



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ
ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ**

ΔΙΔΩ ΜΑΡΙΑ ΜΕΪΜΑΡΟΓΛΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2012

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΩΝ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ

ΔΙΔΩ ΜΑΡΙΑ ΜΕΪΜΑΡΟΓΛΟΥ

ΑΜ 52415

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Π. Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Π. Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμ. Χημείας (Επιβλέπουσα)

Ν. Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ

Σ. Μαστρονικολή, Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Π. Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Επιβλέπουσα**
- 2. Ν. Γαλανοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ**
- 3. Σ. Μαστρονικολή, Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ**
- 4. Μ. Κωμαΐτης, Καθηγητής ΓΠΑ**
- 5. Α. Βαλαβανίδης, Καθηγητής Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ**
- 6. Μ. Μαυρή-Βαβαγιάννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ**
- 7. Φ. Φλουρή, Λέκτορας ΓΠΑ**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 12.6.2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ

Οι Αφλατοξίνες είναι ισχυρά τοξικές και καρκινογόνες ουσίες και αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ορισμένων μυκήτων του γένους *Aspergillus*, οι οποίοι προσβάλλουν φυσικά προϊόντα και κυρίως ελαιώδεις καρπούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η Αφλατοξίνη B₁ (ΑΦΒ₁), η οποία χαρακτηρίζεται ως η πιο επικίνδυνη φυσικώς παραγόμενη χημική ένωση.

Η βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ από τους μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* επηρεάζεται, μεταξύ των άλλων, από τα λιποϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων, καθώς και από το μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA), το οποίο σχηματίζεται από την υδροϋπεροξειδωση του α-λινολενικού οξέος μέσω της λιποξυγενάσης και αποτελεί βασικό ρυθμιστή ανάπτυξης των φυτών αλλά ταυτόχρονα και ένωση απόκρισής τους σε εξωτερικές πιέσεις (stress) βιοτικού και αβιοτικού χαρακτήρα. Καθώς οι αφλατοξινογόνοι μύκητες προσβάλλουν τα φυτά, η έκθεσή τους στο MeJA είναι πολύ πιθανή.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε δύο πολύ διαφορετικά υποστρώματα. Ένα θρεπτικό υλικό συγκεκριμένης σύστασης, το εκχύλισμα ζύμης σακχαρόζης (YES) και ένα φυτικό βρώσιμο προϊόν ελληνικής προέλευσης, την κάππαρη.

Στο θρεπτικό υλικό YES μελετήθηκαν παράλληλα η βιοσυνθετική πορεία της ΑΦΒ₁ για συνολικό διάστημα 25 ημερών επώασης και η επίδραση της προσθήκης των εξής ποσοτήτων MeJA στην πορεία αυτή: 1) 0,0022 mg MeJA/10mL YES, 2) 0,227 mg MeJA/10mL YES, 3) 1,134 mg MeJA/10mL YES, 4) 2,267 mg MeJA/10mL YES, 5) 4,534 mg MeJA/10mL YES, 6) 9,067 mg MeJA/10mL YES, 7) 18,134 mg MeJA/10mL YES, 8) 22,667 mg MeJA/10mL YES, 9) 36,267 mg MeJA/10mL YES και 10) 226,67 mg MeJA/10mL YES. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 10⁻⁶M, 10⁻⁴M, 0,0005M, 10⁻³M, 0,002M, 0,004M, 0,008M, 10⁻²M, 0,016M και 10⁻¹M MeJA ανά 10 mL YES.

Ο προσδιορισμός της ΑΦΒ₁ περιλαμβάνει το στάδιο εκχύλισής από τα μυκήλια στο YES με MeOH, τον καθαρισμό της με μικροστήλες ανοσοσυγγένειας και τέλος τον

ποσοτικό προσδιορισμό της με HPLC και ανιχνευτή φθορισμού, αφού προηγηθεί παραγωγοποίηση της ΑΦΒ₁ προς το αντίστοιχο φθορίζον παράγωγό της, την ΑΦΒ_{2α}. Η μέθοδος έχει ποσοστό ανάκτησης 99% και όριο ανίχνευσης 0,02 ng mL⁻¹ YES.

