπολογίζεται σε 100 και πλέον έτη (Harris, 2013). Ιδανικά, η συγκομιδή γίνεται χρονικά με την πλήρη συσσώρευση του λίπους και της ζάχαρης στους πυρήνες (πλήρη ωριμότητα του καρπού). Αυτό συμπίπτει περίπου με το διαχωρισμό του φλοιού από το κέλυφος (Ferguson et al., 2005), δηλαδή με την εύκολη αποκόλληση του εξωκάρπιου από το ξυλοποιημένο ενδοκάρπιο και την εύκολη απόσπαση των καρπών με ελαφρό τίναγμα (Γεωργιάδου, 2009). Η διάσπαση του κελύφους δεν είναι ορατή λόγω του γεγονότος ότι το σαρκώδες μεσοκάρπιο περιβάλλει το κέλυφος στα αναπτυσσόμενα φιστίκια.

Ωστόσο, στοιχεία της ωρίμανσης μπορεί να δει κανείς στην αλλαγή του χρώματος του φλοιού, ο οποίος είναι πράσινος όταν ο καρπός δεν είναι ώριμος και στη συνέχεια

εξελισσεται σε κόκκινο με πλήρη ωρίμανση. Αυτό συμβαίνει λόγω μείωσης ή απώλειας της χρωστικής χλωροφύλλης στο φλοιό που επιτρέπει τις κόκκινες χρωστικές να γίνουν ορατές. Όταν είναι πλήρως ώριμος, ο καρπός με το κέλυφός του εκτοξεύεται από το φλοιό, όταν εφαρμόζεται πίεση με τον αντίχειρα και το δείκτη στο απομακρυσμένο άκρο του φλοιού. Τα φιστίκια μπορεί να διαχωριστούν κατά μήκος των διαμήκων ραβδώσεων του κελύφους και στην άκρη του κελύφους. Διάσπαση μπορεί να παρουσιαστεί σε οποιοδήποτε συνδυασμό ενός ή και των δύο διαμήκων κορυφογραμμών, με ή χωρίς διάσπαση στην άκρη, ή στην άκρη μόνο. Αν είναι η ανάπτυξη του πυρήνα που οδηγεί στη διάσπαση του κελύφους, τότε παράγοντες που ενισχύουν το μέγεθος του πυρήνα σε σχέση με το μέγεθος του κελύφους θα οδηγήσουν σε μεγαλύτερη διάσπαση των καρπών (Ferguson et al., 2005).

A.4.8 Φυσιολογικά αναπτυξιακά προβλήματα φιστικιών

Φυσιολογικά αναπτυξιακά προβλήματα, που προκύπτουν πριν από την επίτευξη της πλήρους ωριμότητας, μπορεί να έχουν ιδιαίτερα σημαντικές συνέπειες για την ποιότητα του καρπού. Επειδή οι ξηροί καρποί είναι χρήσιμοι μόνο όταν έχουν χωριστεί, η αποτυχία του διαχωρισμού του φλοιού μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση της απόδοσης. Και οι κενοί καρποί αποτελούν αναπτυξιακό πρόβλημα που παρατηρείται συχνά. Δεν είναι γνωστό τι καθορίζει το ποσοστό των καρπών με γεμάτο κέλυφος, αλλά υπάρχει η υποψία ότι η αποθηκευτική ικανότητα υδατανθράκων του δέντρου αρχικά καθορίζει το ποσοστό των γεμάτων καρπών (Ferguson et al., 2005).

A.4.9 Εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς

Οι ζωϊκοί εχθροί της φιστικιάς, που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία, είναι τα έντομα, τα ακάρεα, οι νηματώδεις σκώληκες, τα πουλιά και τα τρωκτικά. Στην Ελλάδα από τους εχθρούς αυτούς μόνο τα έντομα αποτελούν σοβαρό πρόβλημα (Γεωργιάδου, 2009). Αρκετά έντομα που είναι παράσιτα των φιστικιών είναι σε θέση να προκαλέσουν επιφανειακή ζημία (αλλοίωση εξωκάρπιου) στους αναπτυσσόμενους καρπούς. Αν τα έντομα είναι σε θέση να εμβαθύνουν ή να εισάγουν παθογόνους μύκητες, αυτά τα παράσιτα μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στους πυρήνες. Απολύμανση με μεθυλοβρωμίδιο ή φωσφίνη έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο σε συγκομίζοντα

φιστίκια, αλλά έχει αναφερθεί αντίσταση των εντόμων σε αυτά και η χρήση αυτών των καπνογόνων καταργείται σταδιακά. Εργαστηριακές δοκιμές κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας φιστικιού δείχνουν ότι πολύ λίγα από τα έντομα επιβιώνουν μετά την ξήρανση του καρπού (Ferguson et al., 2005). Οι σημαντικότεροι εντομολογικοί εχθροί που αναφέρονται για τη φιστικιά στην Ελλάδα περιγράφονται στον πίνακα 4.4. Από αυτούς, το ευρύτομο, ο σκώρος και η ψύλλα της φιστικιάς δημιουργούν κατ' έτος πολύ σοβαρές ζημιές μέχρι και μηδενισμό της παραγωγής (Γεωργιάδου, 2009).

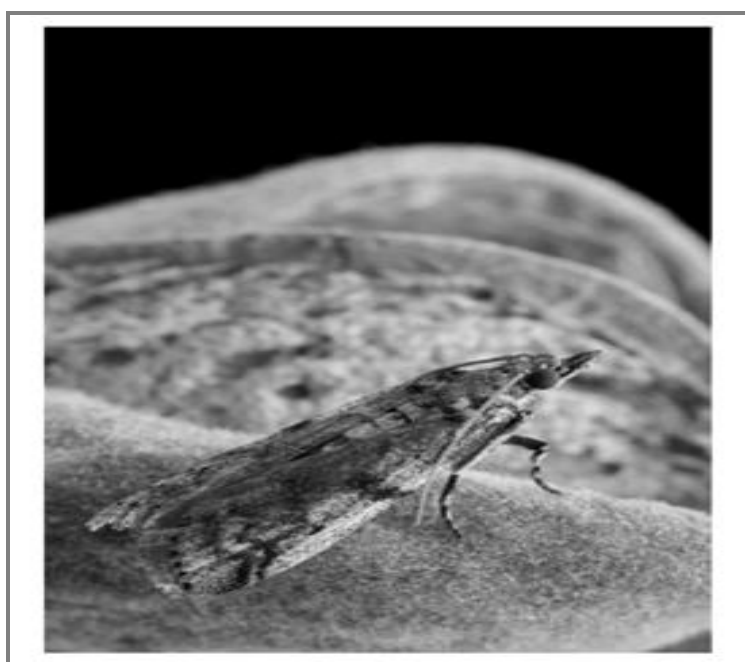
Πίνακας 4.4. Οι εντομολογικοί εχθροί της φιστικιάς στην Ελλάδα (Γεωργιάδου, 2009).

Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία
Καπνώδης	<i>Capnodis tenebrionis</i>
Σκολύτης	<i>Acrantus vestitus</i>
Σινόξυλο	<i>Sinoxylon sexdentatum</i>
Τίνεα	<i>Teleiodes decorella</i>
Ψύλλα	<i>Agonoscena pistaciae</i>
Σκώρος	<i>Palumbina guerinii</i>
Ευρύτομο	<i>Eyrytoma plotnikovi</i>
Τρωγόκαρπος	<i>Megastigmus pistaciae</i>
Τζίτζικακι	<i>Idiocerus stali</i>
Κοκκοειδή	<i>Aspidiotus</i> sp. <i>Melanaspis</i> sp.
Έντομα αποθήκης	<i>Ephestia kuehniella</i> <i>Piodia interpunctella</i>

Εξίσου σημαντικός εντομολογικός εχθρός της φιστικιάς είναι και το «navel orangeworm», το οποίο δε συναντάται στην Ελλάδα αλλά στην Αμερική (εικόνες 4.2 και 4.3). Το navel orangeworm (*Amyelois transitella*) είναι ένα έντομο της οικογένειας *Pyralidae*. Περιγράφηκε για πρώτη φορά στο Μεξικό κι αργότερα ανακαλύφθηκε στην Αριζόνα στα πορτοκάλια navel. Εισήχθηκε στην Καλιφόρνια στη δεκαετία του 1940 και έγινε ένα σοβαρό παράσιτο στα καρύδια, αμύγδαλα, φιστίκια και σύκα. Είναι ανησυχητικό, διότι προσβάλλει το εμπορεύσιμο αγαθό, εμπλέκεται σε αυξημένα επίπεδα αφλατοξίνης και θεωρείται ένα φυτοϋγειονομικό ζήτημα σε ορισμένες εξαγωγικές αγορές (Harris, 2013).



Εικόνα 4.2. Προνύμφη navel orangeworm πέμπτου σταδίου (Harris, 2013).



Εικόνα 4.3. Ενήλικο navel orangeworm (Harris, 2013).

Το navel orangeworm προκαλεί βλάβη στους πυρήνες που οδηγεί σε μόλυνση τόσο από *A. flavus* όσο και *A. parasiticus* και σε ανάπτυξη αφλατοξίνης. Όπως τα φιστίκια ωριμάζουν, το κέλυφος, που βρίσκεται μέσα στο σαρκώδη φλοιό, χωρίζει με φυσικό τρόπο. Ο φλοιός γενικά παραμένει ανέπαφος και προστατεύει την εκτεθειμένη

επιφάνεια από εισβολή εντόμων, μυκήτων και παθογόνων. Ωστόσο, στο 1-4% των καρπών με κέλυφος, ο φλοιός προσκολλάται στο κέλυφος των καρπών με κέλυφος και όταν το κέλυφος διασπαστεί, ο φλοιός χωρίζεται επίσης, εκθέτοντας έτσι τον πυρήνα σε navel orangeworm και πιθανή μόλυνση με *Aspergillus*. Για το λόγο αυτό οι «πρόωρες» διασπάσεις τείνουν να έχουν υψηλότερα επίπεδα αφλατοξίνης. Με κατάλληλες πρακτικές διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών, όπως πρώιμη συγκομιδή και σπρέι φυτοφαρμάκων, οι καλλιεργητές μπορούν να μειώσουν τη μόλυνση σε χαμηλά επίπεδα, γενικά κάτω από 2%. Επειδή η παρουσία ζωντανών navel orangeworm σε προϊόντα του εμπορίου δεν είναι αποδεκτή, οι μεταποιητές υποχρεούνται να απολυμαίνουν το προϊόν με καπνισμό με φωσφίνη ή βρωμιούχο μεθύλιο (Harris, 2013).

A.4.10 Μυκητιολογικές ασθένειες φιστικιάς

Από τους βιοτικούς παράγοντες που προκαλούν ασθένειες στα φυτά μόνο μύκητες έχουν καταγραφεί στις φιστικιές στην Ελλάδα, με μια εξαίρεση, το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*. Η προσβολή από το παθογόνο αυτό χαρακτηρίζεται πολύ σπάνια (Γεωργιάδου, 2009). Οι μύκητες είναι ικανοί να μολύνουν αναπτυσσόμενα φιστίκια και να προκαλέσουν ζημιά στους φλοιούς και τους πυρήνες. Η μόλυνση από μύκητες συχνά διευκολύνεται από την πρόωρη διάσπαση των φλοιών που οδηγεί σε μολύνσεις από μια σειρά εντόμων τα οποία τρέφονται με τους καρπούς και χρησιμεύουν ως φορείς ασθενειών. Συγκεκριμένα, τα είδη *Alternaria* και *Cladosporium* αποικούν τους καρπούς που έχουν διασπαστεί νωρίς. Καθυστέρηση βροχοπτώσεων θα προωθήσει δραστηριότητα της *Botryosphaeria dothidea* στους πυρήνες και τους φλοιούς φιστικιών. Η μεγαλύτερη απειλή, όμως, είναι από τον *Aspergillus flavus*. Ο κίνδυνος είναι ιδιαίτερα σοβαρός, διότι αυτός ο μύκητας μπορεί να παράγει αφλατοξίνη. Υπάρχει στενή σύνδεση της μόλυνσης με την πρώιμη διάσπαση των καρπών που υποδεικνύει ότι μείωση του δυναμικού προβλήματος της αφλατοξίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί με μείωση της πρόωρης διάσπασης ή με διαλογή των καρπών με κέλυφος που διασπώνται πρόωρα (Ferguson et al., 2005). Επιπρόσθετα, τα φιστίκια αντιμετωπίζουν τρεις σοβαρές ασθένειες φυλλωμάτων που προκαλούνται από παθογόνους μύκητες (*Botrytis*, *Botryosphaeria*, *Alternaria*) (Harris, 2013). Στη διεθνή

βιβλιογραφία, επίσης, δεν έχουν περιγραφεί στη φιστικιά προκαρυωτικές ασθένειες και ιώσεις (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.10.1 Προσβολή από τους μύκητες του γένους *Aspergillus*

Από τους καρπούς της φιστικιάς έχουν απομονωθεί διάφορα είδη του γένους *Aspergillus*. Μεταξύ αυτών και τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus*, που ευθύνονται για την παραγωγή αφλατοξινών. Οι μύκητες αυτοί έχουν βρεθεί σε καρπούς φιστικιάς πάνω στο δένδρο, αλλά και σε συγκομισμένους καρπούς κατά την επεξεργασία και αποθήκευση (Γεωργιάδου, 2009).

Συμπτώματα

Ο *A. flavus* σε προσβολές του φλοιού προκαλεί κηλίδες σκούρου χρώματος, που μπορούν να καταλάβουν μεγάλη επιφάνεια του καρπού. Προσβολή του σπέρματος προκαλεί σήψη (Γεωργιάδου, 2009).

Κύκλος ασθένειας – Επιδημιολογία

Οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι σαπρόφυτα ή ασθενή παράσιτα, τα οποία συνήθως εισέρχονται στον ξενιστή από πληγές. Ως σαπρόφυτα έχουν βρεθεί στο έδαφος φιστικιώνων, σε σκόνη και σκουπίδια αποθηκών, σε ξηρές ταξιανθίες και σε καρπούς που έχουν πέσει στο έδαφος. Όλα αυτά τα υποστρώματα αποτελούν εστίες μόλυνσης, από τις οποίες τα σπόρια μεταφέρονται με τον αέρα στους μη συγκομισμένους, στους συγκομισμένους και αποθηκευμένους καρπούς. Σπόρια του *A. flavus* που έχουν παραμείνει επί 4 h στους 50°C παρουσιάζουν ποσοστό βιώσιμων σπορίων 2%. Στα βλαστημένα σπόρια το ποσοστό αυτό είναι ακόμα χαμηλότερο. Αναμένεται, επομένως, σημαντική μείωση του ποσοστού βιώσιμων σπορίων κατά την αποξήρανση των καρπών σε φούρνους ή στον ήλιο. Υπάρχει, όμως, πάντα ο κίνδυνος της επαναμόλυνσης των καρπών αυτών κατά την αποθήκευση (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.11 Επιπτώσεις των προ-συλλεκτικών παραγόντων στη διάσπαση του κελύφους των φιστικιών

Ορισμένες πρακτικές παραγωγής στο χωράφι επηρεάζουν τη διάσπαση του κελύφους και επομένως, την πιθανότητα προσβολής του καρπού από το μύκητα *Aspergillus*. Σε φθίνουσα σειρά του βαθμού των επιπτώσεων, αυτοί οι παράγοντες είναι: η εποχή της συγκομιδής, η διαχείριση της άρδευσης, η διατροφή σε βόριο και η περικοπή του φορτίου των καρπών του δέντρου (Ferguson et al., 2005).

Εποχή της συγκομιδής

Υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι τα υψηλότερα ποσοστά διάσπασης κελύφους επιτυγχάνονται όταν η συγκομιδή καθυστερεί. Η συγκομιδή δεν πρέπει να καθυστερήσει μετά την πλήρη ωρίμανση της καλλιέργειας. Η καθυστερημένη συγκομιδή μπορεί να οδηγήσει σε χρώση του κελύφους, λόγω της διάσπασης των φαινολικών ενώσεων (δραστικών ενώσεων που περιέχουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες σε ένα βενζολικό δακτύλιο). Η καθυστέρηση της συγκομιδής μπορεί να οδηγήσει και σε μόλυνση από navel orangeworm (Ferguson et al., 2005).

Διαχείριση της άρδευσης

Πρόσθετες έρευνες έχουν καταδείξει ότι ανεπαρκής άρδευση από τα μέσα Αυγούστου μέχρι αρχές Σεπτεμβρίου θα μειώσει σημαντικά το ποσοστό των διασπασμένων καρπών. Οργανωμένη άρδευση από τα μέσα Μαΐου μέχρι το τέλος του Ιουνίου μπορεί να αυξήσει το ποσοστό διάσπασης του κελύφους. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν πληροφορίες που να αποδεικνύουν τις επιπτώσεις της ποιότητας του νερού άρδευσης στη διάσπαση του κελύφους (Ferguson et al., 2005).

Διατροφή σε βόριο

Πηγές προέλευσης του βορίου αποτελούν το έδαφος (ορυκτά), τα λιπάσματα (βορικό οξύ, βόρακας), το νερό άρδευσης, καθώς και απόβλητα και προϊόντα καύσης. Η απαίτηση του φιστικιού για βόριο είναι η υψηλότερη από όλες τις γνωστές καλλιέργειες δέντρων (120-250 mg/kg). Τρόποι αντιμετώπισης τροφωπενιών βορίου είναι είτε εδαφικά είτε διαφυλλικά (Harris, 2013).

A.4.12 Βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης φιστικιών

Θερμοκρασία και επίπεδα υγρασίας

Μόλις έχουν ξηραθεί, οι καρποί μπορούν να κρατηθούν στους 20 °C (68 °F) και 65 έως 70% σχετική υγρασία (Relative Humidity - RH) για μέχρι ένα έτος (Ferguson et al., 2005). Ωστόσο, το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών αποθήκευσης για τους καρπούς με κέλυφος είναι 0-10 °C. Όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια ζωής αποθήκευσης (Harris, 2013). Τα φιστίκια δεν είναι ευαίσθητα σε θερμοκρασίες ψύξης και μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες κατάψυξης ή κάτω από αυτές (Ferguson et al., 2005). Ωστόσο, οι καρποί πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την απομάκρυνση από την αποθήκευση στην κατάψυξη λόγω της μικρής διάρκειας ζωής τους σε θερμοκρασία δωματίου, σε σύγκριση με τους καρπούς που δεν έχουν ποτέ καταψυχθεί, ως αποτέλεσμα των επιβλαβών συνεπειών της κατάψυξης στην υφή μετά την απόψυξη των καρπών.

Ένα ασφαλές επίπεδο υγρασίας για τους ξηρούς καρπούς είναι μία δραστηριότητα νερού κάτω από 0,7 στους 25 °C για να επιβραδυνθεί η μικροβιακή ανάπτυξη. Δραστηριότητα νερού 0,7 συμπίπτει με περιεκτικότητα σε υγρασία περίπου 6,5% για τα φιστίκια (Harris, 2013).

Ατμόσφαιρα

Τα επίπεδα O₂ κάτω του 1% είναι πολύ αποτελεσματικά στην καθυστέρηση της τάγγισης και άλλων συμπτωμάτων φθοράς (Harris, 2013). Τα φιστίκια είναι σημαντικά λιγότερο επιρρεπή σε τάγγιση απ' ό, τι είναι τα αμύγδαλα, όμως, ενώ είναι σχετικά σταθερά όταν αποθηκεύονται σε αέρα στους 20 °C (68 °F), η αποθήκευση υπό υψηλό CO₂, μειωμένο O₂ (<0,5%) και χαμηλή θερμοκρασία (0 έως 10 °C) βελτιώνει περαιτέρω τη σταθερότητα της γεύσης (Ferguson et al., 2005). Επιπλέον, είτε επίπεδα O₂ κάτω του 0,5% είτε επίπεδα του CO₂ πάνω από 80% στον αέρα του αποθηκευμένου προϊόντος μπορεί να είναι αποτελεσματικά στον έλεγχο εντόμων και μπορεί να παρέχουν μια εναλλακτική λύση στο χημικό καπνισμό (Harris, 2013).

Η παραγωγή αφλατοξίνης είναι μια αερόβια διαδικασία. Η παραγωγή αφλατοξίνης από καλλιέργειες του *A. flavus* που αναπτύσσονται σε αραχίδες σε ατμόσφαιρα μειωμένου οξυγόνου είναι χαμηλότερη σε σχέση με εκείνη υπό κανονικές συνθήκες. Οι

Diener και Davis (1967) ερεύνησαν τα αποτελέσματα διαφορετικών επιπέδων ατμοσφαιρικών αερίων (διοξειδίου του άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου) σχετικά με την παραγωγή αφλατοξίνης υπό συνθήκες μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας. Διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή αφλατοξίνης σε ώριμους πυρήνες φιστικιού μειώθηκε με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CO₂ από 0,03% έως 100%. Η μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή αφλατοξίνης. Μια άλλη μελέτη ανέφερε ότι πραγματοποιήθηκε μια σημαντική μείωση της παραγωγής μυκοτοξινών, όταν το O₂ μειώθηκε από 5% έως 1%, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα.

Η αποθήκευση σε ελαττωμένο οξυγόνο ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (συσκευασία σε κενό αέρος ή άζωτο) θα μπορούσε να είναι μία από τις επιλογές για τη μείωση της βιοσύνθεσης αφλατοξίνης (Faulkner, 2014).

Ξηροί καρποί (λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια) μπορούν εύκολα να απορροφήσουν οσμές από εξωτερικές πηγές. Έτσι, δεν πρέπει να φυλάσσονται με άλλα εμπορεύματα, που έχουν έντονες μυρωδιές, όπως το σκόρδο, το κρεμμύδι και τις πατάτες (Harris, 2013).

A.4.13 Στάδια παραγωγής φιστικιών

Ανάπτυξη

Τα κελυφωτά φιστίκια αναπτύσσονται σε μεγάλες ομάδες στο δέντρο (Harris, 2013).

Συλλογή

Η συγκομιδή των φιστικιών στη χώρα μας αρχίζει από τα τέλη Αυγούστου με μέσα Σεπτέμβρη, ανάλογα με την ποικιλία και την περιοχή και διαρκεί 15-20 μέρες. Η συγκομιδή, συνήθως, γίνεται όταν το 60-70% των καρπών έχουν ωριμάσει (Γεωργιάδου, 2009). Η συγκομιδή περιλαμβάνει την κάλυψη της περιοχής κάτω και γύρω από τα δέντρα με ένα τύπο ανθεκτικού προστατευτικού υφάσματος – πανιού (Γεωργιάδου, 2012), ώστε να μην έρχονται οι ξηροί καρποί σε επαφή με το έδαφος στο περιβάλλον (Harris, 2013), την ανακίνηση των κλαδιών των δέντρων με ράβδισμα και τη συσκευασία όσων καρπών φιστικιών έπεσαν, μέσα σε σακιά. Σε ελληνικούς φιστικεώνες δεν εφαρμόζεται μηχανική συγκομιδή (Γεωργιάδου, 2012).

Η περιεκτικότητα σε υγρασία των φιστικιών στη συγκομιδή κυμαίνεται 40% και 50% (νωπού βάρους) (Harris, 2013).

Ταξινόμηση

Γίνεται η ταξινόμηση των καρπών με κέλυφος ή χωρίς κέλυφος και σε κατηγορίες μεγέθους, σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας (Harris, 2013). Οι καρποί συλλέγονται σε μουσαμάδες ή πλαίσια (Ferguson et al., 2005) και μεταφέρονται σε κάδους ή ρυμουλκούμενα για τη μεταφορά στην εγκατάσταση ξεφλουδίσματος (Harris, 2013).

Αποφλοιώση

Τα κελύφη των περισσότερων από τα φιστίκια έχουν φυσικά χωρίσει κατά τη στιγμή της συγκομιδής, αλλά οι σαρκώδεις φλοιοί τυπικά παραμένουν άθικτοι. Για να αποφευχθεί η κηλίδωση των κελυφών, τα φιστίκια ιδανικά ξεφλουδίζονται μέσα σε λίγες ώρες από τη συγκομιδή. Αρχικά γίνεται ένας προ-καθαρισμός για να αφαιρεθούν φύλλα και ξύλα (Harris, 2013). Ο διαχωρισμός της μαλακής φλούδας από το κέλυφος πραγματοποιείται μηχανικά με τριβή και έκπλυση με νερό (Γεωργιάδου, 2012). Σε αυτό το σημείο, καρποί κενοί, χαμηλού βάρους, που δεν έχουν αναπτυχθεί επαρκώς (λιγότερο από το 50% του όγκου του κελύφους) ή έχουν υποστεί βλάβη από έντομα, μπορεί να διαχωριστούν από τους πλήρως ανεπτυγμένους σε μια δεξαμενή νερού με επίπλευση, επειδή οι επιθυμητοί καρποί βυθίζονται (Harris, 2013). Τα αποφλοιωμένα φιστίκια πακετάρονται σε σακιά και προωθούνται για ξήρανση (Γεωργιάδου, 2012).

Θεραπεία με αντιοξειδωτικά

Αν το λευκό χρώμα του ξυλοποιημένου ενδοκαρπίου δεν είναι ικανοποιητικό, τα φιστίκια λευκαίνονται με υποθειώδες νάτριο. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται για να επιβραδυνθεί η τάγγιση που προκύπτει από την οξείδωση των λιπαρών οξέων (Harris, 2013).

Ξήρανση

Η ξήρανση λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την αποφλοιώση (φυσιολογικά την ίδια ημέρα) είτε σε ξηραντήρες αέρα είτε κάτω από τον ήλιο (Γεωργιάδου, 2012).

Κατά το μηχανικό τρόπο, οι περισσότεροι χρησιμοποιούν μια διαδικασία δύο σταδίων, όπου οι καρποί ξηραίνονται σε έναν ξηραντήρα στήλης σε 12 με 13% υγρασία με θερμό αέρα στους 82 °C (180 °F) και η ξήρανση ολοκληρώνεται πιο αργά σε 24 έως 48 ώρες με αέρα θερμαινόμενο σε όχι περισσότερο από 49 °C (120 °F) (Ferguson et al., 2005). Υπάρχει και δεύτερη μηχανική μέθοδος, κατά την οποία το προϊόν περνάει μέσα από ένα συνεχή ξηραντήρα μέχρι 24 ώρες σε αρχικές θερμοκρασίες από 80 περίπου έως 105 °C και τελική θερμοκρασία περίπου 70 °C. Οι ξηροί καρποί ξηραίνονται σε υγρασία 8 έως 15% και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μεγάλα σιλό. Ο αέρας του περιβάλλοντος εισάγεται στα σιλό για αρκετές ημέρες έως ότου οι καρποί έχουν εξισορροπηθεί σε επίπεδα υγρασίας από 5 έως 7% (ενεργότητα νερού 0,50 - 0,65). Η υπερβολική ξήρανση, κάτω του 2% υγρασίας, μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στη γεύση, το χρώμα και την υφή (Harris, 2013).

Χειροδιαλογή ή μηχανική διαλογή

Κατά τη διαδικασία αυτή αφαιρούνται οι χαμηλής ποιότητας καρποί (αποχρωματισμένοι, μικρού μεγέθους, φιστίκια ακανόνιστου σχήματος) (Γεωργιάδου, 2012).

Αλάτισμα και ψήσιμο

Τα κελυφωτά φιστίκια είναι συχνά ψημένα και αλατισμένα ή αρωματισμένα. Το κέλυφος έχει φυσικά ένα ελαφρύ κρεμώδες χρώμα και ο πυρήνας ένα διακριτικό πράσινο (Harris, 2013).

Συσκευασία

Είναι σημαντικό να προστατεύονται οι ξηροί πυρήνες από την υγρασία και το οξυγόνο. Επομένως, η συσκευασία, σε διάφορους τύπους και μεγέθη, πρέπει να (Harris, 2013):

A) Παρέχει ένα αποτελεσματικό φράγμα υγρασίας δεδομένου ότι έκθεση σε υγρασία οδηγεί σε απώλεια τραγανότητας και χρόνου ζωής.

B) Αποκλείει το οξυγόνο ώστε να επιβραδυνθεί η ανάπτυξη τάγγισης.

Γ) Αποκλείει το φως για να ελαχιστοποιηθεί η υποβάθμιση του χρώματος.

Συνιστάται συσκευασία σε κενό αέρος ή έκλυσης αζώτου (Harris, 2013).

Αποθήκευση

Οι αποθηκευτικές συνθήκες διαφοροποιούνται ανάλογα με την πρακτική που ακολουθεί κάθε παραγωγός (Γεωργιάδου, 2012). Τα φιστίκια πρέπει να αποθηκεύονται σε καθαρές αποθήκες, με καλή θερμική μόνωση (δροσερή αποθήκευση), με χαμηλή υγρασία για να εμποδίζεται η ανάπτυξη μυκήτων (ξηρή αποθήκευση) και με δυνατότητα αερισμού. Στα παράθυρα των αποθηκών πρέπει να υπάρχει λεπτή σήτα για να αποφεύγεται η είσοδος των εντόμων (Γεωργιάδου, 2009). Έτσι, τα φιστίκια έχουν μια σταθερή σύνθεση και μεγάλη διάρκεια ζωής (Harris, 2013).

Πώληση

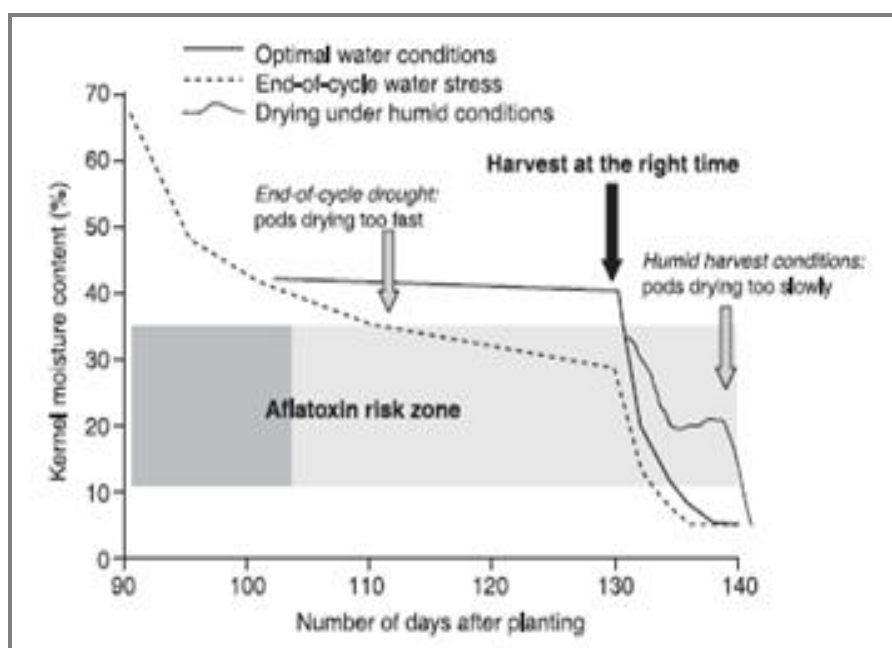
Τα φιστίκια πωλούνται ως συστατικά (σε πυρήνες, κομμάτια, αλεύρι και πάστα) για μια μεγάλη ποικιλία από αλμυρά ή γλυκά προϊόντα. Απορριπτέοι καρποί μπορεί να πιεστούν για την εξόρυξη πετρελαίου. Οι φλοιοί συχνά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ξυλάνθρακα ή ως καύσιμο λέβητα (Harris, 2013).

A.4.14 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, είναι γνωστό ότι επιδρούν στην παραγωγή αφλατοξίνης από τοξικογόνα στελέχη *Aspέργιλλων*. Η μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής της καλλιέργειας από τους συγκεκριμένους μύκητες. Αποτελέσματα από μελέτες με σκοπό να προσδιοριστεί σε ποιο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας και κάτω από ποιες πρακτικές παράγεται η αφλατοξίνη στα κελυφωτά φιστίκια στην Ελλάδα έδειξαν ότι η μόλυνση είναι πιθανό να συμβεί σε κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας: στο στάδιο ωρίμανσης του καρπού πάνω στο δένδρο (προ-συλλεκτικά, καλλιέργεια), στη συγκομιδή, στην επεξεργασία, στην αποθήκευση και στη διανομή (μετα-συλλεκτικά). Η παρουσία των μυκήτων δε σηματοδοτεί κατ' ανάγκη και την ύπαρξη αφλατοξίνης. Γενικά, λίγοι καρποί ενός

δέντρου ή ενός φυτού μολύνονται με τον *A. flavus*, αλλά, δυστυχώς, ακόμα και ένας περιορισμένος αποικισμός οδηγεί σε παραγωγή αφλατοξίνης σε συγκεντρώσεις πάνω από το θεσμοθετημένο αποδεκτό όριο.

Περιοριστικός παράγοντας για την προσβολή των φιστικιών από τους μύκητες αυτούς αποτελεί η χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία των μη λιπαρών συστατικών του σπέρματος. Η συσχέτιση της περιεκτικότητας σε υγρασία των σπερμάτων και του κινδύνου μόλυνσης με αφλατοξίνη περιγράφονται στην εικόνα 4.2. Η περιεκτικότητα σε υγρασία των σπερμάτων μετά την αποξήρανση στον ήλιο επί 3-4 ημέρες κατέρχεται περίπου σε 8-9%, όταν η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος είναι 65%. Όταν, όμως, η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος αυξηθεί θα αυξηθεί και η περιεκτικότητα υγρασίας των σπερμάτων, δηλαδή σε σχετική υγρασία περιβάλλοντος 80% η υγρασία των σπερμάτων θα εξισορροπηθεί στο 13%. Επομένως, θα αυξηθεί και η πιθανότητα προσβολής του καρπού από μύκητες (Γεωργιάδου, 2009).



Εικόνα 4.4. Επίδραση της περιεκτικότητας υγρασίας των σπερμάτων σε σχέση με τον κίνδυνο μόλυνσης με αφλατοξίνη (Harris, 2013).

Επίσης, διάφορες μελέτες συσχετίζουν την επίδραση της θερμοκρασίας και της υγρασίας (ενεργότητα νερού, a_w) στην ανάπτυξη του μύκητα και στην παραγωγή αφλατοξίνης. Σε αυτές τις μελέτες έχουν προσδιοριστεί οριακές και βέλτιστες συνθήκες.

Οι άριστες συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα και της αφλατοξίνης δεν ταυτίζονται, αλλά είναι παρόμοιες. Συγκεκριμένα, η παραγωγή αφλατοξίνης έχει ένα πιο περιορισμένο εύρος συνθηκών θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού απ' ό τι η ανάπτυξη του μύκητα. Οι άριστες συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων αυτών είναι θερμοκρασία 36 °C και $a_w > 0,95$. Η μέγιστη παραγωγή αφλατοξίνης παρατηρείται σε θερμοκρασία από 24-30 °C και ενεργότητα νερού πάνω από 0.95, ενώ σε θερμοκρασία πάνω από 36 °C και $a_w < 0.83$ δεν παράγεται αφλατοξίνη (Γεωργιάδου, 2009).

Επιπλέον, η παραγωγή αφλατοξίνης συσχετίζεται στενά με τις αλλαγές του pH. Η βιοσύνθεση αφλατοξίνης στον *A. flavus* πραγματοποιείται σε όξινα υποστρώματα, αλλά παρεμποδίζεται σε αλκαλικά (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.14.1 Αιτίες παραγωγής αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια πριν τη συγκομιδή

Οι κλιματολογικές συνθήκες, το κατάλληλο υπόστρωμα, η παρουσία πηλγών στους καρπούς από έντομα, ζώα και πουλιά, η ευαισθησία του δένδρου σε μολύνσεις από μύκητες, οι παράγοντες που προκαλούν στρες στους μύκητες (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια και άλλους μικροοργανισμούς) είναι οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή από μύκητες και η παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή (Γεωργιάδου, 2009).

Κλιματολογικές συνθήκες

Η μόλυνση με αφλατοξίνες ποικίλει και εξαρτάται από τον καιρό που επικρατεί την καλλιεργητική περίοδο. Σε μελέτη για την αραχίδα στην Αυστραλία αναφέρεται αύξηση της μόλυνσης με αφλατοξίνες μετά από ξηρασία, ενώ αντίθετα μείωση μετά από επαρκείς βροχοπτώσεις. Πριν τη συγκομιδή, ο κυριότερος παράγοντας που επάγει τη μόλυνση με αφλατοξίνες είναι οι ακανόνιστες ή ανεπαρκείς βροχοπτώσεις, ιδιαίτερα στα εδάφη που έχουν μειωμένη ικανότητα απορρόφησης του νερού. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν και στις Η.Π.Α., όπου υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με το στρες ξηρασίας είναι οι κυριότεροι παράγοντες παραγωγής αφλατοξίνης (Γεωργιάδου, 2009).

Υπόστρωμα – Παράγοντες θρέψης

Θρεπτικοί παράγοντες, όπως ο άνθρακας, το άζωτο, τα αμινοξέα, τα λιπίδια και τα ιχνοστοιχεία, έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης (Γεωργιάδου, 2009):

A) Απλά σάκχαρα, όπως γλυκόζη, μαλτόζη, αλλά όχι πεπτόνη, σορβόζη ή λακτόζη, υποστηρίζουν το σχηματισμό της αφλατοξίνης.

B) Η πηγή αζώτου επιδρά στο σχηματισμό της αφλατοξίνης πολλαπλώς. Η παραγωγή αφλατοξίνης είναι διαφορετική εάν στο υπόστρωμα υπάρχει νιτρώδες ή νιτρικό άλας.

Γ) Τα αμινοξέα έχουν αντίστροφη επίδραση στην παραγωγή αφλατοξίνης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η τρυπτοφάνη παρεμποδίζει το σχηματισμό αφλατοξίνης, ενώ η τυροσίνη ευνοεί την παραγωγή αφλατοξίνης από τον *A. flavus*.

Δ) Τα λιπίδια έχουν πολύ μεγάλη επίδραση στο σχηματισμό αφλατοξίνης.

E) Τα ιχνοστοιχεία (μεταλλικά ιόντα) έχουν αναφερθεί ότι επιδρούν στην έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης.

Παρουσία πληγών στους καρπούς και ευαισθησία του δένδρου σε μολύνσεις από μύκητες

Έχει αποδειχθεί ότι ο *A. flavus* εισβάλλει στους φυτικούς ιστούς στα σημεία που έχουν υποστεί ζημιές (πύλες εισόδου) από έντομα, ζώα, πουλιά, από σχίσσιμο λόγω ωρίμανσης και από απρόσεκτους χειρισμούς. Σε μελέτες στις Η.Π.Α. αναφέρεται ότι πάνω στο δένδρο οι μύκητες αυτοί προσβάλλουν συνήθως τους καρπούς των οποίων το εξωκάρπιο έχει σχιστεί πρόωρα (early splits) ή φέρει σκασίματα από υπερωρίμανση (tattering) ή φαγώματα από πουλιά, έντομα και ζώα. Γενικότερα, οι καρποί με οποιαδήποτε μορφής ζημιά στο εξωκάρπιο είναι αυτοί που κυρίως συνεισφέρουν στην ύπαρξη του *A. flavus*, καθώς και στη μόλυνση με αφλατοξίνες. Οι καρποί κακής ποιότητας που παρουσιάζουν μεταχρωματισμούς και παραμορφώσεις είναι συχνά μολυσμένοι με αφλατοξίνες (Γεωργιάδου, 2009).

Παράγοντες στρες και αντιοξειδωτικά

Σε μελέτες στη Νότια Αφρική σε αραχίδα έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του στρες ξηρασίας και της αυξημένης μόλυνσης με αφλατοξίνη. Στην αραχίδα αναφέρεται ότι οποιαδήποτε ζημιά στους καρπούς (ψίχα και κέλυφος) αυξάνει την πιθανότητα ύπαρξης του *A. flavus* και της μόλυνσης από αφλατοξίνη ανεξαρτήτως συνθηκών ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η πιθανότητα γίνεται πιο ισχυρή όταν υπάρχουν και συνθήκες στρες π.χ. ξηρασία, υψηλή θερμοκρασία, αν και πιο στρεσογόνος παράγοντας στις αραχίδες φαίνεται να είναι η ξηρασία.

Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες προκαλεί τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης. Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι εφαρμογή tert-βουτυλυδροπεροξειδίου στον *A. flavus* και στον *A. parasiticus* προκάλεσε σημαντική αύξηση στην παραγωγή αφλατοξίνης. Αντίθετα, οι υδρολυόμενες ταννίνες παρεμποδίζουν σε μεγάλο βαθμό τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης με πιο αποτελεσματικό το γαλλικό οξύ. Η προσθήκη φαινολικών ή άλλων αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ, σε οξειδωτικά στρεσαρισμένο *A. flavus*, μείωσε σημαντικά την παραγωγή αφλατοξίνης, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη του μύκητα. Ένα άλλο αντιοξειδωτικό που παρεμποδίζει την παραγωγή αφλατοξίνης είναι το καφεϊκό οξύ.

Η προσβολή φιστικιών από μύκητες και η ύπαρξη αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή οδηγεί σε περαιτέρω μόλυνση μετά τη συγκομιδή. Επίσης, είναι πιθανό μολυσμένες σοδειές φιστικιών να αποτελέσουν πηγή για εξάπλωση των μυκήτων σε υγιή φιστίκια κατά τη διάρκεια λανθασμένης ή ελλειμματικής επεξεργασίας ή δυσμενών συνθηκών αποθήκευσης (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.14.2 Αιτίες παραγωγής αφλατοξίνης σε κελυφωτά φιστίκια μετά τη συγκομιδή

Μετά τη συλλογή και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, η ανάπτυξη τοξικογόνων μυκήτων και η ενδεχόμενη παραγωγή αφλατοξίνης επηρεάζονται από πλήθος παραγόντων: το μέγεθος της ζημιάς που έχουν υποστεί οι καρποί, το επίπεδο αφλατοξίνης στα στάδια πριν τη συγκομιδή, το χρόνο μεταξύ αποφλοιώσης και ξήρανσης, την υγρασία του καρπού και του χώρου αποθήκευσης, τη θερμοκρασία, το pH, την υγιεινή του αποθηκευτικού χώρου, τις

προσβολές από έντομα και διάφορους μικροοργανισμούς (έντονη δραστηριότητα εντόμων), τον αερισμό (επίπεδα O₂ και CO₂) και την παρουσία ή απουσία παρεμποδιστών.

Κατά την αποθήκευση, ο μύκητας δεν μπορεί να αναπτυχθεί και να παράγει τοξίνη σε θερμοκρασία <10 °C και σχετική υγρασία <70%. Η παρουσία εντόμων (π.χ. σκώρος) στους χώρους αποθήκευσης, επεξεργασίας και μεταφοράς αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες ανάπτυξης αφλατοξινών, λόγω της ικανότητας πολλών ειδών να μεταφέρουν σπόρια μυκήτων σε μη προσβεβλημένους καρπούς (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.15 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης

Η εφαρμογή κανόνων ορθής γεωργικής (GAP), ορθής υγιεινής (GHP) και ορθής αποθηκευτικής πρακτικής (GSP) αποτελεί το βασικότερο μέτρο πρόληψης σε επίπεδο παραγωγής και μεταποίησης. Η στρατηγική πριν τη συγκομιδή επικεντρώνεται σε γενετική βελτιστοποίηση, χρήση βιοανταγωνιστών στο χωράφι και βελτιστοποίηση των καλλιεργητικών μεθόδων. Η στρατηγική μετά τη συγκομιδή απαιτεί έλεγχο των αφλατοξινών και συγκεκριμένα, την προσέγγιση ενός γρήγορου και οικονομικού εργαλείου παρακολούθησης της παρουσίας τους (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.15.1 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή

Ο έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή πραγματοποιείται με πρόληψη της μόλυνσης στα πρωταρχικά στάδια ή με τροποποίηση του περιβάλλοντος για αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων και μυκοτοξινών.

A) Υιοθέτηση ορθών πρακτικών, που περιλαμβάνουν κατάρτιση και υγιεινή των εργαζομένων, τεκμηρίωση της παραγωγής, ελεγχόμενη ποιότητα νερού, σωστή διαχείριση του φιστικεώνα, έλεγχο παρασίτων (Harris, 2013).

Τεκμηρίωση της παραγωγής

Ο πρωταρχικός στόχος της τεκμηρίωσης είναι να είναι σε θέση να παρακολουθεί όλες τις πτυχές της παραγωγής των καρπών με κέλυφος. Οι καλλιεργητές πρέπει να είναι σε θέση να προσδιορίσουν περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της

παραγωγής των καλλιεργειών, όλες τις λειτουργίες του φιστικεώνα και τον τόπο από τον οποίο συλλέχθηκε μια συγκεκριμένη παρτίδα (Harris, 2013).

Ποιότητα νερού

Η διαχείριση και παρακολούθηση των αποθεμάτων νερού είναι μεταξύ των βασικών διαδικασιών για την πρόληψη μικροβιολογικής και χημικής μόλυνσης των φιστικιών. Τυπικές πηγές νερού είναι τα υπόγεια ύδατα από πηγάδια και τα επιφανειακά ύδατα από δεξαμενές, κανάλια, λίμνες συλλογής ή συστήματα παροχής νερού. Το νερό χρησιμοποιείται για την άρδευση φιστικεώνων, τον ψεκασμό δέντρων, τη μείωση της σκόνης από τους δρόμους του φιστικεώνα και για τον εξοπλισμό του φιστικεώνα. Το νερό χρησιμοποιείται, επίσης, για το πλύσιμο των χεριών και καταναλώνεται από τους εργαζόμενους. Ως εκ τούτου, το νερό στην παραγωγή μπορεί να είναι πηγή και φορέας βιολογικής και χημικής μόλυνσης. Ειδικά, το νερό που χρησιμοποιείται σε ψεκασμούς καλλιεργειών και στον έλεγχο της σκόνης εγκυμονεί κινδύνους μόλυνσης της καλλιέργειας από την άμεση επαφή με τον εκτεθειμένο καρπό πάνω στο δέντρο ή από την επαφή με το έδαφος. Για την αποφυγή μόλυνσης από το νερό σε ένα φιστικεώνα απαιτείται γνώση των πηγών και της ποιότητας της παροχής του νερού.

Η άρδευση είναι η σημαντικότερη χρήση του νερού στους φιστικεώνες. Μέθοδοι που εξοικονομούν νερό χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο (Harris, 2013).

Διαχείριση καλλιέργειας

Η αποτελεσματική διαχείριση της καλλιέργειας θα συμβάλει στη μείωση της μικροβιολογικής, χημικής και φυσικής μόλυνσης των φιστικιών. Η διαχείριση της καλλιέργειας εστιάζει στην πρόληψη ή την εξάλειψη ενδεχομένου μόλυνσης. Προσοχή πρέπει να δοθεί στην ανάπτυξη της καλύτερης μεθόδου για τη μείωση της σκόνης μέσα σε έναν φιστικεώνα, εμποδίζοντας τη συσσώρευση απορριμμάτων από τις εργασίες και με την τακτική επιθεώρηση για την προσβολή από επιβλαβείς οργανισμούς (Harris, 2013). Απαιτείται (Γεωργιάδου, 2009· Γεωργιάδου, 2012):

- 1) Καλή άρδευση των δένδρων, διότι σε συνθήκες ξηρασίας τα δένδρα στρεσάρονται και ευνοείται η μόλυνση από τους μύκητες και η παραγωγή

αφλατοξίνης. Κατά την άρδευση δεν πρέπει να βρέχονται τα φύλλα και οι καρποί, διότι γίνονται πιο ευάλωτοι στη μόλυνση από μύκητες.

- 2) Καλή στράγγιση των φιστικεάων, δεδομένου ότι και οι ασφυκτικές συνθήκες στο έδαφος δημιουργούν συνθήκες στρες στα δένδρα, λόγω μείωσης της πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων από το χώμα.
- 3) Καλός αερισμός στα χωράφια, ο οποίος επιτυγχάνεται με τα σωστά κλαδέματα. Η καλή κυκλοφορία του αέρα μέσα στα χωράφια είναι σημαντική για τη μείωση της σχετικής υγρασίας, η οποία ευνοεί την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή αφλατοξίνης.
- 4) Να μην αφήνονται φυτικά υπολείμματα (φύλλα, χόρτα) πάνω στο έδαφος, διότι αποτελούν πολύ καλό υπόστρωμα πάνω στο οποίο αναπτύσσεται ο μύκητας.
- 5) Σωστή λίπανση των δένδρων, ώστε να μην είναι σε συνθήκες στρες λόγω έλλειψης βασικών στοιχείων (τροφοπενίες). Επίσης, όταν χρησιμοποιείται κοπριά, θα πρέπει να είναι καλά χωνεμένη, να ενσωματώνεται στο έδαφος, ώστε να μη μεταφέρεται μέσω αυτής ο μύκητας.
- 6) Καλή φυτοπροστασία, ιδιαίτερα για τους εντομολογικούς εχθρούς. Η προσβολή από έντομα είναι η κύρια αιτία μόλυνσης των καρπών από Ασπέργιλλους και αφλατοξίνη. Οι αγρότες εφαρμόζουν συνήθως φυτοπροστασία, κυρίως εναντίον των εντόμων (*Eurytoma plotnikovi*, *Eurytomidae*, *Hymenoptera* και *Palumbina guerinii*, *Gelechiidae*, *Lepidoptera*), το Μάιο και τον Ιούνιο, όταν δηλαδή τα φιστίκια είναι ευάλωτα στην προσβολή από έντομα εξαιτίας του γεγονότος ότι το κέλυφός τους είναι ακόμη μαλακό.

Έλεγχος παρασίτων

Έλεγχος των παρασίτων των καλλιεργειών επιτυγχάνεται με χημικές εφαρμογές και, ως εκ τούτου, ενδεχομένως να προκαλεί χημική μόλυνση. Επομένως, υπάρχουν ειδικοί κανονισμοί για κάθε χημική ουσία (Harris, 2013).

B) Ανάπτυξη ποικιλιών φιστικιών ανθεκτικών στη μόλυνση από τους *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*

Τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* βρίσκονται σε ένα μεγάλο εύρος φυτικών υλικών σε παγκόσμια κλίμακα. Ζημιές των φυτικών υλικών που προκαλούνται από έντομα ή περιβαλλοντικό στρες δίνουν τη δυνατότητα στους μύκητες αυτούς να εισβάλλουν στους καρπούς. Για την πρόληψη της μόλυνσης πριν τη συγκομιδή υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τη βελτίωση της ανθεκτικότητας των φυτών στα έντομα, στο φυτικό στρες και σε καλλιεργητικά χαρακτηριστικά. Η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών είναι η πιο αποτελεσματική και οικονομική στρατηγική προσυλλεκτικά για τη μείωση και αποφυγή της μόλυνσης των καλλιεργειών με αφλατοξίνη. Ανθεκτικότητα των καλλιεργειών στη μόλυνση με αφλατοξίνη μπορεί να επιτευχθεί κυρίως με τρεις τρόπους (Γεωργιάδου, 2009):

- 1) ανθεκτικότητα στην εισβολή του μύκητα
- 2) ανθεκτικότητα στα έντομα
- 3) παρεμπόδιση του σχηματισμού αφλατοξίνης

Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η εμπορικά πλέον παραγωγή των διαγονιδιακών Bt (από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*) καλαμποκιού και αραχίδιας. Σε αυτά τα φυτά έχει ενσωματωθεί γονίδιο από το προαναφερόμενο βακτήριο και παράγουν μία πρωτεΐνη (η οποία αναφέρεται ως Cry πρωτεΐνη λόγω της κρυσταλλικής της δομής) η οποία είναι τοξική σε διάφορα έντομα. Αυτά τα διαγονιδιακά φυτά είναι εμπορικά διαθέσιμα από τα μέσα της δεκαετίας του '90 και εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα μόλυνσης από αφλατοξίνη. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι τα αποτελέσματα δεν εμφάνιζαν μονιμότητα (Γεωργιάδου, 2009).

Γ) Ελεγχόμενα μονοπάτια σηματοδότησης

Έχουν επικεντρωθεί προσπάθειες στην αναγνώριση φυτικών πρωτεϊνών που είναι σημαντικές για την άμυνα κατά της εισβολής του *A. flavus*. Ομοίως, η προσπάθεια έχει επικεντρωθεί σε συγκεκριμένα μόρια, όπως οξυγονωμένα ακόρεστα λιπαρά οξέα που εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης. Αυτά τα μόρια μπορούν να ρυθμίζουν την παραγωγή σκληρωτίων και κονιδίων, καθώς και το δευτερογενή μεταβολισμό, όπως την παραγωγή αφλατοξίνης (Harris, 2013).

Δ) Καταπολέμηση με μυκητοκτόνα

Ελέγχεται η αποτελεσματικότητά τους και η δυνατότητα να συνδυαστούν με τη βιολογική καταπολέμηση (Harris, 2013).

Ε) Βιολογική αντιμετώπιση με μη-τοξικογόνα στελέχη *A. flavus* και σαπροφυτικές ζύμες

Η χρήση πολλών από τις διαθέσιμες φυσικές και χημικές μεθόδους για την αποτοξικοποίηση των γεωργικών προϊόντων που έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες είναι περιορισμένη λόγω προβλημάτων που αφορούν θέματα ασφάλειας, πιθανές απώλειες στη διατροφική ποιότητα των επεξεργασμένων προϊόντων, σε συνδυασμό με την περιορισμένη αποτελεσματικότητα και τις επιπτώσεις του κόστους. Επιπλέον, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα πολλών παθογόνων μυκήτων καθώς και η αύξηση ανησυχίας του κοινού για τους κινδύνους που συνδέονται με τη χρήση φυτοφαρμάκων έχει οδηγήσει σε σημαντικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη εναλλακτικών, χωρίς αντιδραστήρια και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων για τον έλεγχο επιβλαβών οργανισμών και ασθενειών. Ο βιολογικός έλεγχος με τη χρήση μικροβιακών ανταγωνιστών έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τον έλεγχο των αφλατοξινών καθώς και ορισμένων άλλων μυκοτοξινών.

Αρκετοί οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων βακτηριδίων, ζυμών και μη-τοξινογενών μυκήτων, έχουν ελεγχθεί για την ικανότητά τους να μειώνουν την πιθανότητα μόλυνσης από μυκοτοξίνες (Harris, 2013). Η εφαρμογή μη-τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus* και του *A. parasiticus* στον αγρό είναι μία πολύ επιτυχημένη στρατηγική μείωσης της μόλυνσης με αφλατοξίνη πριν τη συγκομιδή (Γεωργιάδου, 2009). Μη-τοξικογόνα στελέχη *Aspergillus* που εφαρμόζονται στο έδαφος έχουν την ίδια ικανότητα να επιβιώσουν στο φυσικό περιβάλλον και καταλαμβάνουν τις ίδιες θέσεις με τα φυσικά τοξικά στελέχη. Μπορούν, επομένως, να είναι σε θέση να ανταγωνίζονται και να αντικαθιστούν τα τοξικογόνα στελέχη (Harris, 2013). Αυτή η μέθοδος της αντικατάστασης του τοξικογόνου πληθυσμού από μη-τοξικογόνο έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στο βαμβάκι, στην αραχίδα και στον αραβόσιτο. Τα στελέχη τα οποία επιλέγονται για βιολογική καταπολέμηση θα πρέπει να ικανοποιούν δύο βασικά

κριτήρια. Πρώτον, θα πρέπει να είναι γενετικά σταθερά έτσι ώστε να μην παράγουν αφλατοξίνη υπό οποιεσδήποτε συνθήκες, και δεύτερον, θα πρέπει να είναι ανταγωνιστικά ώστε να επικρατούν των τοξικογόνων στελεχών στη φύση (Γεωργιάδου, 2009). Η *in vitro* αποτελεσματικότητα δεν προϋποθέτει και την *in vivo* αποτελεσματικότητα. Παρά το γεγονός ότι η χρήση παραγόντων βιολογικού ελέγχου είναι συχνά επιτυχής στο εργαστήριο, η εμπορευματοποίησή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το αν μπορούν να ελέγχουν συστηματικά μυκοτοξιογενείς μύκητες σε διαφορετικές θέσεις και ποικιλίες και αν μειώνουν τα επίπεδα μυκοτοξινών κάτω από τα θεσμοθετημένα όρια.

Οι μικροοργανισμοί ως παράγοντες βιοελέγχου έχουν ένα σχετικά στενό φάσμα δραστηριότητας σε σύγκριση με τα περισσότερα χημικά μυκητοκτόνα. Ο βιολογικός έλεγχος είναι πολύπλοκος και περιλαμβάνει μια σειρά βιολογικών, περιβαλλοντικών και οικονομικών μεταβλητών. Οι νέοι παράγοντες βιοελέγχου πρέπει να είναι ασφαλείς, αποτελεσματικοί για το στοχευόμενο φυτοπαθογόνο και οικονομικά αποδοτικοί (Harris, 2013). Ορισμένοι από τους παράγοντες βιοελέγχου για τις μυκοτοξίνες αναφέρονται στον πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5. Παραδείγματα παραγόντων βιοελέγχου που ελέγχουν τους μυκοτοξιογενείς μύκητες και τις μυκοτοξίνες (Harris, 2013).

Targeted mycotoxigenic fungus	Targeted mycotoxin	Biocontrol agent
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxin	Atoxigenic <i>Aspergillus</i> strains
<i>Aspergillus spp.</i>	Aflatoxin	Lactic acid bacteria
<i>Aspergillus spp.</i>	Aflatoxin	Fungal strains that detoxify AF
<i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i>	Ochratoxin A	Phyllosphere yeasts
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Kluyveromyces sp.</i>
<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	DON	<i>Fusarium equiseti</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin	<i>A. pullulans</i> , <i>P. syringae</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>

Παραδείγματα εφαρμογής παραγόντων βιοελέγχου

Στο βαμβάκι, το μη-τοξικογόνο στέλεχος AF36 πήρε έγκριση για εφαρμογή στις βαμβακοκαλλιέργειες επιδεικνύοντας την υψηλότερη ικανότητα επιβίωσης και τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη μείωση του επιπέδου της αφλατοξίνης. Παρόμοιες εφαρμογές έχουν γίνει με επιτυχία στον αραβόσιτο και την αραχίδα. Επίσης το μη-τοξικογόνο στέλεχος *A. flavus* TX9-8 έχει απομονωθεί και δοκιμαστεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα ως ανταγωνιστικό των τοξικογόνων στελεχών του *A. flavus* (Γεωργιάδου, 2009).

Η εφαρμογή μη αφλατοξιγενών στελεχών του *A. parasiticus* στο έδαφος του χωραφιού έχει αναφερθεί να οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα αφλατοξίνης σε καλλιέργειες φιστικιού, με τα επίπεδα να μειώνονται από 531 µg/kg, 96 µg/kg και 241 µg/kg σε μη κατεργασμένα εδάφη σε επίπεδα 11 µg/kg, 1 µg/kg και 40 µg/kg για τα επεξεργασμένα χώματα σε τρία συνεχόμενα χρόνια (1987, 1988 και 1989), αντίστοιχα. Σε μια άλλη μελέτη, διάρκειας δύο ετών, ο Dorner κ.ά. διαπίστωσαν ότι η εφαρμογή των μη-τοξιγενών στελεχών των *A. flavus* και *A. parasiticus* σε εδάφη καλλιέργειας φιστικιού σε διαφορετικές δόσεις μείωσαν τη μόλυνση με αφλατοξίνες από 74,3 έως 99,9%. Σε μια άλλη μελέτη, ένα μη αφλατοξιγενές στέλεχος *A. flavus* μείωσε τη μόλυνση αφλατοξίνης κατά 80 έως 95% στον αραβόσιτο.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι, για να είναι αποτελεσματικά στη μείωση των επιπέδων μόλυνσης με αφλατοξίνη, μη-τοξιγενή στελέχη του *Aspergillus* πρέπει να εφαρμόζονται με μία μέθοδο και σε χρόνο που να επιτρέπει τον επιτυχή ανταγωνισμό με τα στελέχη *Aspergillus* που παράγουν αφλατοξίνες. Στη θεωρία, μη-τοξιγενή στελέχη εφαρμόζονται μία φορά ανά καλλιεργητική περίοδο όταν τα συνολικά επίπεδα *A. flavus* στο χωράφι είναι χαμηλά, παρέχοντας έτσι στο στέλεχος που εφαρμόζεται το χρόνο και την επιθυμητή έκθεση για να εγκατασταθεί στην καλλιέργεια (Harris, 2013).

Μία άλλη εφαρμογή βιολογικού ελέγχου αφορά σαπροφυτικές ζύμες, οι οποίες είναι πολύ κοινές στην επιφάνεια των φύλλων και των καρπών. Κάποιες από αυτές οι οποίες απομονώθηκαν από αμύγδαλα, φιστίκια και φουντούκια δοκιμάζονται ως προς την ανταγωνιστική τους ικανότητα σε σχέση με τον *A. flavus*. Ένα συγκεκριμένο στέλεχος της ζύμης *Pichia anomala* WRL-076 δοκιμάστηκε σε φιστικεώνες στην Καλιφόρνια με αποτέλεσμα να υπάρξει μείωση στον αποικισμό από τον *A. flavus* και μείωση της παραγωγής σπορίων του (Γεωργιάδου, 2009).

ΣΤ) Μελέτη προγνωστικών μοντέλων

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η στρατηγική αντιμετώπισης του προβλήματος στο χωράφι εντοπίζεται επιπλέον σε συγκέντρωση και καταγραφή ενός τεράστιου όγκου πληροφοριών (κλιματολογικών, εντομολογικών, καλλιεργητικών), ώστε να είναι εφικτή μία πρόγνωση για την πιθανότητα μόλυνσης με αφλατοξίνη. Διάφορα τέτοια μοντέλα είναι διαθέσιμα σε ερευνητικό επίπεδο και με δυνατότητα εφαρμογής σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές, αλλά δεν έχει ελεγχθεί ακόμα η αποτελεσματικότητά τους στην πράξη.

A.4.15.2 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης κατά τη συγκομιδή

Οι πρακτικές που αφορούν τη πρόληψη ή μείωση της μόλυνσης από αφλατοξίνη κατά τη συγκομιδή περιγράφονται παρακάτω (Γεωργιάδου, 2009):

A) Ο χρόνος συγκομιδής είναι πολύ σημαντική παράμετρος στη μόλυνση από αφλατοξίνες, διότι όσο προχωρεί η ωρίμανση οι καρποί γίνονται πιο ευάλωτοι στις μολύνσεις τόσο από Ασπέργιλλους όσο και από άλλους μύκητες ή έντομα. Όσο πιο νωρίς γίνεται η συγκομιδή, τόσο μεγαλύτερες πιθανότητες υπάρχουν να είναι άθικτη εξωτερικά η φλούδα και να προστατεύει αποτελεσματικά το σπέρμα από την είσοδο του μύκητα και τη μόλυνση με αφλατοξίνη.

B) Τα πανιά συγκομιδής πρέπει να είναι καθαρά ώστε να προλαμβάνεται οποιαδήποτε μόλυνση από το μύκητα.

Γ) Οι καρποί δεν θα πρέπει να έρχονται σε επαφή με το έδαφος, διότι οι Ασπέργιλλοι υπάρχουν στο έδαφος και μπορεί να μολύνουν τους καρπούς.

Δ) Οι καρποί δεν πρέπει να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (περισσότερο από 24 ώρες) στα σακιά, διότι οι χειρισμοί της συγκομιδής δημιουργούν πληγές, από τις οποίες μπορεί να εισέλθουν οι Ασπέργιλλοι και να μολύνουν τους καρπούς εσωτερικά. Επιπλέον, μέσα στα σακιά υπάρχουν και φύλλα τα οποία αποτελούν εστίες μόλυνσης.

A.4.15.3 Έλεγχος σχηματισμού αφλατοξίνης μετά τη συγκομιδή

Αμέσως μετά τη συγκομιδή του φιστικιού

Αμέσως μετά τη συγκομιδή θα πρέπει να ακολουθούνται οι παρακάτω ορθές πρακτικές (Γεωργιάδου, 2009):

- 1) Αφαίρεση από τα δένδρα των καρπών που έχουν παραμείνει μετά τη συγκομιδή.
- 2) Καλό κλάδευμα για αερισμό του φιστικεώνα και μείωση της σχετικής υγρασίας.
- 3) Καθαρισμός των χωραφιών από τα υπολείμματα του κλαδέματος ή των φυτικών υπολειμμάτων, τα οποία λειτουργούν ως εστίες μόλυνσης από τον *Aspergillus flavus*.
- 4) Καταγραφές όλων των επεμβάσεων που γίνονται στο φιστικεώνα (φυτοπροστασία, λίπανση, κλάδεμα, άρδευση, συγκομιδή κ.λ.π.) ή άλλες παρατηρήσεις (π.χ. μετεωρολογικά δεδομένα), ώστε να μπορούν να υπάρχουν πληροφορίες σε περίπτωση που ανιχνευθεί αφλατοξίνη.

Κατά την αρχική επεξεργασία του φιστικιού

Κατά την αρχική επεξεργασία του φιστικιού θα πρέπει να ακολουθούνται τα εξής παρεμποδιστικά για τη μόλυνση με αφλατοξίνη μέτρα:

A) Αποφλοιώση

Η αποφλοιώση θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατό συντομότερα (σε λιγότερο από 24 ώρες μετά την ολοκλήρωση της συγκομιδής). Καθυστερήσεις μεταξύ της συγκομιδής και της περαιτέρω επεξεργασίας θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται, διότι αυξάνεται η πιθανότητα προσβολής και παραγωγής αφλατοξίνης από το μύκητα *Aspergillus flavus*. Εάν η αποφλοιώση δεν μπορεί να γίνει άμεσα, τότε το προϊόν θα πρέπει να αποθηκεύεται σε τέτοιες συνθήκες ώστε να προστατεύεται από έντομα, μυρμήγκια, ζώα, μύκητες, σκόνη και φυτικά υπολείμματα (Γεωργιάδου, 2009). Προβλήματα που προκαλούνται από αναπόφευκτες καθυστερήσεις μπορεί να μειωθούν με ψυχρή αποθήκευση σε 0 °C (32 °F) σε <70% RH (Ferguson et al., 2005).

B) Ξήρανση

Η ξήρανση θα πρέπει να γίνεται το συντομότερο δυνατό. Το τελικό προϊόν θα πρέπει να έχει υγρασία <6% ώστε να μην είναι ευνοϊκή η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή αφλατοξίνης. Η ποσότητα αφλατοξίνης μειώνεται στην περίπτωση που η ποσότητα κατά τη συγκομιδή ήταν χαμηλή και η ξήρανση έγινε σε ξηραντήριο. Η ποσότητα αφλατοξίνης παραμένει σε υψηλά επίπεδα στην περίπτωση που πριν τη συγκομιδή είχαν ανιχνευθεί, επίσης, υψηλές ποσότητες και εάν η ξήρανση είχε γίνει σε ανοιχτό χώρο στον ήλιο. Εφόσον η ξήρανση γίνεται στον ήλιο, ο κίνδυνος επιμόλυνσης είναι μεγαλύτερος. Θα πρέπει ο χώρος που απλώνεται το φιστίκι να είναι καθαρός και να μαζεύεται σε περίπτωση βροχής (Γεωργιάδου, 2009).

Κατά την ενδιάμεση επεξεργασία του φιστικιού

Μετά την ξήρανση το τελικό προϊόν θα πρέπει να αποθηκεύεται σε ψυγείο σε κατάλληλες συνθήκες (<10 °C και <70% σχετική υγρασία). Η οποιαδήποτε μεταφορά του προϊόντος θα πρέπει να γίνεται με καθαρούς σάκους, το προϊόν να μην έρχεται σε επαφή με εστίες μόλυνσης και τα μέσα μεταφοράς να είναι καθαρά. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, διότι οποιαδήποτε μόλυνση ή παραγωγή αφλατοξίνης συμβεί μετά τη ξήρανση δεν υπάρχει τρόπος να μειωθεί. Μετά τη παράδοση του αποξηραμένου προϊόντος στις μονάδες μεταποίησης θα πρέπει να ακολουθούνται πρακτικές πρόληψης (Γεωργιάδου, 2009):

- 1) Να γίνεται άμεση διαλογή (χειρο-διαλογή ή μηχανικά) και να αφαιρούνται ξένα υλικά, ποιοτικά υποβαθμισμένοι καρποί ή καρποί με προσβολές από έντομα, διότι τέτοιοι καρποί, που έχουν διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά από τα φυσιολογικά, τείνουν να προσβάλλονται από μύκητες και σχετίζονται με την ύπαρξη αφλατοξίνης. Για το σχεδιασμό και τη λειτουργία των συστημάτων διαλογής, απαραίτητη είναι η γνώση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των φιστικιών.
- 2) Τα επίπεδα της υγρασίας των καρπών θα πρέπει να ελέγχονται λαμβάνοντας αντιπροσωπευτικά δείγματα. Επίσης, το όργανο μέτρησης της υγρασίας θα πρέπει να είναι βαθμονομημένο.

- 3) Το προσωπικό που χειρίζεται το προϊόν θα πρέπει να έχει εκπαιδευτεί και να του έχουν δοθεί οδηγίες υγιεινής (προσωπική υγιεινή, προστατευτική ενδυμασία, χρήση τουαλέτας κ.λ.π.).
- 4) Τόσο ο χώρος όσο και ο εξοπλισμός όπου γίνεται η επεξεργασία του προϊόντος θα πρέπει να καθαρίζεται τακτικά και να εφαρμόζονται όλες οι οδηγίες υγιεινής. Θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από έντομα, ζώα (εντομοκτονία-μυοκτονία) και φυτικά υπολείμματα, τα οποία αποτελούν φορείς ή εστίες μόλυνσης των μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνη.

Κατά την αποθήκευση του φιστικιού

Κατά την αποθήκευση θα πρέπει να ακολουθούνται οι παρακάτω πρακτικές πρόληψης (Γεωργιάδου, 2009):

- 1) Θα πρέπει να ελέγχεται δειγματοληπτικά το προϊόν για αφλατοξίνες πριν την αποθήκευση στο ψυγείο.
- 2) Ο χώρος αποθήκευσης θα πρέπει να είναι καθαρός, στεγνός (να μην υπάρχουν νερά στο δάπεδο ή τους τοίχους), απαλλαγμένος από έντομα και μύκητες και να προστατεύεται από τη βροχή, τα τρωκτικά, τα πουλιά και άλλα ζώα.
- 3) Η εντομοκτονία θα πρέπει να γίνεται με εγκεκριμένα εντομοκτόνα ώστε να μην υπάρξουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων στο τελικό προϊόν.
- 4) Οι συνθήκες αποθήκευσης θα πρέπει να είναι κατάλληλες. Η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι μεταξύ 0-10 °C και η σχετική υγρασία <70%, με μικρές διακυμάνσεις. Οι συνθήκες θα πρέπει να ελέγχονται με βαθμονομημένα όργανα μέτρησης.
- 5) Οι σάκοι στους οποίους έχει αποθηκευτεί το φιστίκι θα πρέπει να είναι κατάλληλα τοποθετημένοι ώστε να αερίζονται καλά.
- 6) Δημιουργία συστημάτων διαλογής μολυσμένων ή «ύποπτων» καρπών με βάση κάποια ιδιότητα (π.χ. χρώμα, ανίχνευση κάποιας εξωτερικής παραμόρφωσης) με τη χρήση νέων τεχνολογιών.
- 7) Εφαρμογή ταχείας ξήρανσης με ξηραντήρες ηλιακής ενέργειας.
- 8) Δημιουργία φθηνών διαγνωστικών εργαλείων για έλεγχο αφλατοξινών.
- 9) Δημιουργία ταχέων μεθόδων ανίχνευσης αφλατοξίνης σε προϊόντα.

- 10) Αποικοδόμηση της αφλατοξίνης στους μολυσμένους καρπούς με αμμωνιοποίηση και οξονοποίηση. Το πρόβλημα είναι η καταστροφή ορισμένων θρεπτικών συστατικών και η ποιοτική τους υποβάθμιση και επιπλέον, η δημιουργία νέων χημικών ενώσεων (μεταβολιτών) άγνωστης τοξικότητας.
- 11) Δέσμευση της αφλατοξίνης με προσρόφηση σε ορυκτά μέταλλα ή διάφορα οργανικά υλικά (κύτταρα από ζύμες).
- 12) Εγκατάσταση και εφαρμογή συστήματος ιχνηλασιμότητας, ώστε να είναι δυνατή η απόσυρση οποιασδήποτε μη-αποδεκτής παρτίδας.

Στο στάδιο της αποθήκευσης, βρίσκεται αφλατοξίνη σε πολύ υψηλές ποσότητες όταν και στην ξήρανση οι ποσότητες που έχουν ανιχνευθεί είναι υψηλές. Η ποσότητα αφλατοξίνης αυξάνεται σε πολύ υψηλά επίπεδα, όταν οι καρποί έχουν αποθηκευτεί σε ιδιόκτητο χώρο-αποθήκη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αφλατοξίνη, συνήθως, δεν ανιχνεύεται σε φιστίκια που έχουν αποθηκευτεί σε ψυγείο σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (Γεωργιάδου, 2009).

A.4.16 Μέθοδοι παρεμπόδισης δημιουργίας και τεχνικές αποδόμησης, απενεργοποίησης και καταστροφής αφλατοξίνης και άλλων παθογόνων για το φιστίκι μικροοργανισμών

A) Μικροβιακή απενεργοποίηση

Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τις αντιμυκητιασικές ιδιότητες των διαφόρων βακτηρίων γαλακτικού οξέος, τα οποία μπορεί να εμφανίζουν δραστηριότητα έναντι αρκετών ειδών *Aspergillus* και ενός ευρέος φάσματος άλλων μυκοτοξιογόνων μυκήτων. Αυτά τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος έχουν μια μακρά ιστορία χρήσης σε τρόφιμα και θεωρούνται ασφαλή. Αυτά τα βακτήρια παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις, π.χ., γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, υπεροξειδίο του υδρογόνου, βακτηριοσίνες, και χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνούχες ενώσεις, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού πηγών άνθρακα. Έτσι, ανταγωνίζονται τα τοξικογενή είδη προκαλώντας οξίνιση του περιβάλλοντος και καταστρέφοντας τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται τα τοξικογενή είδη.

Κάποιοι μύκητες και ορισμένες καλλιέργειες βακτηρίων έχουν δειχθεί να αποτοξικοποιούν την AFB₁ κατά 65 έως 99% σε 5 ημέρες στους 28±2 °C. Ορισμένα στελέχη των *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* έχουν δειχθεί να αποικοδομούν AFB₁ στο γάλα μέσω ζύμωσης. Το *Flavobacterium aurantiacum* μπορεί να αφαιρέσει σημαντικά την AFB₁ από ένα υγρό μέσο και από μια ποικιλία από προϊόντα διατροφής, συμπεριλαμβανομένων γάλατος, φιστικιών, καλαμποκιού, χωρίς να αφήνει τοξικά υποπροϊόντα. Στέλεχος του *F. aurantiacum* NRRL-B-184 απομάκρυνε 79,9 έως 98,9%, 92,6 έως 99,8%, και 88,7 έως 100% AFB₁ από αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, φιστίκια και κόκκινο πιπέρι, αντίστοιχα, εντός 48 ωρών (Harris, 2013).

B) Τροποποίηση της τοξικότητας από διαιτητικά χημικά

Η τοξικότητα των μυκοτοξινών μπορεί να επηρεαστεί έντονα από διαιτητικές χημικές ουσίες που μεταβάλλουν τις φυσιολογικές αποκρίσεις των συστημάτων των θηλαστικών στις μυκοτοξίνες. Χημικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων διατροφικών συστατικών (π.χ. πρωτεΐνη, λίπος, βιταμίνες, και ιχνοστοιχεία), τροφίμων και πρόσθετων ζωοτροφών (π.χ. αντιβιοτικά και συντηρητικά), μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τις επιδράσεις των αφλατοξινών στα θηλαστικά (Cornell University, 2015). Ωστόσο για την εμπορική εφαρμογή αυτών των ουσιών θα πρέπει να διερευνηθούν τρόποι πρόσληψης μέσω της τροφής, να αξιολογηθεί το κόστος σε συνάρτηση με την αποτελεσματικότητα, να αναζητηθούν παράπλευρες επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων και να υπάρξει κοινωνική αποδοχή (Razzaghi-Abyaneh, 2013).

Γ) Μείωση της βιοδιαθεσιμότητας της αφλατοξίνης με τη βοήθεια χημειοπροσροφητών αφλατοξίνης

Μια νέα προσέγγιση για την αποτοξικοποίηση των αφλατοξινών είναι η προσθήκη ανόργανων υλικών προσροφητή, γνωστών ως χημειοπροσροφητών, όπως φυλλοπυριτική άργυλο (Hydrated Sodium Calcium Alumino Silicate - HSCAS) στη διατροφή των ζώων. Το HSCAS έχει την ικανότητα να δεσμεύει και να ακινητοποιεί

αφλατοξίνες στη γαστρεντερική οδό των ζώων, με αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση της βιοδιαθεσιμότητας αφλατοξίνης (Cornell University, 2015).

Αξιοσημείωτη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των αφλατοξινών έχει πραγματοποιηθεί μέσω της προσθήκης HSCAS ή άλλων οργανικών υλικών (π.χ. κυτταρικά τοιχώματα ζυμών) στις ζωοτροφές, τα οποία εκλεκτικά απορροφούν μέσω χημειοπροσρόφησης τις αφλατοξίνες στο γαστρεντερικό σύστημα των ζώων. Παρόμοια δράση εμφανίζουν και άλλα ορυκτά υλικά, όπως ο αργιλικός ασβεστούχος μοντμοριλονίτης (calcium montmorillonite clays). Το κρίσιμο σημείο αυτής της στρατηγικής αντιμετώπισης των αφλατοξινών είναι ότι θα πρέπει να ελέγχεται η ασφάλεια των προϊόντων αποικοδόμησης, διότι οι μεταβολίτες δε θα πρέπει να είναι τοξικοί στον άνθρωπο και στα ζώα. Επίσης, θα πρέπει να αξιολογείται η επίδραση αυτών των επεμβάσεων στη θρεπτική αξία και στις οργανοληπτικές ιδιότητες των επεξεργασμένων προϊόντων (Razzaghi-Abyaneh M., 2013).

Δ) Αποδόμηση με χημική επεξεργασία

Μια ομάδα χημικών ουσιών έχει ελεγχθεί για την ικανότητά της να αποδομεί και απενεργοποιεί αφλατοξίνες. Οι χημικές αυτές ουσίες μπορούν να αντιδράσουν για να καταστρέψουν (ή υποβαθμίσουν) αφλατοξίνες αποτελεσματικά, αλλά οι περισσότερες είναι δυνητικά μη ασφαλείς λόγω του σχηματισμού των τοξικών καταλοίπων ή της διατάραξης της περιεκτικότητας θρεπτικών συστατικών και των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του προϊόντος. Δύο χημικές προσεγγίσεις για την αποτοξικοποίηση των αφλατοξινών που έχουν λάβει σημαντική προσοχή είναι η αμμωνιοποίηση και η αντίδραση με όξινο θειώδες νάτριο. Πολλές μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι η χημική επεξεργασία μέσω αμμωνιοποίησης μπορεί να παρέχει μια αποτελεσματική μέθοδο για να αποτοξικοποιήσει μολυσμένο με αφλατοξίνη καλαμπόκι. Ο μηχανισμός για τη δράση αυτή φαίνεται να περιλαμβάνει υδρόλυση του δακτυλίου της λακτόνης και χημική μετατροπή της ένωσης αφλατοξίνης B₁ σε πολλά προϊόντα τα οποία εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη τοξικότητα. Από την άλλη πλευρά, το όξινο θειώδες νάτριο έχει δείχθει ότι αντιδρά με αφλατοξίνες (B₁, G₁ και M₁) υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης και χρόνου για να σχηματίσει υδατοδιαλυτά προϊόντα (Cornell University, 2015).

Ε) Θερμική απενεργοποίηση

Αν και οι αφλατοξίνες είναι πολύ σταθερές έχει διερευνηθεί η δυνατότητα της θερμικής απενεργοποίησής τους, (θερμοκρασία απενεργοποίησης 237-306 °C). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα δεν είναι σταθερή και ο βαθμός καταστροφής εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση, τη θερμοκρασία και το χρόνο επεξεργασίας, την περιεκτικότητα σε υγρασία, το pH και την ιονική ισχύ του τροφίμου (Razzaghi-Abyaneh M., 2013).

Αυτές οι διεργασίες μπορούν να εξουδετερώσουν αποτελεσματικά τα παθογόνα, αλλά αλλοιώνουν παράλληλα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καρπών με κέλυφος (αλλαγές στα χαρακτηριστικά υφής, αρώματος, χρώματος, γεύσης) (Harris, 2013).

ΣΤ) Μη θερμικές τεχνολογίες

Οι μη θερμικές τεχνολογίες έχουν δειχθεί ότι επηρεάζουν τις φυσικές, χημικές και οργανοληπτικές ιδιότητες σε μικρότερο βαθμό απ' ό, τι οι θερμικές επεξεργασίες. Για να θεωρηθεί αποτελεσματική, η θεραπεία πρέπει να καταστρέψει τον οργανισμό-στόχο αποτελεσματικά. Για να διασφαλιστεί η οικονομική βιωσιμότητα, η διαδικασία πρέπει να είναι οικονομικά αποτελεσματική, εφικτή, αποδεκτή από τους καταναλωτές, και να έχει λάβει νόμιμη έγκριση (Harris, 2013).

1) Διεργασία με οξείδιο του προπυλενίου (PPO)

Το οξείδιο του προπυλενίου (PPO) είναι ένα καταχωρημένο στην ΕΡΑ (Environmental Protection Agency – Εταιρεία Περιβαλλοντικής Προστασίας) φυτοφάρμακο εγκεκριμένο ως απολυμαντικό για διάφορους ξηρούς καρπούς, σκόνη κακάο και μπαχαρικών. Το PPO είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την απεντόμωση και το συνολικό μικροβιακό έλεγχο και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία ξηρών καρπών στις ΗΠΑ. Η υπολειμματική περιεκτικότητα του οξειδίου του προπυλενίου σε επεξεργασμένη ψίχα καρπού περιορίζεται σε 300 mg/kg και η υπολειμματική περιεκτικότητα του προϊόντος της αντίδρασης, προπυλενοχλωροδρίνη, περιορίζεται σε 10 mg/kg. Ορισμένες χώρες δεν έχουν θεσπίσει όριο ανοχής για τα υπολείμματα PPO.

Γενικά, το προϊόν τοποθετείται σε ένα προθερμασμένο θάλαμο, ο αέρας εκκενώνεται και αντικαθίσταται με PPO. Το σημείο βρασμού του PPO είναι 34,23 °C σε ατμοσφαιρική πίεση (101 kPa). Έτσι, ο θάλαμος θερμαίνεται (> 45.5 °C) πριν από την ένεση με PPO για να βεβαιωθούμε ότι το PPO είναι σε φάση ατμού. Μετά από πέντε διεργασίες, ο θάλαμος καπνισμού υποβάλλεται σε καθαρισμό με χρήση πολλαπλών κύκλων αερισμού για την απομάκρυνση του υπολειμματικού PPO από το θάλαμο. Μετά την επεξεργασία PPO, οι ψίχες συνήθως αποθηκεύονται σε μια περιοχή εγκλιματισμού για περίπου δύο έως πέντε ημέρες, ώστε να εξασφαλίζεται ότι το υπόλειμμα επί του προϊόντος είναι μικρότερο από την ανοχή των 300 mg/kg. Η απολύμανση των καρπών κατά τις θεραπείες με αέριο εξαρτάται από τη συγκέντρωση, το χρόνο έκθεσης, τη θερμοκρασία έκθεσης, τη θερμοκρασία του προϊόντος, την υγρασία και το χρόνο κατακράτησης μετά την περίοδο διεργασίας (Harris, 2013).

2) Ακτινοβολήση

Η ακτινοβολήση είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά των παθογόνων και αλλοιογόνων οργανισμών και εντόμων. Ο όρος «ακτινοβολήση των τροφίμων» αναφέρεται στην έκθεση των τροφίμων σε ένα από τα τρία είδη της ιονίζουσας ακτινοβολίας: ακτίνες γ, ακτίνες X και δέσμες ηλεκτρονίων (σωματίδια β). Η ενέργεια είναι επαρκής για να προκαλέσει ιονισμό ή διέγερση των ηλεκτρονίων, αλλά ανεπαρκής για να επηρεάσει τα νετρόνια. Έτσι, αυτά τα κύματα είναι ανίκανα να επάγουν ραδιενέργεια. Οι ακτίνες γ εκπέμπονται από μια πηγή ραδιενέργειας και οι δέσμες ηλεκτρονίων ή οι ακτίνες X δημιουργούνται από έναν επιταχυντή ηλεκτρονίων. Οι περισσότερες εγκαταστάσεις ακτινοβολήσης σε όλο τον κόσμο χρησιμοποιούν το κοβάλτιο 60 ως πηγή για τις ακτίνες γ που περιέχονται σε εξαιρετικά θωρακισμένους θαλάμους.

Τα φωτόνια και ηλεκτρόνια που συνδέονται με υψηλής ενέργειας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μπορεί να καταστρέψουν απευθείας το μικροοργανισμό καταστρέφοντας το DNA του μικροοργανισμού-μύκητα, καθώς και την κυτταρική μεμβράνη διαταράσσοντας έτσι κυτταρικές λειτουργίες και προκαλώντας το θάνατο των κυττάρων. Οι έμμεσες επιδράσεις σχετίζονται με την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Αυτά τα ασταθή μόρια μπορούν να επιτεθούν στο σακχαρο-φωσφορικό σκελετό του

DNA, οδηγώντας σε μονά ή διπλά σπασίματα του κλώνου. Η ικανότητα ενός κυττάρου να ανακάμψει εξαρτάται από την ικανότητά του να επισκευάσει τα σπασίματα του κλώνου. Ελεύθερες ρίζες αντιδρούν, επίσης, με μεγάλα μόρια, όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, και πηκτίνες και μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες μεταβολές της ποιότητας, όπως οξείδωση του λίπους, αποπολυμερισμό πηκτίνης και ανάπτυξη ανεπιθύμητων γεύσεων (Harris, 2013).

Εφαρμογή της ακτινοβόλησης για βελτίωση της ασφάλειας των καρπών με κέλυφος

Παρόλο που ο *Aspergillus* μπορεί να καταστραφεί σε σχετικά χαμηλά επίπεδα ακτινοβόλησης, η αδρανοποίηση της τοξίνης του απαιτεί πολύ υψηλότερα επίπεδα διεργασίας. Οι Temcharoen και Thilly (1982) βρήκαν ότι ακτινοβόληση 50 ή 100 kGy απαιτούνταν για να εξαλειφθεί η αφλατοξίνη σε μολυσμένα φιστίκια (Harris, 2013).

Επίδραση της ακτινοβόλησης στην ποιότητα των καρπών με κέλυφος

Η υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά των καρπών τα καθιστά επιρρεπή στην οξείδωση των λιπιδίων σε υψηλά επίπεδα ακτινοβόλησης. Η ομάδα των Mexis και Kontominas έχει αξιολογήσει την επίδραση της ακτινοβόλησης σε διάφορους καρπούς, συμπεριλαμβανομένων των φιστικιών. Η οργανοληπτική ποιότητα ήταν αποδεκτή στο εύρος από 1,5 έως 3,0 kGy. Σε αυτές τις τιμές, μια μέτρια μείωση των μυκήτων (αλλά όχι των αφλατοξινών) μπορεί να επιτευχθεί (Harris, 2013).

3) Υπεριώδης ακτινοβολία

Η επεξεργασία UV περιλαμβάνει τη χρήση της ακτινοβολίας από την υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που κυμαίνεται από 100 έως 400 nm. Η περιοχή αυτή υποδιαιρείται σε (Harris, 2013):

- UVA (315-400 nm) που είναι συνήθως υπεύθυνη για τις αλλαγές στο ανθρώπινο δέρμα που οδηγούν σε μαύρισμα
- UVB (280-315 nm) που μπορεί να προκαλέσει κάψιμο του δέρματος και τελικά να οδηγήσει σε καρκίνο του δέρματος
- UVC (200-280 nm) που αδρανοποιεί αποτελεσματικά βακτήρια, μύκητες και ιούς

- το εύρος υπεριώδους κενού (100-200 nm), που μπορεί να απορροφηθεί από σχεδόν όλες τις ουσίες σχηματίζοντας λιγότερο τοξικά προϊόντα φωτοαποδόμησης

Οι ιδιότητες της UVC ακτινοβολίας οφείλονται κυρίως σε μεταλλάξεις του DNA, αν και η καταστροφή της μεμβράνης που οφείλεται σε τοπική θέρμανση θα μπορούσε, επίσης, να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει σε κυτταρικό θάνατο. Όταν το DNA απορροφά το υπεριώδες φως, αυτό προκαλεί διασυνδέσεις μεταξύ γειτονικών βάσεων θυμίνης και κυτοσίνης στον ίδιο κλώνο DNA πράγμα το οποίο εξασθενεί τη μεταγραφή και αντιγραφή του DNA οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Το επίπεδο των μεταλλάξεων που μπορεί να αντιστραφεί εξαρτάται από το σύστημα επιδιόρθωσης στο μικροοργανισμό-στόχο. Μόλις παρέλθει ένα χρονικό όριο, επέρχεται ο θάνατος των κυττάρων. Φωτοεπανενεργοποίηση των UVC βλαφθέντων κυττάρων μπορεί να συμβεί εάν τα κύτταρα εκτεθούν σε μήκη κύματος υψηλότερα των 330nm με αποτέλεσμα επισκευή στο επίπεδο του DNA και αύξηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων. Φωτοεπανενεργοποίηση μπορεί, επίσης, να προκαλέσει αλλοίωση του τροφίμου, ως εκ τούτου, τα UVC επεξεργασμένα τρόφιμα πρέπει να διατηρούνται υπό ψύξη ή στο σκοτάδι.

Η βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση της ακτινοβολίας UVC για στερεές τροφές, όπως ξηρούς καρπούς, είναι σπάνια. Σε μια αναφορά, ακτινοβολία UVC στα 254 nm χρησιμοποιήθηκε για να μειώσει τον *Aspergillus parasiticus* σε φουντούκια. Ο *A. parasiticus* μειώθηκε μετά από δύο ώρες επανειλημμένης έκθεσης σε UVC ακτινοβολία. Μια διεργασία έξι ωρών μείωσε τις αφλατοξίνες B₁ και G₁, αλλά οι αφλατοξίνες B₂ και G₂ δεν επηρεάστηκαν. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι διεργασία σε φουντούκια για δύο ώρες δεν έδειξε καμία οργανοληπτική αλλαγή, αλλά η διεργασία για έξι ώρες προκάλεσε ένα «καμένο» άρωμα (Harris, 2013).

4) Όζον

Το όζον είναι μία όλο και πιο δημοφιλής εναλλακτική λύση στα απολυμαντικά με βάση το χλώριο λόγω της αποτελεσματικής αντιμικροβιακής δράσης του και επειδή δε δημιουργεί υποπροϊόντα. Το όζον έχει εγκριθεί ως πρόσθετο τροφίμων από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων, είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός

παράγοντας και εξαιρετικά ασταθές. Επηρεάζει συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας την οξειδωση των γλυκοπρωτεϊνών, γλυκολιπιδίων, ή πρωτεϊνών που περιέχουν σουλφυδρυλικές ομάδες που οδηγούν σε αλλαγές διαπερατότητας της μεμβράνης και τελικά, σε κυτταρική λύση. Μπορεί, επίσης, να επηρεάσει την κυτταρική αναπνοή και να προκαλέσει ζημιά σε νουκλεϊκά οξέα. Έτσι, οι πολλαπλοί κυτταρικοί στόχοι κάνουν το όζον ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό αντιμικροβιακό. Η οργανική ύλη και η παρουσία αναγωγικών παραγόντων μπορεί να εξουδετερώσουν την αποτελεσματικότητα του όζοντος.

Η επαφή του όζοντος με τα τρόφιμα μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση. Η αέρια μορφή είναι πιο σταθερή, έχει μεγαλύτερη διείσδυση υπό πίεση, καλύτερη διάχυση σε μικροσκοπικούς πόρους και ρωγμές και δεν αφήνει κανένα υπόλειμμα που το καθιστά συμφέρον για χρήση σε καρπούς.

Η αποτελεσματικότητα του όζοντος για την απολύμανση καρπών έχει διερευνηθεί από διάφορες ομάδες. Ο Proctor και άλλοι (2004) ερεύνησαν την αποτελεσματικότητα του αέριου όζοντος στην καταστροφή αφλατοξινών σε κόκκους φιστικιού και αλεύρων σε διάφορες θερμοκρασίες (25, 50, 75 °C) και χρόνους έκθεσης (5, 10, και 15 λεπτά). Παρατήρησαν ότι η καταστροφή αφλατοξίνης αυξήθηκε με υψηλότερες θερμοκρασίες και μεγαλύτερους χρόνους διεργασίας και ότι η καταστροφή της τοξίνης ήταν μεγαλύτερη σε κόκκους φιστικιού απ' ό, τι σε αλεύρι. Οι Akbas και Ozdemir παρατήρησαν ότι το αέριο όζον είναι πιο αποτελεσματικό στην καταστροφή των αφλατοξινών σε πυρήνες κελυφωτών φιστικιών, απαιτώντας μικρότερο χρόνο έκθεσης και μικρότερες συγκεντρώσεις όζοντος για παρόμοιες μειώσεις στις συγκεντρώσεις αφλατοξίνης σε σύγκριση με τα φιστίκια εδάφους (αραχίδα). Οι οργανοληπτικές ιδιότητες των φιστικιών εδάφους μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά από διεργασία με 5,0 mg όζοντος/L για 140 λεπτά (Harris, 2013).

5) Απολυμαντικές διεργασίες

Διάφορες χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για να αποστειρώνουν τα ακατέργαστα προϊόντα. Ενώσεις του χλωρίου είναι από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες, αλλά ο κατάλογος περιλαμβάνει, επίσης, ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, οξέα τροφίμων και επιφανειοδραστικούς παράγοντες (Harris, 2013).

6) Low Pressure Cold Plasma

Το cold plasma είναι μια συλλογή μερικώς ιονισμένων αερίων. Αυτή η εξαιρετικά ενεργοποιημένη κατάσταση περιέχει ιόντα, ηλεκτρόνια, καθώς και ενεργά ουδέτερα είδη (ρίζες, άτομα και μόρια), τα οποία έχουν επαρκή ενέργεια για να σπάσουν ομοιοπολικούς δεσμούς οργανικών και ανόργανων ενώσεων που προκαλούν μικροβιακή καταστροφή και να ξεκινήσουν διάφορες χημικές αντιδράσεις.

Το cold plasma παράγει δραστικά είδη μοριακού οξυγόνου, όπως όζον, ατομικό οξυγόνο, υδροξύλιο, νιτρικό οξείδιο και ρίζες υπεροξειδίου, καθώς και άλλες ελεύθερες ρίζες. Έτσι, τα σπόρια του μύκητα αδρανοποιούνται με τη διάβρωση της επιφάνειάς τους.

Το πλάσμα μπορεί να αδρανοποιήσει μικροοργανισμούς σε χαμηλές θερμοκρασίες, διατηρώντας έτσι τη φρεσκάδα και τις θρεπτικές τους ιδιότητες. Επίσης, το πλάσμα δεν αφήνει υπολείμματα. Η επιλογή των αερίων είναι σημαντική για την αποτελεσματικότητα και την εφαρμογή τους. Για χρήση σε τρόφιμα, τα αέρια θα πρέπει να είναι GRAS (Generally Recognized As Safe – Γενικώς Αναγνωρισμένα Ως Ασφαλή), εύκολα εφαρμόσιμα, να μην αφήνουν υπολείμματα στο προϊόν, να είναι αποδοτικά στο κόστος και να μην προκαλούν βλάβη στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Ωστόσο, τα λιπίδια των καρπών μπορεί να επηρεαστούν από τα ενεργά είδη οξυγόνου που παράγονται από το cold plasma, προκαλώντας ανεπιθύμητες οργανοληπτικές αλλαγές.

Ο Basaran και άλλοι (2008) χρησιμοποίησαν χαμηλής πίεσης cold plasma που παράγεται με τη χρήση αέρα και εξαφθοριούχου θείου (SF₆) για την εξάλειψη *A. parasiticus* και της τοξίνης του σε φιστίκια. Το χρώμα, η οσμή, η υφή και η συνολική αποδοχή του προϊόντος δεν επηρεάστηκαν από τη διεργασία (Harris, 2013).

