

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

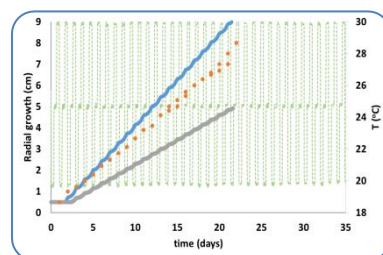
Τμήμα Συστημάτων Διαχείρισης Ποιότητας και Διασφάλισης Υγιεινής
Τροφίμων

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής των Τροφίμων

Π.Μ.Σ. Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο:

Ανάπτυξη και επικύρωση κινητικού και πιθανολογικού μοντέλου με βάση την αρχή “gamma concept” για την μελέτη διαφορετικών στελεχών μυκήτων σε προϊόντα τύπου brioche, συναρτήσεσι: θερμοκρασίας, υγρασίας – a_w , pH και συντηρητικού.



Ιωάννα Α. Καλαϊτζόγλου

Αθήνα, 2017

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Ν. Παναγιώτης

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής των Τροφίμων

Μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο:

Ανάπτυξη και επικύρωση κινητικού και πιθανολογικού μοντέλου με βάση την αρχή “gamma concept”, για την μελέτη διαφορετικών στελεχών μυκήτων σε προϊόντα τύπου brioche, συναρτήσει: θερμοκρασίας, υγρασίας – a_w και συντηρητικού.

Τριμελής επιτροπή:

- Σκανδάμης Ν. Παναγιώτης – Επίκουρος καθηγητής (Επιβλέπων)
- Πανάγου Ζ. Ευστάθιος – Επίκουρος καθηγητής
- Αντωνίου Π. Πολύμνια – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Ιωάννα Λ. Καλαϊτζόγλου

Αθήνα, 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανάπτυξη και επικύρωση κινητικού και πιθανολογικού μοντέλου με βάση την αρχή “gamma concept”, για την μελέτη διαφορετικών στελεχών μυκήτων σε προϊόντα τύπου brioche, συναρτήσει: θερμοκρασίας, υγρασίας – a_w και συντηρητικού.

Εισαγωγή: Οι μύκητες αποτελούν σύνθετες αλλοιωγόνους παράγοντες σε ενδιάμεσης υγρασίας τρόφιμα όπως είναι τα αρτοσκευάσματα. Τα brioche αποτελούν αρτοσκευάσματα που δύναται να αλλοιωθούν από μύκητες λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους pH 5.7-6.3 και ενεργότητα νερού a_w 0.85. Η έρευνα αυτή σκοπεύει στη μοντελοποίηση της επίδρασης των: T, pH και a_w σε *in vitro* ανάπτυξη τριών αλλοιωγόνων μυκήτων των γενών *Aspergillus* και *Penicilium*, που απομονώθηκαν από προϊόντα τύπου Brioche.

Υλικά και μέθοδοι: 10μL από σπόρια των μυκήτων *A. flavus*, *A. fumigatus* και *P. chrysogenum* τοποθετήθηκαν στο κέντρο τρυβλίων με θρεπτικό υπόστρωμα Potato Dextrose Agar και αποθηκεύτηκαν σε αερόβιες συνθήκες ($n=5 \times 3$). Η ανάπτυξη των μυκήτων παρατηρούνταν καθημερινά μέσω αλλαγών στην διάμετρο της αποικίας και ο ρυθμός ανάπτυξης (cm/ημέρα) υπολογίστηκε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης. Οι κινητικές παράμετροι (Cardinal values) για τους παράγοντες T, pH (προσαρμογή με χρήση HCl/NaOH) και a_w (προσαρμογή με γλυκερόλη) για κάθε μύκητα προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το θεμελιώδες μοντέλο με σημεία καμπής (cardinal model with inflection). Επιπλέον, αξιολογήθηκε η μυκηλιακή ανάπτυξη παρουσία (400ppm) ή απουσία συντηρητικού προπιονικού οξέως και έγινε προσδιορισμός του μ_{ref} σε εργαστηριακά υποστρώματα υπό αερόβιες συνθήκες και συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Επίσης αξιολογήθηκε η απόδοση του μοντέλου σε πραγματικά προϊόντα brioche.

Αποτελέσματα: Περιγράφηκε η συνδυασμένη επίδραση των παραγόντων T, pH και a_w στους τρεις μύκητες με τη βοήθεια ενός δευτερογενούς μοντέλου βασιζόμενο στην αρχή gamma-concept. Οι τιμές που υπολογίστηκαν για την T_{opt} για τους τρεις μύκητες *A. flavus*, *A. fumigatus* and *P. chrysogenum* ήταν 30, 37 and 25°C αντίστοιχα. Οι κινητικές παράμετροι για το pH και την a_w φαίνεται να ποικίλουν, ενώ η μυκηλιακή ανάπτυξη σε εμπορικά αρτοσκευάσματα brioche προβλέφθηκε επαρκώς.

Σπουδαιότητα: Το μοντέλο αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για να προβλέψει πιθανή ποιοτική αλλοίωση προϊόντων brioche μετά από προσβολή από μύκητες.

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής των Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: κινητικό μοντέλο, gamma concept, μύκητες, επικύρωση, προϊόντα αρτοποιίας

ABSTRACT

Modelling the effect of temperature, a_w , pH and preservative using the gamma concept approach on different fungi genera responsible for spoilage on brioche-like products

Introduction: Fungi are common spoilers of intermediate moisture foods such as bakery products. Brioche are bakery products prone to fungal spoilage due to their pH (5.7-6.3) and a_w of 0.85. This research aimed to model the effect of T, pH and a_w on the *in vitro* growth of three spoilage fungi of *Aspergillus* and *Penicilium* genera, isolated from Brioche-like products.

Materials and Methods: Spores of *A. flavus*, *A. fumigatus* and *P. chrysogenum* were point-inoculated (10 μ L) on Potato Dextrose Agar and stored under aerobic conditions (n=5x3). Fungal growth was monitored *via* changes in fungal diameter and the radial growth rate (cm/day) was estimated using linear regression. Cardinal values of T, pH (adjusted with HCl/NaOH) and a_w (adjusted with glycerol) per isolate were determined using the cardinal model with inflection. Moreover, fungal growth was assessed in the presence (400ppm) or absence of calcium propionate. μ_{ref} was determined in aerobically and modified atmosphere-packaged products, while the performance of the model was further assessed on commercial brioche products.

Results: The combined effect of T, pH and a_w of the three fungal isolates was described by a secondary model based on gamma-concept. The estimated T_{opt} values for *A. flavus*, *A. fumigatus* and *P. chrysogenum* was 30, 37 and 25°C. Cardinal values of pH and a_w varied with isolates, while fungal growth was adequately predicted on commercial-brioche products.

Significance: This model could be a valuable tool to predict potential quality deterioration of brioche products due to fungal growth.

Laboratory of Food Quality Control and Hygiene

Key words: *kinetic model, gamma concept, validation, fungi, bakery products*

Περιεχόμενα

Σελίδα

Ευχαριστίες	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Αλλοίωση προϊόντων αρτοποιίας	10
1.1.1 Μικροβιολογικοί κίνδυνοι στα άλευρα.....	10
1.1.2 Μικροβιολογικοί κίνδυνοι στα αρτοσκευάσματα	11
2. Χαρακτηριστικά των μυκήτων <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aspergillus fumigatus</i> και <i>Penicillium chrysogenum</i>	15
2.1 <i>Aspergillus flavus</i>	16
2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
2.3 <i>Penicillium chrysogenum</i>	18
3. Επίδραση T, pH, aw στους υπό μελέτη μύκητες.....	20
4. Η Μικροβιολογία Πρόρρησης στην βιομηχανία τροφίμων.....	22
4.1 Κινητικά Μοντέλα	29
4.2 Τάξεις Μοντέλων	31
4.2.1 Πρωτογενή Μοντέλα	31
4.2.2 Δευτερογενή Μοντέλα	32
4.2.3 Gamma-Concept.....	33
4.2.4 Τριτογενή Μοντέλα	36
4.3 Πιθανολογικά μοντέλα.....	39
4.4 Επικύρωση του μοντέλου	40
5. Υπόθεση – Σκοπός Μελέτης.....	41
6. Υλικά και Μέθοδοι.....	42
6.1 Ανανέωση και εμβολιασμός με τους μύκητες	42
6.2 Εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης μυκήτων	43
6.3 Εύρος ενεργότητας νερού (aw)	44
6.4 Προσδιορισμός τιμών pH	44
6.5 Χρήση συντηρητικού (Προπιονικό ασβέστιο).....	45

6.6 Ανάπτυξη Μαθηματικού Μοντέλου πρόβλεψης απόκρισης μυκήτων σε προϊόντα τύπου Brioche	46
6.6.1 Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου	46
6.7 Επικύρωση μοντέλου	47
6.7.1 Επικύρωση μοντέλου σε εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα	47
6.7.2 <i>In situ</i> εμβολιασμός σε αρτοσκευάσματα Brioche	48
7. Αποτελέσματα – Συζήτηση	49
7.1 Ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου	57
7.1.2 Επικύρωση του μοντέλου σε εργαστηριακό υπόστρωμα	60
7.1.3 Επικύρωση του μοντέλου σε προϊόντα brioche	62
8. Συμπεράσματα	63
9.Βιβλιογραφία	64

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Σκανδάμη για την εμπιστοσύνη του να πραγματοποιήσω την συγκεκριμένη μεταπτυχιακή έρευνα στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής των Τροφίμων, καθώς και για όλα μου έμαθε, το συνεχές και άμεσο ενδιαφέρον που μου έδειξε, αλλά και για την καθοδήγησή μου καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της μελέτης.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου για την συμβολή του στην εισαγωγή των εννοιών της μικροβιολογίας πρόρρησης, καθώς και την αναπληρώτρια καθηγήτρια του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας κα. Πολύμνια Αντωνίου για τις πολύτιμες συμβουλές της πάνω στην μελέτη αυτή.

Επιπλέον θέλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην υποψήφια Διδάκτωρ Ιφιγένεια Μακαρίτη για την όλη συνεισφορά της, το ενδιαφέρον και την βοήθεια που μου παρείχε για την υλοποίηση των στόχων της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης τόσο κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά την συγγραφή της. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω, την Μεταδιδάκτορα Αναστασία Καπετανάκου και την υποψήφια Διδάκτορα Δανάη Σιδεράκου για τη βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές τους, καθώς και όλο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου για την συνεργασία το χρονικό αυτό διάστημα.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στους γονείς μου Μαρία Φύτρου, Λεωνίδα Καλαϊτζόγλου και την αδερφή μου Θεοδώρα Καλαϊτζόγλου για την αμέριστη συμπαράσταση, κατανόηση και φροντίδα καθ' όλη την διάρκεια των Μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συναδέλφους και φίλες μου: Αδαμαντία Παπαϊωάννου, Άρτεμις Ζαβιτσάνου και Μαρία Γεωργούλια για την στήριξη και τη συνεργασία τη χρονιά αυτή, μιας και έκαναν το χρόνο μου στο εργαστήριο πιο ευχάριστο.

1. Εισαγωγή

Ο άρτος (ψωμί) και γενικότερα τα αρτοσκευάσματα αποτελούν βασικό μέρος των διατροφικών συνηθειών τόσο των σύγχρονων όσο και των αναπτυσσόμενων κοινωνιών, διότι πρόκειται για ένα οικονομικό είδος τροφής πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά καθώς αποτελεί σημαντική πηγή υδατανθράκων, φυτικών ινών, αμύλου, κυτταρίνης, Βιταμίνης Ε και Βιταμίνες του συμπλέγματος Β.

Όπως όλα τα τρόφιμα έτσι και το ψωμί και τα διάφορα αρτοσκευάσματα, κατά την συντήρησή τους υπόκεινται σε έναν αριθμό αλλαγών ο οποίος οδηγεί στην μεταβολή των οργανοληπτικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών τους. Οι αλλαγές αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτές που οφείλονται στην μικροβιακή επιμόλυνση και ανάπτυξη, και σε αυτές που είναι αποτέλεσμα φυσικοχημικών αλλαγών των συστατικών του. Η αλλοίωση των τροφίμων ορίζεται ως «η αλλαγή στα χαρακτηριστικά των τροφίμων που το καθιστά μη αποδεκτό». Αναφέρεται σε τρόφιμα που φαίνονται μη αποδεκτά, λόγω αλλαγών που αποδίδονται σε φυσική ή βιολογική διαδικασία.

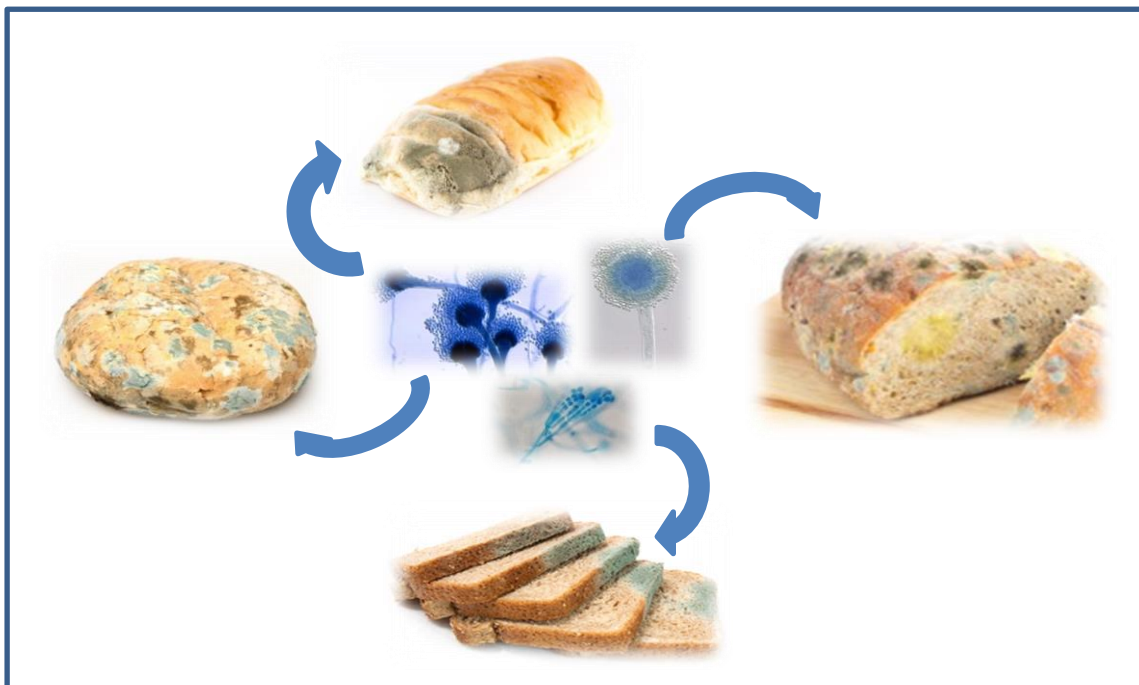
Στην προκειμένη έρευνα μελετήθηκαν αρτοσκευάσματα τύπου brioche τα οποία υπάγονται στα τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας, δηλαδή τρόφιμα με ενεργότητα νερού (δίνεται ορισμός και εκτενής αναφορά παρακάτω) η οποία κυμαίνεται μεταξύ: a_w 0.65-0.90 σύμφωνα με τον FAO, και δύναται να επιμολυνθούν και να αλλοιωθούν από μικροοργανισμούς κατά την περίοδο παρασκευής τους και παραμονής τους στα σημεία πώλησης. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση του τελικού προϊόντος και την ποιοτική και οργανοληπτική του υποβάθμιση.

Τα αρτοσκευάσματα Brioche που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αποτελούν εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα, συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα: 80% N_2 και 20% CO_2 . Αποτελούνται από ζύμη με ενσωματωμένα κομματάκια σοκολάτας και γέμιση πραλίνα, φράουλα και μπισκότο. Το pH τους κυμαίνεται μεταξύ 5.7-5.8, η προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης είναι οι 25 °C και η ενεργότητα νερού (a_w) τους κυμαίνεται μεταξύ 0.70 και 0.85. Τέλος

χρησιμοποιείται ως συντηρητικό το προπιονικό ασβέστιο, ως βελτιωτικό αλεύρου το ασκορβικό οξύ και ως συντηρητικό κρέμας το σορβικό κάλιο. Ο χρόνος ζωής του προϊόντος είναι 60 ημέρες.

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ως αρτοσκευάσματα νοούνται τα κάθε μορφής και φύσης αρτοσκευάσματα, που παρασκευάζονται με ανάλογο τρόπο με τον άρτο, διαφέρουν όμως χαρακτηριστικά από αυτόν ως προς τους μακροσκοπικούς και οργανοληπτικούς χαρακτήρες, λόγω προσθήκης σε αυτά και άλλων πρώτων υλών, εκτός από αυτές που επιτρέπονται για την παρασκευή του άρτου (ΚΤΠ, Άρθρα 112-114).

Μικροβιολογικοί κίνδυνοι θεωρούνται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, βακτήρια ή τοξίνες και μύκητες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στη δημόσια υγεία. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να υπάρχουν στις πρώτες ύλες και να περάσουν ή να αναπτυχθούν στο προϊόν ή να γίνει επιμόλυνση μετά την έξοδο του προϊόντος από τον φούρνο και μέχρι το στάδιο της συσκευασίας του. (Huchet,2013)



1.1 Αλλοίωση προϊόντων αρτοποιίας

1.1.1 Μικροβιολογικοί κίνδυνοι στα άλευρα

Οι μύκητες είναι γνωστοί λόγω του γεγονότος ότι δημιουργούν τα κυριότερα προβλήματα στα άλευρα. Χωρίζονται στους μύκητες που αναπτύσσονται κατά την καλλιέργεια στον αγρό και στους μύκητες που αναπτύσσονται κατά την αποθήκευσή τους. Μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή χρώματος, παραγωγή μυκοτοξινών και ειδικών λιπασών που υδρολύουν τα λιπίδια των αλεύρων με αποτέλεσμα την αλλοίωση του προϊόντος. Επιπλέον, λόγω της μεταβολικής τους δραστηριότητας προκαλούν και αύξηση της θερμοκρασίας της μάζας των αλεύρων. Σε γενικές γραμμές τα άλευρα είναι ασφαλή όταν αποθηκεύονται με ποσοστό υγρασίας 12-14%. Διάφοροι μύκητες των γενών *Penicillium*, *Aspergillus* και *Fusarium* ευθύνονται για την παρουσία μυκοτοξινών στα σιτηρά, με το *Penicillium* να προκαλεί το 90% της αλλοίωσης σε προϊόντα αρτοποιίας (Legan and Voysey, 1991). Τα γένη αυτά των μυκήτων απαντώνται συχνά στο έδαφος, και τα διάφορα στελέχη τους παράγουν διαφορετικές μυκοτοξίνες στα άλευρα κατά την αποθήκευσή τους όπως είναι οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες, οι φουμονισίνες, η ζεαραλενόνη, η πατουλίνη κ.α. (Τσιτσιγιάννης, 2014). Οι αφλατοξίνες αποτελούν την πιο πιθανή αιτία πρόκλησης καρκίνου του ήπατος και μπορούν να προσβάλλουν όλα τα είδη ζώων συμπεριλαμβανομένου των πτηνών, των ψαριών και του ανθρώπου. Κύριες πηγές αφλατοξίνης αποτελούν οι μύκητες *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* (ICMS, 2002).

Παρά το γεγονός ότι η εξάλειψη των μυκοτοξινών στις πρώτες ύλες δεν είναι πλήρως εφικτή, επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση της παρουσίας τους με την εφαρμογή ορθών γεωργικών πρακτικών και ορθών πρακτικών αποθήκευσης. Για τα άλευρα που συσκευάζονται σε σάκους, πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι τελευταίοι είναι καθαροί, στεγνοί και ότι στοιβάζονται σε παλέτες ή ότι μεταξύ των σάκων και του δαπέδου μεσολαβεί ένα αδιάβροχο επίπεδο. Επίσης γνωστός είναι ο *Aspergillus candidus* ο οποίος αποτελεί συχνό παράγοντα επιμόλυνσης των αλεύρων και των δημητριακών καρπών (Weidenborner et al., 2000/ Dantigny et al., 2005). Όπου αυτό

είναι εφικτό, τα άλευρα θα πρέπει να αερίζονται με την κυκλοφορία του αέρα στο χώρο αποθήκευσης, έτσι ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται σε κατάλληλα και ομοιόμορφα επίπεδα στο σύνολο του χώρου αποθήκευσης. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, πρέπει να ελέγχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα η περιεκτικότητα σε υγρασία και η θερμοκρασία στα αποθηκευμένα άλευρα. Η ύπαρξη οσμής μπορεί να συνεπάγεται θέρμανση του αλεύρου, ιδίως εάν η αποθήκη είναι κλειστή. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης πρέπει να μετράται η θερμοκρασία του αποθηκευμένου σπόρου σε διάφορα προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να συνεπάγεται ανάπτυξη μικροβίων ή / και προσβολή από έντομα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη καταστροφή της παραγωγής. Τα εμφανώς επιμολυσμένα τμήματα των αλεύρων θα πρέπει να ξεχωρίζονται και να αποστέλλονται δείγματα προς ανάλυση. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ορθές διαδικασίες διαχείρισης για να ελαχιστοποιείται η παρουσία εντόμων και μυκήτων στις εγκαταστάσεις αποθήκευσης. Οι διαδικασίες αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν τη χρήση κατάλληλων καταχωρημένων εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων ή κατάλληλων εναλλακτικών μεθόδων (Γεωργόπουλος,2012/ Τσιτσιγιάννης,2014).