Από την παρατήρηση της πορείας βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ από τον *A.parasiticus* στο YES για συνολικό διάστημα 25 ημερών προέκυψε ότι η μέγιστη παραγωγή ΑΦΒ₁ εντοπίζεται τη 18^η ημέρα επώασης.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με το MeJA έδειξαν πως η παρουσία του επηρεάζει τη μυκηλιακή ανάπτυξη και την παραγωγή της ΑΦΒ₁ προκαλώντας αναστολή η διέγερση ανάλογα με τη συγκέντρωση που επιδρά στο σύστημα του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη της μικρότερης ποσότητας MeJA (0,0022 mg/κωνική, 10⁻⁶M) προκάλεσε στατιστικά σημαντική (p=0.05) αύξηση της παραγωγής της μυκηλιακής μάζας και διέγερση της παραγωγής της ΑΦΒ₁, η οποία θεωρείται στατιστικά σημαντική (p=0.05) κατά τη 12^η ημέρα επώασης. Η προσθήκη της αμέσως μεγαλύτερης ποσότητας MeJA από όσες συνολικά μελετήθηκαν (0,227 mg/κωνική, 10⁻⁴M) αύξησε το ρυθμό βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (p=0.05) μόνο κατά τη 12^η ημέρα επώασης χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Η παρουσία MeJA στις συγκεντρώσεις 0,0005M, 10⁻³M και 0,002M ανά κωνική είχε σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική (p=0.05) μείωση της παραγωγής της μυκηλιακής μάζας σε όλο το διάστημα παρατήρησης και τη μείωση του ρυθμού βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁, σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μετά τη 15^η ημέρα επώασης. Από τα αποτελέσματα της έρευνας στα δείγματα με συγκεντρώσεις MeJA 0,004M, 0,008M, 10⁻²M, 0,016M και 10⁻¹M ανά κωνική προέκυψε ότι σε όλες τις περιπτώσεις υπήρχε αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης και της παραγωγής της ΑΦΒ₁, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική (p=0.05) σε όλο το διάστημα παρατήρησης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα η ελάχιστη ποσότητα MeJA που απαιτείται για την πλήρη αναστολή της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ σε θρεπτικό υλικό YES εμβολιασμένο με 10² κονίδια του μύκητα *A.parasiticus* είναι 9,067 mg/10 mL YES.

Για την παρατήρηση της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ και τη μελέτη στη συνέχεια της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων του MeJA στην ανάπτυξη του *A.parasiticus* και στην παραγωγή της ΑΦΒ₁ στην κάππαρη, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία μέθοδος προσδιορισμού της ΑΦΒ₁ στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Ο προσδιορισμός της ΑΦΒ₁ περιλαμβάνει την εκχύλισή της από τη συνολική μάζα του μύκητα που αναπτύχθηκε στην κάππαρη μαζί με το φυτό με μίγμα MeOH:H₂O (80:20 v/v), τον καθαρισμό της με μικροστήλες ανοσοσυγγένειας, τη μετατροπή της προς την ημιακετάλη ΑΦΒ_{2α} και τον ποσοτικό προσδιορισμό της με HPLC που διαθέτει ανιχνευτή φθορισμού. Το όριο

ανίχνευσης της μεθόδου βρέθηκε ότι είναι $0,06 \text{ ng g}^{-1}$ κάππαρης, το όριο ποσοτικοποίησης $0,12 \text{ ng g}^{-1}$ κάππαρης και το ποσοστό ανάκτησης 79%. Από τα αποτελέσματα και τη στατιστική επεξεργασία, η μέθοδος κρίθηκε ακριβής, αξιόπιστη και ευαίσθητη.