A.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

A.5.1 Διαδικασία πριν την ανάλυση του αποξηραμένου καρπού για την ανίχνευση αφλατοξίνης

Όπως προαναφέρθηκε, μία πολύ σημαντική, από πλευράς αποτελεσματικότητας, στρατηγική μείωσης των αφλατοξινών μετασυλλεκτικά είναι η χειροδιαλογή, μια ορθή πρακτική που εφαρμόζεται στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες χώρες παραγωγής πριν την αποθήκευση και ανάλυση για ύπαρξη αφλατοξίνης του αποξηραμένου καρπού. Εξειδικευμένοι, κατάλληλα εκπαιδευμένοι και έμπειροι εργάτες, αναγνωρίζοντας εξωτερικά συμπτώματα, διαχωρίζουν τους ελαττωματικούς, ποιοτικά υποβαθμισμένους καρπούς, οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί ως «ύποπτοι», με πολύ υψηλή πιθανότητα να είναι μολυσμένοι με αφλατοξίνη. Ωστόσο, ζημιές ή συμπτώματα (π.χ. εσωτερικές νεκρωτικές κηλίδες) στο εδώδιμο μέρος (σπέρμα), τα οποία δεν είναι ορατά στο ανθρώπινο μάτι, δεν μπορούν να εντοπιστούν ώστε να αφαιρεθούν οι καρποί. Για όλους τους προαναφερόμενους λόγους, προέκυψε η ανάγκη ανάπτυξης μηχανικών αυτόματων συστημάτων διαλογής υψηλής ταχύτητας και αξιοπιστίας, τα οποία ανιχνεύουν τους μολυσμένους ή «ύποπτους» καρπούς και τους απορρίπτουν. Οι προκλήσεις και απαιτήσεις στην ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος είναι πολλές: ο μεγάλος όγκος των προϊόντων που είναι υπό διαλογή, η υψηλή ταχύτητα που απαιτείται, παράλληλα με την ακρίβεια και αξιοπιστία του αποτελέσματος και όλα τα παραπάνω, σε συνάρτηση με το κόστος κατασκευής και λειτουργίας (Γεωργιάδου, 2015).

A.5.1.2 Αυτόματα συστήματα διαλογής

Ενώ η επιθεώρηση και η διαλογή συχνά εκτελούνται από ανθρώπινους φορείς, μερικές προσμίξεις και ελαττώματα είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευθούν αξιόπιστα. Ο Sablatnig (1997) παρουσιάζει μια λεπτομερή ανάλυση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων της διαλογής από ανθρώπους και υπολογιστές. Δύο από τα πιο κοινά θέματα είναι τα εξής: το ελάττωμα μπορεί να είναι πολύ μικρό για να ανιχνευθεί από το ανθρώπινο μάτι ή η ταχύτητα και ο όγκος στα οποία χρειάζεται το προϊόν να επιθεωρηθεί είναι κάτι περισσότερο από αυτά που ένας ανθρώπινος επιθεωρητής

μπορεί να χειριστεί. Αυτοματοποιημένα συστήματα διαλογής μπορούν με συνέπεια και αξιοπιστία να επιθεωρήσουν αντικείμενα τόσο μικρά και να αφαιρέσουν το ανεπιθύμητο προϊόν σε ταχύτητες επεξεργασίας πραγματικού χρόνου. Τέτοια συστήματα έχουν οδηγήσει σε μείωση του κόστους και επιτρέπουν την αυτόματη διαλογή ενός ευρέως φάσματος ξηρών καρπών.

Ο σχεδιασμός και η υλοποίηση ενός συστήματος διαλογής πρέπει να λάβει υπόψη ορισμένους περιορισμούς, ανάλογα με τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Οποιοδήποτε σύστημα διαλογής, ανθρώπινο, υπολογιστικό ή και τα δύο, θα απαιτήσει συμβιβασμούς ανάμεσα στην ταχύτητα, την ακρίβεια και το κόστος. Αλλαγές στην ευαισθησία μπορεί να μειώσουν τις απώλειες αλλά να αυξήσουν τους ψευδείς συναγερούς (καλό προϊόν να ταυτοποιείται ως κακό) σε απαράδεκτα επίπεδα. Ενώ η αύξηση του χρόνου που επιτρέπεται για την επιθεώρηση κάθε δείγματος επιτρέπει συχνά μεγαλύτερη ακρίβεια, οι παραγωγοί γενικά απαιτούν υψηλής ταχύτητας επεξεργασία.

Η ανάπτυξη ενός αυτοματοποιημένου συστήματος για την ταξινόμηση των προϊόντων παρουσιάζει μια σειρά από προκλήσεις: ο μεγάλος όγκος των προϊόντων που πρόκειται να ταξινομηθεί, και η ταχύτητα με την οποία πρέπει να επιτευχθεί ταχεία διεκπεραίωση αιτημάτων, σε συνδυασμό με ακριβείς και αξιόπιστους μηχανισμούς διαλογής. Το κόστος της απαιτούμενης τεχνολογίας μπορεί να κάνει το τελικό προϊόν οικονομικά μη πρακτικό. Ως εκ τούτου, ο έλεγχος του κόστους του εξοπλισμού αποτελεί υψηλή προτεραιότητα στην ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών διαλογής. Πολλά ελαττώματα και προσμείξεις είναι δύσκολο να διακριθούν από το επιθυμητό προϊόν. Κελύφη και χρωματικές παραλλαγές συγκαλύπτουν ή κρύβουν εξωτερικά ορατές ατέλειες, ενώ ορισμένες ατέλειες μπορεί να είναι εσωτερικές (όπως τα έντομα και οι μύκητες) και δεν είναι ορατές με γυμνό μάτι. Το αποτέλεσμα είναι γενικά η ανάγκη για πιο εξελιγμένους αισθητήρες και μεγαλύτερης ισχύος επεξεργασία για την εξαγωγή δεδομένων που μπορούν να διαφοροποιηθούν μεταξύ καλών και κακών προϊόντων, αυξάνοντας έτσι την πολυπλοκότητα και, κατά συνέπεια, το κόστος του συστήματος. Το περιβάλλον επεξεργασίας συχνά δημιουργεί δυσκολίες διαλογής. Τα φιστίκια, για παράδειγμα, συχνά τοποθετούνται σε νερό για να διαχωριστούν αυτά που επιπλέουν από εκείνα που βυθίζονται, δημιουργώντας ένα υγρό προϊόν το οποίο μπορεί να δημιουργήσει κατοπτρικές ανακλάσεις, ένα πιθανό πρόβλημα για τους αισθητήρες, τις

συσκευές απεικόνισης ή τους αλγόριθμους αναγνώρισης που χρησιμοποιούνται σε αυτοματοποιημένα συστήματα. Τέλος, φυσιολογική μεταβλητότητα του προϊόντος και συγκεκριμένες ιδιότητες που μπορεί να είναι επιθυμητές σημαίνει ότι είναι δύσκολο να βρεθεί μία στρατηγική που μπορεί να λειτουργήσει για όλους τους ξηρούς καρπούς. Όλες αυτές οι προκλήσεις έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος συσκευών και συστημάτων διαλογής (Harris, 2013).

Παρακάτω αναφέρουμε δύο αυτοματοποιημένα συστήματα διαλογής (Harris, 2013):

A) Συστήματα Computer Vision-Based Sorting (CVBS)

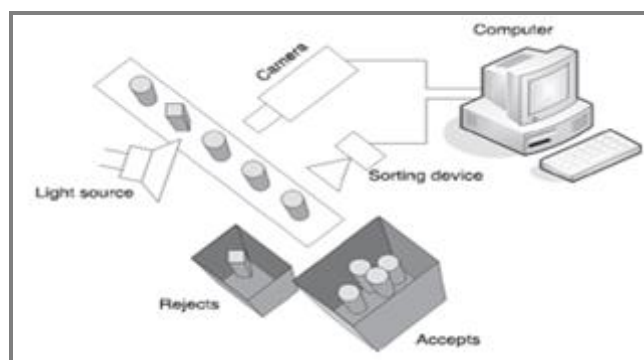
Η «υπολογιστική όραση» είναι ένας ευρύς όρος που καλύπτει ένα ευρύ φάσμα των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Ορίζουμε την υπολογιστική όραση ως την αυτοματοποιημένη διαδικασία η οποία κάνει χρήση ενός υπολογιστή (ή ισοδύναμου) για την ταξινόμηση των δεδομένων που προέρχονται από ένα αντικείμενο, είτε με τη μορφή παραδοσιακών εικόνων, εικόνων ακτινών X, υπερφασματικών εικόνων ή τιμών δεδομένων, όπως η απορρόφηση του φωτός. Αυτό μερικές φορές αναφέρεται, επίσης, ως τεχνητή όραση. Ένα γενικό σύστημα γι' αυτόν τον τύπο (CVBS) απεικονίζεται στην εικόνα 5.1.

Συνήθως, κάθε σύστημα αποτελείται από ένα τύπο συσκευής λήψης εικόνας, είτε μια κάμερα (CCD) είτε έναν αισθητήρα. Οι συσκευές στέλνουν δεδομένα σε έναν υπολογιστή, ο οποίος επεξεργάζεται τα στοιχεία αυτά, παίρνει μια απόφαση με βάση τις προκαθορισμένες συνθήκες και ενεργοποιεί μια συσκευή διαλογής που αφαιρεί το ανεπιθύμητο προϊόν.

Πλεονεκτήματα συστημάτων CVBS

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των συστημάτων CVBS σε σχέση με την οπτική διαλογή είναι ότι δεν περιορίζονται μόνο στο οπτικό φάσμα που είναι διαθέσιμο στο ανθρώπινο μάτι. Επιπλέον, τα συστήματα αυτά μπορεί να βελτιστοποιηθούν για να επικεντρωθούν μόνο σε χρήσιμα τμήματα του φάσματος, δυνητικά αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και τη μείωση του θορύβου. Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα των CVBS συστημάτων είναι η μη καταστρεπτική φύση τους, που μπορεί να βοηθήσει

στη βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος. Τα περισσότερα φιστίκια ταξινομούνται χρησιμοποιώντας ένα διαλογέα που χωρίζει τα κελυφωτά φιστίκια με διασπασμένο κέλυφος από τα φιστίκια με κλειστό κέλυφος. Αυτός ο διαλογέας προκαλεί μικρή ζημιά στον πυρήνα του φιστικιού που φαίνεται παρόμοια με καταστροφή από έντομα, αυξάνοντας την πιθανότητα για απόρριψη από τους καταναλωτές.



Εικόνα 5.1. Σύστημα CVBS (Harris, 2013).

Μειονεκτήματα συστημάτων CVBS

Υπάρχουν αρκετές πιθανές πηγές σφάλματος ειδικά για τα συστήματα CVBS. Τα CVBS συστήματα χρησιμοποιούν συχνά κάμερες και αισθητήρες για να συλλάβουν εικόνες του προϊόντος. Επειδή το προϊόν συνήθως ταξιδεύει σε γρήγορη ταχύτητα, η σύλληψη του πλαισίου μπορεί να είναι ένα ζήτημα. Κατά την απεικόνιση φιστικιών με μια βιντεοκάμερα γραμμικής σάρωσης σε ρυθμό 30-40 φιστίκια/s, ο Pearson (1996) διαπίστωσε ότι οι κάμερες μπορούσαν να συλλάβουν μόνο περίπου έξι καρέ δεδομένων ανά φιστίκι, που συνδυάζονταν ώστε να αντιπροσωπεύουν περίπου το 4% της συνολικής επιφάνειας του φιστικιού. Ενώ αυτό ήταν αρκετό για ένα ποσοστό ακρίβειας 85-87%, η ικανότητα να αξιολογηθεί το σύνολο της επιφάνειας έχει τη δυνατότητα να αυξήσει το ποσοστό ακρίβειας.

Επειδή το προϊόν κινείται, υπάρχει, επίσης, η πιθανότητα για θόλωση, ειδικά στις υψηλές ταχύτητες που χρησιμοποιούνται συνήθως σε επιθεώρηση των τροφίμων. Μείωση του χρόνου έκθεσης ανακουφίζει το πρόβλημα, αλλά υποβαθμίζεται η ποιότητα της εικόνας που προκύπτει. Ο Ding-ji και άλλοι (1994) δημιούργησαν μία τεχνική που μειώνει τη θόλωση, μέσω της χρήσης ενός περιστρεφόμενου κατόπτρου με ακρίβεια.

Επειδή το προϊόν είναι τρισδιάστατο, ένα ελάττωμα μπορεί να χαθεί εάν χρησιμοποιείται μόνο μία κάμερα και το ελάττωμα βρίσκεται στην πλευρά που είναι κρυμμένη από την κάμερα. Τρεις κάμερες είναι συνήθως επαρκείς για να συλλάβουν αρκετά από το εξωτερικό του προϊόντος για μια πλήρη επιθεώρηση. Για να παρακαμφθεί το βάρος της προσθήκης πολλαπλών καμερών, ο Ghezlbash και άλλοι (2011) ανέπτυξαν ένα σύστημα χρήσης κατόπτρων που παράγουν εικόνες του κρυμμένου τμήματος του δείγματος εντός του οπτικού πεδίου μιας ενιαίας κάμερας.

Ο τύπος και η θέση των φωτεινών πηγών που χρησιμοποιούνται για το φωτισμό του προϊόντος έχει, επίσης, αντίκτυπο στην ποιότητα της εικόνας. Για παράδειγμα, το φως της ημέρας του περιβάλλοντος είναι εξαιρετικά μεταβλητό. Έτσι, γενικά χρησιμοποιείται τεχνητό φως. Οι λαμπτήρες φθορισμού και οι λαμπτήρες χαμηλής τάσης μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα. Τα συστήματα θα πρέπει να ενσωματώνουν λαμπτήρες φθορισμού υψηλής συχνότητας.

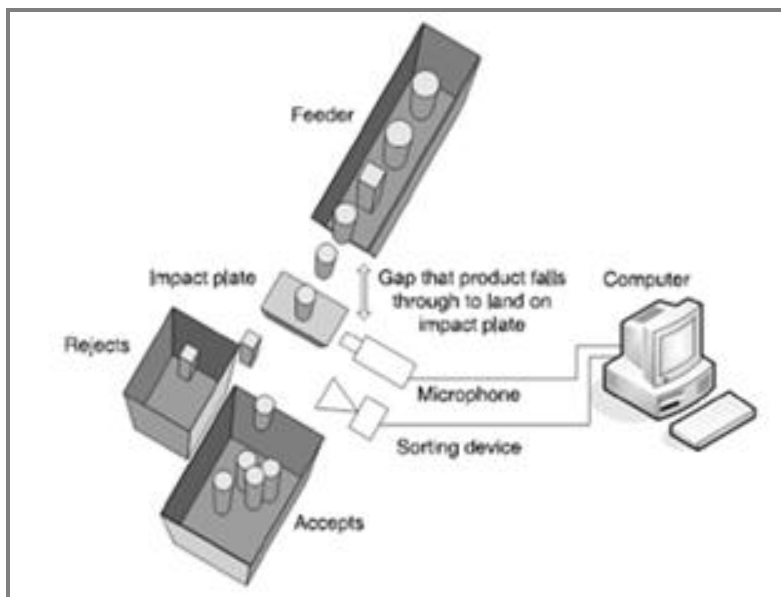
B) Συστήματα που βασίζονται σε ακουστική διαλογή (ABS)

Ένας άλλος τύπος συστήματος διαλογής βασίζεται στην ακουστική επίδραση, που συνήθως παράγεται από το προϊόν χτυπώντας μία σκληρή επιφάνεια και δημιουργώντας ένα σήμα θορύβου που μπορεί να αναλυθεί με έναν υπολογιστή. Ένα γενικό σύστημα γι' αυτόν τον τύπο του συστήματος ABS απεικονίζεται στην εικόνα 5.2.

Τα περισσότερα συστήματα ABS αποτελούνται από έναν τύπο συσκευής τροφοδοσίας που απομονώνει το προϊόν, έτσι ώστε να πέσει μεμονωμένα επάνω σε μια πλάκα κρούσεως. Ένα μικρόφωνο συλλαμβάνει το παραγόμενο ακουστικό σήμα και το στέλνει σε έναν υπολογιστή για επεξεργασία και λήψη αποφάσεων με βάση προκαθορισμένες συνθήκες. Εάν ανιχνευθεί ένα ελάττωμα, ο υπολογιστής ενεργοποιεί μια συσκευή διαλογής που αφαιρεί το προϊόν.

Αυτό το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη διαλογή φιστικιών Αιγίνης και φουντουκιών. Η ακουστική είναι ιδανική για τη διαλογή των καρπών με κέλυφος. Ο Pearson (2001) ανέπτυξε ένα σύστημα ABS, το οποίο ταξινομούσε φιστίκια με κλειστό και ανοιχτό κέλυφος με 97% ακρίβεια σε ποσοστό 40 ξηρών καρπών/s. Οι Haff και Pearson δημιούργησαν μία εκδοχή του συστήματος αυτού χαμηλότερου κόστους. Πέτυχαν ποσοστό ακρίβειας διαλογής πυρήνων 89% σε πραγματικό χρόνο 40 καρπών

με κέλυφος/s και 84% ακρίβεια ταξινόμησης στα με κέλυφος φιστίκια κατά τον ίδιο ρυθμό.



Εικόνα 5.2. Σύστημα ABS (Harris, 2013).

A.5.2 Ανάλυση προϊόντος για τον έλεγχο της ύπαρξης αφλατοξινών

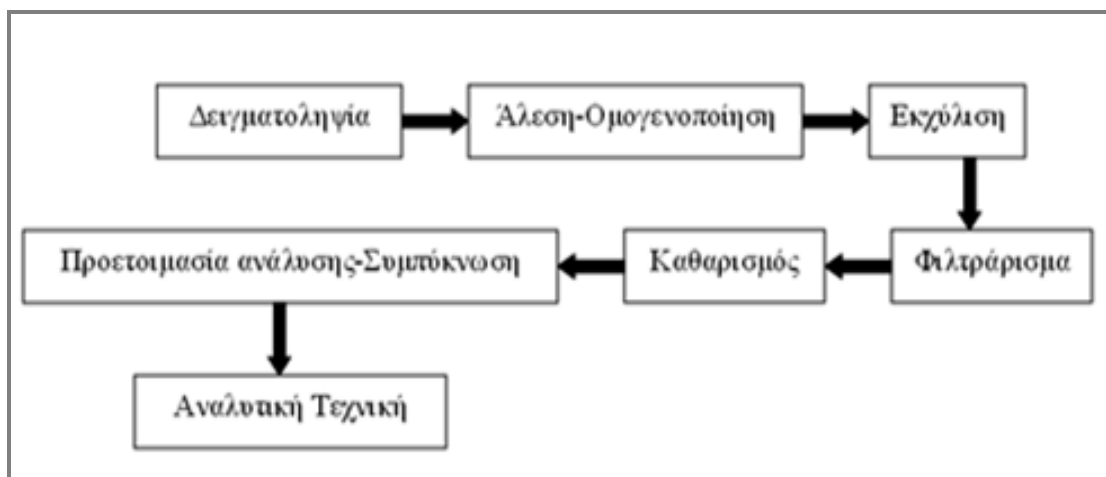
Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια είναι ζωτικής σημασίας το τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή ώστε οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες. Εάν δεν επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο είναι δυνατό πολλά προϊόντα να απορρίπτονται χωρίς λόγο ή αντίστροφα, προβληματικές παρτίδες να γίνονται αποδεκτές δημιουργώντας κινδύνους στην υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, καθώς επίσης και σοβαρές επιπτώσεις στην οικονομία και το παγκόσμιο εμπόριο.

Νομοθετικά (Καν. 882/2004 Παρ.3), στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια:

- A) ορθότητα / αξιοπιστία του αποτελέσματος
- B) ευκολία εφαρμογής

- Γ) όριο ανίχνευσης (LOD)
- Δ) όριο προσδιορισμού (LOQ)
- Ε) ακρίβεια
- ΣΤ) επαναληψιμότητα
- Ζ) ταχύτητα εφαρμογής
- Η) αναπαραγωγιμότητα
- Θ) ανάκτηση
- Ι) επιλεκτικότητα
- ΙΑ) ευαισθησία
- ΙΒ) γραμμικότητα
- ΙΓ) αβεβαιότητα

Η ανάλυση για μυκοτοξίνες είναι απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και ζωοτροφών. Ωστόσο, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των μυκοτοξινών σε $\mu\text{g}/\text{kg}$, που απαιτείται για τις πιο σημαντικές μυκοτοξίνες, είναι δύσκολος (Pittet, 2005). Για την ανάλυση των αφλατοξινών στα τρόφιμα υπάρχουν διαθέσιμες στη βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι, καθώς και οι επίσημες μέθοδοι του AOAC (Association of Analytical Communities). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό των αφλατοξινών λαμβάνοντας υπόψη τα θεσμοθετημένα όρια. Είναι, επίσης, αναγκαίο τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν μεθόδους με ποσοστά απόδοσης όπως απαιτούνται από τη νομοθεσία (Καν 401/2006). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα προσδιορισμού, η χρήση των οποίων εξαρτάται από την υλικοτεχνική υποδομή που έχουν τα διάφορα εργαστήρια, τις οικονομικές τους δυνατότητες, το χρόνο της ανάλυσης και την ευαισθησία της. Πριν από την ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο της ύπαρξης αφλατοξινών προηγούνται μία σειρά πολλών και σύνθετων λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των αφλατοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος και τέλος, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με διάφορες μεθόδους (εικόνα 5.3) (Γεωργιάδου, 2009).

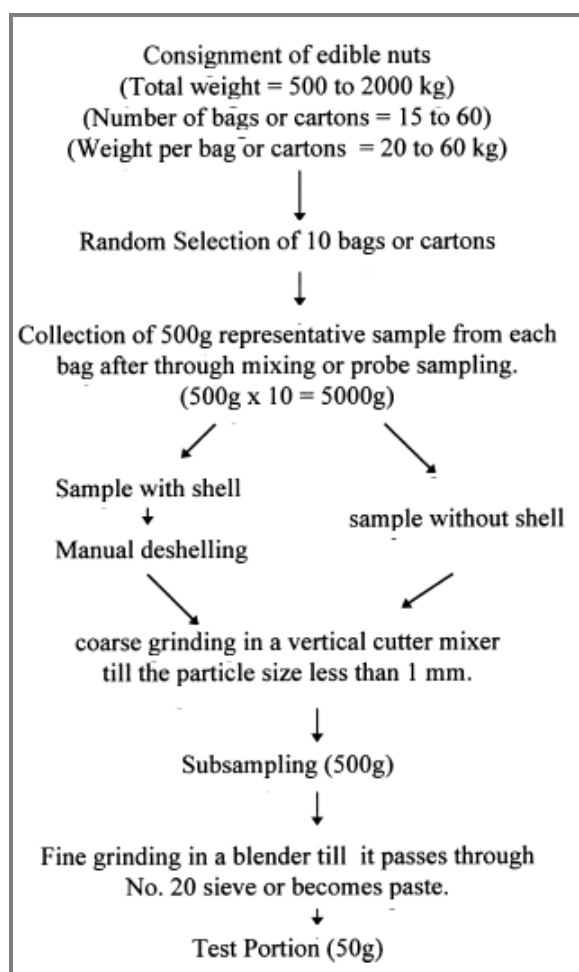


Εικόνα 5.3. Τυπικό διάγραμμα ροής προσδιορισμού αφλατοξινών (Γεωργιάδου, 2009).

Η δειγματοληψία αφορά την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο της παρτίδας, στο οποίο θα γίνει και η ανάλυση. Η δειγματοληψία είναι το πιο σημαντικό στοιχείο της ανάλυσης δεδομένου ότι οι αφλατοξίνες είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρόφιμα. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ένας στους 10^4 - 10^6 καρπούς είναι μολυσμένοι με αφλατοξίνη. Στον ευρωπαϊκό κανονισμό, που καθορίζεται ο τρόπος δειγματοληψίας για τον έλεγχο των αφλατοξινών στα τρόφιμα, αναφέρεται, επίσης, ότι η δειγματοληψία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια με την οποία καθορίζονται τα επίπεδα των μυκοτοξινών, τα οποία κατανέμονται κατά τρόπο ανομοιόμορφο σε μία παρτίδα και ότι οι αφλατοξίνες κατανέμονται κατά τρόπο πολύ ανομοιογενή σε μια παρτίδα, ειδικότερα σε παρτίδα τροφίμων με σωματίδια μεγάλου μεγέθους, όπως είναι τα κελυφωτά φιστίκια (Γεωργιάδου, 2009). Οι Dickens και Welty (1975) ανέφεραν ότι η ακατάλληλη δειγματοληψία είναι η κύρια αιτία του σφάλματος στην ανάλυση των μυκοτοξινών. Ως εκ τούτου, έγινε προσπάθεια να σχεδιαστεί και να εφαρμοστεί μια αποδεκτή δειγματοληψία και άλεση-ομογενοποίηση. Εγκρίθηκε το σχέδιο που φαίνεται στην εικόνα 5.4. Περιελάμβανε τυχαία επιλογή 10 σακούλων ή κουτιών, ακολουθούμενη από συλλογή 500 g αντιπροσωπευτικού δείγματος από κάθε σακούλα ή κουτί. Δείγματα των ξηρών καρπών με κέλυφος υποβλήθηκαν αρχικά σε αποκελύφωση (Abdulkadar et al., 2000).

A.5.2.2 Άλεση – Ομογενοποίηση

Αυτό το στάδιο αποσκοπεί στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των τροφίμων έτσι ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια και να υπάρχει καλύτερη εκχύλιση από το διαλύτη. Η άλεση του δείγματος και η δημιουργία μικρών σωματιδίων ομογενοποιεί το δείγμα, στάδιο το οποίο αν και χρονοβόρο είναι απολύτως απαραίτητο και βασικό στην ανάλυση (Γεωργιάδου, 2009), ώστε η αναλυτική ποσότητα δοκιμής έχει την ίδια συγκέντρωση της τοξίνης με το αρχικό δείγμα. Έτσι, ολόκληρο το δείγμα αλέστηκε χονδροειδώς σε μέγεθος σωματιδίων λιγότερο από 1mm σε ένα κάθετο μίξερ. Από αυτό αποσπάστηκε επιμέρους δείγμα 500 g. Αυτό το επιμέρους δείγμα υποβλήθηκε σε λεπτή άλεση σε ένα μπλέντερ μέχρι να περνά μέσα από ένα κόσκινο No.20 ή να αλεσθεί τελειώς (πάστα). Τέλος, 50 g μερίδας για δοκιμή λήφθηκαν για ανάλυση (Abdulkadar et al., 2000).



Εικόνα 5.4. Σχέδιο δειγματοληψίας και άλεσης-ομογενοποίησης για βρώσιμους καρπούς (Abdulkadar et al., 2000).

A.5.2.3 Εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό στάδιο στον προσδιορισμό των αφλατοξινών στα διάφορα υποστρώματα ή τρόφιμα. Λόγω της διαφορετικής φύσης των προϊόντων που είναι δυνατό να μολυνθούν από αφλατοξίνες, δεν υπάρχει μία μοναδική μέθοδος κατάλληλη για όλα τα προϊόντα (Γεωργιάδου, 2009). Ο σκοπός της εκχύλισης είναι η απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους της αφλατοξίνης από τη μήτρα των τροφίμων σε ένα διαλύτη κατάλληλο για μετέπειτα καθαρισμό και προσδιορισμό (Pittet, 2005). Η εκχύλιση, κατά ένα μεγάλο μέρος εξαρτάται από:

A) τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών που έχουν μολυνθεί με αφλατοξίνες. Για παράδειγμα, υλικά με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και χρωστικές απαιτούν μία πιο εκλεκτική εφαρμογή, η οποία ακολουθείται από εκτεταμένες μεθόδους καθαρισμού για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης (Γεωργιάδου, 2009).

B) τη διαλυτότητα των αφλατοξινών σε διαφορετικούς διαλύτες. Η σύνθεση του διαλύτη εκχύλισης προσδιορίζεται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της τοξίνης, το εμπόρευμα, την εκτίμηση της ασφάλειας, τον υπολογισμό των δαπανών για τη διάθεση των αποβλήτων του διαλύτη και την αναλυτική διαδικασία. Ο διαλύτης εκχύλισης είναι συχνά ένας συμβιβασμός μεταξύ της δύναμης του διαλύτη που απαιτείται για να εξάγει αποτελεσματικά την τοξίνη από τα τρόφιμα και της συμβατότητας του διαλύτη με το αναλυτικό σύστημα. Χλωριωμένοι διαλύτες, όπως το χλωριούχο μεθυλένιο, εξάγουν πολύ αποτελεσματικά αφλατοξίνες από το καλαμπόκι, αλλά η αδυναμία ανάμειξής τους με το νερό απαγορεύει τη χρήση τους σε αναλυτικές δοκιμές που βασίζονται στο νερό. Ωστόσο, εάν οι αφλατοξίνες απομονωθούν χρησιμοποιώντας στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης, η αδυναμία ανάμειξης δεν αποτελεί παράγοντα που πρέπει να ληφθεί υπόψη (Pittet, 2005). Επίσης, ο διαλύτης θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να εκχυλίζει μόνο αυτό που θέλουμε να αναλύσουμε – αφλατοξίνη – με την προσθήκη όσο το δυνατό λιγότερων χημικών ενώσεων, έτσι ώστε να αποφεύγεται η αλληλεπίδρασή τους στο τελικό στάδιο της ανάλυσης.

Για την εκχύλιση αφλατοξινών, χρησιμοποιούνται συνήθως οργανικοί διαλύτες ή μίγματά τους όπως ακετόνη, ακετονιτρίλιο, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη, λόγω του ότι οι αφλατοξίνες είναι διαλυτές σε μετρίως ή ελαφρώς πολικούς διαλύτες. Επίσης, η χρήση μικρών ποσοτήτων νερού σε συνδυασμό με τους προαναφερόμενους διαλύτες υγραίνει το υπόστρωμα αυξάνοντας έτσι τη διείσδυση των οργανικών διαλυτών στο δείγμα άρα βελτιώνει την εκχύλιση της αφλατοξίνης. Οι πιο συνήθεις διαλύτες για την εκχύλιση αφλατοξινών σε διάφορα τρόφιμα είναι μίγματα χλωροφορμίου-νερού, μεθανόλης-νερού, μεθανόλης-ακετονιτριλίου-νερού και ακετονιτριλίου-νερού. Ο διαλύτης μεθανόλη-νερό έχει το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο τοξικός σε σχέση με τα μίγματα ακετονιτριλίου. Σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, όπως τα κελυφωτά φιστίκια (περισσότερο από 50%), συστήνεται η προσθήκη μη-πολικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, για το διαχωρισμό του λίπους (Γεωργιάδου, 2009).

Τεχνικές εκχύλισης

Συνήθως η διαδικασία αποτελείται από ζύγιση μιας μάζας ομογενοποιημένου δείγματος, προσθήκη του διαλύτη εκχυλίσεως και ανακίνηση. Συνήθως, μετά από αυτά τα βήματα, πραγματοποιείται εκχύλιση. Σε αυτές τις εκχυλίσεις εφαρμόστηκαν διαφορετικοί όγκοι και είδη διαλυτών. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαλύτες που κυμαίνονται από 20 έως 250 mL και αποτελούνται κυρίως από μεθανόλη/νερό ή ακετονιτρίλιο/νερό. Η επιλογή για τον καλύτερο διαλύτη εκχύλισης σχετίζεται άμεσα με την απόδοση της εκχύλισης και τον αριθμό των συν-εκχυλισμάτων που αυτός ο διαλύτης εκχυλίζει. Στη μελέτη που αναπτύχθηκε από τον Carpiotti και άλλους (2010) έγινε σύγκριση της χρήσης μεθανόλης, ακετονιτριλίου και ακετόνης για την εκχύλιση μυκοτοξινών από δημητριακά και παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ανάκτηση για τις ουσίες στο διάλυμα ακετόνης (Guevara-González, 2011).

Υπάρχουν δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις για την εκχύλιση, είτε ανάμειξη υψηλής ταχύτητας με ένα διαλύτη για λίγα λεπτά είτε ανακίνηση με ένα διαλύτη από 30 λεπτά έως δύο ώρες. Η ανάμειξη είναι πιο γρήγορη απ' ό,τι η ανακίνηση, όταν αναλύεται ένας μικρός αριθμός δειγμάτων. Στην ανάμειξη, πρέπει να εξασφαλιστεί ότι το σύνολο του δείγματος συνεχώς πλένεται με τον διαλύτη εκχύλισης. Ωστόσο, εάν αναλύονται μεγάλοι αριθμοί δειγμάτων, η ανακίνηση μπορεί να είναι προτιμότερη, διότι οι σύγχρονοι ανακινητές μπορεί να χωρέσουν μέχρι και 20 δείγματα

ταυτόχρονα. Μόλις το στερεό δείγμα έχει ανακινηθεί ή αναμιχθεί με το διαλύτη εκχύλισης, το υγρό διαχωρίζεται από τα στερεά, είτε με διήθηση είτε με φυγοκέντρηση. Το εκχύλισμα στη συνέχεια είτε καθαρίζεται περαιτέρω για να απομονωθούν οι τοξίνες, είτε εφαρμόζεται απευθείας στη διαδικασία (Pittet, 2005).

Σε τελευταίες δημοσιεύσεις αναφέρεται και η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (Pressurized Fluid Extraction - PFE) με την εμπορική ονομασία εκχύλιση επιταχυνόμενου διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction - ASE). Σε αυτή χρησιμοποιούνται διαλύτες σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης εκχύλιση του αναλύτη από στερεά ή ημι-στερεά υποστρώματα με μικρότερες ποσότητες διαλυτών σε μικρότερο χρόνο (Guevara-González, 2011). Η αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση αυξάνει την απόδοση λόγω του ότι μειώνεται το ιξώδες των οργανικών διαλυτών και αυξάνεται η διαλυτική τους ικανότητα, αλλά εξασθενεί και η ισχυρή σύνδεση αφλατοξίνης-υλικού υποστρώματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οργανικός διαλύτης να διεισδύει περισσότερο στο υπόστρωμα και να βελτιστοποιείται η εκχύλιση. Η αύξηση της θερμοκρασίας πρέπει να είναι μέχρι ενός κατάλληλου ορίου ώστε να μη μειωθεί η εκλεκτικότητα του διαλύτη και συμπαρασύρει και άλλες ουσίες. Η PFE μέθοδος έχει εφαρμοστεί για πολλούς αναλύτες σε διάφορα δείγματα, μεταξύ των άλλων για την ανάλυση αφλατοξινών σε κελυφωτά φιστίκια με τη χρήση κατάλληλης συσκευής. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου έδειξαν διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης, όπως υψηλότερη απόδοση, χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης και μικρότερο όγκο διαλύτη (Γεωργιάδου, 2009).

Η τεχνική MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion) έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση αφλατοξινών σε δείγματα τροφίμων. Η MSPD περιλαμβάνει την ομογενοποίηση του δείγματος μαζί με ένα κατάλληλο διαλύτη χρησιμοποιώντας γουδί και γουδοχέρι. Το στερεό μίγμα μεταφέρεται σε μία καρτούσα και μετά, οι αφλατοξίνες εκλούνται και προσδιορίζονται.

Οι εκχυλίσεις στερεάς φάσης (SPME – Solid Phase MicroExtraction) χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση μυκοτοξινών από διαφορετικά είδη δειγμάτων. Ο Nonaka και άλλοι (2009) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι με τη χρήση αυτής της προσέγγισης είναι δυνατόν να απομονωθούν αφλατοξίνες από εκχυλίσματα δειγμάτων χωρίς απαίτηση οποιασδήποτε άλλης προκατεργασίας, τα οποία μπορούν στη συνέχεια

να αναλυθούν με LC-MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry). Αυτή η μέθοδος είναι αυτόματη, απλή, γρήγορη, επιλεκτική, και ευαίσθητη και μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα για την ανάλυση των διαφόρων δειγμάτων τροφίμων (Guevara-González, 2011).

A.5.2.4 Καθαρισμός

Λόγω του μεγάλου αριθμού των συνεκχυλισμάτων που υπάρχουν στα εκχυλίσματα του δείγματος, οι περισσότερες μήτρες είναι ακατάλληλες για άμεση χρωματογραφική ανάλυση και χρειάζονται ένα στάδιο καθαρισμού. Το στάδιο καθαρισμού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις τεχνικές ποσοτικοποίησης, αποφεύγοντας ψευδώς θετικούς προσδιορισμούς, επιτρέποντας καλύτερες ανακτήσεις και βοηθώντας το χρόνο ζωής του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Ορισμένες μελέτες, σύμφωνα με την τεχνική ανίχνευσης που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια, χρησιμοποιούν την προσέγγιση της αραιώσης για τη μείωση των παρεμβολών της μήτρας, όπως θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε στη μελέτη των Acharya & Dhar (2008). Οι μέθοδοι καθαρισμού, όμως, που εφαρμόζονται περισσότερο στα κελυφωτά φιστίκια είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης και οι στήλες ανοσοσυγγένειας (IACs).

Εκχύλιση στερεάς φάσης

Οι συσκευές εκχύλισης στερεάς φάσης είναι συνήθως ένα πορώδες διοξείδιο του πυριτίου, η επιφάνεια του οποίου έχει τροποποιηθεί για να παρέχει επιλεκτική απορρόφηση είτε της αναλυόμενης ουσίας είτε των ανεπιθύμητων προσμίξεων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αναλυόμενη ουσία συγκρατείται επί των στηλών, ενώ οι ανεπιθύμητες προσμίξεις διέρχονται. Η αναλυόμενη ουσία, στη συνέχεια, απομακρύνεται επιλεκτικά με την αλλαγή της σύνθεσης του διαλύματος έκλυσης. Σε άλλες περιπτώσεις, οι στήλες SPE έχουν σχεδιαστεί για να παγιδεύουν ανεπιθύμητες προσμίξεις και επιτρέπουν στην αναλυόμενη ουσία να περάσει. Το πλεονέκτημα του τελευταίου τύπου στήλης (γνωστή ως πολυλειτουργική στήλη) είναι ότι μόνο ο διαλύτης εκχύλισης είναι απαραίτητος για να καθαρίσει το δείγμα, εξαλείφοντας την ανάγκη για επιπλέον διαλύτη έκλυσης (Guevara-González, 2011).

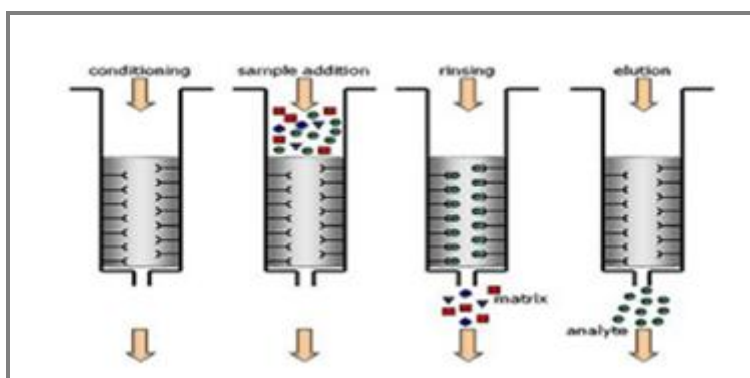
Στήλες ανοσοσυγγένειας (IACs)

Οι στήλες ανοσοσυγγένειας αποτελούν το πιο σύγχρονο εργαλείο καθαρισμού για τις αναλύσεις αφλατοξίνης (Pittet, 2005). Σε αυτές, μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία είναι πολύ εξειδικευμένα για αφλατοξίνες και τις δεσμεύουν ειδικά ακινητοποιούνται επάνω σε σεφαρόζη, ένα αδρανές υλικό, και στη συνέχεια ενσωματώνονται σε μικρές στήλες. Η προς εξέταση τοξίνη συλλέγεται με έκλουση με κατάλληλο διαλύτη (Guevara-González, 2011). Μόλις η μυκοτοξίνη έχει εξαχθεί από τη στερεά μήτρα, το υγρό εκχύλισμα καθαρίζεται μέχρι να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες ουσίες πριν το βήμα ποσοτικού προσδιορισμού. Ο καθαρισμός περιλαμβάνει την απομόνωση της τοξίνης από το εκχύλισμα και αποτελεί προϋπόθεση για τις περισσότερες (αλλά όχι όλες) αναλυτικές μεθόδους. Ωστόσο, πολλές μέθοδοι διαλογής, δεν απαιτούν καθαρισμό, αλλά αραιώση του εκχυλίσματος και διήθηση πριν από την ανάλυση (Pittet, 2005).

Οι στήλες ανοσοσυγγένειας έχουν δείξει πολλά πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους σε διάφορα τρόφιμα λόγω του ότι δίνουν τη δυνατότητα μεγαλύτερων όγκων εκχυλίσματος του δείγματος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου (Γεωργιάδου, 2009). Άλλο πλεονέκτημα είναι η πολύ ειδική φύση της αλληλεπίδρασης μυκοτοξίνης και αντισώματος (Pittet, 2005) που οδηγεί σε αποτελεσματικό και εξειδικευμένο καθαρισμό των εκχυλισμάτων (Guevara-González, 2011). Παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του αντισώματος θα επηρεάσουν την ικανότητα της στήλης να δεσμεύει μυκοτοξίνες και, συνεπώς, την ικανότητα να ανακτηθεί τοξίνη από τα τρόφιμα. Παράγοντες, όπως η αντοχή του διαλύτη που εφαρμόζεται στη στήλη, η ταχύτητα ροής και ο όγκος του εκχυλίσματος, μπορούν να βελτιστοποιηθούν ώστε να αποκτηθούν ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η ευκολία χρήσης των στηλών, οι υψηλές ανακτήσεις και η καλή επιλεκτικότητα, ανεξάρτητα από το είδος της μήτρας, έχουν οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση στην ακρίβεια, ιδιαίτερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Pittet, 2005). Επιπλέον, δεν είναι απαιτητικές όσον αφορά την ικανότητα και την εμπειρία που απαιτείται από το χρήστη (Γεωργιάδου, 2009). Μειονεκτήματα αποτελούν το υψηλό κόστος, ο περιορισμένος χρόνος αποθήκευσής τους και το ότι δεν είναι ανακυκλώσιμες (δεν επαναχρησιμοποιούνται, είναι μιας χρήσης) (Arroyo-Manzanares, Huertas- Pérez, García-Campaña, Gámiz-Gracia, 2015).

Ο ρυθμός ροής του υγρού της εκχύλισης από τα διάφορα φίλτρα καθαρισμού είναι πολύ σημαντικός για την απόδοση της εκχύλισης και την παραλαβή όσο το δυνατό πιο καθαρής αφλατοξίνης. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι όσο μειώνεται ο ρυθμός ροής και αυξάνει έτσι ο χρόνος του καθαρισμού, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης λόγω του ότι ο χρόνος επαφής του διαλύτη και του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος.

Το διάλυμα που εκχυλίζεται μετά και τον καθαρισμό συλλέγεται και συμπυκνώνεται για την περαιτέρω ανάλυση (Γεωργιάδου, 2009). Η αρχή λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας φαίνεται στην εικόνα 5.5.



Εικόνα 5.5. Βασικές αρχές λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας (Γεωργιάδου, 2009).

A.5.2.5 Ανίχνευση αφλατοξίνης

Το τελικό βήμα σε μια ανάλυση περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της τοξίνης, χρησιμοποιώντας τουλάχιστον μία τεχνολογία ανίχνευσης. Οι αναλυτικές μέθοδοι που είναι εμπορικά διαθέσιμες για την ανάλυση των μυκοτοξινών καταγράφονται στον πίνακα 5.1. Συνήθως κάνουμε μια διάκριση μεταξύ των μεθόδων «ταχείας ανίχνευσης» που αποσκοπούν κυρίως στην ανίχνευση της παρουσίας μιας μυκοτοξίνης ή ομάδας τοξινών και των «αναφορικών ή επιβεβαιωτικών μεθόδων», οι οποίες επιτρέπουν την επιβεβαίωση της ανίχνευσης και την ποσοτικοποίηση των μυκοτοξινών σε διάφορες μήτρες (Pittet, 2005).

Σκοπός των επιβεβαιωτικών μεθόδων είναι να επιβεβαιώσουν τα δείγματα που περιέχουν μυκοτοξίνες (αφού έχει γίνει η ανίχνευσή τους με βάση τις δοκιμές ταχείας ανίχνευσης) και να ποσοτικοποιηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η ποσότητα της τοξίνης. Οι επιβεβαιωτικές μέθοδοι για τις μυκοτοξίνες περιλαμβάνουν μια χρωματογραφική

τεχνική, όπως αέρια χρωματογραφία (GC), χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (LC-MS) ή διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS / MS) (Pittet, 2005).

Πίνακας 5.1. Αναλυτικές μέθοδοι εμπορικά διαθέσιμες για την ανάλυση των μυκοτοξινών (Pittet, 2005).

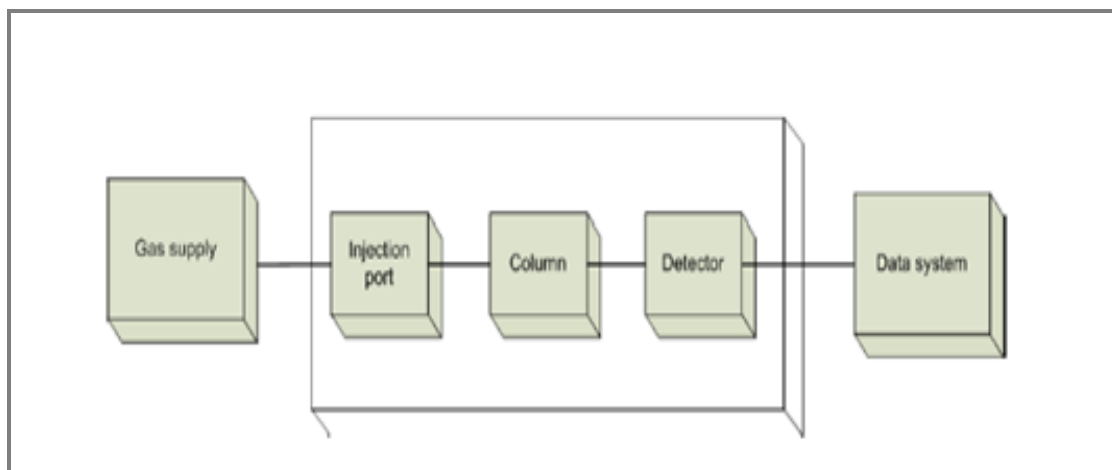
Analytical methods commercially available for mycotoxin analysis		
Method	Strength	Weakness
Thin Layer Chromatography (TLC)	Simple, rapid, inexpensive, robust, widely used in various matrices	Requiring clean-up, not precise, laborious
Gas chromatography (GC)	Selective, sensitive, accurate	Requiring clean-up, time consuming, laborious, expensive
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Selective, sensitive, accurate	Requiring clean-up, time consuming, laborious, complex, expensive
Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)	Selective, sensitive, accurate	Time consuming, laborious, complex, expensive, requiring skilled and experienced staff to operate
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	Requiring low sample volume, rapid, simple, specific, sensitive, portable	Matrix dependent, laborious, application-limited
ImmunoAffinity Column assay (IAC)	Easy to use, rapid, simple, specific, selective, sensitive, portable	Matrix dependent, laborious, application-limited
Biosensors	Rapid, specific, real-time monitoring, adaptable to remote sensing	Cross-reactive, insensitive

A.5.2.5.1 Αναφορικές ή επιβεβαιωτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό αφλατοξινών

A) Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography - GC)

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση της παρουσίας των μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Οι περισσότερες

μυκοτοξίνες δεν είναι πτητικές και επομένως, πρέπει να παραγωγοποιηθούν για ανάλυση με τη χρήση GC. Έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές για την παραγωγοποίηση των μυκοτοξινών. Χημικές αντιδράσεις, όπως η πολυφλουοροακυλίωση, χρησιμοποιούνται για να δώσουν ένα πτητικό προϊόν (Πετρωτός, 2010). Στη συνέχεια, τα πτητικά συστατικά διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας τη σχετική συγγένεια των ενώσεων για μία σταθερή στήλη και μία κινητή στήλη αδρανούς αερίου (Pittet et al., 2005). Οι αναλύτες που διαχωρίζονται στη στήλη και εκλούνται με το αδρανές αέριο ανιχνεύονται από μια μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών, όπως ανιχνευτές φθορισμού (Fluorescence Detector - FLD), ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector - FID), συλλήψεως ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector - ECD), ανιχνευτές υπεριώδους (Ultra Violet Detector - UVD) ή φασματοσκοπία μάζας (MS) (Αποστολόπουλος, 2011).



Εικόνα 5.6. Κύρια στοιχεία που απαρτίζουν ένα σύστημα GC (Γεωργιάδου, 2009).

Τα κύρια στοιχεία από τα οποία αποτελείται ένα σύστημα αεριοχρωματογραφίας φαίνονται στην παραπάνω εικόνα. Ο εφοδιασμός με αέριο γίνεται για να μετακινηθεί το δείγμα μέσω της στήλης. Τα αέρια προς επιλογή είναι περιορισμένα και τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είναι το άζωτο και το ήλιο. Είναι, επίσης, απαραίτητος ο έλεγχος της ροής του αερίου, επειδή μπορεί να έχει επίπτωση στην διαχωριστική απόδοση. Η χρωματογραφική διαδικασία ξεκινά όταν το δείγμα εισάγεται μέσα στην στήλη, ιδανικά χωρίς να διαταράσσεται η ροή στη στήλη. Ως εκ τούτου, η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη θα πρέπει να είναι ελεγχόμενη, αναπαραγώγιμη και ταχεία. Η GC περιλαμβάνει ένα φούρνο, ο οποίος αποτελεί σημαντικό συστατικό στη διαδικασία, διότι πρέπει να

διατηρηθεί η κατάσταση ατμού, επομένως, πρέπει να διατηρείται καλός έλεγχος της θερμοκρασίας (Γεωργιάδου, 2015).

Παρόλο που έχουν αναφερθεί αρκετά παραδείγματα επιτυχούς εφαρμογής της GC στην ανάλυση των μυκοτοξινών, υπάρχουν και αρκετά μειονεκτήματα. Πέρα από το ότι τα δείγματα που χρειάζονται ανάλυση πρέπει να είναι πτητικά ή αλλιώς να μετατραπούν σε πτητικά, η θερμική σταθερότητα αποτελεί ένα επιπλέον σημαντικό πρόβλημα, διότι πολλές φορές η θέρμανση αποικοδομεί τα δείγματα (Πετρωτός, 2010).

B) Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC)

Η TLC είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για να προσδιοριστεί η παρουσία μιας ή περισσότερων μυκοτοξινών σε ένα δείγμα, αλλά δεν επιτρέπει την ποσοτικοποίηση. Συνήθως, χρησιμοποιείται μία πλάκα από γυαλί ή αλουμίνιο πάνω στην οποία έχει τοποθετηθεί ένα λεπτό στρώμα πήγματος οξειδίου του πυριτίου ή παρόμοια μήτρα. Πάνω στην πλάκα έχουν εναποτεθεί κατάλληλα πρότυπα για σύγκριση καθώς, επίσης, και επισημασμένο εκχύλισμα του δείγματος προς ανάλυση. Η ακμή της πλάκας που βρίσκεται πλησιέστερα στα επισημασμένα εκχυλίσματα και πρότυπα τοποθετείται σε ένα καθορισμένο παρασκεύασμα διαλύτη που καλύπτει τον πυθμένα ενός δοχείου που επιτρέπει στην πλάκα να σταθεί σχεδόν κατακόρυφα. Ο διαλύτης προσροφάται από το διοξείδιο του πυριτίου ή την παρόμοια μήτρα και ταξιδεύει μέσα από τα επισημασμένα εκχυλίσματα και πρότυπα (Pittet, 2005). Δηλαδή στην TLC η κινητή φάση είναι υγρή και η στατική είναι ένας στέρεος προσροφητής. Καθώς συμβαίνει αυτό, οι διάφορες ενώσεις του εκχυλίσματος διαχωρίζονται, ανάλογα με την προσρόφησή τους με τη μήτρα και τη διαλυτότητά τους. Επειδή αυτές οι ιδιότητες ποικίλλουν, οι ενώσεις «σταματούν» σε διαφορετικά ύψη επί της πλάκας. Ο προσροφητής θα πρέπει να δείξει μία μέγιστη εκλεκτικότητα ως προς τις ουσίες που διαχωρίζονται, έτσι ώστε οι διαφορές στο ρυθμό της έκλουσης να είναι μεγάλες (Γεωργιάδου, 2015). Η πλάκα μπορεί να αφαιρεθεί από το δοχείο, όταν το μέτωπο του διαλύτη πλησιάζει την κορυφή της πλάκας και οι κηλίδες μπορεί να απεικονιστούν με φθορισμό κάτω από μια λάμπα UV.

Σε μερικές περιπτώσεις, δύο διαστάσεων TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βρεθούν μυκοτοξίνες σε δείγματα με πολλές προσμίξεις. Σε τέτοιες περιπτώσεις, μια

πλάκα αναπτύσσεται με ένα μίγμα διαλυτών σε μία κατεύθυνση, περιστρέφεται κατά 90° και τρέχει σε ένα δεύτερο σύστημα διαλύτη. Συχνά, άγνωστες μυκοτοξίνες έχουν βρεθεί σε πλάκες TLC που δε θα ήταν εμφανείς με τη χρήση άλλων μεθόδων (Pittet, 2005).

Η TLC, από το 1990, έχει θεωρηθεί ως επίσημη μέθοδος ανάλυσης αφλατοξινών (ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός) σε κελυφωτά φιστίκια από τον AOAC. Αργότερα, σημειώθηκε μία σημαντική αύξηση στη χρήση της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Thin Layer Chromatography - HPTLC), η οποία έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με τη μέθοδο της HPLC (Γεωργιάδου, 2009). Η TLC είναι μία οικονομική μέθοδος, αλλά σε σχέση με την HPLC παρουσιάζει χειρότερο διαχωρισμό, λιγότερο ικανοποιητική ακρίβεια και χαμηλότερη ευαισθησία (Guevara-González, 2011).

Γ) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

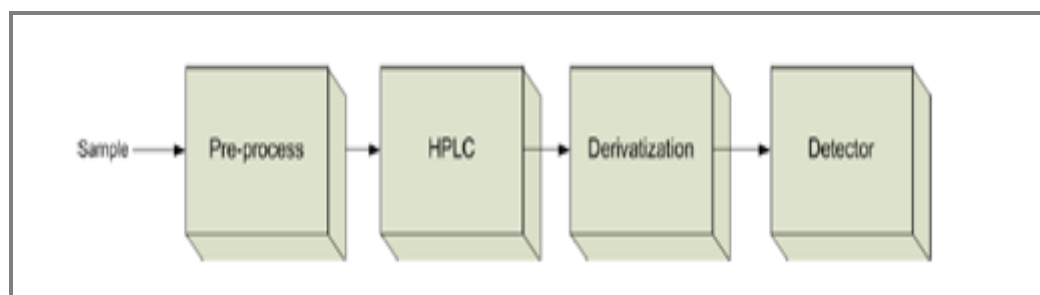
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η πιο συχνά και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης μυκοτοξινών και συγκεκριμένα, η κύρια μέθοδος ανάλυσης αφλατοξίνης (Pittet, 2005), λόγω της μεγαλύτερης ακρίβειας σε σχέση με την TLC και της σταθερότητας των αποτελεσμάτων σε σχέση με τη μέθοδο της ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Γεωργιάδου, 2009). Η μέθοδος αυτή πληρεί όλα τα κριτήρια που ορίζονται από τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (EC 882/2004). Το όριο ανίχνευσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο επιτρέποντας την ανίχνευση αφλατοξινών ακόμη και σε επίπεδο ίχνους. Η τεχνική είναι επαναλήψιμη, καθώς παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται όταν ο ίδιος χειριστής χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό. Η ανάλυση HPLC εμφανίζει υψηλή ακρίβεια και εκλεκτικότητα και επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης αφλατοξίνης μικρότερης από 2mg/kg (Γεωργιάδου, 2012). Το 2014, σε έρευνα φιστικιών προερχόμενα από το Ιράν, ποσοτικοποιήθηκε η AFB₁. Το όριο ανίχνευσης (LOD) για την AFB₁ ήταν 0,1 ng/g και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) για την AFB₁ ήταν 0.8 ng/g (Mahmoudi et al., 2014).

Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών στα τρόφιμα περιλαμβάνουν: LC κανονικής φάσης (NPLC), LC αντίστροφης φάσης

(RPLC), RPLC με προ-στήλης παραγωγοποίηση (BCD), RPLC που ακολουθείται από μετά-στήλης παραγωγοποίηση (PCD), και RPLC με ηλεκτροχημική ανίχνευση (Cornell University, 2015). Ο διαχωρισμός των αφλατοξινών πραγματοποιείται με κινητή φάση που αποτελείται από μίγμα νερού, μεθανόλης και ακετονιτριλίου (Guevara-González, 2011) και απαιτεί, συνήθως, μία διαδικασία καθαρισμού με στήλες ανοσοσυγγένειας πριν από την ανίχνευση. Τέτοια προετοιμασία δείγματος είναι πολυσταδιακή, δαπανηρή και χρονοβόρα.

Τα στάδια κατά την ποσοτικοποίηση αφλατοξινών με HPLC απεικονίζονται στην εικόνα 5.7. Η αρχή της υγρής χρωματογραφίας είναι η διαδικασία διαχωρισμού η οποία βασίζεται στην κατανομή μεταξύ δύο φάσεων (Γεωργιάδου, 2015). Η HPLC χωρίζει ένα μίγμα ενώσεων με τη σχετική συγγένεια των ενώσεων για μία σταθερή στήλη και έναν κινητό διαλύτη. Ενώσεις εκλούμενες από τη στήλη διέρχονται μέσω ανιχνευτή κάποιου είδους (συνήθως φθορισμού ή υπεριώδους ακτινοβολίας) ανάλογα με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του αναλύτη και ο ανιχνευτής βοηθά στην ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων ενώσεων στο αρχικό δείγμα (Pittet, 2005). Ευαίσθητη ανίχνευση φθορισμού των AFB₁ και AFG₁ απαιτεί τη μετατροπή τους σε παράγωγα που φθορίζουν περισσότερο (B₁ σε B_{2a} και G₁ σε G_{2a}) (Arroyo-Manzanares et al., 2015). Η διαδικασία παραγωγοποίησης διεξάγεται γενικά κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των συστατικών του δείγματος από τη στήλη στον ανιχνευτή. Η παραγωγοποίηση μπορεί να επιτευχθεί πριν από την είσοδο του δείγματος στη στήλη και λέγεται «παραγωγοποίηση προ-στήλης». Στην «παραγωγοποίηση μετα-στήλης» τα συστατικά που διαχωρίστηκαν με έκλυση από τη στήλη παραγωγοποιούνται πριν από την είσοδο στον ανιχνευτή (Γεωργιάδου, 2015). Η μετά-στήλης παραγωγοποίηση επιτρέπει ενίσχυση του φθορισμού περίπου 30 φορές για τις αφλατοξίνες B₁ και G₁. Η μέση ανάκτηση είναι μεταξύ 84 και 91% και LOQ 0,1 μg/kg (Guevara-González, 2011). Διάφορες μέθοδοι παραγωγοποίησης είναι διαθέσιμες συμπεριλαμβανομένης της προ-στήλης παραγωγοποίηση με τριφθοροοξικό οξύ (TFA), μετα-στήλης παραγωγοποίηση με πυριδινικό βρωμιούχο υπερβρωμίδιο (PBPB) ή ηλεκτροχημικά παραγόμενο βρώμιο και φωτοχημική παραγωγοποίηση. Η PCD δε χρειάζεται χημικά αντιδραστήρια, πρόσθετες αντλίες ή ηλεκτροχημικές κυψέλες, καθιστώντας την παραγωγοποίηση γρήγορη και εύκολη, με ελάχιστη παρέμβαση του αναλύτη (Arroyo-Manzanares et al., 2015).

Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου ανάλυσης με HPLC φαίνεται να είναι η δυνατότητα αυτοματοποίησης. Ωστόσο, η ανάλυση αυτή είναι χρονοβόρα, έχει κόστος και απαιτεί εξειδικευμένο και έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό (Γεωργιάδου, 2009).



Εικόνα 5.7. Στάδια κατά την ποσοτικοποίηση αφλατοξινών με HPLC (Γεωργιάδου, 2009).

Η υγρή χρωματογραφία (LC) και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) αλληλοσυμπληρώνονται. Για ένα αναλυτή δεν είναι ασυνήθιστο να χρησιμοποιήσει TLC στην προκαταρκτική εργασία για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών διαχωρισμού με LC (Cornell University, 2015). Ωστόσο, σε αντίθεση με την TLC όπου οι πλάκες χρησιμοποιούνται μία φορά, η ζωή των αναλυτικών στηλών HPLC εξαρτάται από τις συνθήκες λειτουργίας. Ένεση σχετικά "βρώμικων" δειγμάτων, θα μειώσει δραστικά τη ζωή της στήλης και μπορεί να οδηγήσει σε ευρύτερες κορυφές από τα υπολείμματά στον εισαγωγέα ή στη στήλη. Πράγματι, τελικά εκχυλίσματα μπορούν να εξακολουθούν να περιέχουν ενώσεις που δεν αφαιρούνται κατά τη διάρκεια καθαρισμού και μπορεί να σχετίζονται με τη μυκοτοξίνη-στόχο ή και όχι. Αυτές οι ουσίες μπορεί να έχουν χρόνους κατακράτησης παρόμοιους με τους αναλύτες-στόχους, οδηγώντας έτσι σε ψευδώς θετική ή λανθασμένη αναγνώριση. Τα μπαχαρικά (και ιδίως το μοσχοκάρυδο) έχουν συχνά προκαλέσει προβλήματα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης για αφλατοξίνες, λόγω του μεγάλου αριθμού των πτητικών ενώσεων που υπάρχουν φυσικά (Pittet, 2005).

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

Έρευνες που χρησιμοποίησαν Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) έφεραν μικρότερους χρόνους διαχωρισμού και καλύτερα σχήματα κορυφών. Ο Huang και άλλοι (2010) χρησιμοποίησαν την UPLC-MS/MS για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση αφλατοξινών μετά από εκχύλιση με ακετονιτρίλιο και νερό και καθαρισμό

με SPE, φθάνοντας τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 0.012 και 0.073 µg/kg. Ο συνολικός χρόνος για το διαχωρισμό των AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁ και AFM₂ ήταν λιγότερος από 9 λεπτά (Guevara-González, 2011).

NP-HPLC και RP-HPLC

Η HPLC κανονικής φάσης (NP-HPLC) με σύστημα ανίχνευσης στο UV αποδείχθηκε ότι δεν ήταν ικανοποιητική για τον προσδιορισμό αφλατοξίνης σε επίπεδα νανογραμµαρίων (ng). Λόγω του ότι οι αφλατοξίνες φθορίζουν, ένα σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης θεωρήθηκε καταλληλότερο, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου. Ένα, όμως, από τα πιο σημαντικά προβλήματα είναι η εξάρτηση της ικανότητας φθορισμού των κυρίων αφλατοξινών (B₁, B₂, G₁, G₂) από τη σύνθεση του διαλύτη. Η NP-HPLC από την δεκαετία του '70 σταμάτησε να χρησιμοποιείται μετά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας αναστροφής φάσης, λόγω μειωμένης επαναληψιμότητας των χρόνων κατακράτησης όταν το νερό ή οργανικοί διαλύτες μεταβάλλουν την υγρασία του χρωματογραφικού μέσου (silica ή αλουμίνα). Σήμερα, η HPLC αναστροφής φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και πολλές φορές αναφέρεται απλά ως HPLC χωρίς να επεξηγείται ιδιαίτερα. Η RP-HPLC αποτελείται από μία μη-πολική στατική φάση (συνήθως silica στην οποία έχει εφαρμοστεί RMe₂SiCl, όπου R είναι αλκύλιο όπως C₁₈H₃₇ ή C₈H₁₇) και μία υδατική μέτρια πολική κινητή φάση. Το σύστημα RP-HPLC αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο λόγω της ευκολίας στο χειρισμό και της μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση (Αποστολόπουλος, 2011).

Υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (LC-MS) ή με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS)

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS) ή τη διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS / MS) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση μυκοτοξινών και ιδιαίτερα για εκείνες τις τοξίνες, για τις οποίες υπάρχει ελάχιστη απορρόφηση υπεριώδους ή ελάχιστη φυσική ικανότητα φθορισμού (Pittet, 2005).

Συγκρινόμενη με τις κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους ανίχνευσης, η LC-MS μπορεί να προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Επιπροσθέτως, είναι δυνατό να διερευνήσει τη μοριακή δομή μεταβολιτών (κρυμμένες μυκοτοξίνες) και να παρακάμψει τελείως τα στάδια της παραγοντοποίησης και του καθαρισμού που είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και ελλοχεύουν κινδύνους για εργαστηριακά λάθη. Τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η μικρή ποσότητα του αρχικού προπαρασκευαστικού δείγματος, ο κίνδυνος μείωσης της ακρίβειας της μεθόδου εξαιτίας της τελείως απρόβλεπτης επίδρασης των συστατικών που συνυπάρχουν στο αρχικό δείγμα με την αναλυόμενη ουσία και το υψηλό κόστος (Αποστολόπουλος, 2011).

Η δυνατότητα της LC-MS/MS για διαλογή μεγάλων ποσοτήτων δειγμάτων για την παρουσία ενός αριθμού μυκοτοξινών έχει αποδειχθεί σε πολλές δημοσιεύσεις, αλλά διεθνείς συλλογικές μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν πριν αυτό το είδος της μεθόδου αποκτήσει ευρύτερη αποδοχή στα εργαστήρια διασφάλισης ποιότητας (Pittet, 2005).

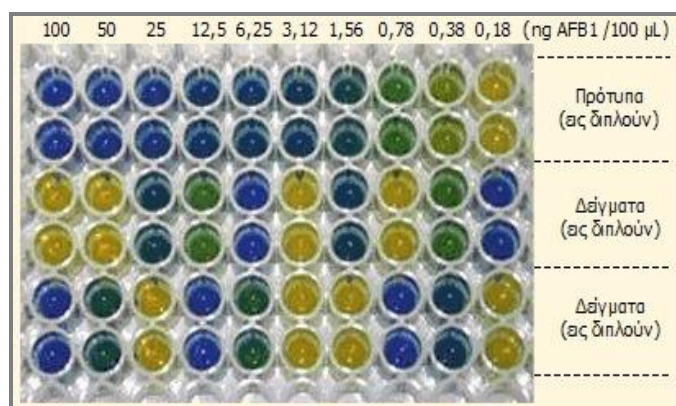
A.5.2.5.2 Μέθοδοι ταχείας διαλογής για τον προσδιορισμό αφλατοξινών

Η πλειοψηφία των ταχέων μεθόδων ανίχνευσης βασίζεται σε αντιδράσεις αντισώματος-αντιγόνου, στις οποίες ένα από τα αντιδραστήρια έχει επισημανθεί και το άλλο είναι ακινητοποιημένο σε μια πλατφόρμα. Υπάρχουν διάφορα είδη μορίων-δεικτών, τα οποία μπορεί να είναι ραδιοϊσότοπα, ένζυμα, φθορίζουσες ενώσεις και κολλοειδής χρυσός. Τα μόρια-δείκτες, λόγω του μικρού μεγέθους των αφλατοξινών, ενώνονται με πρωτεΐνες, έτσι ώστε να μπορούν να συλληφθούν με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα (Ab) που έχουν συγγένεια με τις αφλατοξίνες (Γεωργιάδου, 2015). Σήμερα έχουμε ουσιαστικά τρεις βασικές τεχνικές ταχείας διαλογής: την ELISA, τις δοκιμές ράβδων εμβάπτισης και πλευρικής ροής, και τη φθοριομετρία (Pittet, 2005). Αυτές οι μέθοδοι μπορεί να εντοπίσουν και να μετρήσουν τις αφλατοξίνες στα τρόφιμα σε λιγότερο από 10 λεπτά (Cornell University, 2015). Οι ταχείες μέθοδοι έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν στάδια καθαρισμού. (Αποστολόπουλος, 2011).

A) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays (ELISA)

Η τοξίνη από το δείγμα ανταγωνίζεται με μια σημασμένη τοξίνη για έναν περιορισμένο αριθμό θέσεων δέσμευσης αντισώματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της τοξίνης που υπάρχει στο δείγμα, τόσο χαμηλότερη είναι η σύνδεση της επισημασμένης τοξίνης και τόσο χαμηλότερο είναι και το σήμα. Σε τέτοιες δοκιμασίες, η παρουσία τοξίνης, επομένως, μετριέται από την απουσία μιας απόκρισης (δηλαδή χρώμα). Αυτή είναι η αχίλλειος πέτρα της ELISA, επειδή κάποιος παράγοντας που μειώνει τη σύνδεση μεταξύ της σημασμένης τοξίνης και του αντισώματος μπορεί να δώσει λανθασμένο αποτέλεσμα για την παρουσία της τοξίνης. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να περιλαμβάνουν δομικά συσχετισμένες μυκοτοξίνες, καθώς και συστατικά της μήτρας που είναι απολύτως άσχετα με μυκοτοξίνες αλλά απλώς παρεμβαίνουν με προσάρτηση στο αντίσωμα. Με άλλα λόγια, διασταυρούμενες αντιδραστικότητες και εξάρτηση μήτρας (εξάρτηση από το υπόστρωμα) είναι τα κύρια μειονεκτήματα των μεθόδων ELISA, η οποία μπορεί μερικές φορές να οδηγήσει σε μια ισχυρή υπερεκτίμηση του επιπέδου μόλυνσης των μυκοτοξινών (Pittet, 2005). Τα πλεονεκτήματα της είναι η μεγάλη ταχύτητα, η ευκολία της λειτουργίας της και η υψηλή ευαισθησία της (Αποστολόπουλος, 2011).

Ο Wild και άλλοι (1986) χρησιμοποίησαν ιδιαίτερα ευαίσθητες ανοσοδοκιμασίες για να ποσοτικοποιηθούν αφλατοξίνες στα υγρά του ανθρώπινου σώματος (εικόνα 5.8) (Cornell University, 2015). Υπάρχουν και έτοιμα kit για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών σε τρόφιμα με την τεχνική ELISA, όπως αυτά που φαίνονται στην εικόνα 5.9.



Εικόνα 5.8. Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης B₁ σε όλο το εύρος από 0,01ng/mL έως 10ng/mL και έλεγχος δειγμάτων ανθρώπινων ούρων με την τεχνική ELISA.



Εικόνα 5.9. Κιτ (προσσκευασμένα αντιδραστήρια και μικροτιτλοδοτικές πλάκες) για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών σε τρόφιμα με την τεχνική ELISA.

B) Δοκιμές ράβδων εμβάπτισης και πλευρικής ροής

Εκτός από τις κοινές διαδικασίες ELISA υπάρχει μια αυξανόμενη ζήτηση για γρήγορες ανοσοδοκιμές στις οποίες η παρουσία μυκοτοξίνης ανιχνεύεται ευθέως σε μια αναλώσιμη συσκευή.

Κάθε συσκευή πλευρικής ροής είναι μία ενιαία μονάδα (μερικές φορές περικλείεται μέσα σε ένα πλαστικό περίβλημα) επιτρέποντας δοκιμές μεμονωμένων δειγμάτων. Η συσκευή περιέχει ένα αντίσωμα συζευγμένο σε ένα έγχρωμο σωματίδιο (όπως κολλοειδή χρυσό ή λάτεξ), το οποίο εναποτίθεται σε μία ταινία, και μία μυκοτοξίνη-στόχο ακινητοποιημένη επί της μεμβράνης. Όταν το διάλυμα του δείγματος χύνεται επί του στρώματος της ταινίας ή όταν η ταινία τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο που περιέχει το διάλυμα του δείγματος, το επισημασμένο αντίσωμα διαλυτοποιείται και δεσμεύεται με τη μυκοτοξίνη-στόχο, αν υπάρχει. Στη συνέχεια, αυτό το συγκρότημα μυκοτοξίνης-αντισώματος ρέει με το υγρό δείγμα πλευρικά κατά μήκος της επιφάνειας της ταινίας. Όταν το συγκρότημα περνά πάνω από τη ζώνη όπου η μυκοτοξίνη-στόχος έχει ακινητοποιηθεί, δε συμβαίνει τίποτα, επειδή το συγκρότημα δεν έχει θέσεις δέσμευσης διαθέσιμες. Κατά συνέπεια, μόνο ένα συγκρότημα θα εμφανιστεί στο παράθυρο αποτελεσμάτων, υποδεικνύοντας ότι το υγρό έρεε σωστά μέχρι την ταινία. Στην περίπτωση ενός τυφλού δείγματος, το σημασμένο αντίσωμα παραμένει ελεύθερο και μπορεί να συνδεθεί με την ακινητοποιημένη στη ζώνη δοκιμής της μεμβράνης μυκοτοξίνη, παράγοντας μια χρωματιστή ζώνη επί της ταινίας. Ως εκ τούτου, η παρουσία δύο ζωνών στο παράθυρο αποτελεσμάτων υποδηλώνει ένα αρνητικό αποτέλεσμα.

Μια δοκιμή πλευρικής ροής μπορεί να παρέχει είτε ένα ποιοτικό αποτέλεσμα για την παρουσία της μυκοτοξίνης-στόχου είτε ένα ημι-ποσοτικό αποτέλεσμα, συνήθως σε δέκα λεπτά. Τα πλεονεκτήματα αυτής της δοκιμής είναι ότι είναι φορητή, με όλα τα αντιδραστήρια ακινητοποιημένα και ότι δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό. Μειονέκτημα αποτελεί το κατά πολύ υψηλότερο κόστος ανά δοκιμή όταν συγκρίνεται με την ELISA. Πολλές εταιρείες στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν ξεκινήσει πρόσφατα μια ποικιλία αυτών των δοκιμών για την ανίχνευση του συνόλου των αφλατοξινών στα δημητριακά.

Μια ενδιαφέρουσα παραλλαγή της δοκιμής πλευρικής ροής είναι εκείνη στην οποία η ροή κατευθύνεται διαμέσου της μεμβράνης και όχι πάνω σε αυτή. Σε αυτή τη μορφή τα υγρά ρέουν διαμέσου της μεμβράνης και συλλέγονται σε ένα απορροφητικό επίθεμα στην αντίθετη πλευρά της μεμβράνης. Η ετικέτα είναι ενζυματική και απαιτεί ένα βήμα επώασης υποστρώματος. Αυτός ο τύπος δοκιμασίας είναι, επίσης, γνωστός ως μια δοκιμασία ενζυμικής ανοσοδιήθησης (Enzyme-Linked ImmunoFiltration Assay - ELIFA) (Pittet, 2005).

Γ) Φθορισμομετρία

Ένα άλλο σύστημα διαλογής βασίζεται στο φθορισμό σε φάσμα UV των «κύποπων» για μόλυνση καρπών (αξιοποιώντας την ιδιότητα των αφλατοξινών να φθορίζουν στα 360-435 nm). Στην περίπτωση αυτή, η τοξίνη εκλύεται σε κυψελίδα, παραγωγοποιημένη (συνήθως με την προσθήκη ενός διαλύματος βρωμίου) για την ενίσχυση του φθορισμού, και κατόπιν ανιχνεύεται σε ένα φορητό φθορισμόμετρο. Ωστόσο, στην περίπτωση των αφλατοξινών, πρέπει να τονιστεί ότι η φθορισμομετρία δεν επιτρέπει να μετρηθούν οι αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁, G₂ ατομικά, αλλά δίνει μόνο μια εκτίμηση της συνολικής συγκέντρωσης αφλατοξίνης. Επίσης, η αξιοπιστία του συστήματος είναι αμφισβητήσιμη καθώς έχουν παρατηρηθεί αρκετές αστοχίες στην πράξη, αλλά και τα πειραματικά αποτελέσματα είναι αντιφατικά, διότι δεν αποδείχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις καλός συσχετισμός του φθορισμού με την παρουσία αφλατοξίνης λόγω του ότι και άλλες ουσίες που υπάρχουν στο προϊόν φθορίζουν στο ίδιο μήκος κύματος. Εάν τα όργανα έχουν βαθμονομηθεί σωστά, η τεχνική της φθορισμομετρίας λειτουργεί ιδιαίτερα καλά για την ανίχνευση αφλατοξίνης M₁ στο

νωπό γάλα. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι σχεδόν 15 χρόνια πριν, μια συλλογική μελέτη από τον AOAC και την IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) διεξήχθη για να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα μιας στήλης ανοσοσυγγένειας σε συνδυασμό είτε με τη φθορισμομετρία είτε με την υγρή χρωματογραφία για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών στο καλαμπόκι, τα φιστίκια και το φυστικοβούτυρο και οδήγησε στην έγκριση και των δύο τεχνικών και από τους δύο οργανισμούς. Η φθορισμομετρία, που έχει καταχωρηθεί ως επίσημη μέθοδος AOAC 991.31, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα (Pittet, 2005).

A.5.2.5.3 Πόλωση φθορισμού – Fluorescence Polarization (FP) για τον προσδιορισμό αφλατοξινών

Η πόλωση φθορισμού (FP) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στον κλινικό τομέα και πρόσφατα επεκτάθηκε στην ανάλυση μυκοτοξινών. Αντίθετα με τις περισσότερες ανοσοανλύσεις, οι ανοσοανλύσεις πόλωσης φθορισμού μπορούν να διεξαχθούν χωρίς την προσκόλληση του αντισώματος σε μία στερεή επιφάνεια. Οι ανιχνευτές φθορισμού πόλωσης μετρούν έμμεσα το ρυθμό περιστροφής ενός φθοροφόρου σε διάλυμα. Ο ρυθμός της περιστροφής σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων, με τα μεγαλύτερα μόρια να περιστρέφονται βραδύτερα σε μία δεδομένη θερμοκρασία και έτσι, να δίνουν ισχυρότερο σήμα πόλωσης φθορισμού σε σχέση με τα μικρότερα μόρια. Στην ανοσοανίχνευση FP χρησιμοποιείται μια φθορισμοφόρος μυκοτοξίνη (ιχνηθέτης). Ο ιχνηθέτης έχει χαμηλό μοριακό βάρος και περιστρέφεται ταχέως σε διάλυμα. Η προσθήκη αντισώματος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ανοσοσυμπλόκου του ιχνηθέτη με το αντίσωμα, που αποτελεσματικά επιβραδύνει το ρυθμό περιστροφής του φθοροφόρου και αυξάνει το σήμα FP (Pittet, 2005). Παρουσία τοξίνης στο δείγμα, λιγότερος ιχνηθέτης προσδένεται με το αντίσωμα και το σήμα πόλωσης φθορισμού μειώνεται.

Επομένως, η ανοσοανίχνευση FP επιτρέπει την ανίχνευση των μυκοτοξινών σε διάλυμα, χωρίς την απαίτηση σταδίων καθαρισμού. Αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα για την FP ανοσολογική δοκιμή, επειδή επιτρέπει στους προσδιορισμούς να διεξάγονται γρήγορα και με λιγότερα βήματα (Maragos, 2006). Ωστόσο, η τεχνική έχει περιορισμούς. Πράγματι, σε σύγκριση με την HPLC, τα περισσότερα από τα

πειράματα FP με διάφορες μυκοτοξίνες έχουν δείξει μια θετική μεροληψία από 20 έως 30%, το οποίο είναι αποτέλεσμα εν μέρει από γνωστές διασταυρούμενες αντιδραστικότητες των αντισωμάτων έναντι άλλων μυκητικών μεταβολιτών, και εν μέρει από επιδράσεις της μήτρας. Τα δείγματα που περιέχουν υπερβολική ποσότητα μυκοτοξινών πρέπει να επανελέγχονται με μεθόδους αναφοράς για επιβεβαίωση (Pittet, 2005).

A.5.2.5.4 Fluorescence Labelled Optical – Read Immuno Dipstick Assay (FLORIDA) για τον προσδιορισμό αφλατοξινών

Σε αντίθεση με τις συμβατικές ταχείες ανοσοαναλύσεις, οι οποίες επισημαίνονται με χρυσό ή σφαιρίδια λάτεξ, η δοκιμασία FLORIDA χρησιμοποιεί ειδικά συγκροτήματα φθορισμού. Το σήμα παράγεται από μια ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία επί μιας ταινίας δοκιμής πλευρικής ροής. Εάν το αντιγόνο (μυκοτοξίνη) απουσιάζει στο δείγμα ή βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης, επισημασμένα με φθορισμό αντισώματα θα δεσμευτούν στο αντιγόνο που είναι ακινητοποιημένο σε μία γραμμή ελέγχου. Σε δείγματα που περιέχουν επαρκείς μυκοτοξίνες, ένα σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου σχηματίζεται το οποίο διέρχεται από τη γραμμή σύλληψης. Η δοκιμασία διεξάγεται από τη μεταφορά μιας ποσότητας του υγρού δείγματος ή εκχυλίσματος δείγματος σε κύπελλο δοκιμής, ακολουθούμενη από την εισαγωγή της ταινίας δοκιμής κατευθείαν μέσα στο υγρό. Μετά από χρόνο αντίδρασης περίπου δύο λεπτών, η δοκιμαστική ταινία αξιολογείται από διέγερση των φθοροφόρων σε μια φορητή λάμπα, όπου μπορούν να ανιχνευθούν οι γραμμές σύλληψης και ελέγχου οπτικά. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής έγκειται στον ειδικό (πατέντα) τρόπο σύζευξης των αντισωμάτων με φθοροφόρα, ο οποίος επιτρέπει να επιτευχθεί μια εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία. Κατά συνέπεια, η τεχνική αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως μία από τις πιο ελπιδοφόρες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη ταχέων και ιδιαίτερα ευαίσθητων ανοσοδοκιμασιών, για παράδειγμα για την ανίχνευση αφλατοξίνης M₁ στο νωπό γάλα (Pittet, 2005).

A.5.2.5.5 Ανοσολογικοί βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό αφλατοξινών

Βιοαισθητήρας είναι μια συσκευή που χρησιμοποιεί συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις που προκαλούνται από απομονωμένα ένζυμα, ανοσοσυστήματα, ιστούς, οργανίδια ή πλήρη κύτταρα για την ανίχνευση χημικών ενώσεων συνήθως με ηλεκτρικά, θερμικά ή οπτικά σήματα. Οι Leland και Clark καθιέρωσαν την έννοια του βιοαισθητήρα ως ένα βιολογικό αισθητήριο στοιχείο το οποίο αλλάζει τις ιδιότητές του όταν αντιδρά βιοχημικά με μια συγκεκριμένη ένωση ή έναν αναλύτη (Γεωργιάδου, 2015). Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων για τον ταχύ, αξιόπιστο και χαμηλού κόστους προσδιορισμό μυκοτοξινών στα τρόφιμα έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια, και διάφορα είδη δοκιμασιών έχουν ήδη επινοηθεί για αρκετές από τις μεγάλες ομάδες μυκοτοξινών.

Για την ταχεία ανίχνευση αφλατοξινών χρησιμοποιείται ένας βιοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance - SPR) (Pittet, 2005). Η αρχή του SPR βασίζεται στην ανίχνευση μιας αλλαγής του δείκτη διάθλασης του μέσου, όταν ένας αναλύτης συνδέεται με ένα ακινητοποιημένο μόριο (αντίσωμα). Μόρια του αναλύτη σε ένα υγρό δείγμα που έρχονται σε επαφή με τον αισθητήρα SPR προσδένονται σε στοιχεία βιοαναγνώρισης, παράγοντας μία αύξηση στο διαθλαστικό δείκτη στην επιφάνεια του αισθητήρα, η οποία μπορεί οπτικά να μετρηθεί. Η αλλαγή στο δείκτη διάθλασης, που παράγεται από την σύλληψη των βιομορίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μορίων αναλυόμενης ουσίας στην επιφάνεια του αισθητήρα και από τις ιδιότητες των μορίων. Αυτοί οι βιοαισθητήρες παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως μικρούς όγκους δείγματος (μL όγκων) και επαναχρησιμοποιήσιμα μεταλλικά τσιπς αισθητήρων (Mosiello, Lamberti, 2011). SPR τσιπς αισθητήρα με ακινητοποιημένη δεοξυνιβαλενόλη θα μπορούσαν να επαναχρησιμοποιηθούν πάνω από 500 φορές χωρίς σημαντική απώλεια της δραστηότητάς τους.

Μια δεύτερη μορφή χρησιμοποιώντας ανιχνευτές οπτικών ινών μπορεί να προσαρμοστεί για συνεχή παρακολούθηση των επιπέδων μυκοτοξινών. Δυστυχώς, οι περισσότερες από τις διαδικασίες βιοαισθητήρων SPR και οπτικών ινών για ανάλυση των μυκοτοξινών εξακολουθούν να απαιτούν κάποια μορφή

καθαρισμού/προσυμπύκνωσης δείγματος προκειμένου να είναι πραγματικά αποτελεσματικές και για την επίτευξη επαρκούς ευαισθησίας. Επιπλέον, η πλειονότητα αυτών των συσκευών δε διαθέτει την ικανότητα να εκτελεί ταυτόχρονες αναλύσεις πολλών δειγμάτων.

Πρόσφατα, βιοαισθητήρες συστοιχίας έχουν αναπτυχθεί για μια ποικιλία εφαρμογών. Η ικανότητα των βιοαισθητήρων συστοιχίας για την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων ταυτόχρονα για πολλαπλές αναλυόμενες ουσίες προσφέρει ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με άλλους τύπους βιοαισθητήρων (Pittet, 2005).

A.5.2.5.6 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό αφλατοξινών

Ο προσδιορισμός αφλατοξινών συνεπάγεται συνήθως πολύπλοκες, δαπανηρές και χρονοβόρες μεθόδους. Ωστόσο, ο προσδιορισμός αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί λαμβάνοντας υπόψη την ανταπόκριση των αφλατοξινών σε ηλεκτρικό ερέθισμα. Αυτές οι μέθοδοι ονομάζονται ηλεκτροχημικές, όπου εφαρμόζονται ανοσοαισθητήρες για να προσδιοριστεί η παρουσία αφλατοξινών σε ένα δείγμα.

Συνήθως, αυτοί οι αισθητήρες αποτελούνται από δύο Screen Printed Electrodes (SPE). Το πρώτο είναι κατασκευασμένο από γραφίτη, λευκόχρυσο ή χρυσό και είναι γνωστό ως ηλεκτρόδιο εργασίας, ενεργό ηλεκτρόδιο ή ηλεκτρόδιο μέτρησης. Το δεύτερο ηλεκτρόδιο είναι το ηλεκτρόδιο αναφοράς και είναι συνήθως κατασκευασμένο από Ag/AgCl. Σε γενικές γραμμές, αυτή η τεχνική περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια. Στο πρώτο, το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι επικαλυμμένο με ένα αντίσωμα. Μετά από το χρόνο επώασης, το δείγμα που περιέχει τις αφλατοξίνες προστίθεται σε αυτό το ηλεκτρόδιο, ενώ το άλλο ηλεκτρόδιο αντιδρά για ένα καθορισμένο χρόνο. Στο τέλος, μία σύζευξη αφλατοξινών και ενζύμων προστίθεται στο ηλεκτρόδιο και τότε αρχίζει η ανταγωνιστική αντίδραση. Σε αυτή την αντίδραση, ελεύθερες αφλατοξίνες ανταγωνίζονται για να συνδεθούν με τα αντισώματα που υπάρχουν στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Μετά από κάποιο χρόνο σταθεροποίησης, το ηλεκτρόδιο εργασίας αφαιρείται από το δείγμα και ξεπλένεται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Το δεύτερο βήμα συνεπάγεται την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού δυναμικού (συνήθως 100 mV) στο ηλεκτρόδιο, το οποίο αλλάζει την ηλεκτρική του αγωγιμότητα σύμφωνα με τη συγκέντρωση των αφλατοξινών (Pittet, 2005).

Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση – Capillary Electrophoresis (CE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) είναι μία χρωματογραφική τεχνική στην οποία οι μυκοτοξίνες διαχωρίζονται η μία από την άλλη και από τα συστατικά της μήτρας χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό δυναμικό. Εν συντομία, ένα τριχοειδές διοξειδίου του πυριτίου (τυπικού μήκους 50 cm) γεμίζεται με ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στο τριχοειδές. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την μετανάστευση των φορτισμένων σωματιδίων στο ρυθμιστικό διάλυμα. Κατιόντα μεταναστεύουν στην κάθοδο και ανιόντα μεταναστεύουν στην άνοδο υπό την επίδραση μιας ηλεκτροοσμωτικής ροής. Οι αναλύτες κατόπιν ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας φθορισμό ή υπεριώδη απορρόφηση. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η δυνατότητα μείωσης της χρήσης διαλύτη κατά τη διάρκεια των καθοριστικών βημάτων της ανάλυσης, λόγω των σχετικά μικρών όγκων δείγματος (nanoliters) και του μικρού όγκου των παραγόμενων αποβλήτων (Pittet, 2005).

Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές προσφέρουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών μεθόδων προσδιορισμού αφλατοξινών μεταξύ των οποίων: αξιοπιστία, μετρήσεις χαμηλού κόστους, in-situ μετρήσεις, γρήγορες διαδικασίες και πιο εύκολη μεθοδολογία σε σχέση με τις συνήθεις τεχνικές χρωματογραφίας παρόμοιας απόδοσης (Γεωργιάδου, 2015).

A.5.2.5.7 Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή – Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) για τον προσδιορισμό αφλατοξινών

Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs) είναι τεχνολογικά προηγμένα πολυμερικά υλικά, τα οποία έχουν βρει εφαρμογή σε εκλεκτικούς διαχωρισμούς μικρών μορίων και ουσιών με βιολογικό ενδιαφέρον. Παράγονται κατά το συμπολυμερισμό ενός λειτουργικού μονομερούς (functional monomer) και ενός μονομερούς δημιουργίας διακλαδώσεων (crosss-linker) παρουσία ενός συγκεκριμένου μορίου, του μορίου αποτύπωσης (template). Τα λειτουργικά μονομερή έχουν την ικανότητα δημιουργίας δεσμών (ομοιοπολικών ή μη) με το μόριο αποτύπωσης στο αρχικό διάλυμα πολυμερισμού και έτσι, μετά από τον πολυμερισμό και την απομάκρυνση του μορίου αποτύπωσης, μια τρισδιάστατη κοιλότητα σχηματίζεται στο στερεό, ισχυρά

διακλαδισμένο, πολυμερικό φορέα. Η κοιλότητα αυτή είναι συμπληρωματική τόσο γεωμετρικά όσο και χημικά με το μόριο αποτύπωσης και έτσι το πολυμερές κατέχει πλέον ένα είδος μοριακής μνήμης. Μπορούν έτσι να επαναδεσμεύουν το μόριο αποτύπωσης με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα, όπως τα αντισώματα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα. Τα MIP παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμική και χημική σταθερότητα σε αντίθεση με τα φυσικά αντισώματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν επαναλαμβανόμενα, χωρίς απώλεια της ικανότητάς τους να αναγνωρίζουν το μόριο αποτύπωσης.

Το μονομερές δημιουργίας διακλαδώσεων χρησιμοποιείται για τη μόνιμη σταθεροποίηση των λειτουργικών μονομερών σε συγκεκριμένες θέσεις εντός της κοιλότητας αναγνώρισης και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε υψηλό ποσοστό.

Ακολουθεί ανάμειξη (α) των λειτουργικών μονομερών, (β) του μονομερούς δημιουργίας διακλαδώσεων και (γ) του μορίου αποτύπωσης, που οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ αυτού και των μονομερών. Ο επακόλουθος πολυμερισμός δίνει ένα αδιάλυτο πολύ διακλαδισμένο πολυμερές δίκτυο γύρω από το μόριο αποτύπωσης, που μετά την απομάκρυνση του μορίου αποτύπωσης μπορεί να το αναγνωρίζει εκλεκτικά σε μετέπειτα χρήση του.

Η σταθερότητα, η ευκολία παρασκευής και το χαμηλό κόστος των υλικών καθιστούν την τεχνική ιδιαίτερα ελκυστική (Pittet, 2005).

A.5.2.5.8 Διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών μέσω απεικόνισης με ακτίνες X

Σε ελληνικά κελυφωτά φιστίκια, μελετήθηκε η δυνατότητα διαχωρισμού καρπών με στιγματομύκωση (οι καρποί εμφανίζουν μια νεκρωτική κηλίδα στο σπέρμα, μη ορατή εξωτερικά) με απεικόνιση με ακτίνες X (X-ray imaging). Η ανίχνευση βάσει ακτίνων X βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό απορρόφησης μεταξύ των υγιών και αλλοιωμένων λόγω στιγματομύκωσης καρπών. Παρατηρήθηκε ότι σπέρματα με νεκρά σημεία (σκοτεινές περιοχές/κηλίδες) περιείχαν περισσότερη αφλατοξίνη σε σχέση με τα υγιή σπέρματα. Η απορρόφηση ακτίνων X εξαρτάται από την πυκνότητα του υπό εξέταση δείγματος. Η μόλυνση από μύκητες στα τρόφιμα οδηγεί σε αλλαγές στην πυκνότητα του τροφίμου. Τέτοιου είδους αλλαγές μπορούν να ανιχνευθούν από σύγκριση των

χαρακτηριστικών μεταξύ υγιών και μολυσμένων καρπών (Yanniotis, Proshlyakov, Revithi, Georgiadou, Blahovec, 2011). Ιδιαίτερη σημασία έχει η παρατήρηση ότι στους καρπούς με το σύμπτωμα της νεκρωτικής κηλίδας απομονώθηκε ο μύκητας που παράγει αφλατοξίνη με αποτέλεσμα η αφαίρεση των καρπών αυτών να μειώνει σε πολύ μεγάλο ποσοστό (98%) τη συνολική ποσότητα αφλατοξίνης στην παρτίδα (Γεωργιάδου, 2015).

A.5.2.5.9 Διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών βάσει του προφίλ των πτητικών ουσιών τους

Η παρακολούθηση των πτητικών μπορεί να είναι ένας καλός δείκτης της πρόωρης φθοράς ποιότητας και πιθανής μόλυνσης, λόγω του γεγονότος ότι τα ευμετάβλητα χαρακτηριστικά ενός προϊόντος επηρεάζονται από την αλλοίωση. Στην περίπτωση της μυκητιακής αλλοίωσης των τροφίμων, οι μύκητες παράγουν πτητικά ως μεταβολίτες. Επομένως, παρακολούθηση των μυκητιασικών πτητικών ενώσεων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μυκητιασικής λοίμωξης και για προσδιορισμό συγκεκριμένων μυκήτων. Η παραγωγή των πτητικών εξαρτάται από το υπόστρωμα ανάπτυξης, καθώς επηρεάζεται από τη σύνθεση θρεπτικών συστατικών, τη διαθεσιμότητα του νερού, τη θερμοκρασία και την ηλικία της καλλιέργειας.

Το 2015 διεξήχθη μία μελέτη για να διερευνηθεί το πτητικό προφίλ υγιών και μολυσμένων φιστικιών και να προσδιοριστούν εκείνα τα πτητικά που είναι χαρακτηριστικά για τα μολυσμένα δείγματα. Για την απομόνωση και τη συγκέντρωση των πτητικών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Head Space-Solid Phase MicroExtraction (HS-SPME). Ακολούθησε ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων και Gas Chromatography - Flame Ionization Detector (GC-FID) ανάλυση των πτητικών ενώσεων, ενώ η αφλατοξίνη προσδιορίστηκε με HPLC. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε μία 82-100% σωστή διάκριση μεταξύ υγιών και μολυσμένων δειγμάτων (Γεωργιάδου, 2015).

A.5.2.5.10 Διαλογή των μολυσμένων με αφλατοξίνη καρπών βάσει οπτικής διαφοροποίησης

Άλλα συστήματα διαλογής, βασίζονται στον οπτικό διαχωρισμό καρπών, οι οποίοι εμφανίζουν μη-τυπικά (off-standard) χαρακτηριστικά της ποικιλίας, ως προς το χρώμα, το μέγεθος, το βάρος και την εξωτερική εμφάνιση. Αυτά τα συστήματα, όμως, έχουν αναπτυχθεί με βάση τα φυσικά χαρακτηριστικά ξένων ποικιλιών (κυρίως της ποικιλίας Kerman που καλλιεργείται στις Η.Π.Α. και δύο ιρανικών ποικιλιών) και τα οποία είναι διαφορετικά από τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας «Αιγίνης» η οποία καλλιεργείται μόνο στην Ελλάδα (Γεωργιάδου, 2015).

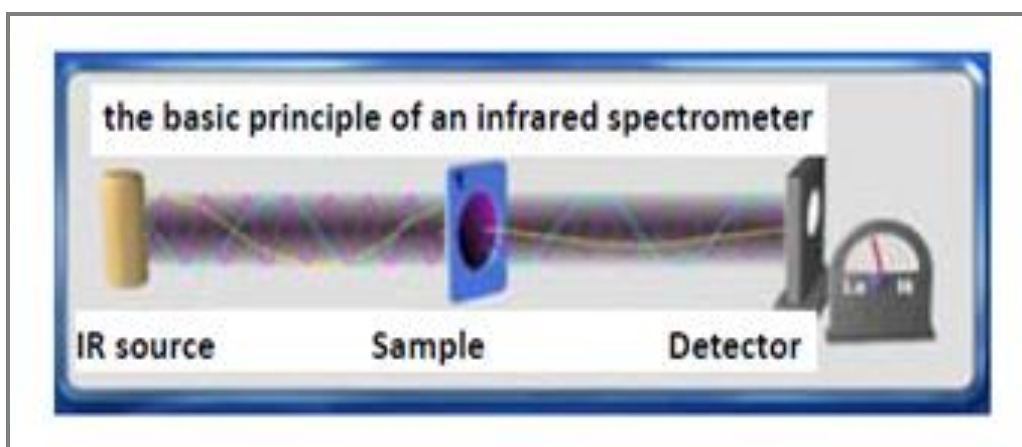
Α.6 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Οι τεχνικές φασματοσκοπίας έχουν διαδοθεί επειδή είναι γρήγορες, χαμηλού κόστους και μη καταστροφικές, κατάλληλες για στερεά και υγρά δείγματα. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του δείγματος με την ακτινοβολούσα ενέργεια ως μια συνάρτηση του μήκους κύματος ή της συχνότητας (Γεωργιάδου, 2015).