1.1.2 Μικροβιολογικοί κίνδυνοι στα αρτοσκευάσματα

Στα αρτοσκευάσματα που παράγονται κάτω από σωστές παραγωγικές πρακτικές, γενικά λόγω της χαμηλής υγρασίας τους, δεν ευνοείται εύκολα η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών εκτός από τους μύκητες. Η μικροβιολογική αλλοίωση αποτελεί τον πιο σοβαρό και πιο συχνά εμφανιζόμενο κίνδυνο αλλοίωσης στα προϊόντα αρτοποιίας, αποτελώντας τον κύριο παράγοντα περιορισμού του χρόνου ζωής τους.

Βασικοί υπαίτιοι για την μικροβιολογική αλλοίωση στα προϊόντα αρτοποιίας είναι και μύκητες (Dagnas, 2016). Οι νηματοειδείς μύκητες (filamentous fungi) είναι το πιο κοινό και σημαντικό αίτιο που αλλοιώνει το ψωμί και άλλα προϊόντα αρτοποιίας και απασχολεί ιδιαιτέρως τις επιχειρήσεις τροφίμων, καθώς πολλοί από

τους μύκητες αυτούς είναι και υπεύθυνοι για την παραγωγή μυκοτοξινών που ευθύνονται για ασθένειες στον άνθρωπο (Moss, 1985/ Palou et al., 2006/ Duarte et al., 2010). Πολλά από τα προϊόντα αρτοποιίας (π.χ. κέικ) περιέχουν στα συστατικά τους ζάχαρη σε υψηλά ποσοστά. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ζάχαρης περιορίζουν τη διαθεσιμότητα του νερού με αποτέλεσμα να αποτελούν δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη βακτηρίων.

Κύρια πηγή μυκήτων αποτελούν οι πρώτες ύλες. Με το ψήσιμο του προϊόντος, οι μύκητες καταστρέφονται, αλλά υπάρχει ο κίνδυνος επιμόλυνσης από τις μεταχειρίσεις που υπόκεινται το προϊόν μετά το ψήσιμο (Huchet et al., 2013) και κατά τη συσκευασία του. Μάλιστα έχει εκτιμηθεί πως η επιμόλυνση επέρχεται μετά το ψήσιμο από σπόρια μυκήτων που υπάρχουν στις πρώτες ύλες και από αυτά που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα και τους χώρους τις επιχείρησης. Υπολογίζεται πως σε ένα γραμμάριο αλεύρου μπορούν να περιέχονται έως και 8000 σπόρια μυκήτων (Doerry, 1990).

Τα προϊόντα αρτοποιίας υποβάλλονται σε θερμική επεξεργασία (ψήσιμο), ωστόσο κάποιοι μικροοργανισμοί μπορεί να επιβιώσουν και να προκαλέσουν αλλοιώσεις, όπως:

- Οι κυριότεροι μύκητες που αλλοιώνουν το ψωμί είναι ο *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Neurospora sitophil*, κ.λπ. προσβάλλοντάς το κυρίως επιφανειακά. Από την άλλη όμως πλευρά, στο εσωτερικό πολλών προϊόντων αρτοποιίας μπορεί να υπάρχει η κατάλληλη υγρασία, ώστε να αναπτυχθούν παθογόνοι μικροοργανισμοί. Ανάμεσά τους έχει αναφερθεί ο *Staphylococcus aureus* που αναπτύσσεται ιδιαίτερα σε προϊόντα με κρέμα γάλακτος και ο οποίος παράγει τοξίνη.
- Επιπλέον, σε προϊόντα αρτοποιίας που περιέχουν αυγά υπάρχει ο κίνδυνος της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Salmonella*. Η παρουσία του *Staphylococcus aureus* στα τελικά προϊόντα οφείλεται στις πρώτες ύλες, στους χειρισμούς του προσωπικού, στο νερό και στο περιβάλλον. Η εφαρμογή ορθών βιομηχανικών τεχνικών συμβάλλει στον περιορισμό των μικροβιολογικών κινδύνων. Πρέπει να τονιστεί ότι

σε αρτοσκευάσματα όπως είναι οι φρυγανιές, τα παξιμάδια κ.λπ. οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι είναι μικροί λόγω του ψησίματος και της χαμηλής υγρασίας- ενεργότητας νερού (a_w) στο τελικό προϊόν (Γεωργόπουλος, 2012) .

Ως συμπέρασμα για την πρόληψη εμφάνισης μικροβιολογικών αλλοιώσεων προτείνεται:

- Να γίνεται έλεγχος κατά την παραλαβή των πρώτων υλών
- Να εφαρμόζονται κανόνες υγιεινής σε χώρους επεξεργασίας
- Να ελέγχεται η προσωπική υγιεινή των εργαζομένων
- Να τηρούνται κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης (όπως για παράδειγμα η κατάλληλη υγρασία και θερμοκρασία) (Ο.Υ.ΕΦΕΤ).
- Επιπλέον, θα πρέπει να προστίθενται συστατικά που μειώνουν την διαθεσιμότητα του νερού (σάκχαρα), συντηρητικά (προπιονικό ασβέστιο, σορβικό κάλιο, σορβικό οξύ), οξέα που αυξάνουν την οξύτητα (οξικό οξύ, κιτρικό οξύ, φωσφορικό οξύ, μηλικό οξύ), μπαχαρικά με αντιμικροβιακές ιδιότητες (κανέλλα, μοσχοκάρυδο, σκόρδο) και σταθεροποιητές που ρυθμίζουν το διαθέσιμο νερό για τους μικροοργανισμούς (κόμμεα, άμυλο).



Εικόνα 1, 2: Αρτοσκευάσματα με εμφανείς αλλοιώσεις από μύκητες.

Τα αρτοσκευάσματα χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες μερικές από τις οποίες αναφέρονται ενδεικτικά στους παρακάτω πίνακες:

Α) Προϊόντα με βάση την οξύτητα (pH)

Πίνακας 1. (Martinez-Anaya et al. 1990, Smith and Simson 1995)

Προϊόντα	Τιμές pH
Υψηλής Οξύτητας	
Προζύμι ψωμιού	4.2-4.6
Μηλόπιτα	4.2
Χαμηλής Οξύτητας	
Άσπρο ψωμί	5.7
Ψωμί ολικής άλεσης	5.6
Αρτοσκευάσματα με σοκολάτα και ξηρούς καρπούς	6.2-6.6
Φρέσκο ψωμί	6.1-6.7
Χωρίς οξύτητα	
Κρέπες	6.0-8.0
Αρτοσκευάσματα με μπανάνα	7.2-7.9
Κέικ καρότο	8.7

Β) Προϊόντα με βάση την ενεργότητα νερού

Πίνακας 2. (Doerry 1985, Smith and Simson 1995)

Προϊόντα	aw
Χαμηλή aw	
Μπισκότα	0.2-0.3
Κράκερς	0.2-0.3
Μεσαία aw	
Ντόνατ με σοκολάτα	0.82-0.83
Δανέζικα αρτοσκευάσματα	0.82-0.83
Κέικ με γεμισή κρέμας	0.78-0.81
Μπισκότα με μαλακή υφή	0.5-0.78
Υψηλή aw	
Ψωμί	0.96-0.98
Πίτα	0.9
Πίτες με φρούτα	0.95-0.98
Κέικ με τυρί	0.91-0.95
Κέικ καρότο	0.94-0.96

2. Χαρακτηριστικά των μυκήτων: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* και *Penicillium chrysogenum*

Οι μύκητες ανήκουν στους ευκαρυωτικούς μη φωτοσυνθέτοντες ετερότροφους μικροοργανισμούς οι οποίοι συνθέτουν γλυκογόνο σχηματίζοντας έτσι νηματοειδείς διακλαδιζόμενες υφές τα λεγόμενα μυκήλια. Διαβιούν ως παράσιτα ή σαπρόφυτα και αναπαράγονται αγενώς ή εγγενώς με τον σχηματισμό σπορίων-κονιδίων πάνω σε κονιδιοφόρους. Η ανάπτυξή τους περιλαμβάνει την βλάστηση των κονιδίων και την επιμήκυνση των υφών δημιουργώντας τελικά το μυκήλιο (Sautour et al., 2001). Για να επέλθει η βλάστηση των σπορίων, προϋποθέτεται την επικράτηση κατάλληλων οικολογικών ή τεχνητών συνθηκών ώστε να γίνει η μετάβαση από την λανθάνουσα/ληθαργική κατάσταση του σπορίου στην ενεργή κατάσταση (Tjamos, 2007). Έπειτα ξεκινάει η δημιουργία των νηματοειδών υφών, οι οποίες έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για την επιβίωση και ανάπτυξη του μύκητα, καθώς τον βοηθούν στην ανεύρεση τροφής και θρεπτικών συστατικών, στη αναπαραγωγή με άλλους μύκητες και στο να γίνονται ξενιστές και να δημιουργούν αποικίες σε άλλους οργανισμούς ή υποστρώματα (Di Pietro, 2015).

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας απομονώθηκαν (Χριστίνα Δρεμέτσικα, Πτυχιακή μελέτη, 2015) και ταυτοποιήθηκαν (Μαρίσια Μπερτόλη, Μεταπτυχιακή μελέτη 2016) 106 μύκητες από εμπορικά αρτοσκευάσματα Brioche. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης το 66% των μυκήτων άνηκε στο γένος *Penicillium* sp., το 22% στο *Cladosporium* sp. και το 7% στο *Aspergillus* sp. Στη συνέχεια 42 από τις 106 απομονώσεις (εκπρόσωποι των κυρίαρχων γενών που απομονώθηκαν), χαρακτηρίστηκαν ως προς το *in vitro* δυναμικό ανάπτυξής τους.

Στη προκείμενη μελέτη επιλέχθηκαν 3 διαφορετικά στελέχη μυκήτων ως κυρίαρχο και αντιπροσωπευτικό δείγμα των μυκήτων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν προηγουμένως και συγκεκριμένα πρόκειται για τους μύκητες: *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*. Παρακάτω γίνεται εκτενής αναφορά στα χαρακτηριστικά του καθενός.

2.1 *Aspergillus flavus*

Το γένος *Aspergillus* περιλαμβάνει πολλά γνωστά είδη ασπεργίλλων αρκετά από τα οποία έχουν μελετηθεί ευρέως. Ανήκει στους ασκομύκητες και τα είδη του έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις οσμωτικής πίεσης. Επιπλέον, οι μύκητες ευδοκιμούν σε υποστρώματα πλούσια σε άνθρακα όπως είναι οι μονοσακχαρίτες (γλυκόζη) και οι πολυσακχαρίτες (αμυλόζη) και για το λόγο αυτό εμφανίζονται σε αμυλούχες τροφές όπως το ψωμί, τις πατάτες κ.ά.

Επιπροσθέτως, κάποια συγκεκριμένα είδη όπως ο *Aspergillus niger* και ο *Aspergillus carbonarius* είναι από τα σοβαρότερα φυτοπαθογόνα λόγω της σύνθεσης της μυκοτοξίνης ωχρατοξίνης που υποβαθμίζει την ποιότητα των παραγόμενων αμπελοκομικών προϊόντων και γενικότερα των τροφίμων, όπως αναφέρεται στην μελέτη της Καπετανάκου Α. (2012) καθώς και το είδος *Aspergillus flavus* λόγω της παραγωγής της μυκοτοξίνης αφλατοξίνης (Tjamos, 2007).

Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσία μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα αποτελούν η θερμοκρασία και η υγρασία τόσο στον αγρό λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών όσο και κατά την συγκομιδή και αποθήκευση των προϊόντων (Pestka, 1995). Σιτηρά που αποθηκεύονται σε υγρασία > 14% και θερμοκρασία >20°C ή/και δεν αερίζονται επαρκώς, είναι πολύ πιθανό να μολυνθούν με αφλατοξίνες.



Εικόνα 3. Προσβολή αραβοσίτου από *Aspergillus flavus* και ανίχνευση αφλατοξίνης με ειδικό μικροσκόπιο (αριστερά), κονιδιοφόροι που φέρουν κονίδια του *Aspergillus flavus* (δεξιά).

Οι αφλατοξίνες παράγονται στα τρόφιμα κυρίως από δύο είδη του γένους *Aspergillus*, *A. flavus* και *A. parasiticus*. (ICMSF, 1996). Και οι δύο μύκητες αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10-12 °C έως 42-43°C με κάποια είδη *Aspergillus* να έχουν βέλτιστη θερμοκρασία 32-38 °C (Pitt et al., 2009). Οι αφλατοξίνες μπορούν να παραχθούν σε θερμοκρασίες 12-40 °C. Οι *A. flavus* και *A. parasiticus* μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα εύρος pH 2.1 - 11.2, με βέλτιστο pH 3.5 και 8 (Wheeler et al., 1991). Το στέλεχος του *Aspergillus flavus* απομονώθηκε από το φιλμ της συσκευασίας από brioche με γέμιση φράουλας.

2.2 *Aspergillus fumigatus*

Ο *Aspergillus fumigatus* είναι ένας μύκητας του γένους *Aspergillus* και είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα είδη του *Aspergillus* που προκαλεί ασθένεια σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια. Είναι σαπροφυτικός μύκητας, ευρέως διαδεδομένος στη φύση, απαντάται συνήθως στο έδαφος και στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης, όπως σε σωρούς κομποστοποίησης, όπου και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση άνθρακα και αζώτου. Οι αποικίες του μύκητα παράγουν από τις κονιδιοφόρους χιλιάδες λεπτά γκρίζο-πράσινα κονίδια (2-3 μm) που είναι εύκολα αερομεταφερόμενα. Ο μύκητας είναι ικανός να αναπτύσσεται στους 37 °C ή 99 °F (κανονική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος) και μπορεί να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασίες μέχρι 50 °C ή 122 °F, με επιζόντα σπόρια σε 70 °C (Abad, 2010).

Αντίστοιχα με τον *A. flavus*, ο *Aspergillus fumigatus* παράγει μία μυκοτοξίνη, την γλοιοξίνη η οποία παράγεται κατά την αναπαραγωγική φάση του μύκητα (sporulation) φαίνεται να είναι υπεύθυνη για ασθένειες στο αναπνευστικό σύστημα πτηνών και ζώων. Θεωρείται ένα είδος που μπορεί επίσης να προκαλέσει ασθένειες και σε ανθρώπους με ανοσοεπάρκεια (Spikes, 2008/ Bok, 2006). Ενδιαφέρον αποτελεί η παραγωγή φουμαγγιλίνης η οποία έχει ιδιότητες αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές (Pitt et al., 2009). Συγκεκριμένα για τη μελέτη αυτή, το στέλεχος του *Aspergillus fumigatus* απομονώθηκε από κρέμα μπισκότο που προοριζόταν για το γέμισμα του brioche.



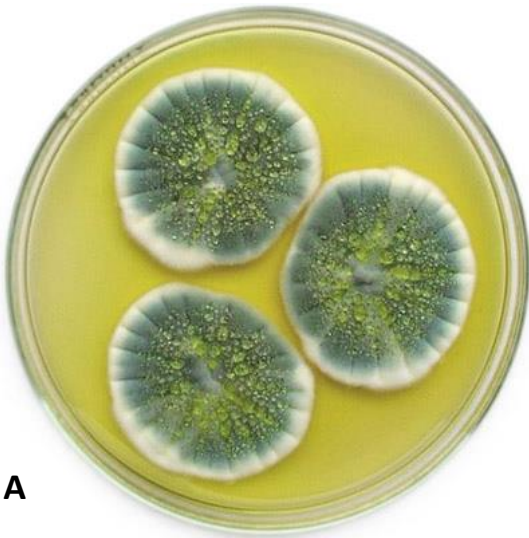
Εικόνα 4. Εικονική αναπαράσταση κονιδιοφόρου με φιαλίδια που φέρουν φιαλιδιοσπόρια-κονίδια του *Aspergillus fumigatus*. **Εικόνα 5.** Κονιδιοφόροι Ασπεργίλλου *A. fumigatus*. (Πηγή 1)

2.3 *Penicillium chrysogenum*

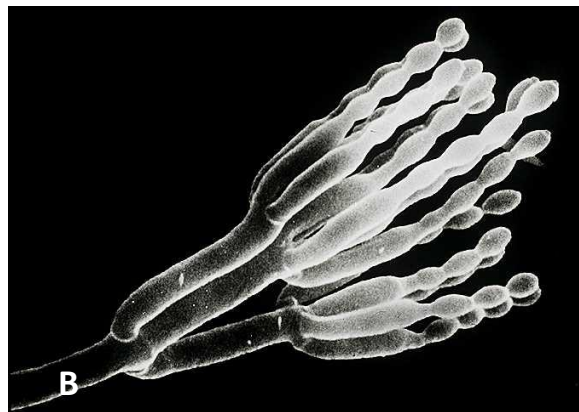
Το γένος *Penicillium* κατατάσσεται στην τάξη *Eurotiales* και είναι γνωστά για τις μετασυσπλεκτικές σήψεις σε καρπούς εσπεριδοειδών και μηλοειδών (Tjamos, 2007). Στη προκείμενη εργασία μελετήθηκε το *Penicillium chrysogenum* το οποίο είναι ένα είδος ασκομύκητα που ανήκει στην οικογένεια *Trichocomaceae*. Είναι κοινό σε εύκρατες και υποτροπικές περιοχές και μπορεί να βρεθεί σε αλατισμένα τρόφιμα, αλλά ως επί το πλείστον βρίσκεται σε εσωτερικούς χώρους με πολλή υγρασία. Στο παρελθόν ήταν γνωστό ως *Penicillium notatum*. Έχει σπάνια αναφερθεί ως αιτία ανθρώπινης ασθένειας. Θεωρείται πηγή αρκετών αντιβιοτικών β-λακτάμης, και κυρίως πενικιλίνης η οποία σκοτώνει τα θετικά κατά gram βακτήρια. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι βιομηχανικά στελέχη του *P. chrysogenum* παράγουν έως και 50.000 μονάδες/ml (~30mg) πενικιλίνη. Δευτερογενείς μεταβολίτες του *P. chrysogenum* περιλαμβάνουν ροκεφορτίνη C, μελεαγρίνη, χρυσογίνη, ξανθοκυλίνη, σεκαλονικά οξέα, sorrentanone, σορβικιλίνη, και PR-τοξίνη. Τοξινογόνα είδη του *Penicillium spp.* έχουν απομονωθεί από αλεύρι σίτου και ψωμί στις ΗΠΑ. Αρκετά είδη του γένους *Penicillium* παράγουν μυκοτοξίνες, συμπεριλαμβανομένου του *Penicillium chrysogenum* (Abellana et al., 2001). Όπως και πολλά άλλα είδη του γένους *Penicillium*, το *P. chrysogenum* αναπαράγεται συνήθως με σχηματισμό ξηροσπορίων (ή κονίδια) σε αλυσίδες ή από κονιδιοφόρους σε σχήμα βούρτσας (Tjamos, 2007). Στην μελέτη αυτή το στέλεχος του *Penicillium chrysogenum* που χρησιμοποιήθηκε είχε προηγουμένως απομονωθεί από αρτοσκευάσματα brioche και συγκεκριμένα από κρέμα φράουλα και κρέμα πραλίνα.



Εικόνα 6. Αναστολή ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* περιφερειακά, λόγω εμβολιασμού με *P. Chrysogenum* στο κέντρο του τρυβλίου.



A



B

Εικόνα 7. A) Χαρακτηριστικές αποικίες με χρυσή εφίδρωση του μύκητα *P.chrysogenum*
B) Κονιδιοφόρος του μύκητα *P.chrysogenum*.

3. Επίδραση T, pH, a_w στους υπό μελέτη μύκητες

Τα αρτοσκευάσματα ανήκουν στα τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας (Intermediate Moisture Foods, IMF), και χαρακτηρίζονται από ενεργότητα νερού a_w : 0.65 - 0.90. Οι μύκητες είναι μικροοργανισμοί που προσαρμόζονται πολύ εύκολα σε ποικίλα περιβάλλοντα, όπως σε χώρους αποθήκευσης και διακίνησης πρώτων υλών, όπου μπορούν να ευδοκιμήσουν και να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αρκετές διαλυμένες ουσίες υπάρχουν στα τρόφιμα αυτά προκειμένου να μειώσουν την ενεργότητα νερού σε επίπεδα που δεν ευνοείται η ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. Επομένως, η συντήρηση αυτών των τροφίμων βασίζεται κυρίως στην υψηλή οσμωτική πίεση που συνδέεται με τις προαναφερθείσες υψηλές ποσότητες διαλυτών ενώσεων στην υδατική φάση, που επάγουν την ενεργότητα νερού να κυμαίνεται μεταξύ : 0.70-0.85 (Vermeulen, 2012). Οι βασικοί μύκητες που αναπτύσσονται σε αυτά τα προϊόντα ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* (Pitt & Hocking, 2009), στελέχη των οποίων και εξετάστηκαν στην προκείμενη μελέτη.