Αντίστοιχα με την περίπτωση του θρεπτικού υλικού YES, μελετήθηκαν στην κάππαρη η πορεία βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ για συνολικό διάστημα 25 ημερών και παράλληλα η επίδραση της παρουσίας διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στην εξέλιξη της βιοσυνθετικής πορείας της ΑΦΒ₁ για 15 ημέρες. Οι ποσότητες MeJA που προστέθηκαν είναι οι εξής: 1) $0,0022 \text{ mg MeJA/15g}$ κάππαρης, 2) $0,227 \text{ mg MeJA/15g}$ κάππαρης, 3) $2,267 \text{ mg MeJA/15g}$ κάππαρης, 4) $22,667 \text{ mg MeJA/15g}$ κάππαρης και 5) $226,67 \text{ mg MeJA/15g}$ κάππαρης. Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 10^{-6}M , 10^{-4}M , 10^{-3}M , 10^{-2}M και 10^{-1}M MeJA ανά 15g κάππαρης.

Η μέγιστη παραγωγή ΑΦΒ₁ στην κάππαρη εμφανίζεται τη 12^η ημέρα παρατήρησης και στη συνέχεια, σε αντίθεση με το θρεπτικό υλικό YES, ο ρυθμός βιοσύνθεσης αρχίζει να μειώνεται.

Ο προσδιορισμός της παραγόμενης ΑΦΒ₁ στα δείγματα που περιείχαν MeJA διαφορετικών συγκεντρώσεων έδειξε πως και στην περίπτωση ενός σύνθετου και τόσο διαφορετικού υποστρώματος - σε σχέση με το YES - όπως είναι η κάππαρη, η προσθήκη MeJA επηρεάζει τις διεργασίες του μύκητα και η επιρροή αυτή εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη συγκέντρωση του φυτικού ρυθμιστή. Αναλυτικότερα, η προσθήκη MeJA στη μικρότερη ποσότητα (10^{-6}M) προκάλεσε στατιστικά σημαντική ($p=0.05$) διέγερση στην παραγωγή της ΑΦΒ₁ στο χρονικό διάστημα από την 9^η έως και την 15^η ημέρα. Η παρουσία του MeJA σε συγκέντρωση 10^{-4}M στο δείγμα προκάλεσε αναστολή στο φαινόμενο της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.05$) στο σύνολο των ημερών επώασης. Αντίστοιχη ήταν και η επίδραση της προσθήκης $2,267 \text{ mg MeJA}$ (10^{-3}M/κωνική). Μεταξύ των δύο αυτών συγκεντρώσεων υπολογίσθηκε ότι βρίσκεται η μέση ανασταλτική συγκέντρωση ic_{50} για το MeJA ($0,433 \text{ mg} \cdot \text{κωνική}^{-1}$). Τέλος, η παρουσία του MeJA στις πιο μεγάλες συγκεντρώσεις (10^{-2}M και 10^{-1}M) ανέστειλε την παραγωγή της ΑΦΒ₁ σε στατιστικά σημαντικά ($p=0.05$) επίπεδα στο σύνολο των ημερών επώασης φτάνοντας τη 12^η ημέρα παρατήρησης το ποσοστό αναστολής 97,74% και 98,42% για τις δύο περιπτώσεις αντίστοιχα.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προέκυψε ότι η επίδραση του MeJA στην ανάπτυξη του μύκητα *A.parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωσή του και ταυτόχρονα ότι ανεξάρτητα από το υπόστρωμα

που χρησιμοποιήθηκε για τις συγκεκριμένες μελέτες, η παρουσία του MeJA σε χαμηλή συγκέντρωση (10^{-6} M) είχε σαν συνέπεια τη διέγερση της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁.

Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις MeJA ανέστειλαν δραματικά την παραγωγή της τοξίνης, γεγονός που ανοίγει ενδιαφέρουσες προοπτικές για τη χρήση της αναστολής από το μεθυλιασμονικό οξύ στον τομέα της πρόληψης της επιμόλυνσης των αποθηκευμένων τροφίμων από αφλατοξινογόνους μύκητες, όπως είναι ο *A.parasiticus*.

Ο τρόπος δράσης του MeJA δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Προκειμένου να δοθούν κάποιες απαντήσεις σε ερωτήματα σχετικά με την επίδρασή του στον αφλατοξινογόνο μύκητα *A.parasiticus*, επιχειρήθηκε μία προσέγγιση αυτής της σχέσης σε γονιδιακό επίπεδο, η οποία είναι σε εξέλιξη. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε RNA από καλλιέργειες του μύκητα με και χωρίς προσθήκη MeJA και έγινε μία προσπάθεια μελέτης της έκφρασης δύο γονιδίων - των *aflC* και *aflR* - που θεωρούνται καθοριστικά για τη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *Aspergillus parasiticus*, Αφλατοξίνη Β₁, Μεθυλιασμονικό οξύ, YES, κάππαρη, HPLC.