Α.6.1 Γενικά στοιχεία φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR)

Α.6.1.1 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infra Red spectroscopy) είναι μια τεχνική που βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από το μέσο που εξετάζεται. Όταν το εξεταζόμενο μέσο εκτίθεται σε υπέρυθρη ακτινοβολία (IR), μέρος της ενέργειας IR μπορεί να απορροφηθεί και το υπόλοιπο θα μεταδοθεί. Εάν τοποθετήσουμε έναν ανιχνευτή, που είναι ευαίσθητος στην υπέρυθρη ακτινοβολία, στη διαδρομή της εκπεμπόμενης ακτίνας μπορούμε να ανιχνεύσουμε την ενέργεια που δεν απορροφάται και συνεπώς να προσδιορίσουμε το ποσό της ενέργειας που απορροφάται (εικόνα 6.1) (Κουβουτσάκης, 2013).



Εικόνα 6.1. Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπερύθρου.

Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού τμήματος και της περιοχής των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm) και διακρίνεται σε τρεις βασικές υποπεριοχές (Παππάς, 2000):

A) Εγγύς Υπέρυθρη (Near IR, NIR) (0,75-2,5 μm ή 13.300-4.000 cm^{-1}), όπου παρατηρούνται συνδυασμοί ταλαντώσεων και σκεδάσεις μεγαλύτερης τάξης

B) Μέσο Υπέρυθρη (Mid IR, MIR) (2,5-50 μm ή 4.000-400 cm^{-1}), όπου διεγείρονται θεμελιώδεις ταλαντώσεις

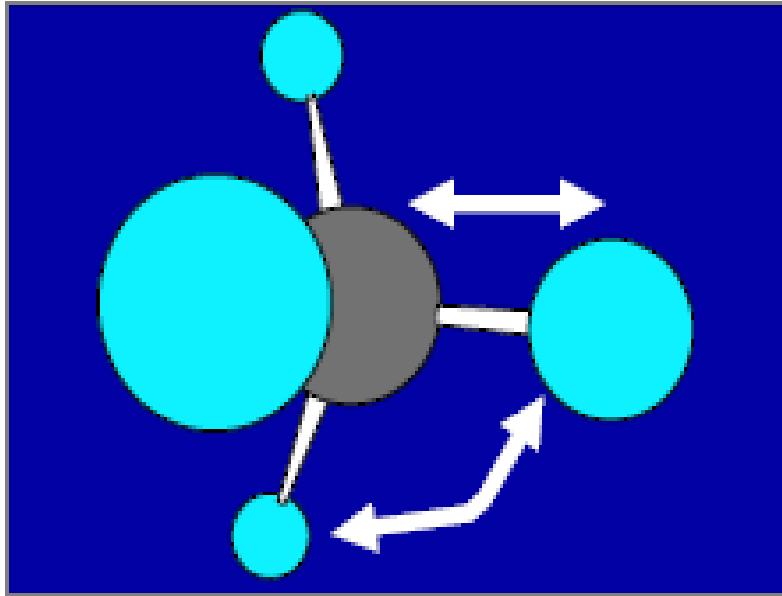
Γ) Άπω Υπέρυθρη (Far IR, FIR) (50-1000 μm ή 400-10 cm^{-1}), όπου καλύπτονται οι συχνότητες ταλάντωσης της δομής των μεγάλων μορίων

Συνήθως στο IR αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού ο οποίος ορίζεται σαν το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός.

$$\nu = \frac{\tilde{\nu}}{c} = \frac{1}{\lambda}$$

Η πλέον αξιοποιήσιμη περιοχή της περιοχής MIR είναι αυτή από 4000 έως 600 cm^{-1} .

Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο προκαλεί διεγέρσεις στις δονήσεις των ατόμων σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες. Οι δονήσεις είναι «δονήσεις τάσης» (stretching vibrations), στις οποίες μεταβάλλεται μόνο το μήκος του δεσμού, δηλαδή οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους, και «δονήσεις κάμψης» (bending vibrations) στις οποίες μεταβάλλεται μόνο η γωνία μεταξύ των δεσμών και μπορεί να είναι τεσσάρων ειδών: ψαλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), παλλόμενη (wagging) ή συστρεφόμενη (twisting) (εικόνα 6.2) (Skoog, Holler, Nieman, 2002). Γενικά σε ένα πολυατομικό μόριο με n άτομα, θεωρητικά οι δυνατές δονήσεις είναι $3n-6$, από τις οποίες οι $n-1$ είναι δονήσεις τάσης και οι $2n-5$ είναι δονήσεις κάμψης (Παππάς, 2000).



Εικόνα 6.2. Σχηματική αναπαράσταση δόνησεων τάσης και κάμψης (Ταραντίλης, 2004).

Προϋποθέσεις για να απορροφηθεί ακτινοβολία από ένα μόριο είναι (Παππάς, 2000):

A) η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι ίση με τη συχνότητα δόνησης ή περιστροφής των ατόμων του μορίου

B) να δονείται το μόριο κατά τέτοιο τρόπο ώστε η διπολική ροπή του να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργός στο υπέρυθρο. Όσο αυξάνει η μεταβολή της διπολικής ροπής τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο δεν παρατηρείται απορρόφηση ακτινοβολίας στην περιοχή αυτή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από τα πολύ συμμετρικά μόρια (Fusco et al., 2015).

Η συχνότητα της κίνησης δίνεται από την εξίσωση: $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$

όπου k : σταθερά δύναμης του δεσμού

μ : ανηγμένη μάζα και $\mu = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2}$

m_1 : μάζα ατόμου 1

m_2 : μάζα ατόμου 2

Πίνακας 6.1. Σταθερές Δύναμης (κ) και Ανηγμένη Μάζα (μ) για διάφορα ατομικά ζεύγη (Ταραντίλης, 2004).

Ατομικό ζεύγος	κ^a	μ^b	a Εκφρασμένη σε 10^5 dynes /cm.
C-C	4,5	6	b Εκφρασμένη σε μονάδες mH, όπου mH = μάζα του ατόμου του υδρογόνου = $1,67339 \times 10^{-24}$ g
C=C	9,6	6	
C≡C	15,6	6,85	
C-O	5,0	6,85	
C=O	12,1	6,85	
C-H	5,1	0,923	
O-H	7,7	0,941	
C-N	5,8	6,46	
C≡N	17,7	6,46	
N-H	6,4	0,933	

Οι δονήσεις κάμψεως απορροφούν σε μικρότερες συχνότητες από τις δονήσεις τάσεως, επειδή απαιτείται μικρότερη ενέργεια να δονηθεί μία ράβδος κάθετα στον άξονά της, παρά κατά μήκος του. Η συχνότητα απορρόφησης εξαρτάται από την ατομική μάζα και την ισχύ του δεσμού.

Παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα δόνησης είναι οι εξής (Παππάς, 2000):

A) Συζυγιακό φαινόμενο (συμμετοχή σε δομές συντονισμού)

B) Επαγωγικό φαινόμενο: Η παρουσία ενός ηλεκτροθετικού ή ηλεκτραρνητικού ατόμου μπορεί να επηρεάσει το μήκος, την ισχύ και την τάξη ενός δεσμού

Γ) Στεροχημικές παρεμποδίσεις: Στους δακτυλίους μεγάλου μεγέθους και στις μη κυκλικές κετόνες η κίνηση του ατόμου C κατά την τάση του δεσμού C=O «απορροφάται» από τις κινήσεις των γειτονικών ατόμων C. Σε δακτυλίους με 3,4,5 άτομα, η τάση του δεσμού C=O συμπιέζει τα γειτονικά άτομα, με αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας όσο το μέγεθος του δακτυλίου μικραίνει. Αυτό οφείλεται στην ελάττωση του ρ και στην αύξηση του s χαρακτήρα του δεσμού, που ελαττώνει το μήκος του διπλού δεσμού, καθιστώντας τον πιο δύσκαμπτο.

Δ) Δεσμοί υδρογόνου: Προκαλούν επιμήκυνση των δεσμών ανάμεσα στα άτομα και ελαττώνουν τη σταθερά δύναμης του δεσμού k και μετατόπιση σε χαμηλότερες συχνότητες. Αφορά τόσο ενδομοριακούς, όσο και διαμοριακούς δεσμούς.

Οι συχνότητες (ή οι κυματαριθμοί) στις οποίες οργανικές δραστικές ομάδες απορροφούν υπέρυθη ακτινοβολία καλούνται «συχνότητες χαρακτηριστικών ομάδων» (group frequencies) και είναι σπάνια επακριβώς οι ίδιες, λόγω των αλληλεπιδράσεων με άλλες δονήσεις που σχετίζονται με το ένα ή και με τα δύο άτομα που αποτελούν την ομάδα. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι συνήθως μικρές. Κατά συνέπεια, μπορεί να ορισθεί ένα εύρος συχνοτήτων μέσα στο οποίο είναι πολύ πιθανόν να βρεθεί η κορυφή της απορρόφησης μιας δεδομένης δραστικής ομάδας. Οι χαρακτηριστικές συχνότητες των ομάδων επιτρέπουν μια επιστημονική πρόβλεψη ως προς το εάν μια ομάδα υπάρχει ή όχι σε ένα μόριο (Skoog et al., 2002).

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές. Την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η μεν πρώτη εκτείνεται στην περιοχή $4000-1400\text{ cm}^{-1}$ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων. Η δε δεύτερη εκτείνεται στην περιοχή $1400-600\text{ cm}^{-1}$, στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» κάθε ένωσης (Κουβουτσάκης, 2013). Στην παρούσα ερευνητική μελέτη μάς απασχολεί η περιοχή MIR του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που βρίσκεται μεταξύ 4000 και 400 cm^{-1} και μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερις ευρείες περιοχές: η περιοχή δόνησης τάσης X-H ($4000-2500\text{ cm}^{-1}$), η περιοχή τριπλού δεσμού ($2500-2000\text{ cm}^{-1}$), η περιοχή διπλού δεσμού ($2000-1500\text{ cm}^{-1}$) και η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων ($1500-400\text{ cm}^{-1}$) (Karoui, Downey, Blecker, 2010).

A.6.1.2 Σημασία φασματοσκοπίας υπέρυθρου

Η υπέρυθη φασματοσκοπία είναι μια από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές (πίνακας 6.2). Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, είτε ολόκληρα είτε ορισμένες ταινίες απορρόφησης τους με άλλα γνωστά φάσματα. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές η ταυτοποίηση άγνωστων

οργανικών ουσιών, αλλά και η πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Για το λόγο αυτό η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην οργανική και φαρμακευτική χημεία, στη φαρμακογνωσία και στην ανάλυση φυσικών προϊόντων, φαρμάκων, τροφίμων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κ.ά (Κουβουτσάκης, 2013).

Πίνακας 6.2. Οι σπουδαιότερες εφαρμογές της IR (Κουβουτσάκης, 2013).

Φασματική περιοχή	Είδος προσδιορισμού	Είδος δείγματος
Εγγύς υπέρυθρη (Near IR)	Ποσοτικός	Στερεά ή υγρά εμπορικά υλικά
	Ποσοτικός	Μείγματα αερίων
Μέση υπέρυθρη (Mid IR)	Ποιοτικός	Καθαρές στερεές, υγρές ή αέριες ενώσεις
	Ποσοτικός	Πολύπλοκα στερεά, υγρά ή αέρια μείγματα
	Χρωματογραφικός	Πολύπλοκα στερεά, υγρά ή αέρια μείγματα
	Ποσοτικός	Ατμοσφαιρικά δείγματα
Άπω υπέρυθρη (Far IR)	Ποιοτικός	Καθαρές ανόργανες ή οργανομεταλλικές ενώσεις

A.6.1.3 Εφαρμογές εγγύς υπέρυθρης φασματοσκοπίας (NIR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία χρησιμεύει ως μέθοδος διαλογής ελαττωματικών καρπών. Συγκεκριμένα, συστήματα διαλογής στο εγγύς υπέρυθρο φάσμα (NIR) εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στο διαχωρισμό συγκεκριμένων συμπτωμάτων σε ελαττωματικούς καρπούς σε σχέση με συστήματα διαλογής που βασίζονται σε άλλες φασματικές περιοχές.

Για παράδειγμα, στα εργοστάσια επεξεργασίας φιστικιού αρχικά χρησιμοποιούνταν μονοχρωματικές συσκευές και η διαλογή βασιζόταν στη μέτρηση από μία μοναδική ζώνη φωτός, συνήθως στο ορατό τμήμα του φάσματος. Έπειτα, αναπτύχθηκαν συσκευές που απορροφούν στο NIR (από 1000 έως 1700 nm), επιτρέποντας έτσι τη διαλογή με βάση τις χημικές και όχι τις οπτικές διαφορές, εξαιτίας της διαφορετικής χημικής σύνθεσης μεταξύ υγιών και μολυσμένων προϊόντων (Haff, Pearson, 2006). Το οπτικό φάσμα αδυνατούσε να ταξινομήσει τα είδη μυκήτων, ενώ η ακρίβεια ταξινόμησης από τη φασματομετρία NIR αποδείχθηκε σαφώς καλύτερη.

Η εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι μια εξαιρετική μέθοδος για την ταχεία και χαμηλού κόστους ανίχνευση αφλατοξινών στον τομέα των σιτηρών. Αφλατοξίνη B₁ μετρήθηκε με επιτυχία στον αραβόσιτο και στο κριθάρι εφαρμόζοντας φασματοσκοπία NIR μετασχηματισμού Fourier. Άλλοι μελετητές έχουν ενσωματώσει έναν αισθητήρα δέσμης ανάκλασης οπτικών ινών στο σύστημα NIR. Εδώ, ο ανιχνευτής οπτικών ινών είναι βυθισμένος στο δείγμα χωρίς προηγούμενη επεξεργασία των δειγμάτων. Στη συνέχεια, τα φάσματα NIR καταγράφονται απευθείας από την ίνα. Αυτός ο συνδυασμός τεχνολογιών έχει αποδειχθεί ότι ποσοτικοποιεί την αφλατοξίνη B₁, την ωχρατοξίνη A και τις συνολικές αφλατοξίνες στην πάπρικα (Γεωργιάδου, 2015). Μία άλλη εφαρμογή αποτελεί ένα σύστημα απεικόνισης κοντά στην υπέρυθρη περιοχή (NIR) που ερευνήθηκε για την ταυτοποίηση υγιών και μολυσμένων από μύκητες χουρμάδων. Οι βιοχημικές αλλαγές που προκύπτουν στους χουρμάδες από τη μεταβολική δραστηριότητα των μυκήτων μπορούν να ανιχνευθούν από τη διαφορά στο φάσμα. Έτσι, η NIR ανάλυση απεικόνισης μπορεί να διακρίνει τους μολυσμένους με μύκητες χουρμάδες από τους υγιείς και επιπλέον, να περιορίσει την παρουσία παθογόνων τοξινών σε ready-to-eat τρόφιμα. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την έγκαιρη ανίχνευση του *A. flavus* (από τη στιγμή που η μόλυνση είναι ακόμα αόρατη) και είναι χρήσιμη στην αποφυγή της διασταυρούμενης μόλυνσης μεταξύ μολυσμένων και υγιών χουρμάδων. Αύξηση της μόλυνσης των χουρμάδων συνεπάγεται απώλεια σκληρότητας και αυτό ανιχνεύεται, επίσης, από το σύστημα απεικόνισης NIR (Teena, Manickavasagan, Ravikanth, Jayas, 2014).

Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός της φασματομετρίας NIR και των χημειομετρικών τεχνικών μπορεί να είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανίχνευση της προέλευσης των φιστικιών, παρέχοντας αξιόπιστα αποτελέσματα μέσω ενός ταχύ και σχετικά οικονομικού τρόπου ανάλυσης (Vitale, Bevilacqua, Bucci, Magri, Magri, Marini, 2012).

A.6.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier

A.6.2.1 Σημασία FTIR

Υπάρχουν τρία είδη αναλυτικών τεχνικών υπέρυθρου φάσματος. Ως εκ τούτου, στο εμπόριο διατίθενται τρία είδη οργάνων για μετρήσεις απορρόφησης υπέρυθρου (Skoog et al., 2002):

A) Όργανα με φράγμα διασποράς της ακτινοβολίας (όργανα διασποράς) τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως σε ποιοτικές μετρήσεις

B) Μη διασπείροντα φωτόμετρα, τα οποία έχουν αναπτυχθεί για ποσοτικό προσδιορισμό

Γ) Πολυπλεκτικά όργανα μετασχηματισμού Fourier, τα οποία είναι κατάλληλα τόσο για ποιοτικές όσο και για ποσοτικές μετρήσεις

Η φασματοσκοπία FTIR αναπτύχθηκε με σκοπό να ξεπεράσει τους περιορισμούς που έθεταν τα όργανα που βασίζονταν στις μεθόδους A) και B). Οι κύριες δυσκολίες αφορούσαν (Skoog et al., 2002):

- 1) την αργή διαδικασία μέτρησης ενός φάσματος IR
- 2) το γεγονός ότι ο ανιχνευτής, στην περιοχή από $4000-400\text{ cm}^{-1}$ που συνήθως χρησιμοποιείται στο IR, λάμβανε μόνο ένα χαμηλό ποσοστό (%) της ενέργειας της αρχικής πηγής ακτινοβολίας. Επειδή η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων ήταν πολύ μικρές, ο «θόρυβος» σκέπαζε τις ταινίες απορρόφησης.

Απαραίτητη ήταν μία τεχνική για τη μέτρηση όλων των υπέρυθρων συχνοτήτων ταυτόχρονα και όχι μεμονωμένα. Όμως, ο ανιχνευτής έπρεπε να λαμβάνει έως και το 50% της ενέργειας της αρχικής πηγής ακτινοβολίας. Οι αδυναμίες αυτές των κοινών φασματοφωτομέτρων υπερνικήθηκαν με τη φασματοσκοπία IR με Μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR) (Κουβουτσάκης, 2013).

A.6.2.2 Τεχνικές λήψης φάσματος FTIR

Όταν μια υπέρυθρη ακτίνα εστιάζεται πάνω σε ένα σωματιδιακό υλικό, η προσπίπτουσα δέσμη μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα σωματίδια με διάφορους τρόπους (Παππάς, 2000).

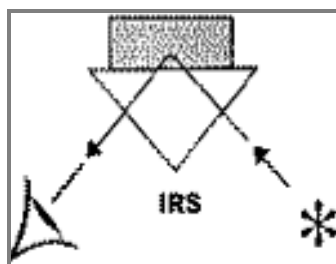
A) Κλασικές τεχνικές

- 1) Υγρά δείγματα: μεταξύ διαφανών πλακιδίων NaCl, KBr, ZnSe
- 2) Στερεά δείγματα:
 - α) Σε μορφή διαλύματος σε κυψελίδες
 - β) Σε μορφή δισκίων με KBr
- 3) Αέρια δείγματα: σε κυψελίδες

Πλεονέκτημα των κλασικών τεχνικών λήψης φάσματος είναι ότι το σύνολο της υπέρυθρης ακτινοβολίας προσπίπτει στο δείγμα. Μειονέκτημα είναι ότι η οπτική διαδρομή είναι μικρή. Έτσι, οι πληροφορίες προέρχονται μόνο από το τμήμα του δείγματος στο οποίο προσπίπτει η υπέρυθρη ακτινοβολία. Επομένως, με δεδομένο ότι τουλάχιστον τα στερεά μίγματα δεν είναι απόλυτα ομογενή, υπάρχει ο κίνδυνος το φάσμα να μην είναι αντιπροσωπευτικό (Παππάς, 2000).

B) Σύγχρονες τεχνικές

- 1) Τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance spectroscopy, ATR)

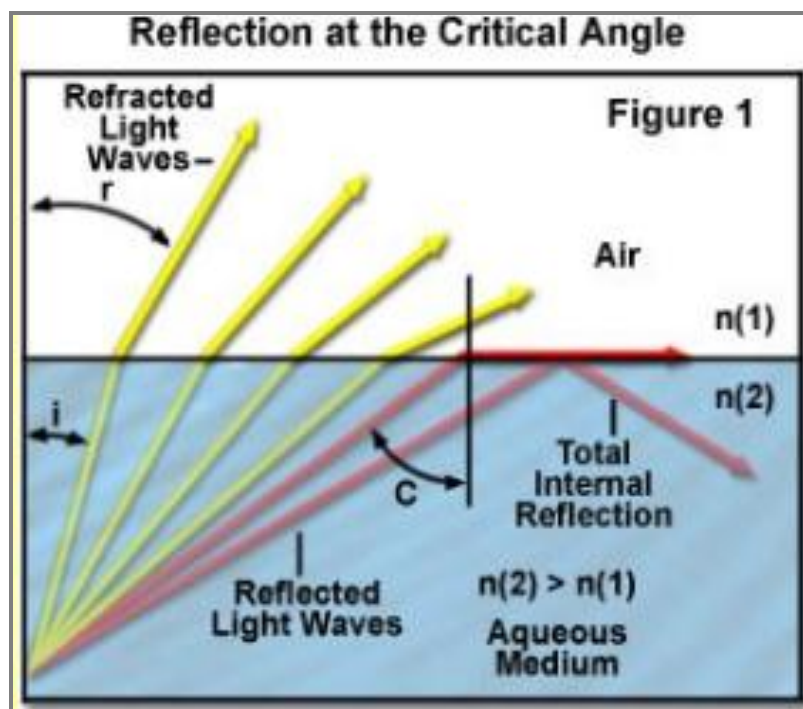


Εικόνα 6.3. Πορεία υπέρυθρης ακτινοβολίας στη μέθοδο ATR (1).

Το ATR είναι ιδανικό για παχιά δείγματα ή δείγματα που απορροφούν έντονα. Το ATR λειτουργεί καλά για τα δείγματα αυτά, επειδή η ένταση των παροδικών κυμάτων εξασθενεί εκθετικά με την απόσταση από την επιφάνεια του κρυστάλλου ATR, καθιστώντας την τεχνική γενικά ευαίσθητη στο πάχος του δείγματος (Thermoscientific, 2013).

Στη μέθοδο ATR, μια υπέρυθρη ακτίνα (IR) κατευθύνεται πάνω σε ένα οπτικά πυκνό κρύσταλλο (στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης) με υψηλό δείκτη διάθλασης με μία ορισμένη γωνία (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005), δηλαδή μια δέσμη IR κατευθύνεται σε ένα κατάλληλο πρίσμα υπό γωνία που υπερβαίνει την κρίσιμη γωνία. Όταν ξεπεραστεί η κρίσιμη γωνία, παρουσιάζεται ολική εσωτερική ανάκλαση εντός του μέσου (εικόνα 6.4).

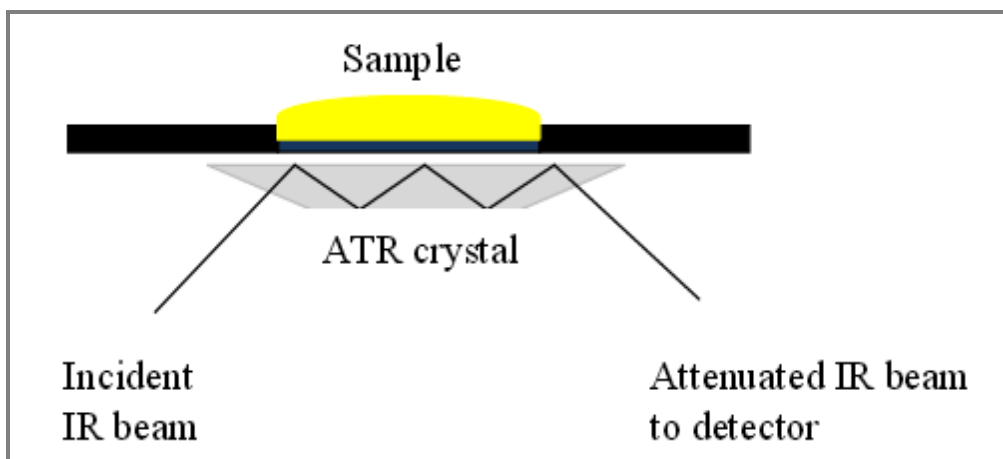
Κρίσιμη γωνία: όταν η γωνία διάθλασης (r) γίνεται ίση με 90° και ισχύει ο νόμος του Snell $\sin(\theta) = n(1) / n(2)$ όπου $n(1) \neq n(2)$ όπου θ ορίζεται η κρίσιμη γωνία c .



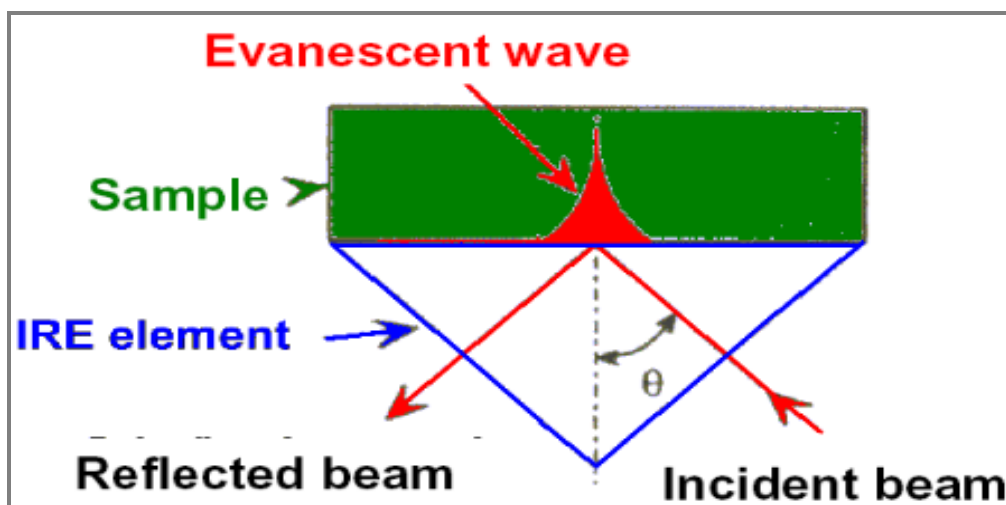
Εικόνα 6.4. Ανάκλαση στην κρίσιμη γωνία.

Η ακτινοβολία IR ανακλάται ολικά εσωτερικά από την πίσω επιφάνεια, η οποία είναι σε επαφή με το δείγμα. Αυτή η εσωτερική ανάκλαση στη διεπιφάνεια κρυστάλλου – δείγματος δημιουργεί ένα εφήμερο κύμα που εκτείνεται πέρα από την επιφάνεια του κρυστάλλου διεισδύοντας μέσα στο δείγμα που έρχεται σε επαφή με τον κρύσταλλο. Μπορεί να είναι ευκολότερο να σκεφτούμε αυτό το παροδικό κύμα ως μια «φούσκα» υπέρυθρων που κάθετα στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Αυτό το παροδικό κύμα προεξέχει μόνο μερικά microns (0,5-5 μm) πέρα από την επιφάνεια του κρυστάλλου και μέσα στο δείγμα. Κατά συνέπεια, πρέπει να υπάρχει καλή επαφή μεταξύ του δείγματος

και της επιφάνειας του κρυστάλλου. Σε περιοχές του υπέρυθρου φάσματος, όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια, το παροδικό κύμα θα είναι εξασθενημένο. Η εξασθενημένη δέσμη από κάθε παροδικό κύμα επιστρέφει στον κρύσταλλο, εξέρχεται από το αντίθετο άκρο του κρυστάλλου και διοχετεύεται στον ανιχνευτή στο φασματόμετρο IR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005). Την πορεία της υπέρυθρης ακτινοβολίας κατά τη μέθοδο ATR δείχνουν οι εικόνες 6.3, 6.5 και 6.6. Οι ATR συσκευές μετρούν τη συνολική ανακλώμενη ενέργεια από την επιφάνεια του δείγματος σε επαφή με τον κρύσταλλο μετάδοσης υπέρυθρων (Kaya-Celikera, Mallikarjunana, Dalay, 2011). Χρησιμοποιείται ATR πολλαπλής αναπήδησης (multi-bounce). Το σύστημα στη συνέχεια, δημιουργεί ένα υπέρυθρο φάσμα (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005).

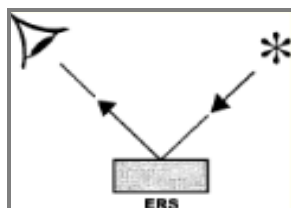


Εικόνα 6.5. Πορεία υπέρυθρης ακτίνας στη μέθοδο ATR (2).



Εικόνα 6.6. Πορεία υπέρυθρης ακτίνας στη μέθοδο ATR (3).

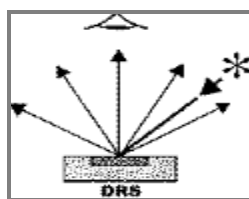
2) Τεχνική της ολικής κατοπτρικής ανάκλασης (Total Specular Reflection spectroscopy, TSR)



Εικόνα 6.7. Πορεία υπέρυθρης ακτινοβολίας στην τεχνική της ολικής κατοπτρικής ανάκλασης.

Η TSR είναι ιδανική για λείες επιφάνειες, μέτρηση λεπτών στρώσεων ή μονοστιβάδων και λειτουργεί με την αρχή αποτελεσματικότητας της ανάκλασης. Η αρχή αυτή αναφέρει ότι κάθε δείγμα έχει ένα δείκτη διάθλασης που ποικίλει ανάλογα με τη συχνότητα του φωτός στο οποίο το δείγμα είναι εκτεθειμένο. Αντί να εξετάσει την ενέργεια που περνά μέσα από το δείγμα, η TSR μετρά την ενέργεια που ανακλάται από την επιφάνεια του δείγματος ή το δείκτη διάθλασής του. Έτσι, η ακτινοβολία υπόκειται σε πολλαπλές αντανάκλασεις από την επιφάνεια των σωματιδίων χωρίς να διεισδύσει μέσα στα σωματίδια. Την πορεία της υπέρυθρης ακτινοβολίας κατά την τεχνική TSR δείχνει η εικόνα 6.7. Με την εξέταση των ζωνών συχνοτήτων στις οποίες ο ρυθμός μεταβολής του δείκτη διάθλασης είναι υψηλός, μπορούν να γίνουν υποθέσεις σχετικά με την απορροφητικότητα του δείγματος (Παππάς, 2000). Στην τεχνική TSR η γωνία ανάκλασης είναι ίση με τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας (Skoog et al., 2002). Η TSR παρέχει άριστα ποιοτικά δεδομένα και χρησιμοποιείται, συνήθως, για την ανάλυση τόσο οργανικών όσο και ανόργανων δειγμάτων που έχουν μεγάλες, επίπεδες, ανακλαστικές επιφάνειες. Πλεονεκτήματα της TSR αποτελούν η υψηλή ευαισθησία σε δείγματα μονοστιβάδας και το γεγονός ότι δεν παρατηρείται βλάβη του δείγματος κατά τη διάρκεια της ανάλυσης (μη καταστρεπτική τεχνική) (Παππάς, 2000).

3) Τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform spectroscopy, DRIFT)



Εικόνα 6.8. Πορεία υπέρυθρης ακτινοβολίας στην τεχνική της διάχυτης ανάκλασης.

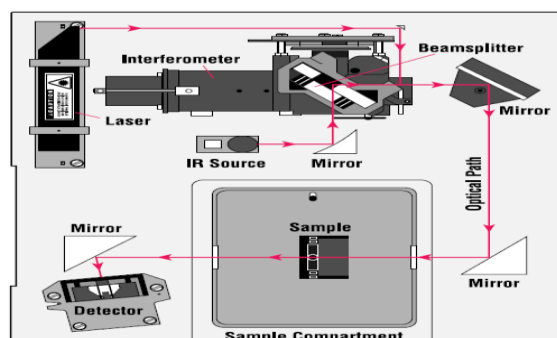
Το DRIFT είναι ιδανικό για τραχείς, ανώμαλες επιφάνειες που τείνουν να ανακλάσουν το φως προς όλες τις κατευθύνσεις (Skoog et al., 2002). Η πορεία της υπέρυθρης ακτινοβολίας στην τεχνική DRIFT φαίνεται στην εικόνα 6.8.

Κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής DRIFT είναι ότι αποτελεί μία ταχεία μέθοδο και επιπλέον, η οπτική διαδρομή είναι μεγάλη και με τις διαδοχικές ανακλάσεις της απορροφητικά ανακλώμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας, οι πληροφορίες προέρχονται από μεγάλο τμήμα του δείγματος. Μειονεκτήματα θεωρούνται ότι οι κορυφές είναι σχετικά πλατειές και, επειδή στο δείγμα προσπίπτει μέρος της υπέρυθρης ακτινοβολίας, η ένταση των κορυφών είναι σχετικά μικρή.

Γενικότερα, πλεονέκτημα των σύγχρονων τεχνικών ανάκλασης είναι ότι η οπτική διαδρομή είναι μεγάλη και με τις διαδοχικές ανακλάσεις της απορροφητικά ανακλώμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας, οι πληροφορίες προέρχονται από μεγάλο τμήμα του δείγματος. Επίσης, η διαδικασία λήψης του φάσματος είναι πολύ σύντομη (Παππάς, 2000).

A.6.2.3 Οργανολογία και λειτουργία φασματοφωτομέτρου FTIR

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FTIR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα: την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, την πηγή λέιζερ, το συμβολόμετρο Michelson και τον ανιχνευτή. Στην εικόνα 6.9 φαίνεται το σχηματικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου FTIR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series) (Κουβουτσάκης, 2013). Η εικόνα 6.12 αναπαριστά συγκεντρωτικά τη λήψη φάσματος με φασματοσκοπία FTIR.



Εικόνα 6.9. Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FTIR της εταιρείας Nicolet.

Πηγή ακτινοβολίας

Η λυχνία νικελίου – χρωμίου (Nicrome) είναι η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους. Είναι μικρής ισχύος και αερόψυκτη. Η θερμοκρασία που αναπτύσσει είναι 1200-1250 °C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή του μέσο – υπέρυθρου. Το μειονέκτημα της πηγής αυτής είναι ότι έχει μικρή σταθερότητα και σχετικά μικρή περίοδο ζωής (Κουβουτσάκης, 2013).

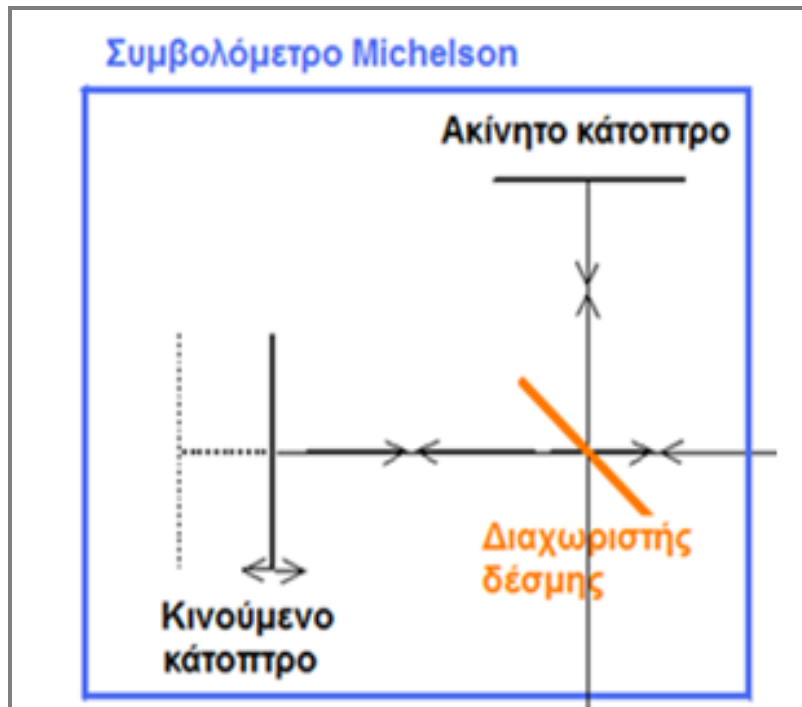
Πηγή λέιζερ

Η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ γίνεται με τη διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (HeNe) (Κουβουτσάκης, 2013).

Συμβολόμετρο Michelson ή ιντερφερόμετρο

Τα φασματοφωτόμετρα FTIR είναι χωρίς επιλογή μήκους κύματος, αλλά η λειτουργία τους στηρίζεται στο φαινόμενο της συμβολής με τη βοήθεια ενός «συμβολομέτρου Michelson», που ονομάζεται αλλιώς και «ιντερφερόμετρο». Η πρώτη ονομασία προήλθε προς τιμή του ανθρώπου που το κατασκεύασε (1891) και ασχολήθηκε με τη διαίρεση μιας φωτεινής δέσμης σε δύο (Κουβουτσάκης, 2013).

Το ιντερφερόμετρο παράγει ένα μοναδικό τύπο σήματος, που έχει όλες τις υπέρυθρες συχνότητες κωδικοποιημένες σε αυτό. Τα περισσότερα ιντερφερόμετρα αποτελούνται από ένα διαχωριστή δέσμης (beamsplitter), ο οποίος λαμβάνει την εισερχόμενη υπέρυθρη δέσμη και τη διαχωρίζει σε δύο οπτικές δέσμες (Παππάς, 2000). Αυτός ο διαχωριστής δέσμης είναι μία ημιδιαφανή πλάκα, κατασκευασμένη από βρωμιούχο κάλιο, που δεν απορροφά στο υπέρυθρο (Κουβουτσάκης, 2013). Η μία δέσμη (50% της ακτινοβολίας) αντανακλάται σε ένα επίπεδο καθρέπτη σταθερά τοποθετημένο (σταθερό κάτοπτρο), ενώ η άλλη (το υπόλοιπο 50% της ακτινοβολίας) αντανακλάται σε ένα διαρκώς κινούμενο επίπεδο καθρέπτη με μετακίνηση μερικών mm σταθερής ταχύτητας (κινούμενο κάτοπτρο). Στη συνέχεια, οι δύο δέσμες συνδυάζονται, συμβάλλουν και συναντώνται πάλι στο διαχωριστή δέσμης, οπότε το σήμα που εξέρχεται από το ιντερφερόμετρο είναι το αποτέλεσμα των δύο αυτών παλμών σε αλληλεπίδραση μεταξύ τους (μία συνελιγμένη δέσμη) (εικόνα 6.10). Το σήμα αυτό καλείται ιντερφερογράφημα ή συμβολόγραμμα (interferogram) (εικόνα 6.11) (Παππάς, 2000).



Εικόνα 6.10. Το συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από ένα διαχωριστή δέσμης και δύο κάτοπτρα (Ταραντίλης, 2004).



Εικόνα 6.11. Ιντερφερογράφημα.

Κάθε σημείο που αποτελεί το σήμα του ιντερφερογραφήματος έχει πληροφορίες για κάθε υπέρυθρη συχνότητα που προέρχεται από την πηγή. Το διπλάσιο της διαφοράς των αποστάσεων των δύο κατόπτρων, άρα των διαδρομών των δύο δεσμών, ονομάζεται καθυστέρηση και συμβολίζεται με το ελληνικό γράμμα δ . Όταν $\delta = k\lambda$ (όπου $k=0,1,2,\dots$ και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας) τότε το σήμα παίρνει τη μέγιστη τιμή, ενώ όταν $\delta = (2k+1)\lambda/2$ τότε το σήμα μηδενίζεται. Σε κάθε άλλη περίπτωση το σήμα λαμβάνει ενδιάμεση τιμή (Κουβουτσάκης, 2013).

Δείγμα

Η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας μέσω κατόπτρου εισέρχεται στο χώρο του υπό εξέταση δείγματος. Ένα μέρος της ακτινοβολίας (ορισμένες συχνότητες) απορροφάται, ενώ το υπόλοιπο μέρος εξέρχεται, εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο και κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή. Έτσι, δημιουργείται το μοριακό αποτύπωμα του δείγματος ή αλλιώς το φάσμα υπερύθρου, που για κάθε μοριακή δομή είναι μοναδικό (Παππάς, 2000).

Ανιχνευτής

Ο σκοπός του ανιχνευτή είναι να «αισθανθεί» την υπέρυθρη ακτινοβολία, που έχει διέλθει μέσα από το δείγμα. Ένας από τους πιο συνηθισμένους τύπους ανιχνευτή, τον οποίο διαθέτει και το φασματοφωτόμετρο FTIR της Nicolet (750 Magna series), είναι ο θερμικός, κατασκευασμένος από δευτεριωμένη θειϊκή τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS). Η λειτουργία του ανιχνευτή αυτού στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του, όταν δέχεται υπέρυθρη ακτινοβολία. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού. Οποιαδήποτε διακύμανση της ενέργειας της υπέρυθρης ακτινοβολίας, λόγω απορρόφησης από το δείγμα, εκφράζεται από τον ανιχνευτή σε μεταβολή τάσης και σαν τέτοια τη στέλνει, στη συνέχεια, στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Ανιχνευτές αυτού του είδους έχουν τα πλεονεκτήματα ότι ανταποκρίνονται σε μεγάλη περιοχή του υπερύθρου, παράγουν μικρό θόρυβο και δε χρειάζονται ψύξη. Τα μειονεκτήματά τους είναι η σχετικά μικρή ευαισθησία τους και ο σχετικά μεγάλος χρόνος απόκρισής τους (Παππάς, 2000).

Υπολογιστής

Το σήμα της μέτρησης (η μεταβολή της τάσης) μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό σήμα και στέλνεται στον υπολογιστή για να λάβει χώρα ο μετασχηματισμός Fourier (αποκωδικοποίηση σήματος) (Παππάς, 2000).

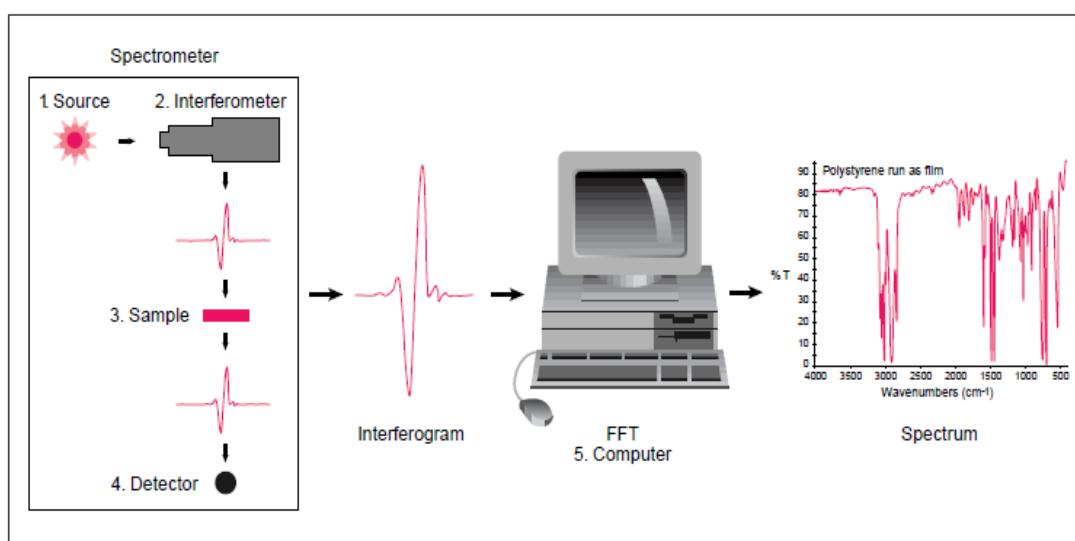
Τα φασματοφωτόμετρα FTIR μπορούν, χάρη στο συμβολόμετρο, να εξετάζουν ταυτόχρονα πολλά σημεία του φάσματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε 10-20 δευτερόλεπτα και επαναλαμβάνεται συνήθως 20-100 φορές. Το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο των επαναλήψεων «σαρώσεων» που έχουν εκτελεστεί. Με αυτόν τον τρόπο, όταν αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων ο «θόρυβος» μειώνεται και οι εντάσεις των απορροφήσεων βελτιώνονται σημαντικά. Η εξασφάλιση ότι το συμβολόγραμμα εξετάζει κάθε φορά τα ίδια σημεία του φάσματος γίνεται με τη βοήθεια μονοχρωματικής ακτινοβολίας λέιζερ. Η εξέταση πολλών ταυτόχρονα σημείων προσδίδει σε αυτού του τύπου τα φασματοφωτόμετρα πολύ μεγάλη ταχύτητα. Σε αντίθεση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα IR, κάθε σημείο εξετάζεται διαδοχικά και μια φορά.

Η καταγραφή φασμάτων με το μετασχηματισμό Fourier παρουσιάζει, εκτός της υψηλής ταχύτητας καταγραφής, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Επιπλέον, μπορούν να αφαιρεθούν ή να προστεθούν δύο φάσματα, να μεγεθυνθεί τμήμα του φάσματος, να διορθωθεί η βασική γραμμή κλπ. Αρνητικοί παράγοντες στην ποιότητα των FTIR φασμάτων είναι: α) η υγρασία του δείγματος και β) η υγρασία του χώρου τοποθέτησης του δείγματος. Η υγρασία του δείγματος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλή. Αυτό σε μεγάλο βαθμό μπορεί να λυθεί με την τεχνική της λυοφιλίωσης των δειγμάτων. Η υγρασία του χώρου του δείγματος μειώνεται με την τοποθέτηση μέσα σ' αυτόν αφυδραντικών (π.χ. silica gel) ή τη διαβίβαση ξηρού αέρα ή αζώτου.

Επειδή στο χώρο των οργάνων υπάρχει ατμοσφαιρικός αέρας, το φάσμα που καταγράφεται «λαμβάνει υπόψη» του και εκείνα τα αέρια συστατικά που απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί και διοξείδιο του άνθρακα). Για το λόγο αυτό πριν από τη λήψη του φάσματος του δείγματος καταγράφεται φάσμα αναφοράς. Το φάσμα αναφοράς λαμβάνεται με τον υποδοχέα του δείγματος χωρίς δείγμα, αλλά περιέχοντας κατά περίπτωση βρωμιούχο κάλιο ή το διαλύτη διάλυσης του δείγματος ή μόνο τον ατμοσφαιρικό αέρα. Το φάσμα αναφοράς στη συνέχεια αφαιρείται αυτόματα, με τη

βοήθεια του λογισμικού, από το συνολικό φάσμα. Ένα φάσμα αναφοράς χρησιμοποιείται για διάφορα δείγματα, επειδή αυτό το φάσμα είναι χαρακτηριστικό μονάχα για το όργανο.

Πριν από την καταγραφή φασμάτων πρέπει να γίνεται ευθυγράμμιση των οπτικών μερών του φασματοφωτομέτρου. Η διαδικασία αυτή γίνεται αυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού του οργάνου. Κύρια η ευθυγράμμιση αποσκοπεί στο να είναι οι γωνίες που σχηματίζει ο διαχωριστής δέσμης με το κινούμενο και το ακίνητο κάτοπτρο ίσες (Κουβουτσάκης, 2013).



Εικόνα 6.12. Συγκεντρωτική αναπαράσταση λήψης φάσματος με φασματοσκοπία FTIR.

A.6.2.4 Μετασχηματισμός Fourier

Το σήμα που στέλνει η πηγή υπερύθρου είναι συνάρτηση συχνοτήτων και συνεπώς κυματαριθμών. Όταν το σήμα εισέλθει στο συμβολόμετρο υπόκειται σε συμβολή. Ο τύπος, όμως, της συμβολής ουσιαστικά εξαρτάται από την καθυστέρηση του κινούμενου κατόπτρου και επομένως, το συμβολόγραμμα είναι συνάρτηση της καθυστέρησης και ως τέτοια φτάνει στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο μετασχηματισμός Fourier είναι ένα μαθηματικό «εργαλείο» με τη βοήθεια του οποίου το συμβολόγραμμα μετασχηματίζεται ξανά σε συνάρτηση κυματαριθμών με βάση τον τύπο:

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) e^{-i2\pi\bar{\nu}\delta} d\delta$$

Όπου $B(\bar{\nu})$: η συνάρτηση των κυματαριθμών, όπως αυτοί εκπέμπονται από την πηγή

$I(\delta)$: η συνάρτηση καθυστέρησης

Ο παραπάνω τύπος αποτελεί το γρήγορο μετασχηματισμό Fourier (Fast Fourier Transform - FFT), όπως αυτός διαμορφώθηκε από τους Cooley και Tukey και με τη βοήθεια του οποίου ο αριθμός των σημείων που εξετάζονται και υπόκεινται στο μετασχηματισμό είναι μειωμένος και επομένως, η όλη διαδικασία γίνεται ταχύτερη.

Ουσιαστικά, με το μετασχηματισμό Fourier προκύπτουν όλες οι συχνότητες της περιοχής του υπέρυθρου φάσματος που μελετάται. Δηλαδή, τα κενά των συχνοτήτων που απορροφήθηκαν από το δείγμα (μερικά ή ολικά) μετασχηματίζονται μαζί με τις συχνότητες που δεν απορροφήθηκαν, σε τυπικό IR φάσμα (Κουβουτσάκης, 2013).

A.6.2.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα FTIR

Πλεονεκτήματα (Smita et al., 2009)

- 1) Είναι μία μη καταστρεπτική τεχνική
- 2) Επιτρέπει τον προσδιορισμό κάθε διαφορετικού είδους ενώσεων του δείγματος (ποιοτική ανάλυση)
- 3) Αποτελεί άμεσο δείκτη της ποσότητας των ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα μέσω του μεγέθους των κορυφών στο φάσμα (ποσοτική ανάλυση)
- 4) Παρέχει εξαιρετικά ακριβείς και επαναλήψιμες μετρήσεις
- 5) Μετρούνται όλες οι υπέρυθρες συχνότητες ταυτόχρονα και η ταχύτητα των μετρήσεων είναι υψηλή, συνήθως της τάξης του 1 sec (Felgett Advantage)
- 6) Έχει αυξημένη ευαισθησία με χαμηλά επίπεδα θορύβου (μείωση τυχαίου θορύβου των μετρήσεων) (Jacquinot Advantage)
- 7) Χαρακτηρίζεται από μηχανική απλότητα, καθώς το μόνο διαρκώς κινούμενο τμήμα του ιντερφερόμετρου είναι ο κινούμενος καθρέπτης και ως αποτέλεσμα είναι σπάνια η μηχανική βλάβη

- 8) Παρέχει μετρήσεις που δεν απαιτούν εξωτερική βαθμονόμηση. Γίνεται εσωτερική βαθμονόμηση μέσω ενός laser HeNe χωρίς την ανάγκη βαθμονόμησης από το χρήστη (Connes Advantage)

Μειονεκτήματα (Παππάς, 2000)

- 1) Το φάσμα υπερύθρου μπορεί να παρουσιάζει έντονες απορροφήσεις που οφείλονται στο H₂O και το CO₂ του χώρου του φασματοφωτόμετρου.
- 2) Απαιτείται ακριβής ρύθμιση των οπτικών του οργάνου, κυρίως του συμβολομέτρου Michelson. Σε αντίθεση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα, που δίνουν κακής ποιότητας αλλά χρησιμοποιήσιμα φάσματα όταν δεν είναι καλά ρυθμισμένα, τα φωτόμετρα FTIR δεν παρέχουν καμία πληροφορία όταν δεν έχουν καλή ρύθμιση.

A.6.2.6 Χαρακτηριστικές παράμετροι της φασματοσκοπίας FTIR

Διαχωριστική ικανότητα

Η διαχωριστική ικανότητα επιλέγεται πριν από την καταγραφή του φάσματος. Ως διαχωριστική ικανότητα ορίζεται η ικανότητα του οργάνου να ξεχωρίζει κορυφές απορρόφησης που αντιστοιχούν σε πολύ κοντινούς κυματαριθμούς. Για να ξεχωρίσουν δύο κορυφές απαιτούνται τρία σημεία (data points). Ένα για κάθε κορυφή και ένα για το μεταξύ τους διάστημα. Τα σημεία αυτά απέχουν μεταξύ τους το 1/2 της διαχωριστικής ικανότητας που έχει επιλεγεί. Η χρήσιμη διαχωριστική ικανότητα ξεκινά από 10cm⁻¹ και φθάνει σε ορισμένα όργανα τα 0,06 cm⁻¹. Για τα στερεά και τα υγρά, συνήθως, χρησιμοποιείται η τιμή 8-4 cm⁻¹, ενώ για τα αέρια 2-0,5 cm⁻¹.

Πλεονέκτημα της μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας είναι η λήψη οξύτερων κορυφών με αποτέλεσμα την καλύτερη ανάλυσή τους. Μειονεκτήματα μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας είναι ο μεγαλύτερος θόρυβος και χρόνος λήψης του φάσματος.

Η διαχωριστική ικανότητα εξαρτάται από τη χρονική καθυστέρηση, δηλαδή από το πόσο μεγάλες είναι οι αποστάσεις που διανύει το κινητό κάτοπτρο από τη θέση ZPD (Zero Path Difference). Όσο αυξάνει η χρονική καθυστέρηση τόσο περισσότερο διακριτές είναι οι συχνότητες στο συμβολόγραμμα (Παππάς, 2000).

Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio, RSN)

Η ποιότητα ενός φάσματος καθώς και η αξιολόγησή του εξαρτάται από το «θόρυβο» που παρουσιάζει. Θόρυβος είναι όλα εκείνα τα σήματα τα οποία καταγράφονται και δεν ανταποκρίνονται σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος, αλλά σε άλλους λόγους. Για να αξιολογηθούν τα σήματα χρησιμοποιείται ο λόγος σήματος προς θόρυβο.

Η αξιολόγηση του RSN επιτυγχάνεται με τον υπολογισμό της τετραγωνικής ρίζας του μέσου όρου του αθροίσματος των τετραγώνων (Root Mean Square - RMS) των RSN όλων των σημείων μιας περιοχής για την οποία υπάρχει απόλυτη βεβαιότητα ότι δεν υπάρχει κορυφή που να αποδίδεται στο δείγμα. Μια τέτοια περιοχή είναι αυτή μεταξύ 2050 και 1950 cm^{-1} . Το RMS υπολογίζεται με τη χρήση αλγορίθμων. Ένας από τους αλγόριθμους που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι και αυτός των Savitsky-Golay. Η αξιολόγηση, όμως, δεν είναι εύκολη υπόθεση και γίνεται πάντα σε συνδυασμό με την απόδοση της κορυφής αυτής σε κάποια δόνηση. Ο RSN είναι αντιστρόφως ανάλογος της τετραγωνικής ρίζας του αριθμού των επαναλήψεων. Επομένως, αυξανόμενου του αριθμού των επαναλήψεων ο θόρυβος μειώνεται (Κουβουτσάκης, 2013).

Οι κυριότερες αιτίες που δημιουργούν θόρυβο οφείλονται (Παππάς, 2000):

A) στην κατάσταση του δείγματος, το οποίο όταν είναι σε στερεά κατάσταση ή δεν έχει διαλυθεί πλήρως στο διαλύτη διαχέει μέρος της προσπίπτουσας σε αυτό ακτινοβολίας

B) στην πηγή

Γ) στο συμβολόμετρο

Δ) στον ανιχνευτή

E) στην ψηφιοποίηση του αναλογικού σήματος (αποδισμός)

ΣΤ) στην υψηλή διαχωριστική ικανότητα

Z) σε διάφορους θορύβους ηλεκτρονικής ή τυχαίας φύσης

Ο RMS βοηθά στην αξιολόγηση μιας κορυφής, μικρής έντασης, αν είναι πραγματική κορυφή, δηλαδή κορυφή που οφείλεται στο δείγμα ή πρόκειται για θόρυβο. Υπολογίζεται από το λογισμικό που συνοδεύει όλα τα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier.

Υψηλή διαχωριστική ικανότητα οδηγεί σε αύξηση του θορύβου, ενώ όταν αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων ο θόρυβος μειώνεται. Όμως, ο αυξημένος αριθμός επαναλήψεων οδηγεί σε αύξηση του χρόνου καταγραφής του φάσματος. Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα παραμένει εκτιθέμενο στην υπέρυθη ακτινοβολία για περισσότερο χρόνο με κίνδυνο, ανάλογα με τη σύστασή του, να υποστεί αλλοιώσεις (Παππάς, 2000).

Αποδισμός

Το κινούμενο κάτοπτρο του συμβολομέτρου έχει μια μέγιστη καθυστέρηση (Δ) και όχι άπειρη. Έτσι, η καθυστέρηση δ κυμαίνεται μεταξύ $-\Delta$ και $+\Delta$ και επομένως, το συμβολόγραμμα, το οποίο είναι μια ατέλειωτη σειρά, πρέπει να περιοριστεί σε όσες πληροφορίες βρίσκονται μεταξύ $-\Delta$ και Δ . Αυτό επιτυγχάνεται θεωρώντας κάθε πληροφορία που υπάρχει στα όρια αυτά πολλαπλασιασμένη επί 1 και κάθε άλλη επί 0. Με τη μαθηματική αυτή τεχνική, γνωστή σα «boxcar truncation», γίνεται η φηφιοποίηση του αναλογικού σήματος η οποία, όμως, οδηγεί στο σχηματισμό λοβών γύρω από τις κορυφές ενός φάσματος. Η μείωση του φαινομένου αυτού λέγεται «αποδισμός» από την ελληνική λέξη α-ποδός (=χωρίς πόδια), επειδή οι λοβοί ονομάζονται και «πόδια». Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται είναι ενσωματωμένος, κατά κανόνα, στο λογισμικό που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο FTIR (Κουβουτσάκης, 2013).

Για τη διαδικασία του αποδισμού, το φασματοφωτόμετρο της Nicolet (750 magna series) χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Happ-Genzel η εξίσωση του οποίου είναι (Κουβουτσάκης, 2013):

$$A(\delta) = 0,54 + 0,46\cos \pi \frac{\delta}{\Delta}$$

όπου δ : η καθυστέρηση και

Δ : η μέγιστη καθυστέρηση

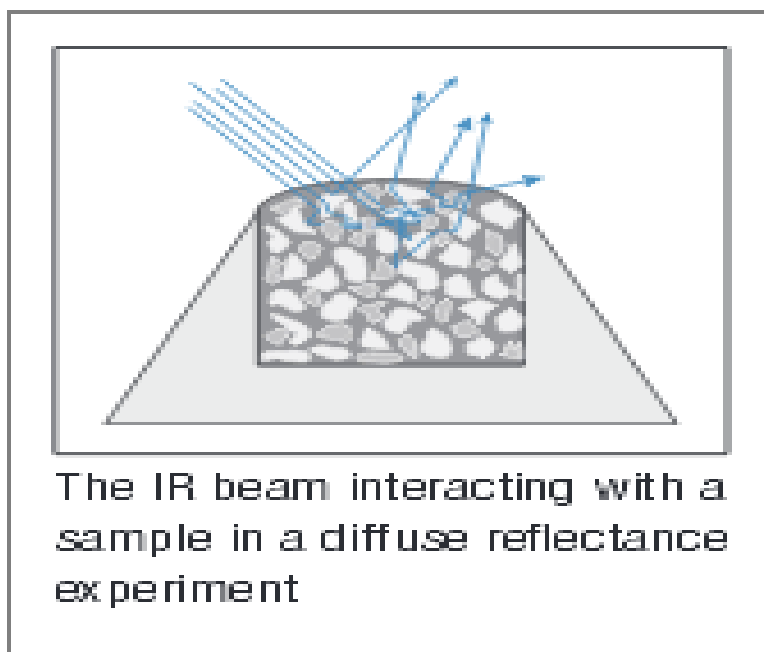
Η ταχύτητα κίνησης του κινητού κατόπτρου

Όσο μειώνεται η ταχύτητα του κινητού κατόπτρου, αυξάνεται η ένταση του φάσματος (Παππάς, 2000).

A.6.3 Φασματοσκοπία FTIR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transform Infra Red Spectroscopy-DRIFTS)

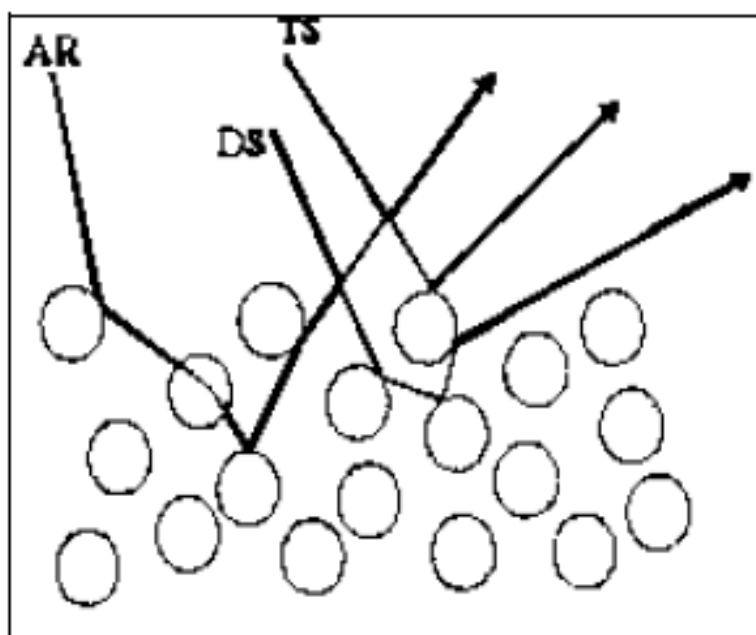
A.6.3.1 Αρχή λειτουργίας DRIFTS

Όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπέσει στην επιφάνεια του υλικού ένα τμήμα της ανακλάται (ή διαχέεται), ένα τμήμα διαθλάται και ένα τμήμα περιθλάται. Ουσιαστικά η ανάκλαση είναι το φαινόμενο στο οποίο στηρίζεται η τεχνική DRIFTS (εικόνα 6.13).



Εικόνα 6.13. Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας IR με ένα δείγμα με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS).

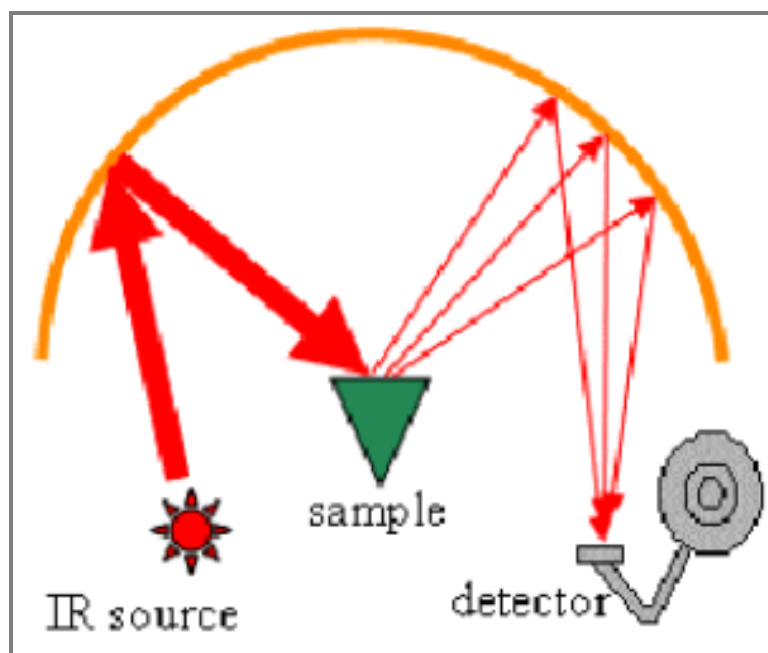
Όμως, η υπέρυθρη ακτινοβολία υπόκειται σε τριών ειδών ανακλάσεις (εικόνα 6.14). Την απορροφητική, τη διαχυτική και την αληθινή ανάκλαση. Από τα τρία είδη ανάκλασης μόνο η απορροφητική περιέχει πληροφορίες για το δείγμα (Κουβουτσάκης, 2013).



Εικόνα 6.14. Τα τρία είδη ανάκλασης υπέρυθρης ακτινοβολίας σε στερεό δείγμα με μορφή σκόνης (AR: απορροφητικά ανακλώμενη, DS: διαχυτικά ανακλώμενη, TS: αληθινά ανακλώμενη)
(Κουβουτσάκης, 2013)

Μια συσκευή DRIFTS λειτουργεί κατευθύνοντας δέσμη ακτινοβολίας IR μέσα σε έναν υποδοχέα γεμάτο με ένα μίγμα του δείγματος και μίας μήτρας, η οποία δεν απορροφά ακτινοβολία IR (π.χ. KBr ή KCl σε αναλογία συνήθως 1:100). Όταν εξετάζονται μίγματα ως δείγματα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ομογενοποίησή τους. Η IR ακτινοβολία αλληλεπιδρά με τα σωματίδια και στη συνέχεια ανακλάται από τις επιφάνειές τους, προκαλώντας διάχυση ή διασκόρπισμα του φωτός, καθώς κινείται μέσα σε όλο το δείγμα (Thermoscientific, 2013). Καθώς συμβαίνει αυτό, δηλαδή καθώς η υπέρυθρη ακτινοβολία αναπηδά από σωματίδιο σε σωματίδιο, αποθηκεύει την απορρόφηση του δείγματος που έπειτα οδηγείται σε κάτοπτρο CPC (καθρέπτης στην έξοδο). Αυτός συλλέγει τις πολλαπλές σκεδαζόμενες ακτίνες και τις οδηγεί στον ανιχνευτή του φασματοφωτομέτρου (εικόνα 6.15). Ο ανιχνευτής καταγράφει την υπέρυθρη ακτινοβολία ως σήμα ιντερφερογραφήματος, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσει ένα φάσμα. Φάσμα υποβάθρου (background) συλλέγεται με τον υποδοχέα γεμάτο με KBr (Thermoscientific, 2013).

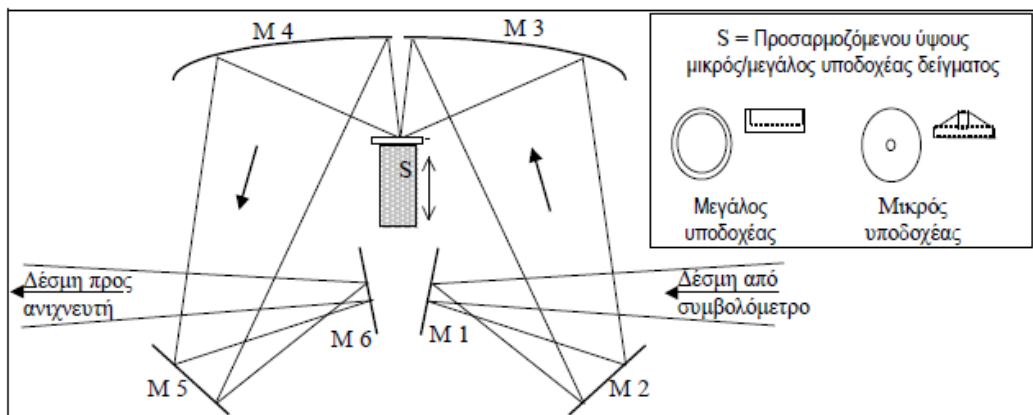
Επομένως, η διάχυτη ανάκλαση προέρχεται από ανάκλαση της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε όλες τις κατευθύνσεις σε τραχιές επιφάνειες και συλλέγεται με τη χρήση ενός ελλειψοειδούς ή παραβολοειδούς κατόπτρου. Τα φάσματα απεικονίζονται σε μονάδες \log αντίστροφης ανάκλασης ($\log 1/R$) έναντι κυματαριθμού ή ως συνάρτηση απορρόφησης-κυματαριθμού.



Εικόνα 6.15. Σχηματική αναπαράσταση αρχής λειτουργίας της τεχνικής DRIFTS.

A.6.3.2 Οργανολογία DRIFTS

Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης είναι μία από τις τεχνικές λήψης FTIR φασμάτων από δείγματα σε στερεά κατάσταση, συνήθως σε μορφή σκόνης χωρίς την προσθήκη άλλου υλικού (π.χ. βρωμιούχο κάλιο). Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος. Το εξάρτημα αυτό διαθέτει 6 κάτοπτρα. Τα κάτοπτρα M_1 , M_2 και M_3 εστιάζουν τη δέσμη της ακτινοβολίας που έρχεται από το συμβολόμετρο επάνω στο δείγμα, ενώ τα M_4 , M_5 και M_6 εστιάζουν την ανακλώμενη ακτινοβολία από το δείγμα προς τον ανιχνευτή (εικόνα 6.16). Ο χώρος όπου τοποθετείται το δείγμα (υποδοχέας) είναι ένα κύπελλο που μπορεί να είναι δύο μεγεθών (εικόνα 6.17). Ο μεγαλύτερος υποδοχέας έχει διάμετρο 13 mm και ύψος 2 mm, ενώ ο μικρός 3 mm και 2 mm αντίστοιχα (Κουβουτσάκης, 2013).



Εικόνα 6.16. Εξάρτημα φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης.



Εικόνα 6.17. Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος και καψίδια για τη λήψη φασμάτων με τεχνική DRIFTS.

Για τα υγρά δείγματα (π.χ. έλαια) χρησιμοποιείται η τεχνική των δισκίων ZnSe. Ο ZnSe είναι ένα σχετικά χαμηλού κόστους κρυσταλλικό υλικό και είναι ιδανικό για την ανάλυση υγρών και μη-λειαντικών πολτών και πηκτωμάτων, με μια περιοχή pH εργασίας = 5-9 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005). Προτιμάται για όλες τις εφαρμογές ρουτίνας, η χρήση του με ισχυρά οξέα και αλκάλια είναι περιορισμένη, η επιφάνειά του χαράσσεται κατά τη διάρκεια παρατεταμένης έκθεσης σε ακραίες τιμές pH, παράγοντες συμπλοκοποίησης (αμμωνία και EDTA), επίσης, διαβρώνουν την επιφάνειά του λόγω σχηματισμού συμπλόκων με τον ψευδάργυρο. Ο ZnSe χαράσσεται

αρκετά εύκολα και χρειάζεται προσοχή κατά τον καθαρισμό του κρυστάλλου (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2005).

A.6.3.3 Χαρακτηριστικές παράμετροι της τεχνικής DRIFTS

Το μέρος της ακτινοβολίας που θα απορροφηθεί και στη συνέχεια, θα ανακλαστεί, δηλαδή η απορροφητική ανάκλαση, εξαρτάται από (Κουβουτσάκης, 2013):

A) το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος

B) τη μετωπική επιφάνεια και την πυκνότητα πακεταρίσματος του δείγματος στον υποδοχέα

Γ) το δείκτη διάθλασης του δείγματος

Δ) τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας επάνω στο δείγμα

Το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος είναι καθοριστικός παράγοντας για την ποιότητα του φάσματος που θα ληφθεί. Όταν το μέγεθος των σωματιδίων είναι μεγάλο επικρατεί το φαινόμενο σκέδασης της ακτινοβολίας με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά ο θόρυβος και να μειώνεται το ποσό της ακτινοβολίας που διεισδύει μέσα στο δείγμα και ως εκ τούτου, να μειώνεται και η ένταση των απορροφήσεων. Όσο μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων που απαρτίζουν τη σκόνη, αυξάνει η ένταση των κορυφών και μειώνεται αισθητά ο θόρυβος. Ιδανικό είναι το μέγεθος το οποίο είναι μικρότερο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται. Όμως, αυτό εξαρτάται από τη φύση του δείγματος και δεν μπορεί αρκετές φορές να επιτευχθεί. Προτιμάται μέγεθος σωματιδίων μικρότερο από 10mm (που δεν υπερβαίνει, δηλαδή, το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Ορισμένες φορές, με σκοπό την άλεση του δείγματος, χρησιμοποιείται ως λειαντικό μέσο δίσκος χαρτιού επικαλυμμένος με SiC.

Η ομαλότητα της μετωπικής επιφάνειας του δείγματος στον υποδοχέα, μειώνει αισθητά το θόρυβο. Η ομαλότητα εξαρτάται από τη φύση του δείγματος, το μέγεθος

των σωματιδίων και τον τρόπο τοποθέτησης του δείγματος. Τα στιλπνά υλικά δημιουργούν προβλήματα διότι σημαντικό μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ανακλάται.

Η πυκνότητα του πακεταρίσματος του δείγματος ουσιαστικά εξαρτάται από την πίεση που ασκείται σε αυτό κατά την τοποθέτησή του στον υποδοχέα. Ουσιαστικές μεταβολές υπάρχουν όταν ασκούνται υπερβολικά μεγάλες πιέσεις, γιατί τότε αλλάζει ο δείκτης διάθλασης του δείγματος. Το στρώμα του μίγματος (δείγμα+KBr), όπως, επίσης, και του KBr, όταν λαμβάνεται φάσμα υποβάθρου, πρέπει να είναι τουλάχιστον 1,5 mm.

Ο υποδοχέας του δείγματος ρυθμίζεται κατά μήκος και κατά ύψος. Με τον τρόπο αυτό μεταβάλλεται η γωνία πρόσπτωσης και βελτιστοποιείται η εστίαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα. Αυτό επιβεβαιώνεται από τη μεγιστοποίηση του σήματος IR στην οθόνη του υπολογιστή (Κουβουτσάκης, 2013).

A.6.3.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα DRIFTS

Πλεονεκτήματα (Smita et al., 2009)

- 1) Απλός και αποτελεσματικός τρόπος λήψης φασμάτων κονιοποιημένων δειγμάτων, με ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία του δείγματος
- 2) Συλλογή φασμάτων δεδομένων από δείγματα τα οποία δεν έχουν υποστεί σημαντική αλλοίωση σε σχέση με την αρχική τους κατάσταση
- 3) Γρήγορη μέτρηση κονιορτοποιημένων δειγμάτων
- 4) Γρήγορο και εύκολο καθαρισμό
- 5) Υψηλή ευαισθησία και υψηλής ποιότητας αποτελέσματα
- 6) Υψηλή ακρίβεια κυματαριθμού ($0,01 \text{ cm}^{-1}$), παρά τη μεγάλη ταχύτητα λήψης του δείγματος
- 7) Ευελιξία στη ρύθμιση του εύρους των κυματαριθμών
- 8) Λήψη φασμάτων υψηλής διακριτικής ικανότητας
- 9) Μειωμένη επίδραση της παράσιτης ακτινοβολίας
- 10) Εξαιρετικά ποσοτικά και ποιοτικά δεδομένα μπορούν να συλλέγονται με την κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος. Ωστόσο, για ποσοτικά δεδομένα η

τεχνική ATR είναι προτιμότερη σε σχέση με τη DRIFT λόγω του μήκους διαδρομής

Μειονεκτήματα (Skoog et al., 2002)

- 1) Χαμηλή επαναληψιμότητα των φασματικών δεδομένων
- 2) Περίπλοκη φυσική περιγραφή της επίδρασης του σχήματος των σωματιδίων, του πόσο συμπαγή είναι τα δείγματα, του δείκτη διαθλάσεως των σωματιδίων, της ανακλαστικότητας και απορρόφησης των σωματιδίων
- 3) Οι ποσοτικές αναλύσεις είναι περίπλοκες, επειδή δεν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ της ζώνης έντασης και της συγκέντρωσης

A.6.3.5 Επεξεργασία των φασμάτων IR

Οι συνήθεις επεξεργασίες που γίνονται στα FTIR φάσματα είναι η εξομάλυνση του σήματος, η διόρθωση της βασικής γραμμής, η αποσυνέλιξη και η κανονικοποίηση του σήματος. Οι επεξεργασίες αυτές αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς (Παππάς, 2000).

Αφαίρεση της κορυφής απορρόφησης του CO₂

Για λόγους εμφάνισης συνήθως αφαιρείται η κορυφή ($2385-2285\text{ cm}^{-1}$), η οποία οφείλεται στο CO₂ (Παππάς, 2000).

Αυτόματη εξομάλυνση του φάσματος (smoothing)

Κατά την καταγραφή ενός φάσματος εμφανίζεται θόρυβος. Ως θόρυβος εννοούνται όλα εκείνα τα σήματα τα οποία καταγράφονται και δεν ανταποκρίνονται σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος, αλλά σε άλλους λόγους. Με την εξομάλυνση δεν απομακρύνεται ο θόρυβος, αλλά μειώνεται αισθητά χωρίς να παραποιείται η εικόνα του φάσματος, με βάση μια μαθηματική επεξεργασία με αποτέλεσμα να βελτιώνεται ο λόγος RSN. Για τη βελτίωση του RSN χρησιμοποιείται η διαδικασία του RMS, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο Savitsky-Golay. Ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιεί ένα πολυωνυμικό μοντέλο, τις πληροφορίες για το RSN επιλεγμένων σημείων και με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων προσαρμόζει την

καμπύλη του φάσματος. Η λειτουργία «αυτόματη εξομάλυνση» του λογισμικού Omnic 7.3 των φασματομέτρων της εταιρείας Nicolet, χρησιμοποιεί τον παραπάνω αλγόριθμο με πολυωνυμικό μοντέλο δεύτερου βαθμού και πέντε επιλεγμένα σημεία (Παππάς, 2000).

Διόρθωση βασικής γραμμής

Η βασική γραμμή των φασμάτων FTIR, συνήθως, αποτελείται και από σημεία των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν αλλά και τα οποία δεν έχουν αξιόλογη απορρόφηση, γι' αυτό συνήθως γίνεται διόρθωσή της. Η διόρθωση της βασικής γραμμής δε γίνεται μόνο για λόγους εμφάνισης των φασμάτων, αλλά είναι αναγκαία όταν πρόκειται να συγκριθούν δύο φάσματα ή να χρησιμοποιηθούν για ποσοτική ανάλυση.

Η διόρθωση της βασικής γραμμής γίνεται είτε με αυτόματη διαδικασία από το λογισμικό είτε με καθοδηγούμενη. Στη δεύτερη περίπτωση οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η γραμμική, της κυβικής σφήνας και η πολυωνυμική.

Στη γραμμική τεχνική επιλέγονται τα σημεία τα οποία θεωρούνται ότι έχουν απορρόφηση μηδέν και όλο το φάσμα προσαρμόζεται κατάλληλα, ενώ στην τεχνική της κυβικής σφήνας διαδοχικές ομάδες τεσσάρων σημείων υπόκεινται σε προσαρμογή τρίτοβάθμιου πολυωνύμου. Τέλος, με την πολυωνυμική τεχνική, γίνεται προσαρμογή της γραμμής βάσης σε πολυώνυμο ο βαθμός του οποίου αυξάνει (με μέγιστο βαθμό έξι) ανάλογα με τα σημεία που επιλέγονται (Παππάς, 2000).

Κανονικοποίηση

Η κανονικοποίηση της κλίμακας αλλάζει την κλίμακα του άξονα Y ενός φάσματος σε μία κλίμακα στην οποία οι τιμές των δεδομένων του άξονα Y κυμαίνονται σε μονάδες απορρόφησης από μηδέν για το χαμηλότερο σημείο προς ένα για την υψηλότερη κορυφή ή από 10% έως 100% για τη διαπερατότητα. Αυτές οι κανονικές κλίμακες είναι οι τυπικές κλίμακες των φασμάτων σε εμπορικές φασματικές βιβλιοθήκες.

Η κανονικοποίηση αυτή έχει τα εξής πλεονεκτήματα (Παππάς, 2000):

A) Μπορούν να συγκριθούν φάσματα μεταξύ τους ή ένα φάσμα με φάσματα βιβλιοθηκών, διότι τα φάσματα των βιβλιοθηκών έχουν κανονικοποιηθεί.

Πολλαπλασιάζοντας με ένα συντελεστή τα φάσματα γίνονται συγκρίσιμα και αντιπαραβάλλονται τα ύψη των κορυφών τους.

B) Επειδή το μήκος της οπτικής διαδρομής στην τεχνική DRIFT δεν παραμένει πρακτικά σταθερό, η κανονικοποίηση αίρει το πρόβλημα.

Το μειονέκτημά της είναι ότι όταν χρησιμοποιούνται κανονικοποιημένα φάσματα στην ανάπτυξη ποσοτικών μεθόδων, όπως τη συσχέτιση του ύψους ή του εμβαδού μιας κορυφής με τη συγκέντρωση ενός συστατικού, οδηγούμαστε πολλές φορές σε σφάλματα (Παππάς, 2000).

A.6.4 Raman

A.6.4.1 Αρχή λειτουργίας Raman

Η φασματοσκοπία Raman βασίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης της δέσμης του φωτός καθώς αυτό αλληλεπιδρά με την ύλη διεγείροντας τις δονήσεις χαρακτηριστικών ομάδων. Τα φάσματα Raman λαμβάνονται με ακτινοβολία του δείγματος με μια ισχυρή πηγή λέιζερ ορατής ή εγγύς υπερύθρου μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας το φάσμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας λαμβάνεται υπό κάποια γωνία (συνήθως 90°) με ένα κατάλληλο φασματοφωτόμετρο. Οι εντάσεις των γραμμών Raman αντιστοιχούν περίπου στο 0,001% της έντασης της πηγής. Κατά συνέπεια η ανίχνευση και η μέτρησή τους είναι κάπως πιο δύσκολες σε σχέση με τα φάσματα υπερύθρου.

Οι διαφορές μεταξύ ενός φάσματος Raman και ενός φάσματος υπερύθρου δε μας εκπλήττουν εάν λάβουμε υπ' όψιν ότι, παρόλο που εξαρτώνται από τους ίδιους τρόπους δόνησης, προέρχονται από διαδικασίες με διαφορετικό μηχανισμό. Η **απορρόφηση υπερύθρου** απαιτεί οι τρόποι δόνησης ενός μορίου να προκαλούν μεταβολή στη διπολική ροπή ή στην κατανομή φορτίου. Μόνο τότε μπορεί η ακτινοβολία της ίδιας συχνότητας να αλληλεπιδράσει με το μόριο και να το προωθήσει σε μια διεγερμένη δονητική κατάσταση. Αντίθετα, η **σκέδαση** περιλαμβάνει μια στιγμιαία παραμόρφωση της κατανομής ηλεκτρονίων γύρω από ένα δεσμό του μορίου, που ακολουθείται από

επανεκπομπή της ακτινοβολίας καθώς ο δεσμός επιστρέφει στην κανονική του κατάσταση. Εξαιτίας αυτής της θεμελιώδους διαφοράς στο μηχανισμό, η ενεργότητα Raman ενός δεδομένου τρόπου δόνησης μπορεί να διαφέρει σημαντικά από την ενεργότητα στο υπέρυθρο. Δονήσεις που έχουν μια συμμετρική αλλαγή πόλωσης δεν εμφανίζονται στο Raman. Δηλαδή, δονήσεις κάμψης δεν είναι ισχυρές στο Raman και συμμετρικά τμήματα τείνουν να είναι ισχυρά στο Raman. Για τα μόρια με ένα κέντρο συμμετρίας, οι δονήσεις που επιτρέπονται στο Raman απαγορεύονται στο υπέρυθρο και το αντίστροφο. Επιπλέον, η φασματοσκοπία Raman δίνει πληροφορίες για το σκελετό του μορίου (δομικές πληροφορίες), ενώ η φασματοσκοπία IR για τις χαρακτηριστικές ομάδες.

Η ένταση ή η ισχύς μιας κανονικής κορυφής Raman εξαρτάται κατά πολύπλοκο τρόπο από την πολωσιμότητα του μορίου, την ένταση της πηγής, τη συγκέντρωση της δραστικής ομάδας, καθώς και από άλλους παράγοντες. Εκτός από πληροφορίες για την ένταση και τη συχνότητα, οι μετρήσεις Raman παρέχουν μια επιπλέον μεταβλητή, η οποία είναι μερικές φορές χρήσιμη για το χαρακτηρισμό της δομής μορίων και ονομάζεται «λόγος αποπόλωσης». Ο λόγος αποπόλωσης εξαρτάται από τη συμμετρία των δονήσεων που ευθύνονται για τη σκέδαση. Η θεωρία της σκέδασης αποδεικνύει ότι η μέγιστη τιμή του λόγου αποπόλωσης στις μη συμμετρικές δονήσεις είναι έξι προς επτά, ενώ στις συμμετρικές δονήσεις είναι πάντοτε μικρότερος από τον αριθμό αυτό. Δηλαδή ο λόγος αποπόλωσης είναι χρήσιμος για τη συσχέτιση των γραμμών Raman με τον τύπο δόνησης (Skoog et al., 2002).

A.6.4.2 Οργανολογία Raman

Τα σύγχρονα φασματόμετρα Raman αποτελούνται από τρία τμήματα: μία πηγή λέιζερ, ένα σύστημα για την ακτινοβόληση του δείγματος και ένα κατάλληλο φασματόμετρο (Skoog et al., 2002).

Πηγές λέιζερ

Οι πηγές που χρησιμοποιούνται είναι σχεδόν πάντοτε λέιζερ επειδή απαιτείται μεγάλη ένταση ακτινοβολίας για να παρατηρηθεί σκέδαση Raman με ένταση αρκετή, ώστε να μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητικό λόγο σήματος-προς-θόρυβο. Στον παρακάτω πίνακα περιλαμβάνονται πέντε από τα συνηθέστερα λέιζερ, που

χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία Raman. Επειδή η ένταση της σκέδασης Raman είναι ανάλογη με την τέταρτη δύναμη της συχνότητας, οι πηγές ιόντων αργού και κρυπτού, οι οποίες εκπέμπουν στην κυανή και πράσινη περιοχή του φάσματος, υπερτερούν σε σχέση με τις άλλες πηγές που παρατίθενται στον πίνακα 6.3 (Skoog et al., 2002).

Πίνακας 6.3. Μερικές συνηθισμένες πηγές λέιζερ για φασματοσκοπία Raman.

Τύπος πηγής λέιζερ	Μήκος κύματος, nm
Ιόντων αργού	488,0 ή 514,5
Ιόντων κρυπτού	530,9 ή 647,1
He/Ne	632,8
Λείζερ διόδου	782 ή 830
Nd/YAG	1064

Σύστημα ακτινοβολίας του δείγματος

Ο χειρισμός του δείγματος για φασματοσκοπικές μετρήσεις Raman είναι απλούστερος απ' ό,τι στη φασματοσκοπία υπερύθρου. Επιπλέον, η πηγή λέιζερ μπορεί εύκολα να εστιασθεί σε μια μικρή περιοχή του δείγματος και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία μπορεί να εστιασθεί αποτελεσματικά σε μια σχισμή. Κατά συνέπεια, οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε πολύ μικρά δείγματα. Στην πραγματικότητα, ένας συνηθισμένος υποδοχέας δείγματος για υγρά δείγματα, που δεν απορροφούν, είναι ένας κοινός υάλινος τριχοειδής σωληνίσκος μέτρησης σημείου τήξης (Skoog et al., 2002).

A.6.4.3 Εφαρμογές Raman

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές υπέρυθρης ακτινοβολίας και Raman μπορούν να συνδυαστούν για να παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για την καλύτερη ανίχνευση του αναλύτη-στόχου. Τα φάσματα Raman παρουσιάζουν λιγότερες κορυφές σε σχέση με τα φάσματα υπερύθρου. Συνεπώς, η αλληλεπικάλυψη κορυφών στα μίγματα είναι λιγότερο πιθανή και οι ποσοτικές μετρήσεις είναι απλούστερες. Επιπλέον, οι μονάδες τοποθέτησης δείγματος για μετρήσεις Raman δεν προσβάλλονται από την υγρασία και μικρές ποσότητες ύδατος στο δείγμα δεν παρεμποδίζουν. Επίσης, επειδή οι δέσμες των λέιζερ μπορούν να εστιασθούν με ακρίβεια, είναι δυνατό να γίνουν

ποσοτικές μετρήσεις σε πολύ μικρά δείγματα. Η φασματοσκοπία Raman έχει εφαρμοστεί σε ελάχιστες προηγούμενες μελέτες και έδειξε κάποια ελπιδοφόρα αποτελέσματα ως αναλυτική μέθοδος για την ανίχνευση αφλατοξινών, αλλά δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η ανάλυση αφλατοξινών στα μολυσμένα σιτηρά και τους ελαιούχους σπόρους, που αποτελούν πολύπλοκα και ετερογενή δείγματα (Kyung-Min, Davis, Herman, Murray, Deng, 2015).

A.6.5 Χημειομετρία

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα στον τομέα της αναλυτικής χημείας έχει αλλάξει ουσιαστικά με την εισαγωγή χημειομετρικών μεθόδων ανάλυσης. Η αλλαγή αυτή οφείλεται στη δυνατότητα ψηφιακής καταγραφής και επεξεργασίας ευρύτατων συνόλων δεδομένων από κάθε παρατηρούμενο αντικείμενο και για μεγάλο αριθμό αντικειμένων. Η χημειομετρία είναι η μαθηματική μεθοδολογία (εφαρμογή στατιστικής και γραμμικής άλγεβρας) που επιτρέπει τον εντοπισμό εκείνου του υποσυνόλου των δεδομένων, που σχετίζεται με την ιδιότητα του αντικειμένου που μας ενδιαφέρει και συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του αντικειμένου ή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ιδιότητας αυτής (Κουβουτσάκης, 2013).

Οι θέσεις των ζωνών ενός φάσματος δίνουν πληροφορίες για τη μοριακή δομή των χημικών ενώσεων σε ένα μίγμα, ενώ οι εντάσεις των ζωνών αυτών συνδέονται με την συγκέντρωση των ενώσεων αυτών, όπως περιγράφεται από το νόμο των Beer-Lambert. Ο ευκολότερος τρόπος για να προσδιοριστεί το περιεχόμενο μιας χημικής ένωσης είναι η μέτρηση της αλλαγής στην ένταση μιας ζώνης που έχει αποδοθεί σαφώς σε αυτή την ένωση. Αυτό είναι εφικτό για ένα σύστημα καθαρών συνιστωσών, αλλά τα τρόφιμα περιέχουν πολυάριθμα συστατικά που δημιουργούν περίπλοκα φάσματα με επικαλυπτόμενες ζώνες. Η πιο επιτυχημένη προσέγγιση για την εξαγωγή ποιοτικών, ποσοτικών ή δομικών πληροφοριών από τέτοιου είδους φάσματα είναι η χρήση της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης (Karoui et al., 2010).

A.6.5.1 Διαχωριστική ανάλυση (Discriminant Analysis)

Η διαχωριστική ανάλυση (Discriminant Analysis) ανήκει στις τεχνικές της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης και είναι ένα στατιστικό εργαλείο το οποίο έχει

εφαρμοστεί επιτυχώς σε διάφορες αναλύσεις. Το λογισμικό Discriminant Analysis έχει γίνει διαθέσιμο από αρκετούς κατασκευαστές οργάνων FTIR για φασματικές αναλύσεις. Στην παρούσα μελέτη ήταν ενσωματωμένο στο λογισμικό TQ Analyst Professional Edition.

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis - PCA) μειώνει τα φασματικά δεδομένα σε ένα μικρό (συνήθως λιγότερο από 20) αριθμό νέων, ορθογώνιων μεταβλητών (Karoui et al., 2010). Κάθε φάσμα καταχωρείται σε μια συγκεκριμένη κατηγορία. Σκοπός είναι να σχηματιστούν γραμμικοί συνδυασμοί των δεδομένων για την ελαχιστοποίηση της διακύμανσης εντός της ομάδας και τη μεγιστοποίηση της διακύμανσης μεταξύ των ομάδων (Garon, Kaddoumi, Carayon, Amiel, 2010).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φασμάτων IR μπορεί να επιτευχθεί με τεχνικές παλινδρόμησης, όπως PCR ή τη μερική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square-PLS regression). Η PLS βασίζεται στην κατασκευή νέων, μη συσχετιζόμενων παραγόντων από τα αρχικά φασματικά δεδομένα. Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των PCA και PLS είναι ότι, ενώ η PCA μειώνει την ποσότητα των φασματικών δεδομένων ανεξάρτητα από οποιαδήποτε συσχετισμένη χημική πληροφορία, η PLS υπολογίζει νέες μεταβλητές, επιλέγοντας εκείνες τις διαστάσεις που εξηγούν τη μέγιστη διακύμανση. Ως εκ τούτου, η PLS ενσωματώνει μεταβλητές στα δεδομένα που είναι σχετικές για την περιγραφή της διακύμανσης που σχετίζεται με τα χημικά δεδομένα (Karoui et al., 2010).

A.6.5.2 Μερική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square - PLS Regression)

Η PLS παλινδρόμηση (Partial Least Squares - PLS) ανήκει στις τεχνικές της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης και είναι ένα ισχυρό εργαλείο ανάλυσης δειγμάτων που έχουν πολύπλοκη δομή. Η απόδοση των ανεπτυγμένων μοντέλων PLS αξιολογήθηκαν μέσω του συντελεστή συσχέτισης R^2 , της ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της βαθμονόμησης (Root Mean-Squared Error of Calibration - RMSEC), της ρίζας του μέσου τετραγωνικού σφάλματος της διασταυρωμένης

επικύρωσης (Root Mean-Squared Error of cross-Validation - RMSEV) και της ρίζας του μέσου σφάλματος της πρόβλεψης (Root Mean Squared Error of Prediction - RMSEP) (Kaya-Celiker, Mallikarjunan, Kaaya, 2015). Η ακρίβεια των μοντέλων βαθμονόμησης λαμβάνεται σύμφωνα με τις μικρότερες τιμές που λαμβάνονται για το RMSECV (Smita et al., 2009).

A.6.5.3 Φασματοσκοπία Raman και Χημειομετρία

Η φασματοσκοπία Raman σε συνδυασμό με τη Χημειομετρία αποτελεί μια γρήγορη και μη καταστρεπτική μέθοδο για την ποσοτικοποίηση ή την ταξινόμηση μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων. Η φασματοσκοπία Raman μπορεί να είναι ιδανική για καθημερινές αναλύσεις, προσφέροντας δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο της αφλατοξίνης σε κρίσιμα σημεία της αλυσίδας εφοδιασμού σιτηρών. Αναμένεται, επίσης, αυτή η τεχνική να μπορεί να επιτρέψει την ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών μυκοτοξινών σε δημητριακά και ελαιούχους σπόρους. Πιθανά μειονεκτήματα της τεχνικής Raman αποτελούν ο μεγαλύτερος χρόνος σάρωσης και οι πολύπλοκες μαθηματικές επεξεργασίες για τη βελτίωση της ποιότητας των φασμάτων. Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί τρόποι για να βελτιωθεί αυτή η τεχνική για μεγαλύτερη ακρίβεια πρόβλεψης μέσω εφαρμογής πιο αποδοτικών αλγορίθμων και ανάπτυξης νέων τεχνολογιών σάρωσης του δείγματος (Kyung-Min, Herrman, Yun, 2014).

A.7 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο μελέτης είναι να διερευνηθούν:

- η αποτελεσματικότητα των τεχνικών DRIFT και Raman για την ποιοτική ανίχνευση μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών και μολυσμένου με αφλατοξίνη φιστικέλαιου Αιγίνης
- η ποσοτικοποίηση της διαφοροποίησης για τα κελυφωτά φιστίκια (ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης στα μολυσμένα κελυφωτά φιστίκια Αιγίνης)

Η αξιοπιστία του ποσοτικού προσδιορισμού των τεχνικών DRIFT και Raman θα αποδειχθεί με σύγκριση με την ανάλυση HPLC.