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

Σύμφωνα με την μελέτη των Dagnas et al. (2016), η επιμόλυνση προϊόντων αρτοποιίας από ένα ή περισσότερα στελέχη μυκήτων γίνεται μεταξύ του ψησίματος και της συσκευασίας του τροφίμου. Παρόλα αυτά δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με την συμπεριφορά των μυκήτων, και ειδικά σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης εμβολίου, ώστε να προβλεφθεί με ακρίβεια ο χρόνος ζωής τέτοιων προϊόντων σε περίπτωση μετέπειτα επιμόλυνσης.

Οι παράμετροι: θερμοκρασία - pH - ενεργότητα νερού, έχουν δείξει να επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και συγκεκριμένα μελετούνται ως προς την επίδραση που έχουν στην αναστολή της επιβίωσης και ανάπτυξής τους.

Η χαμηλή τιμή ενεργότητας νερού, η χρήση συσκευασιών με τροποποιημένη ατμόσφαιρα, οι χαμηλές τιμές pH, η χρήση οργανικών οξέων, ο ψεκασμός με αιθανόλη, η προσθήκη φυσικών ή/και χημικών συντηρητικών είναι μερικοί από τους παράγοντες που δρουν παρεμποδιστικά ως προς την ανάπτυξη μυκήτων σε αρτοσκευάσματα. Ο συνδυασμός των παρεμποδιστικών αυτών παραγόντων μπορεί να λειτουργήσει συνεργιστικά κατά της ανάπτυξης των μυκήτων και την αποφυγή της αλλοίωσης τροφίμων ενδιάμεσης υγρασίας. Ο αποτελεσματικός συνδυασμός τέτοιων παραγόντων αναδεικνύεται μετά από εμπειρικές δοκιμές (challenge tests) που πραγματοποιεί η εκάστοτε βιομηχανία ανάλογα με το προϊόν που παράγει. Παρόλα αυτά η ποσοτικοποίηση αυτών των αλληλεπιδράσεων επιτρέπει την πρόβλεψη της σταθερότητας των προϊόντων (Vermeulen et al., 2012).

Με βάση προηγούμενες μελέτες έχει φανεί πως το pH δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην εμφάνιση και ανάπτυξη των μυκήτων στο προϊόν (Wheeler et al., 1991). Επίσης σύμφωνα με την έρευνα των Huchet et al., (2013) φάνηκε πως σε προϊόντα αρτοποιίας το pH παραμένει σταθερό (6.5) κατά την διάρκεια του χρόνου ζωής του προϊόντος (14 ημέρες) οπότε δεν φάνηκε να επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Επομένως, κύριο ρόλο παίζουν η θερμοκρασία και η ενεργότητα νερού τόσο στην επιβίωση όσο και στην μετέπειτα ανάπτυξη του εκάστοτε μύκητα. Για παράδειγμα, στην έρευνα των Gock et al. (2002) μελετήθηκε η συνδυαστική επίδραση της ενεργότητας νερού (a_w), του pH και της θερμοκρασίας για την βλάστηση και την ανάπτυξη επτά ξεροφιλικών μυκήτων, υπεύθυνων για αλλοιώσεις σε αρτοσκευάσματα: *Eurotium rubrum*, *E. repens*, *Wallemia Sebi*, *Aspergillus penicillioides*, *Penicillium roqueforti*, *Chrysosporium xerophilum* και *Xeromyces bisporus* επωάστηκαν στους 25, 30 και 37 βαθμούς σε θρεπτικό υπόστρωμα με τιμές pH 4.5, 5.5, 6.5 και 7.5 και με ένα εύρος a_w : 0,92 - 0,70. Η μελέτη αυτή έδειξε πως το *Penicillium roqueforti* μπόρεσε να βλαστήσει σε a_w 0.82 στους 25 °C, a_w 0.86 στους 30 °C και δεν μπόρεσε να βλαστήσει

στους 37 °C κ.ά. Τα αποτελέσματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν σε ένα πιθανολογικό μοντέλο με σκοπό την πρόβλεψη του χρόνου ζωής προϊόντων αρτοποιίας.

4. Η Μικροβιολογία Πρόρρησης (Predictive Microbiology) στην βιομηχανία τροφίμων

Η μικροβιολογία πρόρρησης (predictive microbiology), δηλαδή η μικροβιολογία η οποία χρησιμοποιεί μαθηματικά μοντέλα για να εκφράσει ένα συμπέρασμα, ασχολείται με την ποσοτική αξιολόγηση των μικροβιακών αποκρίσεων τόσο σε μακροσκοπικό όσο και μικροσκοπικό επίπεδο, αλλά επίσης εμπλέκεται και στην εκτίμηση της πιθανότητας που υπάρχει για μία μονάδα (έναν άνθρωπο) ή έναν πληθυσμό να εκτεθεί σε έναν μικροβιακό κίνδυνο. Χρησιμοποιούνται μαθηματικά μοντέλα τα οποία έχουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς στον χώρο της βιομηχανίας τροφίμων (Membre et al, 2016).

Ουσιαστικά, μέσω των μαθηματικών αυτών μοντέλων περιγράφεται η «συμπεριφορά» των διαφόρων μικροοργανισμών που βρίσκονται στο περιβάλλον του τροφίμου, με στόχο την πρόβλεψη ή/και αποφυγή της μετέπειτα αλλοίωσης του τροφίμου ή πρόκλησης ασθενειών και παρουσιάζονται ως μαθηματικές εξισώσεις ή μαθηματικά μοντέλα.

Οι αρχές της μικροβιολογίας πρόρρησης είναι οι ακόλουθες:

1. Η ανάπτυξη, η επιβίωση και η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι αναπαραγώγιμες αποκρίσεις.
2. Ένας περιορισμένος αριθμός περιβαλλοντικών παραμέτρων στα τρόφιμα καθορίζει τις κινητικές αποκρίσεις των μικροοργανισμών (θερμοκρασία, αλάτι, ενεργότητα νερού, pH, συντηρητικά τροφίμων)
3. Ένα μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει ποσοτικά το συνδυαστικό αποτέλεσμα των περιβαλλοντικών παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ανάπτυξης, επιβίωσης ή αδρανοποίησης ενός

μικροοργανισμού και ως εκ τούτου προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων και τη διάρκεια ζωής τους (Jarvis,2008)

Τα νέα συστήματα διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων, από μικροβιολογικής άποψης, βασίζονται ολοένα και περισσότερο στην έρευνα και την επιστήμη και στηρίζονται στην ικανότητα να εκτιμήσουν τις αλλαγές στον πληθυσμό των παθογόνων «από τον αγρό-στο πιρούνι του καταναλωτή» (from farm-to fork). Επομένως η εκτίμηση του κινδύνου είναι πλέον ποσοτική. Τα προγνωστικά μικροβιολογικά μοντέλα είναι ποικίλα και βοηθούν στο να απαντηθούν πολλά ερωτήματα που θέτει η βιομηχανία τροφίμων για την εκτίμηση κινδύνων όπως: "τι πιθανότητα υπάρχει να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί και να αλλοιώσουν ένα προϊόν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του; , "πόσο αποτελεσματική είναι η διαδικασία της παστερίωσης;", "ποιό είναι το ποσοστό των μικροοργανισμών στο οποίο οι καταναλωτές εκτίθενται κατά το τέλος της διάρκειας ζωής ενός προϊόντος;"(Guillier,2016).

Σύμφωνα με την International Commission on Microbiological Specifications for Foods(ICMSF): η αρχική επιμόλυνση (H_0) αφαιρώντας το άθροισμα της μείωσης (απενεργοποίηση κτλ) (ΣR) συν το άθροισμα της αύξησης (επαναμόλυνση, ανάπτυξη) (ΣI) δεν πρέπει να υπερβαίνει τον στόχο για την ασφάλεια των τροφίμων (PO: Performance Objective/ FSO: Food Safety Objective) (Ross, 2009) :

$$H_0 - \Sigma R + \Sigma I \leq PO / FSO$$

Η συμπεριφορά των μικροβιακών πληθυσμών στο εκάστοτε τρόφιμο (ανάπτυξη/επιβίωση/θανάτωση), καθορίζεται από τις ιδιότητες του τροφίμου, δηλαδή: ενεργότητα νερού, pH κτλ, και από τις συνθήκες συντήρησης, δηλαδή: θερμοκρασία, σχετική υγρασία, ατμόσφαιρα κτλ. Η επίδραση των παραγόντων αυτών μπορεί να προβλεφτεί από μαθηματικά μοντέλα που προέρχονται από ποσοτικές μελέτες για τους μικροβιακούς πληθυσμούς. Χρησιμοποιώντας μοντέλα πρόβλεψης, οι μεταβολές των μικροβιακών πληθυσμών σε τρόφιμα από την

παραγωγή / συγκομιδή μέχρι την κατανάλωση μπορούν να εκτιμηθούν από τις αλλαγές στις παραμέτρους του προϊόντος (θερμοκρασία, ατμόσφαιρα αποθήκευσης, pH κτλ).

Με την εφαρμογή του HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) και των Κανόνων Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής GMP (Good Manufacturing Practice) προκύπτουν ερωτήματα όπως: ποιες είναι οι κρίσιμες θερμοκρασίες ή ο κρίσιμος χρόνος κατά την διαδικασία παραγωγής που απαιτούνται ώστε να επιτευχθεί ο σωστός έλεγχος; Τι ανάγκες υπάρχουν κατά την αποθήκευση και συσκευασία των προϊόντων; Τι τροποποιήσεις μπορούν να γίνουν στο προϊόν ώστε να βελτιωθεί ο χρόνος ζωής του; Αυτά είναι μερικά από τα ερωτήματα τα οποία συναντά η βιομηχανία τροφίμων και στα οποία καλείται να δώσει απαντήσεις η μικροβιολογία πρόρρησης.

Τα μοντέλα αυτά έχουν άμεση πρακτική εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων για τη βελτίωση της μικροβιακής ασφάλειας των τροφίμων και της ποιότητας και οδηγούν στην ανάπτυξη μιας ποσοτικής κατανόησης της μικροβιακής οικολογίας των τροφίμων. Οι μικροοργανισμοί «αντιδρούν/ανταποκρίνονται» στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, με αποτέλεσμα, γνωρίζοντας το περιβάλλον του μικροοργανισμού, να μπορεί να προβλεφτεί η αντίδρασή του, ανάπτυξη ή μη, και κατά πόσο γρήγορα θα γίνει αυτό.

Η μικροβιολογία πρόρρησης αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο λήψης αποφάσεων, τα μοντέλα όμως δε παύουν να είναι μια απλοποιημένη αναπαράσταση της πραγματικότητας. Λόγω της πολυπλοκότητας της μικροβιακής συμπεριφοράς και των συστημάτων των τροφίμων, η μικροβιολογία πρόρρησης παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς. Η μικροβιολογία πρόρρησης αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση της «ποσοτικής εκτίμησης μικροβιακού κινδύνου» και συμπεραίνεται ότι πρότυπα μοντέλα που έχουν επικυρωθεί επιτυχώς σύμφωνα με καθορισμένα κριτήρια, αποτελούν ουσιώδες εργαλείο για την αξιολόγηση μικροβιακού κινδύνου σε τρόφιμα (Fakruddin, 2011).

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius στην βιομηχανία τροφίμων, απαιτούνται εξειδικευμένα στατιστικά και μαθηματικά εργαλεία ώστε να προβλέπουν τη

μικροβιακή συμπεριφορά και ανάπτυξη κατά τη αλυσίδα παραγωγής τροφίμων μέχρι το τελικό προϊόν.

Συγκεκριμένα η μοντελοποίηση είναι μια διαδικασία η οποία χρησιμοποιεί σετ δεδομένων και πιθανοτήτων ώστε να προβλέψει ένα αποτέλεσμα. Κάθε μοντέλο αποτελείται από μια σειρά από παράγοντες πρόβλεψης, οι οποίοι αποτελούν τις μεταβλητές που πιθανόν να επηρεάσουν τα μελλοντικά αποτελέσματα. Μόλις γίνει η συλλογή δεδομένων για σχετικούς προγνωστικούς παράγοντες, μπορεί να διατυπωθεί ένα στατιστικό μοντέλο. Το μοντέλο αυτό μπορεί να χρησιμοποιεί μια απλή γραμμική εξίσωση ή μπορεί να είναι ένα πολύπλοκο νευρωνικό δίκτυο, που δημιουργήθηκε από ένα εξελιγμένο λογισμικό. Μόλις τα συμπληρωματικά δεδομένα είναι πλέον διαθέσιμα, τότε το μοντέλο στατιστικής ανάλυσης δύναται να επικυρωθεί ή να αναθεωρηθεί με στόχο τη βελτίωσή του.

Σχετικά με την εφαρμογή των γενικών αρχών της υγιεινής των τροφίμων, είναι ευθύνη των επιχειρήσεων τροφίμων να ελέγχουν τους πιθανούς μικροβιολογικούς κινδύνους στα τρόφιμα ώστε αυτά να είναι ασφαλή και κατάλληλα για τον καταναλωτή (ΕΚ 2073/2005). Ως εκ τούτου, η κάθε επιχείρηση τροφίμων θα πρέπει να διεξάγει μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί η συμμόρφωση με τα κριτήρια υγιεινής, καθώς και η διερεύνηση της ικανότητας των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται ή να επιβιώνουν στο προϊόν κατά τη διάρκεια διατήρησης υπό διαφορετικές λογικά προβλεπόμενες συνθήκες αποθήκευσης. Για το σκοπό αυτό, οι επιχειρήσεις τροφίμων θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, μαθηματικά μοντέλα και διάφορες δοκιμές (challenge tests).

Οι εφαρμογές της μικροβιολογίας πρόρρησης είναι πολλαπλές:

- ✓ Προβλέπει την επίδραση των χαρακτηριστικών του προϊόντος και της αποθήκευσης
- ✓ Οριοθετεί σχετικά με τις μικροβιακές αποκρίσεις (ασφάλεια και διάρκεια ζωής)
- ✓ Προβλέπει την επίδραση των αλλαγών στις παραμέτρους (ανάπτυξη προϊόντος)
- ✓ Σε Σχέδια HACCP - καθορισμός ορίων για τα κρίσιμα σημεία ελέγχου CCP
- ✓ Στοχεύει στην ασφάλεια τροφίμων

- ✓ Συμβάλει στην εκπαίδευση και στην εύκολη πρόσβαση σε πληροφορίες
- ✓ Αποτελεί εργαλείο για την εκτίμηση Ποσοτικού Μικροβιολογικού Κινδύνου (Quantitative Microbiological Risk Assessment) (Koutsoumanis, 2017)

Είναι λογικό το γεγονός ότι:

- Οι δοκιμές θα πρέπει να συμμορφώνονται με τα διεθνώς αναγνωρισμένα Αρχεία Οδηγιών, που αναγνωρίζονται από φορείς ελέγχου (σύμφωνα με το σχέδιο ISO SC 9 WG19, NF V009).
- Οι κινητικές παράμετροι που βοηθούν στην πρόβλεψη της συμπεριφοράς των στελεχών καθορίζεται σύμφωνα με τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές και τις διαδικασίες διασφάλισης ποιότητας, παρέχοντας ακριβείς τιμές με τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις.
- Και η μικροβιολογία πρόρρησης, διενεργείται χρησιμοποιώντας υπολογισμούς στα πλαίσια της διασφάλισης ποιότητας, χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις με την βοήθεια τεχνολογίας αιχμής. (<https://symprevius.eu/predictive-microbiology/>)

Πρόκειται για τον συνδυασμό της μαθηματικής γνώσης και της μικροβιολογίας για την ανάπτυξη των μαθηματικών-πιθανολογικών μοντέλων, τα οποία περιγράφουν την μικροβιακή εξέλιξη στο τρόφιμο και εξηγούν την μικροβιακή συμπεριφορά μέσω μαθηματικών εξισώσεων. Η βασική ιδέα είναι ότι η συμπεριφορά των μικροοργανισμών είναι αιτιοκρατική (deterministic, ντετερμινιστική) και μπορεί να προβλεφθεί εάν είναι γνωστός ο μικροοργανισμός, και το άμεσο περιβάλλον του. Για τα περισσότερα προϊόντα τροφίμων, ένας συνδυασμός από τους κύριους περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, a_w , pH, ατμόσφαιρα και αντιμικροβιακά/ συντηρητικά) παρεμποδίζει ή επιβραδύνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι για την ποσοτική μελέτη των συνδυασμένων εμπόδιων: μέσα από τα μοντέλα που περιγράφουν τη συνδυασμένη επίδραση των μεμονωμένων παραγόντων αυτών, καθώς και μέσω της μοντελοποίησης σύνθετων παραγόντων, χρησιμοποιώντας επιφάνειες απόκρισης ή πολυωνυμική προσέγγιση (CPMF2=Cluster Predictive Microbiology in Foods).

Για την ανάπτυξη ενός πιθανολογικού μοντέλου απαιτούνται κάποια συγκεκριμένα βήματα τα οποία είναι τα ακόλουθα:

1. Ο πειραματικός σχεδιασμός
2. Η συλλογή δεδομένων
3. Ο προσδιορισμός του καταλληλότερου μοντέλου
4. Η εκτίμηση των παραμέτρων που έχουμε θέσει
5. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του πειράματος
6. Η επικύρωση του μοντέλου

Στο τέλος όλης αυτής της διαδικασίας, θα έχει δημιουργηθεί ένα εύχρηστο εργαλείο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να εκτιμήσει τις συνέπειες που υπάρχουν κατά τον χειρισμό και την επεξεργασία των τροφίμων στην ανάπτυξη, την επιβίωση και την αδρανοποίηση των παθογόνων και αλλοιωγόνων τροφιμογενών μικροοργανισμών. Στόχοι της δημιουργίας και χρήσης των μοντέλων αυτών είναι κατά κύριο λόγο:

- I. το τελικό μοντέλο να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σχέδιο HACCP με στόχο να προσδιοριστούν άμεσα τα κρίσιμα σημεία ελέγχου που αφορούν τις μικροβιολογικές επιμολύνσεις κατά την παραγωγική διαδικασία,
- II. στον προσδιορισμό ασφαλών και έγκυρων διορθωτικών ενεργειών μέσω της επιλογής των καταλληλότερων εμποδίων για τους μικροοργανισμούς, σε περίπτωση που εμφανιστούν αποκλείσεις κατά την παραγωγή ή επεξεργασία του τροφίμου
- III. στο να οριστεί ένα ασφαλές και λειτουργικά σχεδιασμένο λογισμικό , χωρίς την ανάγκη για επιπλέον παραγωγή δεδομένων ή τεστ δοκιμών (Skandamis and Panagou, 2016).

Βασιζόμενοι στις μικροβιολογικές αποκρίσεις οι οποίες εκφράζονται ως η αλλαγή σε αριθμούς και σε αντοχή στο στρες, οι συνδυασμοί των ενδογενών και εξωγενών περιβαλλοντικών παραγόντων στους οποίους είναι εκτεθειμένοι οι μικροοργανισμοί χωρίζονται στους παρακάτω κύριους τομείς: α) την περίοδο ανάπτυξης και β) τον τομέα που περιλαμβάνει τους συνδυασμούς οι οποίοι επιτρέπουν την επιβίωση ή την θανάτωση των μικροοργανισμών (Booth, 2002).

Οι παράμετροι αυτές εξαρτώνται από το στέλεχος (strain-dependent) ή το είδος του εκάστοτε μικροοργανισμού (species-dependent) και συνεπώς εισαγάγουν σημαντική παραλλακτικότητα στην αξιολόγηση της επίδρασης των οριακών συνθηκών/παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης. Το θέμα αυτό συχνά εμπεριέχεται στην αξιολόγηση κινδύνου στην ποσοτική μικροβιολογία (Skandamis et al., 2016).

Τα πιθανολογικά μοντέλα αποτελούν ρευστά-δυναμικά συστήματα τα οποία ελέγχονται κυρίως από την θερμοκρασία, το pH, την ενεργότητα νερού, από οξέα και συντηρητικά. Ωστόσο, τα πιο πολύπλοκα στοιχεία, όπως το προηγούμενο περιβάλλον, ο μικροβιακός ανταγωνισμός, η καταπόνηση και η προσαρμογή σε αυτές τις συνθήκες, καθώς και οι φυσικο-χημικές ιδιότητες της δομής των τροφίμων σπάνια λαμβάνονται υπόψιν. Αυτό περιγράφεται ως το σφάλμα πληρότητας (fill-in error) και θεωρείτε ως ένα από τα πιο κύρια σφάλματα στην μικροβιολογία πρόρρησης (McMeekin and Ross, 2002).