ABSTRACT

STUDY OF FACTORS AFFECTING FUNGAL GROWTH AND THE BIOSYNTHESIS OF THEIR CARCINOGENIC METABOLITES

Aflatoxins, produced as secondary fungal metabolites by some toxigenic strains of the *Aspergillus* species, are known as highly toxic and potent carcinogenic mycotoxins. Over the past years they have received the attention of the scientific community because of their disastrous effects on human and animal health as well as on agricultural commodities. It is well known that aflatoxin biosynthesis involves lipid peroxidation with the presence of fatty acid hydroperoxides promoting aflatoxin production. Methyl jasmonate (MeJA) is a plant growth regulator as well as the plants response to environmental stress and to wounding by insect and pathogen attack. It derives from α -linolenic acid, which is oxygenised by a LOX-enzyme to 13S-hydroperoxylinolenic acid. Fungal attack by certain *Aspergillus* species is likely to induce the synthesis of this secondary metabolite.

This study reports of the effect of MeJA added at different concentrations on the growth of *A.parasiticus* and AFB₁ in two rather different media, namely a nutrient medium of well defined composition (YES) as well as an edible plant of Greek origin, caper.

MeJA was added to the YES cultures of *A.parasiticus* at the following concentrations: 1) 0,0022 mg MeJA/10mL YES (10^{-6} M), 2) 0,227 mg MeJA/10mL YES (10^{-4} M), 3) 1,134 mg MeJA/10mL YES (0,0005M), 4) 2,267 mg MeJA/10mL YES (10^{-3} M), 5) 4,534 mg MeJA/10mL YES (0,002M), 6) 9,067 mg MeJA/10mL YES (0,004M), 7) 18,134 mg MeJA/10mL YES (0,008M), 8) 22,667 mg MeJA/10mL YES (10^{-2} M), 9) 36,267 mg MeJA/10mL YES (0,016M) and 10) 226,67 mg MeJA/10mL YES (10^{-1} M).

At the same time, the biosynthesis of AFB₁ in YES medium during an incubation time of 25 days was studied.

AFB₁ is determined from methanol extracted mycelia, followed by immunoaffinity clean-up and finally HPLC method after derivatization to AFB_{2a}. The recovery percentage of the method is 99% and the detection limit 0,02 ng mL⁻¹ YES.

Following the process of the AFB₁ biosynthesis in YES medium, resulted in the 18th day of incubation being the day of maximum AFB₁ production.

According to the results of the MeJA addition to the YES cultures, mycelial growth as well as AFB₁ output depend on the MeJA concentration in the sample. In detail, adding MeJA in a quantity of 0,0022 mg MeJA/10mL YES (10⁻⁶M), stimulated fungal growth and AFB₁ production concomitantly in a statistically significant way (p=0.05) at the 12th day of incubation. MeJA at a concentration of 10⁻⁴M in the YES cultures had no apparent effect on the mycelial growth but did increase AFB₁ output significantly (p=0.05) at the 12th day of incubation. Furthermore, MeJA added to the YES medium in quantities of 1,134 mg MeJA/10mL YES (0,0005M), 2,267 mg MeJA/10mL YES (10⁻³M) and 4,534 mg MeJA/10mL YES (0,002M) decreased significantly (p=0.05) fungal growth during the entire incubation time while the AFB₁ biosynthesis rate was decreased after the 15th day of observation in a statistically significant way (p=0.05). YES cultures with a MeJA concentration of 0,004M, 0,008M, 10⁻²M, 0,016M και 10⁻¹M per flask exhibited an inhibitory effect of both *A.parasiticus* growth and AFB₁ production during the entire incubation time in a statistically significant way (p=0.05).

According to the above data, the minimum quantity of MeJA required for the complete inhibition of the AFB₁ biosynthesis in YES medium containing 10² *A.parasiticus* conidia lies at 9,067 mg/10 mL YES.