Σκοπός της μελέτης είναι η ενσωμάτωση των τεχνικών αυτών στη βιομηχανία τροφίμων για την απόρριψη μολυσμένων με αφλατοξίνη, σε επίπεδα ανώτερα των επιτρεπτών ορίων, κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης. Εάν καταστεί δυνατή αυτή η ενσωμάτωση, θα αντικατασταθούν οι υπάρχουσες χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξινών, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, με τις τεχνικές DRIFT και Raman. Συγκεκριμένα, οι χρωματογραφικές μέθοδοι δεν παρέχουν όλες τις απαιτήσεις ταυτόχρονα, δηλαδή να είναι φορητές (εφαρμογή μετρήσεων στο χωράφι), μη καταστρεπτικές για το δείγμα, γρήγορες, αυτοματοποιημένες, εύκολες (δεν απαιτείται χρονοβόρα εκπαίδευση για την εφαρμογή τους). Αντίθετα, είναι χρονοβόρες, δαπανηρές και παρέχουν ανεπαρκείς πληροφορίες για τη μυκητιασική ταυτοποίηση των ειδών.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Συλλέχθηκαν δείγματα κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης και έγινε διάκρισή τους σε πέντε κατηγορίες που βασίζονται στην κύρια κατηγοριοποίηση των μη μολυσμένων με αφλατοξίνη και των μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων:

- Μη μολυσμένα με αφλατοξίνη

A) Υγιή (Healthy - H) (πίνακας 1.1)

B) Διαλογής (OS) (πίνακας 1.5)

Γ) Τεχνητά μολυσμένα με μη-αφλατοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* (Artificially Non-Toxicogenic contaminated - ANT) (πίνακας 1.4)

- Μολυσμένα με αφλατοξίνη

Δ) Μολυσμένα με αφλατοξίνη με φυσικό τρόπο (Naturally Contaminated - NC) (πίνακας 1.2)

E) Τεχνητά μολυσμένα με αφλατοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* (Artificially Contaminated - AC) (πίνακας 1.3)

Τεχνητή μόλυνση

Για τη διαδικασία της τεχνητής μόλυνσης, λαμβάνονται δείγματα κελυφωτών φιστικιών ποικιλίας Αιγίνης, τα οποία δεν είναι μολυσμένα με αφλατοξίνη. Μέρος των δειγμάτων αυτών (υποδείγματα) μολύνεται τεχνητά με τοξικογόνα στελέχη των μυκήτων *A. flavus* και *A. parasiticus*, τα οποία διατηρούνται στη συλλογή Ασπέργιλλων του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, μετά από επιφανειακή απολύμανση των καρπών. Οι συνθήκες επώασης είναι ίδιες για όλα τα τεχνητά μολυσμένα δείγματα (θάλαμος στους 28 °C σε φως) καθώς και για το μάρτυρα, ο οποίος έχει υποστεί όλες τις επεμβάσεις, όπως και τα τεχνητώς μολυσμένα δείγματα, αλλά το διάλυμα μόλυνσης δεν περιέχει κονίδια (σπόρια) των μυκήτων, αλλά απεσταγμένο νερό.

Προετοιμασία διαλύματος μόλυνσης

- Σε 1 mL δ/τος H₂O:0,01% Tween 80 μεταφέρουμε κονίδια των στελεχών με μία βελόνα και αναδεύουμε στο Vortex
- Αραιώνουμε 100 μL από το αρχικό σε 900 μL από το παραπάνω διάλυμα (H₂O:0,01% Tween 80)
- Μέτρηση στο αιματοκυτταρόμετρο:
Α) βάζουμε 10 μL σε κάθε chamber
Β) μετράμε τα κονίδια στα πέντε τετράγωνα του κάθε chamber
Γ) βρίσκουμε το μ.ο*50000*10
Δ) φτιάχνουμε ένα διάλυμα 1150 mL με 10⁶ κονίδια/mL

Εμβολιασμός

- Απολύμανση καρπών:
Α) 3' σε 10% χλωρίνη (30 mL χλωρίνη σε 300 mL H₂O)
Β) Ξέπλυμα σε νερό
Γ) Πέρασμα από 70% δ/μα αιθανόλης
Δ) Ξέπλυμα με νερό
Ε) Στέγνωμα σε διηθητικό χαρτί
- Μεταφορά του κάθε δείγματος καρπών στο διάλυμα μόλυνσης μέσα σε κωνικές φιάλες.
- Ανάδευση του διαλύματος μόλυνσης με τους καρπούς σε θάλαμο (80 rpm για 30 min).
- Απόρριψη του διαλύματος μόλυνσης, ενώ οι καρποί παραμένουν εντός της κωνικής φιάλης.
- Επώαση σε θαλάμους στους 28 °C προσέχοντας να υπάρχει επαρκής υγρασία.

Πίνακας 1.1. Κατάταξη των υγιών δειγμάτων (Η).

Κατηγορία	Κωδικός	Προέλευση	Έτος συγκομιδής	Τρόπος ξήρανσης	Πληροφορίες
Υγιή	H-1	Αίγινα	2014		ΜΟΥΡΤΖΗΣ- αποθηκευμένο στο ψυγείο με κέλυφος
	H-2	Αίγινα	2014		Αγρ.Συνεταιρισμός LOT:50.11.01.75 αποθηκευμένο στο ψυγείο με κέλυφος
	H-3	Αίγινα	2014		ΜΑΡΜΑΡΙΝΟΣ- αποθηκευμένο στο ψυγείο με κέλυφος
	H-4	Αίγινα		Ήλιος	Ασώματοι και Άγνωστο Αίγινας
	H-5	Αίγινα	2008	Ξηραντήριο	ΚΤΗΜΑ Β ΞΗΡΑΝΣΗ
	H-6	Αίγινα	2008	Ξηραντήριο	ΚΤΗΜΑ Β ΑΠΟΘΗΚΗ
	H-7	Αίγινα	2008	Ήλιος	ΚΤΗΜΑ Δ ΞΗΡΑΝΣΗ 25%
	H-8	Αίγινα	2008		ΑΓΡ.ΣΥΝΕΤΑΙΡΙΣΜΟΣ αποθηκευμένο στην κατάψυξη χωρίς κέλυφος
	H-9	Αίγινα			Περιβόλα και Λευκή Αίγινας
	H-10	Εόβοια	2010	Ήλιος	Α (ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΝΩΡΙΣ) και Β (ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΑΡΓΑ) αποθηκευμένο στο ψυγείο με κέλυφος

	H-11	Καπανδρίτι	2010	Ήλιος	αποθηκευμένο στο ψυγείο με κέλυφος
	H-12	Πόρος	2010	Ήλιος	αποθηκευμένο στο ψυγείο με κέλυφος
	H-13	Αίγινα			Φάρος και Σοβάλα Αίγινας
	H-14	Αίγινα			Βώβου Αίγινας
	H-15	Αίγινα			Μύλου Αίγινας

Πίνακας 1.2. Κατάταξη των φυσικώς μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων (NC).

Κατηγορία	Κωδικός Δείγματος	Πληροφορίες
Φυσικώς μολυσμένα με αφλατοξίνη	NC-3	Μπαλαμούτσος
	NC-4	Α-Ξήρανσης-Κανονικά
	NC-5	Α-Ξήρανσης-25%
	NC-6	Α-Ξήρανσης-35%
	NC-7	Α-Αποθήκη
	NC-8	Κουνάδης 2011
	NC-9	Γ-Ξήρανσης
	NC-10	Δ-Ξήρανσης-35%
	NC-11	Δ-Αποθήκη-Κανονικά
	NC-12	Δ-Αποθήκη-35%

Πίνακας 1.3. Κατάταξη των τεχνητώς μολυσμένων με αφλατοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* δειγμάτων (AC).

Κατηγορία	Κωδικός Δείγματος	Πληροφορίες	Χρόνος επώασης (ημέρες)
Τεχνητά μολυσμένα με τοξικογόνα στελέχη του μύκητα <i>A. flavus</i>	AC-1.1	Στέλεχος 18.4	9
	AC-1.2	Στέλεχος Γ25Α	9
	AC-2.1	Στέλεχος 18.4	9
	AC-2.2	Στέλεχος Γ25Α	9
	AC-3.1	Στέλεχος 18.4	9
	AC-3.2	Στέλεχος Γ25Α	9
	AC-2/10	Στέλεχος AF71	10
	AC-3/12	Στέλεχος 3.11	12
	AC-4/12	Στέλεχος 5.19	12
	AC-5/12	Στέλεχος 9.8	12
	AC-6/12	Στέλεχος 6.4	12
	AC-7/12	Στέλεχος 4.12	12
	AC-8/12	Στέλεχος 14.2	12
	AC-9/12	Στέλεχος 7.3	12

Πίνακας 1.4. Κατάταξη των τεχνητώς μολυσμένων με μη-αφλατοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* δειγμάτων (ANT).

Κατηγορία	Κωδικός Δείγματος	Πληροφορίες	Χρόνος επώασης (ημέρες)
Τεχνητά μολυσμένα με μη τοξικογόνα στελέχη του μήκητα <i>A. flavus</i>	ANT-1/7	Στέλεχος AF10	7
	ANT-1.1	Στέλεχος AF134	9
	ANT-1.2	Στέλεχος AF137	9
	ANT-2.1	Στέλεχος AF134	9
	ANT-2.2	Στέλεχος AF137	9
	ANT-3.1	Στέλεχος AF134	9
	ANT-3.2	Στέλεχος AF137	9

Πίνακας 1.5. Κατάταξη των δειγμάτων διαλογής (OS).

Κατηγορία	Κωδικός Δείγματος	Πληροφορίες
Διαλογής	OS-1	Διαλογή 2014 Α
	OS-2	Διαλογή 2014 Β
	OS-3	Διαλογή 2014 Γ

Κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε φιστικοθραύστης (εικόνα 1.1):



Εικόνα 1.1. Φιστικοθραύστης.

B.2 ΑΛΕΣΗ - ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά τη διαδικασία της άλεσης, τα φιστικά αλέσθηκαν χονδροειδώς με τη βοήθεια μπλέντερ έως τη μετατροπή αυτών σε σκόνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη την πειραματική διαδικασία. Η σκόνη των φιστικών αποθηκεύτηκε στους 4 °C σε πλαστικές σακούλες.

Κατά τη διαδικασία της άλεσης χρησιμοποιήθηκε μπλέντερ (εικόνα 2.1):



Εικόνα 2.1. Μπλέντερ.

Κατά τη διαδικασία της ομογενοποίησης, έγινε κοκκομετρία των δειγμάτων με μέγεθος κόκκων σκόνης φιστικιού 800-500 μm. Όπως έχει προαναφερθεί, το στάδιο αυτό είναι ιδιαίτερο σημαντικό για τη μετέπειτα ανάλυση. Το μέγεθος των κόκκων πρέπει να είναι μικρότερο από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός κατά τη φασματοσκοπική ανάλυση FTIR. Αντίθετα, παρατηρείται σκέδαση ακτινοβολίας με

αποτέλεσμα αύξηση θορύβου και μείωση του ποσού της ακτινοβολίας που διεισδύει μέσα στο δείγμα και κατ' επέκταση μείωση της έντασης των απορροφήσεων. Επιπλέον, με την εξασφάλιση άριστης ομογενοποίησης η αναλυτική ποσότητα δοκιμής έχει την ίδια συγκέντρωση της τοξίνης με το αρχικό δείγμα και πραγματοποιείται καλύτερη εκχύλιση από το διαλύτη κατά την ανάλυση με HPLC.

Κατά τη διαδικασία της κοκκομετρίας χρειάστηκαν κόσκινο μεγέθους 500 μm (εικόνα 2.2), κόσκινο μεγέθους 800 μm (εικόνα 2.3), ψύκτρα καθαρισμού των κόσκινων (εικόνα 2.4), ζυγαριά με δύο δεκαδικά ψηφία (εικόνα 2.6), σακουλάκια αποθήκευσης με ερμητικό κλείσιμο (εικόνα 2.7), ταμπέλες καταγραφής του τύπου του δείγματος (εικόνα 2.8), κάψα ζύγισης (εικόνα 2.9). Στις εικόνες 2.5, 2.10 και 2.11 φαίνονται αντίστοιχα, η κοκκομετρία δείγματος που προηγουμένως έχει αλεσθεί χονδροειδώς, σακουλάκι αποθήκευσης με τυχαίο δείγμα και σακουλάκια αποθήκευσης με 10NC δείγματα:



Εικόνα 2.2. Κόσκινο μεγέθους 500 μm .



Εικόνα 2.3. Κόσκινο μεγέθους 800 μm.



Εικόνα 2.4. Ψύκτρα καθαρισμού των κόσκινων.



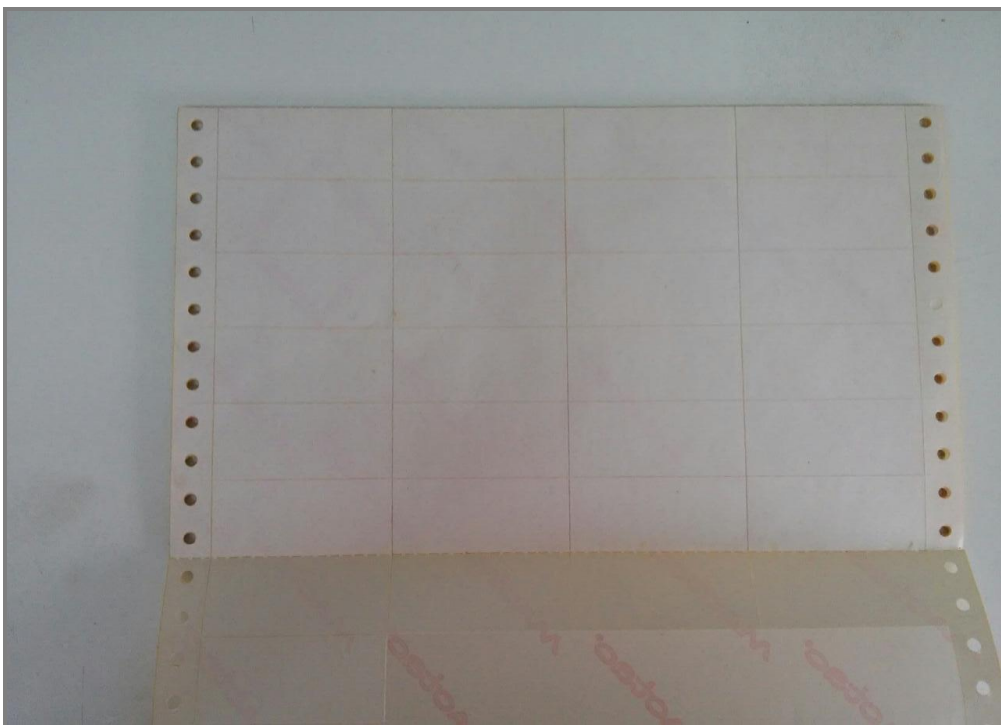
Εικόνα 2.5. Κοκκομετρία δείγματος που προηγουμένως έχει αλεσθεί χονδροειδώς.



Εικόνα 2.6. Ζυγαριά με δύο δεκαδικά ψηφία.



Εικόνα 2.7. Σακουλάκι αποθήκευσης με ερμητικό κλείσιμο.



Εικόνα 2.8. Ταμπέλες καταγραφής του τύπου του δείγματος.



Εικόνα 2.9. Κάβα ζύγισης.



Εικόνα 2.10. Σακουλάκι αποθήκευσης με τυχαίο δείγμα.



Εικόνα 2.11. Σακουλάκια αποθήκευσης με 10NC δείγματα.

B.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ

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

$$Y = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100$$

Ξήρανση στερεών

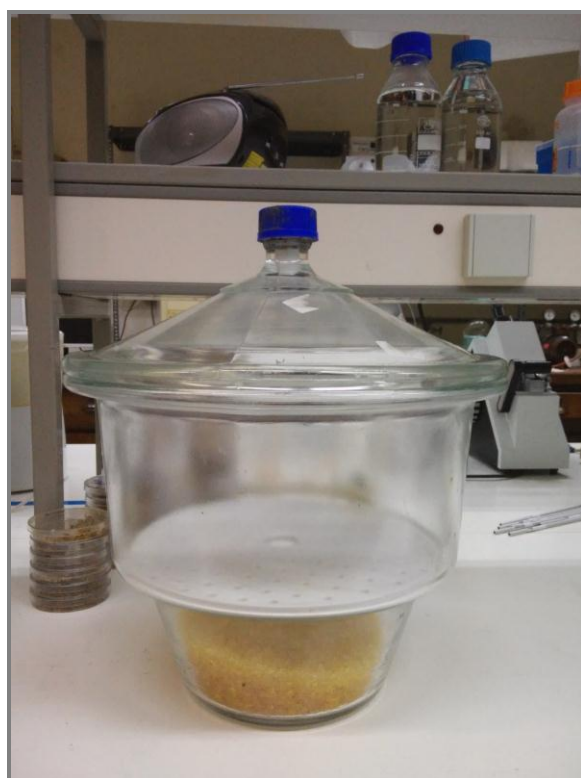
Οι στερεές ουσίες ξηραίνονται με παραμονή στον αέρα ή με θέρμανση σε φούρνο σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το σημείο τήξης και γενικότερα, τις ιδιότητες της κάθε ουσίας. Ο σωστότερος τρόπος είναι να τοποθετείται η ουσία και να μένει αρκετές ώρες σε ξηραντήρα κενού που περιέχει κάποιο ξηραντικό, όπως P₂O₅. Το P₂O₅, που χρησιμοποιείται ως ξηραντικό σε ξηραντήρες, έχει μεγάλη ένταση ξήρανσης. Είναι ισχυρά όξινο γι' αυτό χρησιμοποιείται για μικρό αριθμό οργανικών ενώσεων. Στο ξηραντήριο του εργαστηρίου χρησιμοποιείται η ενεργοποιημένη μορφή του SiO₂ (silica gel). Κατά τη διαδικασία μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία πιο δόκιμο είναι να χρησιμοποιηθεί ο όρος αφυδάτωση (dehydration), αντί του όρου ξήρανση που

πολλές φορές χρησιμοποιείται, γιατί ο όρος αυτός αποδίδει την πλήρη απομάκρυνση νερού από το τρόφιμο.

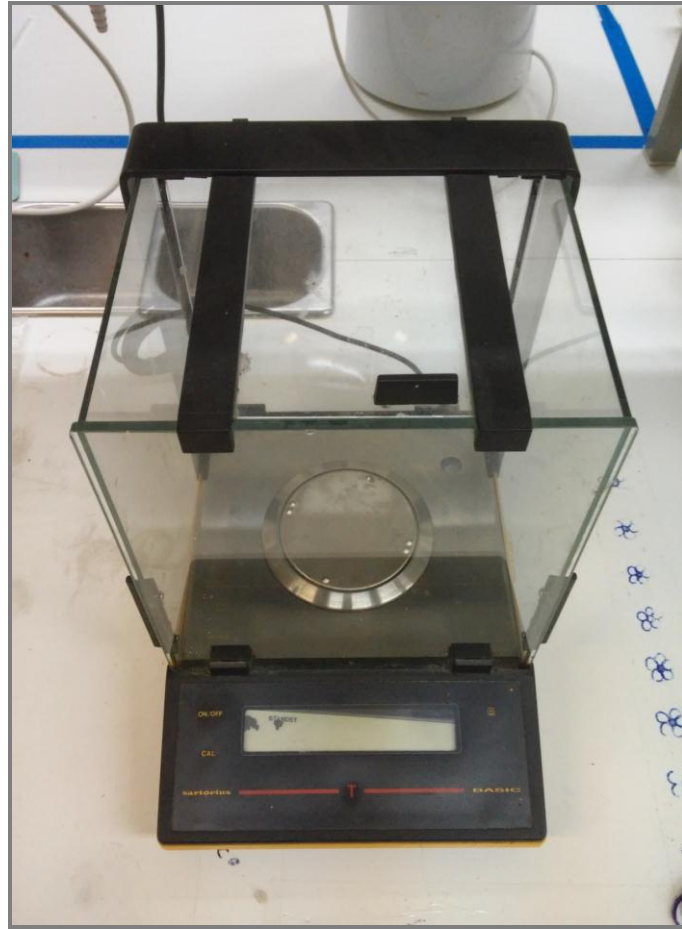
Κατά τη διαδικασία της χρησιμοποιήθηκαν φούρνος (εικόνα 3.1), ξηραντήριο (εικόνα 3.2) και ζυγαριά με τέσσερα δεκαδικά ψηφία (εικόνα 3.3):



Εικόνα 3.1. Φούρνος.



Εικόνα 3.2. Ξηραντήριο.



Εικόνα 3.3. Ζυγαριά με τέσσερα δεκαδικά ψηφία.

B.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΛΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών λιπιδίων στο σπέρμα των κελυφωτών φιστικιών όλων των δειγμάτων προσδιορίστηκε με ημισυνεχή εκχύλιση με οργανικό διαλύτη σε συσκευή Soxhlet, σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο AOAC 948.22. Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, μια ποσότητα 3-4 g από το κάθε δείγμα, μεταφέρεται στο φυσίγγιο εκχύλισης (καρτούσα) (σημείο Β στην εικόνα 4.1) και λαμβάνεται μέτρηση από το απόβαρο (κενή καρτούσα) και το μικτό βάρος (καρτούσα + δείγμα) σε αναλυτικό ζυγό (Sartorius, B 120 S). Το δείγμα έχει προηγουμένως ψιλοαλεστεί σε αναλυτικό μύλο (Tekmar A-10) και αποξηρανθεί μέχρι σταθερού βάρους σε φούρνο (Gallenkamp, Plus Oven) στους 102-105 °C, ώστε να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Στη συνέχεια, η καρτούσα με το δείγμα τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής Soxhlet, ο οποίος προσαρμόζεται σε προζυγισμένη γυάλινη φιάλη, η οποία περιέχει 250-300 mL από το διαλύτη εκχύλισης (πετρελαϊκός αιθέρας). Το δείγμα εκχυλίζεται για έξι ώρες. Μετά την παραλαβή του λίπους, ο διαλύτης εκχύλισης απομακρύνεται με περιστρεφόμενο εξατμιστήρα κενού (Büchi Rotavapor, R-114) συνδεδεμένο με υδατόλουτρο (Büchi Waterbath, B-480) στους 50 °C. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε λίπος υπολογίστηκε α) με απ'ευθείας ζύγιση του ελαίου μετά την εξάτμιση σε αναλυτικό ζυγό και β) με ζύγιση των απολιπασμένων δειγμάτων (η καρτούσα μετά το τέλος της εκχύλισης) σε ζυγό ακριβείας και λήφθηκε η μέση τιμή των δύο μετρήσεων. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

$$(\alpha) \% \text{λίπος} = \frac{M_1 - M_2}{M_2} \times 100$$

Όπου: M_2 = η μάζα του αρχικού δείγματος σε g.

M_1 = Η μάζα της φιάλης μετά την εκχύλιση με το δείγμα σε g.

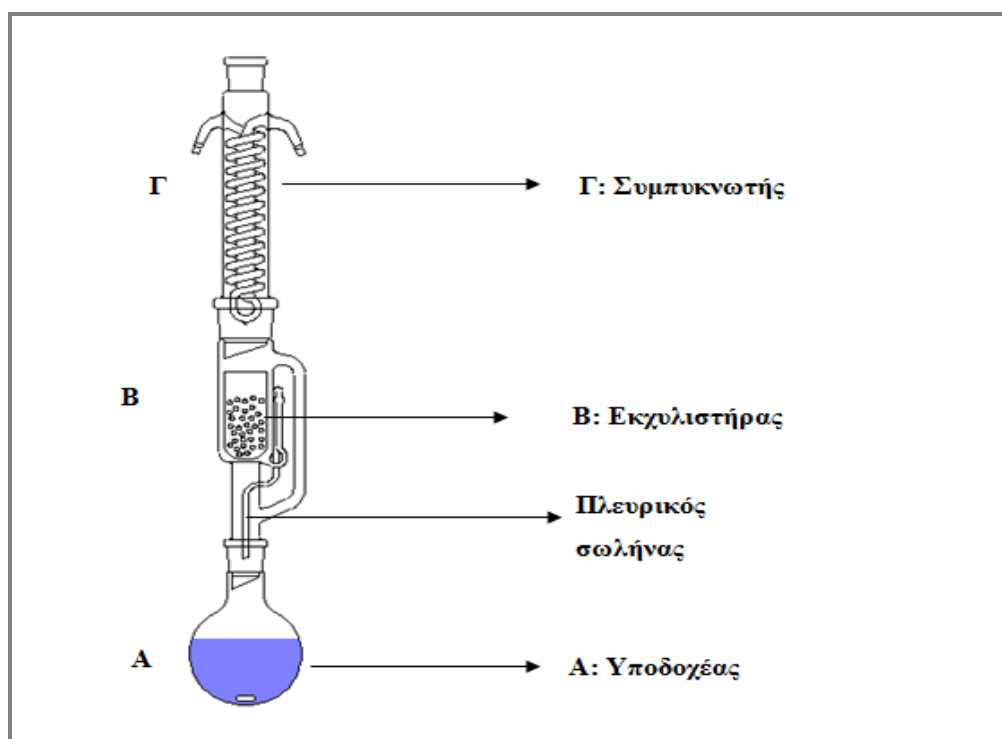
M_0 = Η μάζα φιάλης σε g.

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

Όπου: G_2 = Η μάζα του αρχικού δείγματος σε g.

G_1 = Η μάζα της καρτούσας με το απολιπασμένο δείγμα μετά την εκχύλιση σε g.

G_0 = Η μάζα της καρτούσας με το δείγμα πριν την εκχύλιση σε g.



Εικόνα 4.1. Συσκευή ημισεχούς εκχύλισης Soxhlet.

Αρχή λειτουργίας συσκευής Soxhlet για προσδιορισμό ολικού λίπους

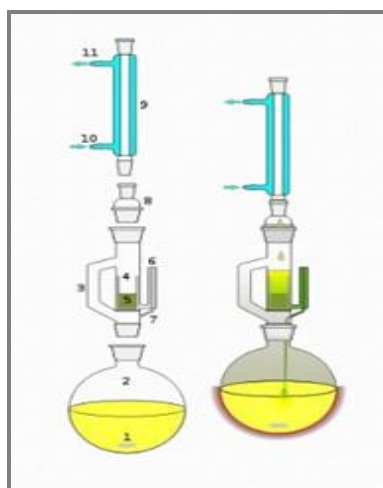
Ο διαλύτης τοποθετείται μέσα σε γυάλινη φιάλη (σημείο A στην εικόνα 4.1) και θερμαίνεται υπό κάθετο ψυκτήρα. Ο ατμός διαλύτη ταξιδεύει μέσω ενός βραχίονα απόσταξης και πλημμυρίζει το θάλαμο που στεγάζει το κύπελλο (καρτούσα) των στερεών (περιέχει το δείγμα) (σημείο B στην εικόνα 4.1). Ο συμπυκνωτής εξασφαλίζει ότι οποιοσδήποτε ατμός διαλύτη ψύχεται και στάζει πίσω μέσα στο θάλαμο που στεγάζει το στερεό υλικό. Ο θάλαμος που περιέχει το στερεό υλικό γεμίζει σιγά-σιγά με το θερμό διαλύτη. Μέρος της επιθυμητής ένωσης (έλαιο) διαλύεται στο ζεστό διαλύτη. Όταν ο θάλαμος Soxhlet είναι σχεδόν πλήρης, ο θάλαμος εκκενώνεται από το σιφόνι (σιφωνισμός). Ο διαλύτης μαζί με το έλαιο που έχει διαλυθεί σε αυτόν επιστρέφεται

στη φιάλη απόσταξης. Ο θάλαμος βεβαιώνει ότι η γρήγορη κίνηση του διαλύτη δε μεταφέρει οποιοδήποτε στερεό υλικό στη φιάλη απόσταξης.

Μετά από πολλούς κύκλους σιφωνισμού η επιθυμητή ένωση συγκεντρώνεται στη φιάλη απόσταξης. Το πλεονέκτημα αυτού του συστήματος είναι ότι, αντί να διέρχονται πολλά τμήματα του θερμού διαλύτη μέσω του δείγματος, διέρχεται ένα ποσό διαλύτη το οποίο ανακυκλώνεται.

Μετά την εκχύλιση ο διαλύτης απομακρύνεται, συνήθως με τη βοήθεια ενός περιστροφικού εξατμιστήρα κενού, αποδίδοντας το έλαιο. Το μη διαλυτό μέρος των εκχυλισμένων στερεών παραμένει στο θάλαμο και συνήθως απορρίπτεται.

Λεπτομερής συνδεσμολογία της συσκευής Soxhlet υπάρχει στην εικόνα 4.2.



Εικόνα 4.2. Λεπτομερής συνδεσμολογία συσκευής Soxhlet.

Όπου 1: αναδευτήρας

2: γυάλινη φιάλη (η φιάλη δε θα πρέπει να είναι υπερπλήρης και ο όγκος του διαλύτη μέσα σε αυτή πρέπει να είναι 3-4 φορές ο όγκος του θαλάμου Soxhlet)

3: διαδρομή απόσταξης

4: θάλαμος Soxhlet

5: στερεά

6: σιφόνι - κορυφή

7: σιφόνι - έξοδος

8: προσαρμογέας επέκτασης

9: συμπυκνωτής

10: νερό ψύξης - είσοδος

11: νερό ψύξης - έξοδος

Λειτουργικά σημεία προσοχής

- Η στήλη πρέπει να είναι όσο γίνεται πιο κατακόρυφη, γιατί έτσι πετυχαίνουμε τη μέγιστη επαφή μεταξύ υγρού και ατμού.
- Το νερό στον υδροψυκτήρα κυκλοφορεί από το κάτω μέρος προς τα πάνω (κάτω-είσοδος και πάνω-έξοδος) για καλή κυκλοφορία (φεύγει έτσι εύκολα ο αέρας) από τη μια μεριά και για να αποφεύγεται η απότομη επαφή του θερμού αποστάγματος με το ψυχρό νερό από την άλλη.
- Για τη διατήρηση της ελαττωμένης πίεσης (βέλτιστη κατάσταση είναι η επίτευξη κενού) μεγάλη σημασία έχει η μόνωση της συσκευής Soxhlet από τον αέρα, που την πετυχαίνουμε με λίπανση όλων των σημείων σύνδεσης των γυάλινων εξαρτημάτων.
- Ο εξωτερικός φαρδύς σωλήνας φέρνει εσωτερικά ένα στενότερο γυάλινο σωλήνα σε μορφή σπирάλ. Η μορφή αυτή του σωλήνα διευκολύνει περισσότερο σε σχέση με τη ράβδο, γιατί έτσι έρχεται μεγαλύτερη ποσότητα ατμού σε επαφή με το ψυκτικό μέσο και επιτυγχάνεται πιο γρήγορα η συμπύκνωση του ατμού.

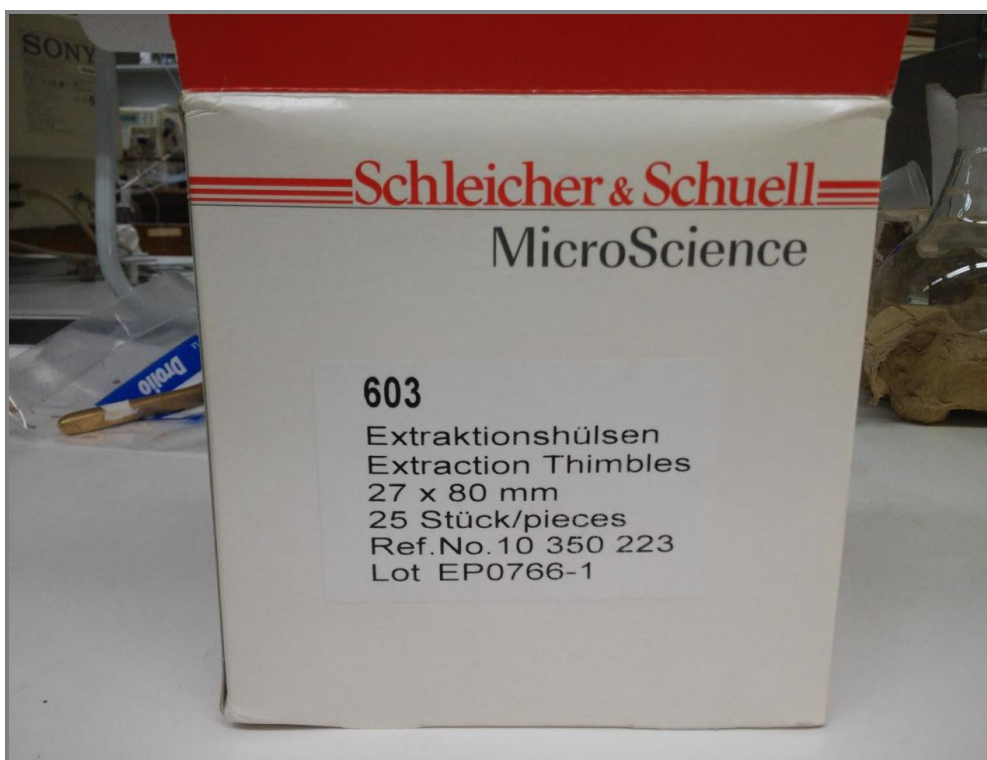
Εξάτμιση με περιστρεφόμενους εξατμιστήρες

Με αυτούς διώχνουμε ένα διαλύτη από διάλυμα στερεής ουσίας (επιθυμητό προϊόν) ή και υγρής αρκεί το σημείο ζέσης της να διαφέρει από το σημείο ζέσης του διαλύτη και να μη σχηματίζει αζεοτροπικό μίγμα μ' αυτόν. Η περιστροφή εξασφαλίζει ομαλή απομάκρυνση του διαλύτη χωρίς κινδύνους εκτίναξης. Έτσι, απομακρύνονται γρήγορα μεγάλες ποσότητες διαλύτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πάλι.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν καρτούσες (εικόνα 4.3 και εικόνα 4.4), συσκευή Soxhlet (εικόνα 4.5 και εικόνα 4.6) και περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (εικόνα 4.7). Στις εικόνες 4.8 και 4.9 φαίνεται το δείγμα πριν και μετά την εκχύλιση του λίπους αντίστοιχα:



Εικόνα 4.3. Καρτούσες (1).



Εικόνα 4.4. Καρτούσες (2).



Εικόνα 4.5. Συσκευή Soxhlet (1).



Εικόνα 4.6. Συσκευή Soxhlet (2).



Εικόνα 4.7. Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού.



Εικόνα 4.8. Πριν την εκχύλιση του λίπους.



Εικόνα 4.9. Μετά την εκχύλιση του λίπους.

B.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ

B.5.1 Ανάλυση κονιορτοποιημένων δειγμάτων με την τεχνική DRIFTS

Τα φάσματα FTIR με την τεχνική DRIFTS ελήφθησαν με φασματόμετρο υπερύθρου Thermo Nicolet 7600. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με ειδικό λογισμικό OMNIC 7.3 για την επεξεργασία τους. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική DRIFTS, όπου τα κελυφωτά φιστίκια υπό μορφή σκόνης, αρχικά τοποθετούνταν σε κατάλληλο καψίδιο και έπειτα, μεταφέρονταν σε ειδικό υποδοχέα για τη λήψη του φάσματος, χωρίς να έχουν υποστεί την οποιαδήποτε χημική προεργασία πριν τη λήψη του φάσματος. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν 5 (πέντε) φάσματα και ανά πέντε φάσματα κάθε φορά, λαμβανόταν το υπόβαθρο (background) με KBr ως φάσμα αναφοράς (υποβάθρου). Ακόμη, σε κάθε δείγμα γίνονταν 100 «σαρώσεις», η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν 4 cm^{-1} , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν $0,3165\text{ mm/s}$.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε υποδοχέας δείγματος που φέρει καψίδιο (εικόνα 5.2). Στην εικόνα 5.1 φαίνεται το σύστημα IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις:



Εικόνα 5.1. Σύστημα της IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.

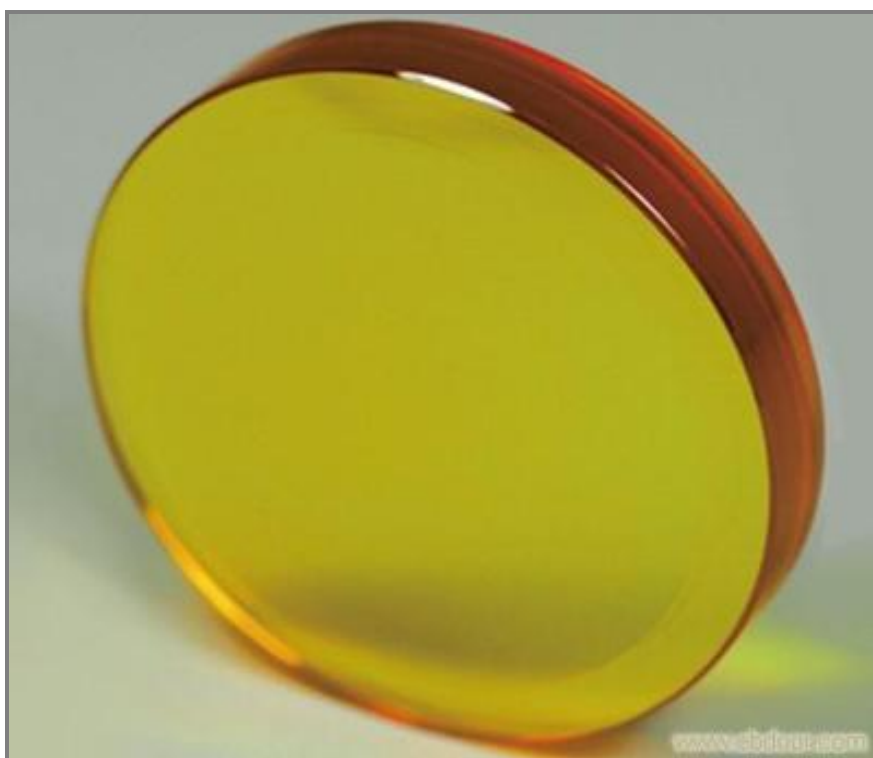


Εικόνα 5.2. Υποδοχέας δείγματος που φέρει καψίδιο.

B.5.2 Ανάλυση δειγμάτων φιστικέλαιου με την τεχνική δισκίων ZnSe

Τα φάσματα FTIR με την τεχνική ZnSe ελήφθησαν με φασματόμετρο υπέρυθρου Thermo Nicolet 7600. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με ειδικό λογισμικό OMNIC 7.3 για την επεξεργασία τους. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική δισκίων ZnSe, όπου το φιστικέλαιο, αρχικά τοποθετούνταν σε κατάλληλα διαφανή πλακίδια ZnSe και έπειτα, μεταφέρονταν σε ειδικό υποδοχέα για τη λήψη του φάσματος. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν τρία φάσματα και ανά τρία φάσματα κάθε φορά, λαμβανόταν το υπόβαθρο (background) ως φάσμα αναφοράς. Υπόβαθρο στη συγκεκριμένη τεχνική λαμβάνεται με την ακτινοβολία υπέρυθρης ακτινοβολίας των πλακιδίων ZnSe. Ο καθαρισμός των δισκίων γινόταν κάθε φορά με αιθανόλη. Ακόμη, σε κάθε δείγμα γίνονταν 100 «σαρώσεις», η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν 4 cm^{-1} , ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν $0,3165\text{ mm/s}$.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε δισκίο ZnSe (εικόνα 5.3):



Εικόνα 5.3. Δισκίο ZnSe.

Όλα τα φάσματα FTIR που ελήφθησαν, εξομαλύνθηκαν, έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής των φασμάτων και κανονικοποιήθηκε η κλίμακά τους. Οι επεξεργασίες αυτές έγιναν με τη βοήθεια των λειτουργιών «αυτόματης εξομάλυνσης», «αυτόματης διόρθωσης της βασικής γραμμής» και «κανονικοποίησης της κλίμακας» του λογισμικού OMNIC 7.3. Τέλος, με τη βοήθεια του Statistical Spectra, στην περίπτωση της τεχνικής DRIFTS λήφθηκε ο μέσος όρος τριών φασμάτων για κάθε δείγμα από τα πέντε αρχικά φάσματα, ενώ στην περίπτωση της τεχνικής ZnSe χρησιμοποιήθηκαν τα τρία φάσματα κάθε δείγματος για την εξαγωγή του μέσου όρου των μετρήσεων.

Συνολικά από τα κονιορτοποιημένα δείγματα ελήφθησαν:

- 75 φάσματα από τα 15 δείγματα H (15 δείγματα x 5 φάσματα), από τα οποία επιλέχθηκαν τα 45 για το μέσο όρο των δειγμάτων (15 δείγματα x 3 φάσματα)
- 50 φάσματα από τα 10 δείγματα NC (10 δείγματα x 5 φάσματα), από τα οποία επιλέχθηκαν τα 30 για το μέσο όρο των δειγμάτων (10 δείγματα x 3 φάσματα)
- 70 φάσματα από τα 14 δείγματα AC (14 δείγματα x 5 φάσματα), από τα οποία επιλέχθηκαν τα 42 για το μέσο όρο των δειγμάτων (14 δείγματα x 3 φάσματα)
- 35 φάσματα από τα 7 δείγματα ANT (7 δείγματα x 5 φάσματα), από τα οποία επιλέχθηκαν τα 21 για το μέσο όρο των δειγμάτων (7 δείγματα x 3 φάσματα)
- 15 φάσματα από τα 3 δείγματα OS (3 δείγματα x 5 φάσματα), από τα οποία επιλέχθηκαν τα 9 για το μέσο όρο των δειγμάτων (3 δείγματα x 3 φάσματα)

Η επιλογή των τριών φασμάτων από τα πέντε για κάθε δείγμα έγινε σύμφωνα με το κριτήριο οπτικής ομοιότητας των φασμάτων.

Συνολικά από τα δείγματα φιστικέλαιου ελήφθησαν:

- 45 φάσματα από τα 15 δείγματα H (15 δείγματα x 3 φάσματα)
- 30 φάσματα από τα 10 δείγματα NC (10 δείγματα x 3 φάσματα)
- 42 φάσματα από τα 14 δείγματα AC (14 δείγματα x 3 φάσματα)
- 21 φάσματα από τα 7 δείγματα ANT (7 δείγματα x 3 φάσματα)
- 9 φάσματα από τα 3 δείγματα OS (3 δείγματα x 3 φάσματα)

Λήφθηκε και φάσμα καθαρής αφλατοξίνης. Επειδή, οι αφλατοξίνες είναι καρκινογόνες ουσίες και πρέπει να δοθεί προσοχή για να αποφευχθεί η προσωπική έκθεση και ο πιθανός κίνδυνος μόλυνσης, όλοι οι χειρισμοί κατά τη λήψη φάσματος καθαρής αφλατοξίνης έγιναν στον απαγωγό με προστατευτικό εξοπλισμό, όπως γυαλιά, γάντια, εργαστηριακή ποδιά και μία μάσκα προσώπου. Τα γυάλινα σκεύη πλύθηκαν με αραιό υποχλωριώδες οξύ πριν από την επαναχρησιμοποίησή τους και τα απόβλητα υλικά επεξεργάζονταν με υποχλωριώδες οξύ πριν τη διάθεσή τους (Cheraghali et al., 2007).

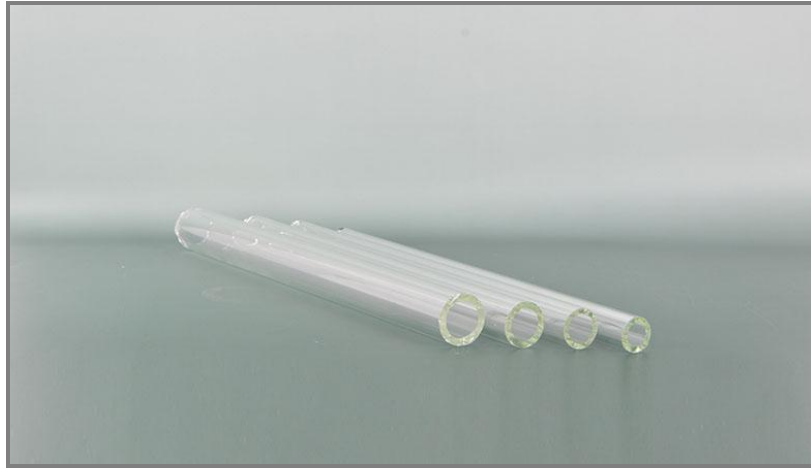
B.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ RAMAN

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν Vis-Raman (768 nm) και το πρόγραμμα NuSpec με integration time = 10 s και number of spectra to acquire = 10. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν τρία φάσματα.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν μηχανήματα Raman για την ανάλυση φιστικέλαιου (εικόνα 6.1) και γυάλινος τριχοειδής σωληνίσκος ως υποδοχέας δείγματος (εικόνα 6.2):



Εικόνα 6.1. Μηχάνημα Raman για την ανάλυση φιστικέλαιου.



Εικόνα 6.2. Γυάλινος τριχοειδής σωληνίσκος ως υποδοχέας δείγματος φιστικέλαιου.

Συνολικά από τα δείγματα φιστικέλαιου ελήφθησαν:

- 45 φάσματα από τα 15 δείγματα Η (15 δείγματα x 3 φάσματα)
- 30 φάσματα από τα 10 δείγματα ΝC (10 δείγματα x 3 φάσματα)
- 42 φάσματα από τα 14 δείγματα ΑC (14 δείγματα x 3 φάσματα)
- 21 φάσματα από τα 7 δείγματα ΑΝΤ (7 δείγματα x 3 φάσματα)
- 9 φάσματα από τα 3 δείγματα ΟS (3 δείγματα x 3 φάσματα)

B.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ ΜΕ HPLC

Στα φυσικώς μολυσμένα (NC) και στα τεχνητώς μολυσμένα με αφλατοξικογόνο στέλεχος (AC) δείγματα πραγματοποιείται ανάλυση με HPLC σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους 2005.08 και 999.07 του AOAC. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται διάλυμα CH₃OH – H₂O 8:2 v/v, σε αναλογία 1:5 με το βάρος του δείγματος. Προσθέτονται, επίσης, 20 mL n-εξανίου για το διαχωρισμό της φάσης του ελαίου και 5 g NaCl για την αύξηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος και της εκχυλιστικής ικανότητας του διαλύτη. Στη συνέχεια, ακολουθεί ομογενοποίηση του δείγματος για τουλάχιστον πέντε λεπτά σε υψηλή ταχύτητα (Ultra Turrex T25 basic IKA – Werke). Πριν από τον καθαρισμό των δειγμάτων με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC, AflaClean™ 3mL widebore, LC Tech) προηγείται μια προκαταρκτική διαδικασία καθαρισμού του υποκειμένου (υδατική φάση του διηθήματος) με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH : 7.2) με διήθηση σε φίλτρο Whatman 1-110 mm και σε φίλτρο 0,2 mm με τη βοήθεια αντλίας ώστε να αφαιρεθεί η επιπλέον τυρβώτητα και να είναι διαυγές. Κατόπιν, το δείγμα περνά άμεσα από τις στήλες IAC με ροή 2 mL/λεπτό, προσαρμοσμένες σε κατάλληλη συσκευή Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction - SPE). Η έκλουση και παραλαβή της αφλατοξίνης πραγματοποιείται με πέρασμα από τη στήλη IAC διαλύματος CH₃OH (HPLC grade, MERCK, 1.06007.2500). Το μεθανολικό διάλυμα συλλέγεται σε γυάλινα φιαλίδια των 4 mL, εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε σύστημα υγρού αζώτου και αποθηκεύεται στο ψυγείο μέχρι να αναλυθεί στην HPLC.

Το σύστημα ανάλυσης HPLC για αφλατοξίνες περιλαμβάνει:

- Αντλία και σύστημα εισαγωγής: JASCO PU 980
- Διαλύτες – κινητή φάση: νερό – μεθανόλη – ακετονιτρίλιο (6-2-2) με ταχύτητα ροής 1 mL/λεπτό, ισοκρατική έκλουση
- Σύστημα απαέρωσης με ήλιο: VWR 2004
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος με θάλαμο έγχυσης (loop): 100 µL
- Στήλη: ODS Hypersyl-Thermo Scientific, 4,6 x 250 mm, 5mm particle size
- Σύστημα παραγωγοποίησης σε διάταξη μετά τη στήλη (post-column derivatization): φωτοχημικός αντιδραστήρας με υπεριώδες φως (UV) στα 254 nm

- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής: JASCO FP920-Co. Ltd., Japan, μήκος διέγερσης 360nm - μήκος εκπομπής 435 nm
- Ολοκληρωτής: Clarity Lite software (Hewlett Packard HP3394A)

Πριν την εισαγωγή του δείγματος στην HPLC γίνεται επαναδιάλυση των αποθηκευμένων δειγμάτων σε 0,5 mL διαλύτη της κινητής φάσης (νερό – μεθανόλη – ακετονιτρίλιο 6:2:2) με τελική συμπύκνωση 2,8 φορές. Για κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ

Ο συντελεστής διακύμανσης (Coefficient of Variation, CV), ή αλλιώς η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD), είναι ένα τυποποιημένο μέτρο της διασποράς μιας κατανομής πιθανότητας ή κατανομής συχνότητας. Συχνά εκφράζεται ως ποσοστό και ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης / μέση τιμή (S / MO). Το CV ή RSD χρησιμοποιείται ευρέως στην αναλυτική χημεία για να εκφραστεί η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της ανιχνεύσεως. Τα αποτελέσματα μέτρησης της περιεκτικότητας σε υγρασία παρουσιάζονται στους πίνακες 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 και 1.5.

Πίνακας 1.1. Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία υγίων δειγμάτων (H).

Κωδικός δείγματος	Υγρασία (%) (Y)	Τυπική απόκλιση (S)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD ή CV)
H-1	3,29	0,05	1,67
H-2	4,27	0,05	1,19
H-3	3,52	0,05	1,47
H-4	3,18	0,09	2,98
H-5	2,56	0,06	2,25
H-6	2,92	0,07	2,48
H-7	4,50	0,02	0,48
H-8	6,90	0,40	5,80
H-9	3,22	0,07	2,05
H-10	33,20	0,20	0,60
H-11	3,67	0,09	2,58
H-12	3,62	0,04	1,09
H-13	2,78	0,10	3,61
H-14	2,92	0,05	1,74
H-15	0,88	0,24	27,22

Πίνακας 1.2. Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία φυσικώς μολυσμένων με αφλατοξίνη δειγμάτων (NC).

Κωδικός δείγματος	Υγρασία (%) (Y)	Τυπική απόκλιση (S)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD ή CV)
NC-3	3,53	0,06	1,71
NC-4	3,75	0,43	11,48
NC-5	3,69	0,08	2,06
NC-6	3,66	0,04	0,97
NC-7	4,02	0,04	1,05

NC-8	4,97	0,09	1,76
NC-9	3,80	0,06	1,62
NC-10	4,18	0,04	0,87
NC-11	4,27	0,07	1,77
NC-12	4,82	0,06	1,25

Πίνακας 1.3. Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία τεχνητώς μολυσμένων με αφλατοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* δειγμάτων (AC).

Κωδικός δείγματος	Υγρασία (%) (Y)	Τυπική απόκλιση (S)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD ή CV)
AC-1.1	27,46	7,75	28,23
AC-1.2	30,43	1,64	5,37
AC-2.1	33,03	0,32	0,98
AC-2.2	37,02	1,24	3,34
AC-3.1	36,54	1,88	5,13
AC-3.2	37,02	0,44	1,18
AC-2/10	38,48	0,70	1,81
AC-3/12	34,29	1,71	4,98
AC-4/12	37,80	0,20	0,53
AC-5/12	35,18	1,13	3,22
AC-6/12	35,27	1,34	3,80
AC-7/12	37,84	0,81	2,13
AC-8/12	36,35	1,08	2,97
AC-9/12	36,46	0,39	1,08

Πίνακας 1.4. Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία τεχνητώς μολυσμένων με μη-αφλατοξικογόνο στέλεχος του *Aspergillus flavus* δειγμάτων (ANT).

Κωδικός δείγματος	Υγρασία (%) (Y)	Τυπική απόκλιση (S)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD ή CV)
ANT-1/7	39,07	0,59	1,51
ANT-1.1	36,00	0,50	1,39
ANT-1.2	37,00	0,20	0,54
ANT-2.1	34,40	0,30	0,87
ANT-2.2	32,16	1,20	3,75
ANT-3.1	36,30	0,99	2,72
ANT-3.2	40,22	1,67	4,15

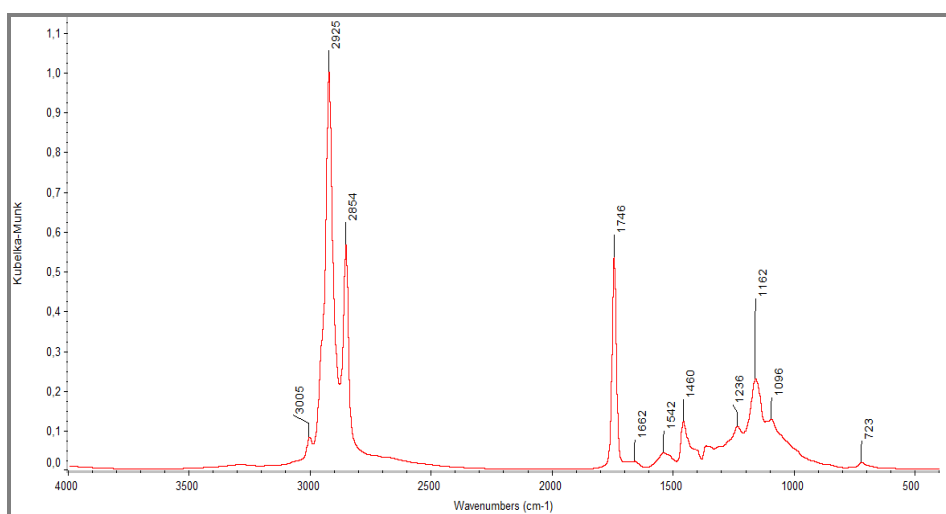
Πίνακας 1.5. Αποτελέσματα μέτρησης περιεκτικότητας σε υγρασία δειγμάτων διαλογής (OS).

Κωδικός δείγματος	Υγρασία (%) (Y)	Τυπική απόκλιση (S)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD ή CV)
OS-1	4,74	0,47	9,92
OS-2	4,15	0,06	1,49
OS-3	4,61	0,22	4,74

Γ.2 ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ MIR ΤΟΥ ΚΟΝΙΟΡΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΦΙΣΤΙΚΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ

Τα φάσματα FT-IR των κονιοποιημένων δειγμάτων φιστικιού Αιγίνης, ελήφθησαν με την τεχνική DRIFT (4000 έως 400 cm^{-1}), αποκόπηκε η κορυφή του CO_2 , εξομαλύνθηκαν (λειτουργία αυτόματης εξομάλυνσης), έγινε διόρθωση της βασικής τους γραμμής (λειτουργία αυτόματης διόρθωσης) και κανονικοποιήθηκε η κλίμακά τους με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (OMNIC 7.3) που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο. Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων με τη φασματοσκοπία υπεράυθρου, κρίνεται σκόπιμο στο σημείο αυτό, να παρατεθούν ορισμένα φασματοσκοπικά δεδομένα, καθώς και το φάσμα FTIR του πρώτου δείγματος υγιούς φιστικιού Αιγίνης H-1 (εικόνα 2.1). Στο τέλος, στο παράρτημα 1 ακολουθούν τα φάσματα και των υπόλοιπων δειγμάτων (μέσοι όροι των τριών φασμάτων τους).

Ελήφθησαν φάσματα κονιορτοποιημένου φιστικιού που προέρχονται και από αποξηραμένα φιστίκια και από αφυδατωμένα φιστίκια. Η διαφορά έγκειται στο ότι στα μεν αποξηραμένα φιστίκια έγινε λήψη φάσματος FTIR χωρίς προσδιορισμό περιεκτικότητας σε υγρασία (απευθείας λήψη φάσματος μετά την άλεση-ομογενοποίησή τους), ενώ στα αφυδατωμένα φιστίκια είχε προηγηθεί προσδιορισμός περιεκτικότητας σε υγρασία πριν τη λήψη του φάσματος FTIR. Η διαχωριστική ανάλυση, όπως φαίνεται σε επόμενη ενότητα, επιλέχθηκε να γίνει στα αφυδατωμένα φιστίκια, γιατί αυτά παρουσίαζαν καλύτερο ποσοστό διαχωρισμού. Ως εκ τούτου, παραθέτονται τα φάσματα FTIR των αφυδατωμένων κονιορτοποιημένων δειγμάτων.



Εικόνα 2.1. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-1).

Σ' ένα υπέρυθρο φάσμα διακρίνονται δύο περιοχές (Ταραντίλης, 2004):

- των χαρακτηριστικών ομάδων ($4.000-1.500\text{ cm}^{-1}$)
- των δακτυλικών αποτυπωμάτων ($1.500-600\text{ cm}^{-1}$)

Για την αναγνώριση και απόδοση των κορυφών ενός φάσματος υπάρχει η δυνατότητα αναφοράς σε πίνακες που περιέχουν τις διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες με τους αντίστοιχους κυματαριθμούς. Στην αρχή διακρίνουμε αν υπάρχουν χαρακτηριστικές ομάδες όπως C=O, O-H, C-C, C≡N, NO₂ και C-X.

A) Αν υπάρχει καρβονύλιο (C=O), που απορροφά στην περιοχή $1820-1660\text{ cm}^{-1}$, τότε μπορεί να έχουμε:

- Οξύ, όταν υπάρχει φαρδιά απορρόφηση του OH στα $3400-2400\text{ cm}^{-1}$, που επικαλύπτεται συχνά από αυτή του C-H.
- Αμίδιο, όταν υπάρχει και μέτρια απορρόφηση του NH κοντά στα 3500 cm^{-1} που μερικές φορές είναι διπλή.
- Εστέρας, όταν υπάρχει και η απορρόφηση ισχυρής έντασης του C-O στην περιοχή $1300-1100\text{ cm}^{-1}$.
- Ανυδρίτης, παρουσιάζει δύο κορυφές για το C=O στα 1810 και 1760 cm^{-1} .
- Αλδεΐδη, όταν υπάρχουν και δύο ασθενείς απορροφήσεις στα 2850 και 2750 cm^{-1} του C-H της αλδεΐδης, δεξιά των άλλων απορροφήσεων C-H.
- Κετόνη, όταν οι προηγούμενες πέντε εκδοχές έχουν αποκλεισθεί.

B) Αν δεν υπάρχει καρβονύλιο (C=O), τότε έχουμε:

- Αλκοόλη ή Φαινόλη, όταν υπάρχει έντονη και φαρδιά απορρόφηση στα $3600-3300\text{ cm}^{-1}$, που επιβεβαιώνεται από την απορρόφηση του C-O στα $1300-1100\text{ cm}^{-1}$.
- Αμίνη, όταν παρουσιάζει μέτρια απορρόφηση του N-H στα $3500-3300\text{ cm}^{-1}$.
- Αιθέρας, όταν παρουσιάζει έντονη απορρόφηση του C-O στην περιοχή $1300-1100\text{ cm}^{-1}$.

Γ) Διπλοί δεσμοί ή Αρωματικοί δακτύλιοι

- Ο διπλός δεσμός C=C παρουσιάζει μια μέτρια απορρόφηση στα 1650 cm^{-1} .
- Οι αρωματικοί δακτύλιοι παρουσιάζουν μέτριες απορροφήσεις στην περιοχή $1650\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$.

Η επιβεβαίωση των παραπάνω προέρχεται από την περιοχή των C-H που βρίσκονται αριστερά από τα 3000 cm^{-1} (τα αλειφατικά βρίσκονται δεξιά).

Δ) Τριπλοί δεσμοί

- $\text{C}\equiv\text{N}$ παρουσιάζει μια μέτρια και λεπτή απορρόφηση στα 2250 cm^{-1} .
- $\text{C}\equiv\text{C}$ παρουσιάζει μια μέτρια και λεπτή απορρόφηση στα 215 cm^{-1} .

Ε) Υδρογονάνθρακες

- Πολύ απλό φάσμα που παρουσιάζει απορρόφηση μόνο στις περιοχές 3000 , 1450 και 1375 cm^{-1} .

ΣΤ) Νιτροομάδες

- Παρουσιάζουν δύο έντονες απορροφήσεις στα $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ και στα $1390\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.

Στον πίνακα 2.1 φαίνονται οι κορυφές του φάσματος υγιούς κονιορτοποιημένου φιστικιού Αιγίνης (οι πιο χαρακτηριστικές αναγράφονται και στην εικόνα 2.1) και παραθέτονται στοιχεία για τα δεδομένα στα οποία δύναται να αντιστοιχούν (Kaya-Celiker et al., 2015· Karoui et al., 2010· Socrates, 2001· Kaya-Celikera et al., 2011).

Πίνακας 2.1. Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις (Mid IR)
του υγιούς κονιορτοποιήμενου φιστικιού Αιγίνης.

Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Απόδοση
Ευρεία κορυφή στην περιοχή 3500-3200	Δόνηση τάσης του –OH και τάση C-N
3005	Αρωματικά C-H (δόνηση τάσης) και η τάση των =CH ₂
2925	Μη αρωματικά C-H (ασύμμετρη δόνηση τάσης) (συσχετίζονται με τα λιπίδια)
2854	Μη αρωματικά C-H (συμμετρική δόνηση τάσης) (συσχετίζονται με τα λιπίδια)
1746	C=O (δόνηση τάσης, εστέρες), δ-λακτόνες (αφλατοξίνες)
1662	Τάση του C=O του πεπτιδικού δεσμού (amide I) Στην ίδια περιοχή απορροφούν: α) οι άκυκλοι C=C (δόνηση τάσης), β) Το COO ⁻ (ασύμμετρη τάση)
1542	Τάση του C-N συνδυασμένη με την κάμψη του N-H του πεπτιδικού δεσμού (amide II). Στην ίδια περιοχή εμφανίζονται και: α) Η παραμόρφωση των αρωματικών δακτυλίων, β) Τάση των κυκλικών C=C
1460	Τάση των C=C (ολεφίνες – ακόρεστοι υδρογονάνθρακες), Τάση C-N του πεπτιδικού δεσμού (amide III) Κάμψη του –CH ₂ -
1364	Συμμετρική κάμψη του CH ₃ (συσχετίζεται με τις πρωτεΐνες) Συμμετρική τάση του COO ⁻ , δόνηση τάσης C-O (εστέρες, σάκχαρα),
1236	Δόνηση τάσης C-O (σάκχαρα, αιθέρες), δόνηση τάσης C-N, ασύμμετρη τάση του P=O της PO ₂ - (νουκλεϊκά οξέα), δόνηση τάσης C-O (λακτόνες, σάκχαρα)
1162	Κυρίως C-O (αντισυμμετρική δόνηση τάσης) (σάκχαρα)
1096	Συμμετρική τάση του P=O της PO ₂ - (νουκλεϊκά οξέα), δόνηση του σκελετού C-O-C (σάκχαρα)
723	Τάση cis –CH=CH-, αιώρηση του C-H του τμήματος – (CH ₂) _n -

Τα φιστίκια είναι πολύπλοκες δομές, με τα κύρια συστατικά τους να είναι το νερό, οι πρωτεΐνες, τα λίπη και υδατάνθρακες. Οι πρωτεΐνες εμφανίζονται ως ομάδες αμιδίου I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) και αμιδίου II ($1565-1520\text{ cm}^{-1}$). Στην παρούσα μελέτη οι κορυφές που σχετίζονται με την πρωτεΐνη είναι στα 1662 cm^{-1} και 1746 cm^{-1} για το αμίδιο I και στα 1542 cm^{-1} για το αμίδιο II. Η πρώτη αντιπροσωπεύει τη δόνηση τάσης του καρβονυλίου (αμίδιο I) και η δεύτερη την τάση του C-N συνδυασμένη με την κάμψη του N-H του πεπτιδικού δεσμού (αμίδιο II). Μια άλλη κορυφή απορρόφησης που σχετίζεται με την πρωτεΐνη, συνήθως, παρατηρείται γύρω 3290 cm^{-1} ως ευρεία κορυφή (δόνηση τάσης του C-N), αλλά η περιοχή αυτή δε συμπεριλαμβάνεται στην ανάλυση παλινδρόμησης.

Μαζί με τις κορυφές της πρωτεΐνης, τα φάσματα FTIR των μολυσμένων με αφλατοξίνη και υγιών δειγμάτων έδειξαν, επίσης, μια απότομη γραμμική αύξηση στις κορυφές που σχετίζονται με το λίπος, υποδηλώνοντας υδρόλυση των λιπιδίων. Τα φιστίκια αποτελούνται από μικτά γλυκερίδια και περιέχουν αρκετά λιπαρά οξέα, που αντιπροσωπεύουν μεγάλο ποσοστό της ακόρεστης δομής (περίπου 80% ελαϊκό και λινελαϊκό οξύ). Αυτή η δομή είναι γνωστό ότι ενισχύει το ρυθμό ανάπτυξης του *Aspergillus spp.* Εκτός από τον ρυθμό ανάπτυξης, το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα φιστίκια επηρεάζει το ποσό της μυκοτοξίνης που παράγεται.

Το ύψος της κορυφής του δεσμού του εστέρα λιπαρού οξέος (-C=O), στα 1746 cm^{-1} , μειώθηκε λόγω κατανάλωσης των λιπιδίων. Ταυτόχρονα, μπορεί να εμφανιστεί κορυφή του καρβονυλίου εστέρα (-C=O δόνηση τάσης του οξέος), που αποτελεί προϊόν διάσπασης των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids - FFA), κοντά στα 1710 cm^{-1} . Μία άλλη κορυφή απορρόφησης που σχετίζεται με το λίπος εκτείνεται στα 1160 cm^{-1} και μειώνεται καθώς αυξάνεται ο μύκητας (αντισυμμετρική δόνηση τάσης C-O).

Άλλες κορυφές που σχετίζονται με το λίπος, στα 1460 cm^{-1} και 1364 cm^{-1} , αντιπροσωπεύουν δονήσεις κάμψης του μεθυλενίου και συμμετρική δόνηση κάμψης των ομάδων μεθυλίου των λιπαρών οξέων. Το ύψος της κορυφής στα 1236 cm^{-1} σχετίζεται με τη δόνηση τάσης C-O των εστέρων. Οι κορυφές στα 1118 cm^{-1} και 1095 cm^{-1} οφείλονται στην ομάδα C-O εστέρων τριγλυκεριδίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του επιπέδου της αποικοδόμησης των λιπιδίων ή την ανάπτυξη των μυκήτων (Kaya-Celiker et al., 2015).

Οι κορυφές στα 3005 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} και 2854 cm^{-1} σχετίζονται με τις δονήσεις τάσεις των αρωματικών και μη αρωματικών C-H (Karoui et al., 2010). Ιδιαίτερα οι κορυφές 2925 cm^{-1} και 2854 cm^{-1} σχετίζονται με τα λιπαρά συστατικά.

Οι ημικυτταρίνες απορροφούν στα 1732 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} . Η κυτταρίνη στα $1170\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$, 1050 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} . Η λυγνίνη στα $\sim 1510\text{ cm}^{-1}$. Οι πηκτίνες στα $1680\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, 1260 cm^{-1} , 955 cm^{-1} (Karoui et al., 2010).

Φασματική περιοχή των $3028\text{--}2752\text{ cm}^{-1}$ αποδόθηκε στη τάση του cis διπλού δεσμού (= C-H) με κορυφή στα 3007 cm^{-1} , στην ασύμμετρη (2922 cm^{-1}) και συμμετρική (2853 cm^{-1}) τάση της μεθυλενο-ομάδας (-CH₂), και η περιοχή $1800\text{--}1707\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στην τάση του καρβονυλίου, ιδιαίτερα δε του εστέρα με ξεχωριστή κορυφή στα 1744 cm^{-1} . Στις ίδιες φασματικές περιοχές παρατηρούνται η τάση των αρωματικών C-H, του μεθυλικού C-H και των κετονικών καρβονυλίων των μορίων αφλατοξίνης. Η περιοχή $1584\text{--}1424\text{ cm}^{-1}$ περιλαμβάνει τις σκελετικές δονήσεις που αφορούν την τάση του C = C (δακτύλιος), C-C (δακτύλιος) και την κάμψη των C-C, C-H (δακτύλιος) και -C-H των αφλατοξινών. Η κορυφή στα 1538 cm^{-1} υποδηλώνει την ύπαρξη της ομάδας του αμιδίου II της πρωτεϊνικής δομής της πάστας φιστικιού και άλλες ισχυρές ζώνες απορρόφησης εμφανίζονται στα 1464 cm^{-1} αντιπροσωπεύοντας την κάμψη των -C-H των -CH₂- και -CH₃ αλειφατικών ομάδων. Η τελευταία περιοχή ($1408\text{--}1127\text{ cm}^{-1}$), επίσης, καλύπτει σημαντικούς τρόπους δόνησης για τις αφλατοξίνες, όπως -C-H (CH₃), C = C (δακτύλιος), -C-H κάμψη και C-O, = C-H, C = C (δακτύλιος) τέντωμα. Ίδια περιοχή παρουσιάζει έντονες κορυφές στα 1377 cm^{-1} (C-H (CH₃)), 1236 και 1159 cm^{-1} (-C-O, -CH₂-). (Kaya-Celikera et al., 2011).

Γ.3 ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ

Σε μελέτη που έγινε στον αραβόσιτο, οι αφλατοξίνες παρουσίασαν χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης σε μήκη κύματος (Kyung-Min et al., 2015· Pavao, Soares Neto, Ferreira Neto, Leao, 1995):

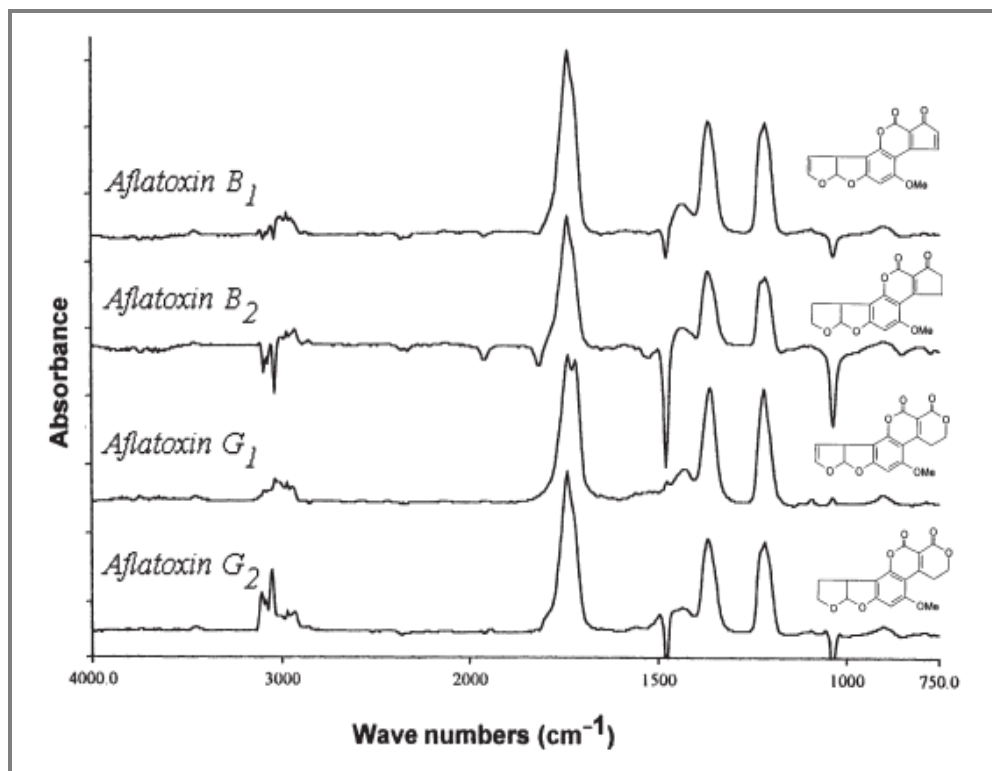
- 1037 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη συμμετρική δόνηση του $\nu(\text{C-O-C})$ του φαινυλίου
- 1200 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση κάμψης $-\text{CH}$ του φαινυλίου
- 1268 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης C-C
- 1365 cm^{-1} που σχετίζεται με το $-\text{CH}_3$ κοντά σε εποξικό δακτύλιο
- 1623 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του βενζολικού δακτυλίου
- 1690 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση του διπλού δεσμού $\text{C}(8) - \text{C}(9)$
- $1744\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ που αντιστοιχεί στη δόνηση του $\text{C} = \text{O}$
- $3004\text{-}2969\text{ cm}^{-1}$ για CH_2 , αρωματικά $=\text{CH}$, $-\text{C-H}$, $\text{C} = \text{C}$ και φαινύλια

Το φάσμα IR και οι δομές των αφλατοξινών B_1 , B_2 , G_1 και G_2 παρουσιάζονται στην εικόνα 3.1, ενώ στην εικόνα 3.2 παρουσιάζεται μεμονωμένα το φάσμα IR της αφλατοξίνης B_1 .

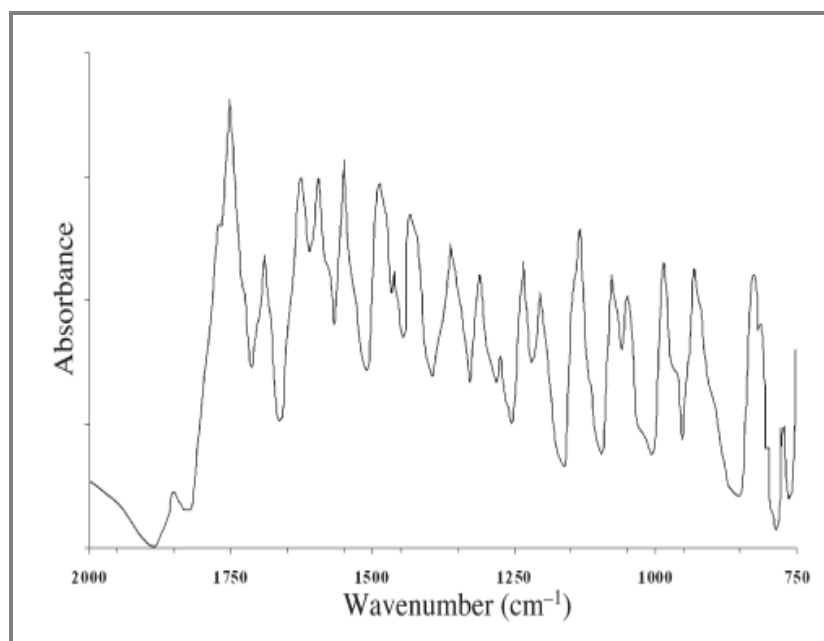
Στην παρούσα μελέτη, έπειτα από λήψη φασμάτων FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (εικόνα 3.3) και του ίδιου δείγματος έπειτα από μόλυνση με αφλατοξίνη (εικόνα 3.4), οι αφλατοξίνες παρουσίασαν χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης στα παρακάτω μήκη κύματος:

- 1100 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη συμμετρική δόνηση του $\nu(\text{C-O-C})$ του φαινυλίου
- 1170 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση κάμψης $-\text{CH}$ του φαινυλίου
- 1240 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης C-C
- 1365 cm^{-1} που σχετίζεται με το $-\text{CH}_3$ κοντά σε εποξικό δακτύλιο
- 1623 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του βενζολικού δακτυλίου
- 1690 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση του διπλού δεσμού $\text{C}(8) - \text{C}(9)$

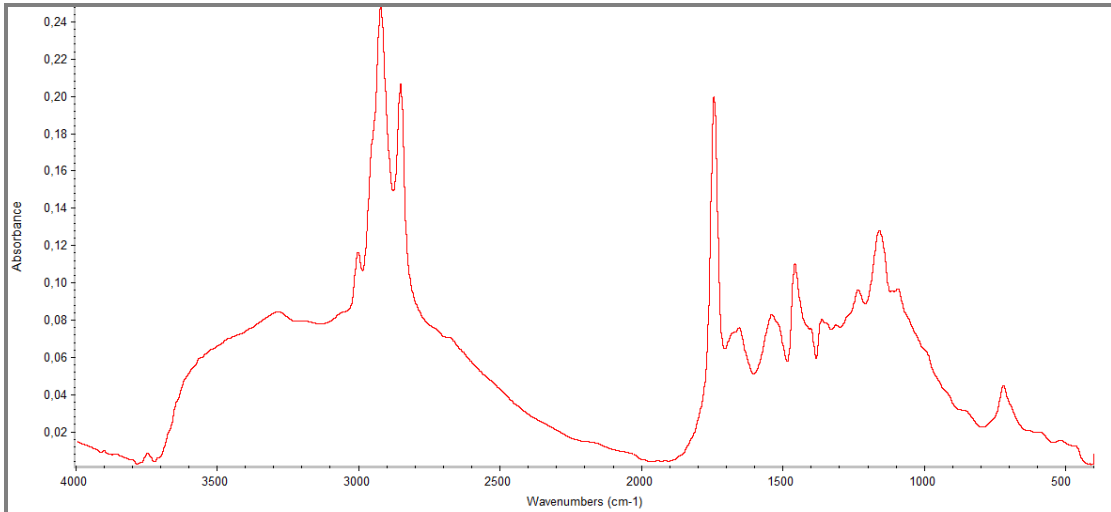
- 1750 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση του $\text{C}=\text{O}$
- $3016\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ για CH_2 , αρωματικά $=\text{CH}$, $-\text{C}-\text{H}$, $\text{C}=\text{C}$ και φαινόλια



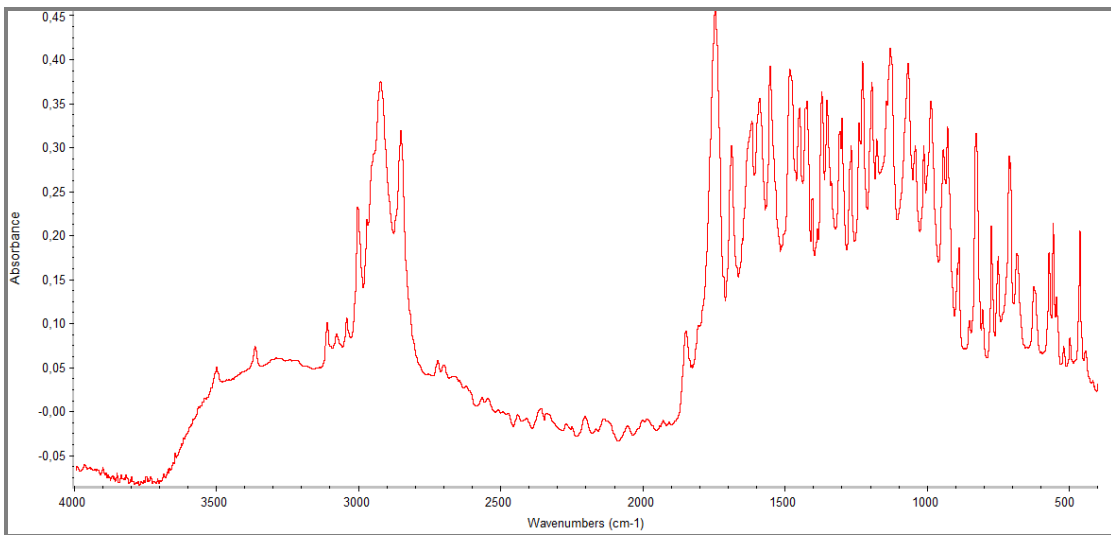
Εικόνα 3.1. Φάσμα IR και δομές των αφλατοξινών B₁, B₂, G₁ και G₂
(Mirghani, Che Man, Jinap, Baharin, Bakar, 2001).



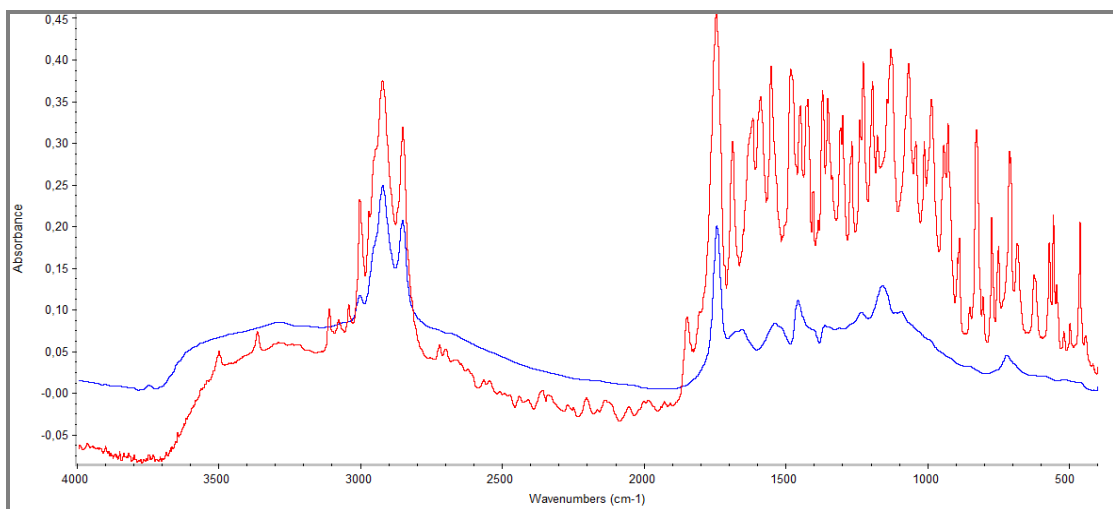
Εικόνα 3.2. Φάσμα IR της αφλατοξίνης B₁.



Εικόνα 3.3. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-3).



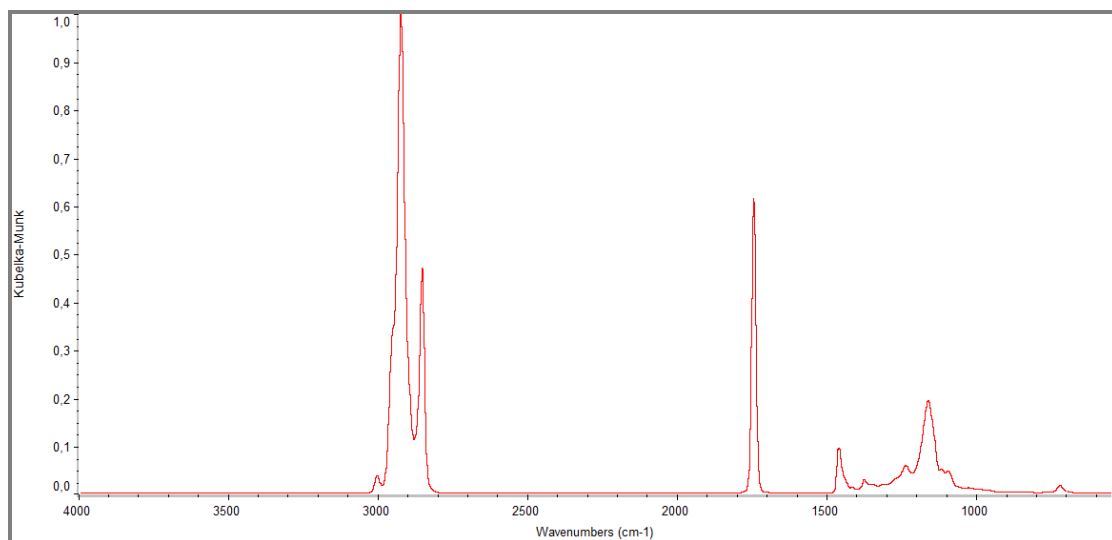
Εικόνα 3.4. Φάσμα FTIR φιστικιού Αιγίνης H-3 εμβολιασμένο με αφλατοξίνη.



Εικόνα 3.5. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης H-3 (μπλε γραμμή) και ίδιου δείγματος μολυσμένο με αφλατοξίνη (κόκκινη γραμμή).

Γ.4 ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ MIR ΤΟΥ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ

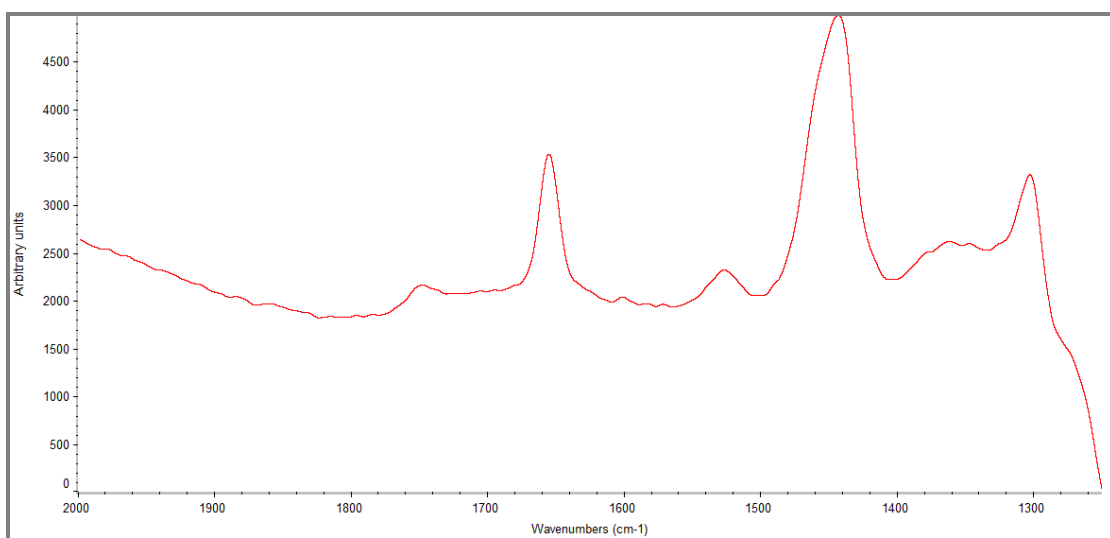
Παρατίθεται το φάσμα FTIR (με την τεχνική ZnSe) του πρώτου δείγματος υγιούς φιστικέλαιου Αιγίνης (εικόνα 4.1). Στο τέλος, στο παράρτημα 2 ακολουθούν τα φάσματα και των υπόλοιπων δειγμάτων.



Εικόνα 4.1. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-1).

Γ.5 ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ RAMAN ΤΟΥ ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ

Παρατίθεται το φάσμα Raman του πρώτου δείγματος υγιούς φιστικέλαιου Αιγίνης (εικόνα 5.1). Στο τέλος, στο παράρτημα 3 ακολουθούν τα φάσματα και των υπόλοιπων δειγμάτων. Η περιοχή που εξετάζουμε εκτείνεται από τα 1250 cm^{-1} έως τα 2000 cm^{-1} .



Εικόνα 5.1. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-1).

Γ.6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

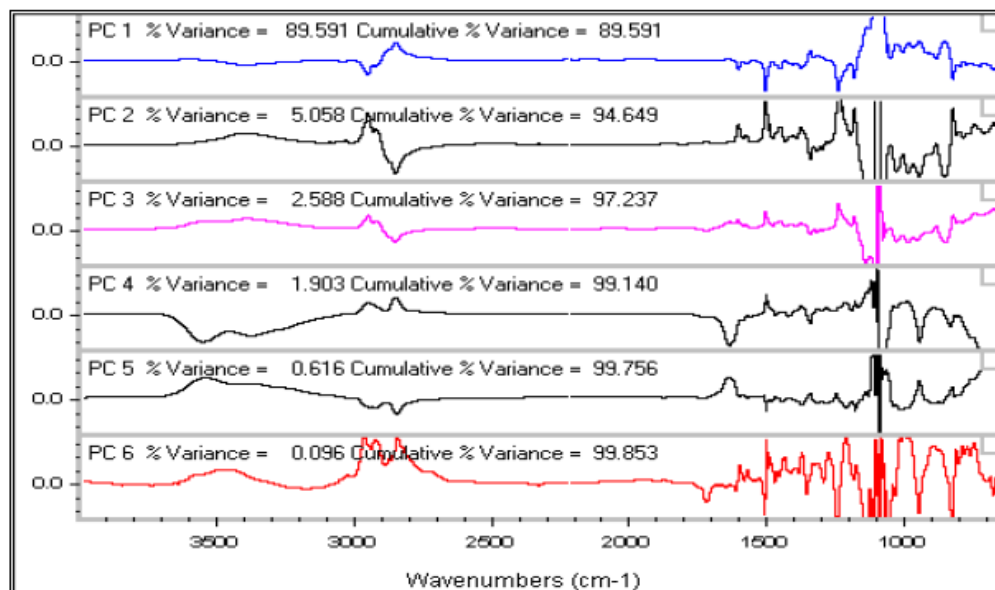
Γ.6.1 Γενικά στοιχεία για το φάσμα κύριας συνιστώσας (Principal Component Spectra)

Κάθε μέθοδος διαχωριστικής ανάλυσης παράγει φάσματα κύριων συνιστωσών ώστε να περιγράψει το 99,9% της φασματικής μεταβολής σε όλα τα πρότυπα. Αυτά τα φάσματα βοηθούν στο να προσδιοριστεί ο αριθμός των κύριων συνιστωσών που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση. Το λογισμικό TQ Analyst δημιουργεί τουλάχιστον ένα φάσμα κύριας συνιστώσας για κάθε συστατικό ή κλάση που προσδιορίζονται σε μία μέθοδο αν είναι περισσότερα από 10, ή τουλάχιστον 10 φάσματα κύριων συνιστωσών αν οι προσδιοριζόμενες κλάσεις είναι λιγότερες από 10.

Το φάσμα κύριας συνιστώσας δείχνει πώς οι φασματικές πληροφορίες σε ένα σύνολο φασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση της μεθόδου, αντιπροσωπεύονται από τις κύριες συνιστώσες και τι ποσοστό της φασματικής διακύμανσης κάθε συνιστώσα περιγράφει.

Το φάσμα της κύριας συνιστώσας είναι το ορθογώνιο φάσμα (φάσμα που αποτελεί μια ανεξάρτητη πηγή διακύμανσης σε ένα σύνολο δεδομένων) που αντιπροσωπεύει το ποσοστό της μεταβλητότητας και περιγράφεται από μία συνιστώσα που μετράται σε ολόκληρο το φασματικό εύρος των προτύπων.

Στο παράδειγμα που ακολουθεί εξηγείται πώς μπορεί να ερμηνευθεί ένα φάσμα κύριας συνιστώσας σε μία μέθοδο διαχωριστικής ανάλυσης. Στην εικόνα 6.1 δίνονται τα φάσματα για τις πρώτες έξι κύριες συνιστώσες που βρέθηκαν στα δεδομένα του παραδείγματος διαχωριστικής ανάλυσης που δίνεται (Κουβουτσάκης, 2013).



Εικόνα 6.1. Φάσματα κύριων συνιστωσών.

Οι πηγές της διακύμανσης στα φάσματα βαθμονόμησης παράγουν διακριτά χαρακτηριστικά στα φάσματα των κύριων συνιστωσών. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να εμφανίζονται σε μια φασματική κορυφή ή σαν κορυφή παραγώγου. Ένα θορυβώδες ή ιδιαίτερων χαρακτηριστικών φάσμα κύριας συνιστώσας δείχνει ότι η αντίστοιχη (και κάθε επόμενη με ανάλογα χαρακτηριστικά) κύρια συνιστώσα συμβάλλει ελάχιστα στις πληροφορίες του μοντέλου βαθμονόμησης.

Οι περισσότερες πληροφορίες στα φάσματα των κύριων συνιστωσών που φαίνονται στην παραπάνω εικόνα αποδίδονται από απορροφούσες ζώνες κοντά στα 1100 cm^{-1} . Τα φάσματα των κύριων συνιστωσών υπολογίζονται από όλη τη φασματική κλίμακα των φασμάτων βαθμονόμησης. Επομένως, τυχόν ολοκληρωτικά απορροφούσες ζώνες που υπάρχουν στα φάσματα βαθμονόμησης θα καταδεικνύονται, επίσης, επάνω στο φάσμα των κύριων συνιστωσών, καθιστώντας τα δεδομένα δύσκολα στην ερμηνεία.

Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η κύρια συνιστώσα περιγράφει το 99% της συνολικής φασματικής μεταβολής («Cumulative Variance% στο φάσμα της κύριας συνιστώσας 4»). Τα φάσματα των κύριων συνιστωσών 5 και 6 περιέχουν μια μικρή ποσότητα φασματικής πληροφορίας για τις φασματικές περιοχές κοντά στα 2900 cm^{-1} και $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (Κουβουτσάκης, 2013).

Γ.6.2 Απόσταση δείγματος από ένα πρότυπο

Τα αποτελέσματα μίας μεθόδου εκφράζονται σε απόσταση Mahalanobis της κλάσης του δείγματος από μία κλάση της μεθόδου. Η απόσταση Mahalanobis εκφράζεται από έναν αλγόριθμο και υπολογίζει την απόσταση ενός δείγματος από το μέσο όρο (κέντρο κάθε κλάσης) ενός συνόλου προτύπων κάθε κλάσης. Για κάθε μία κλάση, δηλαδή, υπάρχει ένα φάσμα που προκύπτει από το μέσο όρο των φασμάτων των πρότυπων δειγμάτων (Kaya-Celiker et al., 2015). Η απόσταση Mahalanobis δίδεται από τη σχέση:

$$D^2 = (X - X_{avg})^T S^{-1} (X - X_{avg})$$

Όπου: D = η απόσταση (ως ποσοστό)

X = διανυσματικά δεδομένα (n x 1)

X_{avg} = μέσος όρος διανυσματικών δεδομένων (n x 1)

S = μήτρα συνδιακύμανσης (n x n)

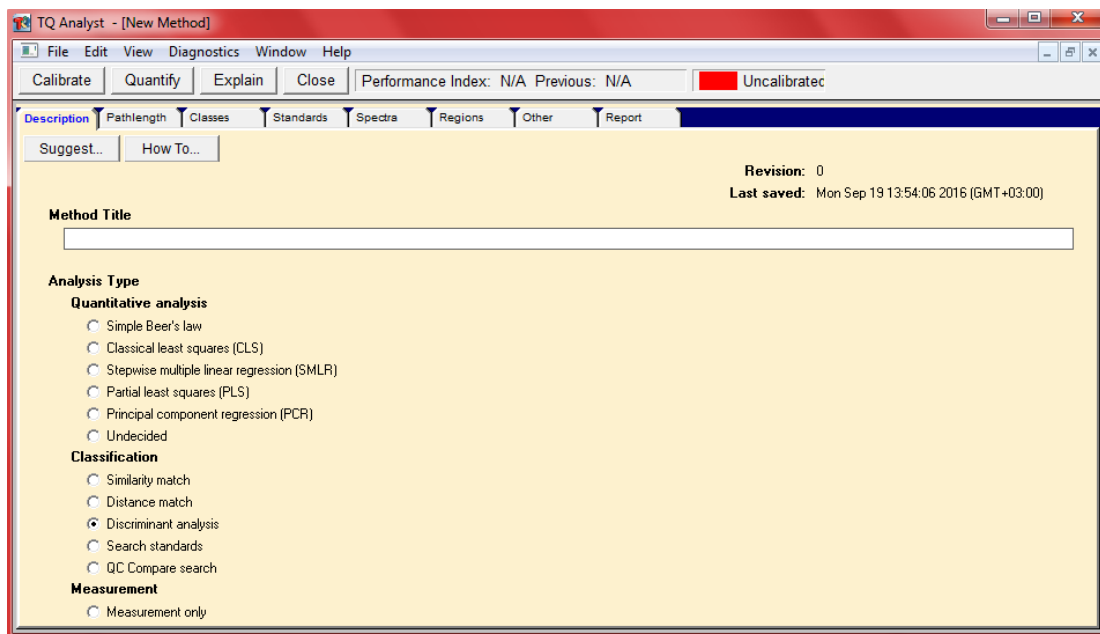
(X - X_{avg})^T = δηλώνει τη μεταβολή του (X - X_{avg})

n = ο αριθμός των δεδομένων του X

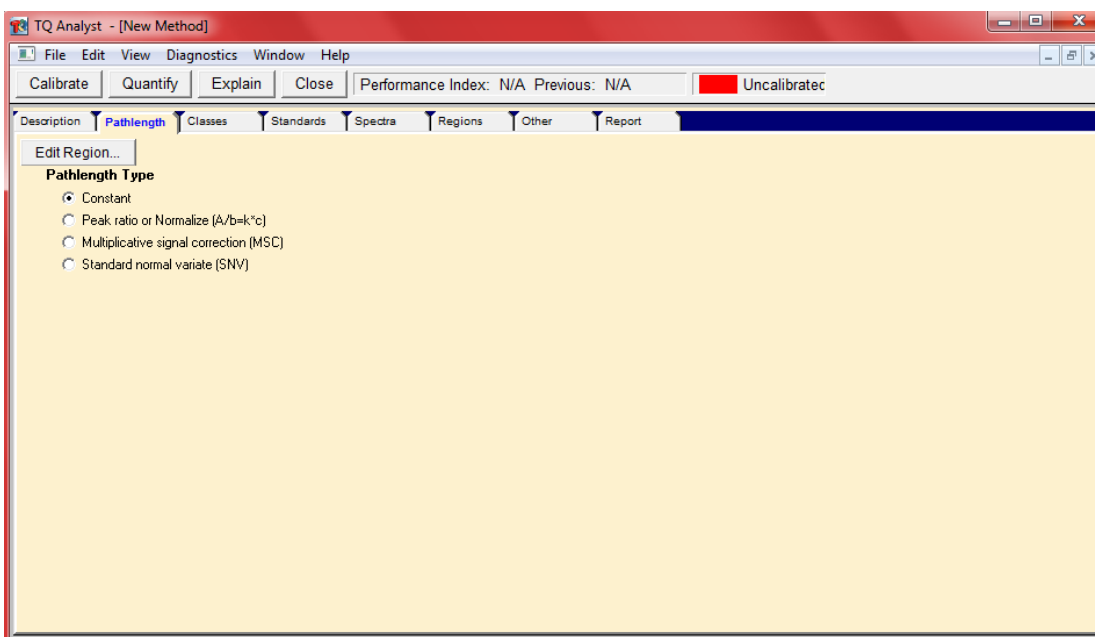
Το λογισμικό TQ Analyst κατατάσσει ένα άγνωστο δείγμα στην κλάση με τη μικρότερη απόσταση Mahalanobis από αυτό.