Τα μοντέλα πρόβλεψης μπορούν να διαχωριστούν σε:

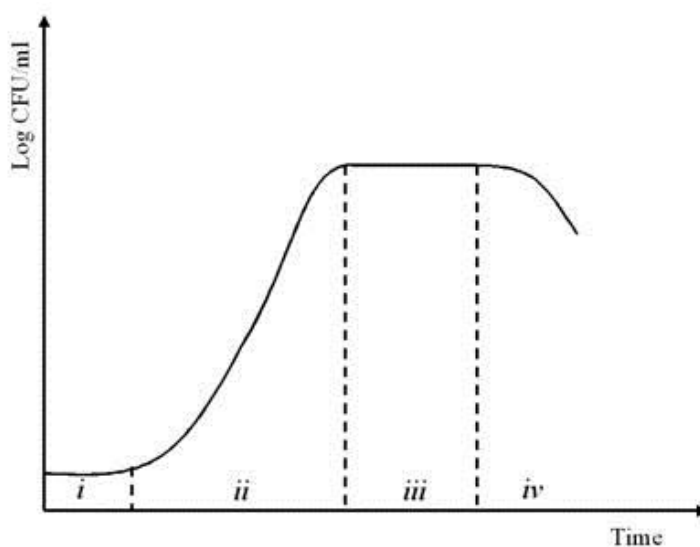
1. Κινητικά μοντέλα: τα οποία περιγράφουν τις αλλαγές στην μικροβιακή ανάπτυξη ή θανάτωση ως συνάρτηση του χρόνου
2. Και πιθανολογικά μοντέλα: τα οποία περιγράφουν την πιθανότητα που υπάρχει να συμβεί ένα συγκεκριμένο γεγονός (ανάπτυξη μικροοργανισμού, παραγωγή τοξίνης κτλ.) ως συνάρτηση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων (Stumbo, 1983).

4.1 Κινητικά Μοντέλα

Αυτά τα μοντέλα περιγράφουν την εξέλιξη μιας μυκηλιακής αποικίας ή του αριθμού των κυττάρων ως συνάρτηση του χρόνου (δηλαδή, τις διάφορες φάσεις, μέσα σε μία καμπύλη) σε ένα συγκεκριμένο αρχικό επίπεδο εμβολιασμού, εγγενών παραγόντων (pH, a_w , συγκέντρωση οξέος, κ.λ.π.) και εξωγενών παραγόντων (θερμοκρασία, ατμόσφαιρα, κ.λπ.). Τα περισσότερα μοντέλα που έχουν δημοσιευθεί περιγράφουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, η οποία χωρίζεται σε τρεις φάσεις – την φάση προσαρμογής (lag phase), την εκθετική φάση ανάπτυξης (exponential phase) και τη στατική φάση (stationary phase). Εκτός από τα μοντέλα ανάπτυξης, υπάρχουν επίσης και τα μοντέλα για την επιβίωση και την αδρανοποίηση/απενεργοποίηση, τα οποία περιγράφουν τη μείωση του αριθμού των κυττάρων ως συνάρτηση του χρόνου.

Φάσεις της μικροβιακής καμπύλης ανάπτυξης

Μια κλασική καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών (Σχ.1) , μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερις διαφορετικές φάσεις, (i) την φάση προσαρμογής, (ii) η φάση ανάπτυξης, (iii) την στατική φάση και (iv) η φάση αδρανοποίησης



Γράφημα 1. Απεικόνιση της μικροβιακή καμπύλης ανάπτυξης συναρτήσει του χρόνου.

Φάση προσαρμογής (Lag time)

Η φάση προσαρμογής αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται για να προσαρμοστεί ένα κύτταρο στο νέο περιβάλλον πριν από την ανάπτυξη. Αυτή η φάση θα επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από την «ιστορία» των μικροοργανισμών. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ του προηγούμενου μέσου ανάπτυξης και του νέου μέσου, τόσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της φάσης αυτής.

Φάση ανάπτυξης

Η φάση ανάπτυξης περιγράφει τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών (σε βακτήρια) ή την ανάπτυξη της αποικίας (σε μύκητες) και εξαρτάται μόνο από τον συνδυασμό των εγγενών και εξωγενών παραγόντων. Αυτή η φάση μπορεί να εκφραστεί ως ο ρυθμός ανάπτυξης (μ) ή ως ο χρόνος διπλασιασμού γενεάς (Generation Time, GT). Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι η αλλαγή του αριθμού των βακτηρίων ή της διαμέτρου της αποικίας των μυκήτων, κατά την διάρκεια ενός χρονικού διαστήματος. Και οι δύο παράμετροι που σχετίζονται ως εξής:

$$GT = \frac{\log_{10} 2}{\mu}$$

Για τον σχεδιασμό της φάσης ανάπτυξης χρειάζεται να μετατραπεί ο αριθμός των κυττάρων σε λογάριθμο του 10 ($\log_{10}$). Αυτό, επιτρέπει την αναπαράσταση της μικροβιακής ανάπτυξης μέσω μιας γραμμικής συσχέτισης.

Στατική φάση

Αυτή η φάση είναι ίση με την μέγιστη πυκνότητα του πληθυσμού και αντιπροσωπεύει το μέγιστο επίπεδο στο οποίο μπορεί να φτάσει ένας μικροοργανισμός σε ένα συγκεκριμένο συνδυασμό ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Το επίπεδο επίσης θα επηρεαστεί από την παρουσία και άλλων μικροοργανισμών, έλλειψη θρεπτικών, παρουσία ανασταλτικών για την ανάπτυξη παραγόντων κ.ά.

Φάση αδρανοποίησης

Οι μικροοργανισμοί αδρανοποιούνται ή εξαλείφονται, όταν οι συνθήκες είναι δυσμενείς για την επιβίωσή τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αυξημένες συνθήκες στρες ή μετά την στατική φάση, κατά την διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης. Το σχήμα της καμπύλης απενεργοποίησης μπορεί να ποικίλει, ανάλογα με τις εγγενείς και εξωγενείς συνθήκες. Η καμπύλη μπορεί επίσης να υποδιαιρεθεί σε τρεις φάσεις δηλαδή του «ώμου (shoulder)» που είναι ανάλογη με την φάση προσαρμογής, τη γραμμική φάση αδρανοποίηση και σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζεται μια ουρά (tail).

4.2 Τάξεις των μοντέλων

4.2.1 Πρωτογενή Μοντέλα

Τα πρωτογενή μοντέλα περιγράφουν λοιπόν τον τρόπο με τον οποίο ο αριθμός των μικροοργανισμών σε έναν πληθυσμό μεταβάλλεται με το χρόνο υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Marks, 2007). Χρησιμοποιούνται, δε, για την εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων (Baranyi, 2002). Οι κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού περιλαμβάνουν την διάρκεια της φάσης προσαρμογής, τον ρυθμό ανάπτυξης και τον μέγιστο πληθυσμό. Για την καμπύλη αδρανοποίησης οι κινητικές παράμετροι είναι το αρχικό σημείο απενεργοποίησης - «ώμος (shoulder)», μια γραμμική μείωση του αριθμού των κυττάρων, και η πιθανή «ουρά (tail)». Η πιο δύσκολη παράμετρος, από την άποψη της μοντελοποίησης, είναι η lag time, επειδή το παρελθόν (η ιστορία) του μικροοργανισμού και το πραγματικό περιβάλλον την επηρεάζουν (Baranyi, 2002).

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πρωτογενή μοντέλα ανάπτυξης είναι το γραμμικό (linear), του τροποποιημένου Gompertz (modified Gompertz) (Zwietering et al., 1990) και των Baranyi και Roberts (Adaptation to the new environment) (1994).

4.2.2 Δευτερογενή Μοντέλα

Τα δευτερογενή μοντέλα περιγράφουν την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων (θερμοκρασία, ενεργότητα νερού, pH) στις κινητικές παραμέτρους (μ = ρυθμός ανάπτυξης και λ = φάση προσαρμογής). Η εκβλάστηση (germination) ή οι παράμετροι ανάπτυξης (π.χ. μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης) που εκτιμώνται από πρωτογενή μοντέλα στη συνέχεια μοντελοποιούνται συναρτήσει των εγγενών και εξωγενών παραγόντων των τροφίμων. Δύο από τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές παραμέτρους που καθορίζουν την ικανότητα ανάπτυξης των μυκήτων σε τρόφιμα είναι η ενεργότητα νερού και η θερμοκρασία. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, η ενεργότητα νερού έχει μεγαλύτερη επίδραση στην ανάπτυξη των μυκήτων από ότι έχει η θερμοκρασία (Holmquist, 1983).. Η δομή των δευτερογενών μοντέλων μπορεί να εκφραστεί από την σχέση:

$$g(p)=f(x)$$

όπου: - p : η κινητική παράμετρος του πρωτογενούς μοντέλου

- $x=(x_1 \dots x_n)$: ο φορέας των παραγόντων του πραγματικού περιβάλλοντος
- f : η συνάρτηση πολλαπλών μεταβλητών

Γνωστά δευτερογενή μοντέλα είναι τα εξής:

- Το πολυωνυμικό μοντέλο
- Το μοντέλο Arrhenius
- Το Gamma concept
- Το μοντέλο Ratkowski
- Τα τύπου Belerhaddek μοντέλα

4.2.3 Gamma-concept

Ο κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αναφέρει ότι η χρήση μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους υπεύθυνους επιχειρήσεων τροφίμων ως μία μελέτη για τη διερεύνηση της συμμόρφωσης σύμφωνα με μικροβιολογικά κριτήρια καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που ευνοούν την ανάπτυξη του *L. monocytogenes* και αυτό μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία. Έχουν ήδη αναπτυχθεί αρκετά μοντέλα πρόβλεψης της μικροβιακής ανάπτυξης. Μεταξύ αυτών, είναι και τα μοντέλα: Gamma-concept, που αναπτύχθηκαν από τους Zwietering et al. (1996).

Η συνάρτηση γ βασίζεται α) στο γεγονός ότι πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης, δρουν ανεξάρτητα και η επίδραση του κάθε παράγοντα παριστάνεται με έναν διακριτό όρο οποίος πολλαπλασιάζεται με τους υπόλοιπους όρους που επιδρούν στον ρυθμό ανάπτυξης και β) στο γεγονός ότι η επίδραση κάθε παράγοντα στον ρυθμό ανάπτυξης μπορεί να εκφραστεί με τη μορφή κλάσματος του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (Psomas, Διδακτορική διατριβή). Επομένως, μπορούν να μελετηθούν διάφοροι συνδυασμοί εμποδίων και να συγκριθούν μεταξύ τους ώστε να προκύψει μια ολιστική προσέγγιση ανασταλτικών παραγόντων (Pujol, 2011).

Σε ένα μοντέλο Gamma-concept ο αναφερόμενος ρυθμός ανάπτυξης είναι το $\mu_{\max}$. Τα αναφερόμενα επίπεδα θερμοκρασίας, ενεργότητας νερού κτλ είναι εκείνα στα οποία ο ρυθμός ανάπτυξης είναι βέλτιστος και συμβολίζονται ως: T_{opt} , $a_{w, opt}$, pH_{opt} . Η συνδυασμένη επίδραση των διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων προσδιορίζεται από τον πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων παραγόντων γ :

$$\mu_{\max} = \mu_{\max opt} * \gamma(T) * \gamma(pH) * \gamma(a_w), \text{ όπου:} \quad (4.2.3.1)$$

$$\gamma(T) = \left(\frac{T - T_{\min}}{T_{opt} - T_{\min}} \right)^2$$

$$\gamma(pH) = \frac{(pH - pH_{\min})(pH_{\max} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{\min})(pH_{\max} - pH_{opt})}$$

$$\gamma(a_w) = \frac{(a_w - a_{w, \min})}{(1 - a_{w, \min})}$$

Τα μοντέλα θεμελιωδών παραμέτρων (Cardinal Parameter Models), υπάγονται στη κατηγορία των δευτερογενών μοντέλων και βασίζονται στην αρχή ότι για την ανάπτυξή τους χρησιμοποιούνται παράγοντες που έχουν βιολογική ή μαθηματική σημασία και ότι η επίδραση των παραγόντων αυτών στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι πολλαπλασιαστική. Αποτελούνται από έναν διακριτό όρο για τον κάθε περιβαλλοντικό παράγοντα, ο κάθε όρος παίρνει τιμές μεταξύ 0-1. Παρακάτω αναγράφεται η εξίσωση (4.2.3.2) που εκφράζει την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στον ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

$$CM_n(x, p_{\min}, p_{\text{opt}}, p_{\max}) \quad (4.2.3.2)$$

$$= \begin{cases} x \leq p_{\min}, & 0.0 \\ p_{\min} < x < p_{\max}, & \frac{(x - p_{\min})^n (x - p_{\max})}{(p_{\text{opt}} - p_{\min})^{n-1} \{ (p_{\text{opt}} - p_{\min})(x - p_{\text{opt}}) - (p_{\text{opt}} - p_{\max})[(n-1)p_{\text{opt}} + p_{\min} - nx] \}} \\ x \geq p_{\max}, & 0.0 \end{cases}$$

Όπου:

x : T, a_w

$p_{\text{opt}}, p_{\min}, p_{\max}$: optimum, minimum, maximum growth value for x

n : shape parameter

Με την χρήση των μοντέλων αυτών προσδιορίζονται οι θεμελιώδεις παράμετροι ή αλλιώς cardinal values: $T_{\min}$, $T_{\max}$, T_{opt} , $a_{w\min}$, $a_{w\max}$, $a_{w\text{opt}}$, μ_{opt} , κτλ τα οποία είναι μοναδικά και αποτελούν την «ταυτότητα» του κάθε μικροοργανισμού.

Τέλος, το lambda concept χρησιμοποιεί την ίδια προσέγγιση με το Gamma-concept, αλλά εφαρμόζεται στην απενεργοποίηση (inactivation) των μικροοργανισμών (Sym'Previous).

Πίνακας 3. Παραδείγματα δευτερογενών κινητικών μοντέλων ανάπτυξης μυκήτων σε εργαστηριακά υποστρώματα (Garcia, 2009)

Μοντέλο	Είδος Μύκητα	Αναφορές
Ratkowsky square-root	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Emericella nidulans</i>	Cuppers et al. (1997)
	<i>A. niger</i>	Parra and Magan (2004)
	<i>P. expansum</i>	Baert et al. (2007)
Arrhenius–Davey	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Samapundo et al. (2005)
	<i>P. expansum</i>	Baert et al. (2007)
	<i>A. carbonarius</i>	Tassou et al. (2007)
	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Samapundo et al. (2007)
Rosso cardinal	<i>P. roqueforti</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>P. variotii</i> , <i>A. niger</i> , <i>E. nidulans</i>	Cuppers et al. (1997)
	<i>P. chrysogenum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Alternaria alternata</i> .	Sautour et al. (2001)
	<i>A. flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. sydowii</i> , <i>E. amstelodami</i> , <i>E. chevalieri</i> , <i>Xeromyces bisporus</i>	Rosso and Robinson (2001)
	<i>P. brevicompactum</i>	Membre´ et al. (2001)
	<i>Monascus ruber</i>	Panagou et al. (2003)
	<i>A. carbonarius</i>	Tassou et al. (2007)
Polynomial	<i>A. flavus</i>	Gibson et al. (1994)
	<i>P. variotii</i> , <i>A. niger</i> , <i>E. nidulans</i>	Cuppers et al. (1997)
	<i>P. roqueforti</i>	Valik et al. (1999)
	<i>P. chrysogenum</i>	Sautour et al. (2001)
	<i>Wallemia sebi</i>	Patriarca et al. (2001)
	<i>M. ruber</i>	Panagou et al. (2003)
	<i>A. niger</i>	Parra and Magan (2004)
	<i>A. section Nigri</i>	Belli´ et al. (2004a,b,2005)
	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. verrucosum</i>	Pardo et al. (2004, 2005a,b,c,d, 2006a,b)
	<i>F. verticilloides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Samapundo et al. (2005)
	<i>P. expansum</i>	Lahlali et al. (2005)
	<i>E. chevalieri</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>P. brevicompactum</i>	Char et al. (2005)
	<i>A. carbonarius</i> , <i>P. expansum</i>	Mari´n et al. (2006a,b)
	<i>A. carbonarius</i>	Tassou et al. (2007)
	<i>P. expansum</i>	Baert et al. (2007)
	<i>M. ruber</i>	Panagou et al. (2007)
	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Samapundo et al. (2007)
	<i>M. ruber</i>	Panagou et al. (2003)
Gamma Concept	<i>A. alternata</i> , <i>A. flavus</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>T. harzianum</i>	Sautour et al. (2003)

4.2.4 Τριτογενή Μοντέλα

Τριτογενή μοντέλα

Το τελικό βήμα για την ανάπτυξη ενός πιθανολογικού μοντέλου περιλαμβάνει την έκφραση των προβλέψεων του δευτερογενούς μοντέλου μέσω ενός πρωτογενούς μοντέλου. Στην περίπτωση αυτή, τα δεδομένα που εισάγουμε στο μοντέλο είναι οι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες και τα δεδομένα που εξάγει το μοντέλο είναι μια καμπύλη ανάπτυξης ή απενεργοποίηση. Τα μοντέλα αυτά μπορούν να ενσωματωθούν σε υπολογιστικά φύλλα και μπορούν να προγραμματιστούν σε πακέτα λογισμικού. Αυτό επιτρέπει στους ανθρώπους που δεν είναι εξοικειωμένοι με την προγνωστική μοντελοποίηση, να κάνουν προβλέψεις για ανάπτυξη μικροοργανισμών υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ενός προϊόντος διατροφής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προβλέψεις της μικροβιακής συμπεριφοράς δεν είναι πάντα 100% ακριβείς. Οι διακυμάνσεις και η αβεβαιότητα προκαλούνται λόγω του πειραματικού σφάλματος, της διακύμανσης μεταξύ των στελεχών και της εκτίμησης των παραμέτρων για το πρωτογενές και δευτερογενές μοντέλο. Ως εκ τούτου, τα κινητικά μοντέλα συχνά έχουν ένα ανώτατο και κατώτατο όριο εμπιστοσύνης.

Τα τριτογενή μοντέλα αποτελούνται από τον συνδυασμό των πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων σε ένα εύχρηστο λογισμικό(software) ως εργαλείο. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.) αναφέρονται συνοπτικά τα ήδη υπάρχοντα τριτογενή μοντέλα που χρησιμοποιούνται από ερευνητικά ιδρύματα και βιομηχανίες τροφίμων μαζί με μια συνοπτική περιγραφή του καθενός από αυτά (Tenenhaus-Aziza, 2014).