Γ.6.3 Εισαγωγή στοιχείων για στατιστική επεξεργασία

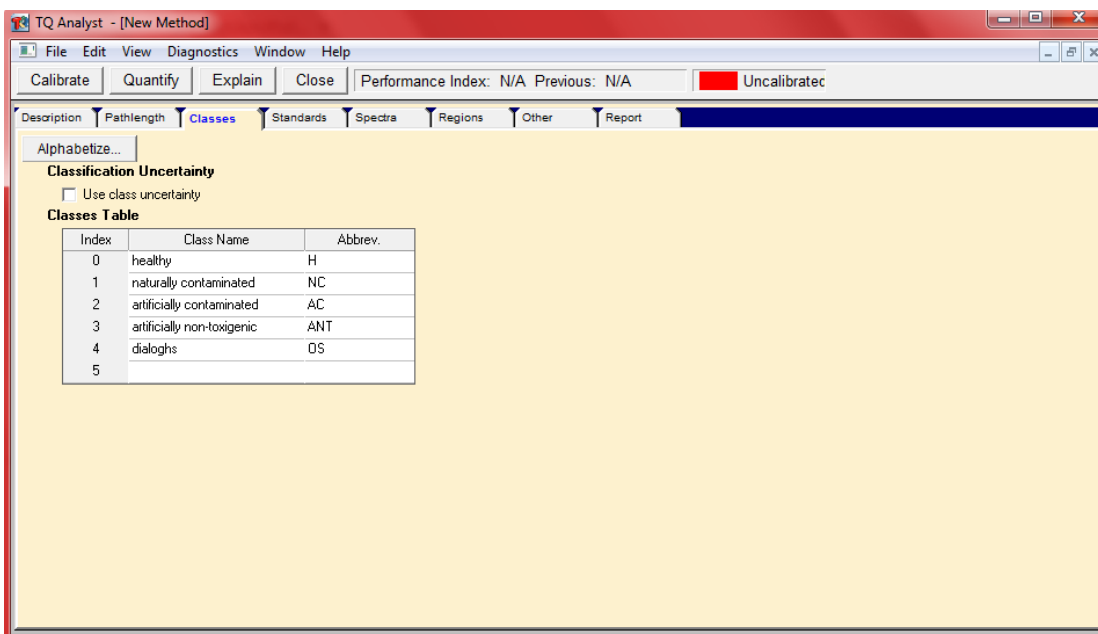
A) Ανοίγοντας το λογισμικό TQ Analyst αρχικά επιλέγουμε στο Description το Discriminant Analysis:



Β) Στη συνέχεια στο Pathlength επιλέγουμε constant αφού είναι επιθυμητό το μήκος της διαδρομής να είναι σταθερό:



Γ) Στην παράμετρο Classes ονομάζουμε τις τάξεις των δειγμάτων:

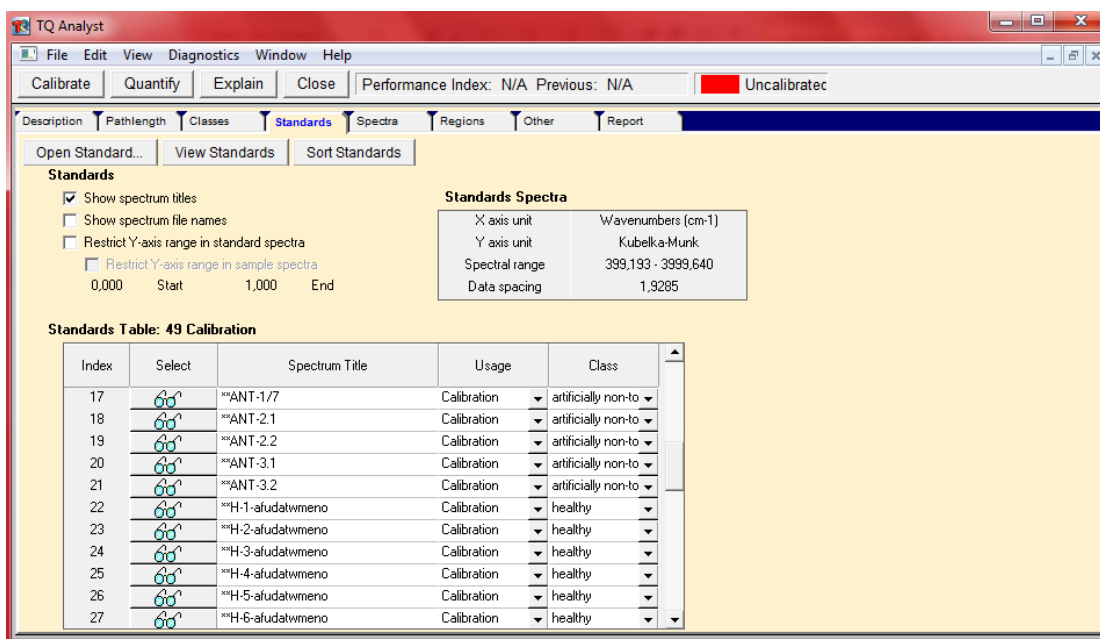


Τα δείγματα χωρίστηκαν σε συνολικά 4 κλάσεις που φαίνονται στον πίνακα 6.1:

Πίνακας 6.1. Κλάσεις δειγμάτων πρώτης μεθόδου διαχωριστικής ανάλυσης.

Index	Class Name	Abbrev.
0	healthy	H
1	naturally contaminated	NC
2	artificially contaminated	AC
3	artificially non-toxicogenic	ANT
4	dialoghs	OS

Δ) Στην παράμετρο Standards επιλέγουμε την εντολή Open Standard και εισάγουμε τα φάσματα των δειγμάτων. Στον πίνακα που εμφανίζεται επιλέγουμε την τάξη του κάθε δείγματος:



Στον πίνακα 6.2 φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων που έγινε σύμφωνα με τις κλάσεις που αναπτύχθηκαν:

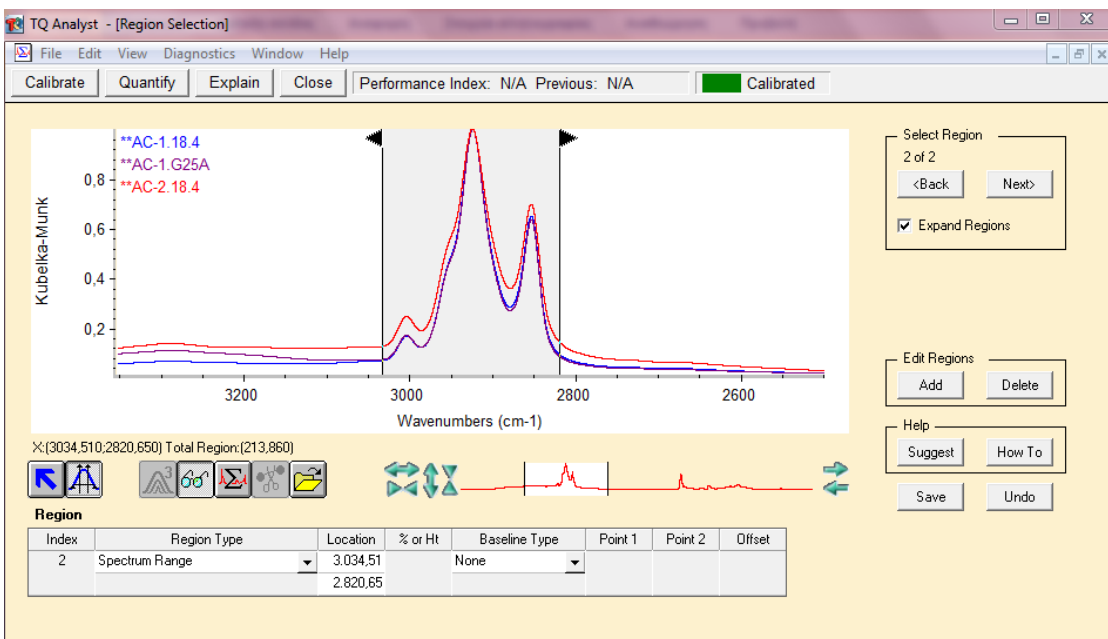
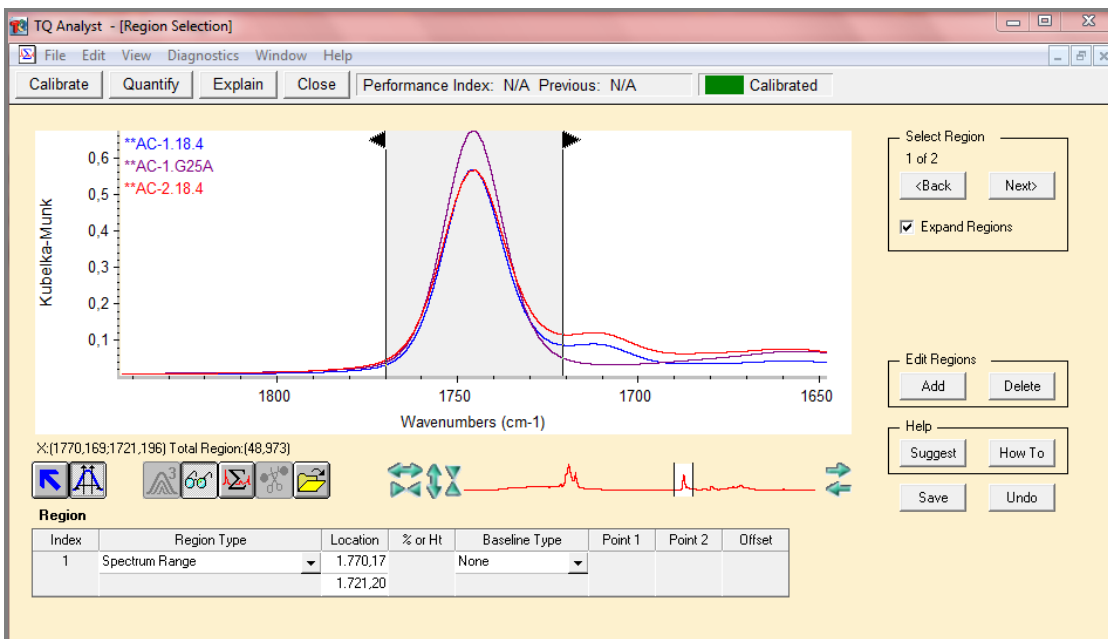
Πίνακας 6.2. Ταξινόμηση δειγμάτων στις χωριζόμενες κλάσεις της μεθόδου διαχωριστικής ανάλυσης.

Index	Spectrum Title	Usage	Class
1	**AC-1.18.4	Calibration	artificially contaminated
2	**AC-1.G25A	Calibration	artificially contaminated
3	**AC-2.18.4	Calibration	artificially contaminated
4	**AC-2.G25A	Calibration	artificially contaminated
5	**AC-2/10	Calibration	artificially contaminated
6	**AC-3.18.4	Calibration	artificially contaminated
7	**AC-3.G25A	Calibration	artificially contaminated
8	**AC-3/12	Calibration	artificially contaminated
9	**AC-4/12	Calibration	artificially contaminated
10	**AC-5/12	Calibration	artificially contaminated
11	**AC-6/12	Calibration	artificially contaminated
12	**AC-7/12	Calibration	artificially contaminated
13	**AC-8/12	Calibration	artificially contaminated
14	**AC-9/12	Calibration	artificially contaminated
15	**ANT-1.1	Calibration	artificially non-toxicogenic
16	**ANT-1.2	Calibration	artificially non-toxicogenic
17	**ANT-1/7	Calibration	artificially non-toxicogenic
18	**ANT-2.1	Calibration	artificially non-toxicogenic
19	**ANT-2.2	Calibration	artificially non-toxicogenic
20	**ANT-3.1	Calibration	artificially non-toxicogenic
21	**ANT-3.2	Calibration	artificially non-toxicogenic
22	**H-1-afudatwmeno	Calibration	healthy

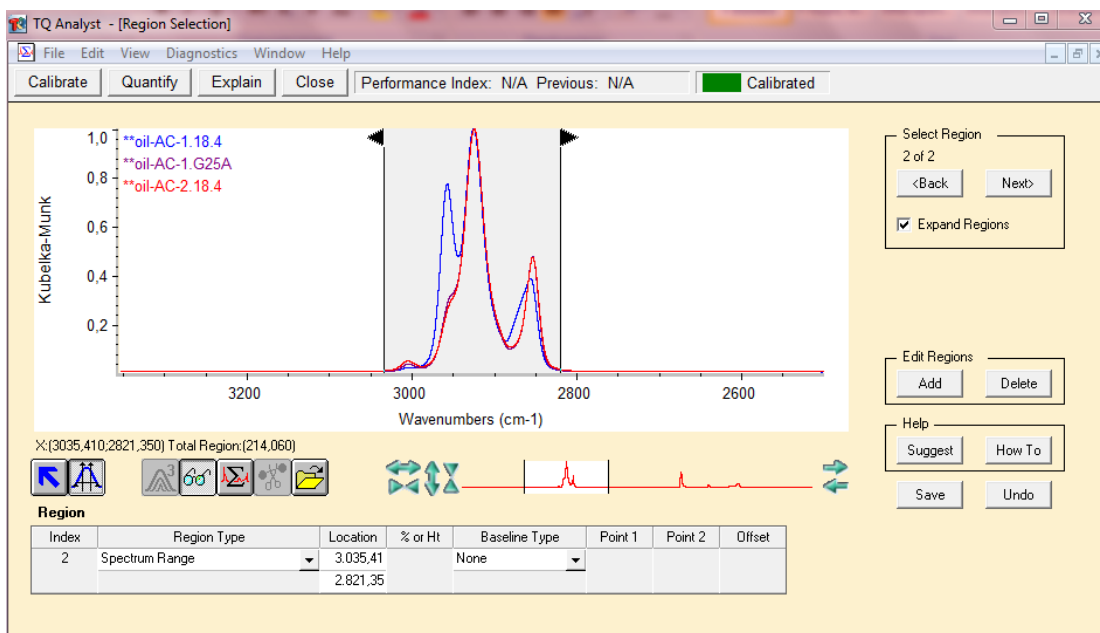
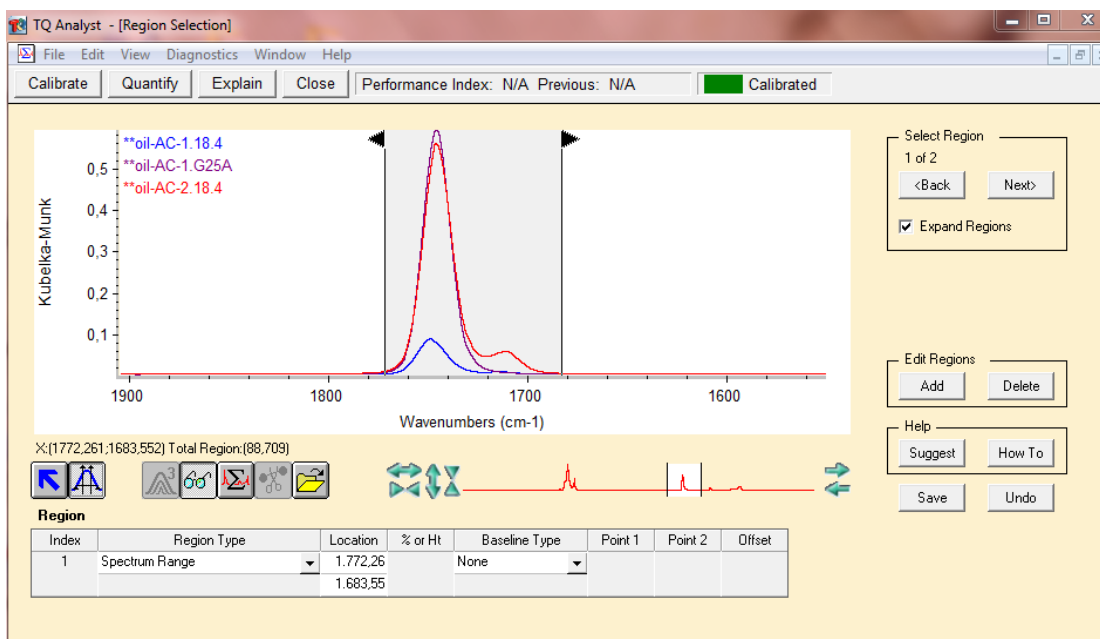
23	**H-2-afudatwmeno	Calibration	healthy
24	**H-3-afudatwmeno	Calibration	healthy
25	**H-4-afudatwmeno	Calibration	healthy
26	**H-5-afudatwmeno	Calibration	healthy
27	**H-6-afudatwmeno	Calibration	healthy
28	**H-7-afudatwmeno	Calibration	healthy
29	**H-8-afudatwmeno	Calibration	healthy
30	**H-9-afudatwmeno	Calibration	healthy
31	**H-10-afudatwmeno	Calibration	healthy
32	**H-11-afudatwmeno	Calibration	healthy
33	**H-12-afudatwmeno	Calibration	healthy
34	**H-13-afudatwmeno	Calibration	healthy
35	**H-14-afudatwmeno	Calibration	healthy
36	**H-15-afudatwmeno	Calibration	healthy
37	**NC-3-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
38	**NC-4-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
39	**NC-5-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
40	**NC-6-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
41	**NC-7-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
42	**NC-8-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
43	**NC-9-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
44	**NC-10-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
45	**NC-11-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
46	**NC-12-afudatwmeno	Calibration	naturally contaminated
47	**OS-1	Calibration	dialoghs
48	**OS-2	Calibration	dialoghs
49	**OS-3	Calibration	dialoghs

Ε) Στην παράμετρο Regions αν επιλέξουμε την εντολή Edit Region διαλέγουμε την περιοχή του φάσματος βάσει της οποίας θα γίνει η διαχωριστική ανάλυση. Στον πίνακα με τις περιοχές που έχουμε επιλέξει μπορούμε να ορίσουμε αν θα χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο η τρέχουσα φασματική περιοχή (spectrum range), η πρώτη ή η δεύτερη παράγωγος αυτής.

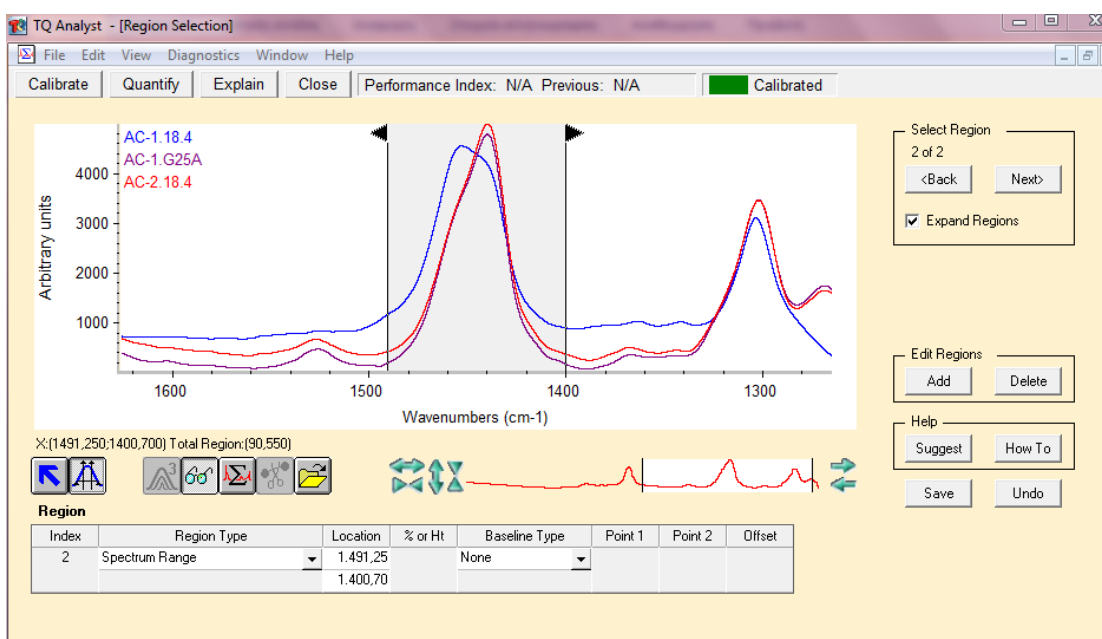
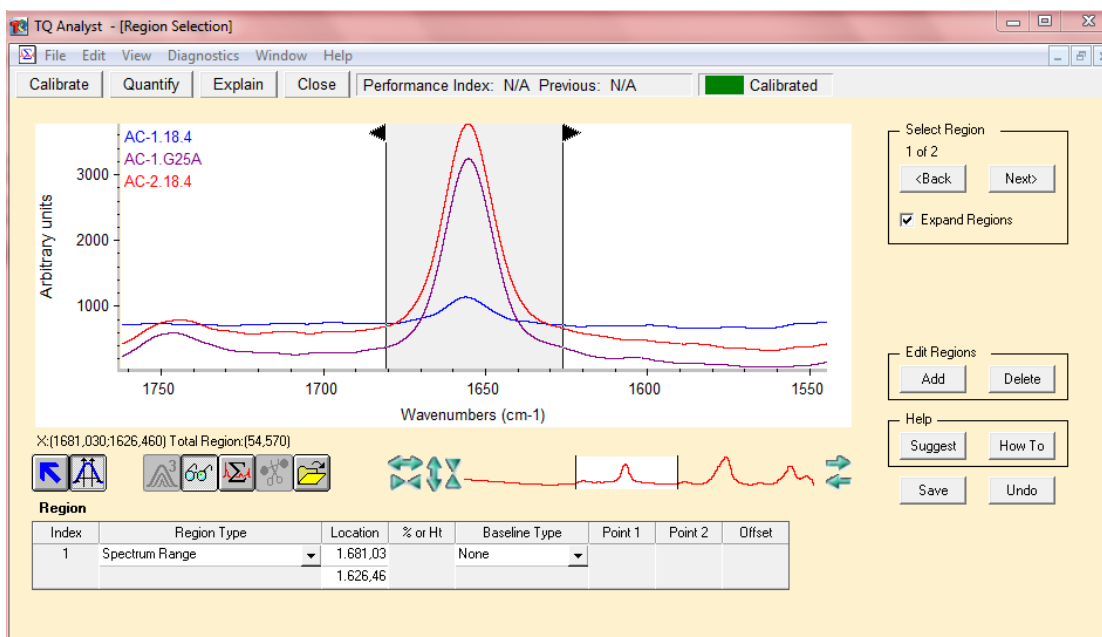
- Για την ανάλυση των κονιορτοποιημένων δειγμάτων φιστικιού Αιγίνης, επιλέχθηκαν δύο περιοχές του εύρους του φάσματος (spectrum range), 1770,17-1721,20 cm^{-1} και 3034,51-2820,65 cm^{-1} , βάσει των οποίων θα γίνει η διαχωριστική ανάλυση.



- Για την ανάλυση του φυσικέλαιου Αιγίνης με FTIR, επιλέχθηκαν δύο περιοχές του εύρους του φάσματος (spectrum range), $1772,26-1683,55 \text{ cm}^{-1}$ και $3035,41-2821,35 \text{ cm}^{-1}$, βάσει των οποίων θα γίνει η διαχωριστική ανάλυση.

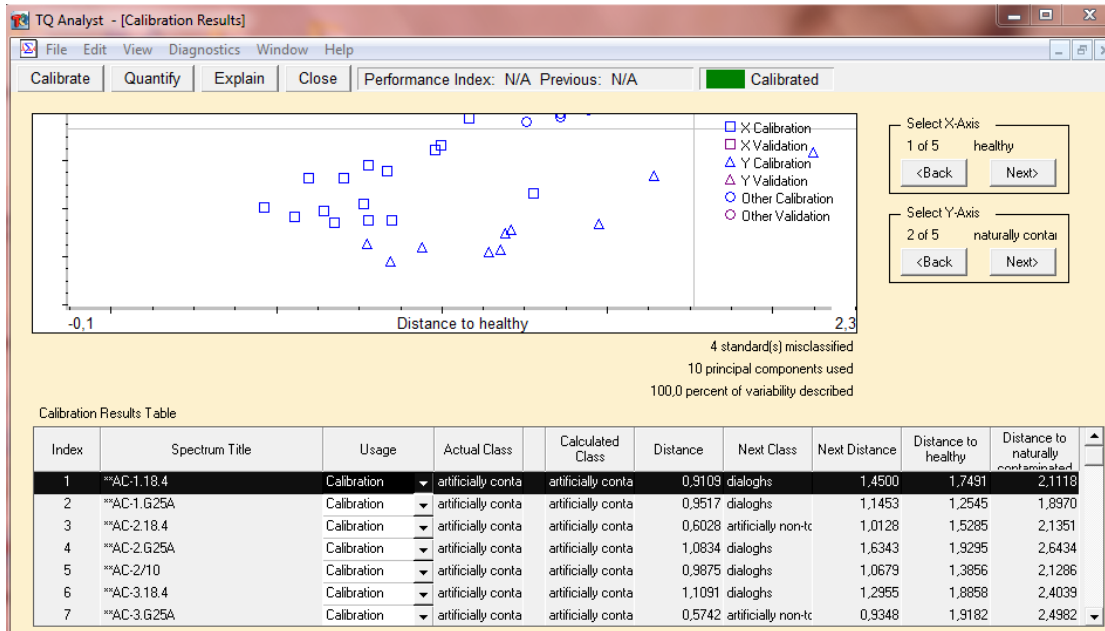


- Για την ανάλυση του φυσικέλαιου Αιγίνης με Raman, επιλέχθηκαν δύο περιοχές του εύρους του φάσματος (spectrum range), $1681,03-1626,46 \text{ cm}^{-1}$ και $1491,25-1400,70 \text{ cm}^{-1}$, βάσει των οποίων θα γίνει η διαχωριστική ανάλυση.

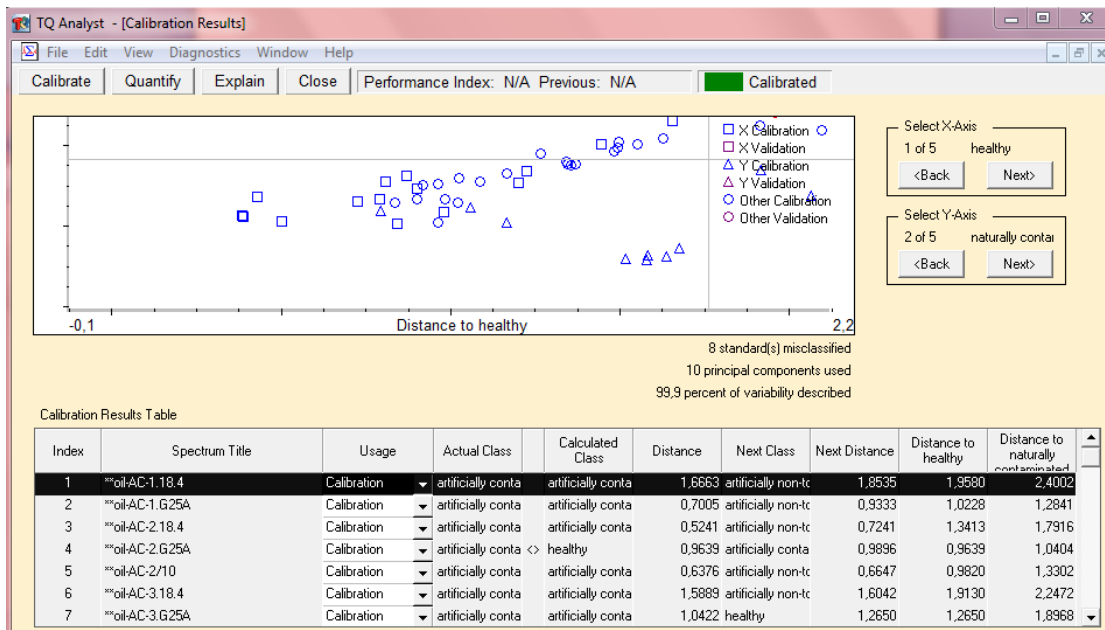


ΣΤ) Επιλέγοντας την εντολή Calibrate πραγματοποιείται η βαθμονόμηση της μεθόδου και διαπιστώνεται κατά πόσο η διαχωριστική ανάλυση λειτουργεί για τις παραμέτρους που έχουν ορισθεί:

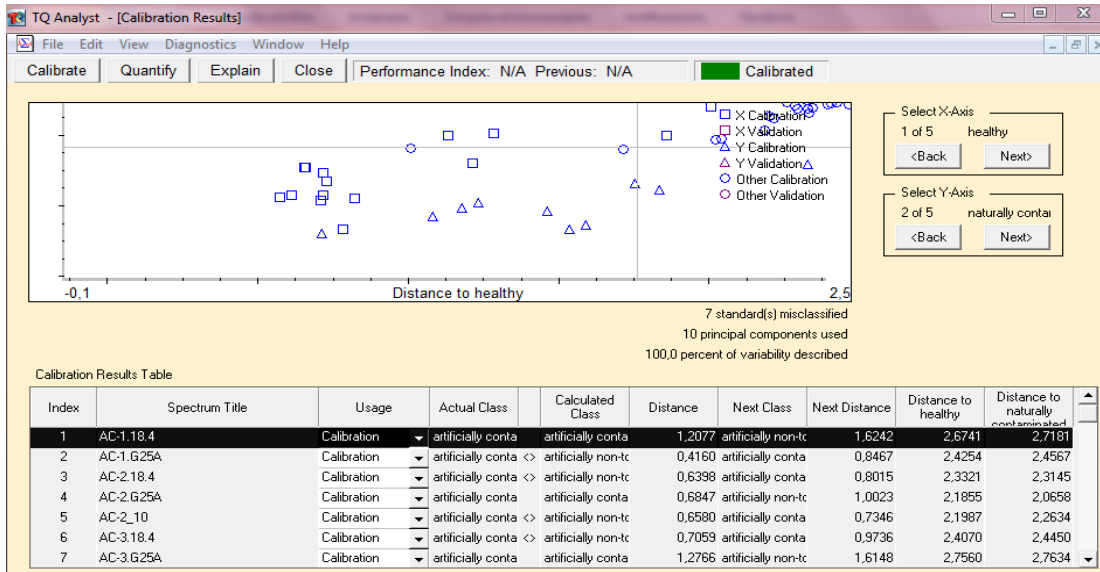
- Calibrate κονιοροτοποιημένων δειγμάτων



- Calibrate φυσικόλαιου με FTIR



- Calibrate φυσικέλαιου με Raman



Z) Στους πίνακες 6.3, 6.4 και 6.5 παρουσιάζονται οι κύριες συνιστώσες. Στη στήλη Full Spectrum Contribution φαίνεται η συμβολή του φάσματος των κύριων συνιστωσών στη μέθοδο, δηλαδή το ποσοστό του συνόλου της φασματικής μεταβολής που περιγράφει, ενώ στη στήλη Analysis Region Contribution φαίνεται το ποσοστό της φασματικής μεταβολής που περιγράφει μόνο στην περιοχή που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί.

Principal Component	Full Spectrum Contribution	Analysis Region Contribution
1	43,4779	75,2087
2	73,0019	90,4567
3	88,1119	96,2392
4	94,2115	98,3688
5	96,1885	99,1109
6	97,2497	99,7311
7	98,0161	99,8530
8	98,6899	99,9326
9	99,1235	99,9545

Πίνακας 6.3. Κύριες συνιστώσες για τα κονιορτοποιημένα δείγματα.

Principal Component	Full Spectrum Contribution	Analysis Region Contribution
1	52,9628	77,1055
2	75,4833	88,7721
3	82,8702	96,4102
4	88,4386	98,1204
5	92,4828	99,3706
6	94,2580	99,5934
7	95,7897	99,7335
8	96,9107	99,8127
9	97,6386	99,8756

Πίνακας 6.4. Κύριες συνιστώσες για τα δείγματα φιστικέλαιου με FTIR.

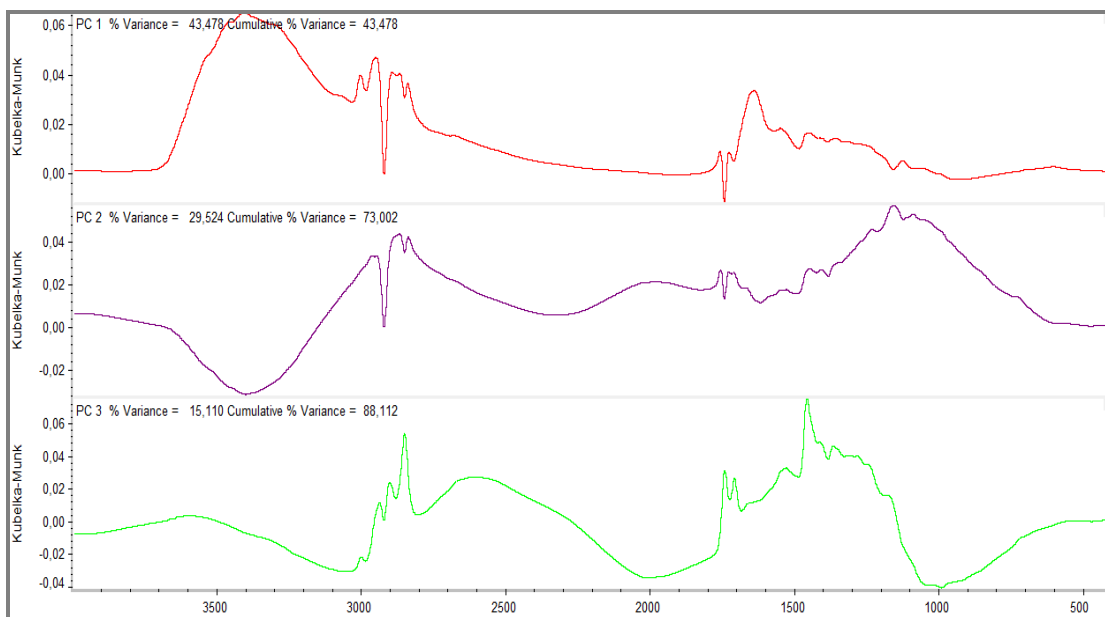
Principal Component	Full Spectrum Contribution	Analysis Region Contribution
1	82,9105	85,4161
2	97,6591	95,4464
3	98,7270	98,2313
4	99,3282	99,8045
5	99,6880	99,9371
6	99,8338	99,9687
7	99,9008	99,9817
8	99,9498	99,9884
9	99,9702	99,9911

Πίνακας 6.5. Κύριες συνιστώσες για τα δείγματα φιστικέλαιου με Raman.

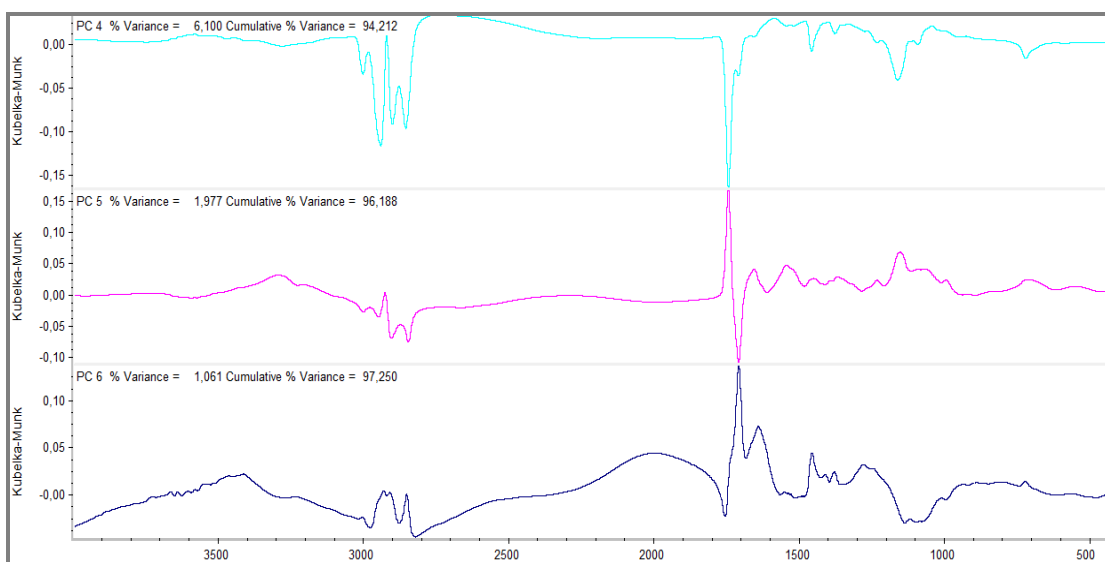
Παρατηρούμε ότι οι περισσότερες κύριες συνιστώσες που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφουν πάνω από το 99% της φασματικής μεταβολής τόσο στο σύνολο του φάσματος όσο και στην περιοχή που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί σε κάθε μέθοδο.

Στη συνέχεια, παραθέτονται τα φάσματα των κύριων συνιστωσών ώστε να διαπιστωθεί πως η περιοχή του φάσματος που χρησιμοποιήθηκε περιέχει σημαντικές φασματικές πληροφορίες και γι' αυτό το λόγο οι κύριες συνιστώσες είναι ικανές να περιγράφουν πάνω από το 99% της φασματικής μεταβολής (εικόνες 6.2 έως και 6.13).

- Για τα κονιοροτοποιημένα δείγματα



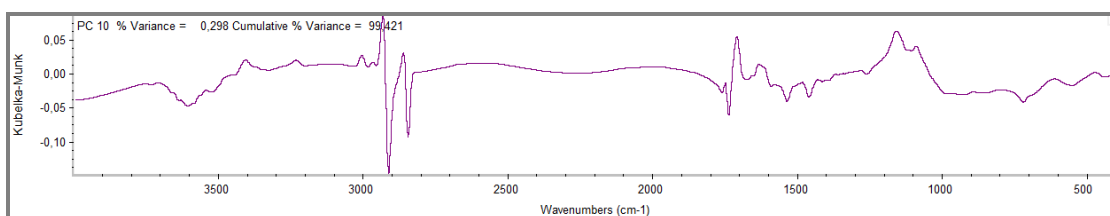
Εικόνα 6.2. Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 1,2,3 κονιοροτοποιημένων δειγμάτων.



Εικόνα 6.3. Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 4,5,6 κονιοροτοποιημένων δειγμάτων.



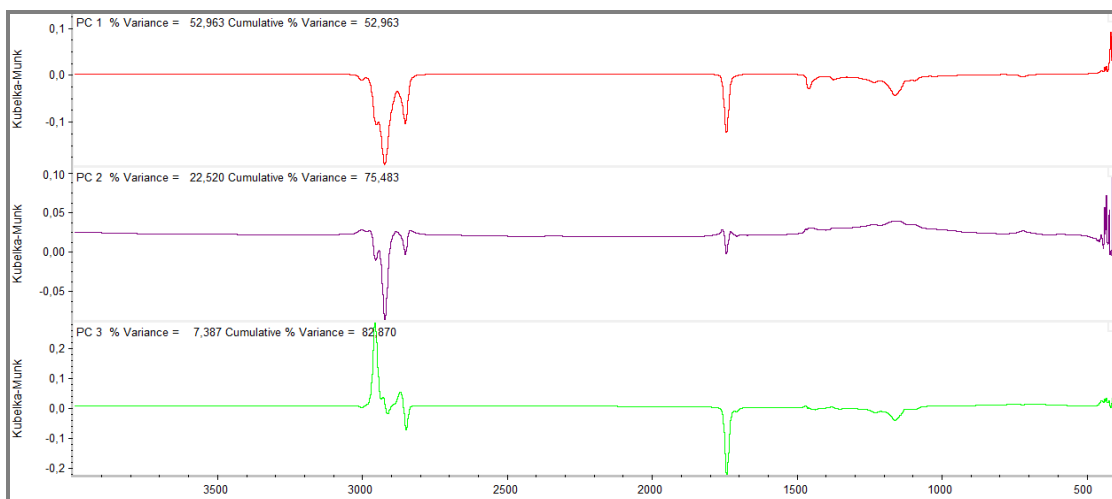
Εικόνα 6.4. Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 7,8,9 κονιορτοποιημένων δειγμάτων.



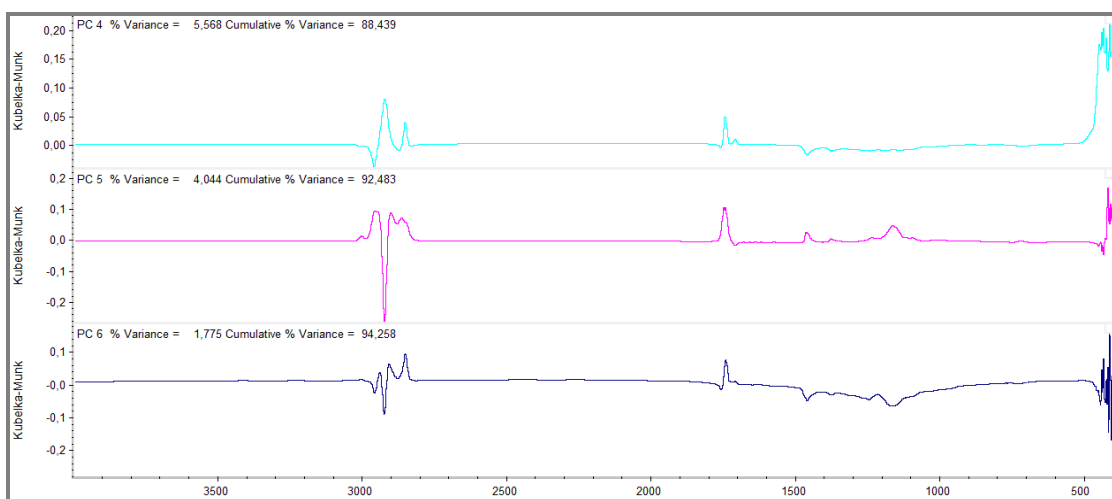
Εικόνα 6.5. Φάσμα FTIR κύριας συνιστώσας 10 κονιορτοποιημένων δειγμάτων.

Παρατηρούμε ότι τα φάσματα των κύριων συνιστωσών παρουσιάζουν μεταξύ τους μία έντονη διαφοροποίηση στην περιοχή $1770,17 \text{ cm}^{-1}$ - $1721,20 \text{ cm}^{-1}$ και $3034,51 \text{ cm}^{-1}$ - $2820,65 \text{ cm}^{-1}$ όπου είναι η περιοχή κυρίως του -C=O των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, αντίστοιχα. Συνεπώς, οι κύριες συνιστώσες αποδίδουν τη φασματική πληροφορία που έχουν λάβει από τα φάσματα των πρότυπων δειγμάτων και αφορά κυρίως πρωτεΐνες και λίπη.

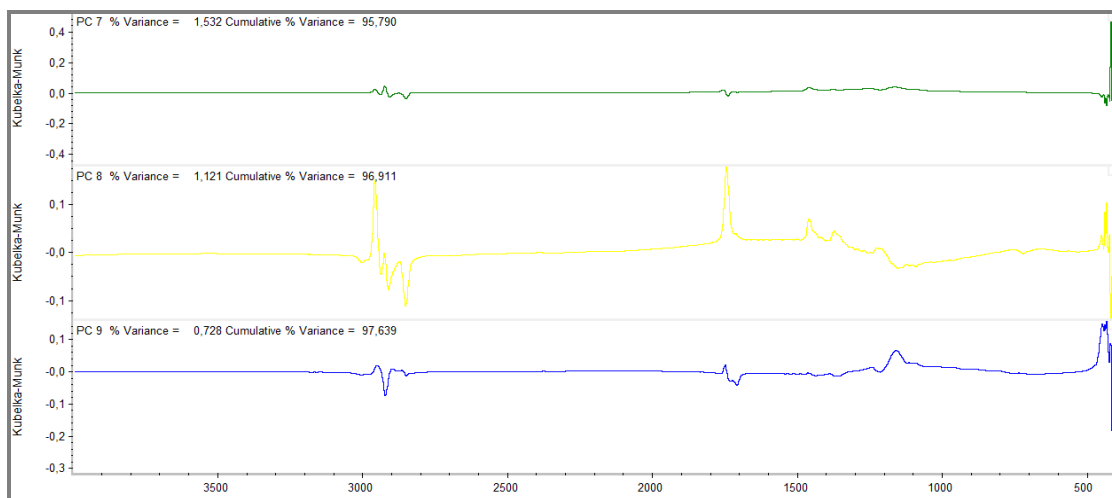
- Για το φιστικέλαιο με FTIR



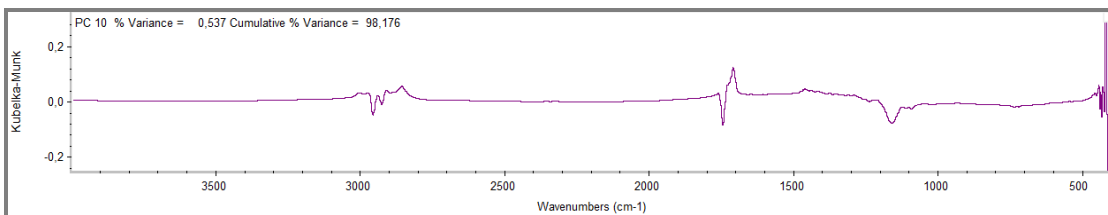
Εικόνα 6.6. Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 1,2,3 φιστικέλαιου.



Εικόνα 6.7. Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 4,5,6 φιστικέλαιου.

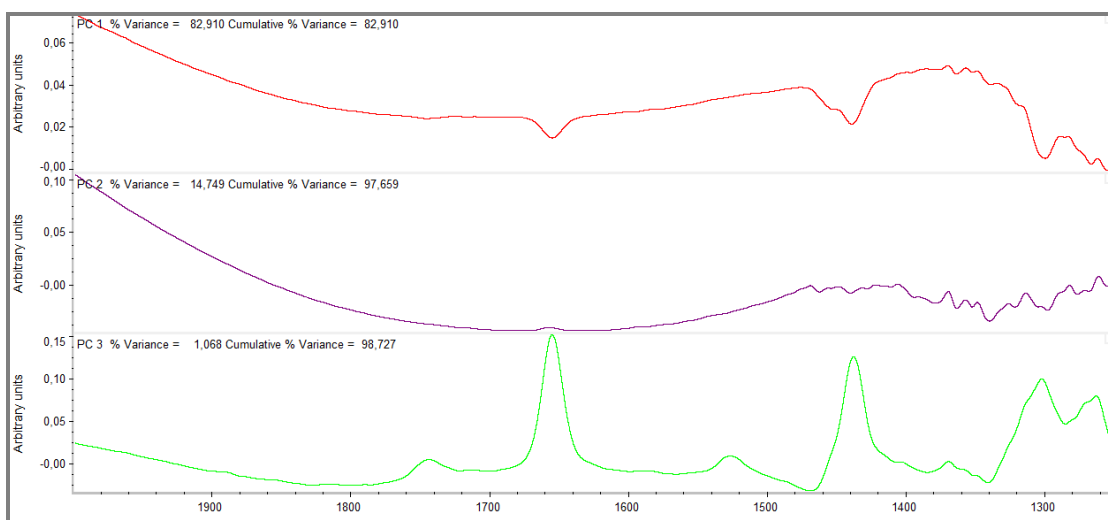


Εικόνα 6.8. Φάσμα FTIR κύριων συνιστωσών 7,8,9 φιστικέλαιου.

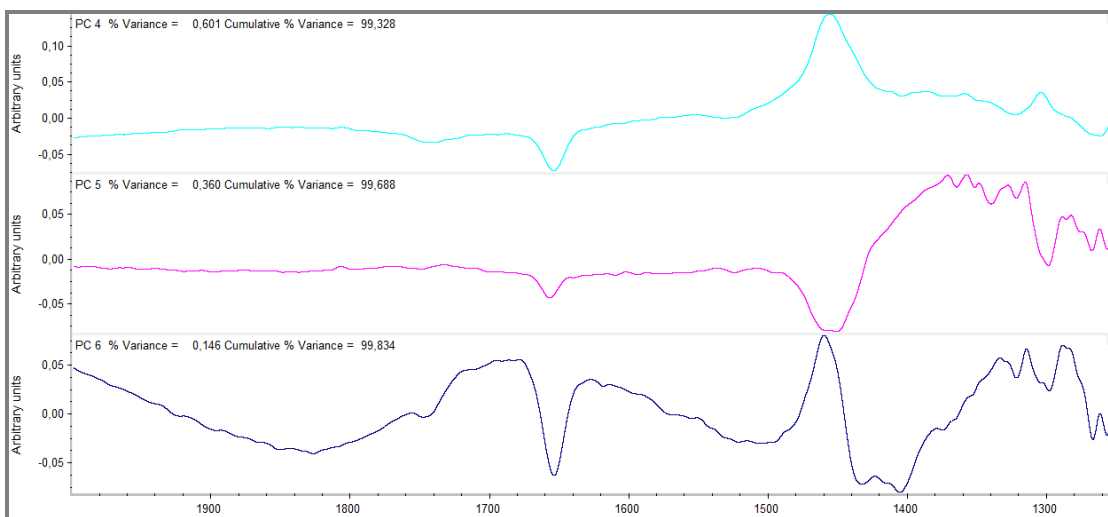


Εικόνα 6.9. Φάσμα FTIR κύριας συνιστώσας 10 φιστικέλαιου.

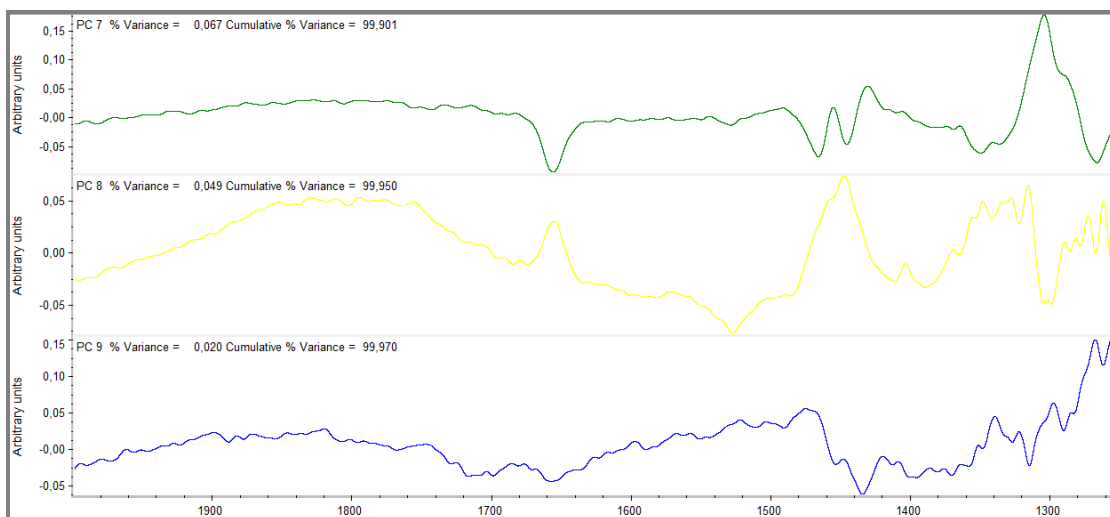
- Για το φιστικέλαιο με Raman



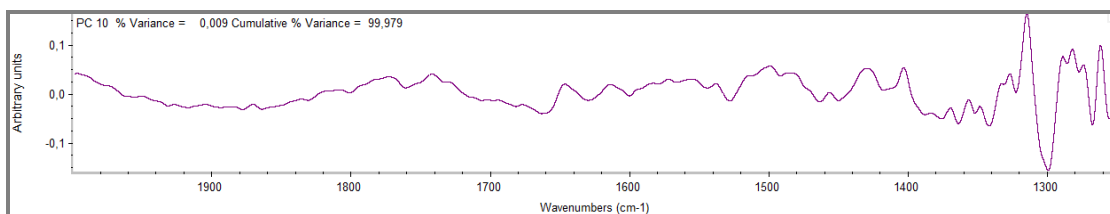
Εικόνα 6.10. Φάσμα Raman κύριων συνιστωσών 1,2,3 φιστικέλαιου.



Εικόνα 6.11. Φάσμα Raman κύριων συνιστωσών 4,5,6 φιστικέλαιου.



Εικόνα 6.12. Φάσμα Raman κύριων συνιστωσών 7,8,9 φιστικέλαιου.



Εικόνα 6.13. Φάσμα Raman κύριας συνιστώσας 10 φιστικέλαιου.

Η) Στη συνέχεια, παραθέτονται οι αποστάσεις των δειγμάτων από τις κύριες συνιστώσες 1 και 2 (πίνακες 6.6, 6.7 και 6.8).

Πίνακας 6.6. Αποστάσεις κωδικοποιημένων δειγμάτων από τις κύριες συνιστώσες 1 και 2.

Index	Spectrum Title	PC1 Score	PC2 Score
1	**AC-1.18.4	-0,26164	0,09787
2	**AC-1.G25A	-0,30134	0,3026
3	**AC-2.18.4	0,42009	-0,06109
4	**AC-2.G25A	-0,22439	0,49566
5	**AC-2/10	-0,54813	0,27154
6	**AC-3.18.4	0,6967	0,37892
7	**AC-3.G25A	0,10413	0,24579
8	**AC-3/12	0,00009	0,27651
9	**AC-4/12	-0,06262	0,02673
10	**AC-5/12	0,06661	-0,15856
11	**AC-6/12	-0,17671	0,41765
12	**AC-7/12	0,21545	0,28007
13	**AC-8/12	1,41945	-0,14473
14	**AC-9/12	0,90509	0,04462
15	**ANT-1.1	0,29899	0,51043

16	**ANT-1.2	0,7185	-0,18101
17	**ANT-1/7	-0,18117	0,17843
18	**ANT-2.1	0,35103	-0,30829
19	**ANT-2.2	-0,04299	0,13915
20	**ANT-3.1	0,16984	0,27142
21	**ANT-3.2	0,31356	0,26172
22	**H-1-afudatwmeno	-1,09331	0,0863
23	**H-2-afudatwmeno	-0,28968	-0,04185
24	**H-3-afudatwmeno	-0,46159	-0,00066
25	**H-4-afudatwmeno	0,66143	0,03904
26	**H-5-afudatwmeno	-0,11011	-0,34493
27	**H-6-afudatwmeno	-0,52853	-0,17169
28	**H-7-afudatwmeno	-0,39346	-0,37774
29	**H-8-afudatwmeno	-0,12834	0,0184
30	**H-9-afudatwmeno	0,52774	0,10678
31	**H-10-afudatwmeno	0,26279	-0,03127
32	**H-11-afudatwmeno	-0,3138	-0,23257
33	**H-12-afudatwmeno	0,03072	0,16875
34	**H-13-afudatwmeno	0,54781	-0,24681
35	**H-14-afudatwmeno	-0,00037	0,13189
36	**H-15	0,95129	-0,5061
37	**NC-3-afudatwmeno	-0,18335	-0,351
38	**NC-4-afudatwmeno	-0,83925	-0,29726
39	**NC-5-afudatwmeno	-1,09942	-0,26514
40	**NC-6-afudatwmeno	-1,07286	0,02112
41	**NC-7-afudatwmeno	0,76334	-0,44254
42	**NC-8-afudatwmeno	-0,83875	-0,09344
43	**NC-9-afudatwmeno	0,50595	-0,50329
44	**NC-10-afudatwmeno	-0,91364	-0,0585
45	**NC-11-afudatwmeno	-0,97037	-0,21457
46	**NC-12-afudatwmeno	-0,41679	-0,13552
47	**OS-1	0,87906	0,16553
48	**OS-2	0,26082	0,42127
49	**OS-3	0,3821	-0,18962

Πίνακας 6.7. Αποστάσεις δειγμάτων φιστικέλαιου με FTIR από τις κύριες συνιστώσες 1 και 2.

Index	Spectrum Title	PC1 Score	PC2 Score
1	**oil-AC-1.18.4	0,35818	1,35443
2	**oil-AC-1.G25A	0,36535	-0,50924
3	**oil-AC-2.18.4	0,3223	-0,53159
4	**oil-AC-2.G25A	0,77248	0,12283
5	**oil-AC-2/10	0,02621	-0,34811
6	**oil-AC-3.18.4	0,86862	-0,77023
7	**oil-AC-3.G25A	1,1715	-0,17788
8	**oil-AC-3/12	0,36828	0,08868
9	**oil-AC-4/12	-0,31514	-0,57708

10	**oil-AC-5/12	0,41646	-0,08329
11	**oil-AC-6_12	0,26565	-0,04397
12	**oil-AC-7/12	0,64441	-0,57796
13	**oil-AC-8/12	-0,2784	0,08962
14	**oil-AC-9_12	-0,23183	-0,11722
15	**oil-ANT-1.1	-0,41586	-0,50284
16	**oil-ANT-1.2	-0,07589	-0,66163
17	**oil-ANT-1/7	-0,67373	-0,08958
18	**oil-ANT-2.1	-0,40459	-0,35126
19	**oil-ANT-2.2	0,13362	-0,1753
20	**oil-ANT-3.1	0,15418	-0,33945
21	**oil-ANT-3.2	-0,30578	0,25886
22	**oil-H-1	0,48309	-0,46851
23	**oil-H-2	1,00808	-0,21159
24	**oil-H-3	1,27074	0,11058
25	**oil-H-4	1,80658	-0,46364
26	**oil-H-5	0,48057	0,25088
27	**oil-H-6	1,09182	0,13886
28	**oil-H-7	1,24691	-0,10794
29	**oil-H-8	-0,25429	0,75725
30	**oil-H-9	0,1221	1,67711
31	**oil-H-10	-0,21537	0,55414
32	**oil-H-11	0,45654	0,32457
33	**oil-H-12	0,38118	0,6567
34	**oil-H-13	1,32777	0,60853
35	**oil-H-14	1,29016	0,69132
36	**oil-H-15	0,49776	0,1774
37	**oil-NC-3	-3,15857	0,0087
38	**oil-NC-4	0,74516	-0,4454
39	**oil-NC-5	-3,36676	0,01215
40	**oil-NC-6	1,33332	-0,467
41	**oil-NC-7	0,82565	0,92405
42	**oil-NC-8	0,26355	-0,6466
43	**oil-NC-9	-3,33802	-0,0031
44	**oil-NC-10	-3,56153	0,01708
45	**oil-NC-11	-1,92233	0,00149
46	**oil-NC-12	-3,24532	0,02436
47	**oil-OS-1	-0,10963	-0,21201
48	**oil-OS-2	0,69867	-0,15105
49	**oil-OS-3	0,67617	0,1839

Πίνακας 6.8. Αποστάσεις δειγμάτων φιστικέλαιου με Raman από τις κύριες συνιστώσες 1 και 2.

Index	Spectrum Title	PC1 Score	PC2 Score
1	AC-1.18.4	-7690,4	-6967,17
2	AC-1.G25A	-12213,3	1037,029
3	AC-2.18.4	-9387,41	3111,293

4	AC-2.G25A	-8060,91	-617,86
5	AC-2_10	-13304,7	-492,225
6	AC-3.18.4	-8926,69	1630,748
7	AC-3.G25A	-7567,29	-7634,59
8	AC-3_12	-5609,19	-783,527
9	AC-4_12	-6061,1	1210,39
10	AC-5_12	-14052,5	701,1819
11	AC-6_12	-9223,65	524,4654
12	AC-7/12	-11753,3	1014,792
13	AC-8_12	-12402,3	223,12
14	AC-9_12	-9311,2	-614,629
15	ANT-1.1	-9739,88	1840,322
16	ANT-1.2	-14232,2	-499,674
17	AC-1_7	-11030	-505,34
18	ANT-2.1	-8931,9	2511,635
19	ANT-2.2	-8147,59	3214,692
20	ANT-3.1	-10776,1	312,5449
21	ANT-3.2	-10219,1	-788,095
22	H-1	5729,214	1423,09
23	H-2	3591,208	-537,857
24	H-3	10504,28	2753,99
25	H-4	-2531,26	-1368,03
26	H-5	14479,7	459,889
27	H-6	25909,06	2491,68
28	H-7	17244,51	-21854,2
29	H-8	27572,52	-4891,2
30	H-9	-3542,89	-4350,7
31	H-10	10407,83	-142,546
32	H-11	8715,629	2498,946
33	H-12	8693,679	2062,883
34	H-13	120,9604	-1026,73
35	H-14	-4039,17	-92,0616
36	H-15	-4796,39	-416,187
37	NC-3	11476,13	179,4074
38	NC-4	22372,76	4270,287
39	NC-5	13244,5	2781,289
40	NC-6	13319,3	612,1633
41	NC-7	19959,25	1147,639
42	NC-8	7072,351	4165,962
43	NC-9	16442,56	3413,752
44	NC-10	14995,68	6475,098
45	NC-11	-187,465	1720,192
46	NC-12	440,8828	805,8522
47	OS-1	-13297	-684,334
48	OS-2	-9347,12	977,8527
49	OS-3	-5910,01	-1305,23

Γ.6.4 Ποσοστό επιτυχή διαχωρισμού

Τα αποτελέσματα της διαχωριστικής ανάλυσης για τα κονιορτοποιημένα δείγματα είχαν ποσοστό επιτυχίας 91,8%, διότι από τα 49 δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά τα 45 (πίνακας 6.9).

Τα αποτελέσματα της διαχωριστικής ανάλυσης για τα δείγματα φιστικέλαιου με FTIR είχαν ποσοστό επιτυχίας 83,4%, διότι από τα 49 δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά τα 41 (πίνακας 6.10).

Τα αποτελέσματα της διαχωριστικής ανάλυσης για τα δείγματα φιστικέλαιου με Raman είχαν ποσοστό επιτυχίας 85,7%, διότι από τα 49 δείγματα ταξινομήθηκαν σωστά τα 42 (πίνακας 6.11).

Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης για τα κονιορτοποιημένα δείγματα με ποσοστό επιτυχίας 91,8%.

Index	Spectrum Title	Actual Class	Calculated Class	Distance	Next Class	Next Distance
1	**AC-1.18.4	artificially contaminated	artificially contaminated	0,9109	dialoghs	1,45
2	**AC-1.G25A	artificially contaminated	artificially contaminated	0,9517	dialoghs	1,1453
3	**AC-2.18.4	artificially contaminated	artificially contaminated	0,6028	artificially non-toxicogenic	1,0128
4	**AC-2.G25A	artificially contaminated	artificially contaminated	1,0834	dialoghs	1,6343
5	**AC-2/10	artificially contaminated	artificially contaminated	0,9875	dialoghs	1,0679
6	**AC-3.18.4	artificially contaminated	artificially contaminated	1,1091	dialoghs	1,2955
7	**AC-3.G25A	artificially contaminated	artificially contaminated	0,5742	artificially non-toxicogenic	0,9348
8	**AC-3/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,8711	artificially non-toxicogenic	1,0037
9	**AC-4/12	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,5419	artificially contaminated	0,8589
10	**AC-5/12	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,7995	artificially contaminated	0,8981
11	**AC-6/12	artificially contaminated	artificially contaminated	1,3516	artificially non-toxicogenic	1,6851
12	**AC-7/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,6132	dialoghs	1,2221
13	**AC-8/12	artificially contaminated	artificially contaminated	1,9491	dialoghs	2,1088
14	**AC-9/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,9807	artificially non-toxicogenic	1,4593
15	**ANT-1.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	1,6365	artificially contaminated	1,9984
16	**ANT-1.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,8343	artificially contaminated	1,4206
17	**ANT-1/7	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,8358	artificially contaminated	0,8655
18	**ANT-2.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	1,1916	artificially contaminated	1,2109
19	**ANT-2.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	1,0236	artificially contaminated	1,5013
20	**ANT-3.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,5186	artificially contaminated	0,8922
21	**ANT-3.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	1,051	artificially contaminated	1,6047
22	**H-1-afudatwmeno	healthy	naturally contaminated	1,1605	healthy	1,276
23	**H-2-afudatwmeno	healthy	healthy	0,4622	naturally contaminated	1,0089
24	**H-3-afudatwmeno	healthy	healthy	0,5539	naturally contaminated	0,913
25	**H-4-afudatwmeno	healthy	dialoghs	0,6777	healthy	0,9781
26	**H-5-afudatwmeno	healthy	healthy	0,6731	naturally contaminated	0,8588

27	**H-6-afudatwmeno	healthy	healthy	0,6426	naturally contaminated	0,9714
28	**H-7-afudatwmeno	healthy	healthy	0,8499	naturally contaminated	0,8817
29	**H-8-afudatwmeno	healthy	healthy	0,5952	dialoghs	0,8863
30	**H-9-afudatwmeno	healthy	healthy	0,7762	dialoghs	1,0015
31	**H-10-afudatwmeno	healthy	healthy	0,7043	dialoghs	0,9115
32	**H-11-afudatwmeno	healthy	healthy	0,7761	naturally contaminated	0,8846
33	**H-12-afudatwmeno	healthy	healthy	0,8331	dialoghs	1,0824
34	**H-13-afudatwmeno	healthy	healthy	0,7626	naturally contaminated	1,0512
35	**H-14-afudatwmeno	healthy	healthy	1,0823	dialoghs	1,2795
36	**H-15	healthy	healthy	0,9983	dialoghs	1,2766
37	**NC-3-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,6339	healthy	0,7733
38	**NC-4-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,839	healthy	1,4743
39	**NC-5-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,7437	healthy	1,1919
40	**NC-6-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,6029	healthy	0,9392
41	**NC-7-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	1,3458	healthy	1,6429
42	**NC-8-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,784	healthy	1,2108
43	**NC-9-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	1,5856	healthy	2,1212
44	**NC-10-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,4585	healthy	0,8457
45	**NC-11-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,5818	healthy	1,1791
46	**NC-12-afudatwmeno	naturally contaminated	naturally contaminated	0,5463	healthy	1,1421
47	**OS-1	dialoghs	dialoghs	1,0004	artificially contaminated	1,5399
48	**OS-2	dialoghs	dialoghs	1,0925	healthy	1,3583
49	**OS-3	dialoghs	dialoghs	0,9033	artificially contaminated	1,0756

Πίνακας 6.10. Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης για τα δείγματα φυσικέλαιου με FTIR με ποσοστό επιτυχίας 83,4%.

Index	Spectrum Title	Actual Class	Calculated Class	Distance	Next Class	Next Distance
1	**oil-AC-1.18.4	artificially contaminated	artificially contaminated	1,6663	artificially non-toxicogenic	1,8535
2	**oil-AC-1.G25A	artificially contaminated	artificially contaminated	0,7005	artificially non-toxicogenic	0,9333
3	**oil-AC-2.18.4	artificially contaminated	artificially contaminated	0,5241	artificially non-toxicogenic	0,7241
4	**oil-AC-2.G25A	artificially contaminated	healthy	0,9639	artificially contaminated	0,9896
5	**oil-AC-2/10	artificially contaminated	artificially contaminated	0,6376	artificially non-toxicogenic	0,6647
6	**oil-AC-3.18.4	artificially contaminated	artificially contaminated	1,5889	artificially non-toxicogenic	1,6042
7	**oil-AC-3.G25A	artificially contaminated	artificially contaminated	1,0422	healthy	1,265
8	**oil-AC-3/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,3741	artificially non-toxicogenic	0,722
9	**oil-AC-4/12	artificially contaminated	artificially contaminated	1,7194	artificially non-toxicogenic	1,9716
10	**oil-AC-5/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,8163	artificially non-toxicogenic	1,0207
11	**oil-AC-6/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,6208	artificially non-toxicogenic	0,9523
12	**oil-AC-7/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,72	healthy	0,834
13	**oil-AC-8/12	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,6228	artificially contaminated	0,6753
14	**oil-AC-9/12	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,5798	artificially contaminated	0,7029
15	**oil-ANT-1.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,4976	artificially contaminated	1,0221
16	**oil-ANT-1.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,8134	artificially contaminated	0,9268
17	**oil-ANT-1/7	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,525	artificially contaminated	0,949
18	**oil-ANT-2.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,3834	artificially contaminated	0,9598
19	**oil-ANT-2.2	artificially non-toxicogenic	artificially contaminated	1,2244	artificially non-toxicogenic	1,3029
20	**oil-ANT-3.1	artificially non-toxicogenic	artificially contaminated	0,3611	artificially non-toxicogenic	0,4342
21	**oil-ANT-3.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,7487	artificially contaminated	1,1237
22	**oil-H-1	healthy	healthy	0,841	artificially contaminated	0,8431
23	**oil-H-2	healthy	healthy	0,7896	dialoghs	0,9788
24	**oil-H-3	healthy	healthy	1,2236	dialoghs	1,4848
25	**oil-H-4	healthy	healthy	1,2003	dialoghs	1,3503
26	**oil-H-5	healthy	healthy	0,3884	artificially contaminated	0,7805

27	**oil-H-6	healthy	healthy	0,5023	artificially contaminated	0,9178
28	**oil-H-7	healthy	healthy	0,9798	artificially contaminated	1,1516
29	**oil-H-8	healthy	healthy	0,8999	dialoghs	1,169
30	**oil-H-9	healthy	healthy	1,6541	dialoghs	2,125
31	**oil-H-10	healthy	healthy	0,7238	dialoghs	1,0028
32	**oil-H-11	healthy	healthy	0,3848	dialoghs	0,7254
33	**oil-H-12	healthy	healthy	0,4294	dialoghs	0,8666
34	**oil-H-13	healthy	healthy	1,4461	dialoghs	1,8294
35	**oil-H-14	healthy	healthy	0,8706	dialoghs	1,3527
36	**oil-H-15	healthy	healthy	0,8077	dialoghs	0,8331
37	**oil-NC-3	naturally contaminated	naturally contaminated	0,5904	healthy	1,5156
38	**oil-NC-4	naturally contaminated	healthy	0,7939	dialoghs	0,8379
39	**oil-NC-5	naturally contaminated	naturally contaminated	0,6295	healthy	1,6369
40	**oil-NC-6	naturally contaminated	naturally contaminated	1,0408	healthy	1,1654
41	**oil-NC-7	naturally contaminated	naturally contaminated	1,6914	healthy	1,9147
42	**oil-NC-8	naturally contaminated	artificially contaminated	0,8376	artificially non-toxigenic	1,0027
43	**oil-NC-9	naturally contaminated	naturally contaminated	0,6337	healthy	1,5822
44	**oil-NC-10	naturally contaminated	naturally contaminated	0,7207	healthy	1,676
45	**oil-NC-11	naturally contaminated	naturally contaminated	1,3821	healthy	2,0628
46	**oil-NC-12	naturally contaminated	naturally contaminated	0,5806	healthy	1,5795
47	**oil-OS-1	dialoghs	artificially contaminated	0,7665	artificially non-toxigenic	0,8283
48	**oil-OS-2	dialoghs	dialoghs	0,7424	healthy	1,4825
49	**oil-OS-3	dialoghs	dialoghs	0,5374	healthy	0,963

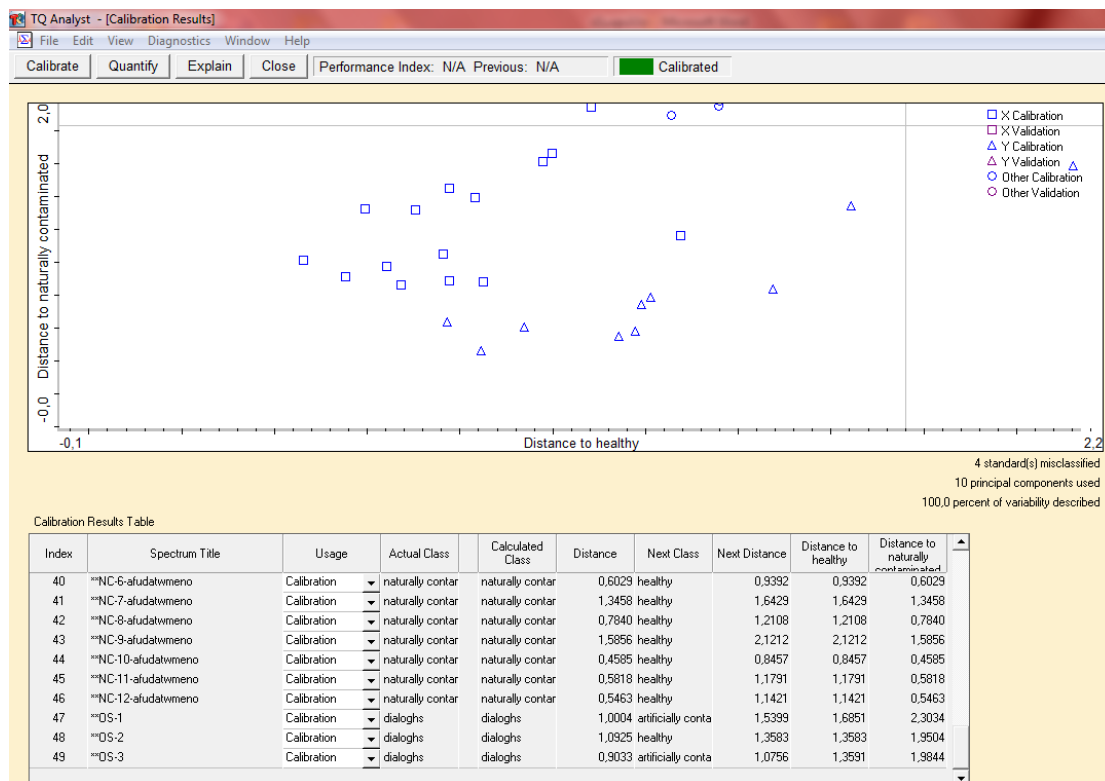
Πίνακας 6.11. Αποτελέσματα διαχωριστικής ανάλυσης για τα δείγματα φιστικέλαιου με Raman με ποσοστό επιτυχίας 85,7%.

Index	Spectrum Title	Actual Class	Calculated Class	Distance	Next Class	Next Distance
1	AC-1.18.4	artificially contaminated	artificially contaminated	1,2077	artificially non-toxicogenic	1,6242
2	AC-1.G25A	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,416	artificially contaminated	0,8467
3	AC-2.18.4	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,6398	artificially contaminated	0,8015
4	AC-2.G25A	artificially contaminated	artificially contaminated	0,6847	artificially non-toxicogenic	1,0023
5	AC-2/10	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,658	artificially contaminated	0,7346
6	AC-3.18.4	artificially contaminated	artificially non-toxicogenic	0,7059	artificially contaminated	0,9736
7	AC-3.G25A	artificially contaminated	artificially contaminated	1,2766	artificially non-toxicogenic	1,6148
8	AC-3/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,5806	artificially non-toxicogenic	1,0543
9	AC-4/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,8773	dialoghs	1,1855
10	AC-5/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,7954	artificially non-toxicogenic	0,9864
11	AC-6/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,705	artificially non-toxicogenic	1,127
12	AC-7/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,7258	artificially non-toxicogenic	0,796
13	AC-8/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,8172	artificially non-toxicogenic	1,028
14	AC-9/12	artificially contaminated	artificially contaminated	0,3248	artificially non-toxicogenic	0,6009
15	ANT-1.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,7025	artificially contaminated	0,949
16	ANT-1.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,762	artificially contaminated	0,8259
17	AC-1/7	artificially contaminated	artificially contaminated	0,8397	artificially non-toxicogenic	0,9283
18	ANT-2.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,6727	artificially contaminated	1,1041
19	ANT-2.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,7299	artificially contaminated	1,0751
20	ANT-3.1	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,449	artificially contaminated	0,4929
21	ANT-3.2	artificially non-toxicogenic	artificially non-toxicogenic	0,6397	artificially contaminated	0,6506
22	H-1	healthy	naturally contaminated	0,6739	healthy	0,7842
23	H-2	healthy	healthy	0,6137	naturally contaminated	1,1513
24	H-3	healthy	healthy	0,7087	naturally contaminated	1,0697
25	H-4	healthy	healthy	0,6563	dialoghs	1,0192
26	H-5	healthy	healthy	0,5714	naturally contaminated	1,1166

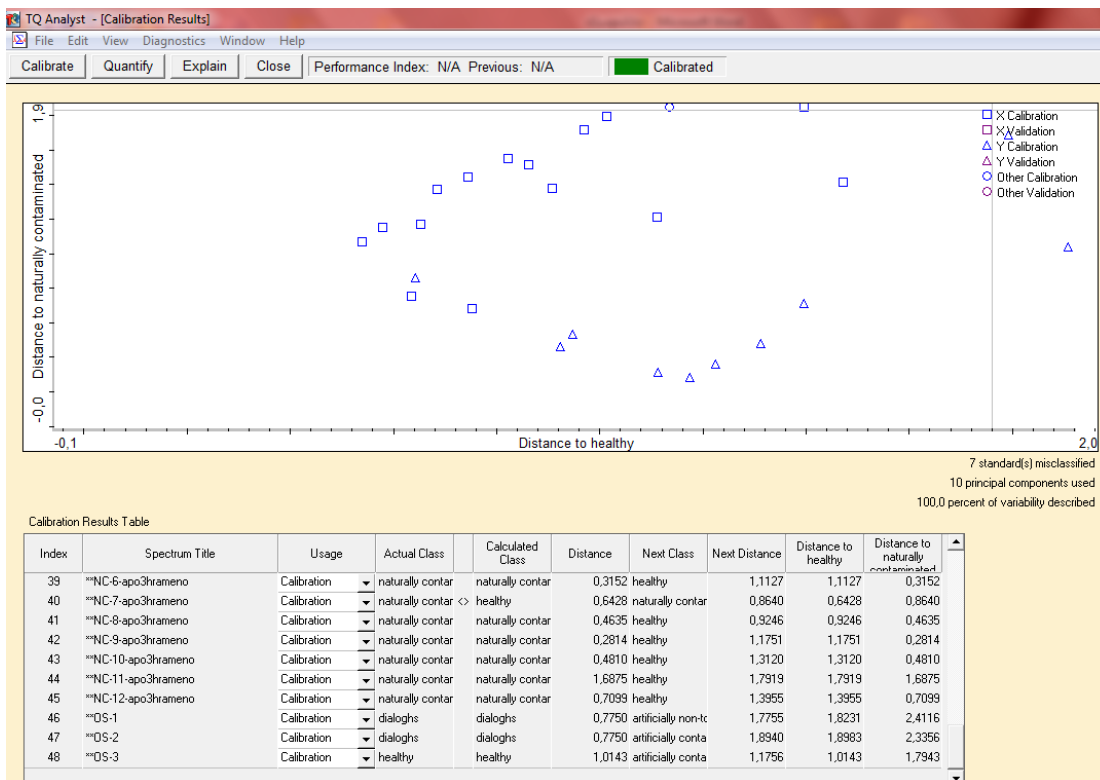
27	H-6	healthy	healthy	1,212	naturally contaminated	1,6078
28	H-7	healthy	healthy	2,0073	naturally contaminated	2,4079
29	H-8	healthy	healthy	1,8587	naturally contaminated	1,9915
30	H-9	healthy	healthy	1,1336	naturally contaminated	2,0012
31	H-10	healthy	healthy	0,6575	naturally contaminated	1,5469
32	H-11	healthy	healthy	0,7168	naturally contaminated	1,1567
33	H-12	healthy	healthy	0,7282	naturally contaminated	1,3419
34	H-13	healthy	healthy	0,7157	naturally contaminated	1,4625
35	H-14	healthy	healthy	0,8224	naturally contaminated	1,1033
36	H-15	healthy	dialoghs	0,9887	healthy	1,2832
37	NC-3	naturally contaminated	naturally contaminated	0,8501	healthy	1,0837
38	NC-4	naturally contaminated	naturally contaminated	1,3214	healthy	1,7521
39	NC-5	naturally contaminated	naturally contaminated	0,6724	healthy	1,5346
40	NC-6	naturally contaminated	naturally contaminated	0,6051	healthy	0,7131
41	NC-7	naturally contaminated	naturally contaminated	0,925	healthy	1,463
42	NC-8	naturally contaminated	naturally contaminated	0,732	healthy	1,5919
43	NC-9	naturally contaminated	naturally contaminated	0,9731	healthy	1,177
44	NC-10	naturally contaminated	naturally contaminated	1,5836	healthy	2,3267
45	NC-11	naturally contaminated	naturally contaminated	1,2262	dialoghs	1,6632
46	NC-12	naturally contaminated	naturally contaminated	1,0411	healthy	1,2324
47	OS-1	dialoghs	dialoghs	1,0542	healthy	1,7152
48	OS-2	dialoghs	artificially contaminated	0,5848	artificially non-toxicogenic	0,8495
49	OS-3	dialoghs	dialoghs	0,8967	healthy	1,0067

Γ.6.5 Αιτιολόγηση διαχωριστικής ανάλυσης με τα αφυδατωμένα δείγματα αντί των αποξηραμένων δειγμάτων

Κατά τη χρήση των αφυδατωμένων φιστικιών, από τα 49 δείγματα τα 45 κατατάσσονται σωστά, δηλαδή έχουμε 91,8% επιτυχή διαφοροποίηση.



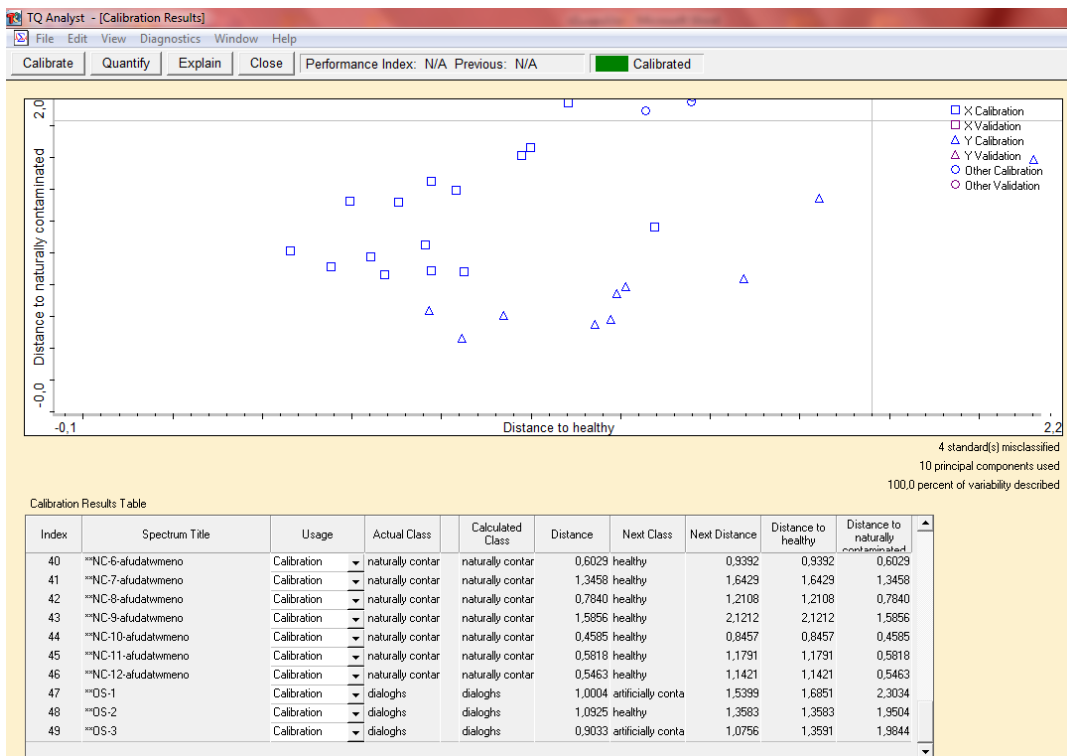
Κατά τη χρήση των αποξηραμένων φιστικιών, από τα 48 δείγματα τα 41 κατατάσσονται σωστά, δηλαδή έχουμε 85,4% επιτυχή διαφοροποίηση.



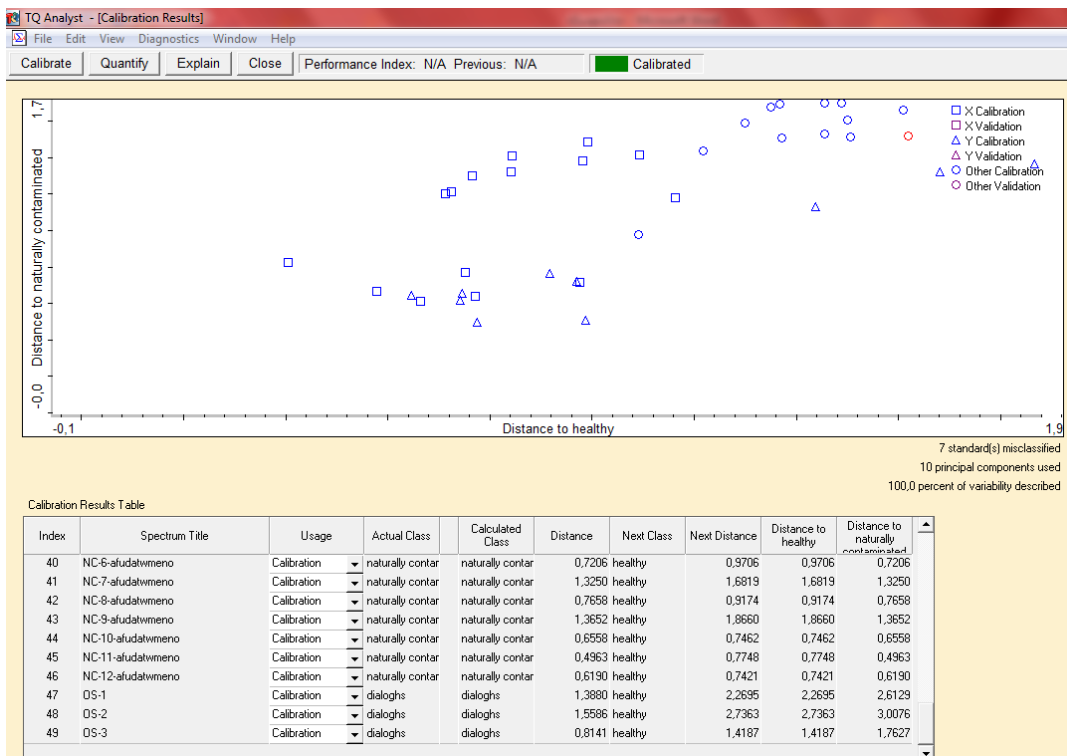
Η διαφοροποίηση αυτή πιθανόν να οφείλεται στη διαφοροποίηση των πρωτεϊνών λόγω θέρμανσης και οξειδώσεων. Συμπεραίνουμε ότι η διαχωριστική ανάλυση είναι καλύτερο να γίνει με τα αφυδατωμένα δείγματα (αντί με τα αποξηραμένα) κονιορτοποιημένων φιστικιών Αιγίνης. Επίσης, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα των αποξηραμένων σε νερό, δημιουργεί πρόβλημα στα φάσματα.

Γ.6.6 Αιτιολόγηση φάσματος Kubelka-Munk αντί φάσματος Average

Κατά τη χρήση φασμάτων τροποποιημένων με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk αφυδατωμένων φιστικιών, από τα 49 δείγματα τα 45 κατατάσσονται σωστά, δηλαδή έχουμε 91,8% επιτυχή διαφοροποίηση.



Κατά τη χρήση φασμάτων average αφυδατωμένων φιστικιών, από τα 49 δείγματα τα 42 κατατάσσονται σωστά, δηλαδή έχουμε 85,71% επιτυχή διαφοροποίηση.



Συμπεραίνουμε ότι η διαχωριστική ανάλυση είναι καλύτερο να γίνει με τα τροποποιημένα με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk φάσματα (αντί με τα φάσματα average) δειγμάτων κονιορτοποιημένων φιστικιών Αιγίνης.

Τα φαινόμενα διάχυτης ανάκλασης είναι δύσκολο να μοντελοποιηθούν μαθηματικά. Όσοι έχουν καθιερώσει μοντέλα για την περιγραφή των φαινομένων διάχυτης ανάκλασης χρησιμοποιούν τις βασικές οπτικές ιδιότητες του δείγματος (Christy, Kvalheim, Velapoldi, 1995). Ωστόσο αυτά τα μοντέλα αντιμετωπίζουν πρόβλημα μετατροπής του φάσματος ανάκλασης σε μια μορφή όπου οι ζώνες έντασης απορρόφησης θα μεταβάλλονται γραμμικά με τη συγκέντρωση σε ένα ευρύ φάσμα συγκέντρωσης (Christy, Liang, Hui, Kvalheim, 1993).

Οι Kubelka και Munk ανέπτυξαν ένα μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων διάχυτης ανάκλασης υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ο αλγόριθμος Kubelka-Munk ισχυροποιεί την απορρόφηση των εξασθενημένων ζωνών απορρόφησης σε σύγκριση με το ακατέργαστο φάσμα. Υποθέτει άπειρη αραίωση δείγματος σε μια μη-απορροφητική μήτρα, σταθερό συντελεστή σκέδασης και παχύ στρώμα δείγματος και εκφράζεται ως εξής:

$$f(R) = \frac{(1-K)^2}{2K} = \frac{s}{s}$$

όπου R: η ανάκλαση της επιφάνειας του δείγματος

k: ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης

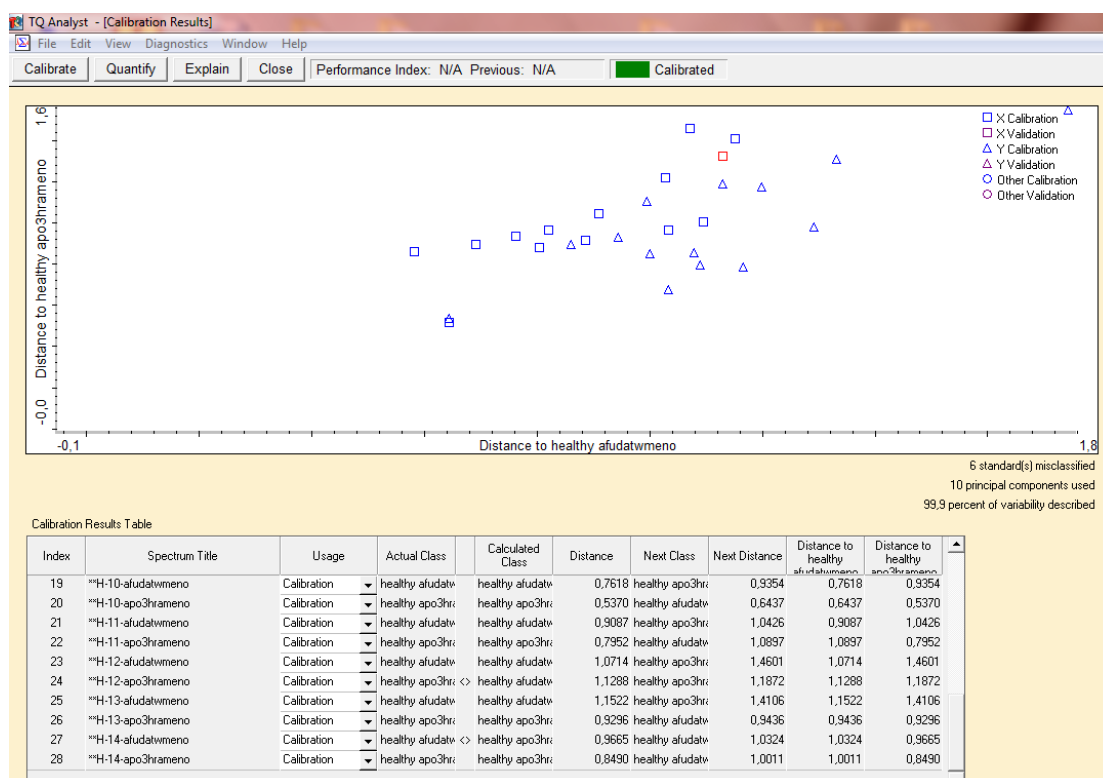
s: ο συντελεστής σκέδασης

Επομένως, με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk επιτυγχάνεται η ανάκλαση της επιφάνειας του δείγματος να είναι ανάλογη της μοριακής απορρόφησης και αντιστρόφως ανάλογη της σκέδασης της ακτινοβολίας κι έτσι, δημιουργείται μια γραμμική σχέση για τη φασματική ένταση σε σχέση με τη συγκέντρωση του δείγματος (Christy et al., 1995).

Γ.6.7 Συμπληρωματικές πληροφορίες από τη μελέτη

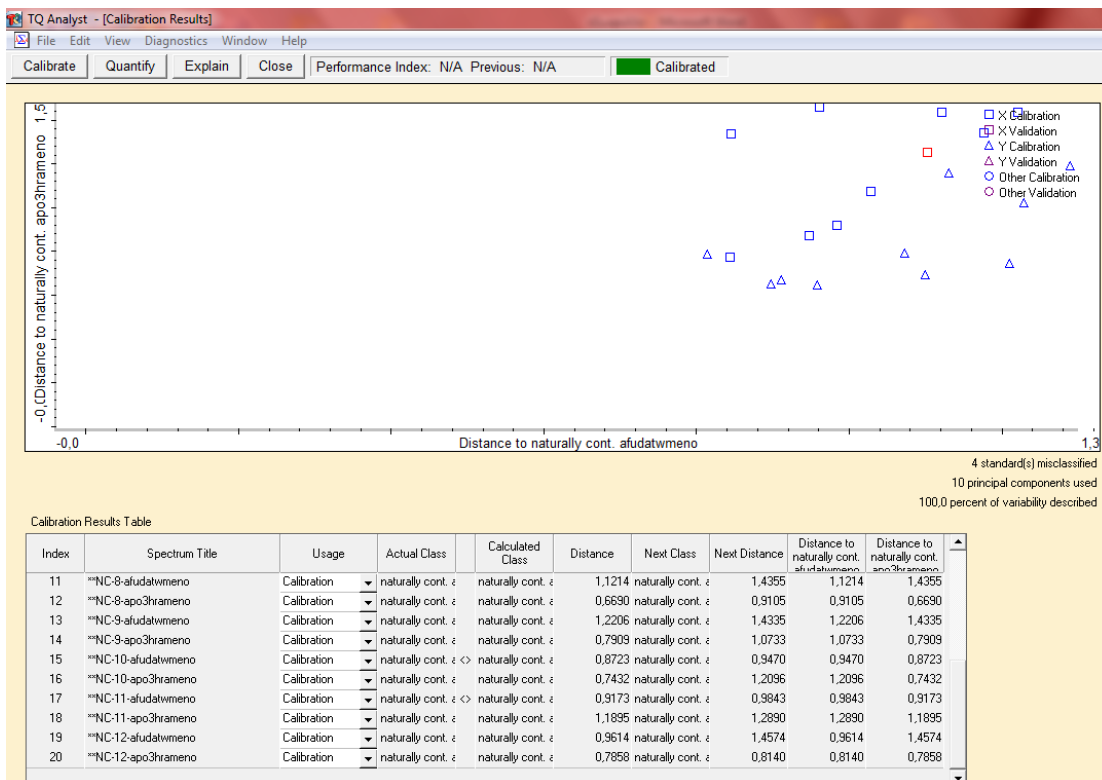
Γ.6.7.1 Διαχωρισμός Healthy αφυδατωμένων vs. Healthy αποξηραμένων φιστικιών

Κατά το διαχωρισμό υγιών αποξηραμένων και αφυδατωμένων φιστικιών, από τα 28 δείγματα (14 υγιή αφυδατωμένα και 14 υγιή αποξηραμένα) τα 22 κατατάσσονται σωστά, δηλαδή έχουμε 78,6% επιτυχή διαφοροποίηση.



Γ.6.7.2 Διαχωρισμός Naturally Contaminated αφυδατωμένων vs. Naturally Contaminated αποξηραμένων φιστικιών

Κατά το διαχωρισμό φυσικώς μολυσμένων αποξηραμένων και αφυδατωμένων φιστικιών, από τα 20 δείγματα (10 φυσικώς μολυσμένα αφυδατωμένα και 10 φυσικώς μολυσμένα αποξηραμένα) τα 16 κατατάσσονται σωστά, δηλαδή έχουμε 80,0% επιτυχή διαφοροποίηση.



Γ.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

Γ.7.1 Αποτελέσματα ανίχνευσης αφλατοξίνης με τη μέθοδο HPLC

Από την ανάλυση με τη μέθοδο HPLC προέκυψαν τα δεδομένα των πινάκων 7.1, 7.2 και 7.3:

Πίνακας 7.1. Ποσότητα αφλατοξίνης στα φυσικώς μολυσμένα δείγματα.

Κατηγορία	Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα Αφλατοξίνης (μg/kg)
NC: Φυσικώς μολυσμένα με αφλατοξίνη	NC-3	1015,3
	NC-4	1143,3
	NC-5	794,5
	NC-6	661,55
	NC-7	1047,5
	NC-8	600,1
	NC-9	1088,64
	NC-10	831,24
	NC-11	593,68
	NC-12	774,2

Πίνακας 7.2. Ποσότητα αφλατοξίνης στα τεχνητώς μολυσμένα με τοξικογόνα στελέχη δείγματα.