Πίνακας 4. Τριτογενή μοντέλα
(Tenenhaus, 2016)

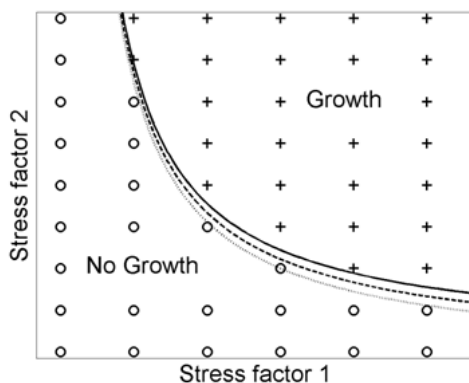
Software	Link	Presenter(s) and affiliation(s)	Σύντομη Περιγραφή
Baseline	www.baselineapp.com	Antonio Valero Díaz, (University of Cordoba, Spain)	προσμοιώνει την ανάπτυξη και την αδρανοποίηση 5 διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών σε αρκετά υποστρώματα τροφίμων, χρησιμοποιώντας προγνωστικά μοντέλα από τη βιβλιογραφία.
ComBase	http://www.combase.cc	Jozsef Baranyi, Daniel Marin (IFR, UK)	παρέχει μια βάση δεδομένων με περισσότερα από 50.000 αρχεία για να περιγράψει την εξέλιξη (ανάπτυξη και αδρανοποίηση) πολλών μικροοργανισμών σε υποστρώματα καλλιέργειας ή σε διαφορετικά τρόφιμα. Περιλαμβάνει επίσης ορισμένες ενότητες προσομοίωσης για ανάπτυξη και αδρανοποίηση. Συμπεριλαμβάνονται 15 μικροοργανισμοί.
Dairy Products Safety Predictor	www.agr.maisondulait.fr	Frederique Perrin (ACTALIA, France), Fanny Tenenhaus-Aziza, (CNIEL, France)	είναι ένα εμπορικό λογισμικό που εκτελεί προσομοιώσεις ενός μοντέλου έκθεσης ή αξιολόγησης κινδύνου που έχει αναπτυχθεί προηγουμένως για έναν συγκεκριμένο μικροοργανισμό σε ένα συγκεκριμένο γαλακτοκομικό προϊόν. Οι χρήστες έχουν προσωπικούς λογαριασμούς όπου ενημερώνουν τα μοντέλα τους και στη συνέχεια μπορούν να δοκιμάσουν νέες παραμέτρους.
FDA-iRISK	https://irisk.foodrisk.org	Yuhuan Chen (FDA, US)	επιτρέπει την ιεράρχηση του κινδύνου για τα τρόφιμα, εφαρμόζοντας μοντέλα αξιολόγησης κινδύνου για διαφορετικούς παθογόνους παράγοντες και πίνακες τροφίμων. Προτείνονται πρότυπα για μοντέλα αξιολόγησης κινδύνου.
FILTREX	http://w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/logiciels/filtrex/	Jean-Pierre Gauchi (INRA, France)	αξιολογεί με μεγάλη ακρίβεια τις παραμέτρους των μοντέλων πρωτογενούς ανάπτυξης και αδρανοποίησης και παρέχει υποστήριξη για βέλτιστο διαδοχικό σχεδιασμό πειραμάτων δοκιμής.
FISHMAP	http://www.azti.es/downloads/downloads/fishmap/#tab-description	Begona Alfaro (AZTI, Spain)	προσμοιώνει την ανάπτυξη 8 ειδών αλλοίωσης σε ψάρια, χρησιμοποιώντας θερμοκρασία, αέρα και CO ₂ .
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	http://fssp.food.dtu.dk	Paw Dalgaard (DTU Food, Denmark)	προβλέπει την ανάπτυξη 3 παθογόνων, 3 αλλοιωγόνων και άλλων μικροοργανισμών σε προϊόντα κρέατος και θαλασσινών. Στο πλαίσιο της προσομοίωσης σε δυναμικές συνθήκες μπορούν να ενσωματωθούν 12 περιβαλλοντικές παράμετροι.
GlnaFit	http://cit.kuleuven.be/biotech/downloads.php	Annemie Geeraerd, Letícia Haberbeck	επιτρέπει την τοποθέτηση δέκα μοντέλων απενεργοποίησης σε πειραματικά δεδομένα και την επιλογή του καλύτερου μοντέλου
GroPIN	www.aua.gr/psomas/gropin	Panagiotis N. Skandamis (Agricultural University of Athens, Greece)	προσμοιώνει τη συμπεριφορά 66 μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων παθογόνων και αλλοιωγόνων σε διαφορετικά υποστρώματα τροφίμων. Επίσης, παρέχεται βάση δεδομένων προγνωστικών μοντέλων και μπορεί να εφαρμοστεί με νέα μοντέλα. Οι προσομοιώσεις Monte Carlo προτείνονται επίσης για να ληφθεί υπόψη η παραλλακτικότητα.

Listeria Meat Model	www.cpmf2.be	Jan van Impe (KU Leuven, Belgium)	είναι ένα εμπορικό λογισμικό που προσομοιώνει την ανάπτυξη του παθογόνου στο κρέας και σε διάφορα προϊόντα κρέατος.
MicroHibro	www.microhibro.com	Fernando Perez Rodriguez (University of Cordoba, Spain)	αξιολογεί και επικυρώνει τις παραμέτρους ενός πρωτογενούς μοντέλου που βασίζεται σε πειραματικά δεδομένα. Η εφαρμογή μοντέλων εκτίμησης κινδύνων, ακολουθούμενη από ανάλυση ευαισθησίας του μοντέλου, είναι επίσης δυνατή με βάση το συνδυασμό πολλών βασικών διεργασιών και τη χρήση της βάσης δεδομένων των προγνωστικών μοντέλων που παρέχονται.
MRV, Microbial Responses Viewer	http://mrviewer.info/	Shige Koseki (National Food Research Institute, Japan)	είναι ένα μοντέλο διεπαφής για ανάπτυξης / μη ανάπτυξης που βασίζεται στη βάση δεδομένων ComBase. Παρέχει μια οπτικοποίηση των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης.
NIZO Premia	No Internet access	Maykel Verschuere (NIZO food research, The Netherlands)	είναι ένα εμπορικό λογισμικό για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών τα χαρακτηριστικά των οποίων παρέχονται από τον χρήστη ή ενσωματώνονται στο μοντέλο. Αυτές οι προβλέψεις εφαρμόζονται κυρίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Άλλα υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν εφόσον τα χαρακτηριστικά τους παρέχονται από το χρήστη.
PMM-Lab	https://sourceforge.net/projects/pmmlab/	Matthias Filter (Federal Institute for Risk Assessment, Germany)	είναι ένα εξελικτικό λογισμικό ανοιχτού-κώδικα που προσομοιώνει τη συμπεριφορά των παθογόνων και των αλλοιογόνων σε διαφορετικά υποστρώματα τροφίμου, υπό τον όρο ότι οι απαιτούμενες πληροφορίες δίνονται από το χρήστη. Παρέχει μια βάση δεδομένων που βοηθά στη διαχείριση πειραματικών δεδομένων.
Prediction of Microbial Safety in Meat Products	http://dmripredict.dk	Annemarie Gunvig (Danish Meat Research Institute, Denmark)	προβλέπει και προσομοιώνει τη συμπεριφορά τεσσάρων ειδών παθογόνων σε προϊόντα κρέατος, βάσει βιβλιογραφίας και εσωτερικών προγνωστικών μοντέλων και πειραματικών δεδομένων.
Sym'Previus	www.symprevius.org	Noemie Descric (ADRIA Developpement, France)	είναι ένα εμπορικό λογισμικό που προσομοιώνει την ανάπτυξη και αδρανοποίηση 6 παθογόνων και 13 αλλοιογόνων σε αρκετά υποστρώματα τροφίμων τόσο σε στατικές όσο και σε δυναμικές συνθήκες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ντετερμινιστικές ή πιθανολογικές προσεγγίσεις με βάση εσωτερικά πειραματικά δεδομένα ή δεδομένα χρηστών.

4.3 Πιθανολογικά μοντέλα

Τα αποτελέσματα ενός πιθανολογικού μοντέλου θα δηλώνουν τη πιθανότητα που υπάρχει ώστε να λάβει χώρα ένα συγκεκριμένο συμβάν εντός ορισμένου χρόνου (Σχ. 2). Το χρονικό διάστημα είναι ένα σημαντικό κριτήριο καθώς για ένα ορισμένο συνδυασμό των περιβαλλοντικών συνθηκών ένα αντίγραφο μπορεί να εξελιχθεί από «μη- ανάπτυξη» σε «ανάπτυξη», αν παραταθεί η περίοδος της ανάλυσης.

Στην περίπτωση των πιθανολογικών μοντέλων, οι απαντήσεις, σύμφωνα με τις καθορισμένες πειραματικές συνθήκες και σε ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, θα πρέπει να κωδικοποιούνται είτε ως 0 (που θα δηλώνει ότι δεν έχουμε κάποια παρατήρηση) ή ως 1 (έχουμε παρατηρούμενη απόκριση). Εάν πραγματοποιηθούν επαναλαμβανόμενες παρατηρήσεις σε μία κατάσταση, θα ληφθεί μια πιθανότητα μεταξύ 0 και 100%. Προκειμένου να συσχετιστεί η πιθανότητα με τις μεταβλητές πρόβλεψης, χρησιμοποιείται παλινδρόμηση. Αυτή η τεχνική στατιστικής μοντελοποίησης χρησιμοποιείται ευρέως όταν το αποτέλεσμα που μας ενδιαφέρει είναι διχοτομικό (ICPMF9/ Skandamis, 2016).



Γράφημα 2. Απεικόνιση ενός μοντέλου ανάπτυξης/μη ανάπτυξης. Το σύμβολο (o) δηλώνει μη ανάπτυξη no-growth), το σύμβολο (+) δηλώνει ανάπτυξη (growth). Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις προβλέψεις του λογιστικού μοντέλου παλινδρόμησης: $p = 0.9$ (—), $p = 0.5$ (- - -), $p = 0.1$ (• • •).

4.4 Επικύρωση του Μοντέλου

Πολλά μοντέλα αναπτύσσονται μετά από πειραματικές μελέτες σε εργαστηριακά υποστρώματα. Δεν υπάρχει διαβεβαίωση ότι οι προβλεπόμενες τιμές από ένα μοντέλο θα ταιριάζουν με αυτές σε ένα συγκεκριμένο σύστημα πραγματικού τροφίμου. Πριν χρησιμοποιηθεί το εκάστοτε μοντέλο ως προς ένα τρόφιμο θα πρέπει ο χρήστης του μοντέλου αυτού να το επικυρώσει (validate) ως προς το υπό μελέτη τρόφιμο.

Η εσωτερική επικύρωση (internal validation) αφορά στη σύγκριση μεταξύ προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών για τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου και η εξωτερική επικύρωση (external validation) αφορά στη σύγκριση μεταξύ προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών για ανεξάρτητα δεδομένα (Koutsoumanis, 2017/Whiting, 1995)

Η επικύρωση αποτελεί ουσιαστικό βήμα μετά τη μοντελοποίηση.

Παρ' όλα αυτά, σε πολλές μελέτες εκλείπει το κομμάτι της επικύρωσης του μοντέλου σε πραγματικό τρόφιμο λόγω της πολυπλοκότητας των τροφίμων, δεν παύει όμως να αποτελεί απαραίτητο κομμάτι για την απόδειξη της εγκυρότητας και εφαρμοσιμότητας των μοντέλων. Οι Balley et al., (2001) δημιούργησαν ένα πιθανολογικό μοντέλο για τους *A. niger* και *P. spinulosum* σε ένα ποτό και το επικύρωσαν σε μια διαφορετική ομάδα ποτών. Οι Samarundo et al. (2007) ανέπτυξαν μαθηματικό μοντέλο για την ανάπτυξη των *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus* σε ακτινοβολημένους κόκκους αραβοσίτου και διεξήγαγαν την επικύρωση αυτού σε νέο πειραματικό σύνολο ακτινοβολημένων κόκκων αραβοσίτου. Οι Baert et al. (2007) ανέπτυξαν μια σειρά μοντέλων για ανάπτυξη του *Penicillium expansum* σε θρεπτικό μέσο από άγαρ και πουρέ μήλου, που επικυρώθηκε σε μήλα. Οι Marin et al (2008b) επικύρωσαν μοντέλα για την πιθανότητα ανάπτυξης και παραγωγής OTA (ωχρατοξίνης Α) που αναπτύχθηκαν για το *A. carbonarius* σε φιστίκια, σε ένα ανεξάρτητο σύνολο πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν με φιστίκια.

5. Υπόθεση – Σκοπός Μελέτης

Τα προϊόντα αρτοποιίας αποτελούν τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας ($a_w=0.65-0.90$) τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων τόσο αλλοιωγόνων όσο και παθογόνων καθώς πολλοί από αυτούς παράγουν μυκοτοξίνες. Οι κυριότεροι παράγοντες που συμβάλουν στην ανάπτυξη των μυκήτων είναι η θερμοκρασία του περιβάλλοντος του τροφίμου και η a_w και το pH του ίδιου του τροφίμου (Panagou, 2003). Η επίδραση των παραγόντων αυτών στη μικροβιακή ανάπτυξη μετριέται με μεθόδους προγνωστικής μοντελοποίησης (predictive microbiology) (Dantigny, 2005) και εάν συνδυαστούν μπορούν να αποτελέσουν ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ασφάλεια των τροφίμων και τη διαχείριση της ποιότητας (Leistner and Gorris, 1995).

Η ανάπτυξη των μυκήτων ευνοείται σε όξινα pH μεταξύ 4.5 – 5.5 και σε εύρος θερμοκρασίας μεταξύ 25-37°C (Gock et al., 2003). Στην μελέτη των Dagnas et al., (2016) σε προϊόντα αρτοποιίας αξιολογήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η επίδραση των T και a_w σε στελέχη *Aspergillus niger*, *Eurotium repens* (*Aspergillus pseudoglaucus*) και *Penicillium corylophilum* με τη χρήση μοντέλου Gamma-concept, με στόχο την βελτίωση του χρόνου ζωής των προϊόντων.

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας απομονώθηκαν (Χριστίνα Δρεμέτσικα, Πτυχιακή μελέτη, 2015) και ταυτοποιήθηκαν (Μαρίσια Μπερτόλη, Μεταπτυχιακή μελέτη 2016) 106 μύκητες από εμπορικά αρτοσκευάσματα Brioche. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης το 66% των μυκήτων άνηκε στο γένος *Penicillium* sp., το 22% στο *Cladosporium* sp. και το 7% στο *Aspergillus* sp. Στη συνέχεια 42 από τις 106 απομονώσεις (εκπρόσωποι των κυρίαρχων γενών που απομονώθηκαν), χαρακτηρίστηκαν ως προς το *in vitro* δυναμικό ανάπτυξής τους.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν: α) η μοντελοποίηση της επίδρασης των T , a_w και pH στον ρυθμό ανάπτυξης τριών μυκήτων (από τις παραπάνω απομονώσεις) που ανήκαν στα γένη *Aspergillus* και *Penicillium*, χρησιμοποιώντας το μοντέλο Gamma concept. β) Η επικύρωση του ανεπτυχθέντος μοντέλου σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα που προσομοιάζουν το τελικό προϊόν brioche καθώς και σε πραγματικό τρόφιμο (εμπορική συσκευασία).

6. Υλικά και Μέθοδοι

6.1. Ανανέωση και εμβολιασμός με τους μύκητες

Τα στελέχη των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν απομονωθεί από α' ύλες, υλικά συσκευασίας είτε τελικά προϊόντα brioche σε προηγούμενη εργασία (Δρεμέτσικα Χριστίνα, Πτυχιακή μελέτη). Πιο συγκεκριμένα, ο *Aspergillus flavus* απομονώθηκε από φιλμ συσκευασίας brioche με γέμιση φράουλας, ο *Aspergillus fumigatus*, απομονώθηκε από κρέμα μπισκότο που προοριζόταν για το γέμισμα του brioche και τέλος ο *Penicillium chrysogenum* απομονώθηκε από αρτοσκευάσματα brioche και συγκεκριμένα από κρέμα φράουλα και κρέμα πραλίνα.

Για την ανανέωση των μυκήτων, 10μl από το στοκ του εκάστοτε μύκητα (εναιώρημα σπορίων μύκητα σε 60% v/v γλυκερόλη, -20°C) τοποθετούνταν στο κέντρο κάθε τρυβλίου με θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar, pH: 5.7-5.8) υπό ασηπτικές συνθήκες και στη συνέχεια επωάστηκαν στους 25 °C για 7 μέρες.

Στη συνέχεια, η συλλογή των σπορίων του εκάστοτε μύκητα πραγματοποιούνταν με τη χρήση αποστειρωμένης μεταλλικής σπάτουλας και την προσθήκη 10ml διαλύματος 0.1 % v/v Tween® 80 στο τρυβλίο. Το εναιώρημα των σπορίων – μυκηλλιακών υφών διερχόταν από αποστειρωμένη γάζα με σκοπό τη συγκράτηση των μυκηλλιακών υφών και τη διέλευση μόνο των σπορίων. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των σπορίων αυτό αραιωνόταν καταλλήλως ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10^6 σπόρια/ ml. Για τον εμβολιασμό των εργαστηριακών υλικών χρησιμοποιούνταν 10μl από το εναιώρημα των σπορίων στο κέντρο του εκάστοτε τρυβλίου, υπό ασηπτικές συνθήκες (n=5x3) και ακολουθούσε συντήρηση αυτών σε επιλεγμένες θερμοκρασίες.

6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των μυκήτων

Με σκοπό τον υπολογισμό των θεμελιωδών παραμέτρων του εκάστοτε μύκητα για τη θερμοκρασία, εργαστηριακό υλικό (PDA) ενοφθαλμίστηκε με τους διαφορετικούς μύκητες, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο) και ακολούθησε συντήρηση αυτών σε οκτώ (8) Τ συντήρησης. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μυκήτων πραγματοποιούνταν με τη μέτρηση της διαμέτρου του μύκητα σταυροειδώς. Σύμφωνα και με αντίστοιχες έρευνες, ο λόγος για τον οποίο εξετάστηκε πρώτα ο παράγοντας: θερμοκρασία, εξηγείται από το γεγονός ότι γνωρίζοντας την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του εκάστοτε μύκητα, θα μπορεί να παραμένει σταθερή κατά την μελέτη των υπόλοιπων παραγόντων. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- *Aspergillus flavus* (134) και *Aspergillus fumigatus* (111): 15 °C, 20 °C, 22 °C, 25°C, 28 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C.
- *Penicillium chrysogenum* (53): 10 °C, 15 °C, 20 °C, 22 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 35°C.

Εφαρμόστηκαν 3 ξεχωριστές επαναλήψεις από 5 τρυβλία η κάθε επανάληψη.

6.3 Επίδραση της ενεργότητας ύδατος στην ανάπτυξη των μυκήτων

Ως ενεργότητα νερού ορίζεται το ελεύθερο νερό/ ελεύθερη υγρασία, που υπάρχει στο περιβάλλον του τροφίμου και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιήσει ο μύκητας προκειμένου να εκβλαστήσει, να επιβιώσει και να αναπτυχθεί.

Επίσης, μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση σε αντίστοιχες έρευνες χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος ενεργότητας από 0.80 – 0.90 για μύκητες των ειδών *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (Samarundo et al, 2007), για τους μύκητες: *A. flavus*/*A. parasiticus*/*A. oryzae*/*A. nomius* οι Gibson et al., (1994) χρησιμοποίησαν ένα σετ ενεργοτήτων: 0.85/0.87/0.90/0.95/0.97/0.98 σε θερμοκρασίες 15-25-30°C.

Σκοπός ήταν η εύρεση της βέλτιστης ενεργότητας νερού στην οποία αναπτύσσεται ο εκάστοτε μύκητας.

Αφού λοιπόν, προσδιορίστηκαν προηγουμένως οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης για τον κάθε μύκητα και συγκεκριμένα οι 25 °C για τον *Penicillium chrysogenum* (53), οι 30 °C για τον *A. flavus* (134) και οι 37 °C για τον *Aspergillus fumigatus* (111), στη συνέχεια δημιουργήθηκαν 10 διαφορετικά υποστρώματα ενεργότητας νερού, το οποίο έγινε με την προσθήκη γλυκερόλης. Η γλυκερόλη έχει την ιδιότητα να συγκρατεί τα μόρια του νερού με αποτέλεσμα να μειώνεται η ελεύθερη υγρασία που υπάρχει στο προϊόν. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως από την βιομηχανία τροφίμων στη ρύθμιση της υγρασίας. Μετά τον ενοφθαλμισμό με τους μύκητες ακολούθησε συντήρηση αυτών σε δέκα (10) επίπεδα ενεργότητας νερού. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μυκήτων πραγματοποιούνταν με τη μέτρηση της διαμέτρου του μύκητα σταυροειδώς.

Αναλυτικότερα παρακάτω φαίνονται οι τιμές ενεργότητας που χρησιμοποιήθηκαν μετά από ρύθμιση με προσθήκη γλυκερόλης:

Πίνακας 5. Τα δέκα (10) επίπεδα ενεργότητας νερού που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των τριμυκήτων.

aw										
0%	10%	20%	25%	30%	35%	40%	42%	45%	47%	50%
0.9807	0.9575	0.9266	0.9080	0.8850	0.8537	0.8393	0.8266	0.8089	0.8001	0.778

6.4 Επίδραση του pH ενεργότητας ύδατος στην ανάπτυξη των μυκήτων

Ο προσδιορισμός των βέλτιστων τιμών του pH πραγματοποιήθηκε μεταξύ των τιμών 3 – 9, και ρυθμίστηκε με χρήση HCl ή NaOH αναλόγως . Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές έρευνες το pH δεν λαμβάνεται ιδιαίτερα υπόψιν διότι όπως αναφέρουν και οι Huchet et al., στη μελέτη τους, το pH δεν λήφθηκε υπόψιν λόγω του γεγονότος ότι τα αρτοσκευάσματα έχουν σταθερό pH κοντά στο 6.5 κατά την διαδικασία της αποθήκευσης και λόγω του γεγονότος ότι, όπως αναφέρεται σε άλλες έρευνες έχει αμελητέα σημασία στην κινητική ανάπτυξης των μυκήτων (Wheeler et al., 1991).

Πίνακας 6. Τα δέκα (10) επίπεδα pH που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των τριμυκήτων.

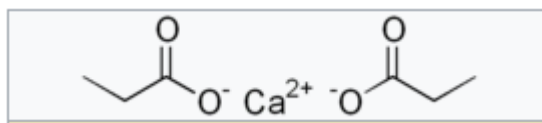
pH									
3	4	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	9

6. 5 Χρήση συντηρητικού (προπιονικό ασβέστιο)

Έγιναν πειράματα επικύρωσης αποτελεσμάτων, δηλαδή προσομοίωσης συνθηκών πραγματικού τροφίμου σε υπόστρωμα PDA με τη χρήση συντηρητικού προπιονικού ασβεστίου. Πρόκειται για ένα φυσικό οξύ σε μορφή σκόνης, που βρίσκεται σε μικρές ποσότητες σε πολλά τρόφιμα και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε προϊόντα αρτοποιίας κυρίως εναντίον των μυκήτων. Παράγεται σε μεγάλη κλίμακα από βακτήρια του παχέως εντέρου και χρησιμοποιείται ευρέως από την βιομηχανία τροφίμων σε αρτοσκευάσματα και είδη ζαχαροπλαστικής ως συντηρητικό.

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius εντοπίζεται στην λίστα με τα συντηρητικά υπό την ονομασία: E282 και πρόκειται για ένα συντηρητικό το οποίο επιτρέπεται και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής ως ασφαλές - GRAS (Generally Recognized As Safe). Το προπανοϊκό ασβέστιο χρησιμοποιείται σε προϊόντα αρτοποιίας για την αναστολή ανάπτυξης μυκήτων, σε συγκέντρωση μεταξύ 0,1-0,4% (Zakour, 1998), (αν και οι ζωοτροφές ενδέχεται να περιέχουν έως και 1%). Η μόλυνση από τους μύκητες θεωρείται σοβαρό πρόβλημα για τους αρτοσκευαστές και οι συνθήκες που απαντώνται συνήθως μετά το ψήσιμο είναι αρκετά ευνοϊκές για την ανάπτυξη μυκήτων. Πριν από μερικές δεκαετίες, ο *Bacillus mesentericus* ήταν ένα σοβαρό πρόβλημα, αλλά οι σημερινές βελτιωμένες πρακτικές υγιεινής στα αρτοποιεία, έχουν ουσιαστικά εξαλείψει αυτή τη μορφή αλλοίωσης. Το προπανοϊκό ασβέστιο και το προπανοϊκό νάτριο πλέον είναι αποτελεσματικά έναντι των μυκήτων και του *B. mesentericus* (Furia, 1973).

Στο πείραμα αυτό συγκρίθηκε απουσία συντηρητικού σε σχέση με 400 ppm και 800 ppm από το συντηρητικό σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA με συνδυασμούς ενεργότητας νερού 0.84 και 0.90.



Εικόνα 8. Στερεοχημική απεικόνιση του προπιονικού ασβεστίου.

6.2 Ανάπτυξη Μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης απόκρισης μυκήτων σε προϊόντα τύπου Brioche

6.6.1 Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το δευτερογενές μοντέλο gamma concept σύμφωνα με το οποίο κάθε παράγοντας επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο και συνδυάζονται μαζί με πολλαπλασιαστικό τρόπο (Zwietering, 1992).

Η επιλογή του μοντέλου αυτού έγινε λόγω του γεγονότος ότι δίνει ικανοποιητική εξήγηση των αποτελεσμάτων βιολογικής σημασίας, αποτελεί ένα εργαλείο εύχρηστο χωρίς την προϋπόθεση ο χειριστής να έχει γνώσεις στατιστικής ή μαθηματικών, δίνει έγκυρα αποτελέσματα και με οικονομικό τρόπο καθώς χρειάζεται μικρό όγκο δεδομένων και δεν χρειάζονται περαιτέρω τεστ δοκιμών από την εταιρεία. Τέλος είναι ευέλικτο, καθώς στο μοντέλο αυτό μπορούν να προστεθούν επιπλέον παράγοντες για την αξιολόγηση ανάπτυξης των μικροοργανισμών χωρίς να επηρεάσει τους ήδη υπάρχοντες.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά έγινε ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων δηλαδή: του ρυθμού ανάπτυξης (μ) της διαμέτρου των μυκήτων (growth rate) για τον κάθε παράγοντα που εξετάστηκε και της φάσης προσαρμογής (λ) - lag phase με τη βοήθεια του Baranyi και τη χρήση του προγράμματος DMFit.

Ακολούθησε ο προσδιορισμός των θεμελιωδών παραμέτρων (cardinal values) των: $T^\circ\text{C}$, pH, a_w , μέσω του θεμελιώδους μοντέλου με σημεία καμπής (cardinal model with inflection) και με τη βοήθεια του προγράμματος TableCurve2D σύμφωνα με το οποίο προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες, μέγιστες και ελάχιστες τιμές για κάθε εξεταζόμενο παράγοντα.

Στη συνέχεια, έγινε ποσοτικοποίηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην ανάπτυξη των μυκήτων με βάση την αρχή Gamma-concept, καθώς και επικύρωση του μοντέλου σε συνθήκες προσομοίωσης των αρτοσκευασμάτων

brioche σε εργαστηριακό υπόστρωμα και σε πραγματικά εμπορικά αρτοσκευάσματα brioche.

Για τον υπολογισμό του μ_{ref} και $1/\lambda_{ref}$, ως θερμοκρασία εισάγεται η προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου, δηλαδή οι 25 °C (θερμοκρασία δωματίου), στην θέση του pH εισάγεται το pH του τροφίμου δηλαδή 5.8 και ως ενεργότητα νερού χρησιμοποιήθηκαν δύο τιμές: $a_w=0.84$ (η ενεργότητα του ίδιου του τροφίμου-brioche) και $a_w=0.90$ που αντιστοιχεί στην ενεργότητα ύδατος που πιθανώς να προκύψει έπειτα από κάποια αστοχία κατά τους χειρισμούς του τροφίμου και η οποία είναι πιο ευνοϊκή για την ανάπτυξη μυκήτων. Επιπλέον σε αυτούς τους παράγοντες προστέθηκε το συντηρητικό που χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία προπιονικό ασβέστιο σε συγκέντρωση 400ppm.

6.3 Επικύρωση μοντέλου

6.3.1 Επικύρωση του μοντέλου σε εργαστηριακά θρεπτικά υλικά

Κατά την επικύρωση του μοντέλου σε εργαστηριακό υπόστρωμα PDA λήφθηκαν υπόψιν τα χαρακτηριστικά του τροφίμου (brioche). Ως θερμοκρασία εισάγεται η προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου, δηλαδή οι 25 °C (θερμοκρασία δωματίου), στην θέση του pH τοποθετείται το pH του τροφίμου δηλαδή 5.8 και ως ενεργότητα νερού μελετήθηκαν δύο τιμές: $a_w=0.84$ (η ενεργότητα του ίδιου του τροφίμου) και $a_w=0.90$ η ενεργότητα που πιθανώς να προκύψει έπειτα από κάποια αστοχία κατά τους χειρισμούς του τροφίμου και η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη μυκήτων. Επιπλέον σε αυτούς τους παράγοντες προστέθηκαν το συντηρητικό που χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία προπιονικό οξύ: 400ppm και τέλος τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε σακούλες υπό αέρα και υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα με αναλογία: 10% CO₂, 10% O₂, 80% N₂.

6.3.2 *In situ* εμβολιασμός σε αρτοσκευάσματα brioche

Για τον εμβολιασμό των brioche χρησιμοποιήθηκαν από 10 μl εμβολίου και έγινε σε οκτώ (8) σημεία και για τους τρεις μύκητες ξεχωριστά. Ο εμβολιασμός έγινε επιφανειακά κατά μήκος των brioche σε τρία σημεία τόσο στην επάνω πλευρά όσο και στην κάτω πλευρά και αριστερά και δεξιά του brioche (όπως φαίνεται στην ακόλουθες εικόνες). Στη συνέχεια τα brioche συσκευάστηκαν σε διάφανες σακούλες είτε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) είτε σε αερόβιες συνθήκες και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία συντήρησης 25 °C αλλά και σε μεταβαλλόμενες T (20°C -25°C -30°C).



Εικόνα 8, Εικόνα 9. Διαδικασία εμβολιασμού brioche στην επάνω την κάτω και στην πλαϊνή πλευρά αντίστοιχα.

7. Αποτελέσματα-Συζήτηση

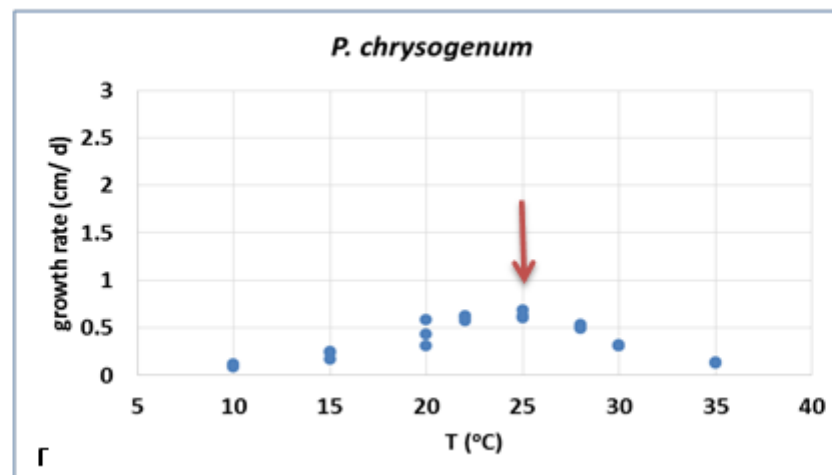
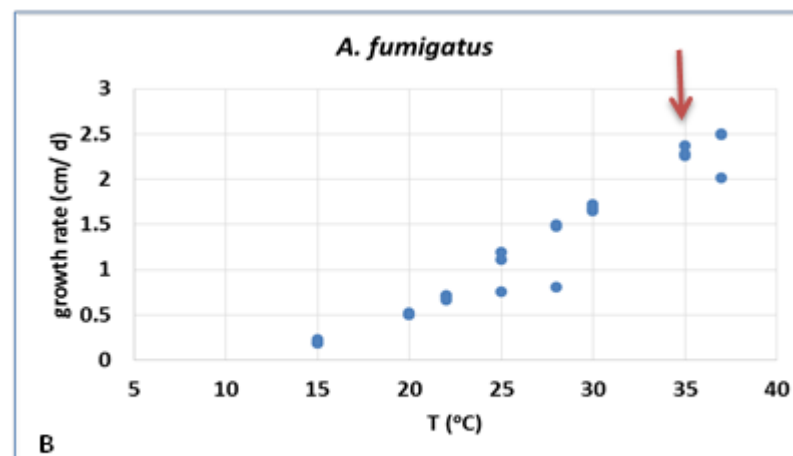
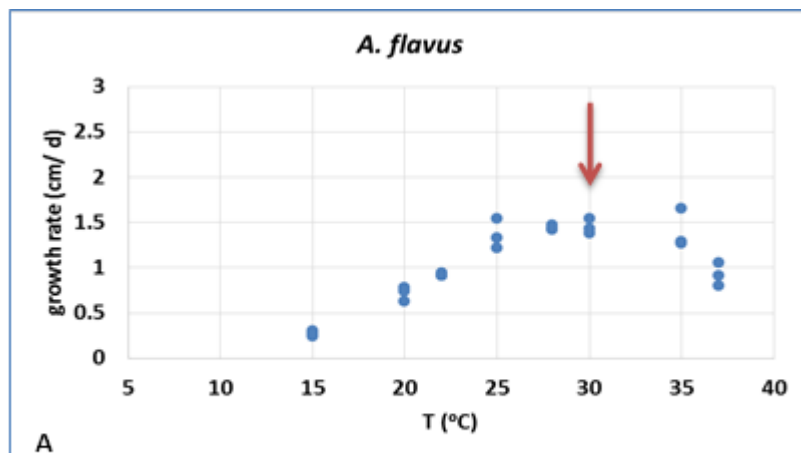
Η λεπτομερής γνώση των μικροβιακών αποκρίσεων στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες, που συντίθενται σε ένα μαθηματικό μοντέλο, επιτρέπει την αντικειμενική αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών διεργασιών (επεξεργασίας, διανομής και αποθήκευσης) στη μικροβιολογική ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων, παρακολουθώντας το περιβάλλον χωρίς την ανάγκη διενέργειας μικροβιολογικών αναλύσεων (Koutsoumanis, 2017).

Η μικροβιολογία πρόρρησης πλέον έχει καθιερωθεί στη μικροβιολογία τροφίμων ως ένα χρήσιμο εργαλείο ελέγχου της μικροβιολογικής χλωρίδας στο τρόφιμο και συμβάλει στην μείωση του κόστους που έχουν τα τεστ δοκιμών για της βιομηχανίες. Με τη ραγδαία ανάπτυξη υπολογιστών και του Διαδικτύου, οι διαθέσιμες διεθνείς βάσεις δεδομένων και τα μαθηματικά μοντέλα θα οδηγήσουν στην καθημερινή χρήση των μοντέλων πρόβλεψης καθώς θα αποτελούν απαραίτητα εργαλεία για τη βιομηχανία και για τα ερευνητικά και πανεπιστημιακά ιδρύματα.

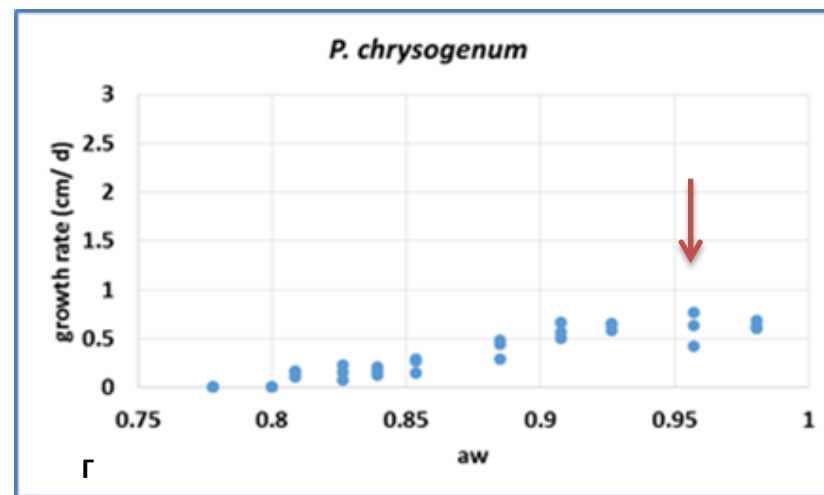
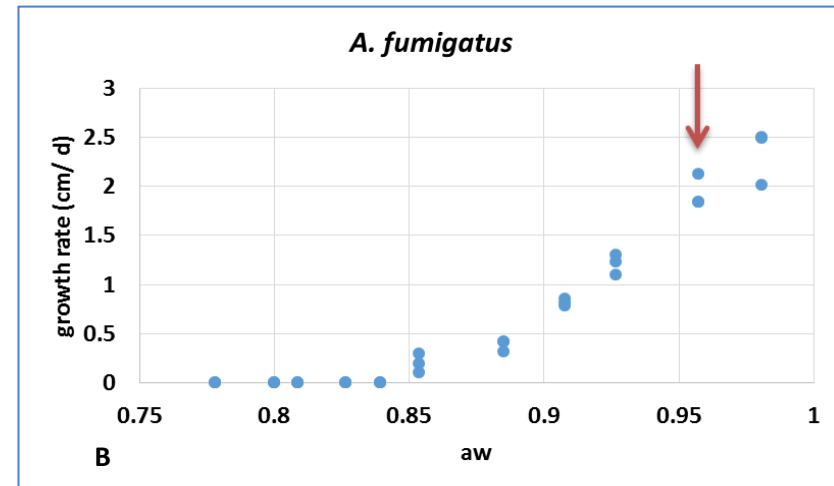
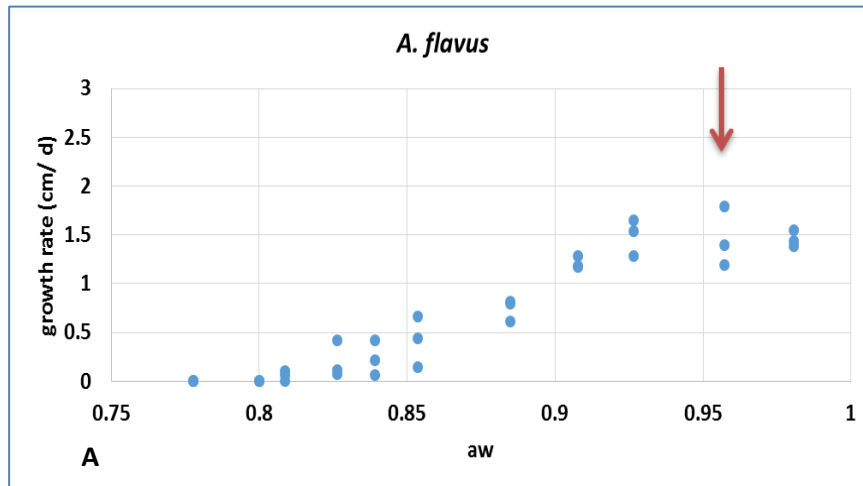
Όπως προαναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο μικροβιακός πληθυσμός στα τρόφιμα μπορεί να αυξηθεί σημαντικά λόγω κακών μεταχειρίσεων κατά τη διάρκεια της τροφικής αλυσίδας. Οι κύριοι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη, την επιβίωση και το μεταβολισμό των μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι: θερμοκρασία ή T ($^{\circ}\text{C}$), το pH και η ενεργότητα νερού (a_w). Καθώς αυτοί οι παράγοντες μεταβάλλονται κατά την παραγωγή και την αποθήκευση-συντήρηση των τροφίμων, εμφανίζεται η ανάγκη χρήσης μαθηματικών μοντέλων που να καθιστούν εφικτή την πρόβλεψη της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στο εκάστοτε τρόφιμο-περιβάλλον με απώτερο σκοπό την διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης της ανάπτυξης των μυκήτων *A. flavus*, *A. fumigatus* και *P. chrysogenum* σε αρτοκευάσματα brioche σε σχέση με την Θερμοκρασία T ($^{\circ}\text{C}$), το pH και την ενεργότητα νερού a_w . Τα brioche αποτελούν τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας με a_w 0.65-0.90, που επιτρέπει την ανάπτυξη αλλοιωγόνων και παθογόνων μυκήτων, συντηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και έχουν χρόνο ζωής 60 ημέρες. Το μοντέλο που επιλέχθηκε ήταν το Gamma concept/ cardinal growth model. Η αρχή ανάπτυξης των μοντέλων θεμελιωδών παραμέτρων βασίζεται στη χρήση παραμέτρων που έχουν βιολογική ή μαθηματική σημασία (Psomas,2012).