Κατηγορία	Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα Αφλατοξίνης (μg/kg)
AC: Τεχνητά μολυσμένα με τοξικογόνα στελέχη του μύκητα <i>A. flavus</i>	AC-1.1	415,2
	AC-2.1	369,7
	AC-3.1	464,7
	AC-1.2	17,8
	AC-2.2	10
	AC-3.2	344,3
	AC-6/12	273,9
	AC-7/12	64
	AC-9/12	53,13
	AC-3/12	361,66
	AC-5/12	386,21
	AC-8/12	28,47
	AC-2/10	2,81
	AC-4/12	374,34

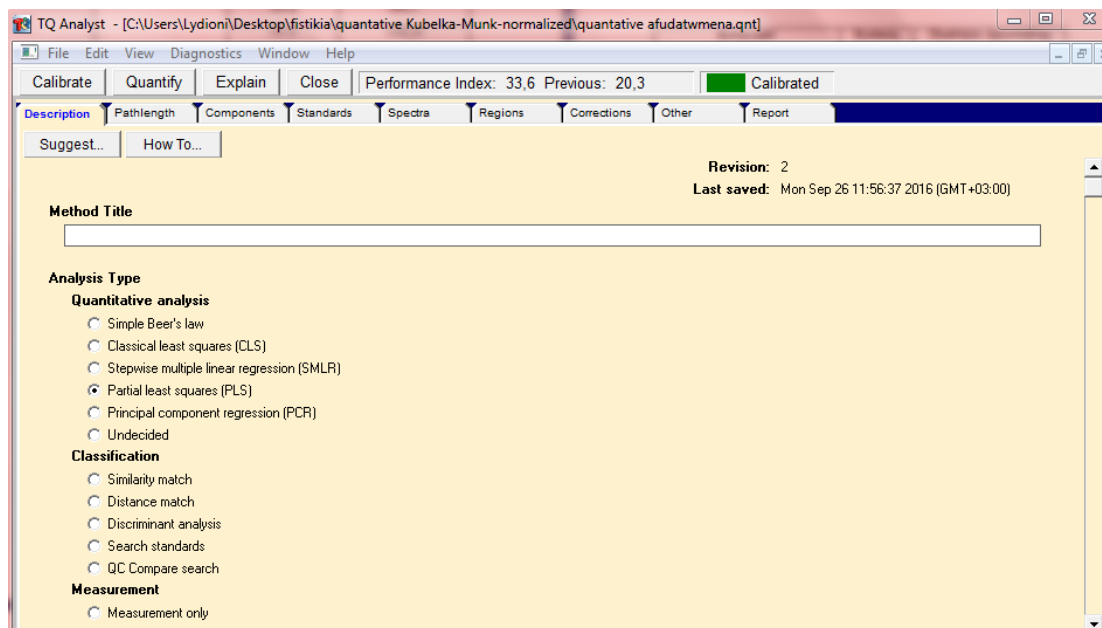
Πίνακας 7.3. Ποσότητα αφλατοξίνης στα τεχνητώς μολυσμένα με μη τοξικογόνα στελέχη δείγματα.

Κατηγορία	Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα Αφλατοξίνης (μg/kg)
ANT: Τεχνητά μολυσμένα με μη τοξικογόνα στελέχη του μύκητα <i>A. flavus</i>	ANT-1/7	48,48
	ANT-2.2	9,4

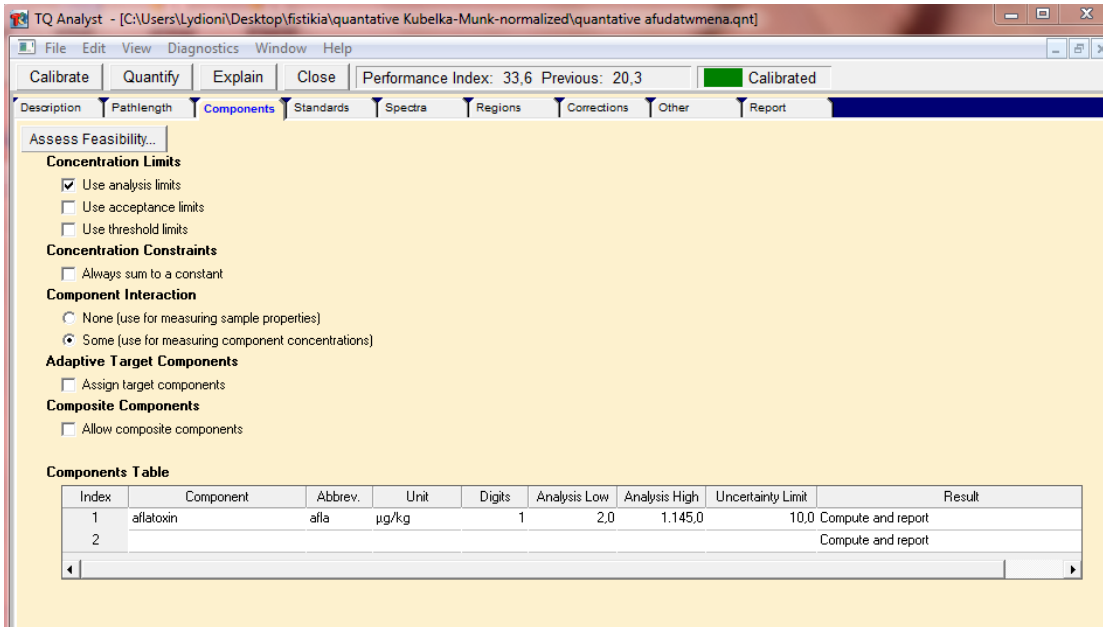
Γ.7.2 Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξίνης στα κονιορτοποιημένα δείγματα με τη μέθοδο PLS

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με τα προαναφερόμενα με τη διαφορά ότι:

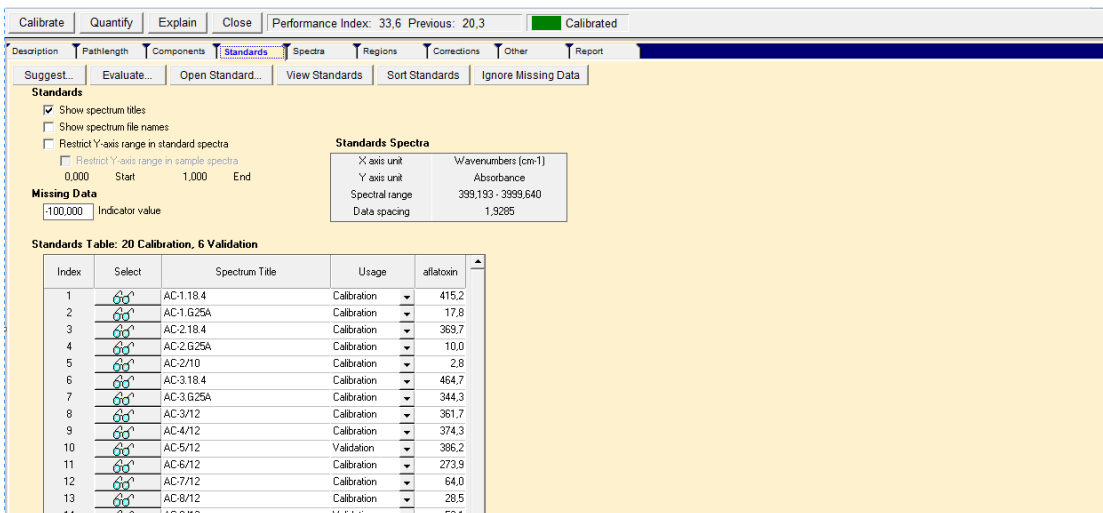
A) Στο Description επιλέγουμε Quantitative Analysis: PLS



Β) Στην παράμετρο Components εισάγουμε τα δεδομένα όπως φαίνονται στην παρακάτω εικόνα

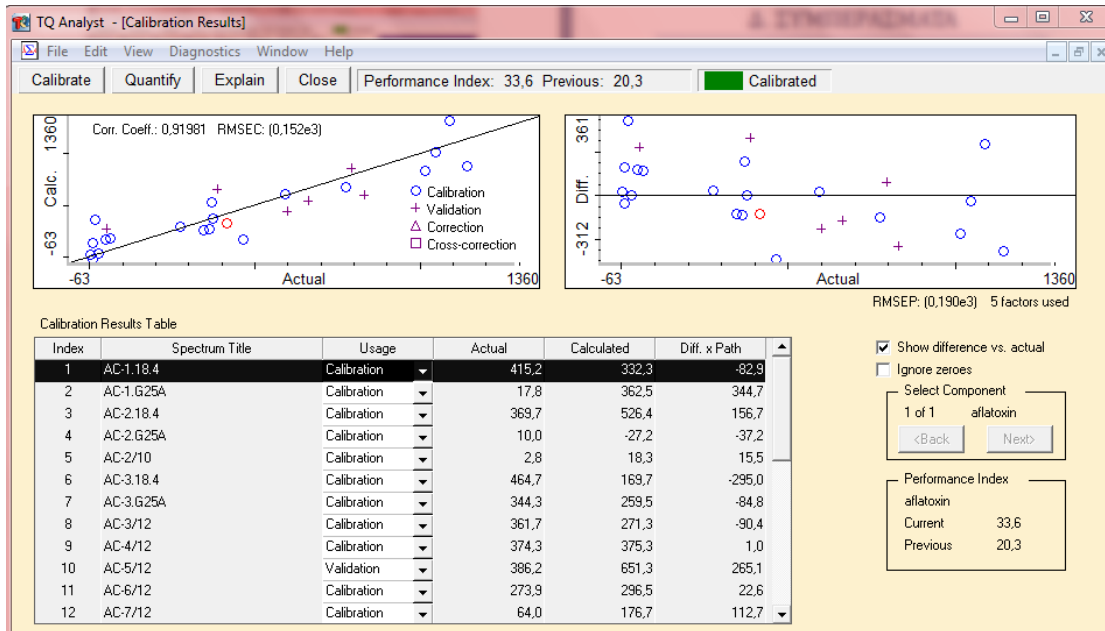


Γ) Στην παράμετρο Standards εισάγουμε τα φάσματα και την ποσότητα αφλατοξίνης για το κάθε δείγμα σύμφωνα με τα δεδομένα των πινάκων Γ.7.1, Γ.7.2, Γ.7.3.



Συμπεραίνουμε ότι δεν παρατηρούνται ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον ποσοτικό διαχωρισμό των κονιορτοποιημένων δειγμάτων. Από τη μία ο συντελεστής συσχέτισης R^2 είναι ικανοποιητικός ($R^2 = 0,91981$), αλλά από την άλλη οι τιμές των

RMSEC και RMSEP, αν και κοντινές, είναι ιδιαίτερα υψηλές (RMSEC = 152 και RMSEP = 190).



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα στα οποία οδηγηθήκαμε είναι τα εξής:

- Ο ποιοτικός διαχωρισμός μεταξύ υγιών και μολυσμένων κονιορτοποιημένων δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης με την τεχνική FTIR (DRIFTS) είναι επιτυχημένος. Στις περιοχές $1770,17-1721,20\text{ cm}^{-1}$ και $3034,51-2820,65\text{ cm}^{-1}$ το ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού είναι 91,8%.
- Ο ποιοτικός διαχωρισμός φιστικέλαιου Αιγίνης από υγιή και μολυσμένα δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης με την τεχνική FTIR (δισκία ZnSe) είναι επιτυχημένος. Στις περιοχές $1772,26-1683,55\text{ cm}^{-1}$ και $3035,41-2821,35\text{ cm}^{-1}$ το ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού είναι 83,4%.
- Ο ποιοτικός διαχωρισμός φιστικέλαιου Αιγίνης από υγιή και μολυσμένα δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης με την τεχνική Raman είναι επιτυχημένος. Στις περιοχές $1681,03-1626,46\text{ cm}^{-1}$ και $1491,25-1400,70\text{ cm}^{-1}$ το ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού είναι 85,7%.
- Η ποιοτική διαφοροποίηση μεταξύ υγιών και μολυσμένων κονιορτοποιημένων δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης με την τεχνική FTIR (DRIFTS) βασίζεται κυρίως στην περιοχή των πρωτεϊνών και των λιπιδίων.
- Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού μεταξύ αποξηραμένων και αφυδατωμένων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης. Για τα υγιή δείγματα, το ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού μεταξύ αποξηραμένων και αφυδατωμένων δειγμάτων είναι 78,6%. Για τα φυσικώς μολυσμένα με αφλατοξίνη δείγματα, το ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού μεταξύ αποξηραμένων και αφυδατωμένων δειγμάτων είναι 80,0%.

Αυτή η διαφοροποίηση πιθανόν να οφείλεται στη διαφοροποίηση των πρωτεϊνών λόγω θέρμανσης των αφυδατωμένων δειγμάτων, λόγω οξειδώσεων των αποξηραμένων δειγμάτων και λόγω μεγαλύτερης περιεκτικότητας των αποξηραμένων δειγμάτων σε νερό που δημιουργεί πρόβλημα στα φάσματα.

- Ο διαχωρισμός μεταξύ υγιών και μολυσμένων κονιορτοποιημένων δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης είναι προτιμότερο να γίνει με τα αφυδατωμένα δείγματα και όχι με τα αποξηραμένα δείγματα.
- Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού μεταξύ των φασμάτων average και των φασμάτων τροποποιημένων με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk. Το ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού μεταξύ υγιών και μολυσμένων κονιορτοποιημένων δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης με την τεχνική FTIR (DRIFTS) είναι 85,71% για τα φάσματα average. Το ποσοστό επιτυχίας του ποιοτικού διαχωρισμού μεταξύ υγιών και μολυσμένων κονιορτοποιημένων δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης με την τεχνική FTIR (DRIFTS) είναι 91,8% για τα φάσματα τροποποιημένα με τον αλγόριθμο Kubelka-Munk.
- Ο ποσοτικός διαχωρισμός μεταξύ υγιών και μολυσμένων κονιορτοποιημένων δειγμάτων κελυφωτών φιστικιών Αιγίνης δεν είναι ικανοποιητικός. Από τη μία ο συντελεστής συσχέτισης R^2 είναι ικανοποιητικός ($R^2 = 0,91981$), αλλά από την άλλη οι τιμές των RMSEC και RMSEP, αν και κοντινές, είναι ιδιαίτερα υψηλές (RMSEC = 152 και RMSEP = 190).

Ανακεφαλαιώνοντας, στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκε η αποτελεσματικότητα των τεχνικών DRIFT και Raman για την ανίχνευση μολυσμένων με αφλατοξίνη κελυφωτών φιστικιών και μολυσμένου με αφλατοξίνη φιστικέλαιου Αιγίνης. Συμπεραίνουμε ότι οι τεχνικές DRIFT και Raman με τη βοήθεια της Χημειομετρίας είναι αποτελεσματικές για τον ποιοτικό διαχωρισμό, αλλά ανεπαρκείς για ποσοτικό προσδιορισμό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΛΙΘΩΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdulkadar, A. H. W., Al-Ali, A., & Al-Jedah, J. (2000). Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*, *11*, 157-160.

Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2015). Aflatoxins in animal feeds: A straightforward and cost-effective analytical method. *Food Control*, *54*, 74–78.

Cheraghali, A. M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Aliabadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghiy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E., & Zamanian, F. (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, *45*, 812–816.

Chitzanidis, A. (2010). From Asia to Aigina: The story of the pistachio tree. In: G. Zakynthinos (Ed.), *XIV GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds* (pp. 299-302). Zaragoza: CIHEAM / FAO / AUA / TEI Kalamatas / NAGREF (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 94).

Christy, A. A., Kvalheim, O. M., & Velapoldi, R. A. (1995). Quantitative analysis in diffuse reflectance spectrometry: A modified Kubelka-Munk equation. *Vibrational Spectroscopy*, *9*, 19-27.

Christy, A. A., Liang, Y., Hui, C., & Kvalheim, O. M. (1993). Effect of particle size on diffuse reflectance infrared spectra of polystyrene spheres. *Vibrational Spectroscopy*, *5*, 233-244.

Egner, P. A., Wang, J. B., Zhy, Y. R., Zhang, B. C., Wu, Y., Zhang, Q. N., Qian, G. S., Kuang, S. Y., Gange, S. J., Jacobson, L. P., Helzlsouer, K. J., Bailey, G. S., Groopman, J. D., & Kensler, T. W. (2001). Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin - DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *98*(25), (pp. 14601-14606).

Faulkner, G. A. (2014). *Aflatoxins-Food Sources, Occurrence and Toxicological Effects*. New York: Nova.

Ferguson, L., Polito, V., & Kallsen, C. (2005). The pistachio tree: Botany and physiology and factors that affect yield. In: L. Ferguson (Ed.), *Pistachio production manual* (pp. 31-39). USA: University of California Inc.

Fusco, V., Besten, H. M. W., Logrieco, A. F., Rodriguez, F. P., Skandamis, P. N., Stessl, B., & Teixeira, P. (2015). Food safety aspects on ethnic foods: toxicological and microbial risks. *Current Opinion in Food Science*, *6*, 24–32.

- Garon, D., Kaddoumi, A. E., Carayon, A., & Amiel, C. (2010). FT-IR Spectroscopy for Rapid Differentiation of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* and Characterization of Aflatoxigenic Isolates Collected from Agricultural Environments. *Mycopathologia*, *170*, 131–142.
- Georgiadou, M., Dimou, A., & Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control*, *26*, 580-586.
- Guevara-González, R. G. (2011). *Aflatoxins-Biochemistry and molecular biology*. Croatia: Intech.
- Haff, R. P., & Pearson, T. (2006). Spectral band selection for optical sorting of pistachio nut defects. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*, *49*(4): 1105–1113.
- Harris, L. J. (2013). Improving the safety and quality of nuts. In: L. Harris (Ed.), *Food Science, Technology and Nutrition*. UK: Woodhead Publishing Inc.
- Karoui, R., Downey, G., & Blecker, C. (2010). Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure-Quality Relationships. *Chemical Reviews*, *110*, 6144–6168.
- Kaya-Celikera, H., Mallikarjunana, P. K., & Dalay, O. (2011). Determination of aflatoxin level in peanut paste using Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection. In: P. S. Taoukis, N. G. Stoforos, V. T. Karathanos, & G. D. Saravacos (Eds), *Applying Advances in Food Process Engineering in a Changing World: The Industry Perspective* (pp. 141-152). Berlin: Springer Inc.
- Kaya-Celiker, H., Mallikarjuna, P. K., & Kaaya, A. (2015). Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts. *Food Control*, *52*, 103-111.
- Kyung-Min, L., Davis, J., Herrman, T. J., Murray, S. C., & Deng, Y. (2015). An empirical evaluation of three vibrational spectroscopic methods for detection of aflatoxins in maize. *Food Chemistry*, *173*, 629–639.
- Kyung-Min, L., Herrman, T. J., & Yun, U. (2014). Application of Raman spectroscopy for qualitative and quantitative analysis of aflatoxins in ground maize samples. *Journal of Cereal Science*, *59*, 70-78.
- Mahmoudi, R., Norian, R., Katirae, F., Pajohi-Alamoti, M. R., & Emami, S. J. (2014). Occurrence of aflatoxin B1 in pistachio nuts during various preparing processes: Tracing from Iran. *Mycology Research*, *1*(1), 1-5.
- Maragos, C. M. (2006). Fluorescence polarization for mycotoxin determination. *Mycotoxin Research*. *22*(2), 96-99.

- Markaki, P., Velivassaki, K., Giannitsis, D., & Galanopoulou, D. (2006). Methyl jasmonate effect on AFB1 production by olives inoculated with *A. parasiticus* is concentration-dependent. In: H. Njapau, S. Trujillo & H.P vanEgmond (Eds), *Mycotoxins and Phycotoxins - Advances in determination, toxicology and exposure management*. The Netherlands: Wageningen Academic Inc.
- Mirghani, M. E. S., Che Man, Y. B., Jinap, S., Baharin, B. S., & Bakar, J. (2001). New Method for Determining Aflatoxins in Groundnut and Groundnut Cake Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance. *JAOCS*, 78(10), 985-992.
- Mosiello, L., & Lamberti, I. (2011). Biosensors for Aflatoxins Detection. In: I. Torres-Pacheco (Ed.), *Aflatoxins-Detection, Measurement and Control* (pp. 147-158). Rome: ENEA Inc.
- Pavao, A. C., Soares Neto, L. A., Ferreira Neto, J., & Leao, M.B.C. (1995). Structure and activity of aflatoxins B and G. *Journal of Molecular Structure*, 337, 57-60.
- Pittet, A. (2005). Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 96, 424-444.
- Razzaghi-Abyaneh, M. (2013). *Aflatoxins-Recent advanced and future prospects*. Croatia: Intech.
- Smela, M. E., Currier, S. S., Bailey E. A., & Essigmann J. M. (2001). The chemistry and biology of aflatoxin B1: From mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22(4), 535-545.
- Smita, T., & Mishra, H. N. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control*, 20, 840-846.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. UK: John Wiley & Sons.
- Teena, M. A., Manickavasagan, A., & Jayas, D. S. (2014). Near infrared (NIR) hyperspectral imaging to classify fungal infected date fruits. *Journal of Stored Products Research*, 59, 306-313.
- Tsitsigiannis, D. I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P. P., & Tjamos, E. C. (2012). Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathologia Mediterranea*. 51(1), 158-174.
- Vergopoulou, S., Galanopoulou, D., & Markaki, P. (2001). Methyl jasmonate aflatoxin B1 biosynthesis by *A. parasiticus*. *Agric Food Chem*, 49(7), 3494-3498.
- Vitale, R., Bevilacqua, M., Bucci, R., Magrì, A. D., Magrì, A. L., & Marini, F. (2013). A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by

NIR spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 121, 90–99.

WHO. (1998). *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. In: JECFA (Eds.), *Food Additive Series* (pp. 359-468). Geneva: WHO Inc.

Williams, J. H., Phillips T. D., Jolly P. E., Stiles J. K., Jolly C. M., & Aggarwal D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The Amsterdam Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.

Yanniotis, S., Proshlyakov, A., Revithi, A., Georgiadou, M., & Blahovec, J. (2011). X-ray imaging for fungal necrotic spot detection in pistachio nuts. *Procedia Food Science*, 1, 379 – 384.

Yanniotis, S., & Zarboutis, I. (1996), Water sorption isotherms of pistachio nuts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 372-375.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2002). *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*. Αθήνα: Κωσταράκης.

Αποστολόπουλος, Ν. (2011). Μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών παραμέτρων ανάπτυξης της μυκοτοξίνης ζεαραλενόνης (ZON) σε δημητριακά. Μεταπτυχιακή μελέτη, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Πατρών.

Γεωργιάδου, Μ. (2009). Μελέτη του προβλήματος των αφλατοξινών. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Γεωργιάδου, Μ. (2015). Μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών με στόχο τη μείωση της αφλατοξίνης. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κουβουτσάκης, Π. Γ. (2013). Γεωγραφική ταξινόμηση οσπρίων φακής (*Lens culinaris* L.) με χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας συνδυασμένης με χημειομετρικές μεθόδους. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μπαλατσούρας, Γ. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα: Έμβρο.

Παπιάς, Χ. (2000). Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.). Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Πετρωτός, Κ. (2010). Ανάπτυξη Ταχείας Μεθόδου Ανάλυσης Επικίνδυνων Μυκοτοξινών σε Ξηρούς Καρπούς. Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων ΤΕΙ Λάρισας.

Ταραντίλης, Π. (2004). Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης – Παραλαβή, διαχωρισμός, απομόνωση, καθαρισμός και

ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

Lillard-Roberts, S. «Symptoms of Fungal Exposure (Mycotoxicosis)». 2004
<<http://www.mold-survivor.com/symptoms.html>> (15 October 2016)

ICRISAT. «Combating Aflatoxin». 2016
<<http://www.icrisat.org/aflatoxin/>> (15 October 2016)

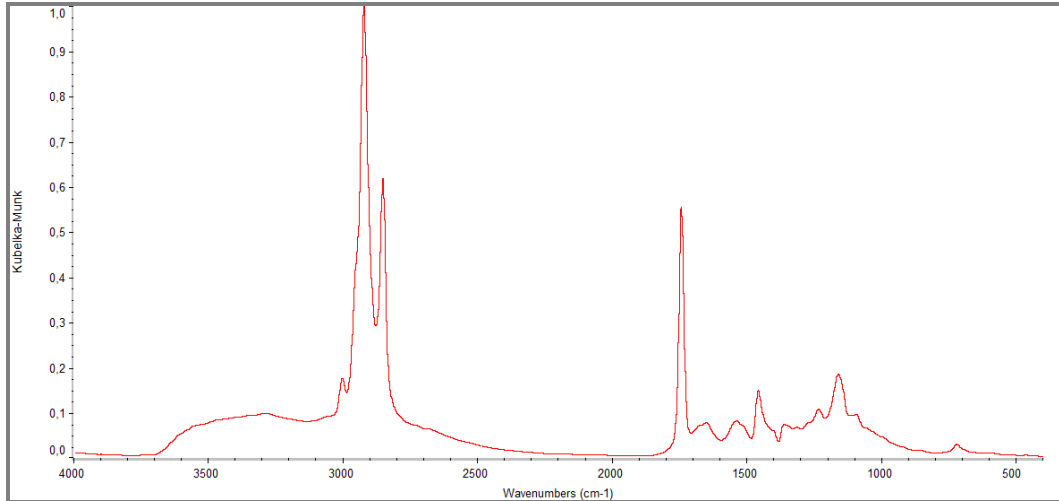
Cornell University. «Aflatoxins: Occurrence and Health Risks». 2015
<<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>>

Thermoscientific. «Introduction to FT-IR: Sample Handling». 2013
<https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD%20Documents/Catalogs%20%26%20Brochures/Molecular%20Spectroscopy/FTIR/FTIR%20Spectrometers/BR50557_E_IntroSampHand0613M_H_1.pdf> (15 October 2016)

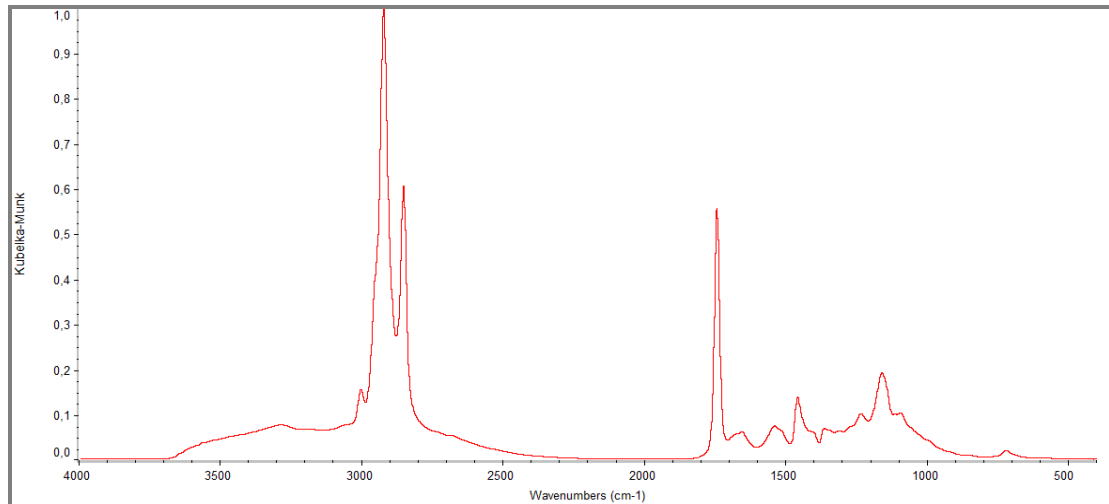
PerkinElmer Life and Analytical Sciences. «FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR)». 2005
<http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf> (15 October 2016)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

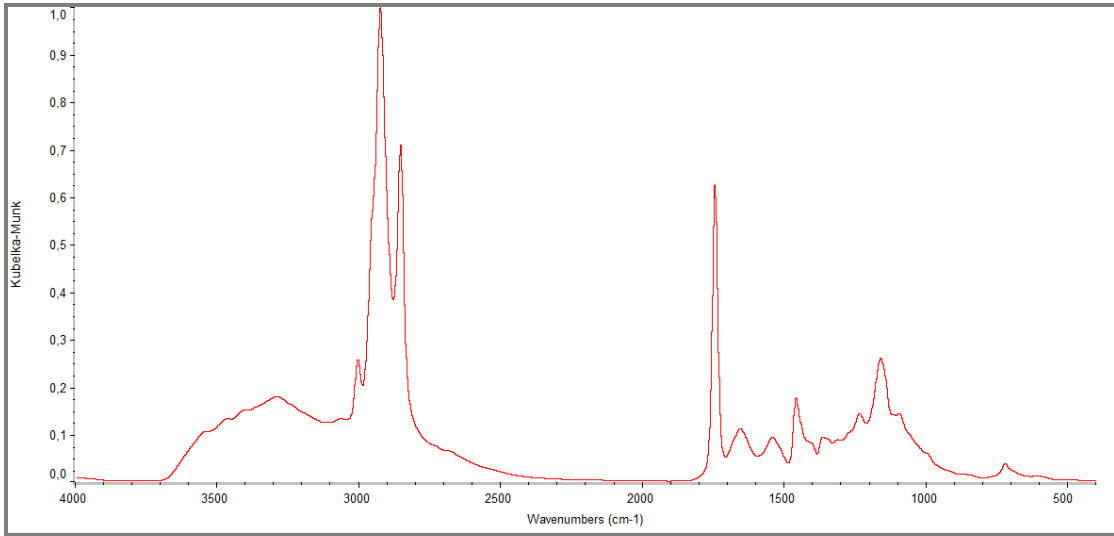
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 – ΦΑΣΜΑΤΑ FTIR ΦΙΣΤΙΚΙΩΝ ΑΙΓΙΝΗΣ



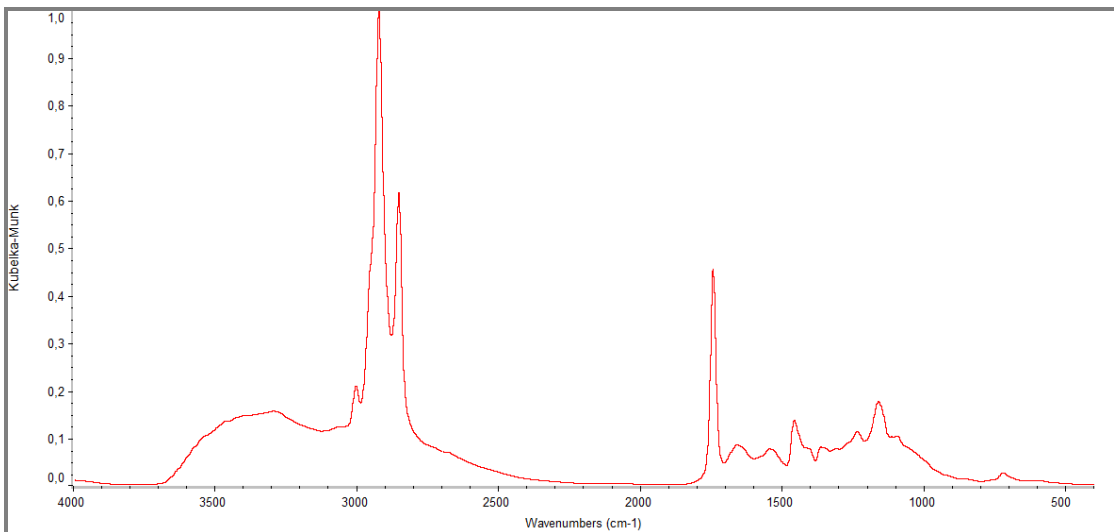
Π.1.1. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-2).



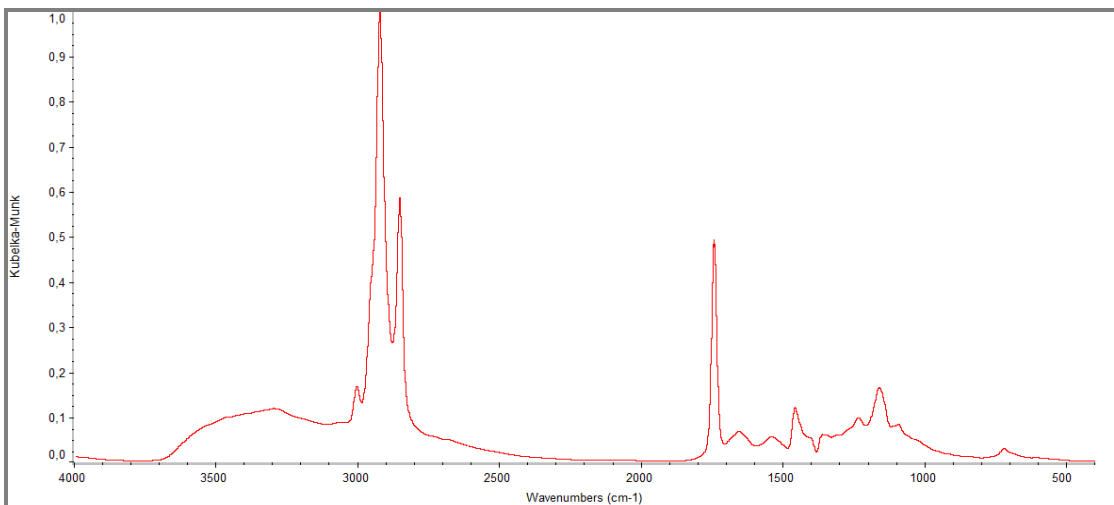
Π.1.2. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-3).



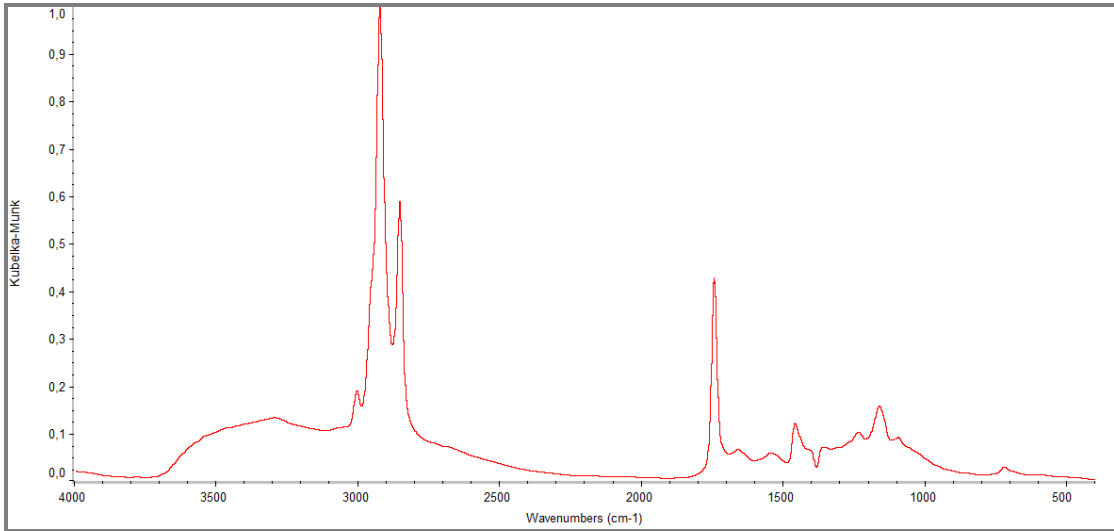
Π.1.3. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-4).



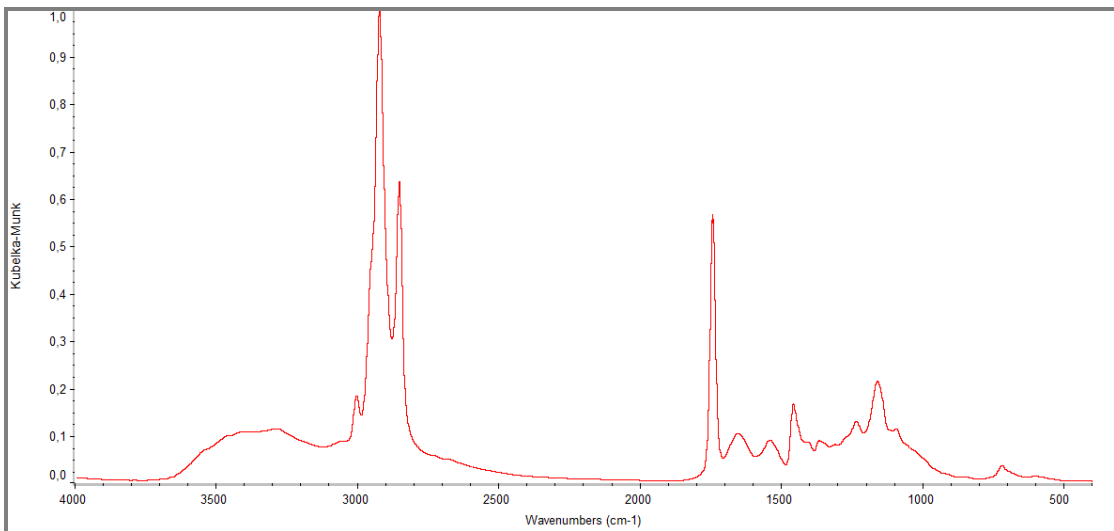
Π.1.4. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-5).



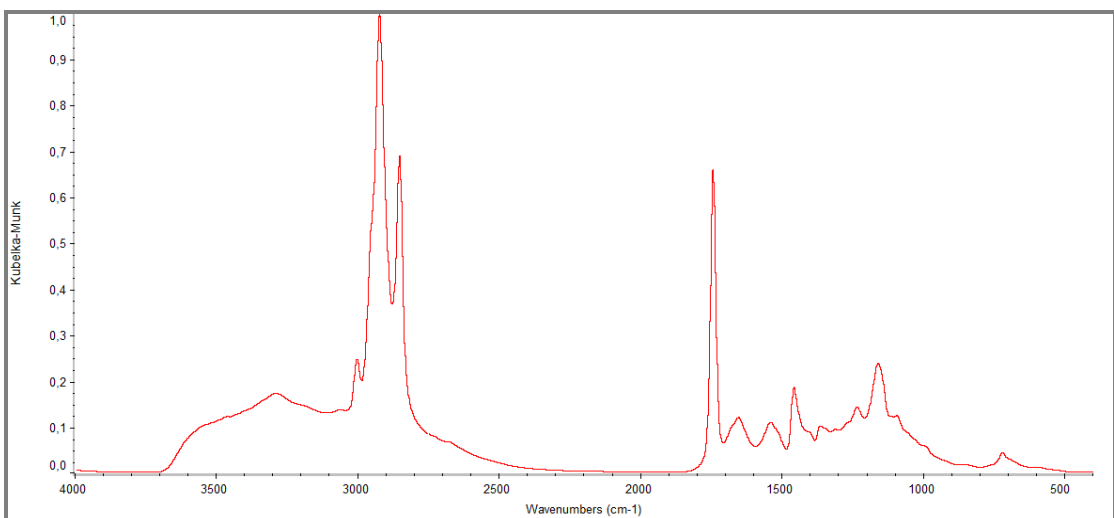
Π.1.5. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-6).



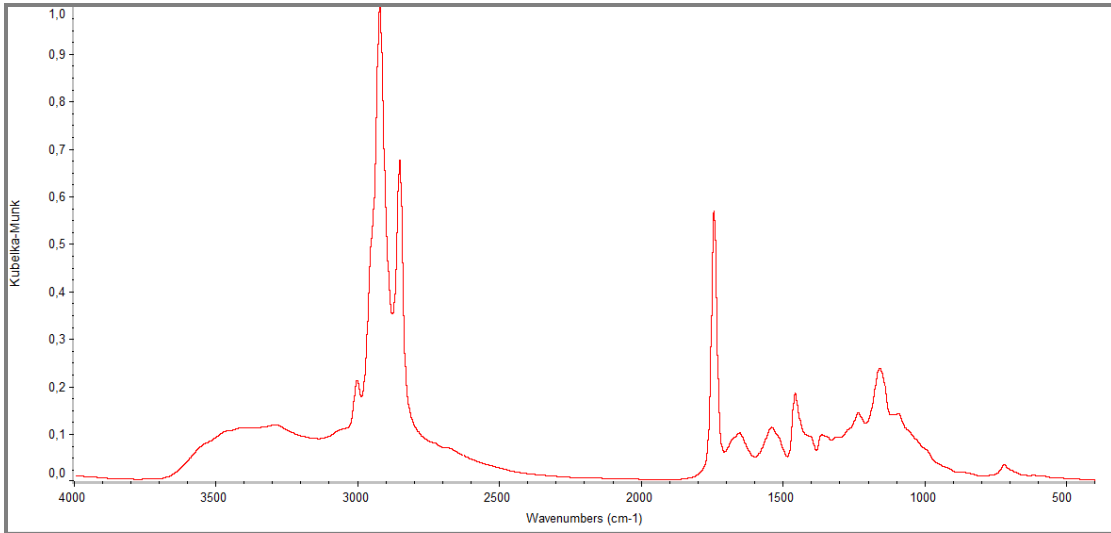
Π.1.6. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-7).



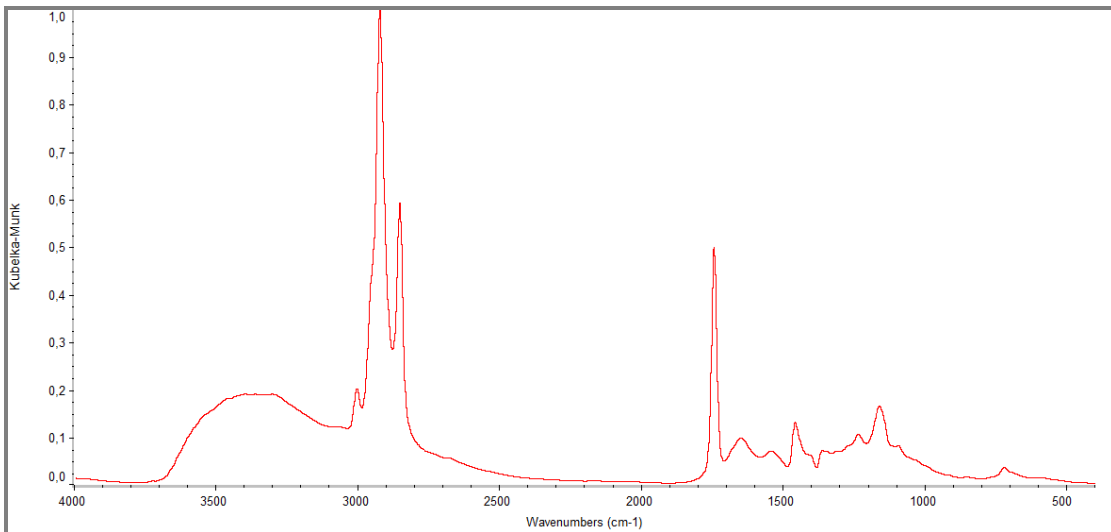
Π.1.7. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-8).



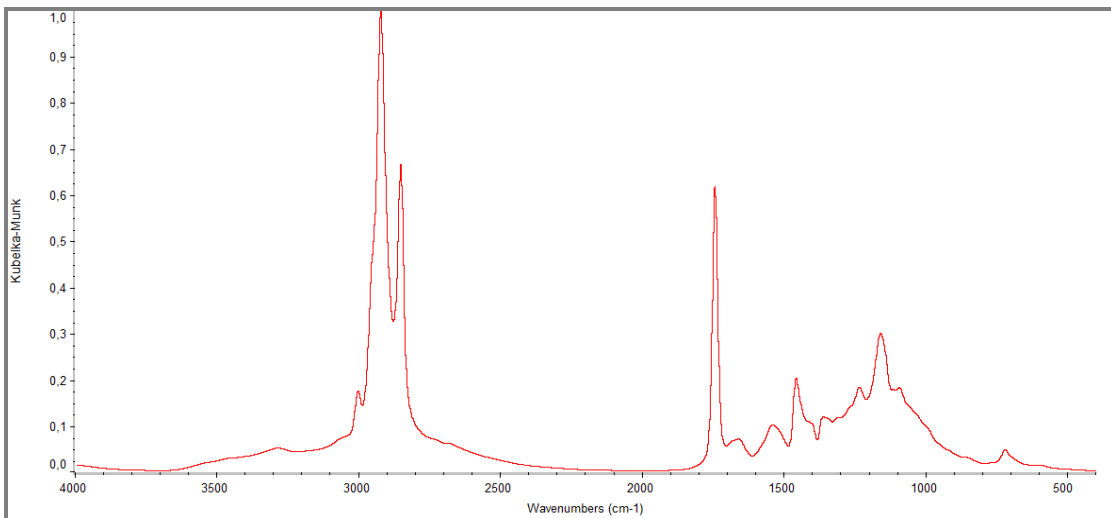
Π.1.8. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-9).



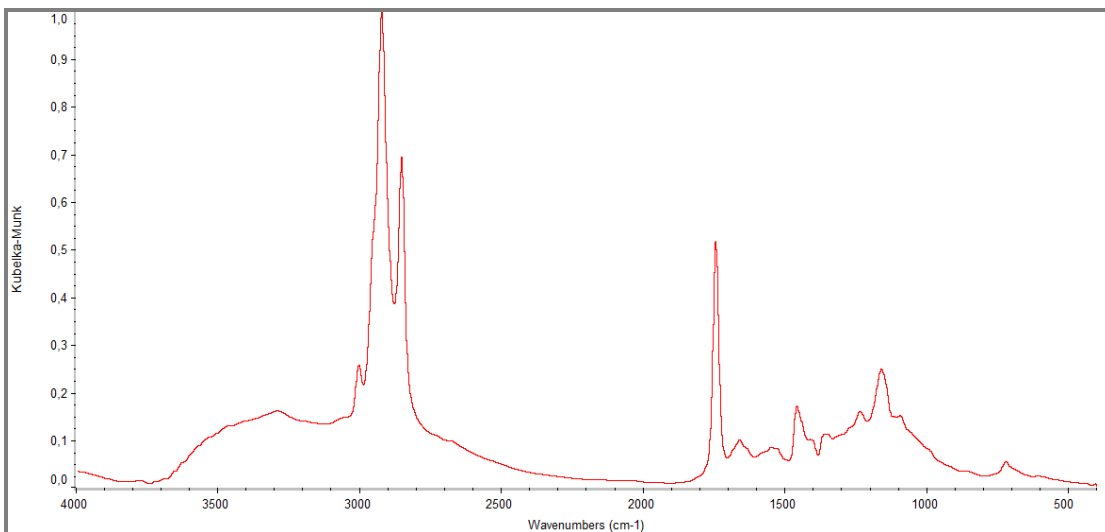
Π.1.9. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-10).



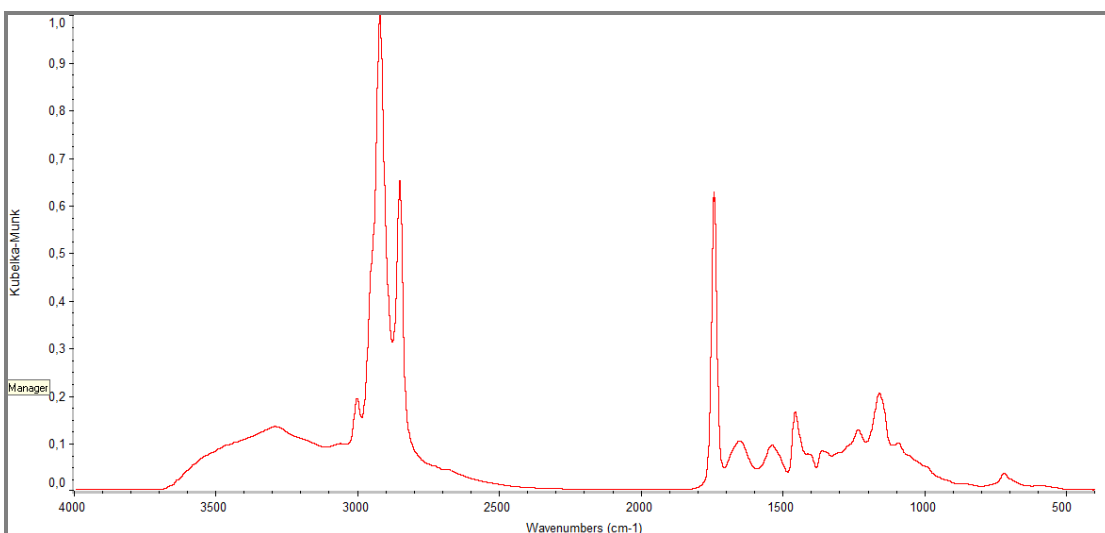
Π.1.10. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-11).



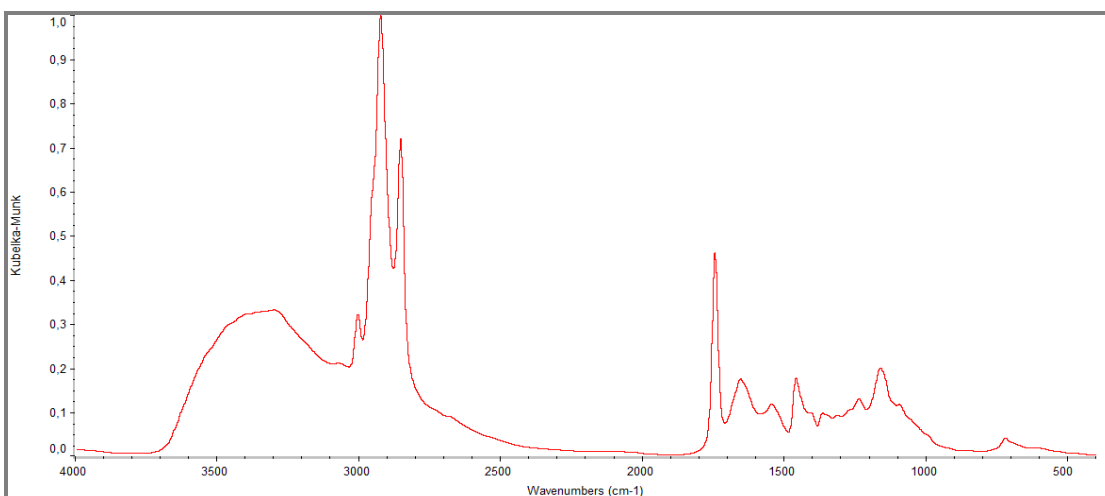
Π.1.11. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-12).



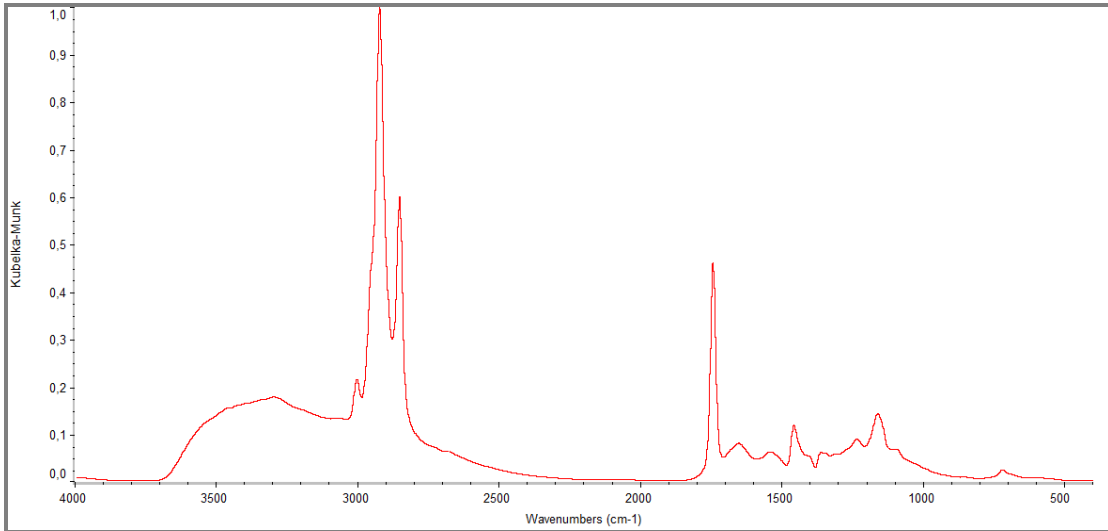
Π.1.12. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-13).



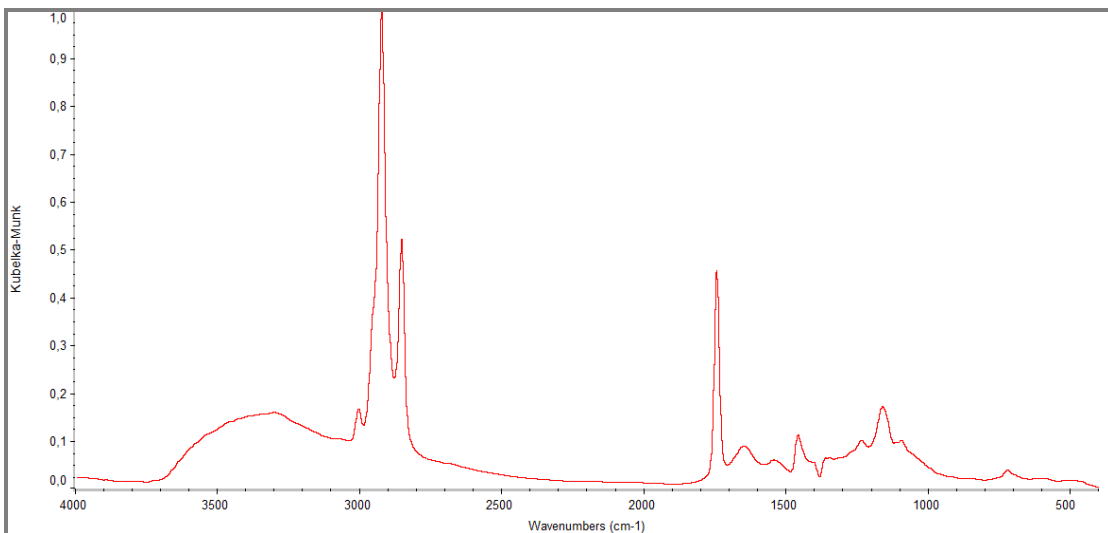
Π.1.13. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-14).



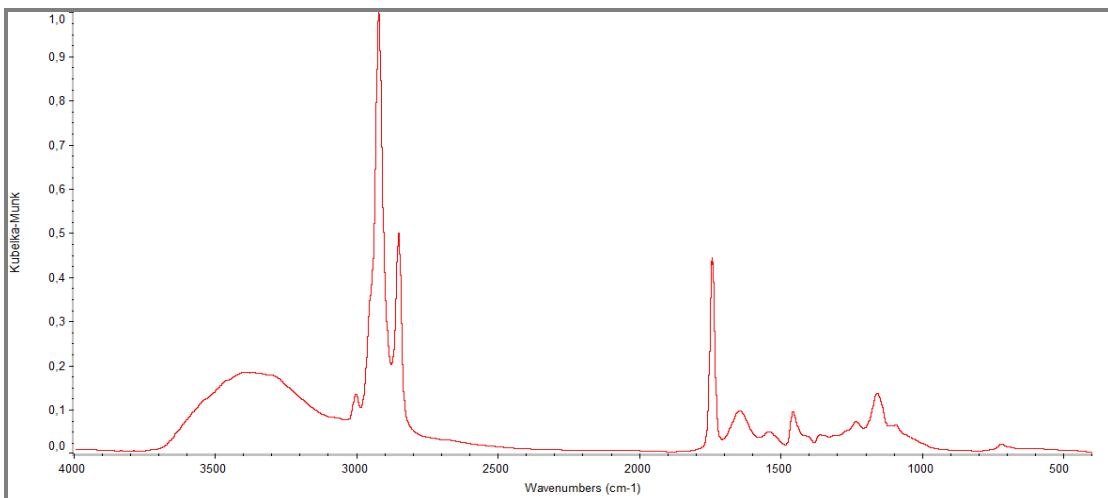
Π.1.14. Φάσμα FTIR υγιούς φιστικιού Αιγίνης (H-15).



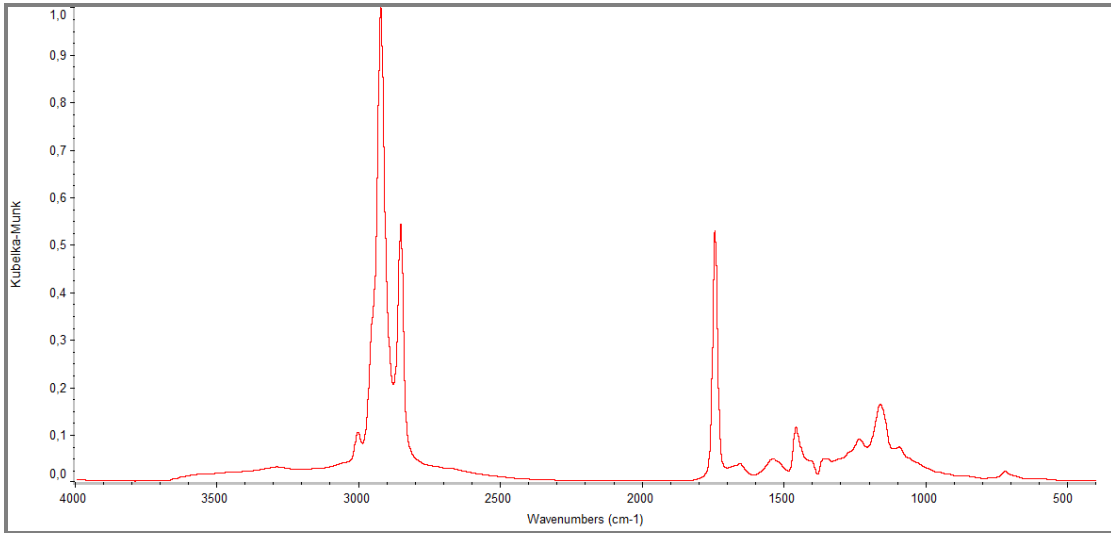
Π.1.15. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-3).



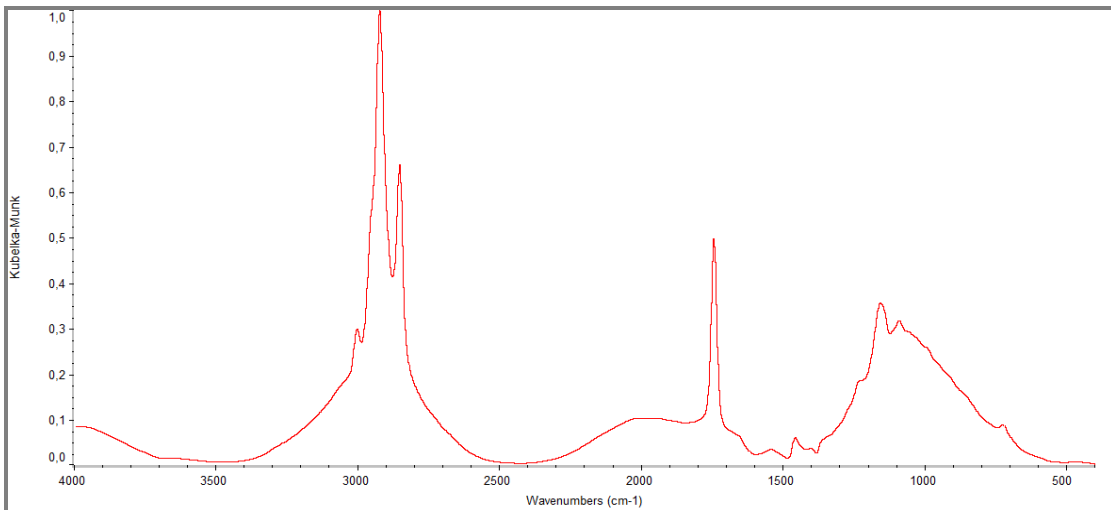
Π.1.16. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-4).



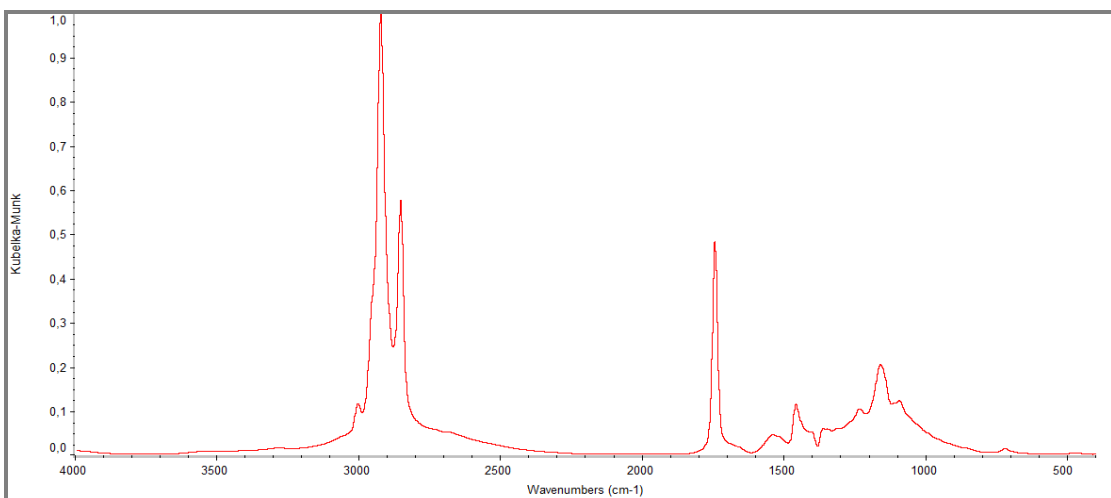
Π.1.17. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-5).



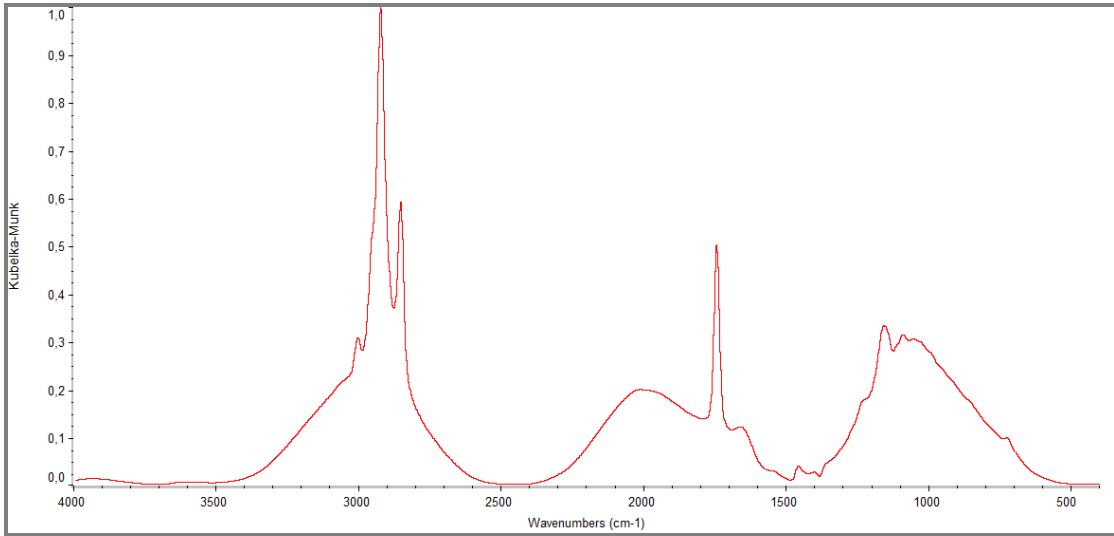
Π.1.18. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-6).



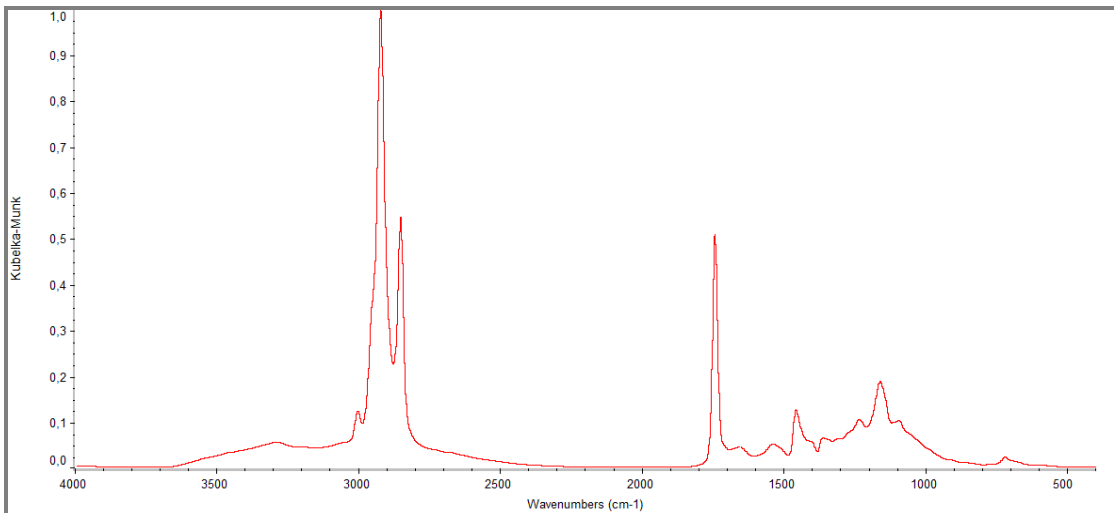
Π.1.19. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-7).



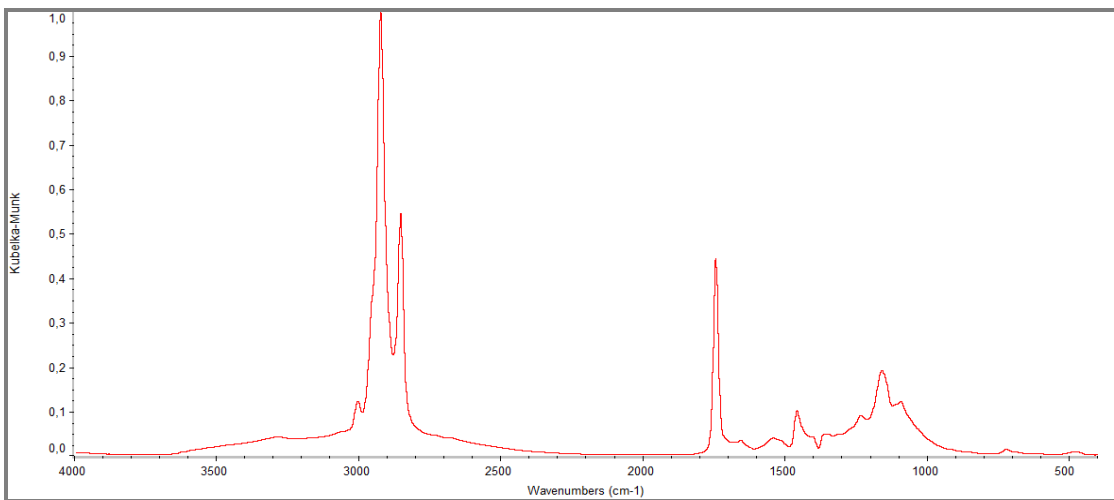
Π.1.20. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-8).



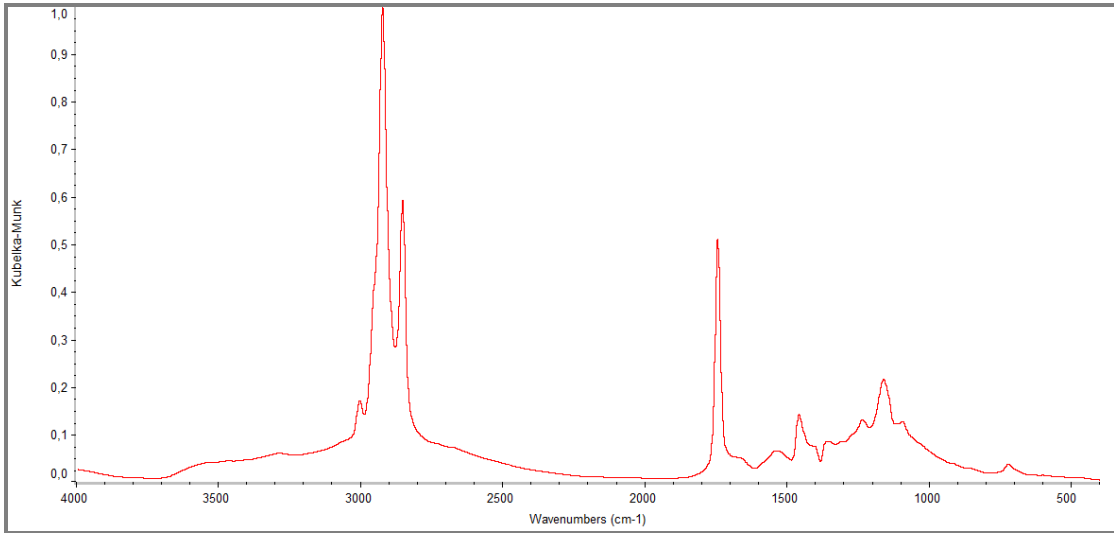
Π.1.21. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-9).



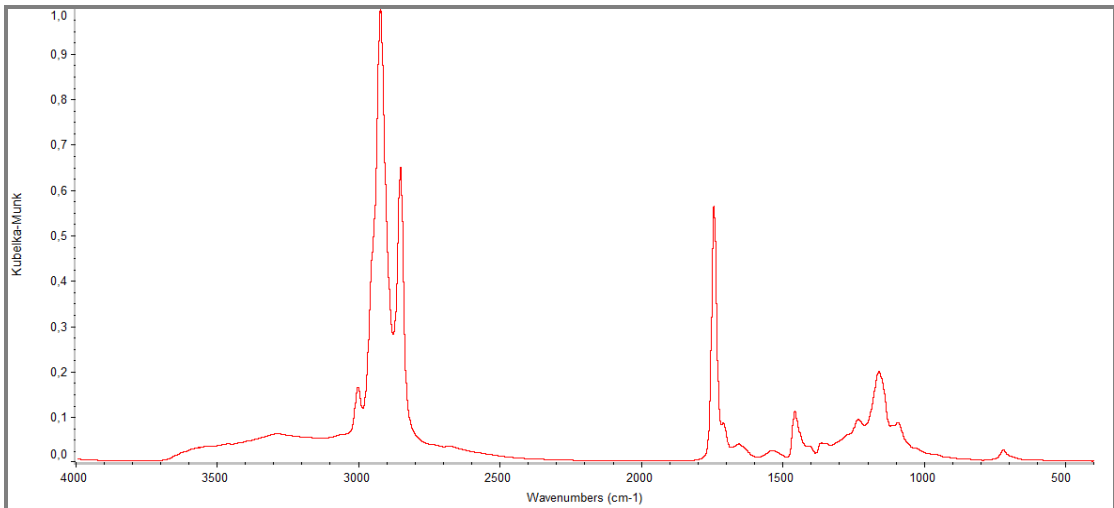
Π.1.22. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-10).



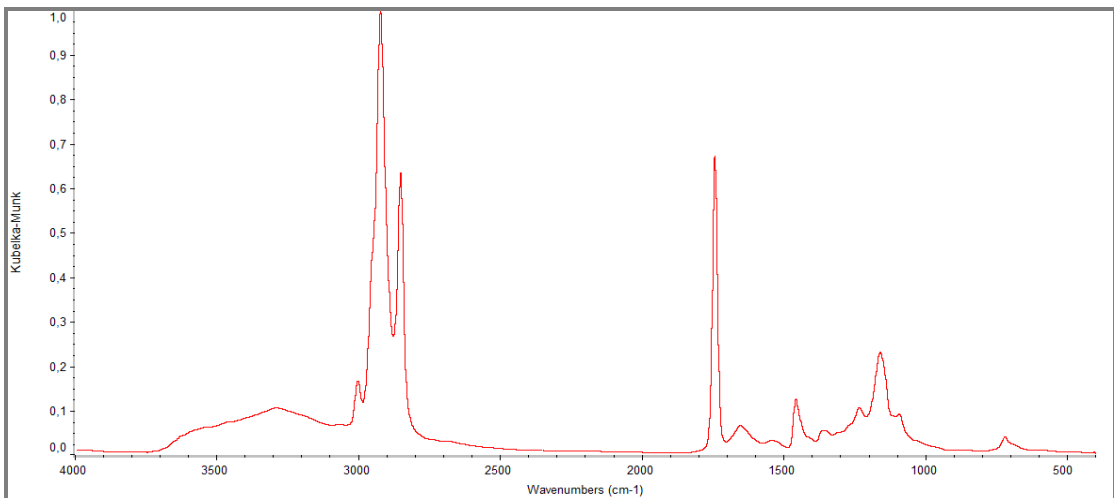
Π.1.23. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-11).



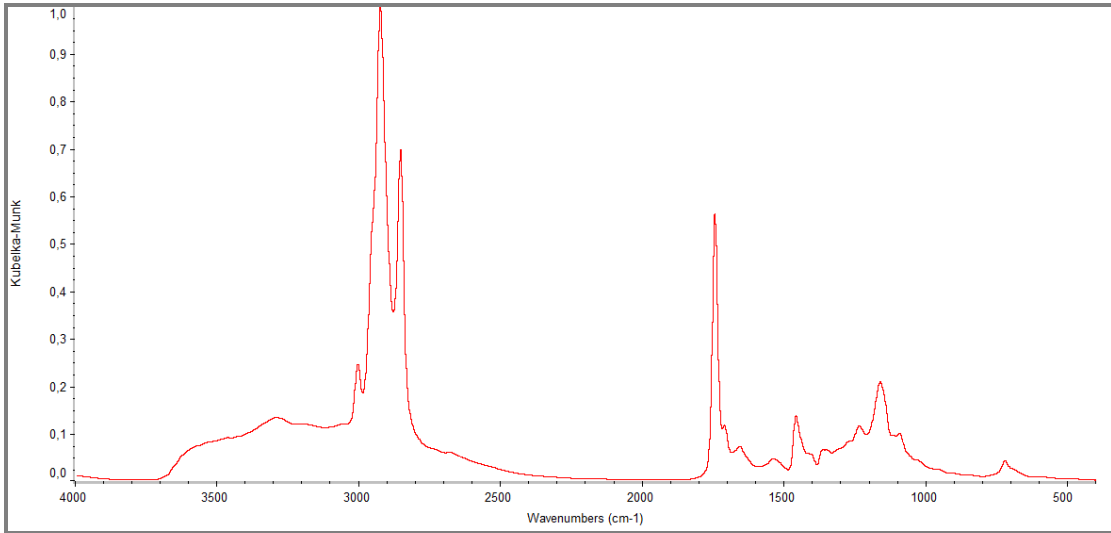
Π.1.24. Φάσμα FTIR φυσικώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (NC-12).



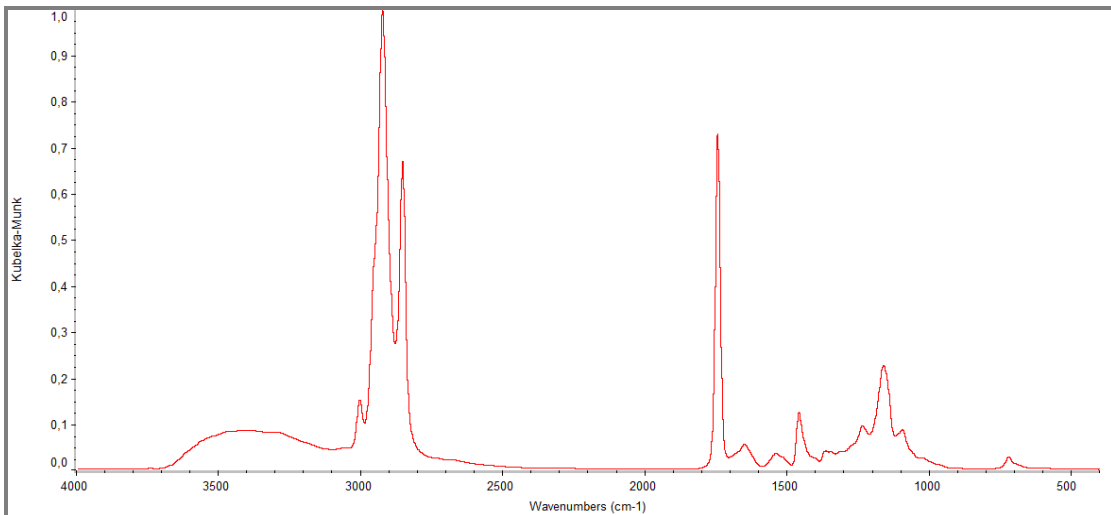
Π.1.25. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-1.1).



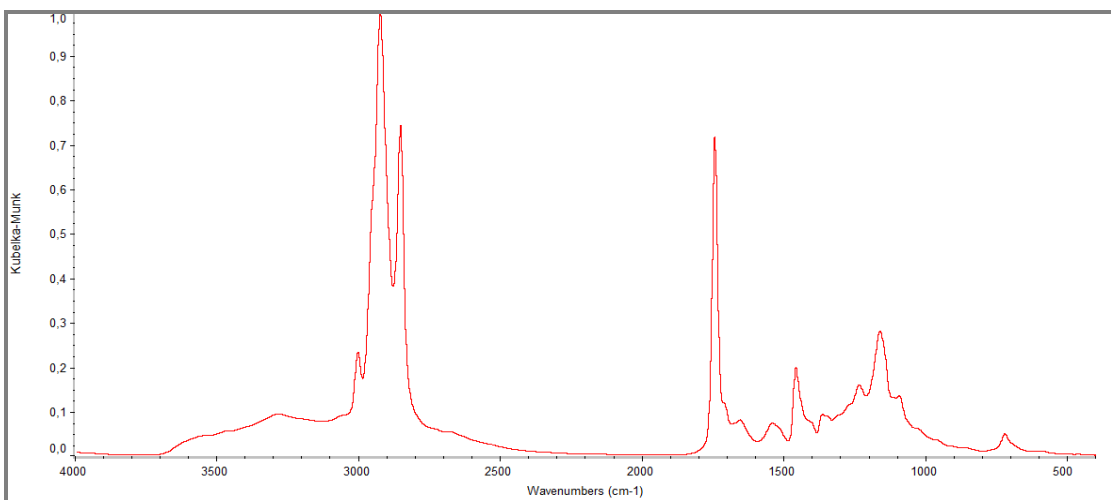
Π.1.26. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-1.2).



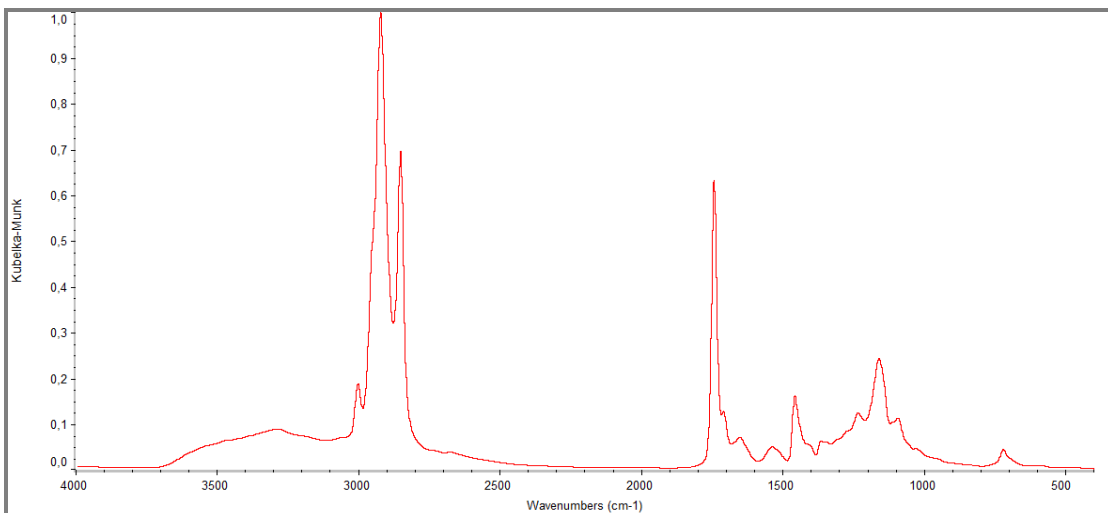
Π.1.27. Φάσμα FTIR τεχνητός μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-2.1).



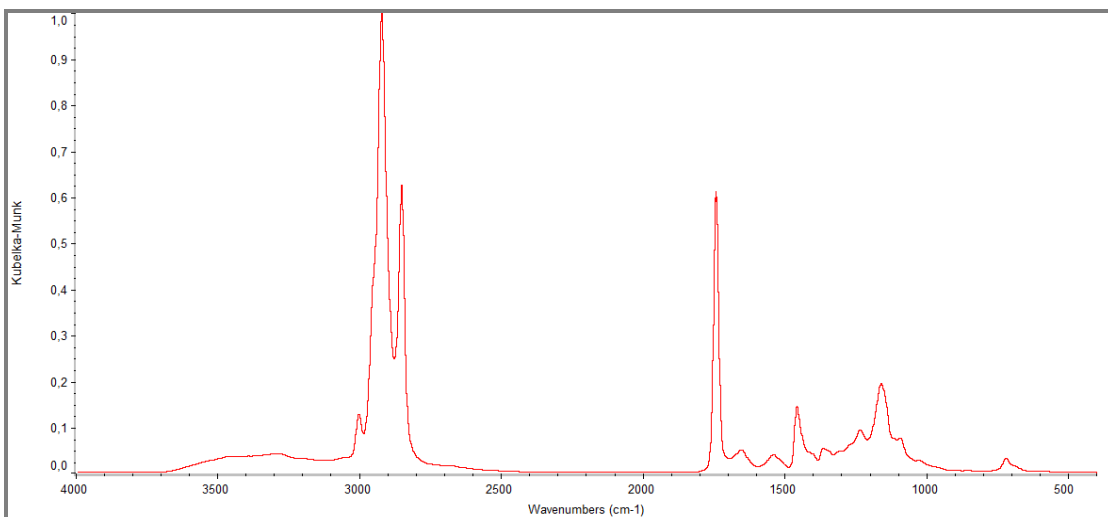
Π.1.28. Φάσμα FTIR τεχνητός μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-2.2).



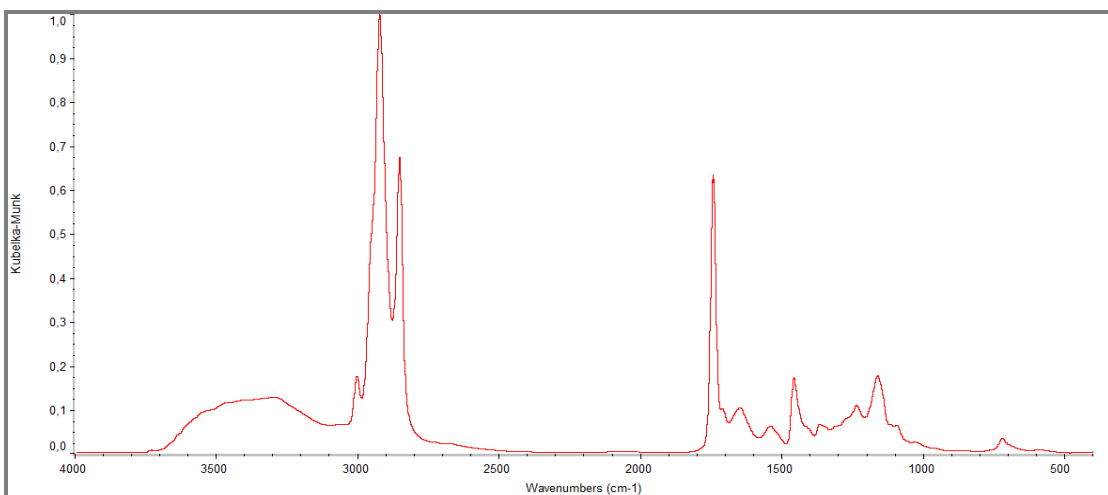
Π.1.29. Φάσμα FTIR τεχνητός μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-3.1).



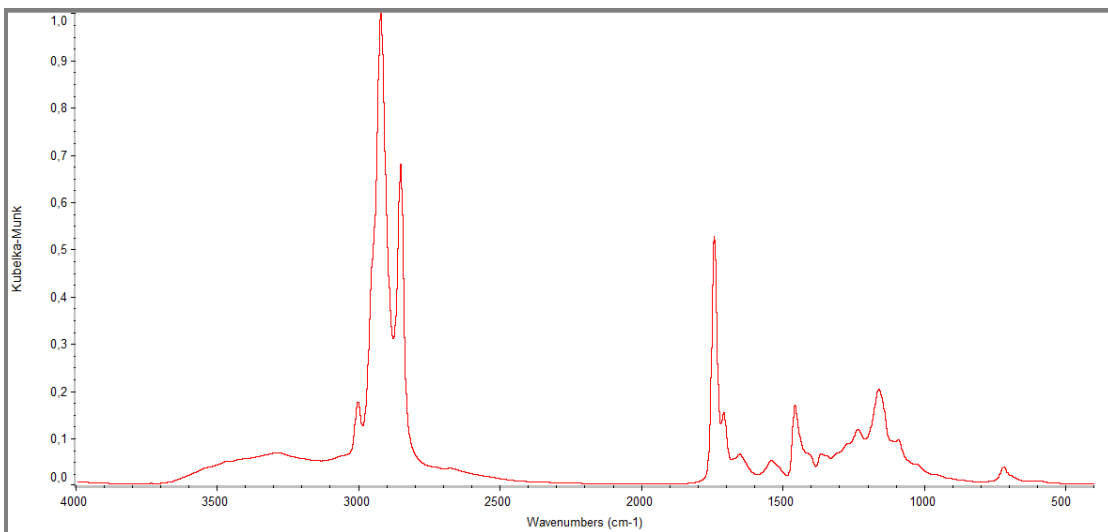
Π.1.30. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-3.2).



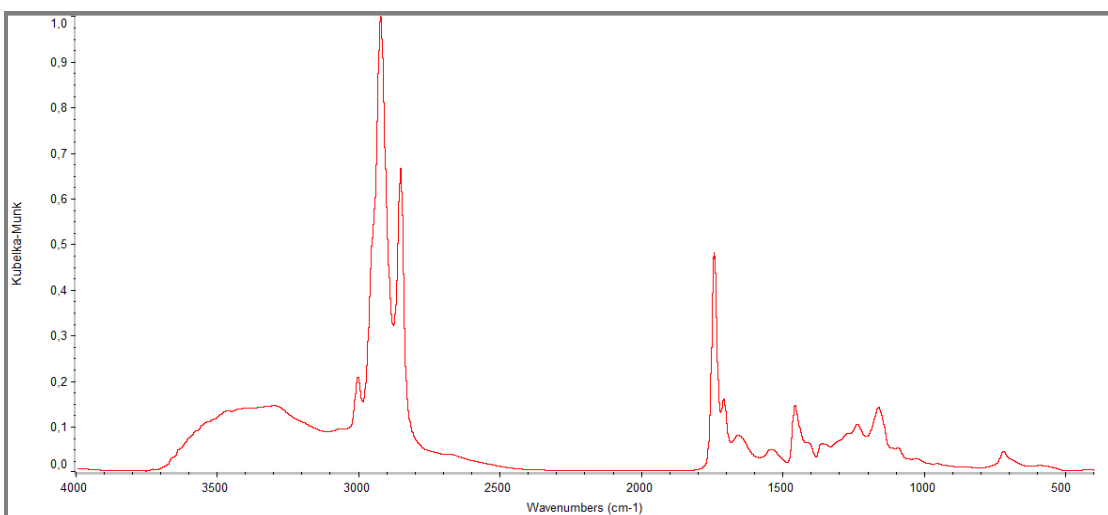
Π.1.31. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-2/10).



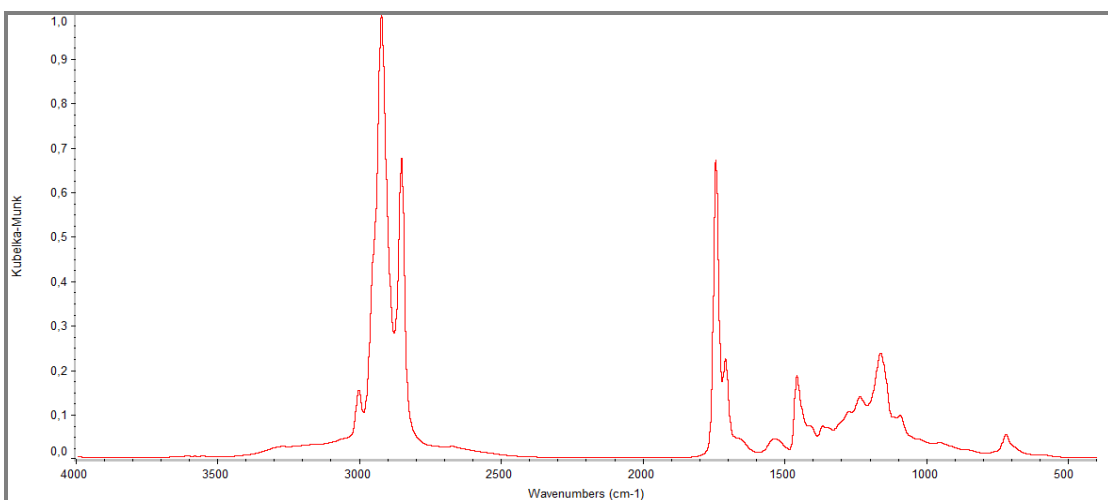
Π.1.32. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-3/12).



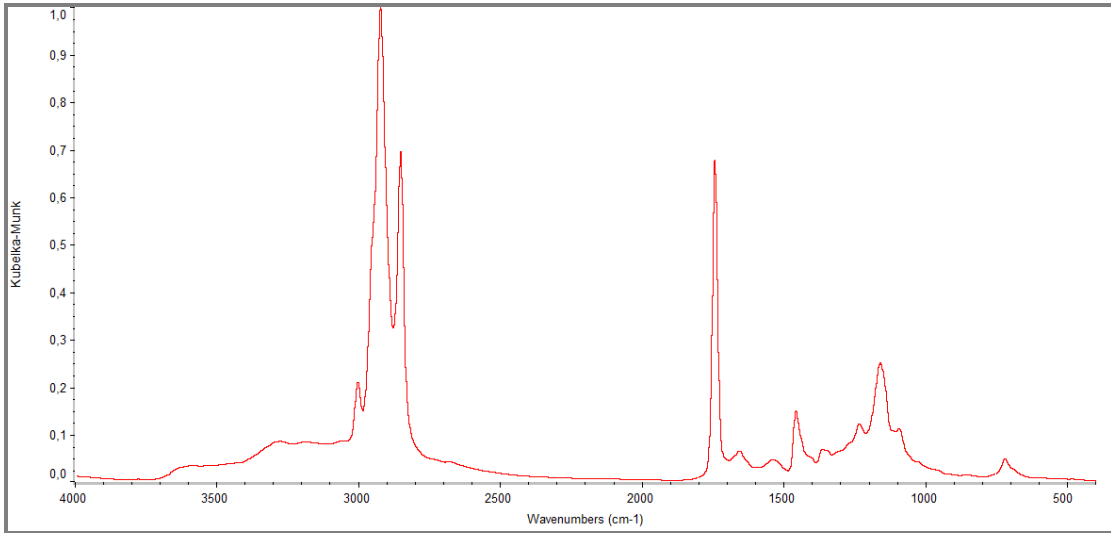
Π.1.33. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-4/12).



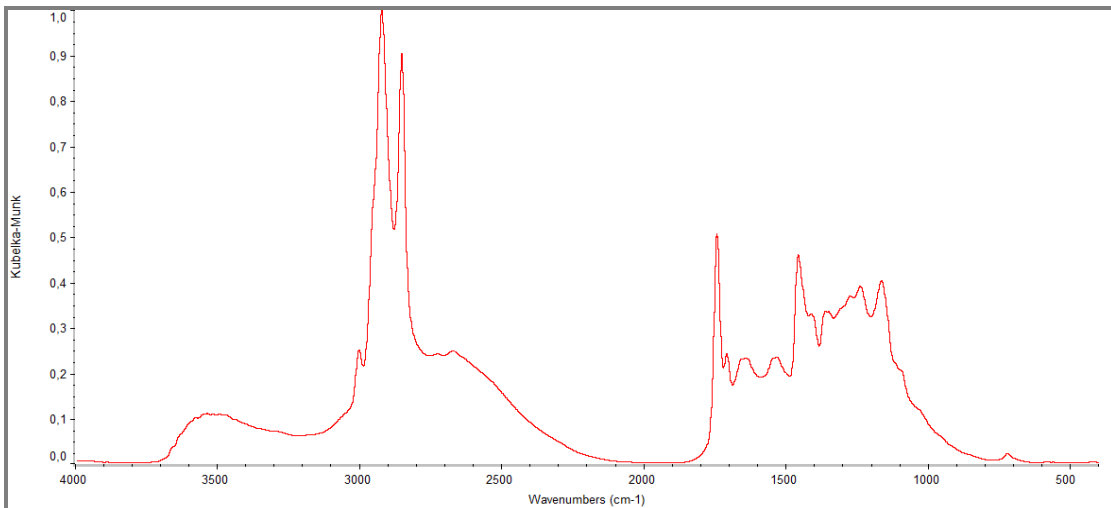
Π.1.34. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-5/12).



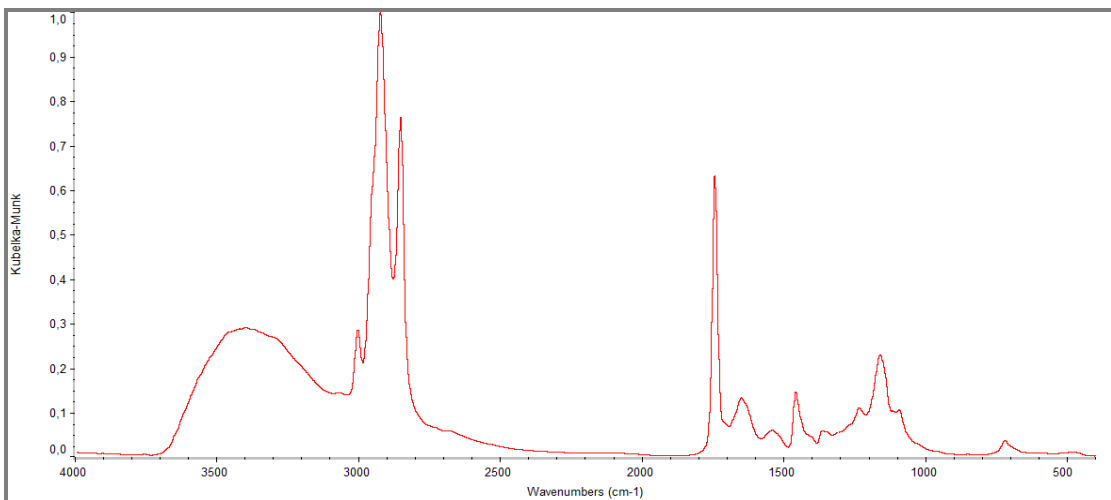
Π.1.35. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-6/12).



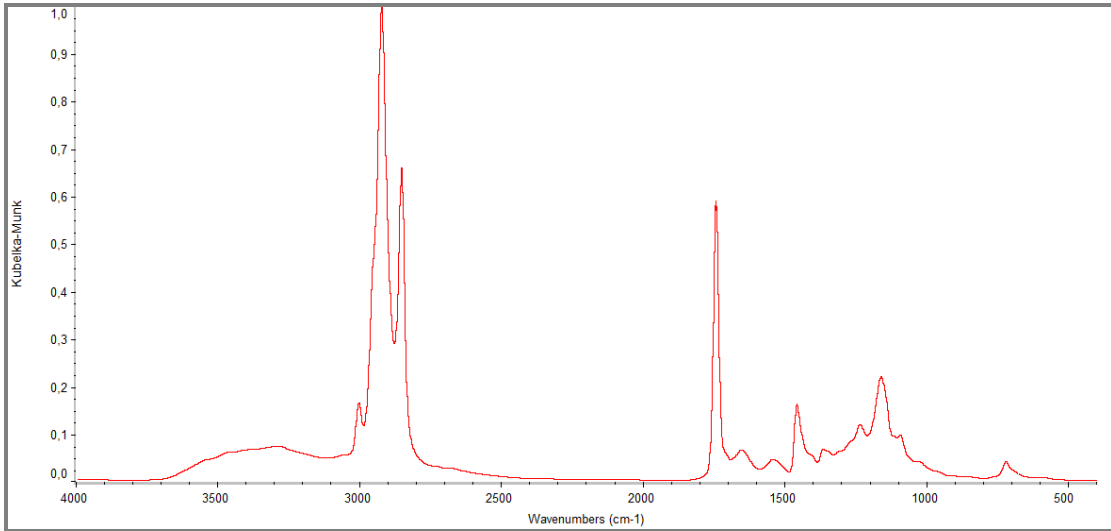
Π.1.36. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-7/12).



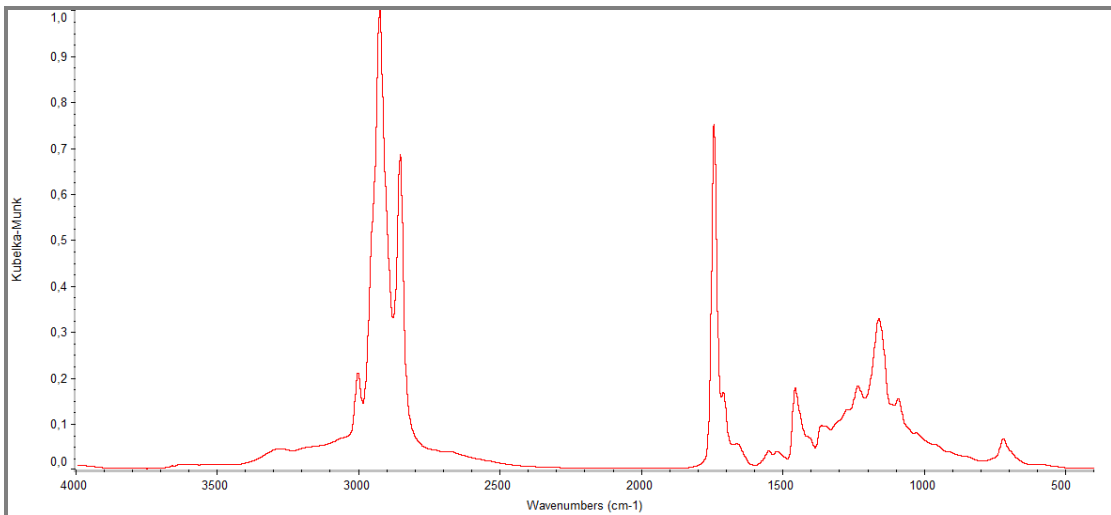
Π.1.37. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-8/12).