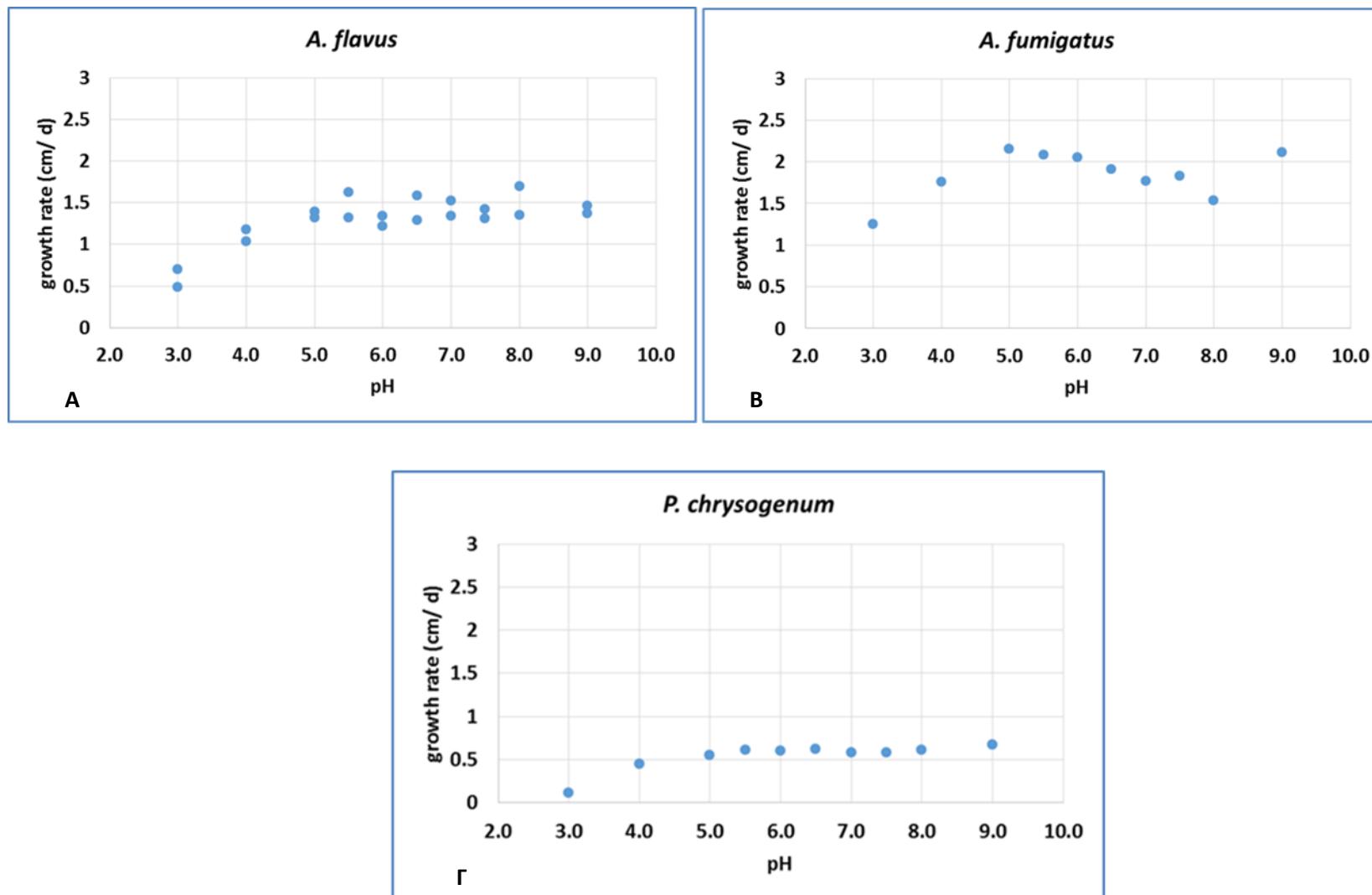
Αναπτύχθηκαν δύο (2) ανεξάρτητα δευτερογενή μοντέλα (gamma concept) για την πρόβλεψη της επίδρασης της T , a_w και pH του τροφίμου στο ρυθμό ανάπτυξης και τη φάση προσαρμογής των υπό μελέτη μυκήτων. Για την ανάπτυξη του μοντέλου αρχικά υπολογίστηκαν οι θεμελιώδεις παράμετροι (cardinal values) για κάθε έναν από τους υπό μελέτη μύκητες και για κάθε έναν από τους υπό μελέτη παράγοντες T , a_w , pH. Ωστόσο, η ανάπτυξη των μυκήτων εξαρτάται τόσο από τον ρυθμό ανάπτυξης όσο και από την φάση προσαρμογής. Για να εισέλθει ο μικροοργανισμός στην εκθετική φάση ανάπτυξης πρέπει πρώτα να εξέλθει από την φάση προσαρμογής (lag phase). Η φάση αυτή διαφέρει ανάλογα με τον μικροοργανισμό και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες θα βρεθεί. Για το σκοπό αυτό, υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι δηλαδή: ο ρυθμός αύξησης της διαμέτρου (radial growth rate, μ) και η φάση προσαρμογής (lag phase, λ) των μυκήτων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για κάθε ένα παράγοντα ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το πρωτογενές μοντέλο του Baranyi και με τη βοήθεια του προγράμματος DMfit. Η επίδραση της T και a_w στη μεταβολή των ρυθμών ανάπτυξης των μυκήτων (ρυθμός αύξησης της διαμέτρου) απεικονίζεται στα (Γραφήματα 1-3). Επιπλέον η επίδραση των εν λόγω παραγόντων στη φάση προσαρμογής του *Aspergillus flavus* (ρυθμός αύξησης της διαμέτρου) απεικονίζεται στο Γράφημα 4.



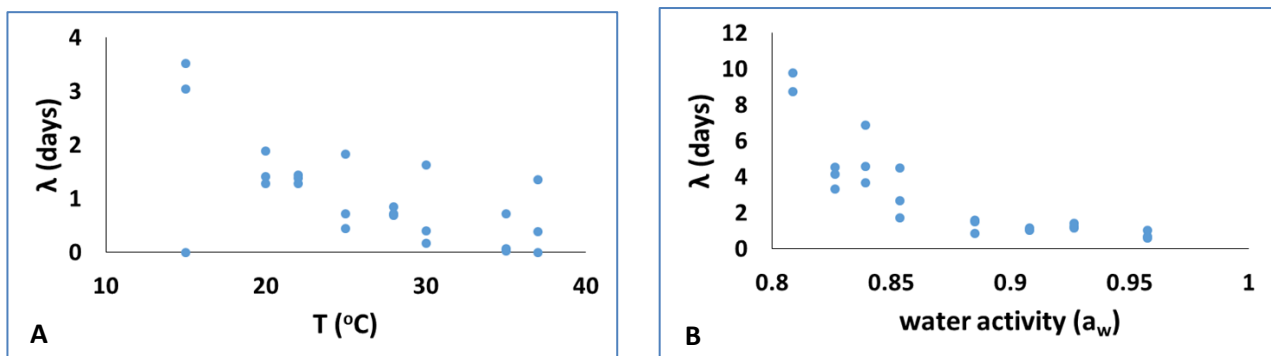
Γράφημα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ρυθμού ανάπτυξης (cm/day) των διαφορετικών μυκήτων *A. flavus*, (A) *A. fumigatus* (B) και *P. chrysogenum* (Γ) συναρτήσει της θερμοκρασίας. Με βέλος διακρίνεται η T_{opt} για τον κάθε μύκητα.



Γράφημα 2 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ρυθμού ανάπτυξης (cm/day) των διαφορετικών μυκήτων *A. flavus* (Α), *A. fumigatus* (Β) και *P. chrysogenum* (Γ) συναρτήσει της aw. Με βέλος διακρίνεται η aw_{opt} για τον κάθε μύκητα.



Γράφημα 3 Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ρυθμού ανάπτυξης (cm/day) των διαφορετικών μυκήτων *A. flavus* (Α), *A. fumigatus* (Β) και *P. chrysogenum* (Γ) συναρτήσει του pH.



Γράφημα 4 Διαγραμματική απεικόνιση της φάσης προσαρμογής συναρτήσει της θερμοκρασίας (Α) και συναρτήσει της ενεργότητας ύδατος (Β) για τον *Aspergillus flavus*.

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του προγράμματος TableCurve2D και την εξίσωση των Rosso and Robinson, (2001) που ακολουθεί (7.1), έγινε προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα (μ , λ) και προσδιορίστηκαν οι θεμελιώδεις παράμετροι (cardinal values) – (βέλτιστη-optimum, μέγιστη- maximum, ελάχιστη-minimum και ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης μ_{opt}) για κάθε μύκητα και για κάθε υπό μελέτη παράγοντα (Γράφημα 5 και 6). Υπολογίστηκε το $1/\lambda$ ώστε διαγραμματικά να έχουμε όμοια/ συγκρίσιμη καμπύλη με αυτή του ρυθμού ανάπτυξης μ . Τα δεδομένα του pH δεν χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη του μοντέλου διότι φαίνεται πως το pH δεν επηρεάζει την ανάπτυξη μυκήτων στο εύρος τιμών pH του Brioche (5.8-6.2) και επειδή τα προϊόντα brioche έχουν σταθερό pH κατά την αποθήκευση. Οι θεμελιώδεις παράμετροι που υπολογίστηκαν για κάθε μύκητα φαίνονται στους Πίνακες 5 κι 6. Όπου $x \leq p_{min}$ ή $x \geq p_{max}$ δεν υπάρχει ανάπτυξη του μύκητα (no growth).



$$CM_n(x, p_{min}, p_{opt}, p_{max}) = \begin{cases} x \leq p_{min} & 0.0 \\ p_{min} < x < p_{max} & \frac{(x - p_{min})^n (x - p_{max})}{(p_{opt} - p_{min})^{n-1} \{ (p_{opt} - p_{min})(x - p_{opt}) - (p_{opt} - p_{max})[(n-1)p_{opt} + p_{min} - nx] \}} \\ x \geq p_{max} & 0.0 \end{cases} \quad (7.1)$$

x : T, a_w

p_{opt} , p_{min} , p_{max} : optimum, minimum, maximum growth value for x

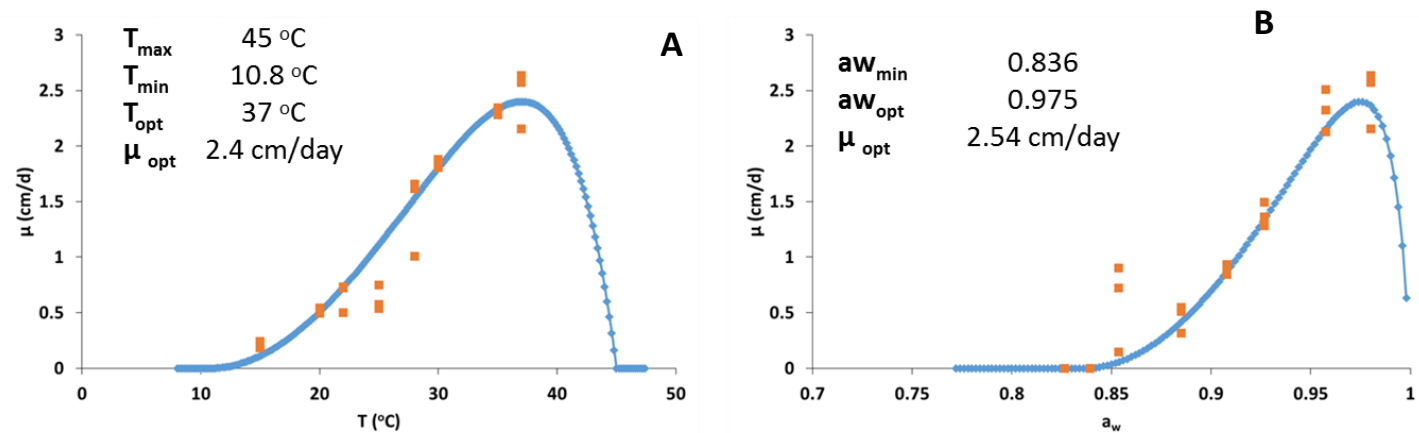
n : shape parameter

Πίνακας 5. Οι θεμελιώδεις παράμετροι των τριών μυκήτων όπως βρέθηκαν στη βιβλιογραφία και όπως υπολογίστηκαν από το CPM σε σχέση με τον ρυθμό ανάπτυξης συναρτήσει T και a_w .

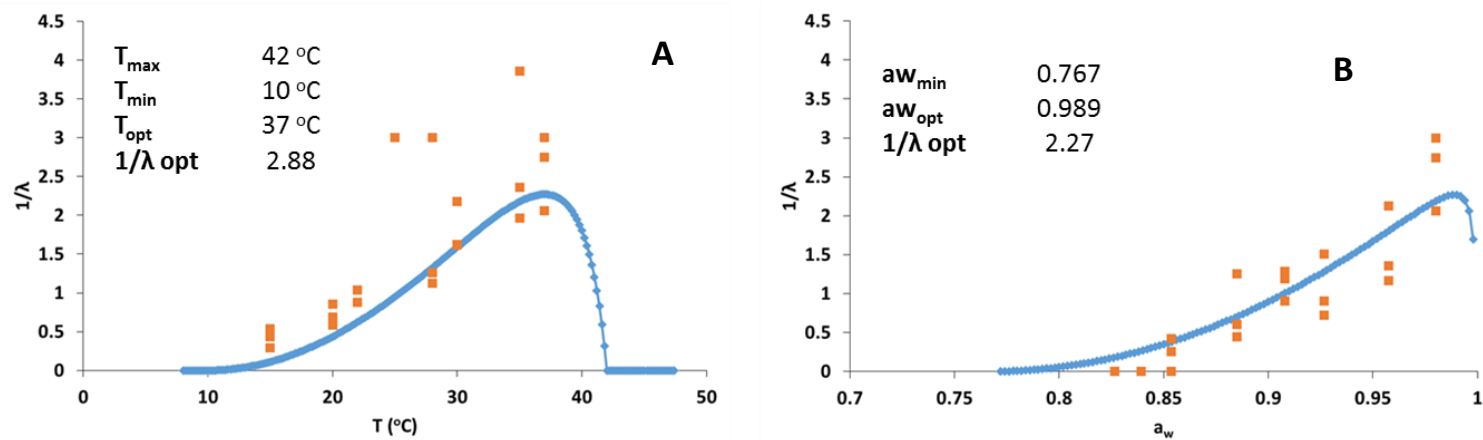
Παράμετροι για μ_{max}	<i>Aspergillus flavus</i> (134)		<i>Aspergillus fumigatus</i> (111)		<i>Penicillium chrysogenum</i> (53)	
	Observed	Literature data	Observed	Literature data	Observed	Literature data
Tmax (°C)	40°C	48 °C	45°C	55 °C	37°C	37 °C
Tmin (°C)	12°C	12 °C	10.8°C	12 °C	12°C	4 °C
Topt (°C)	30 °C	30-37 °C	37 °C	40-42 °C	25 °C	23 °C
μ_{opt} (cm/day) -T	1.5		2.4		0.67	
a_w min	0.794	0.78	0.836	0.82	0.75	0.78-0.81
a_w opt	0.958		0.975		0.954	
μ_{opt} (cm/day)- a_w	2		2.54		0.75	

Πίνακας 6. Οι θεμελιώδεις παράμετροι των τριών μυκήτων όπως βρέθηκαν στη βιβλιογραφία και όπως υπολογίστηκαν από το CPM σε σχέση με την φάση προσαρμογής συναρτήσει T και a_w .

Παράμετροι για $1/\lambda$	<i>Aspergillus flavus</i> (134)		<i>Aspergillus fumigatus</i> (111)		<i>Penicillium chrysogenum</i> (53)	
	Observed	Literature data	Observed	Literature data	Observed	Literature data
Tmax (°C)	40	48 °C	42	55 °C	42	37 °C
Tmin (°C)	10.7	12 °C	10	12 °C	8	4 °C
Topt (°C)	30	30-37 °C	37	40-42 °C	25	23 °C
$1/\lambda_{opt}$ -T	2.06		2.88		1.38	
a_w min	0.77	0.78	0.767	0.82	0.767	0.78-0.81
a_w opt	0.99		0.989		0.959	
$1/\lambda_{opt}$ - a_w	2.19		2.27		1.5	



Γράφημα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της προσαρμογής του cardinal parameter model για τη θερμοκρασία T (A) και την ενεργότητα ύδατος a_w (B) στις παρατηρούμενες τιμές του ρυθμού ανάπτυξης μ του *Aspergillus fumigatus*.



Γράφημα 6. Διαγραμματική απεικόνιση της προσαρμογής του cardinal parameter model για τη θερμοκρασία T (A) και την ενεργότητα ύδατος a_w (B) στις παρατηρούμενες τιμές της φάσης προσαρμογής λ – [Lag time (λ)] $\rightarrow 1/\lambda$, του *Aspergillus fumigatus*

7.1 Ανάπτυξη και επικύρωση του μοντέλου

Για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων στον ρυθμό ανάπτυξης, χρησιμοποιήθηκε το Gamma-concept των Zwietering et al., (1992).

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η συνάρτηση γ (gamma-concept) βασίζεται α) στο γεγονός ότι πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης, δρουν ανεξάρτητα και η επίδραση του κάθε παράγοντα παριστάνεται με έναν διακριτό όρο οποίος πολλαπλασιάζεται με τους υπόλοιπους όρους που επιδρούν στον ρυθμό ανάπτυξης και β) στο γεγονός ότι η επίδραση κάθε παράγοντα στον ρυθμό ανάπτυξης μπορεί να εκφραστεί με τη μορφή κλάσματος του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης, επομένως, μπορούν να μελετηθούν διάφοροι συνδυασμοί εμποδίων και να συγκριθούν μεταξύ τους ώστε να προκύψει μια ολιστική προσέγγιση ανασταλτικών παραγόντων (Psomas, 2012).

Κάτω από ολοκληρωτικά βέλτιστες συνθήκες, κάθε μικροοργανισμός παρουσιάζει ένα μέγιστο αναπαραγωγικό ρυθμό ανάπτυξης παρά την πιθανή επίδραση της παραλλακτικότητας (variability) του στελέχους (Psomas, 2012).

Ο όρος γ αντιπροσωπεύει την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στον ρυθμό ανάπτυξης (Dagnas, 2016) και μπορεί να εκφραστεί ως ένα κλάσμα του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (δηλαδή ο ρυθμός όταν αυτός ο περιβαλλοντικός παράγοντας βρίσκεται στο βέλτιστο επίπεδο).

$$\gamma = \frac{\text{ρυθμός ανάπτυξης σε πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες}}{\text{ρυθμός ανάπτυξης σε βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες}}$$

Ως θερμοκρασία εισάγεται η προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου, δηλαδή οι 25 °C (θερμοκρασία δωματίου), στην θέση του pH μπαίνει το pH του τροφίμου δηλαδή 5.8 και ως ενεργότητα νερού μελετήθηκαν δύο τιμές: $a_w=0.84$ (η ενεργότητα του ίδιου του τροφίμου) και $a_w=0.90$ η ενεργότητα που

πιθανώς να προκύψει έπειτα από κάποια αστοχία κατά τους χειρισμούς του τροφίμου και η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη μυκήτων. Επιπλέον σε αυτούς τους παράγοντες προστέθηκαν το συντηρητικό που χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία προπιονικό οξύ: 400ppm και τέλος τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε σακούλες υπό αέρα και υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα με αναλογία: 10% CO₂, 10% O₂, 80% N₂.

Το cardinal parameter model (Augustin et al., 2005) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του μοντέλου με κάποιες τροποποιήσεις, η εξίσωση του οποίου είναι η ακόλουθη:

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{ref}} \cdot \left[\frac{(T - T_{\min})}{T_{\text{ref}} - T_{\min}} \right]^2 \cdot \frac{(a_w - a_{w \min})}{(a_{w \text{ opt}} - a_{w \min})} \cdot \left(1 - \frac{[PA_{\text{H}}]}{[MIC_{\text{U propionate}}]} \right) \cdot \left[\frac{CO_{2 \max} - CO_2}{CO_{2 \max}} \right] \cdot \xi$$

$$\psi = \sum_i \frac{\phi_{e_i}}{2 \prod_{j \neq i} (1 - \phi_{e_j})}$$

$$\xi = \begin{cases} 1 & , \psi \leq 0.5 \\ 2(1 - \psi) & , 0.5 < \psi < 1 \\ 0 & , \psi \geq 1 \end{cases}$$

$$\phi(T) = \left(\frac{T_{\text{opt}} - T}{T_{\text{opt}} - T_{\min}} \right)^3$$

$$\phi(a_w) = \left(\frac{a_{w \text{ opt}} - a_w}{a_{w \text{ opt}} - a_{w \min}} \right)^3$$

$$\phi(\text{Propionate}) = \left(1 - \sqrt{1 - \frac{[PA_{\text{H}}]}{[MIC_{\text{U propionate}}]}} \right)^2$$

$$\phi(CO_2) = \left[1 - \sqrt{\frac{CO_{2 \max} - CO_2}{CO_{2 \max}}} \right]^2$$

Όπου: μ_{ref} = ρυθμός ανάπτυξης στις συνθήκες αναφοράς

ξ = όρος ο οποίος αντικατοπτρίζει την επίδραση των αλληλεπιδράσεων των υπό μελέτη περιβαλλοντικών παραγόντων στο $\mu_{\max}$

η τιμή ψ = περιγράφει την απόκλιση συγκεκριμένων συνδυασμών από τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και των συνθηκών αποθήκευσης σε σχέση με την προβλεπόμενη οριακή ανάπτυξη ($\psi=1.0$) (προσδιορίζεται από τα δεδομένα των περιβαλλοντικών παραγόντων)

$\phi(T)$ = συνεισφορά της T στην αλληλεπίδραση

$\phi(a_w)$ = συνεισφορά της a_w στην αλληλεπίδραση

$\phi(\text{propionate})$ = συνεισφορά της προπιονικού ασβεστίου (ppm) στην αλληλεπίδραση (MIC: Minimum Inhibitory Concentration)

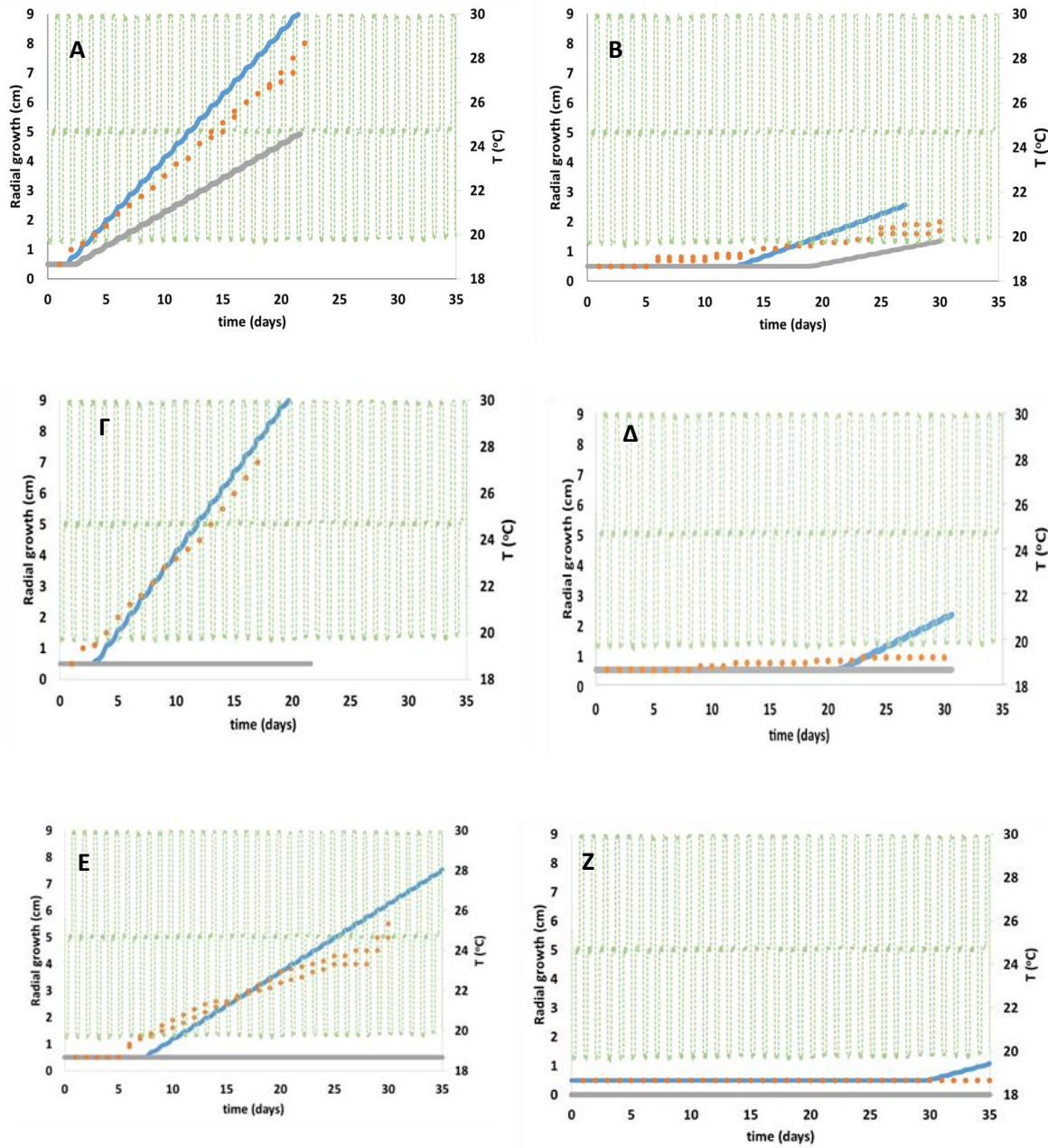
$\phi(\text{CO}_2)$ = συνεισφορά του CO_2 στην αλληλεπίδραση (Le Marc et al., 2002)

Με σκοπό την καλύτερη πρόβλεψη του μοντέλου της ανάπτυξης του εκάστοτε μύκητα σε όλο το εύρος των τιμών a_w , υπολογίστηκαν δύο διαφορετικά $\mu_{\text{ref}} - 1/\lambda_{\text{ref}}$ για $a_{w\text{ref}} 0.84$ και $a_{w\text{ref}} 0.90$, συνθήκες που αντιστοιχούν στην a_w -στόχο του τροφίμου (brioche) και την πιθανή a_w του τροφίμου σε περίπτωση αστοχίας (π.χ. έψηση μικρότερης διάρκειας ή σε χαμηλότερη T) (Πίνακας 7.)