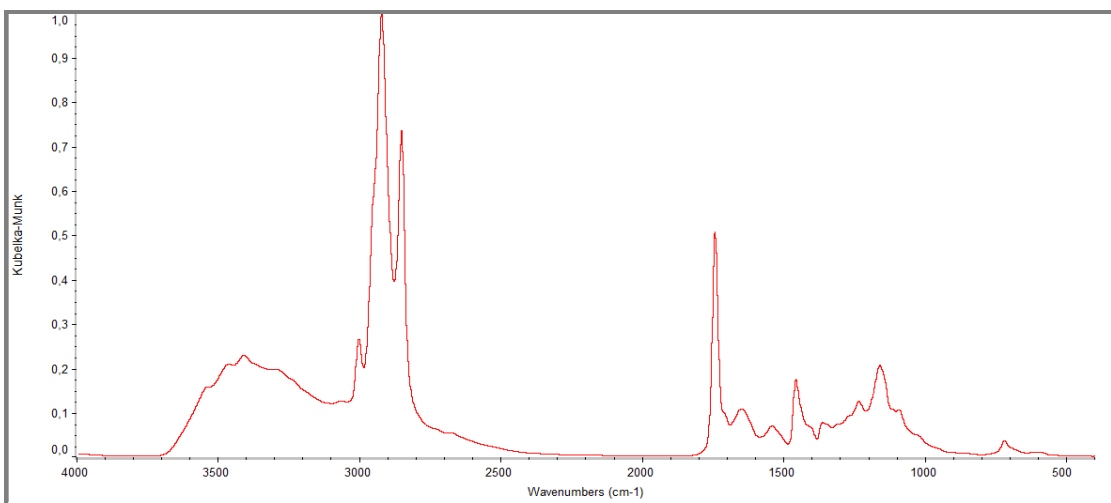
Π.1.38. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (AC-9/12).



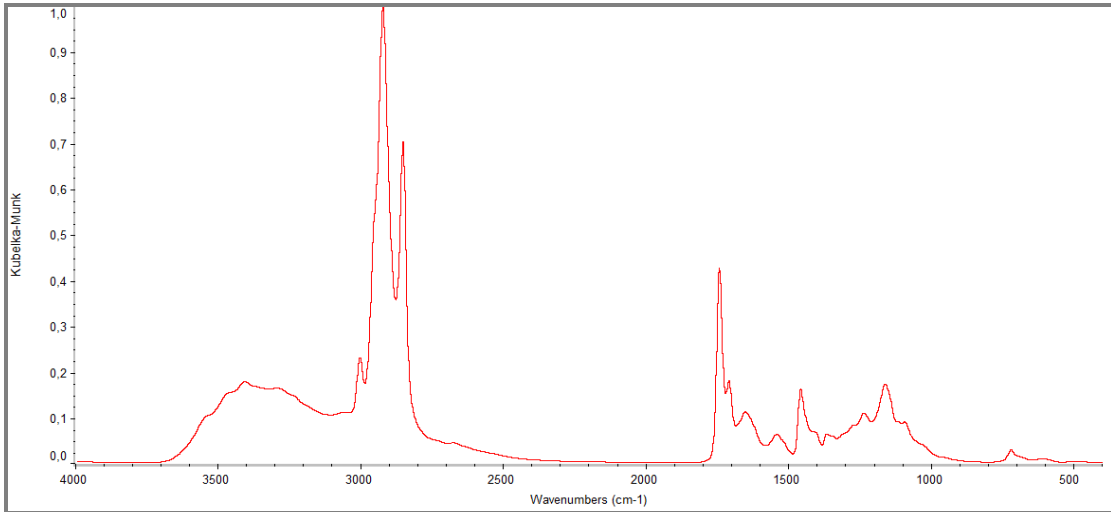
Π.1.39. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (ANT-1/7).



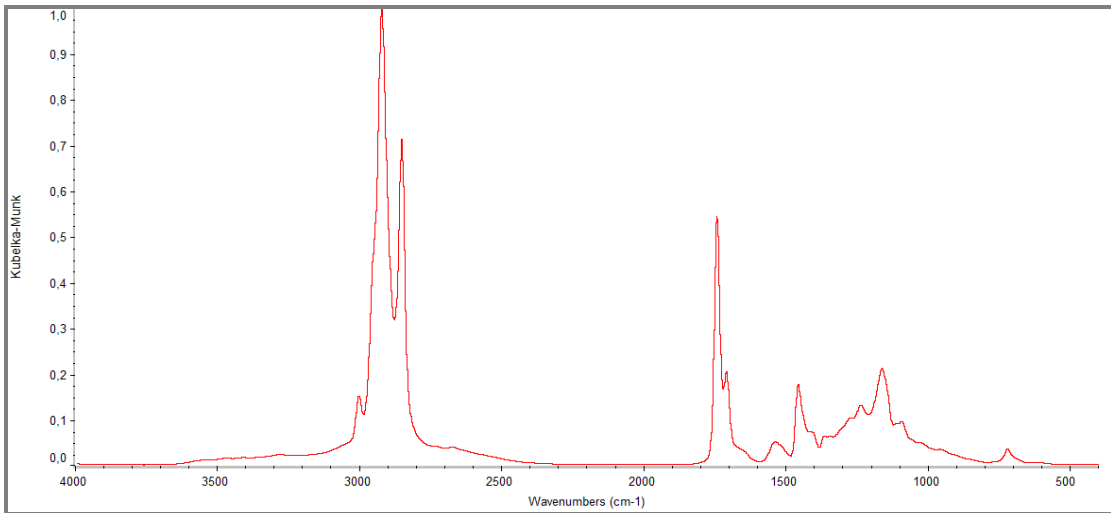
Π.1.40. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (ANT-1.1).



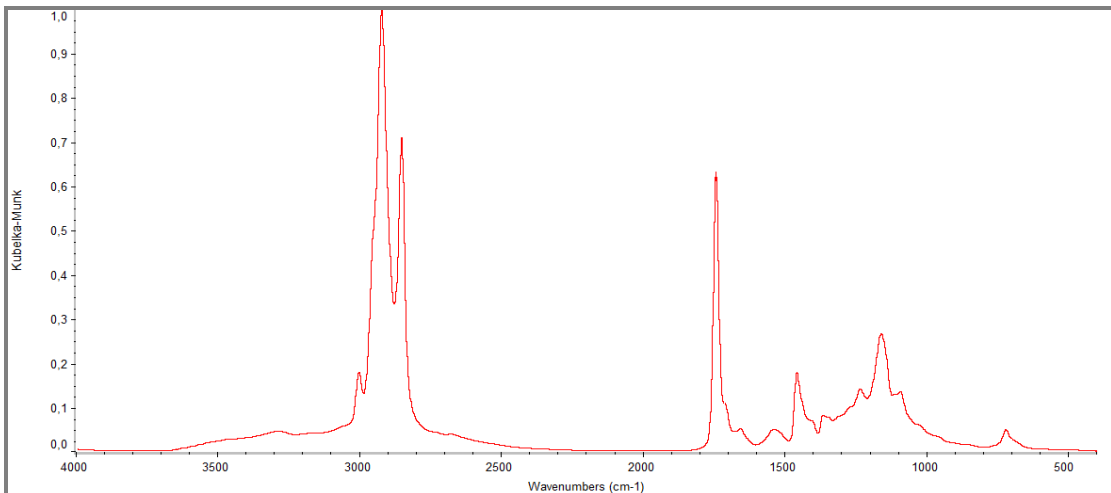
Π.1.41. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (ANT-1.2).



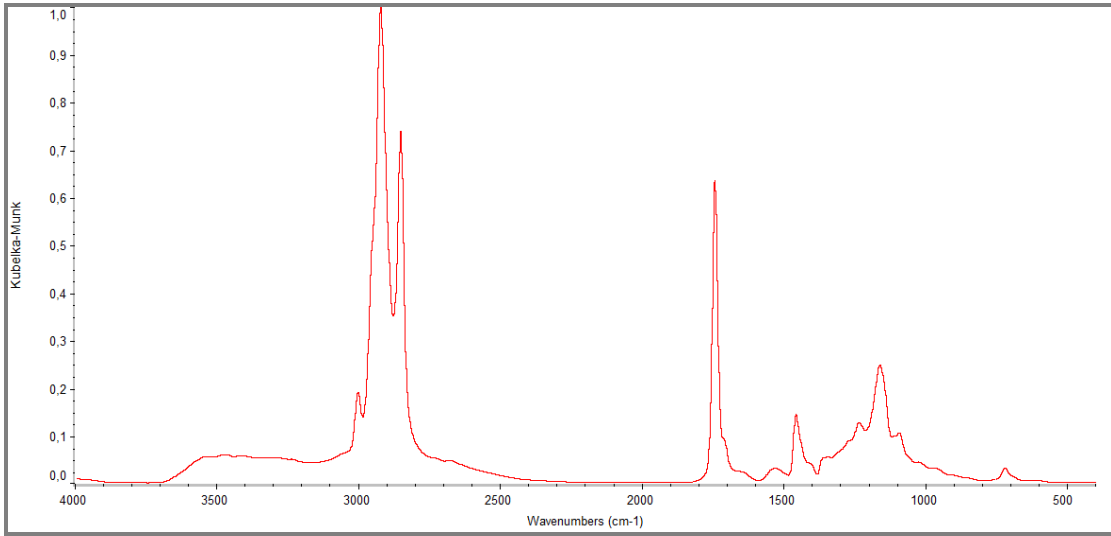
Π.1.42. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (ANT-2.1).



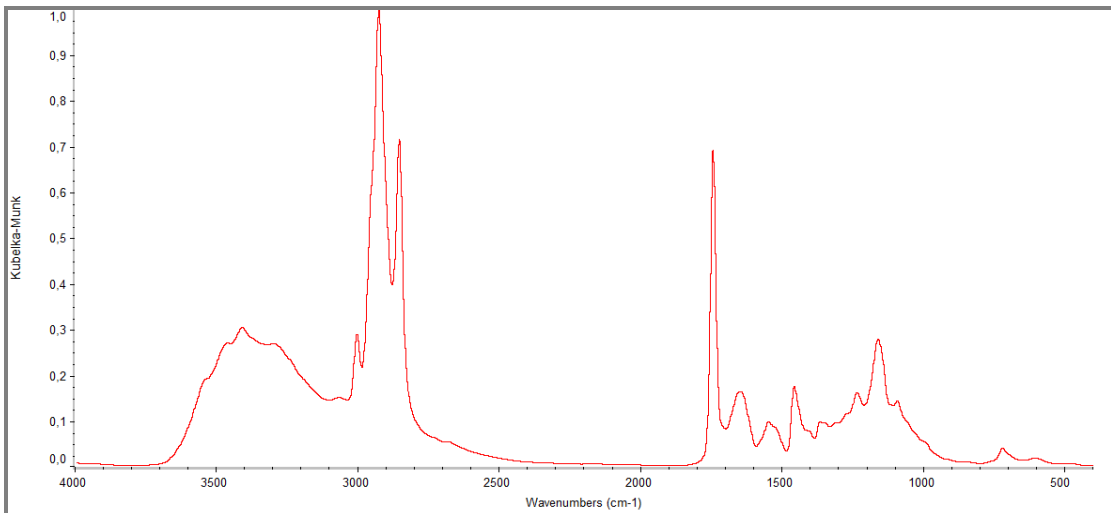
Π.1.43. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (ANT-2.2).



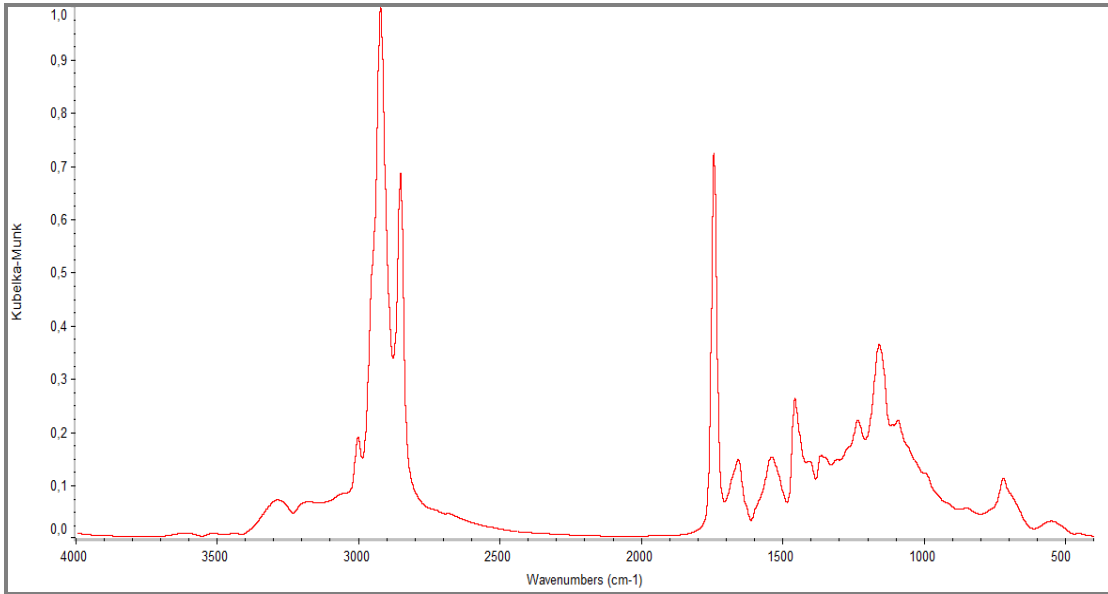
Π.1.44. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (ANT-3.1).



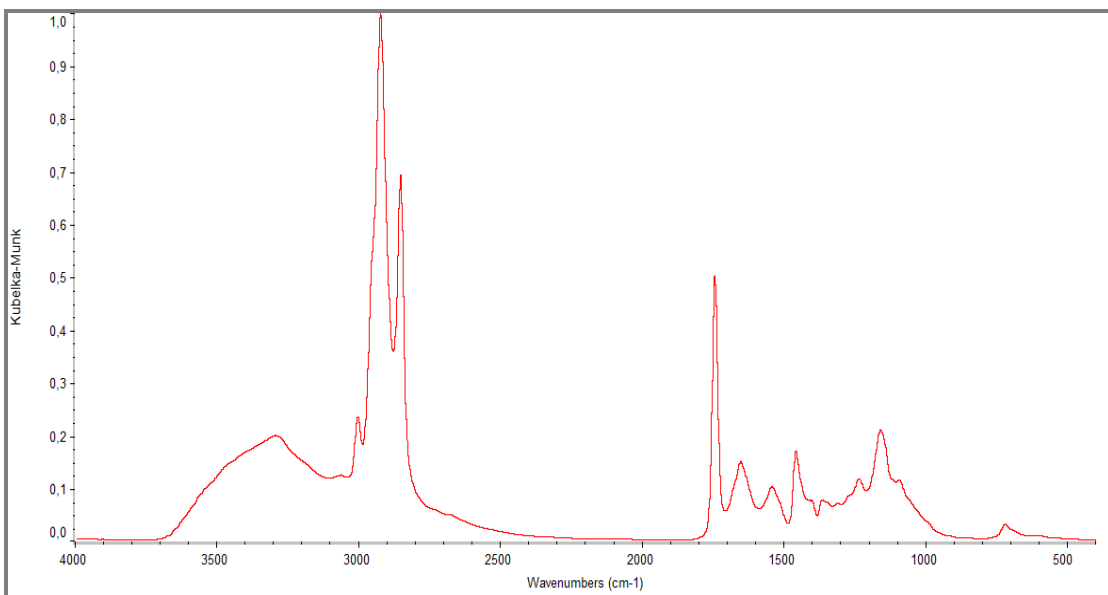
Π.1.45. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (ANT-3.2).



Π.1.46. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (OS-1).

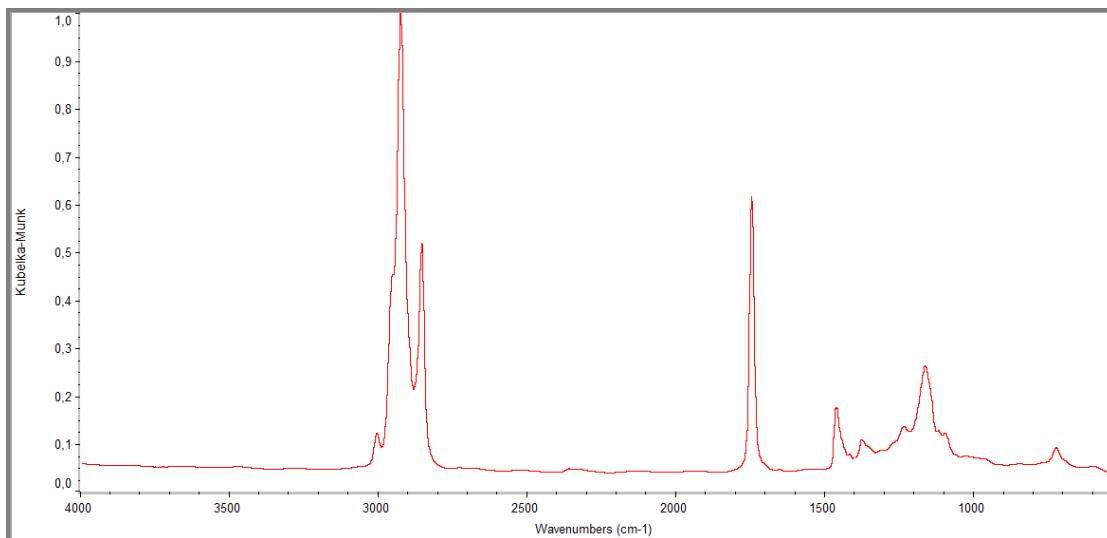


Π.1.47. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (OS-2).

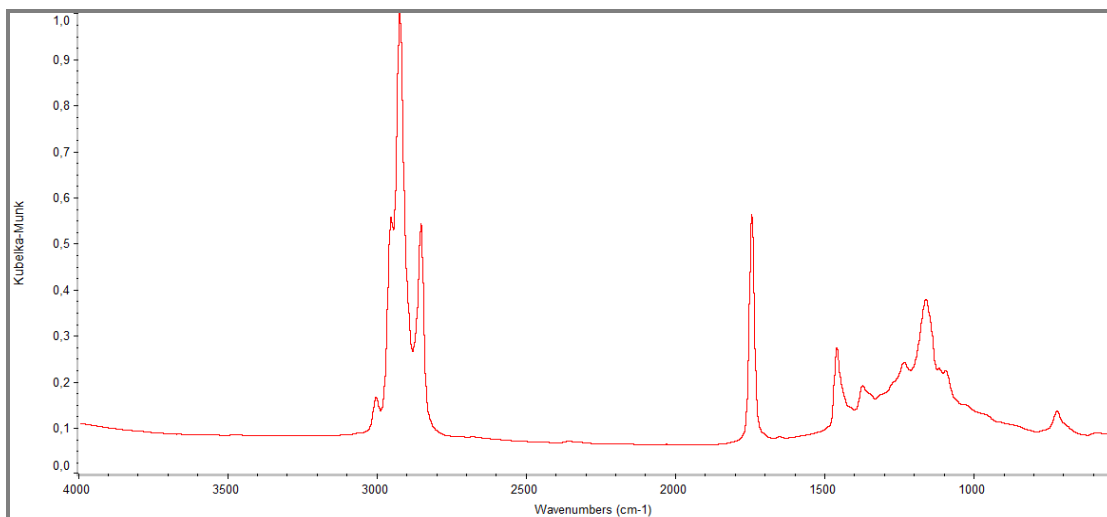


Π.1.48. Φάσμα FTIR τεχνητώς μολυσμένου φιστικιού Αιγίνης (OS-3).

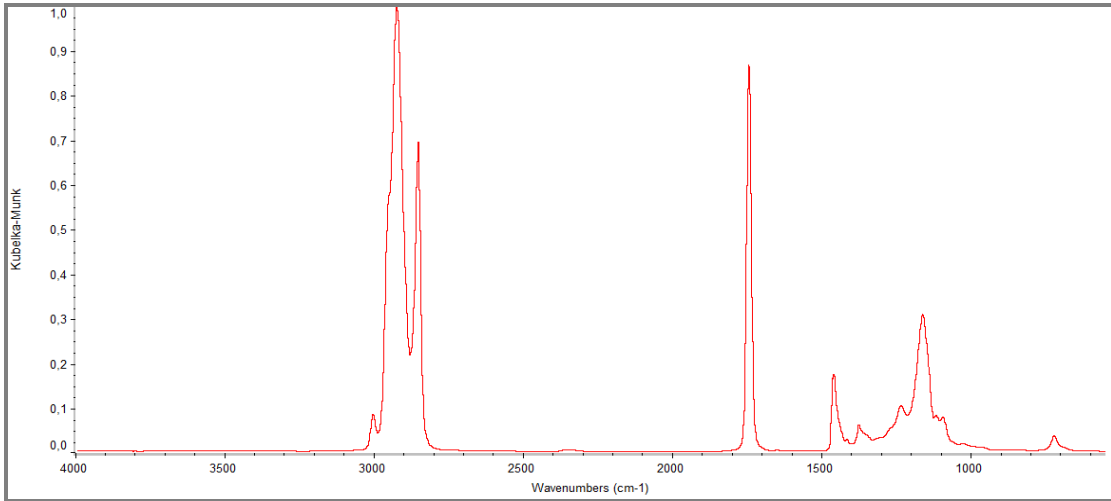
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 – ΦΑΣΜΑΤΑ FTIR (ΤΕΧΝΙΚΗ ZnSe) ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ



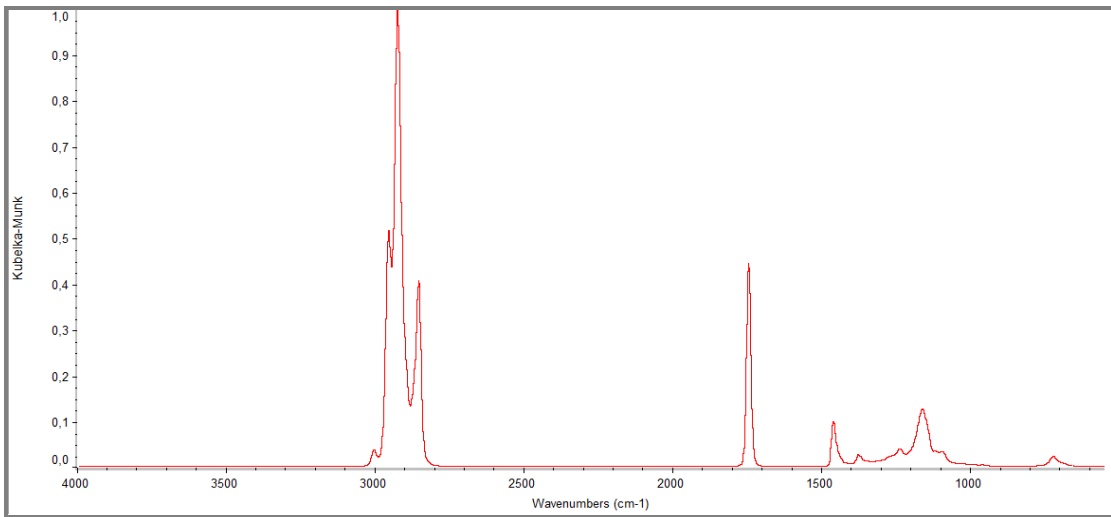
Π.2.1. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-2).



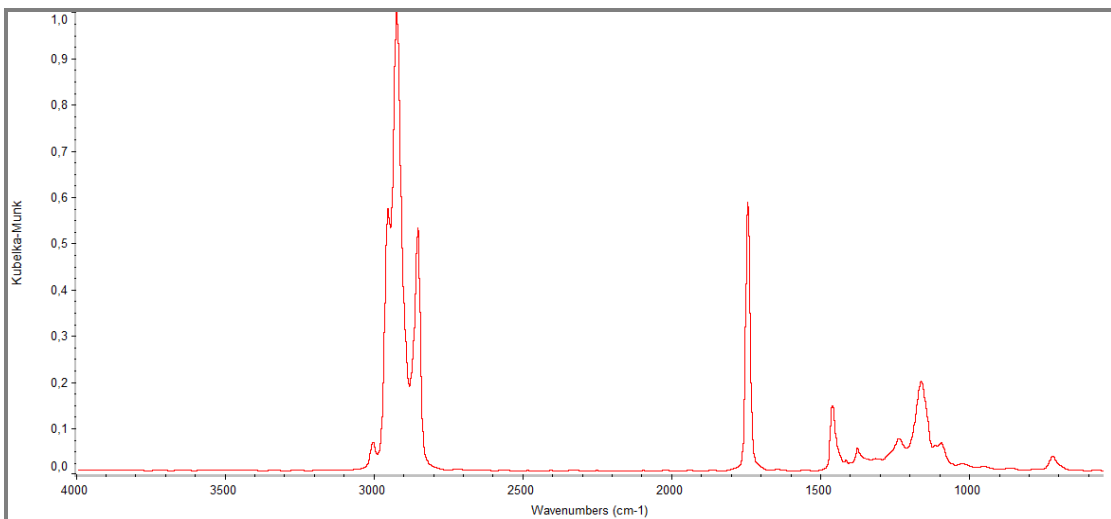
Π.2.2. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-3).



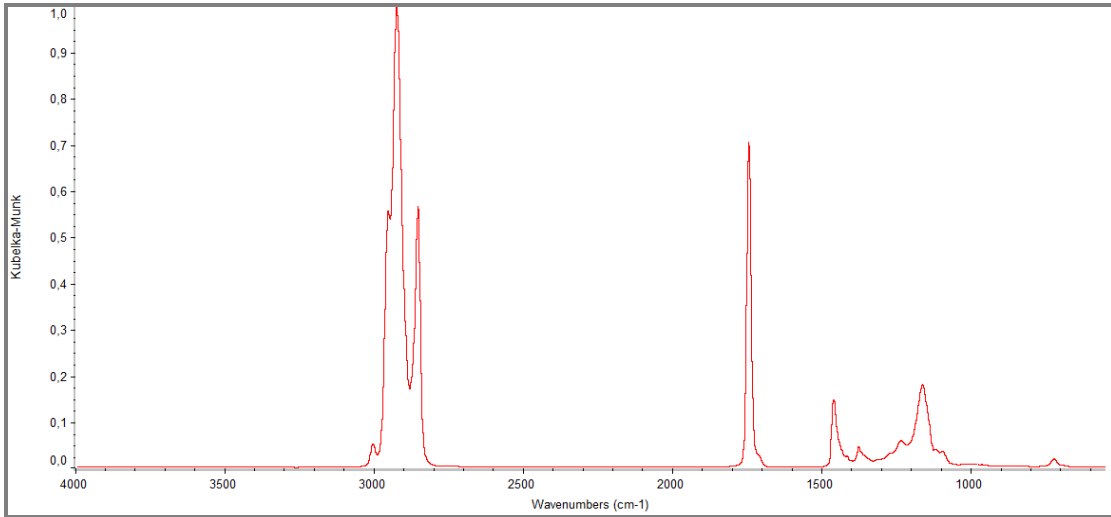
Π.2.3. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-H-4).



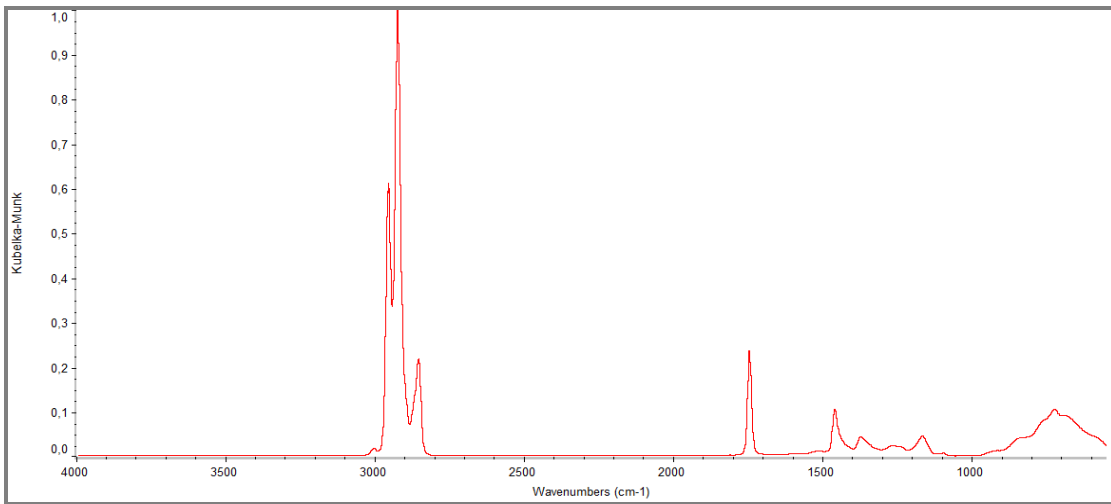
Π.2.4. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-H-5).



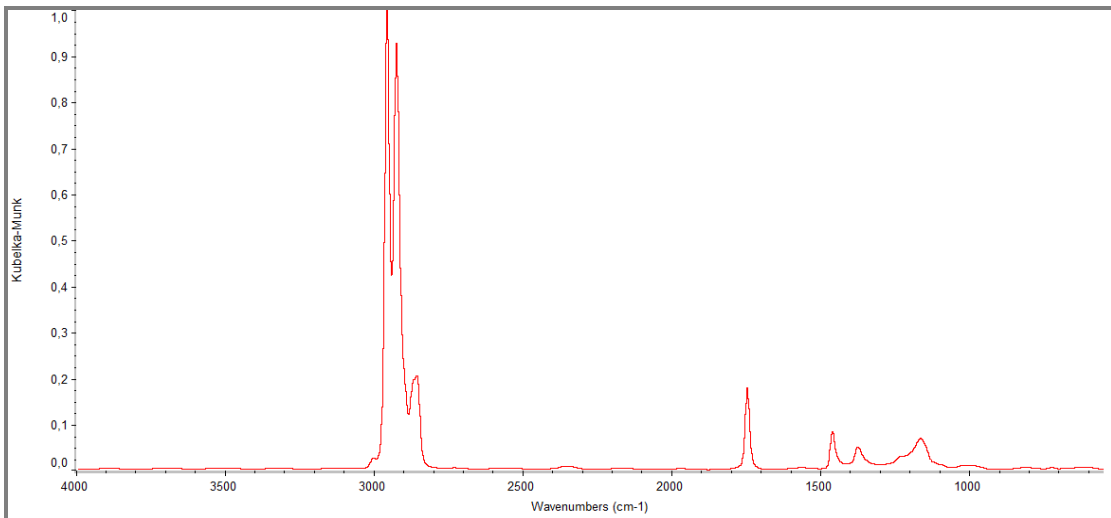
Π.2.5. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-H-6).



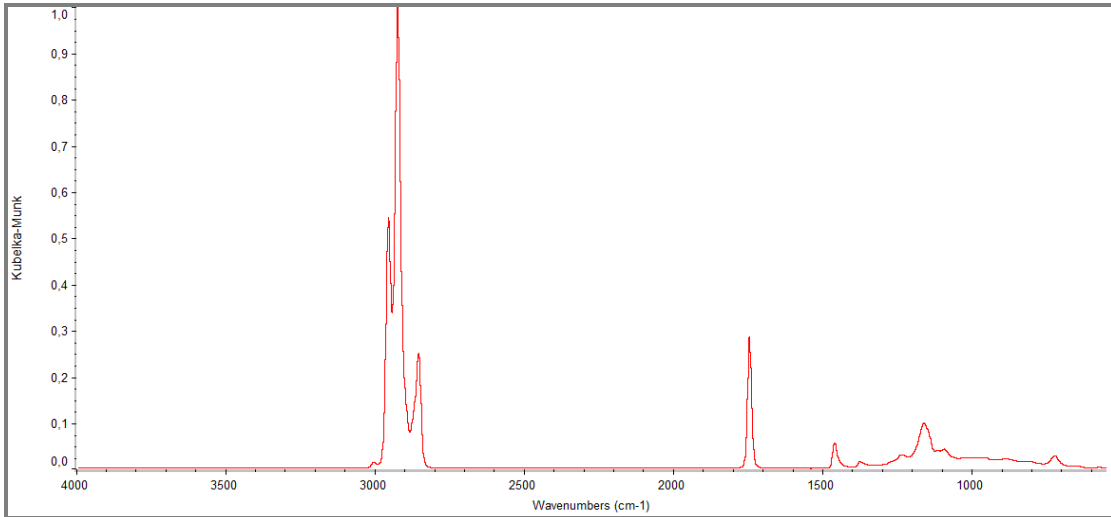
Π.2.6. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-7).



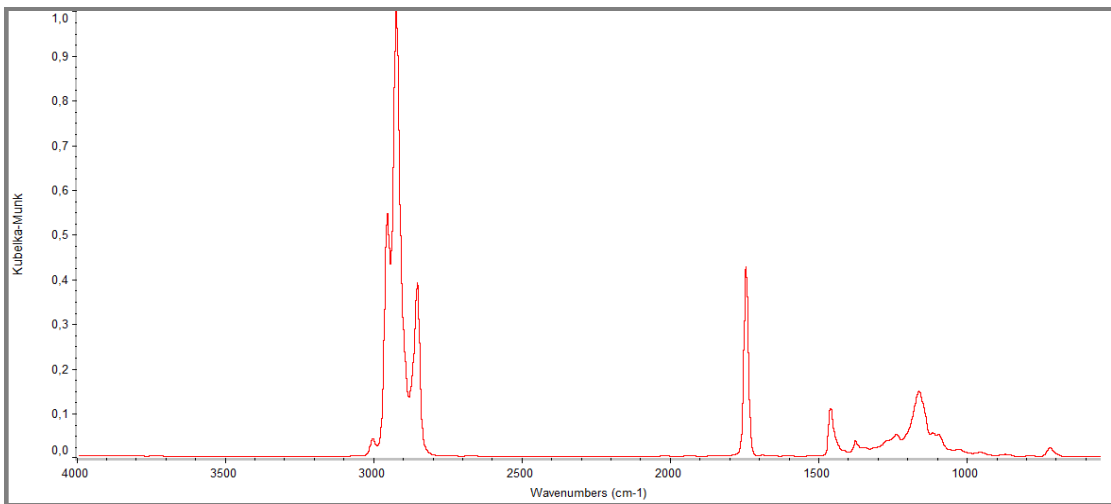
Π.2.7. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-8).



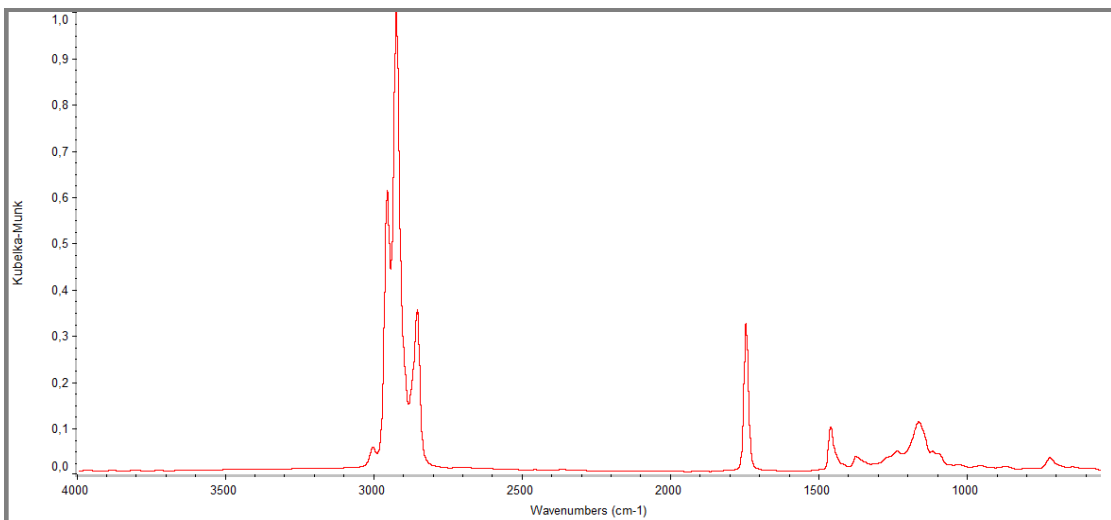
Π.2.8. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-9).



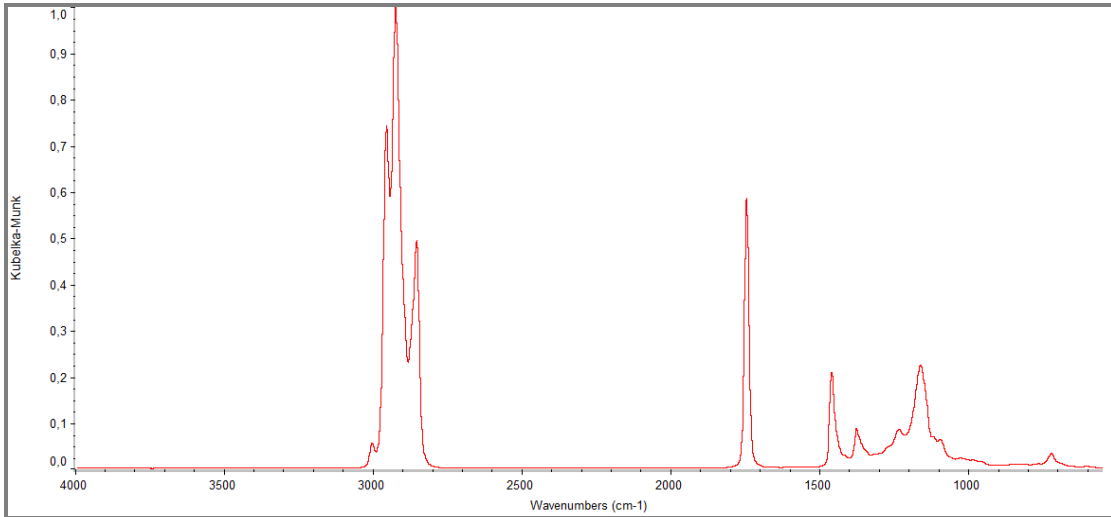
Π.2.9. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-10).



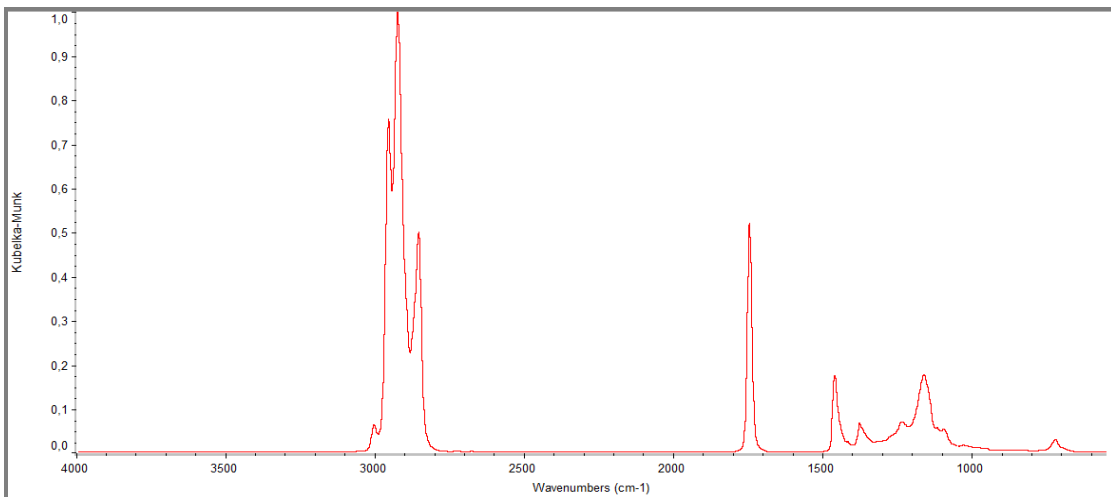
Π.2.10. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-11).



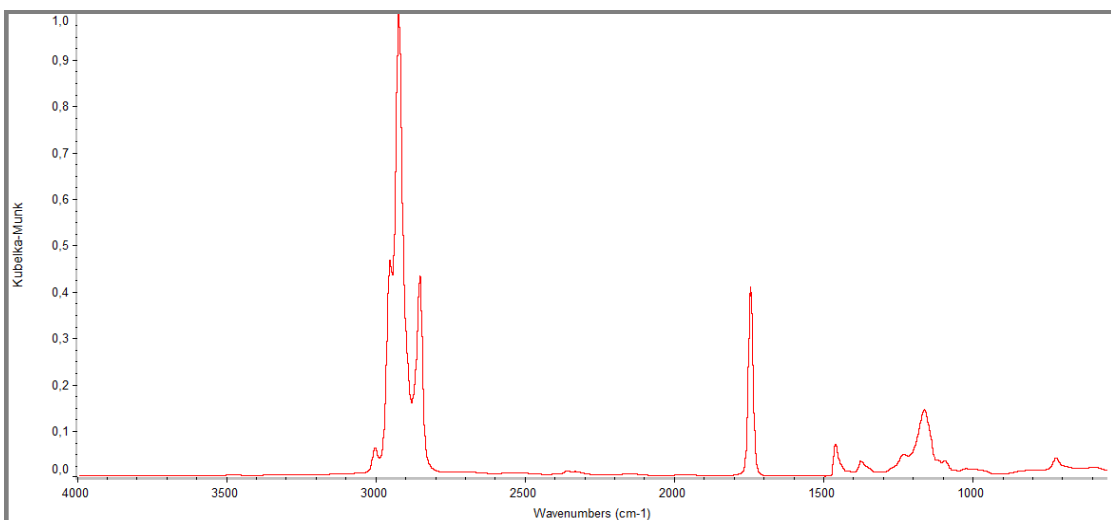
Π.2.11. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-12).



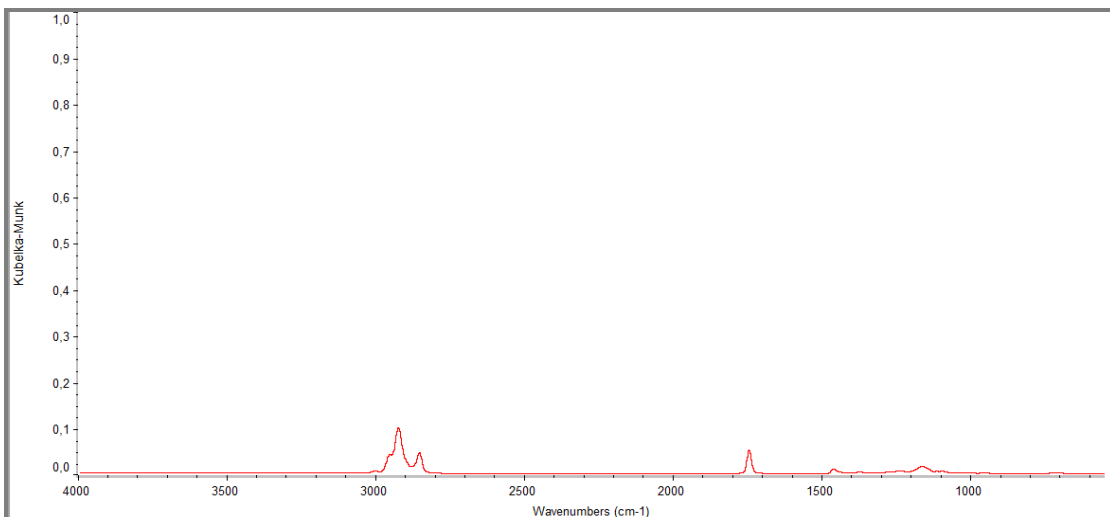
Π.2.12. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-13).



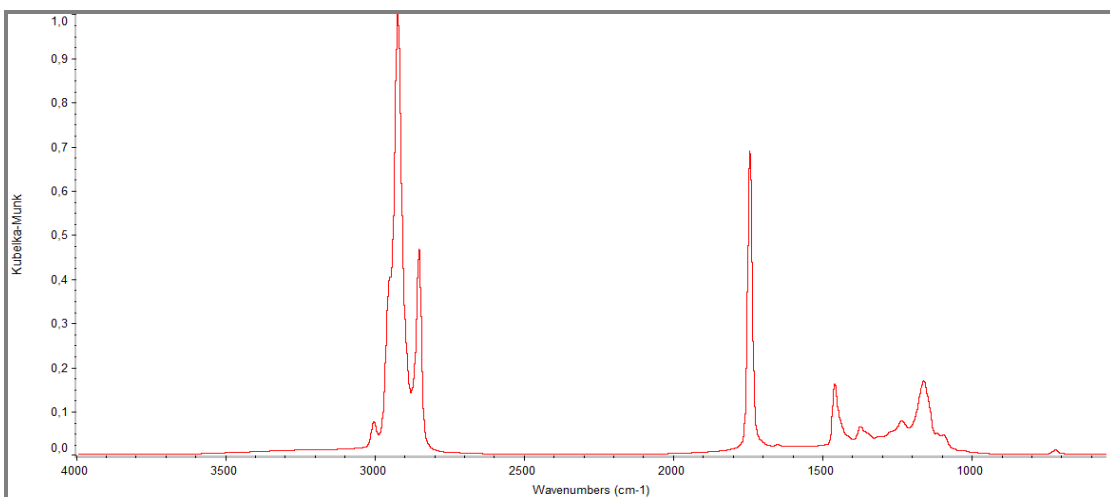
Π.2.13. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-14).



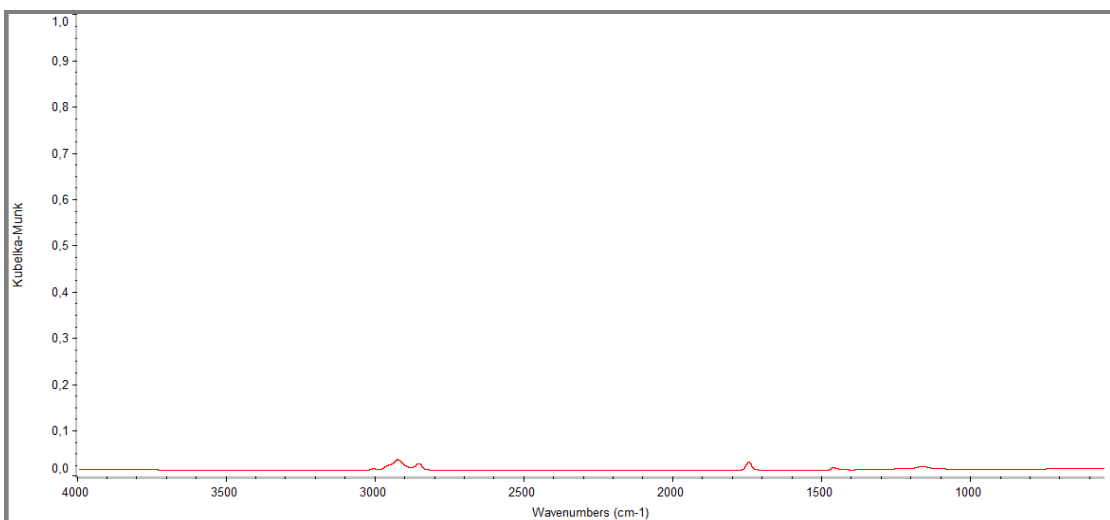
Π.2.14. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-15).



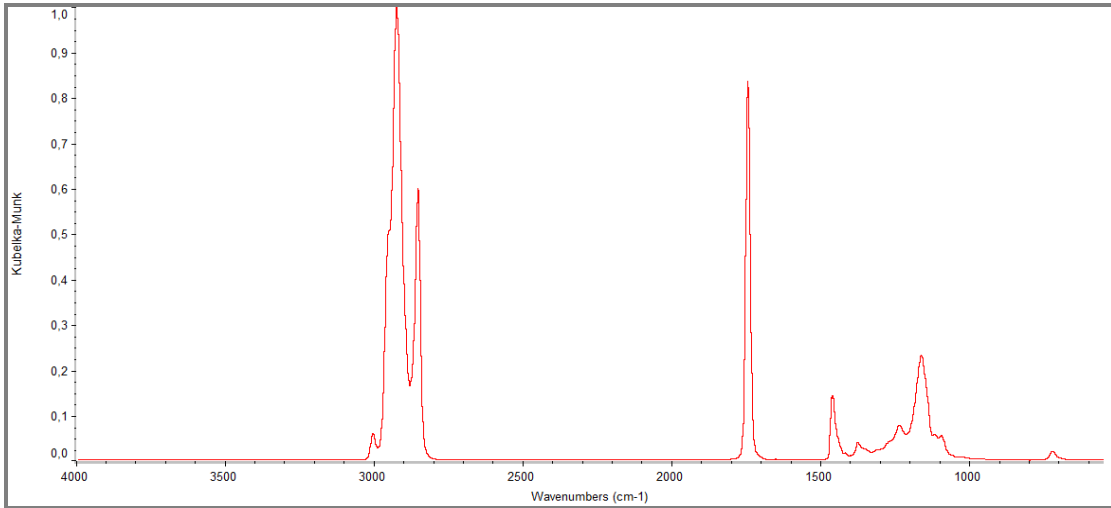
Π.2.15. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-3).



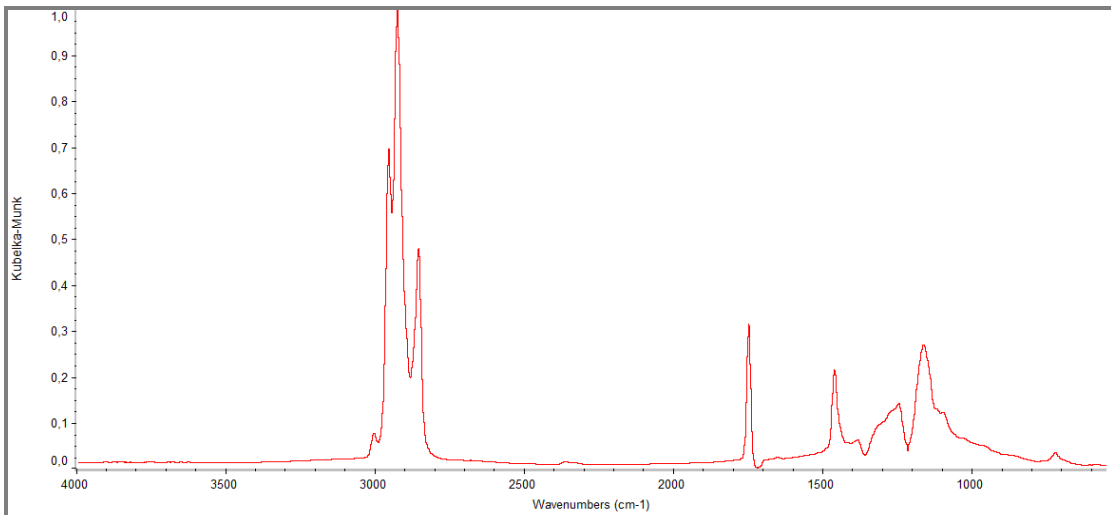
Π.2.16. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-4).



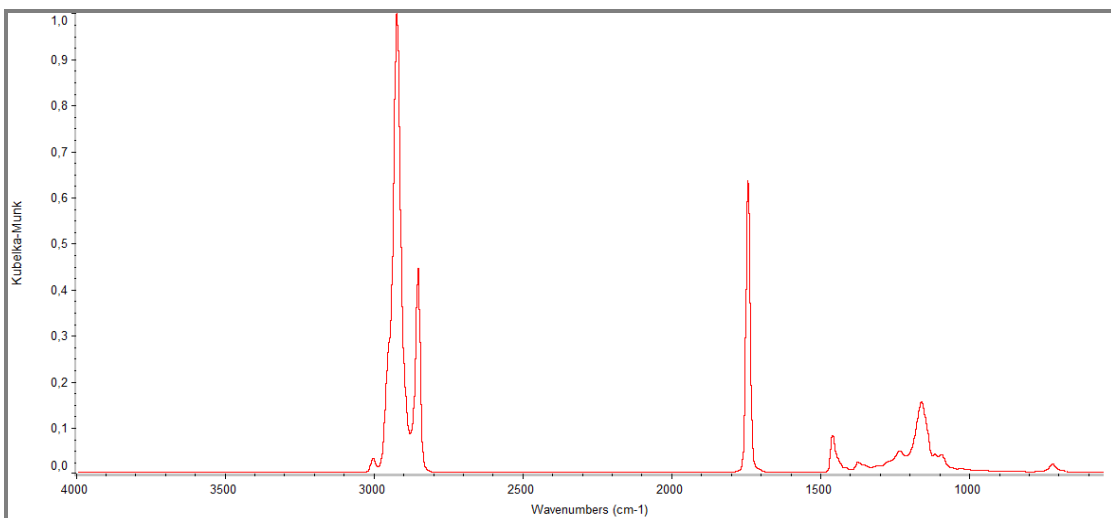
Π.2.17. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-5).



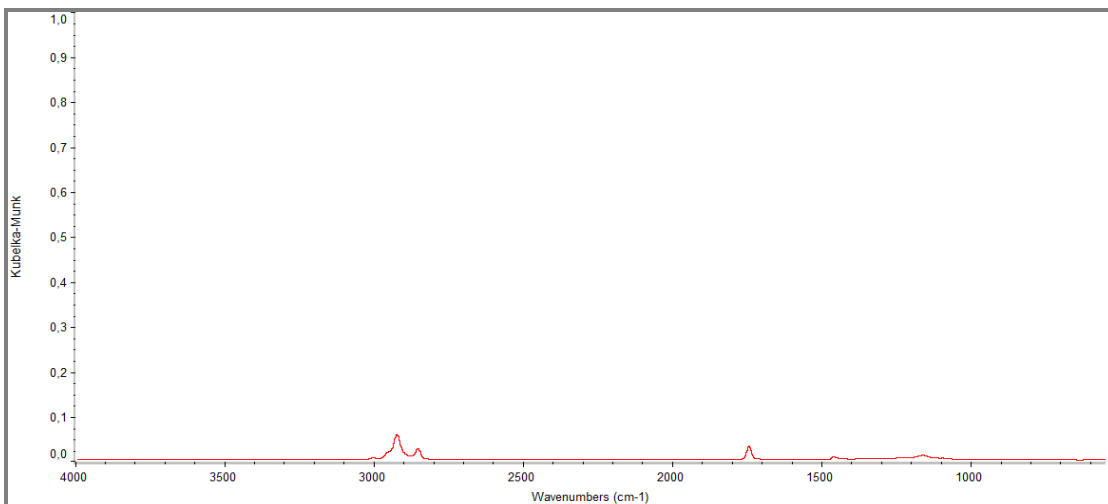
Π.2.18. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-6).



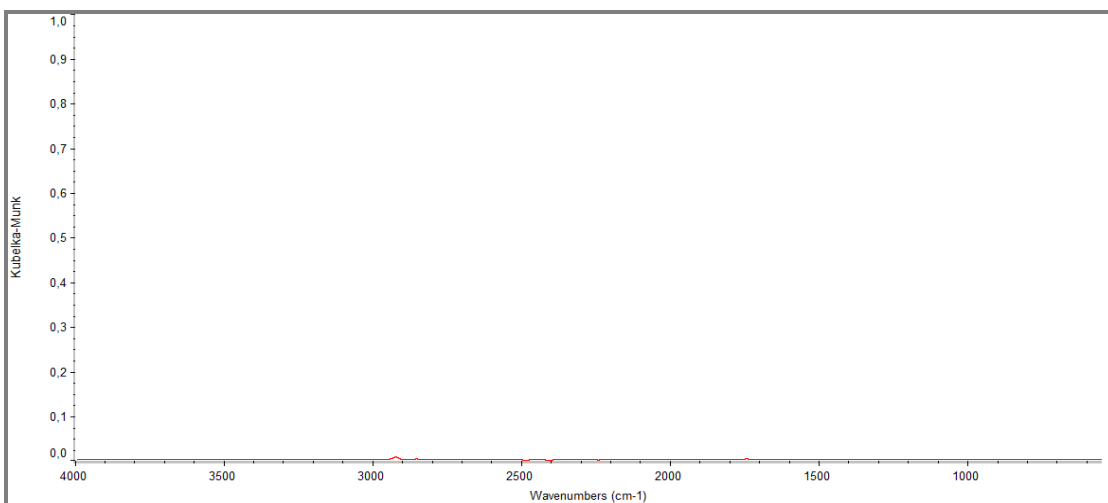
Π.2.19. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-7).



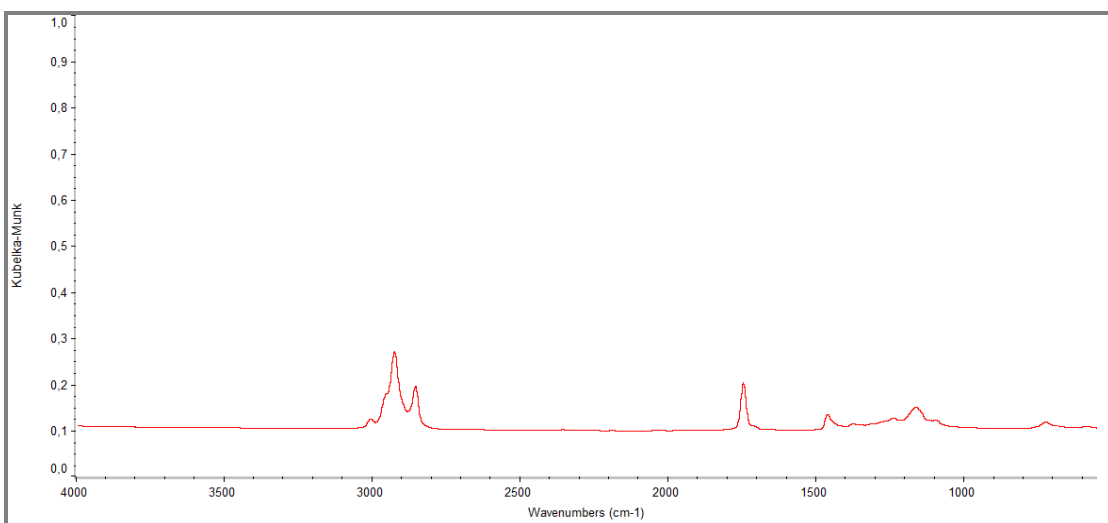
Π.2.20. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-8).



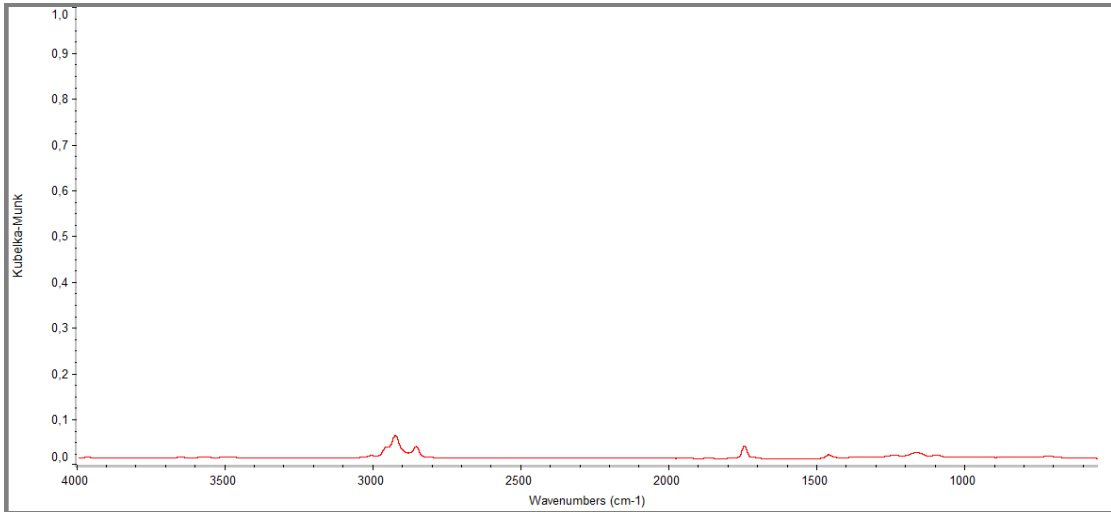
Π.2.21. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-9).



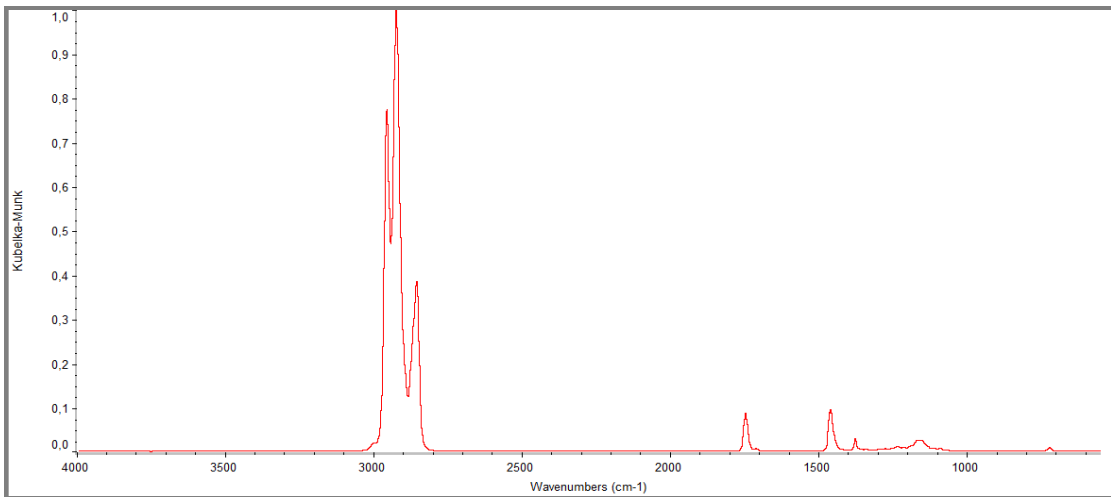
Π.2.22. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-10).



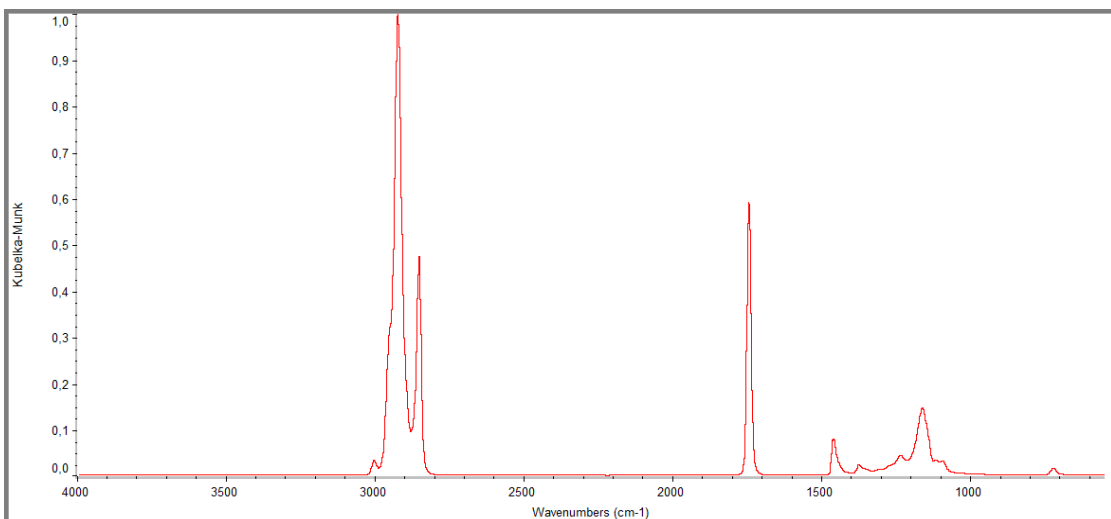
Π.2.23. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-11).



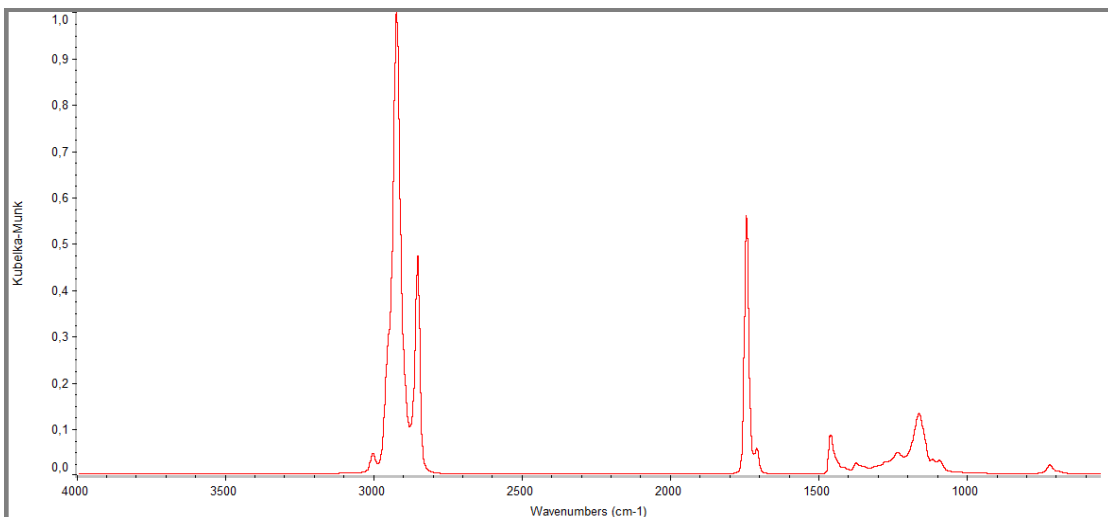
Π.2.24. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-12).



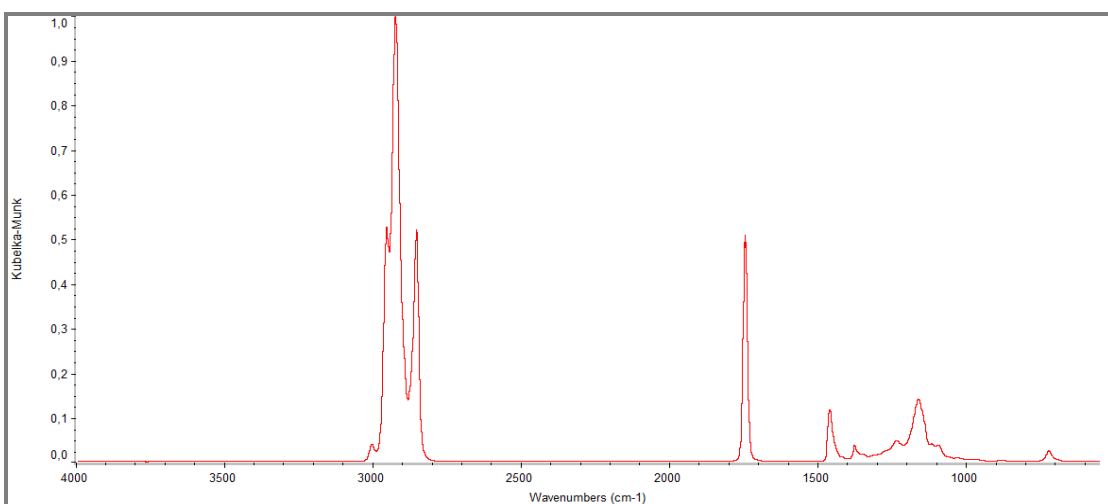
Π.2.25. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-1.1).



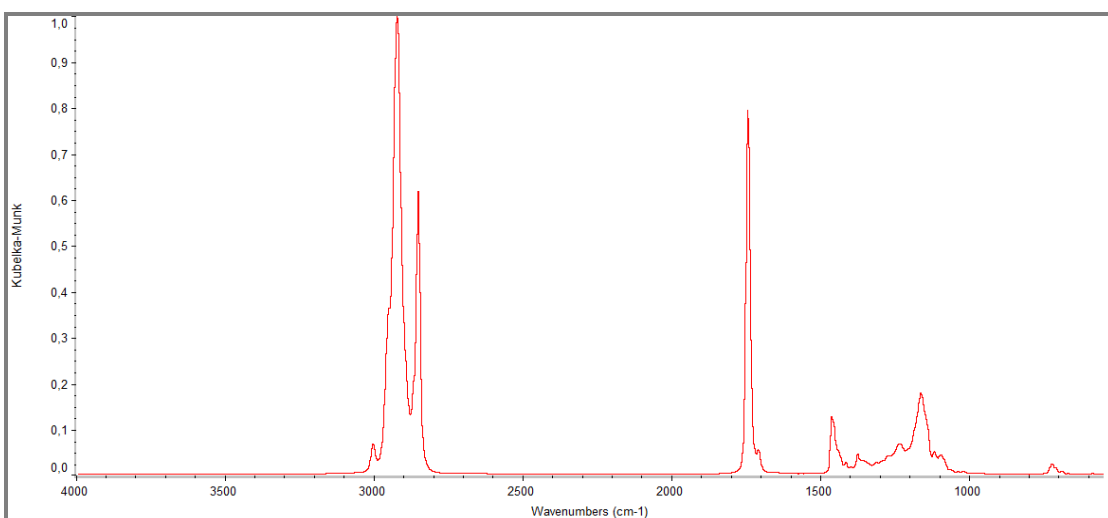
Π.2.26. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-1.2).



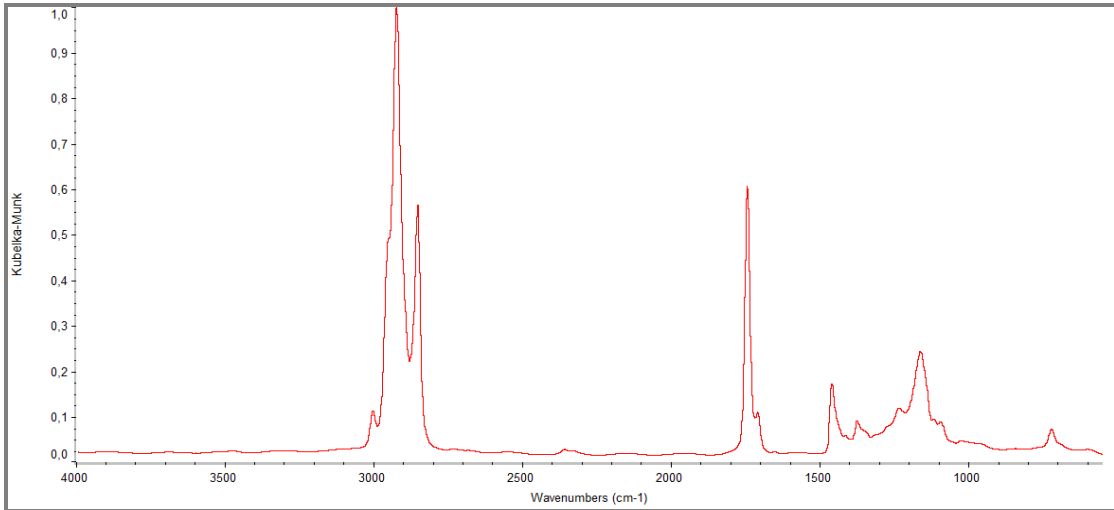
Π.2.27. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-2.1).



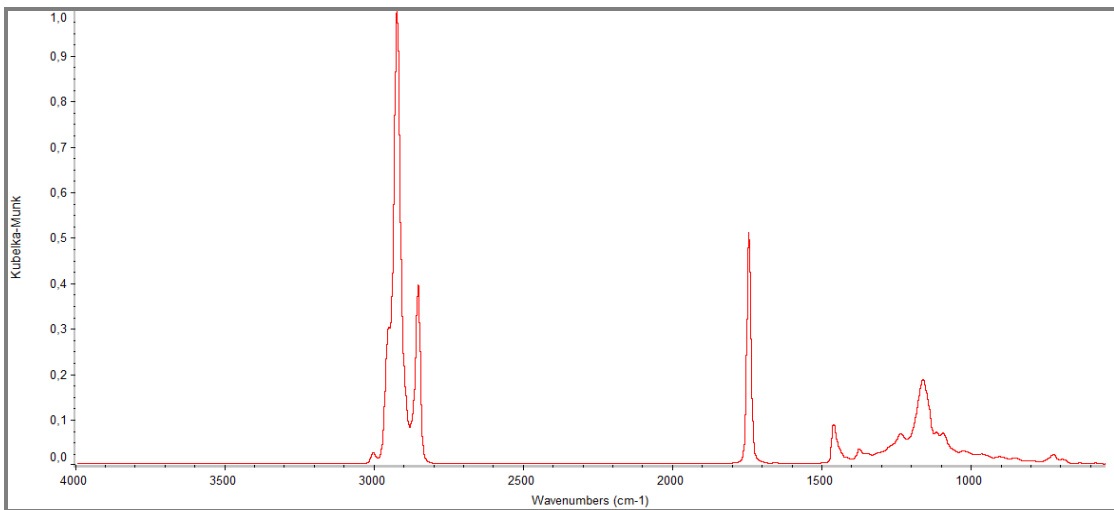
Π.2.28. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-2.2).



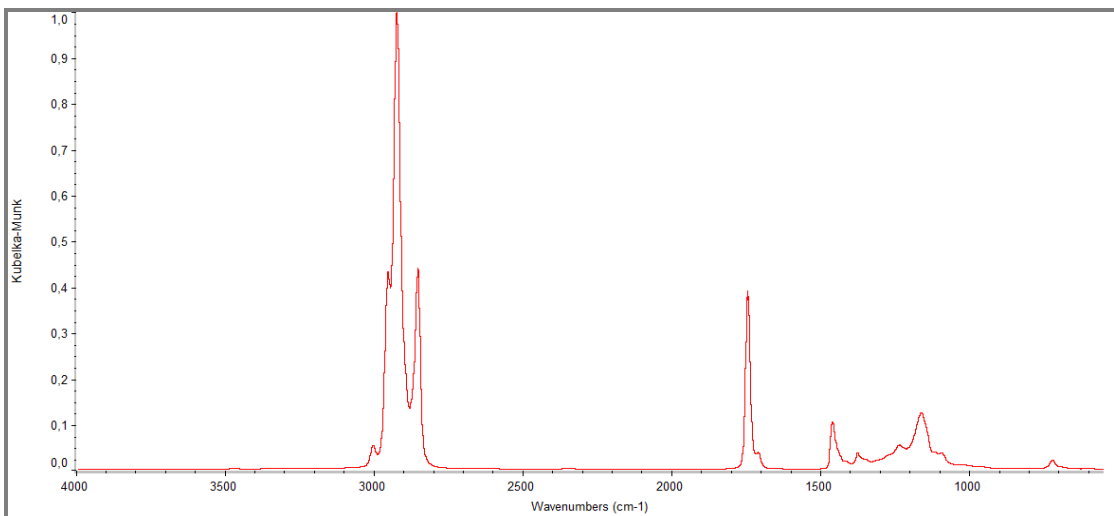
Π.2.29. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-3.1).



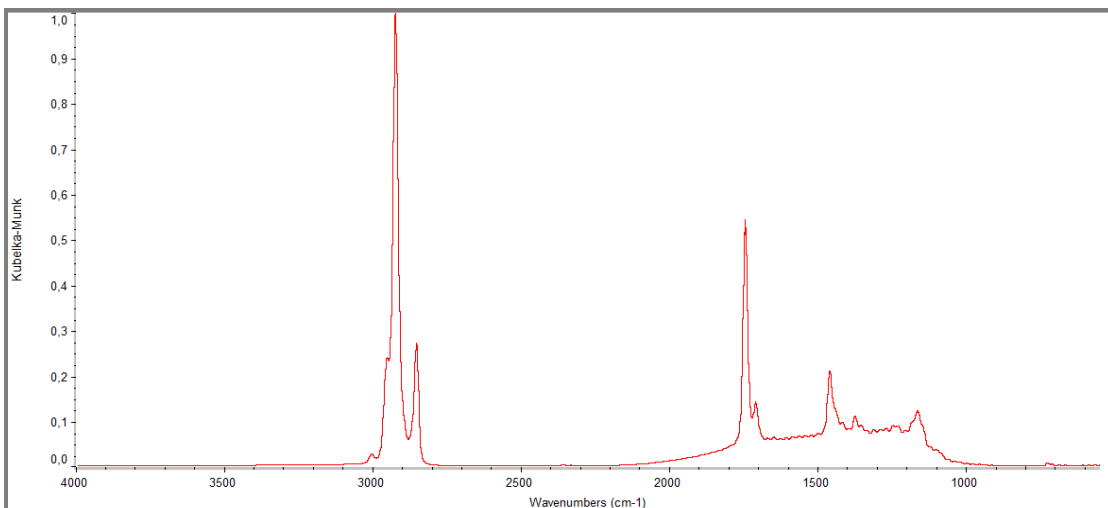
Π.2.30. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-3.2).



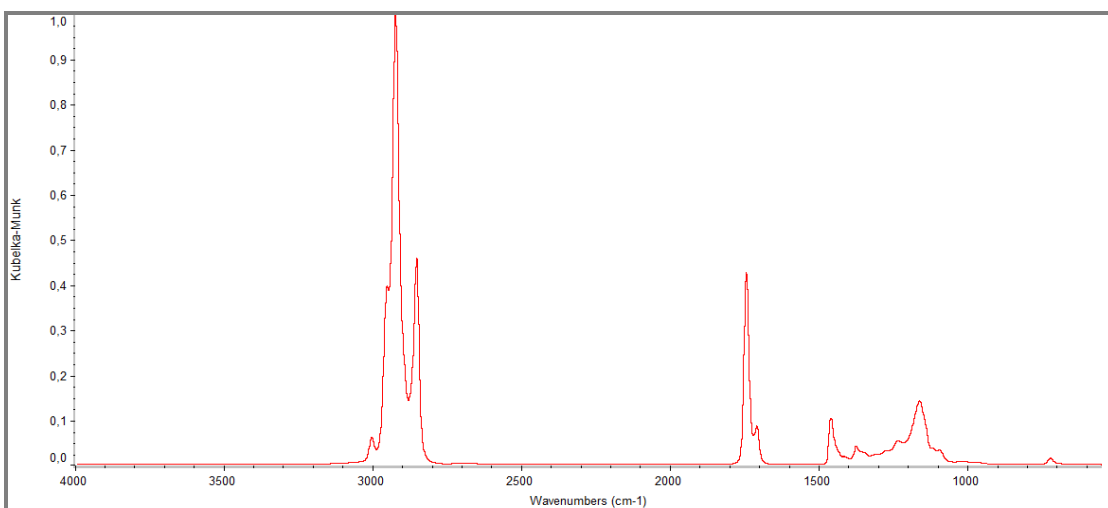
Π.2.31. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil- AC-2/10).



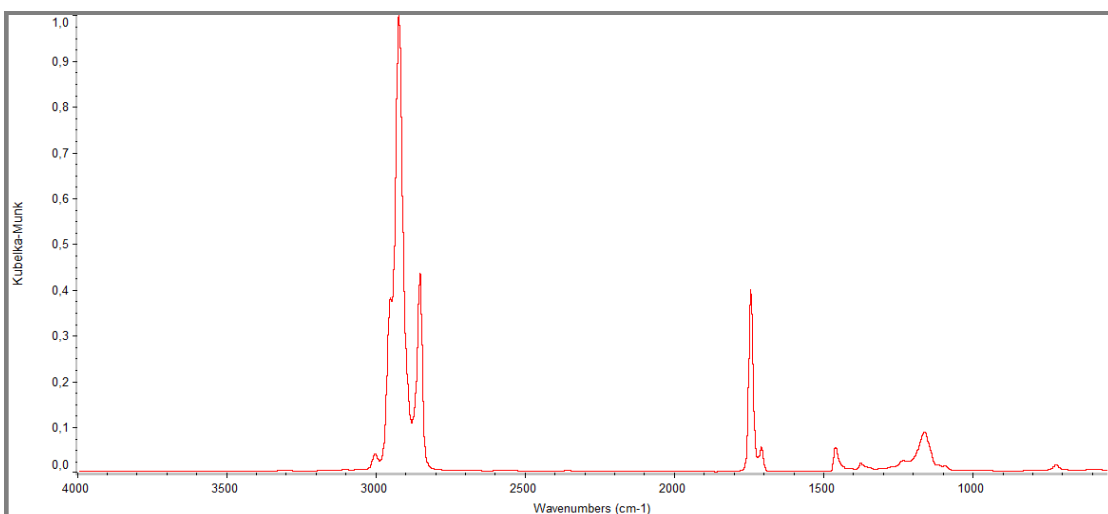
Π.2.32. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil- AC-3/12).



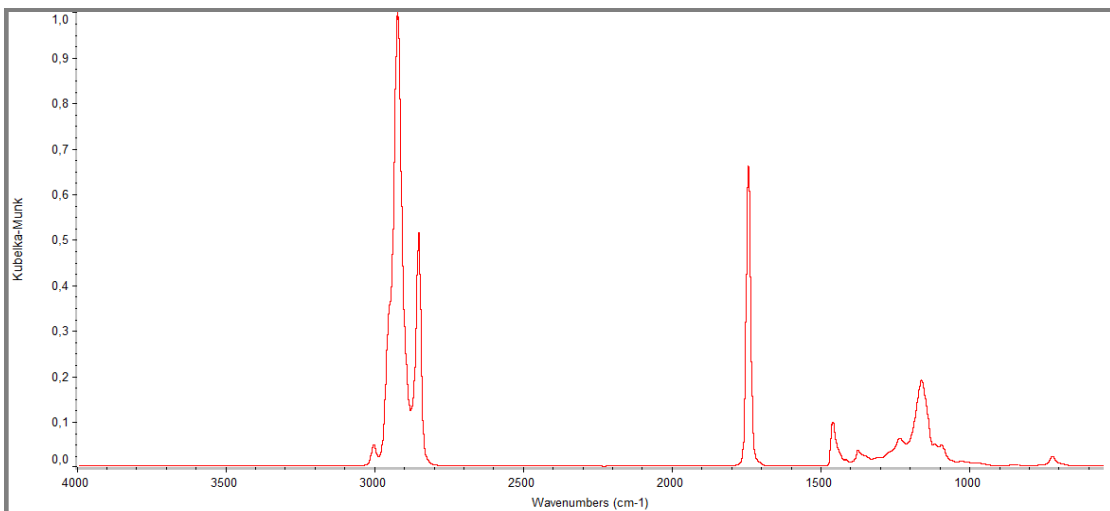
Π.2.33. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-4/12).



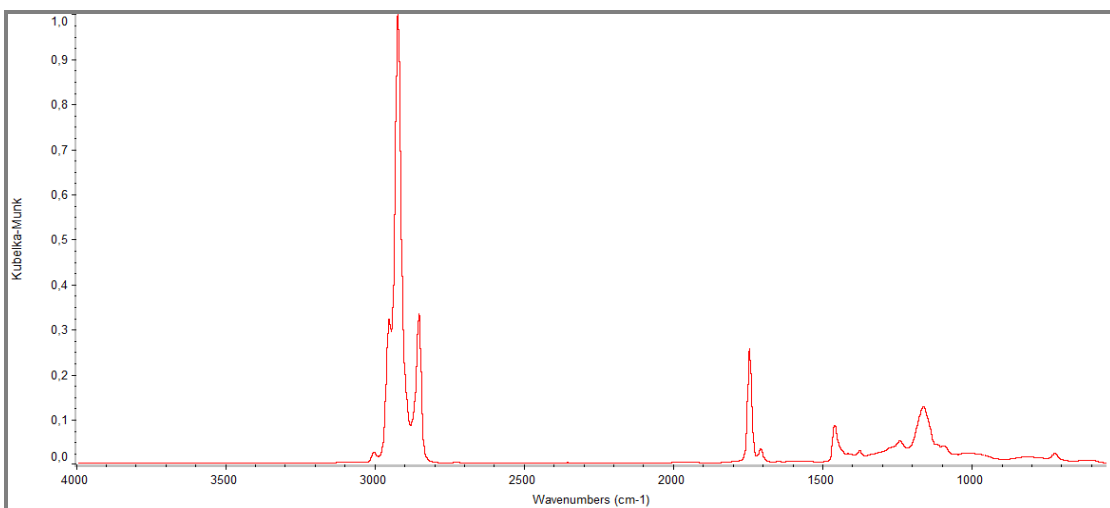
Π.2.34. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-5/12).



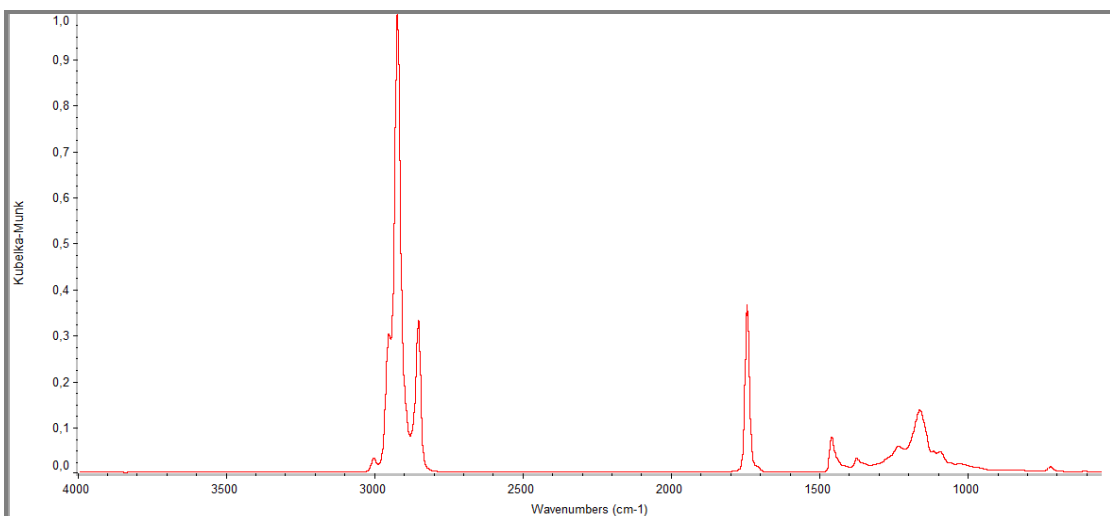
Π.2.35. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-6/12).



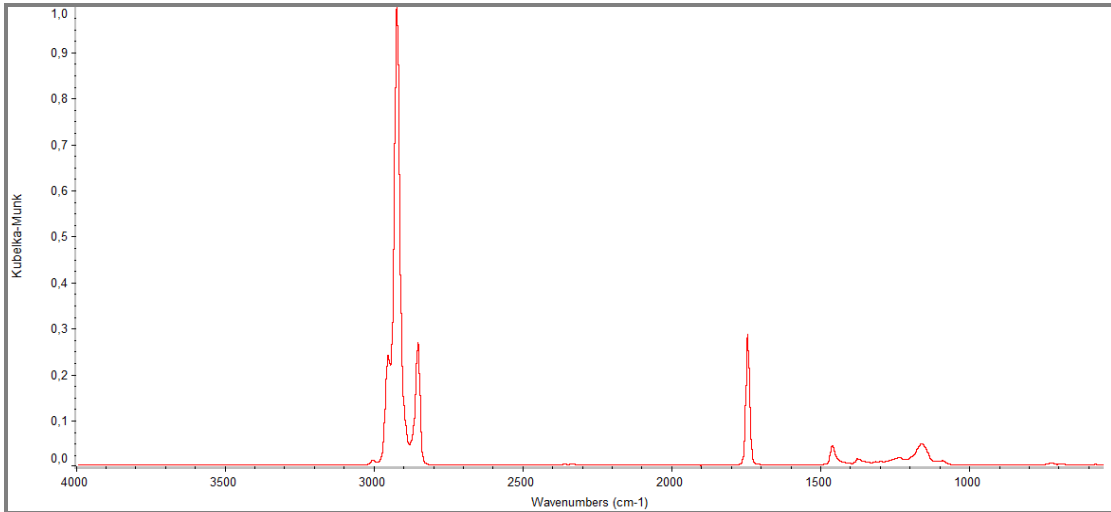
Π.2.36. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-7/12).



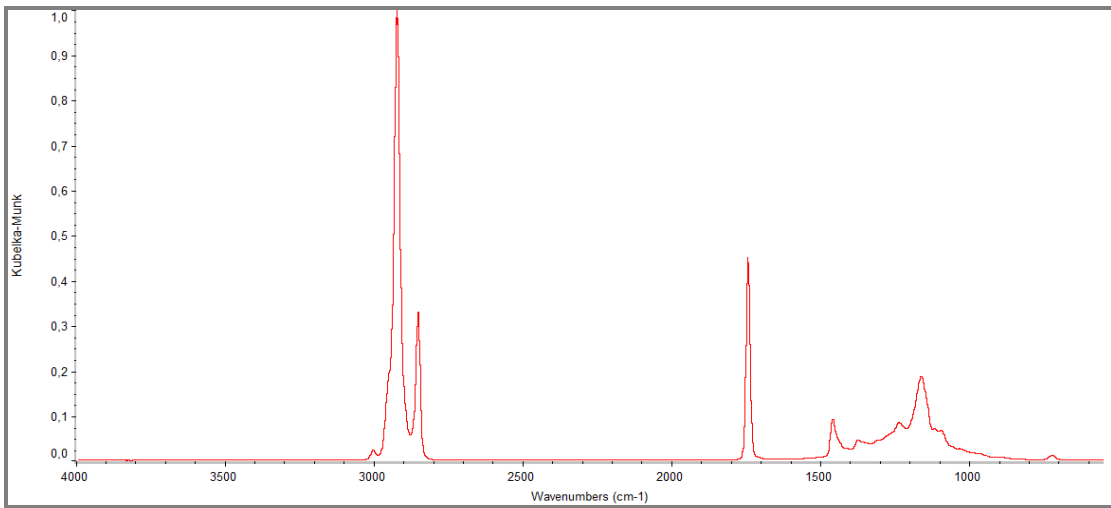
Π.2.37. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-8/12).



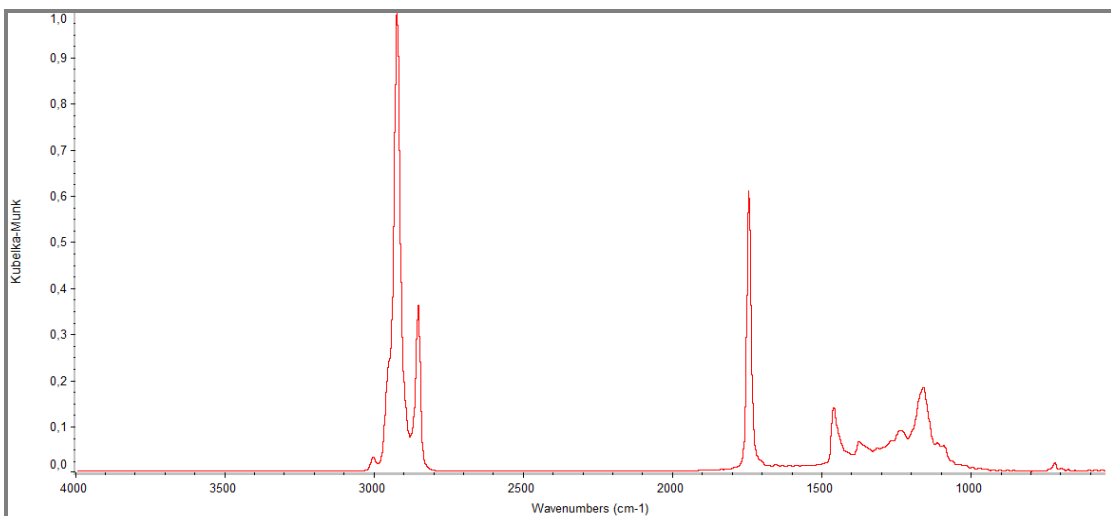
Π.2.38. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-9/12).



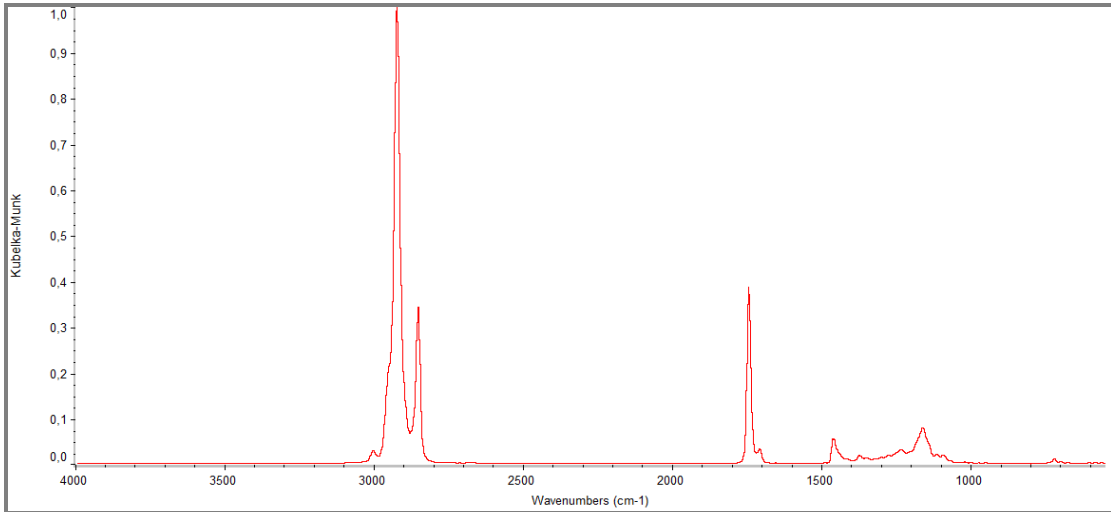
Π.2.39. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-1/7).



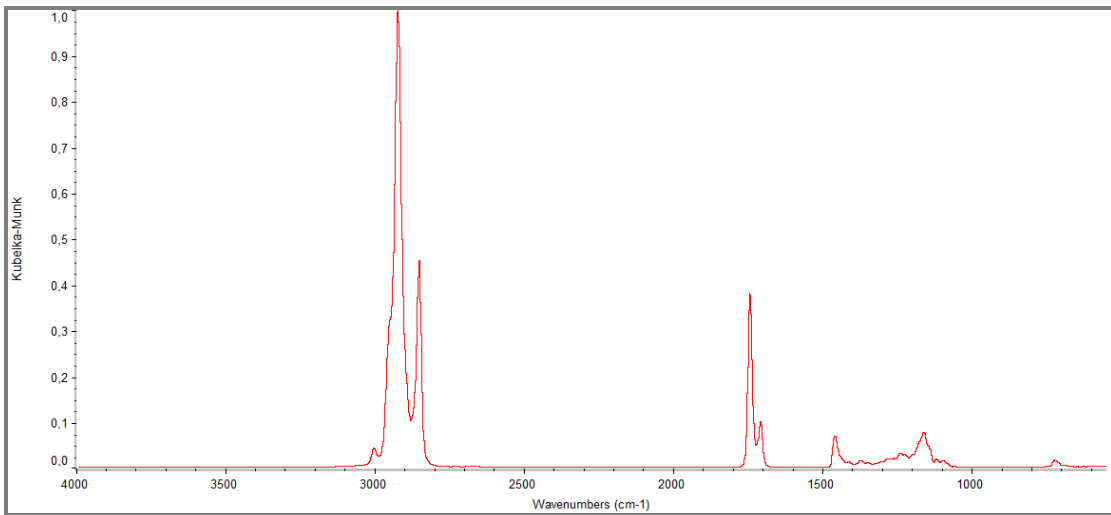
Π.2.40. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-1.1).



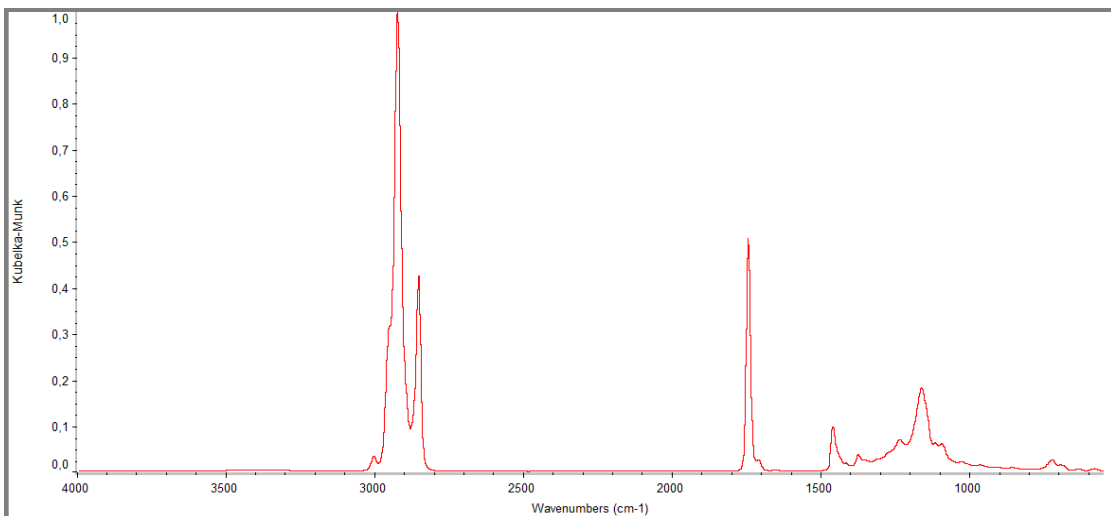
Π.2.41. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-1.2).