Πίνακας 7. : Υπολογισμός των μ_{ref} (A) και $1/\lambda$ (B) ref ανάλογα με την ενεργότητα νερού για κό μύκητα.

A μ_{ref}		
	$a_w 0.90$	$a_w 0.84$
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.24	0.0001
<i>Aspergillus flavus</i>	0.49	0.025
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.41	0.07

B $1/\lambda_{\text{ref}}$		
	$a_w 0.90$	$a_w 0.84$
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.33	0.03
<i>Aspergillus flavus</i>	0.6	0.07
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.75	0.31



Γράφημα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της παρατηρούμενης (πορτοκαλί) και προβλεφθείσας (μπλε και γκρι) καμπύλης ανάπτυξης του *Penicillium chrysogenum* (Α - Β), του *Aspergillus flavus* (Γ-Δ), του *Aspergillus fumigatus* (Ε-Ζ), υπό μεταβαλλόμενη θερμοκρασία συντήρησης και a_w 0.90 (αριστερά) ή a_w 0.84 (δεξιά). Οι δύο προβλεφθείσες καμπύλες ανάπτυξης αντιστοιχούν σε χρήση διαφορετικού μ_{ref} και $1/\lambda_{ref}$, υπολογισμένο σε a_{wref} 0.90 (μπλε) και a_{wref} 0.84 (γκρι).

Στα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται πόσο καλά προσαρμόζει το μοντέλο τα δεδομένα του ως προς τις παρατηρήσεις. Όπου για ενεργότητα αναφοράς ήταν η τιμή 0.84, η καμπύλη προσαρμόζεται καλύτερα ως προς τις παρατηρούμενες που η ενεργότητα ήταν εξίσου προσαρμοσμένη στην τιμή 0.84. Αντίστοιχα για την ενεργότητα αναφοράς όταν η τιμή ήταν 0.90 τα δεδομένα του μοντέλου προσαρμόζονται καλύτερα ως προς τα παρατηρούμενα για ενεργότητα νερού 0.90. Αυτό σημαίνει πως το μοντέλο δίνει λογικές και ρεαλιστικές τιμές για την ανάπτυξη των μυκήτων στο προϊόν.

Πίνακας 8.: Υπολογισμός του έργου (h_o) που καταβάλει ο κάθε μύκητας προκειμένου να βγει από την φάση προσαρμογής (λ).

	Average h_o
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.17
<i>Aspergillus flavus</i>	0.77
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.58

7.1.2 Επικύρωση του μοντέλου σε προϊόντα brioche

Εκτός από την επικύρωση του μοντέλου σε συνθήκες προσομοίωσης του τροφίμου, πραγματοποιήθηκε και *in situ* αξιολόγηση της πιθανότητας ανάπτυξης μυκήτων στο ίδιο το προϊόν (brioche). Τα brioche αφού εμβολιάστηκαν με περίπου 1000 σπόρια μυκήτων/σημείο, τοποθετήθηκαν σε συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα με αναλογία αερίων: 10% O₂ : 10% CO₂ : 80% N₂ και στη συνέχεια συντηρήθηκαν στην εμπορικά προτεινόμενη θερμοκρασία συντήρησης 25°C. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 10) φαίνονται με βέλη τα σημεία στα οποία έγινε ο εμβολιασμός.

Καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης (>40 ημέρες) , δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κανενός από τους υπό μελέτη μύκητες στα προϊόντα brioche. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην πολυπλοκότητα του τροφίμου όπου παίζουν ρόλο και παράγοντες όπως η φυσική μικροχλωρίδα του τροφίμου, τα διαθέσιμα θρεπτικά, οι αντιμικροβιακοί παράγοντες κ.ά. Παρατηρήθηκε ότι συνδυασμός συντηρητικού και ποσοστού 10% CO₂ σε MAP συσκευασία μπορεί να δράσει ανασταλτικά ως προς την εμφάνιση και ανάπτυξη των μυκήτων.

Συνεπώς συμπεραίνεται ότι ένας συνδυασμός ανασταλτικών παραγόντων μπορεί με επιτυχία να ελέγξει την αλλοίωση προϊόντων brioche από επιμόλυνση μυκήτων.



Εικόνα 10. Συσκευασμένα brioche σε MAP: 10% CO₂, 10% O₂, 80% N₂ μετά από εμβολιασμό με τον μύκητα *Penicillium chrysogenum*.

8. Συμπεράσματα

Η πρόβλεψη της επιβίωσης, της ανάπτυξης και της αδρανοποίησης των παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, αποτελεί μία από τις πιο ενδιαφέρουσες και παραγωγικές διαδικασίες στον τομέα της έρευνας για την Μικροβιολογία Τροφίμων τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Στοχεύοντας σε μια ευρύτερη εφαρμογή των πιθανολογικών μοντέλων, η ανάπτυξη διαφόρων λογισμικών έχει ήδη ενεργή εφαρμογή στη μοντελοποίηση τροφιμογενών αλλοιωγόνων και παθογόνων με στόχο την πρόβλεψη του χρόνου ζωής των προϊόντων.

Στην προκείμενη μελέτη, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη ενός κινητού μοντέλου πρόβλεψης της ανάπτυξης τριών αλλοιογόνων μυκήτων απομονωθέντων από προϊόντα brioche (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* και *Penicillium chrysogenum*), ως προς τη θερμοκρασία και την ενεργότητα ύδατος. Επιπλέον, το μαθηματικό μοντέλο επικυρώθηκε τόσο σε εργαστηριακά υποστρώματα όσο και σε τελικά προϊόντα brioche. Ο συνδυασμός συντηρητικού με 10% CO₂ στην ατμόσφαιρα της συσκευασίας φάνηκε να αρκεί για την αναστολή της μυκητιακής ανάπτυξης.

Συμπερασματικά, το μοντέλο αυτό δύναται να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο από τη βιομηχανία για την πρόβλεψη της αλλοίωσης και κατά συνέπεια ποιοτικής υποβάθμισης των προϊόντων τύπου brioche από μύκητες.

9. Βιβλιογραφία

9.1 Ξένη Βιβλιογραφία

- Abad A., Fernández-Molina J.V., Bikandi J., Ramírez A., Margareto J., Sendino J., Hernando F.L., Pontón J., Garaizar J., Rementeria A., (2010), What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis.
- Abellana M., SanchisV., Ramos A.J., (2001), Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue, International Journal of Food Microbiology 71, 151–157
- Anaya M.A.M., Torner M., de Barber C.B., (1990), Microflora of the sour dough of wheat flour bread, Z Lebensm Unters Forsch, 190:126-131
- Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. Journal of Applied Microbiology 99, 1019–1042
- Baert K., Valero A, De Meulenaer B, Samapundo S, Ahmed MM, Bo L, Debevere J, Devlieghere F. (2007), Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples, Int J Food Microbiol;118(2):139-50.
- Baranyi J., (2002), Predictive modelling to control microbial Hazards in the food processing industry, Institute of Food Research, Norwich, NR4 7UA, UK, Email: jozsef.baranyi@bbsrc.ac.uk, To be published in: *Proceedings of Euroconference on Veterinary Public Health and Food Safety Assurance*.
- Battey, A.S., Duffy, S., Schaffner, D.W., (2001), Modelling mould spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. Food Microbiol. 18, 521–529.
- Bok JW, Chung D, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, et al. (2006), GliZ, a Transcriptional Regulator of Gliotoxin Biosynthesis, Contributes to *Aspergillus fumigatus* Virulence, Infect Immun. **74** (12): 6761–8.

Booth I.R., (2002), Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress, *International Journal of Food Microbiology*, **78**, 19-30

Cluster Predictive Microbiology in Foods (CPMF2), <http://www.cpmf2.be/predictive.php>

Codex Alimentarius Commission, (2009), Annex II of the guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (CAC/GL612007).www.codexalimentarius.net/download/report

Dagnas S., Gougouli M., OnnoB., Koutsoumanis K., Membré J., (2016), Quantifying the effect of water activity and storage temperature on single spore lag times of three moulds isolated from spoiled bakery products, *International Journal of Food Microbiology*

Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., (2005), Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*. 100, 187-196

Di Pietro A., Turra D., Ghalid ME., Rossi F., (2015), Fungal pathogen uses sex pheromone receptor for chemotropic sensing of host plant signals

Doerry, W.T. (1990), Water activity and safety of baked products. American Institute of Baking Research Department Technical Bulletin, 12 (6) 6 pp.

Duarte Sc., Lino Cm, Pena A. (2010), Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status. *Food Additives and Contaminants* Vol. 27, No. 10, October, 1440–1450

Fakruddin Md ., Mazumder Reaz M., Mannan K.S. B., (2011), Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)* 40 (2): 121-131

Furia, T. E. (1973). *CRC Handbook of Food Additives*, CRC Handbook of Food Additives, CRC Press.

- Garcia D., Ramos A., Sanchis V., Mari'n S., (2009), Predicting mycotoxins in foods: A review, Food Microbiology 26, 757–769
- Gibson A.M., Baranyi J., Pitt J., Eyles M.J., Roberts T.A., (1994), Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species, International Journal of Food Microbiology, 23, 419-431
- Giese, J. (1994). Antimicrobials: assuring food safety. Food Techn. 48 (6):102-109.
- Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Poulos, P. G. (2003), Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. International Journal of Food Microbiology, 81(1), 11–19. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00166-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00166-6)
- Gougouli M., Koutsoumanis K., (2016), pp 61-81 Modeling Microbial Responses: Application to Food Safety
- Guillier L., Duret S., Hoang H.M., Flick D., Nguyen-Thé C., Laguerre O., (2016), Linking food waste prevention, energy consumption and microbial food safety: the next challenge of food policy? Curr. Opin. Food Sci.12:30–35.
- Holmquist, G.U., Walker, H.W., Stahr, H.M., (1983), Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. J. Food Sci. 48, 778–782.
- Huchet V., Pavan S., Lochardet A., Divanac'h M.L., Postollec F., Thuault D.,(2013), Development and application of a predictive model of *Aspergillus candidus* growth as a tool to improve shelf life of bakery products.
- Igoe, R. S and Hui, Y.H. (1996). Dictionary of Food Ingredients - 3rd ed. Chapman & Hall, New York.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996)
- International Commission on Microbiological Species (ICMS), (2002), Microorganisms in Foods 7, Chapter 14: Aflatoxins in peanuts
- Jarvis B., (2008), Statistical Aspects of the microbiological examination of foods, Second Edition, (Progress in Industrial Microbiology), Academic Press

- Koutsoumanis K.P., Lianou A., Gougouli M., (2016), Latest developments in foodborne pathogens modeling. *Curr. Opin. Food Sci.*; 8:120–126.
- Koutsoumanis K., (2017), "In silico methods for food safety – Predictive Microbiology", European Food Safety Authority (EFSA), Summer School
- Leistner, L., Gorris, L.G.M., (1995), Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 41-46.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., (2002), Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, 219–237.
- Leroy F., Degeest B., De Vuyst L., (2002), A novel area of predictive modelling: Describing the functionality of beneficial microorganisms in foods, *International Journal of Food Microbiology* 73, 251–259
- Leroy, F. and de Vuyst, L., (2003), A combined model to predict the functionality of the bacteriocin producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1093–1099.
- Lewis, R.J. (1989), *Food Additives Handbook*. Van Nostrand Reinhold, New York
- Mari'n, S., Hodzic, I., Ramos, A.J., Sanchis, V., (2008b). Predicting the growth/nogrowth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts. *Food Microbiol.* 25, 683–689..
- Marks, B.P., (2007), Status of microbial modelling in food process models. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7, 137–143
- McMeekin, T.A. and Ross, T. (2002), Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 133–153
- Membré Jeanne-Marie; Valdramidis Vasilis P., (2016), Modeling in food microbiology: from predictive microbiology to exposure assessment

- Moss EJ, Neal GE., (1985), The metabolism of aflatoxin B1 by human liver, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 34, No. 17, pp. 3193-3197
- Palou E., López-Malo A., *Advances in food mycology* (2006), Probabilistic modelling of aspergillus growth - pg 292
- Panagou E., Skandamis P., Nychas G., (2003), Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives, *Journal of Applied Microbiology*, 146–156
- Pateras Irene M. C., *Technology of Breadmaking*, (2007), pp 275-298, Chapter: Bread Spoilage and Staling
- Pestka J., (1995), Fungal toxins in raw and fermented meats, *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Chapter 9
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009), *Fungi and Food Spoilage*, Springer Science+Business Media, LLC (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Psomas A., (2012), Συσχετισμός φυσικοχημικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων με την αύξηση του μικροβιακού φορτίου στα τρόφιμα: Ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης αλλοίωσης της ποιότητας, Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Pujol L., Kan-King-Yu D., Le Marc Y., Johnston DM., Rama F., Guillou S., McClure P., Membre JM., (2011), Establishing Equivalence for Microbial-Growth-Inhibitory Effects (“Iso-Hurdle Rules”) by Analyzing Disparate *Listeria monocytogenes*, Data with a Gamma-Type Predictive Model
- Ratkowsky, D., Ross, T., (1995), Modelling the bacterial growth/no-growth interface. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 29–33.
- Ross T., Zwietering M.H., Schothorst M. van, Buchanan R.L., Cole M.B., International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), (2009), Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives, *Food Control*.
- Ross, T., (1999) Assessment of a theoretical model for the effects of temperature on bacterial growth rate, *Refriger. Sci. Technol. Proc.*, EUR 18816, 64–71

- Samapundo S., Devlieghere F., Geeraerd A.H., De Meulenaer B., Van Impe J.F., Debevere J., (2007), Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn.
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., & Bensoussan, M. (2001), A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity, International Journal of Food Microbiology, 67(1-2), 63–69. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00471-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00471-8)
- Skandamis P. N., Mataragas M., Lambert R. W., (2011), Chapter 8, Model fitting and probabilistic models
- Skandamis P. N., Panagou E.Z., (2016), Predictive microbiology: mathematics towards understanding the fate of food-borne microorganisms in food processing, Chapter 2, Quantitative Microbiology in Food Processing: Modeling the Microbial Ecology, First Edition, Anderson de Souza Sant'Ana, © 2017 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2017 by John Wiley & Sons, Ltd.
- Smith JP, Simpson BK., (1995), Modified atmosphere packaging of bakery and pasta products. In: Farber I, Dodds KL, editors. Principles of modified atmosphere packaging and Sous- Vide processing. Manchester: Technomic Publ Co; pp. 207–242.
- Spikes S, Xu R, Nguyen CK, Chamilos G, Kontoyiannis DP, Jacobson RH, et al. (2008). "Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence". J Infect Dis. 197 (3): 479–86.
- Stumbo, C.R., Prokit, K.S., Ramakrishnan, T.V., Evans, D.A. and Franaas, F.J. (1983), CRC handbook of lethality guides for low acid canned foods. 1. Boca Raton (FL). CRC Press.
- Te Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 46, 135–149.
- Tenenhaus-Aziza F., Ellouze M., (2014), Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair, Volume 45, Part B, February, Pages 290-299.

Turra D., Di Pietro A., (2015), Chemotropic sensing in fungus – plant interactions, Volume 26, August, Plant Biology, Pages 135-140

Vermeulen A., Daelman, J., Van Steenkiste, J., & Devlieghere, F. (2012), Screening of different stress factors and development of growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF). Food Microbiology, 32(2), 389–396.

Weidenborner M., Wieczorek C., Appel S., & Kunz B., (2000), Whole wheat and white wheat flour - the mycobiota and potential mycotoxins, Food Microbiol. 17, 103- 107

Wheeler, K. A., Hurdman, B. F., & Pitt, J. I. (1991), Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology, 12(2-3), 141–149. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90063-U](http://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90063-U).

Whiting, R.C. (1995). Microbial modeling in foods, Crit. Rev. Food Sci. 35(6): 467-494.

Zakour O. P, (1998), Chemical Food Preservatives: Propionates and Parabens, Summer Vol. 1 No.3, NYS Food Venture Center Geneva, NY → (Branen, L.A. and Davidson, P.M. 1983. Antimicrobials in Food, Marcel Dekker, New York.

Zwietering, M.H., De Wit, J.C., and Notermans, S., (1996), Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the time of consumption, Int. J. Food Microbiol., 30, 55–70.

Zwietering, M.H., Wijtzes, T., De Wit, J.C., and van't Riet, K. (1992), A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. J. Food Prot., 55, 973–979.

9.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Γεωργόπουλος Θ., (2012), Μικροβιολογικοί κίνδυνοι σε άλευρα και προϊόντα αρτοποιίας.

Καπετανάκου Α., (2012), Μελέτη φυσιολογικών χαρακτηριστικών των *Aspergillus* και *Penicillium* sp. και παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα. - Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής των Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών – Άρθρο 112 (Γενικές Διατάξεις)

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών – Άρθρο 114

Μπερτόλη ΑΜ., Μακαρίτη Ι., Σκανδάμης Π., (2016), Μοριακή ταυτοποίηση και *in vitro* εκτίμηση της ανάπτυξης μυκήτων από αρτοσκευάσματα τύπου brioche, Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής των Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Οδηγός Υγιεινής Νο 15 – ΕΦΕΤ- Αθήνα 2005

Τζάμος Κ.Ε., (2007), Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις Σταμούλη

Τσιτσιγιάννης Δ., (2014), Ασθένειες Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας, «Μυκοτοξίνες – Προκαρυωτικές ασθένειες – Ιολογικές Ασθένειες»

Πηγή 1. *Aspergillus fumigatus*: US Department of Health and Human Services, Center for disease control

Εικόνα 3.1: medlabnews.gr

9.3 Διαδικτυακές Πηγές:

<https://old.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/pen-chr.htm>

<https://nysaes.cals.cornell.edu/research-extension/food-processing-and-food-safety>

<https://symprevius.eu/predictive-microbiology/>

<http://www.cpmf2.be/predictive.php> - Flemish Cluster Predictive Microbiology in Foods

https://www.fsai.ie/faq/shelf_life/predictive_microbiology.html