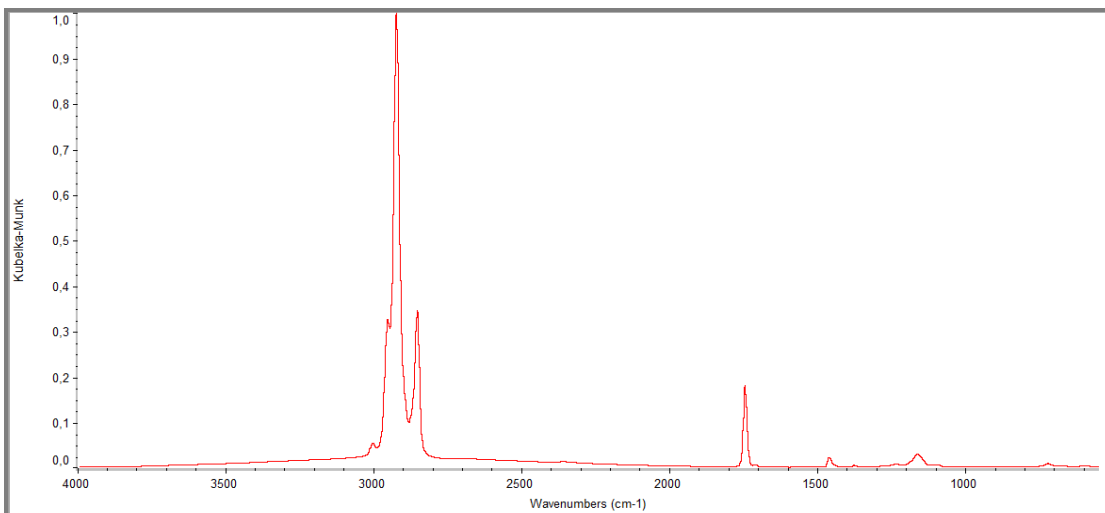
Π.2.42. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-2.1).



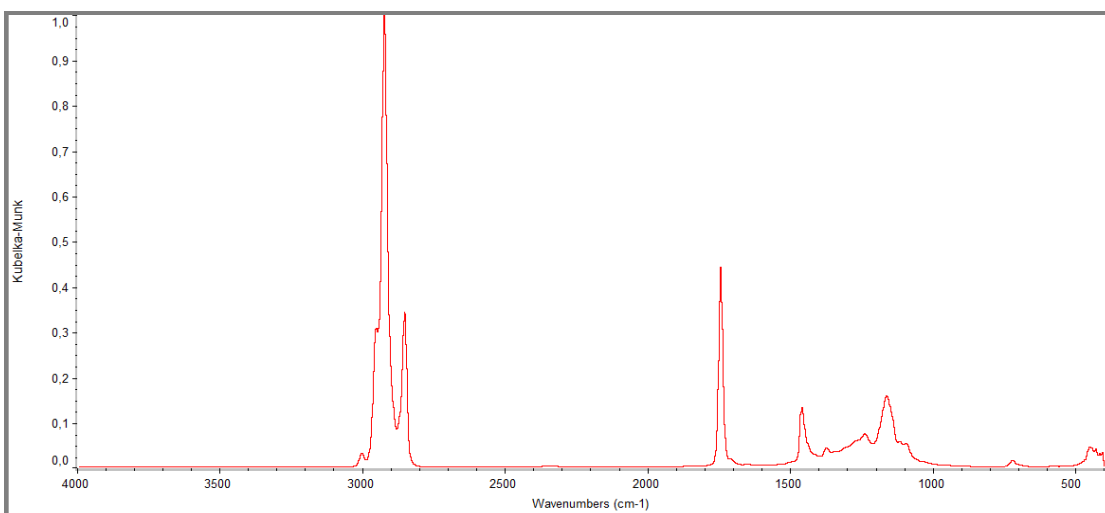
Π.2.43. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-2.2).



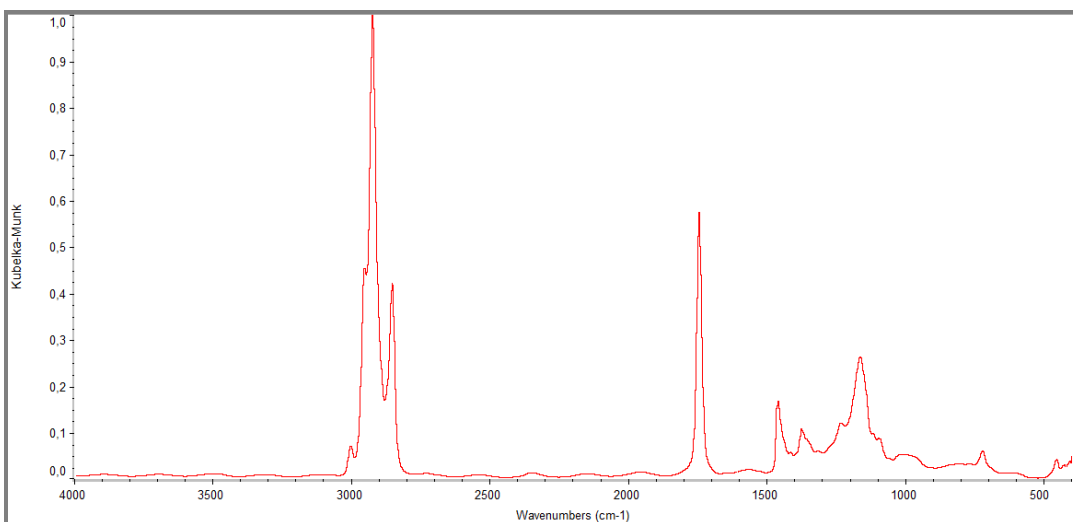
Π.2.44. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-3.1).



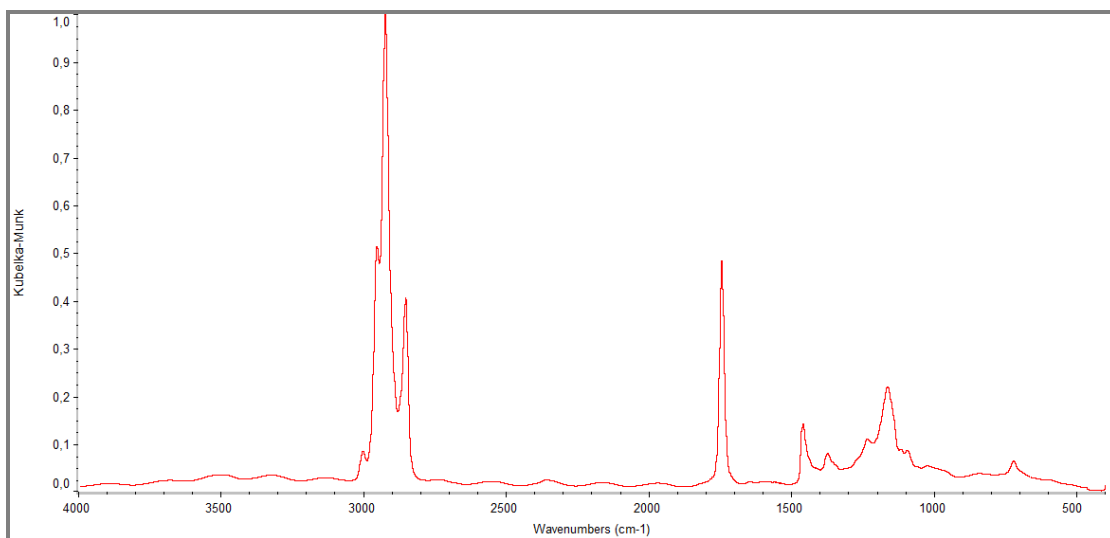
Π.2.45. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-3.2).



Π.2.46. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-OS-1).

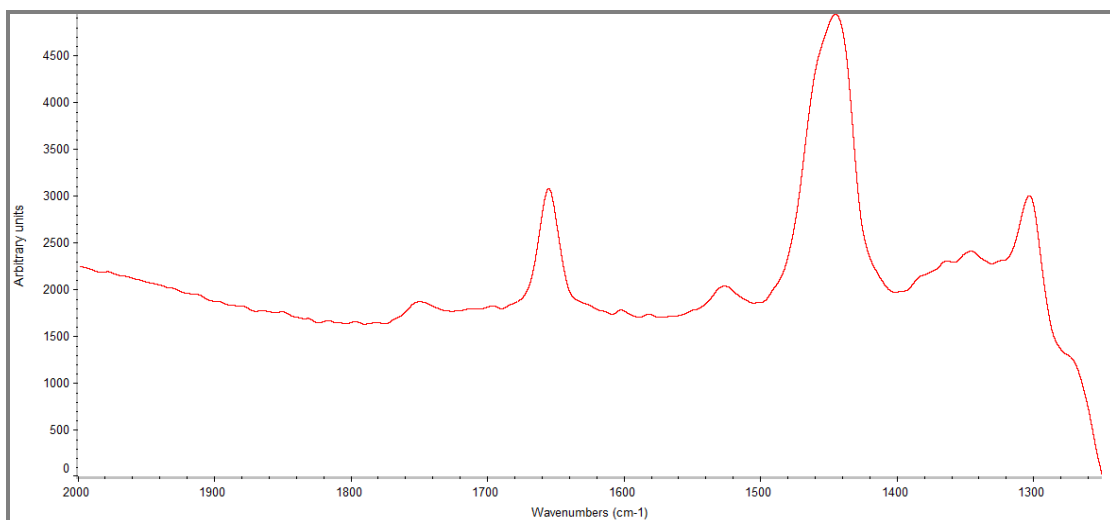


Π.2.47. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-OS-2).

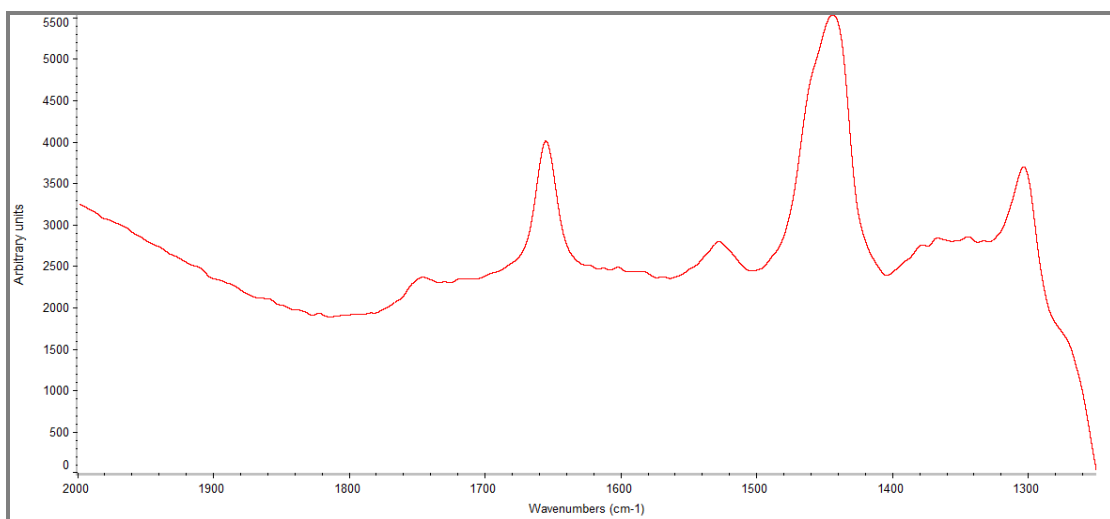


Π.2.48. Φάσμα FTIR φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-OS-3).

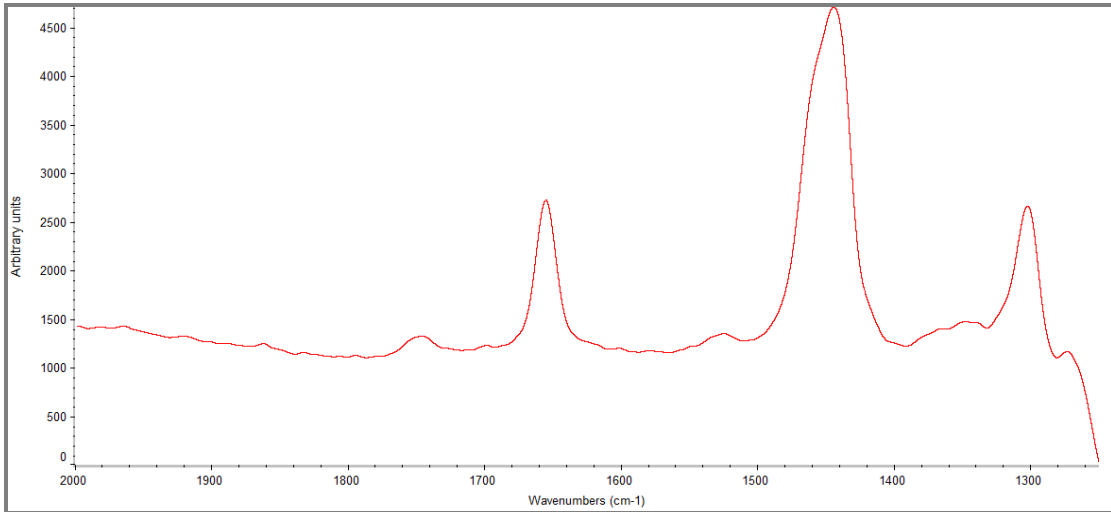
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 – ΦΑΣΜΑΤΑ RAMAN ΦΙΣΤΙΚΕΛΑΙΟΥ ΑΙΓΙΝΗΣ



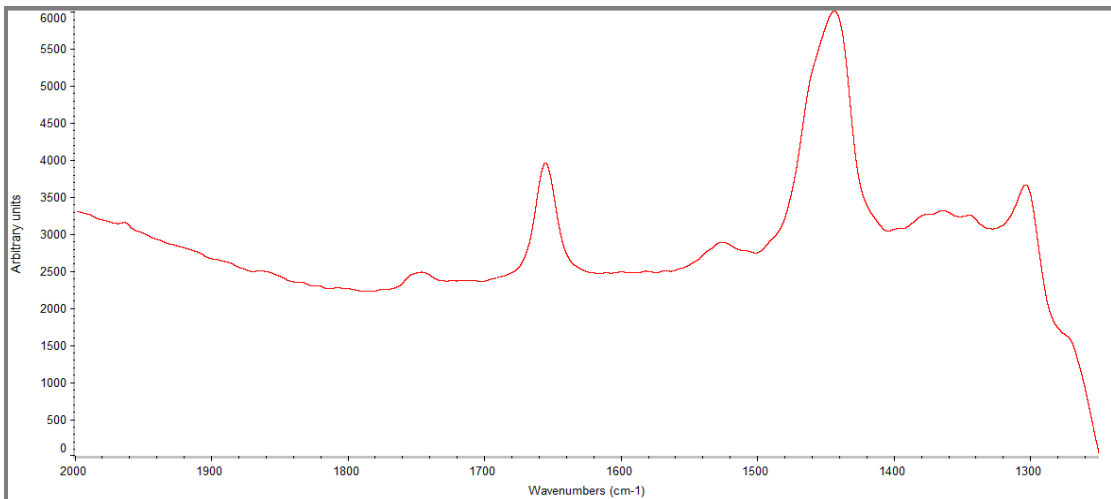
Π.3.1. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-2).



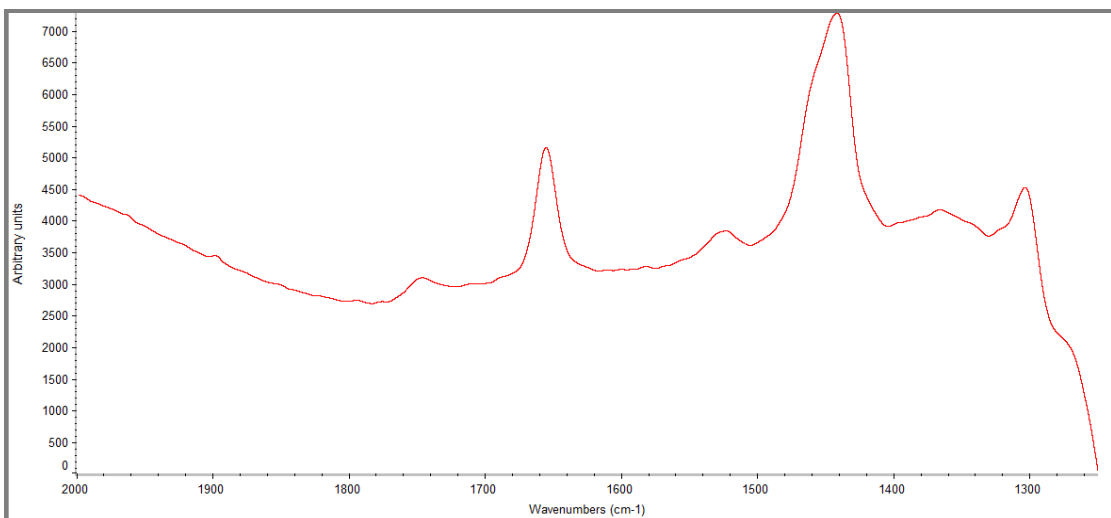
Π.3.2. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-3).



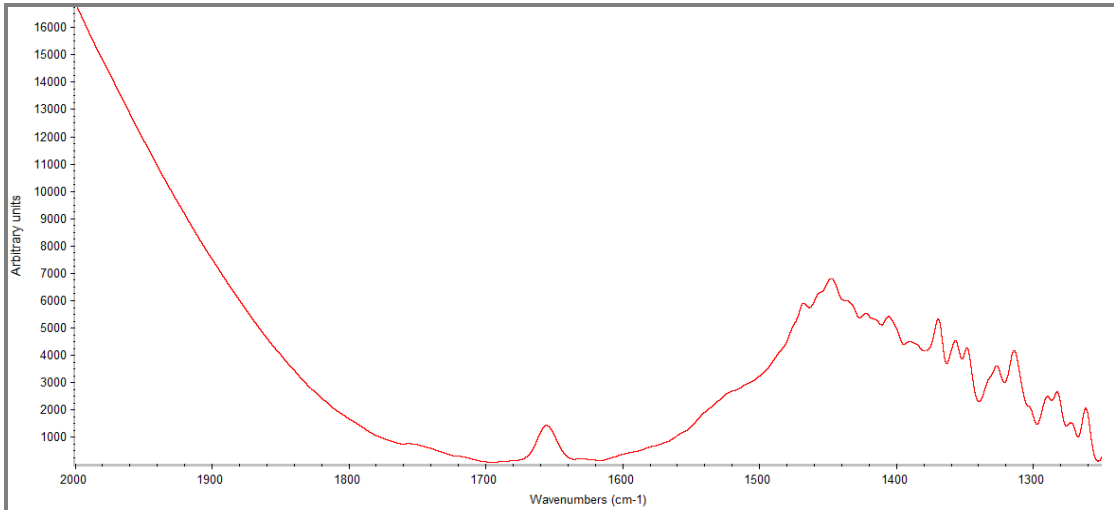
Π.3.3. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-4).



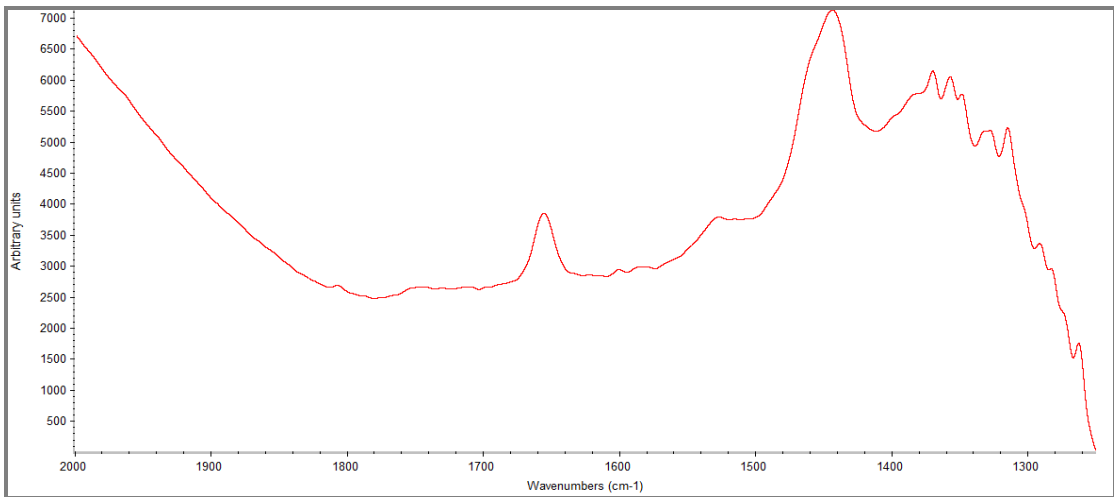
Π.3.4. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-5).



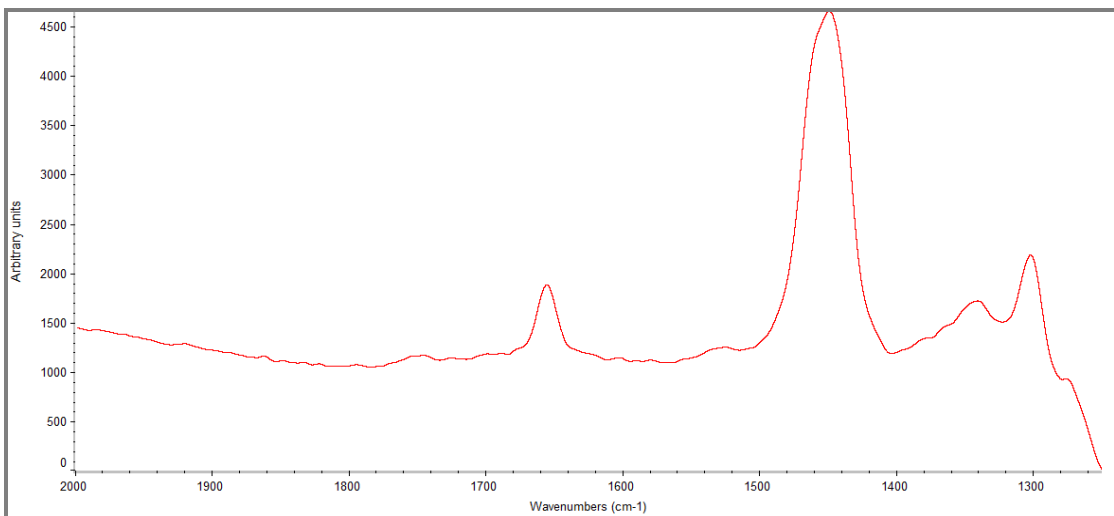
Π.3.5. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-6).



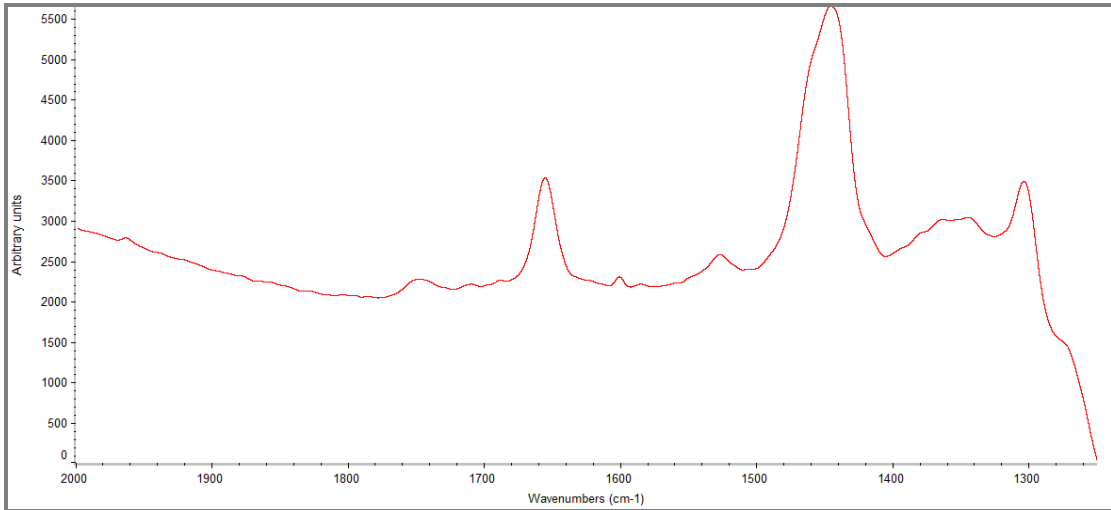
Π.3.6. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-7).



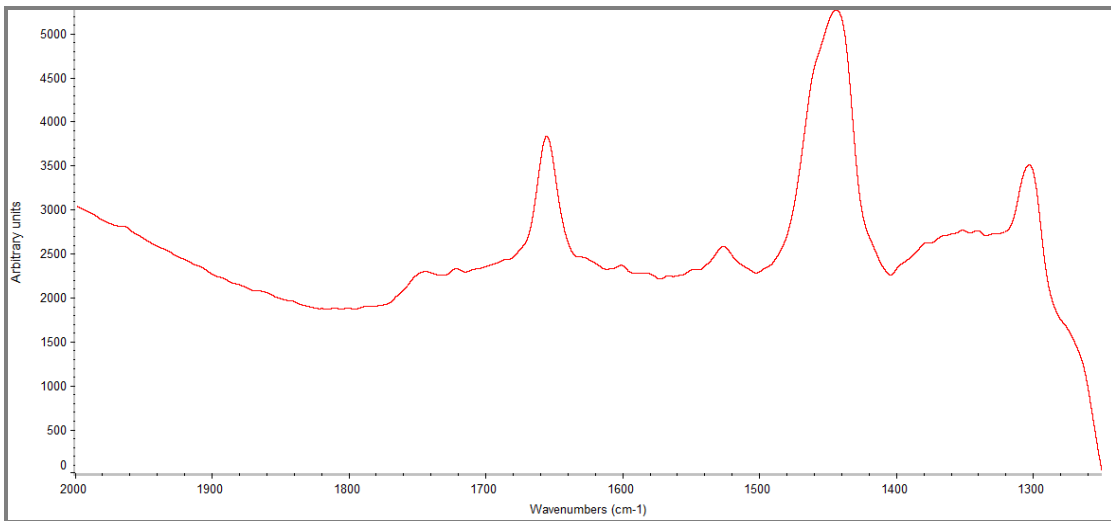
Π.3.7. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-8).



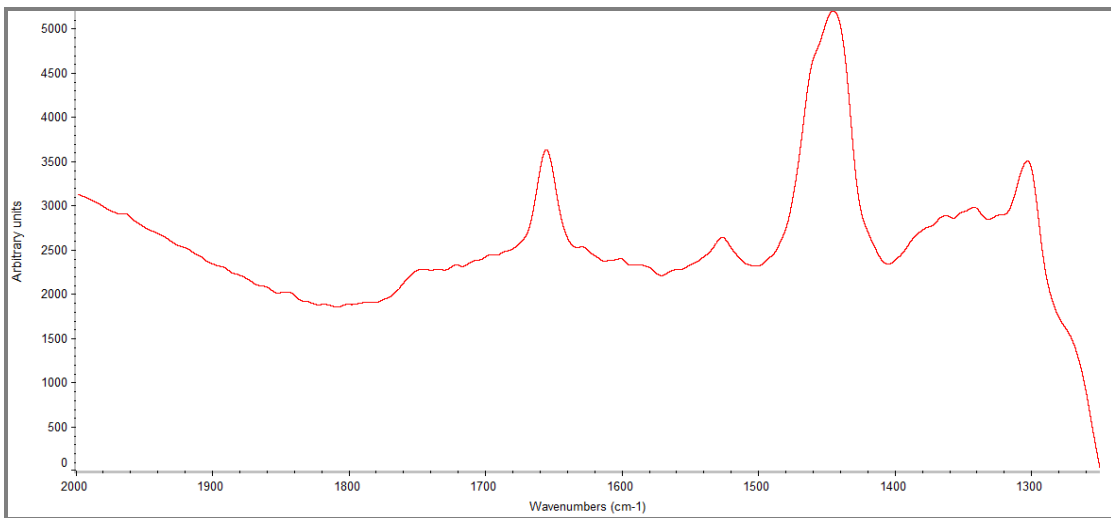
Π.3.8. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-9).



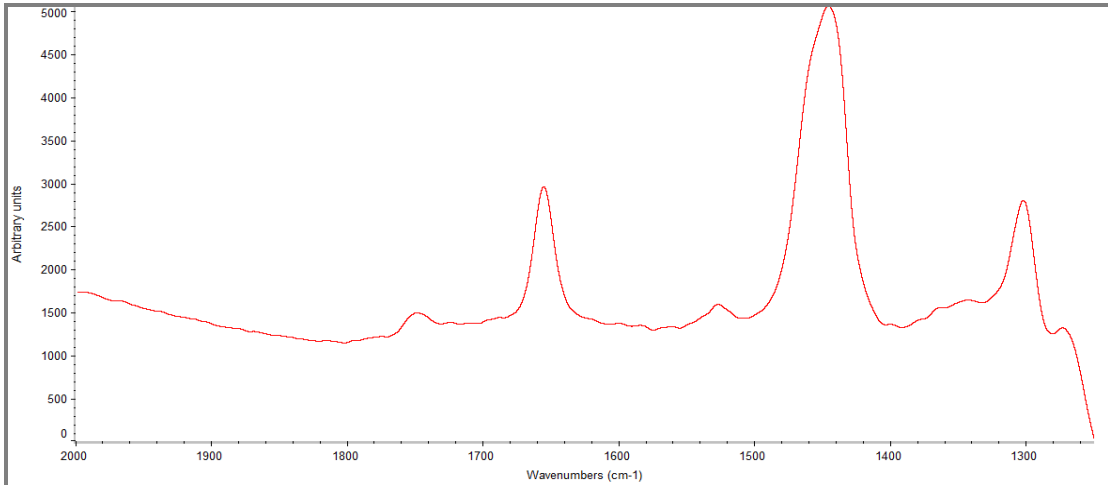
Π.3.9. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-H-10).



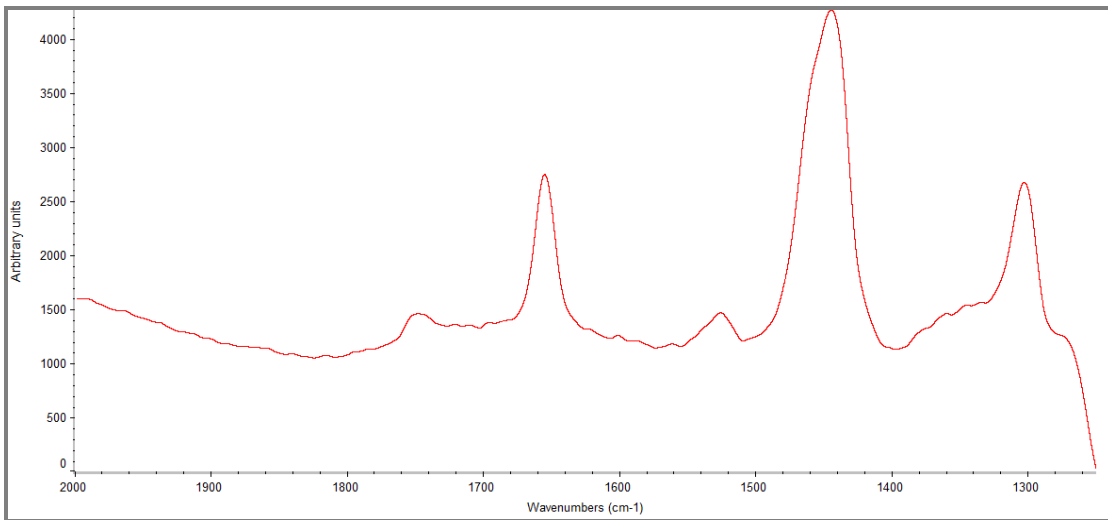
Π.3.10. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-H-11).



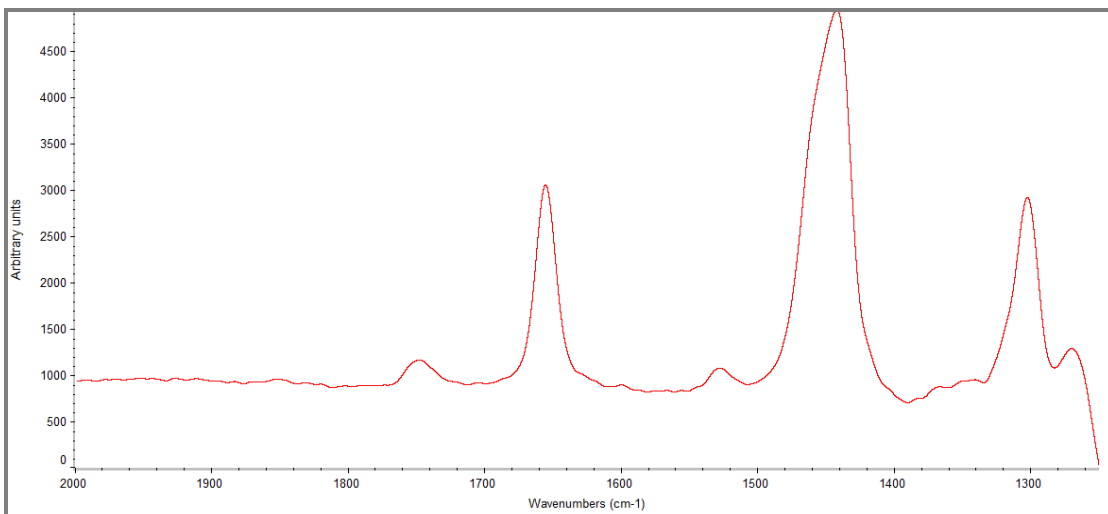
Π.3.11. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-H-12).



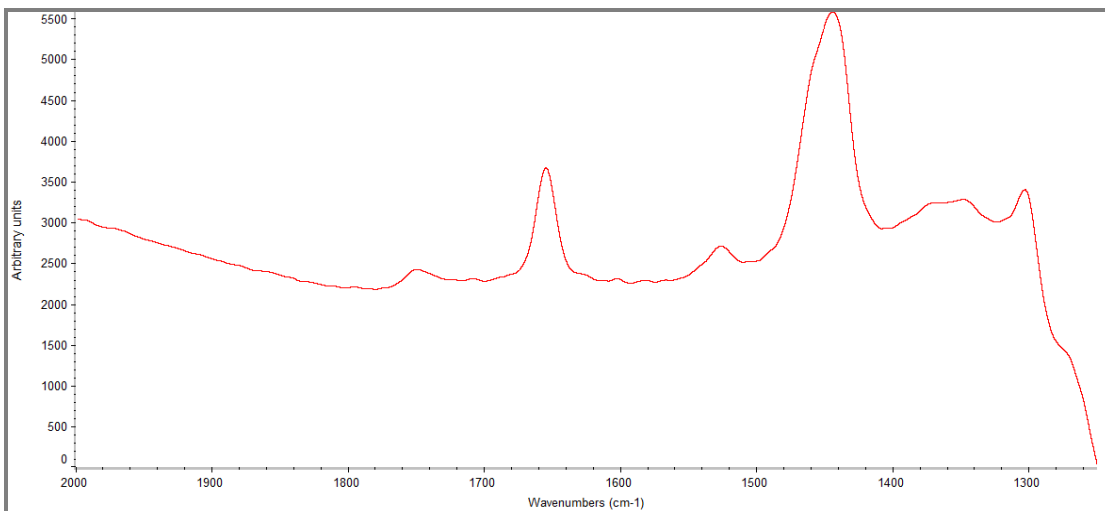
Π.3.12. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-13).



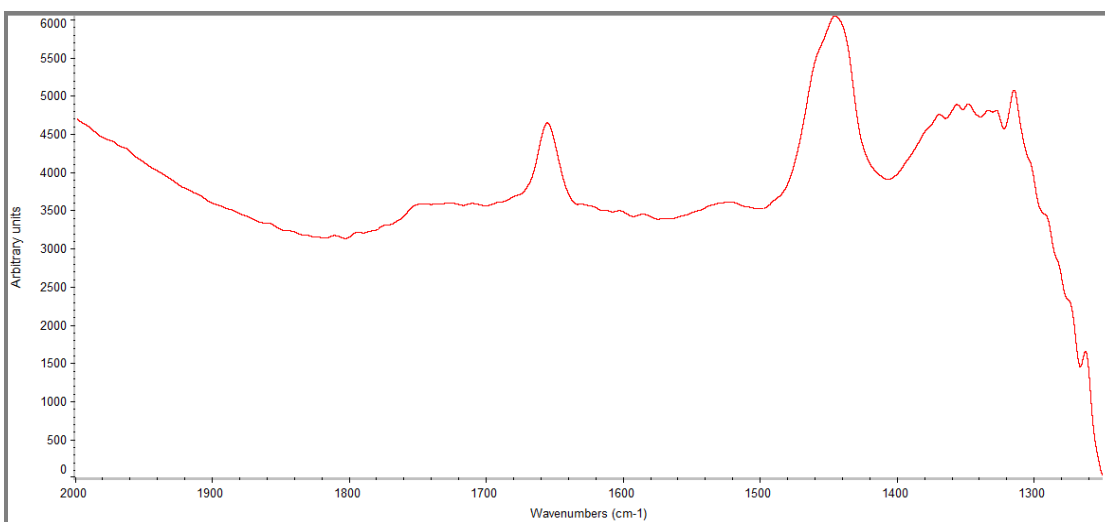
Π.3.13. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-14).



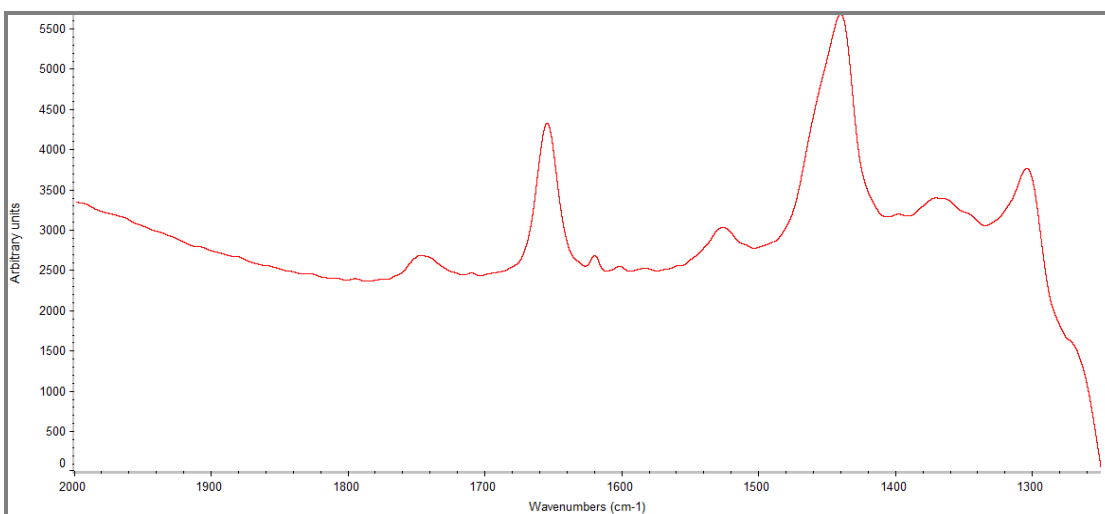
Π.3.14. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-H-15).



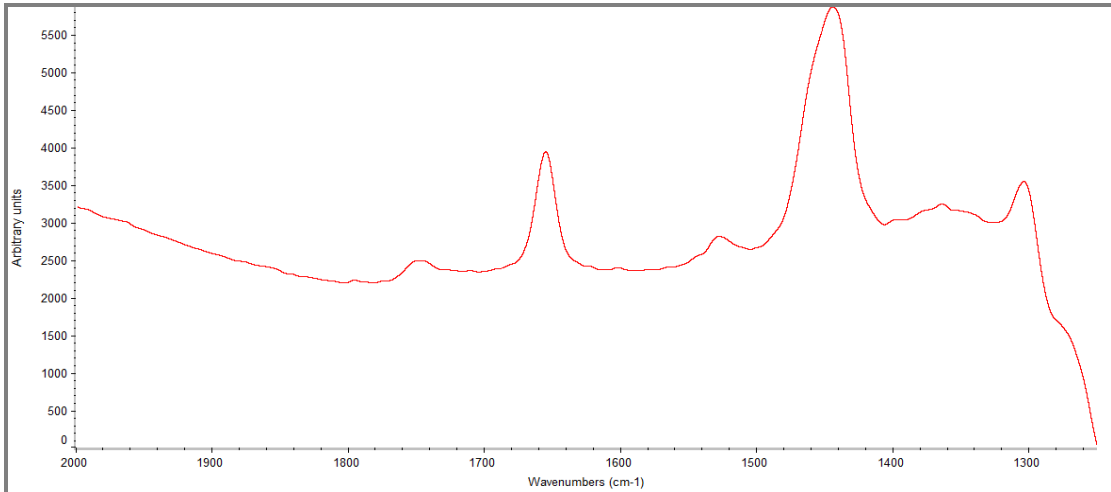
Π.3.15. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-3).



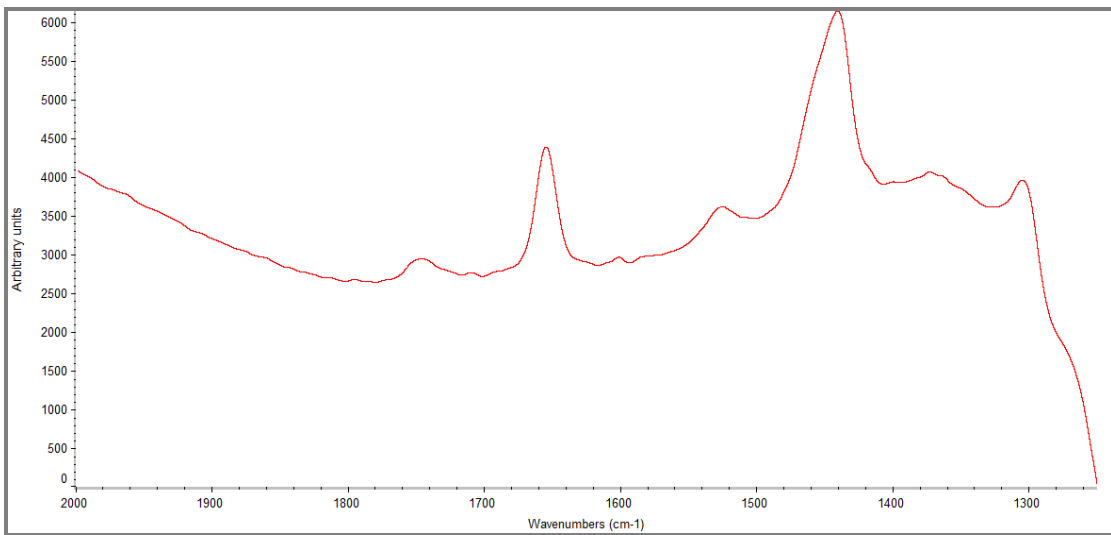
Π.3.16. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-4).



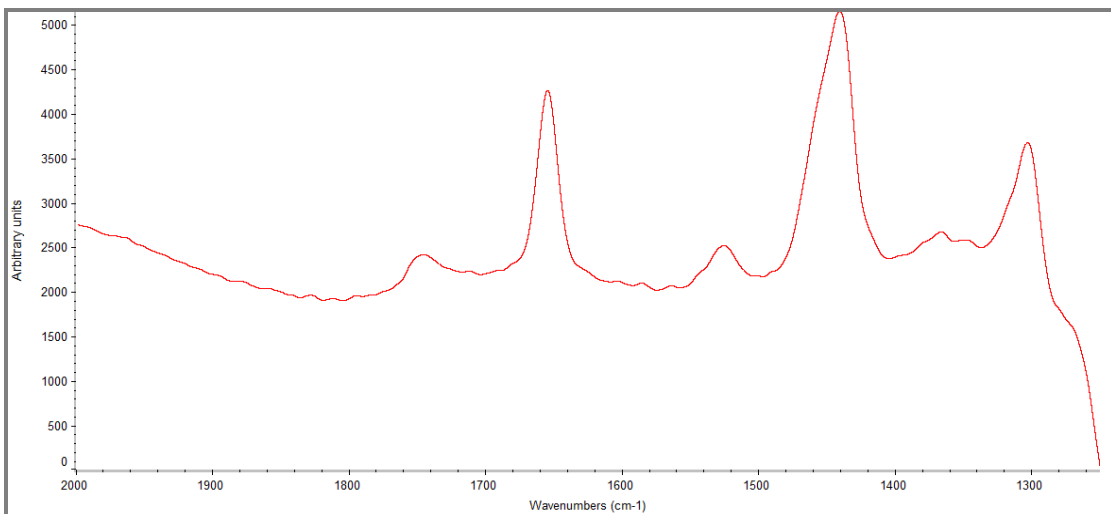
Π.3.17. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-NC-5).



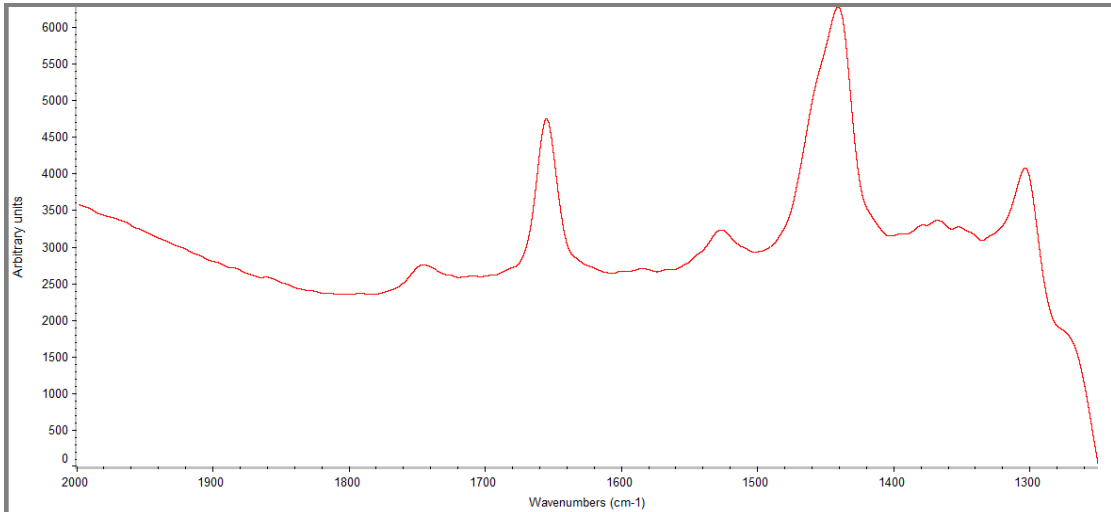
Π.3.18. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-6).



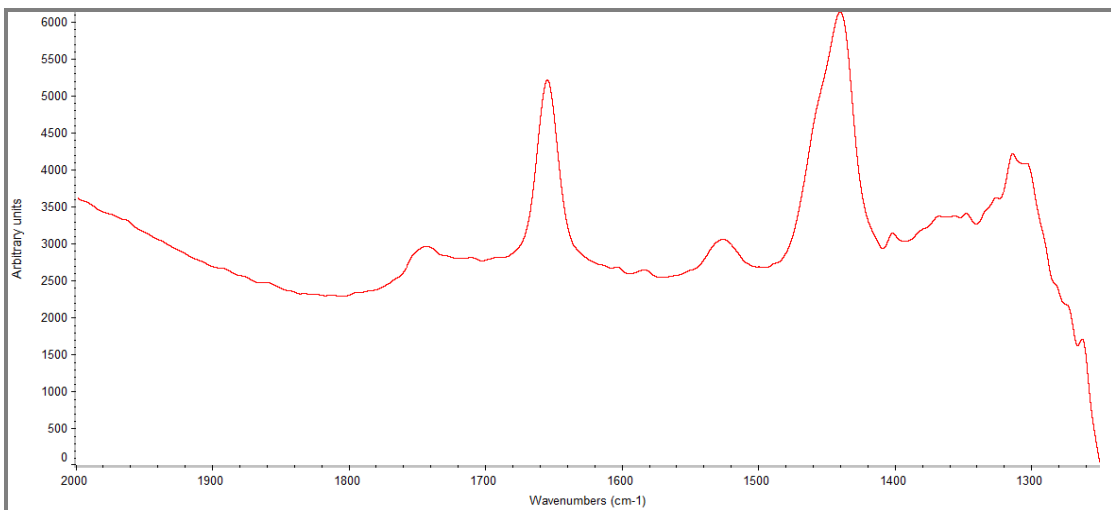
Π.3.19. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-7).



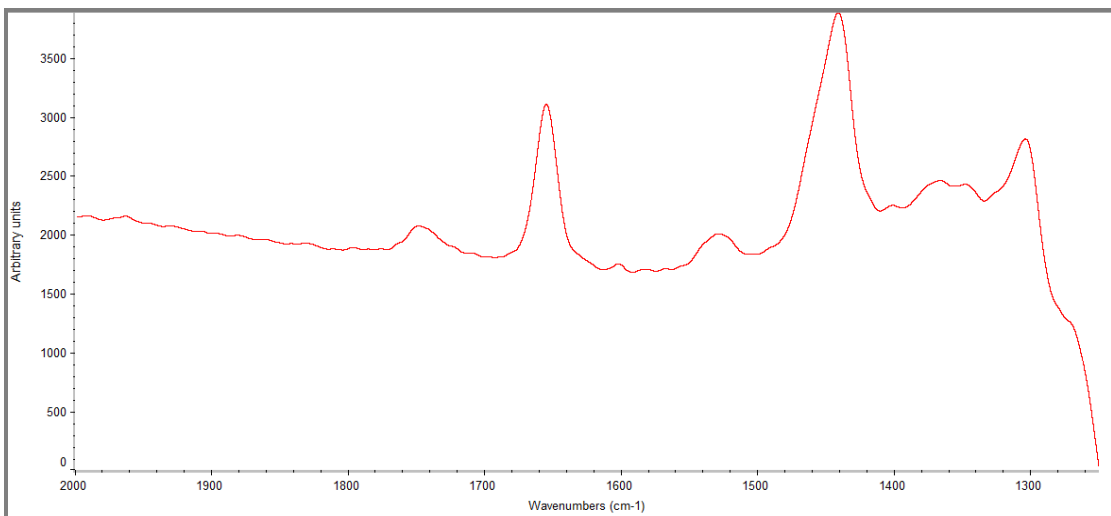
Π.3.20. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-8).



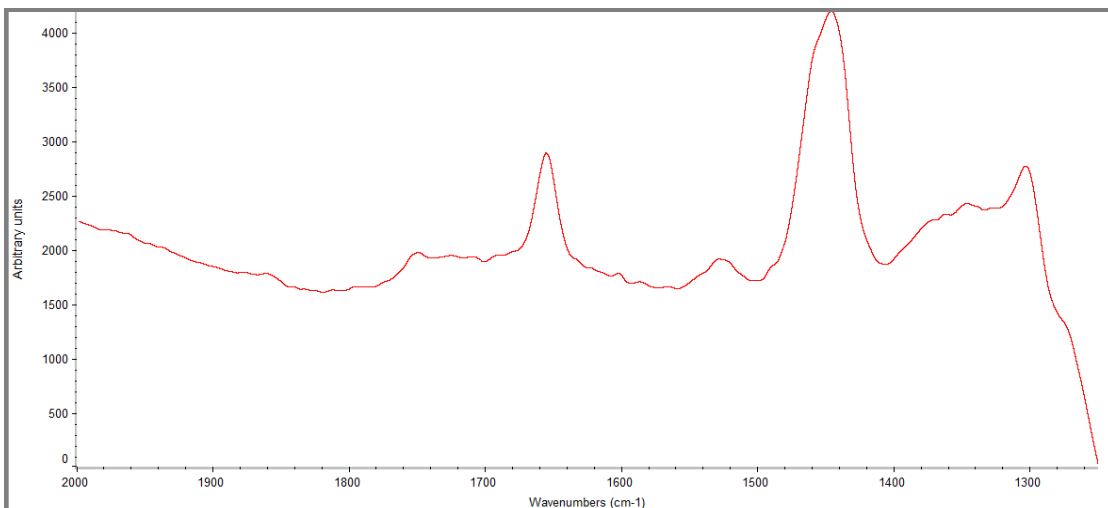
Π.3.21. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-9).



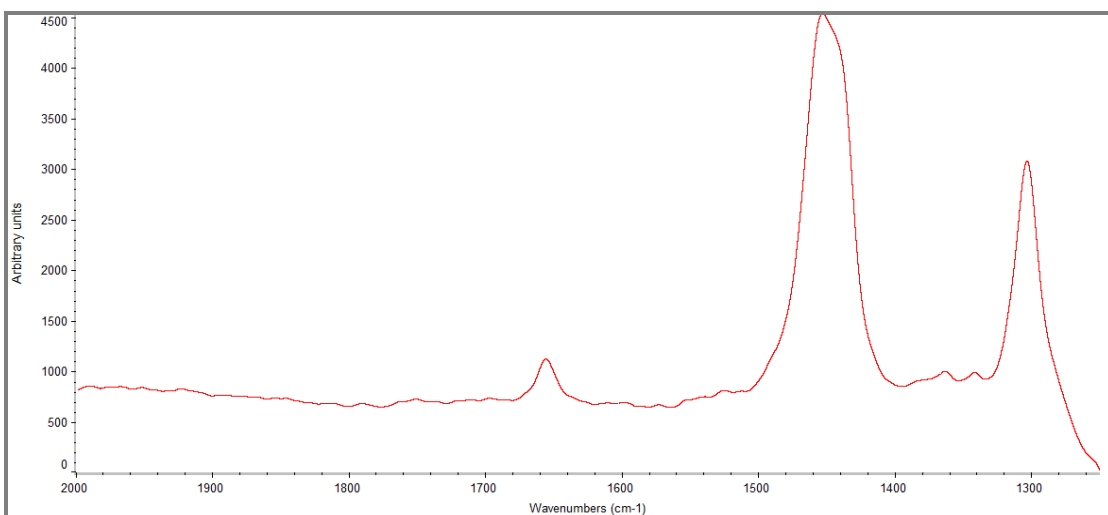
Π.3.22. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-10).



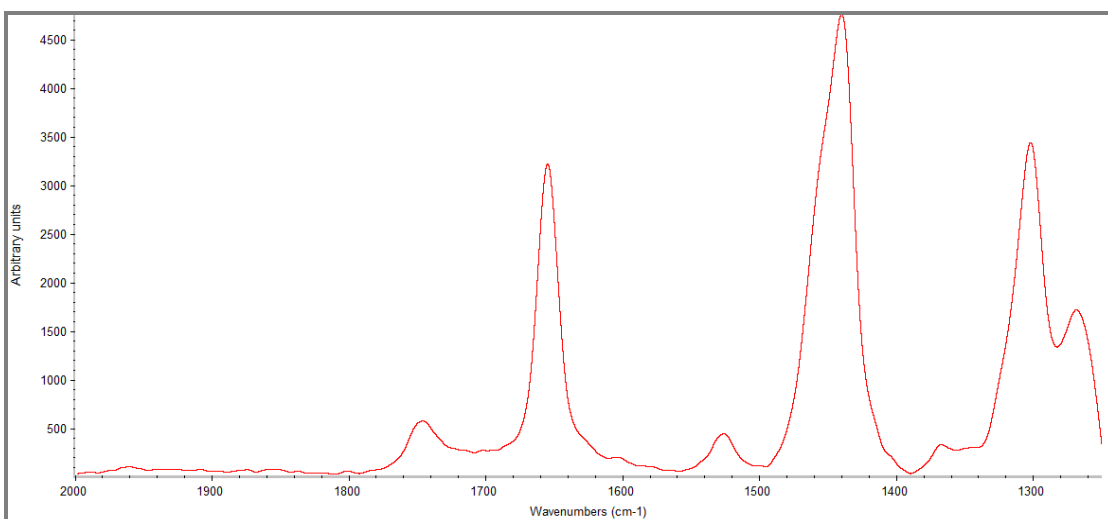
Π.3.23. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-11).



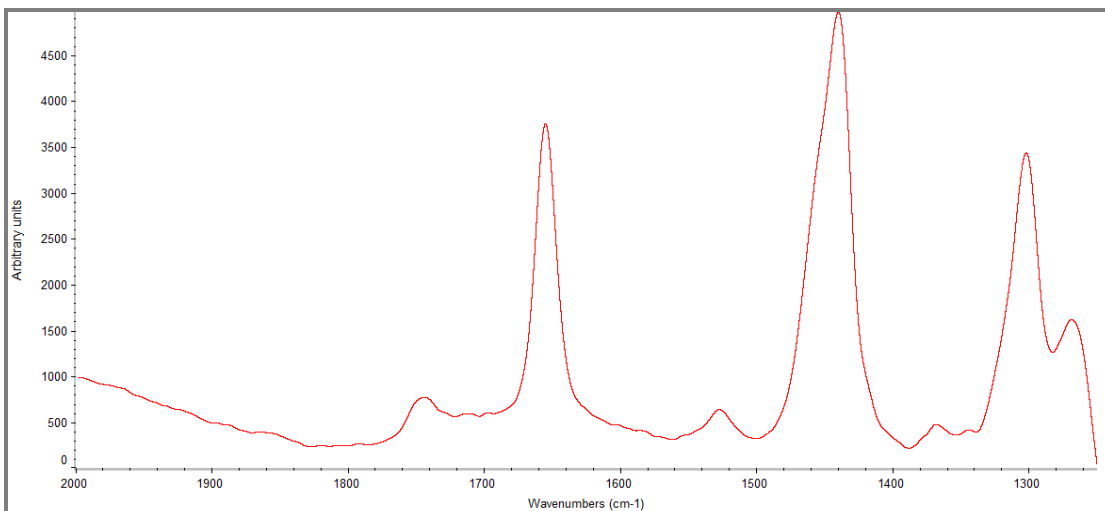
Π.3.24. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-NC-12).



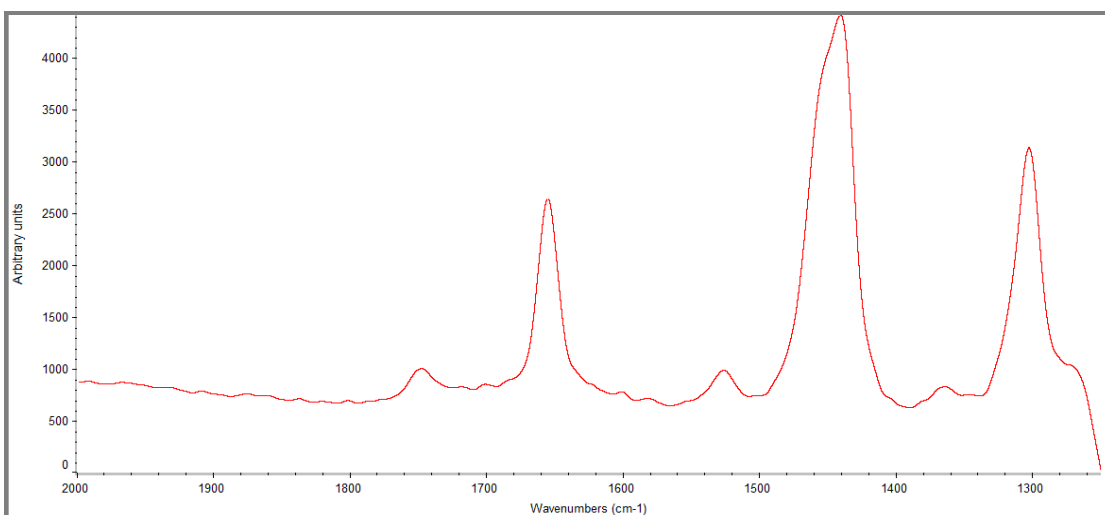
Π.3.25. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-1.1).



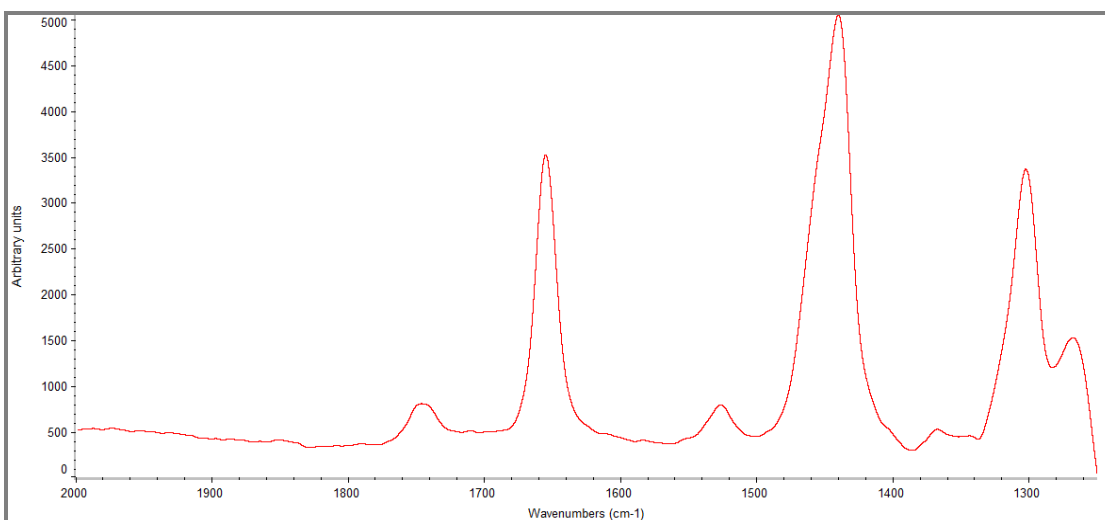
Π.3.26. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-1.2).



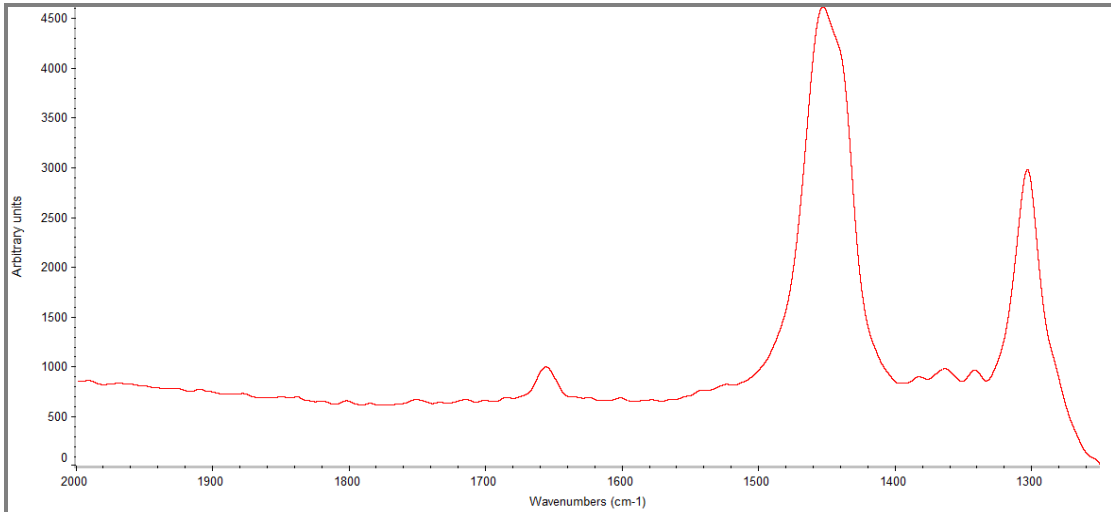
Π.3.27. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-2.1).



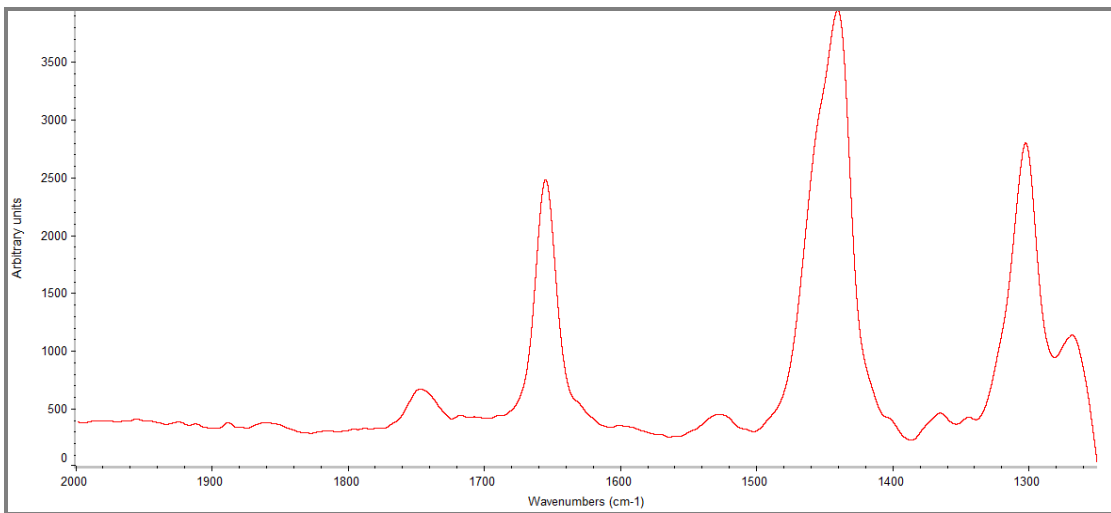
Π.3.28. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-2.2).



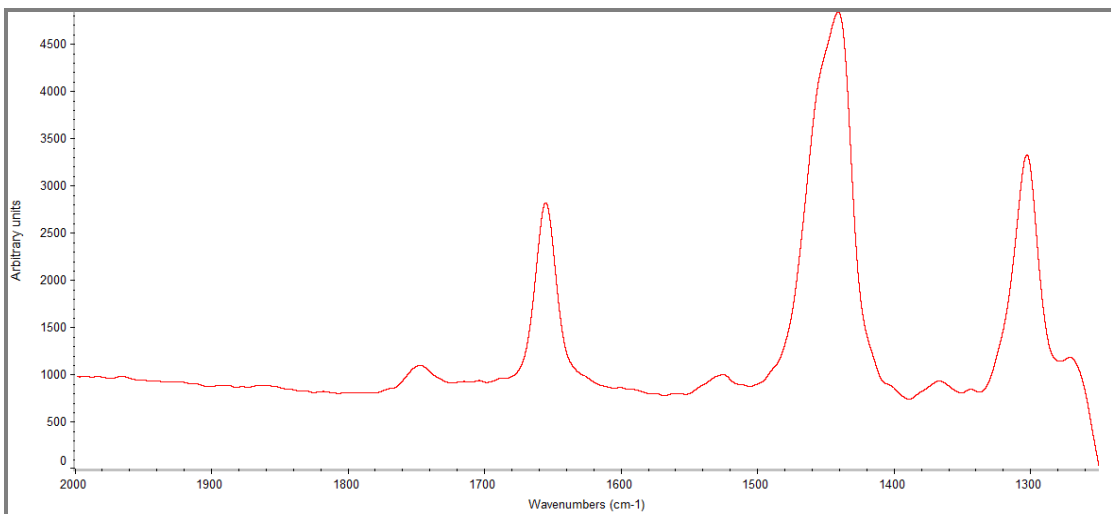
Π.3.29. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-AC-3.1).



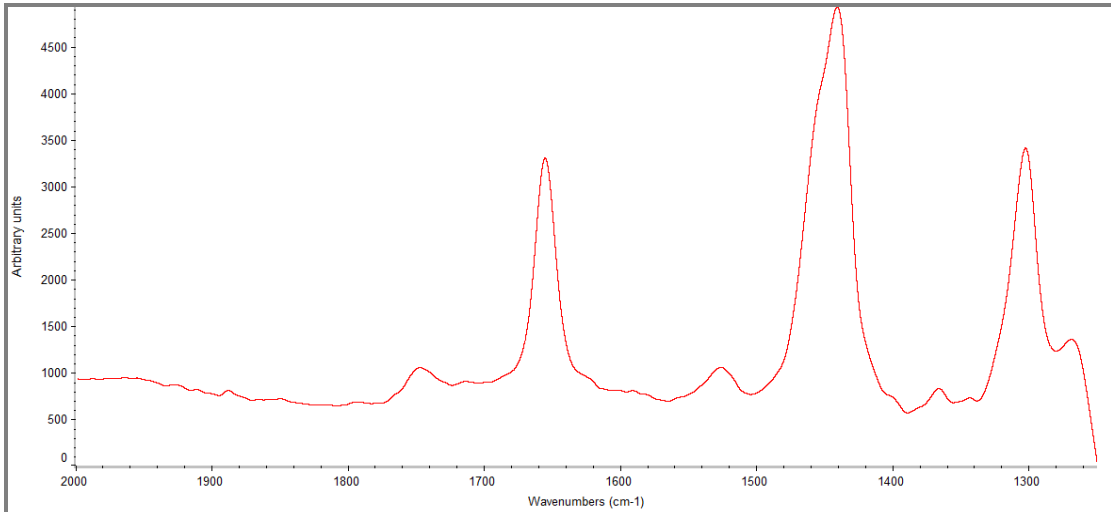
Π.3.30. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-3.2).



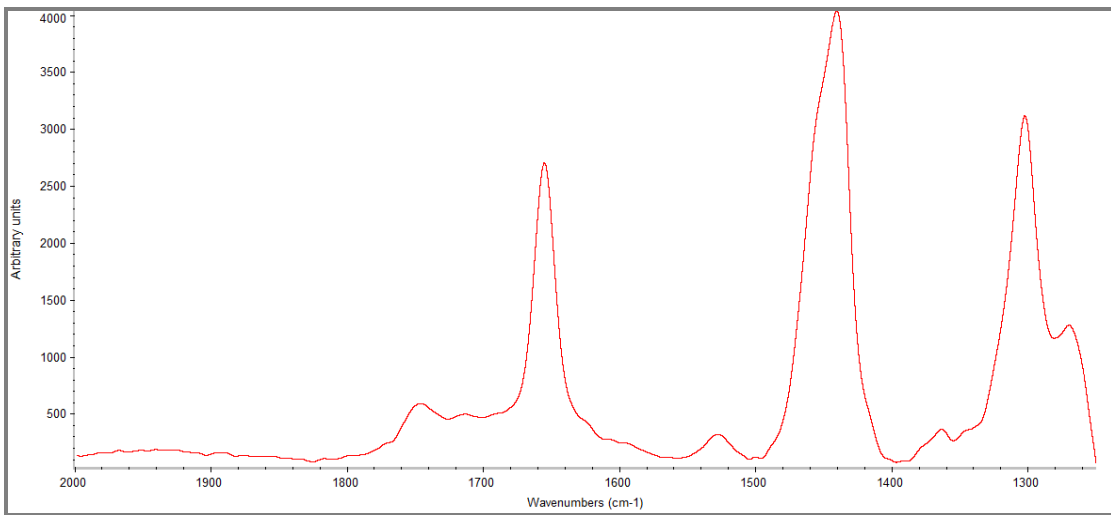
Π.3.31. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-2/10).



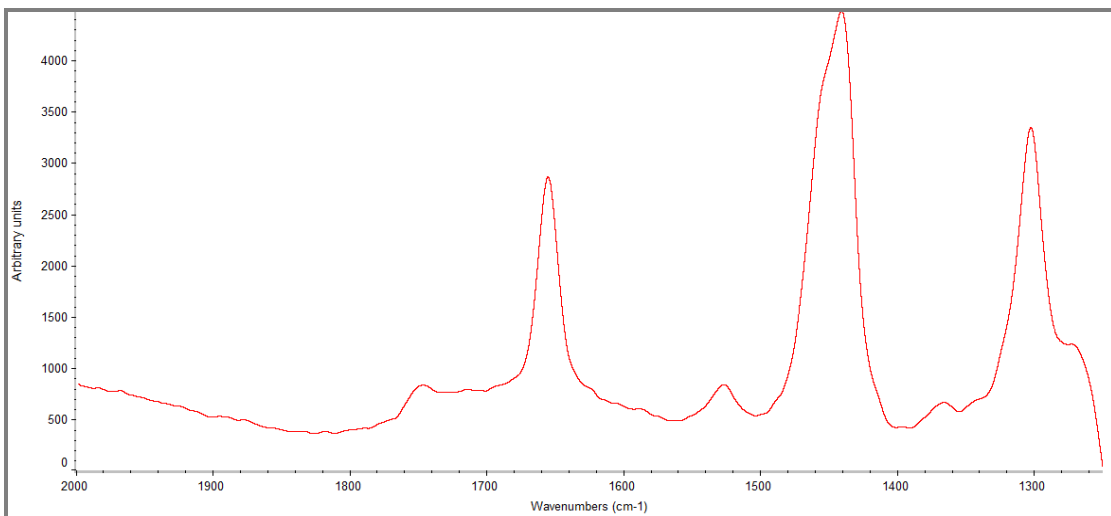
Π.3.32. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-3/12).



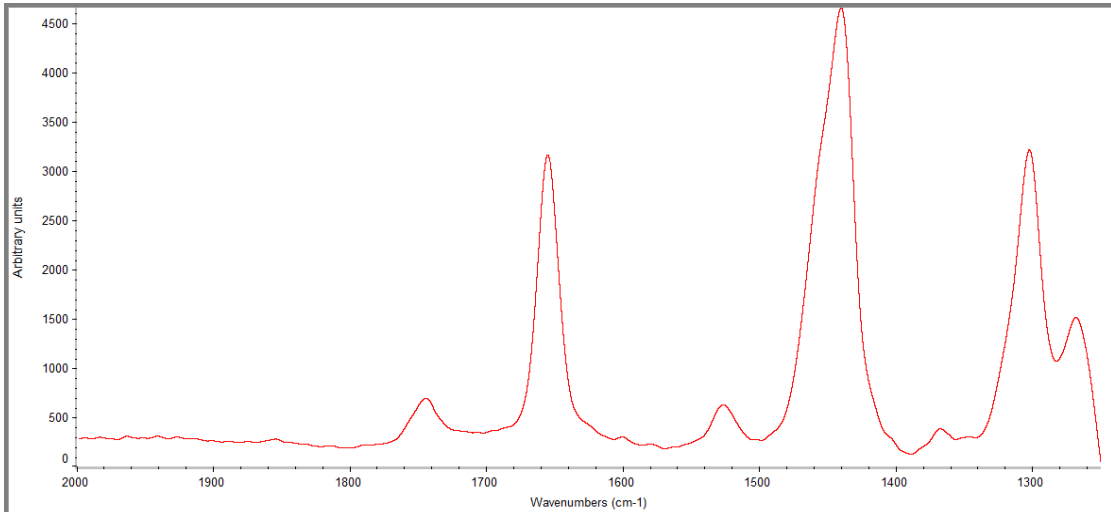
Π.3.33. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-4/12).



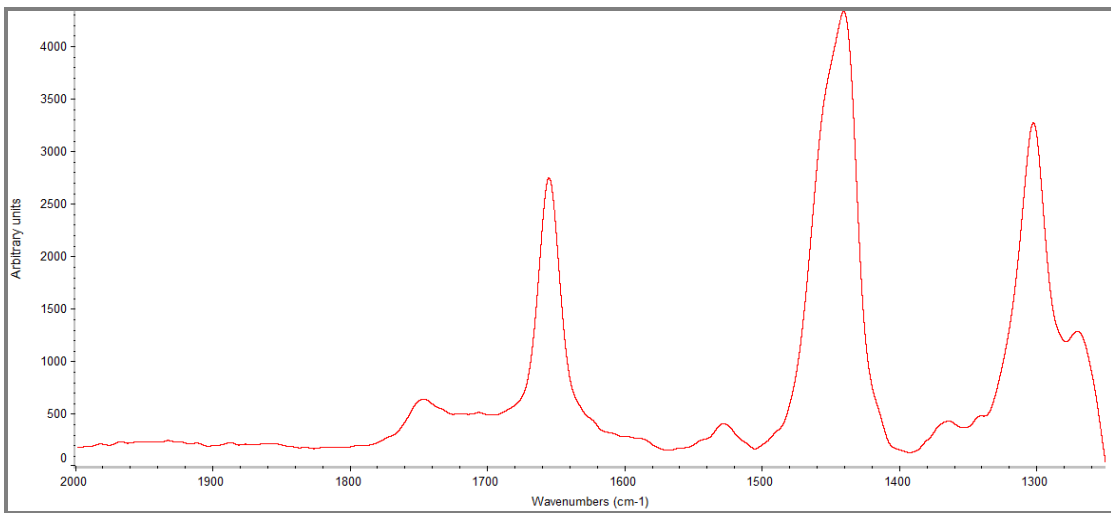
Π.3.34. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-5/12).



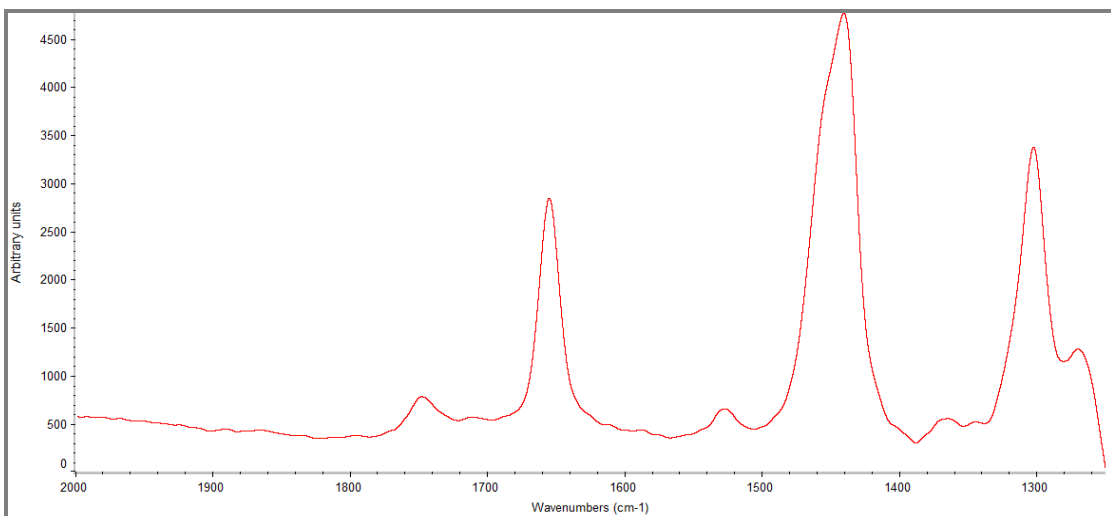
Π.3.35. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-6/12).



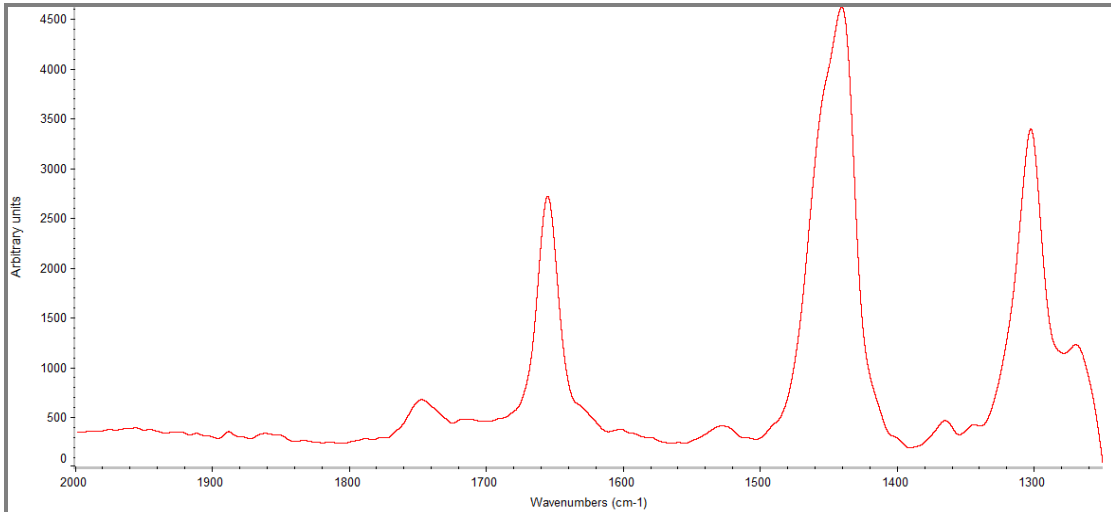
Π.3.36. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-7/12).



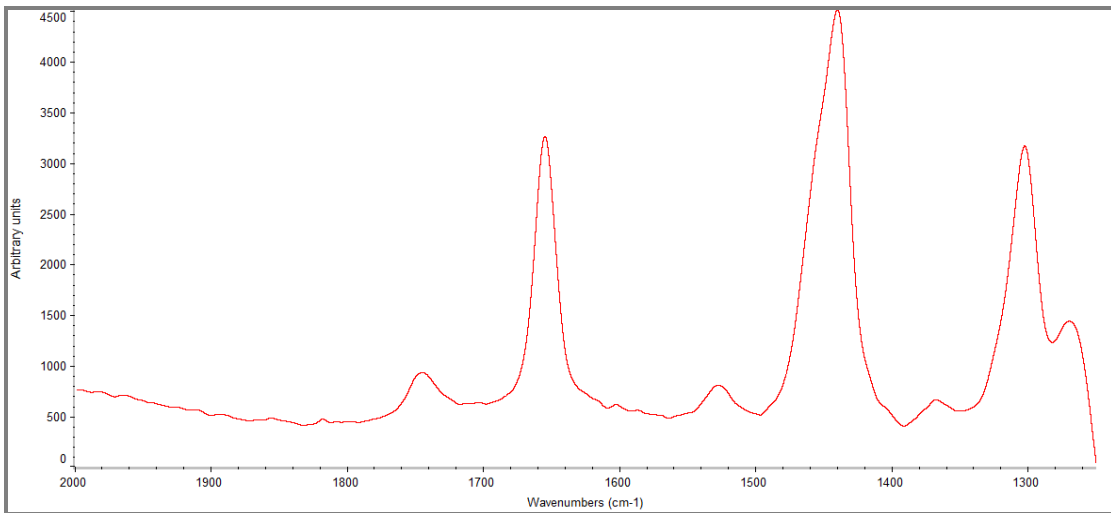
Π.3.37. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-8/12).



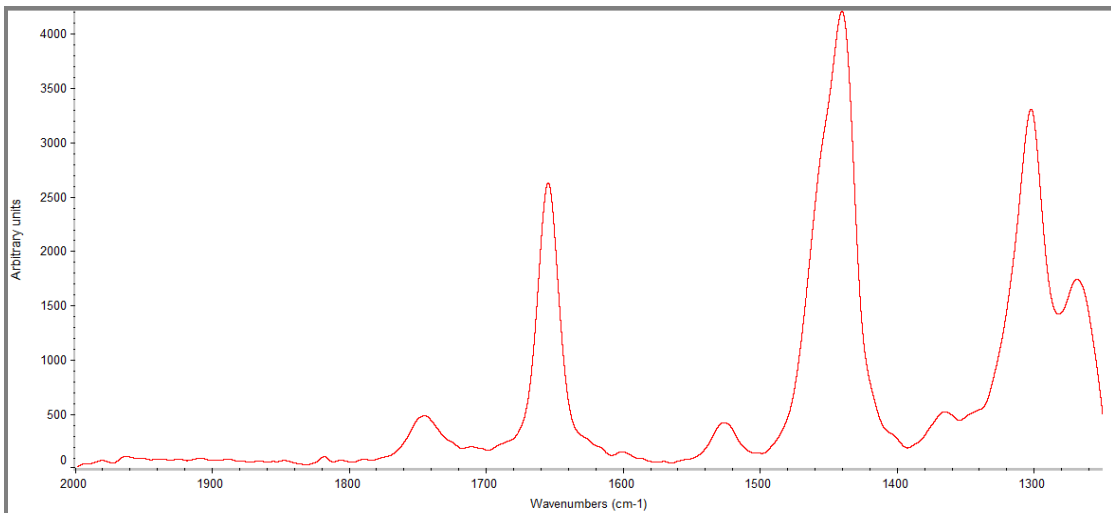
Π.3.38. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-AC-9/12).



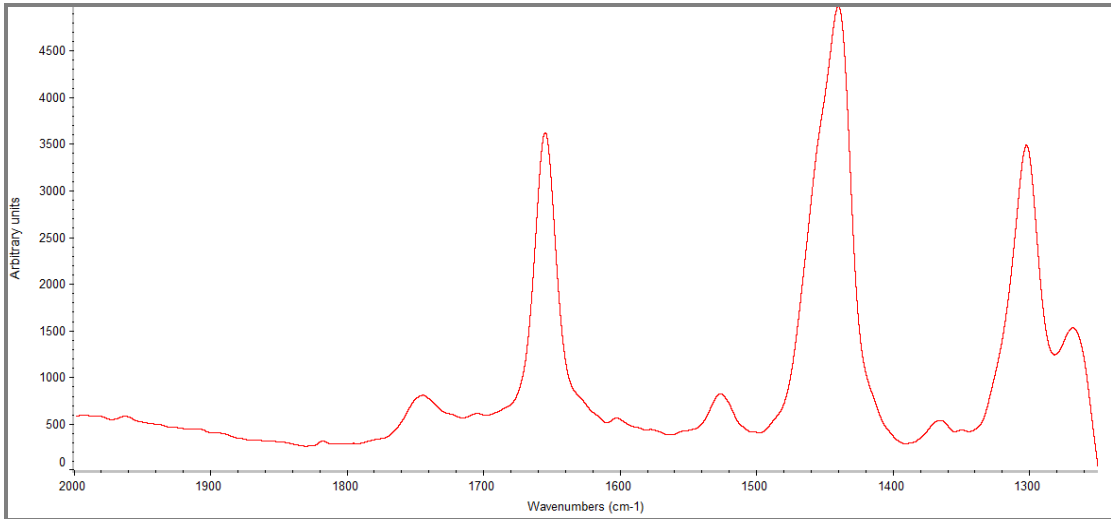
Π.3.39. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-1/7).



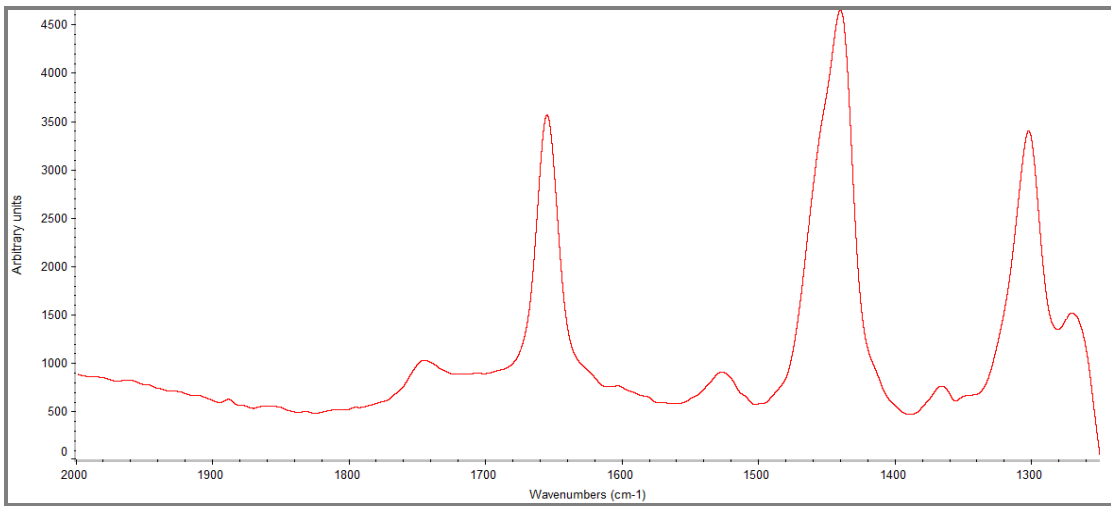
Π.3.40. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-1.1).



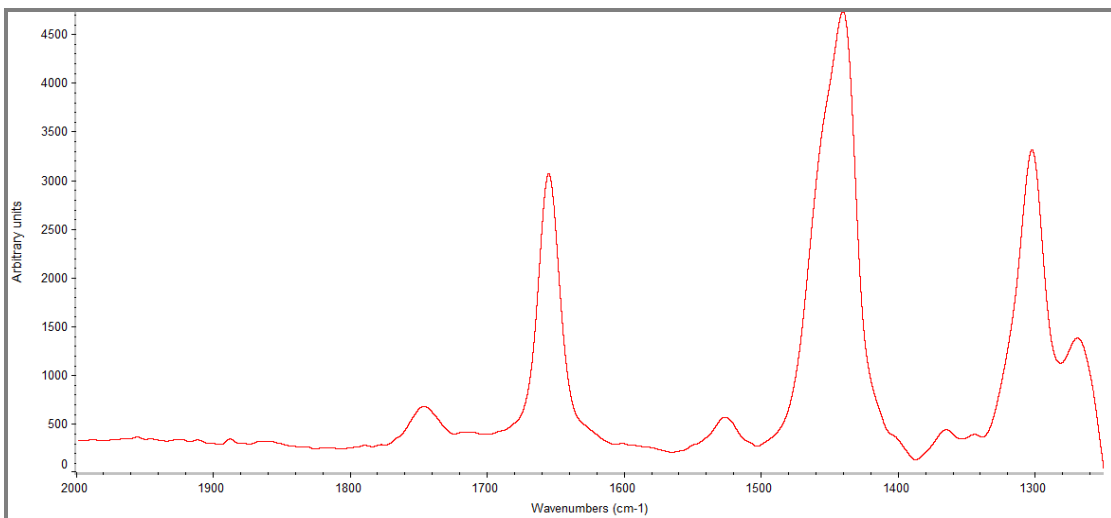
Π.3.41. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-1.2).



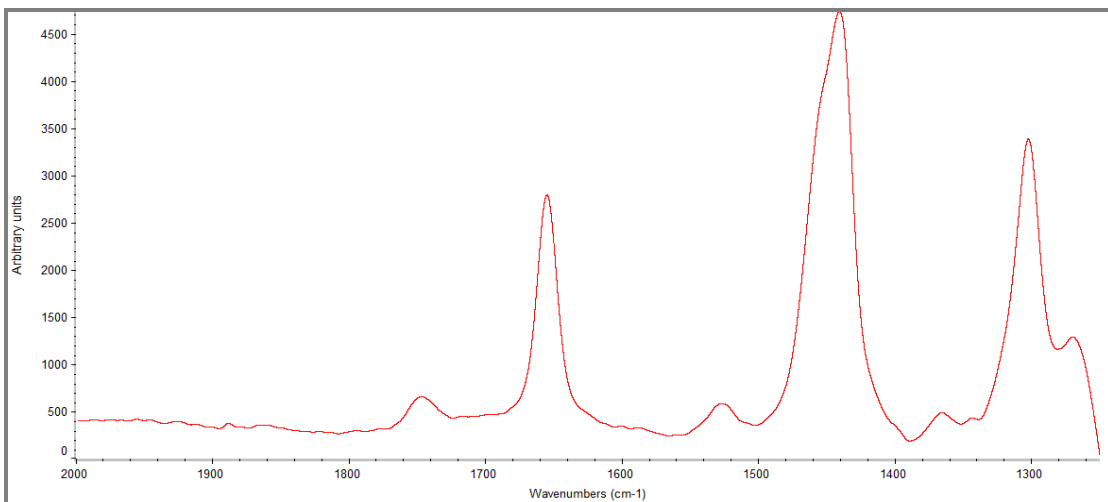
Π.3.42. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-ANT-2.1).



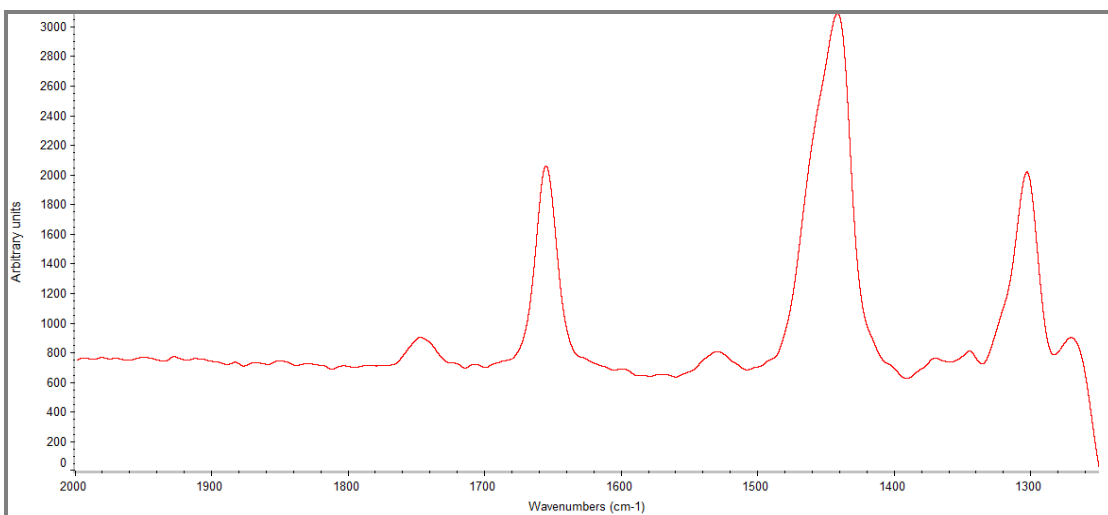
Π.3.43. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-ANT-2.2).



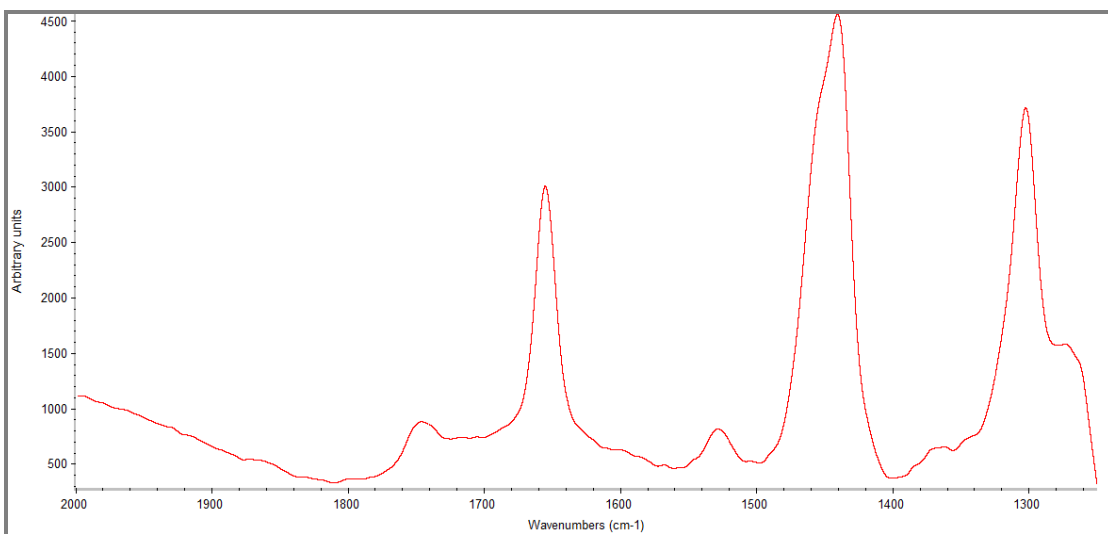
Π.3.44. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αγίνης (oil-ANT-3.1).



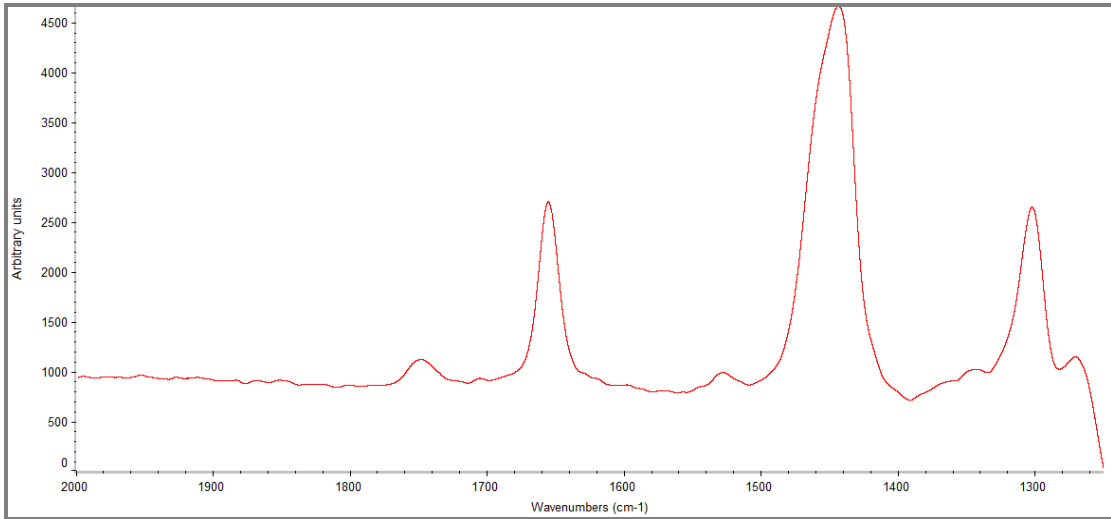
Π.3.45. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-ANT-3.2).



Π.3.46. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-OS-1).



Π.3.47. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil- OS-2).



Π.3.48. Φάσμα Raman φιστικέλαιου Αιγίνης (oil-OS-3).