In order to study the AFB₁ biosynthesis along with the effect of different concentrations of MeJA on the *A.parasiticus* fungal growth as well as the AFB₁ production in caper, a method for determining AFB₁ in caper was developed. The detection limit of the method is 0,06 ng g⁻¹, the quantification limit is 0,12 ng g⁻¹ while the recovery percentage lies at 79%. According to the data, the determination method shows accuracy, reliability and sensitivity.

The AFB₁ biosynthesis during an incubation time of 25 days was thereupon studied, similarly to the YES samples. At the same time, MeJA at 5 different concentrations in the caper samples was studied in terms of its effect on the AFB₁ biosynthetic course for an incubation time of 15 days. The following MeJA quantities were added to the samples: 1) 0,0022 mg MeJA/15g caper (10⁻⁶M), 2) 0,227 mg MeJA/15g caper (10⁻⁴M), 3) 2,267 mg MeJA/15g caper (10⁻³M), 22,667 mg MeJA/15g caper (10⁻²M) and 4) 226,67 mg MeJA/15g caper (10⁻¹M).

The highest level of AFB₁ output occurred at the 12th day of incubation followed, in contrast to YES cultures, by a decreased rate of the biosynthesis.

According to the results obtained from the AFB₁ determination in the MeJA containing caper samples, fungal processes of *A.parasiticus* are greatly affected by MeJA in a dose-dependent manner in this case as well. MeJA at a concentration of 10⁻⁶M in

caper significantly ($p=0.05$) stimulated AFB₁ production after the 9th day of incubation. MeJA at concentrations of 10^{-4} M and 10^{-3} M in caper significantly ($p=0.05$) decreased AFB₁ output during the entire incubation time. The calculated ic₅₀ for MeJA was 0,433 mg g⁻¹. Finally, MeJA added to the caper samples at the highest concentration - 22,667 mg MeJA/15g caper (10^{-2} M) and 226,67 mg MeJA/15g caper (10^{-1} M) - inhibited AFB₁ in a statistically significant way ($p=0.05$) during the entire incubation time. AFB₁ was inhibited by 97,74% and 98,42% on the 12th of observation by MeJA at concentrations 10^{-2} M and 10^{-1} M respectively.

Following the results of this study, it is evident that both *A.parasiticus* fungal growth as well as AFB₁ biosynthesis depend on the concentration of MeJA. Moreover, MeJA at low concentrations (10^{-6} M) induced a stimulation of the AFB₁ production.

The fact that high concentrations of the plant regulator significantly inhibited the mycotoxin output regardless of the used medium or substrate is of great importance and offers an interesting perspective in the field of the prevention of aflatoxin contamination of stored crops and foodstuffs.

The mode of action of MeJA is still unclear. In order to answer some of the questions, which arose from its effects on the aflatoxigenic fungus *A.parasiticus*, an approach at a genetic level was attempted, which is in progress.

KEYWORDS: *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxin B₁, Methyl jasmonate, YES, caper, HPLC.

Στην οικογένειά μου

και

στο Μιλτιάδη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο 2007-2012.

Υπεύθυνη για την επίβλεψή της ήταν η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Π. Μαρκάκη, την οποία ευχαριστώ θερμότατα για την ευκαιρία που μου έδωσε, την καθοδήγηση, τη συνεχή υποστήριξη και τις συμβουλές που μου έδωσε και περισσότερο από όλα για την απεριόριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής και συγγραφικής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ν. Γαλανοπούλου για τον ενθουσιασμό της, την πολύτιμη συμβολή της στο βιοχημικό τμήμα της διατριβής και τις πολύ ενδιαφέρουσες συζητήσεις που είχαμε μαζί, καθώς επίσης και την Καθηγήτρια κ. Σ. Μαστρονικολή για την εμπύχωση και τις χρήσιμες υποδείξεις της.

Εκφράζω επίσης θερμές ευχαριστίες στη Λέκτορα κ. Φ. Φλουρή (Γ.Π.Α.) για τη συνδρομή της σε θέματα Μικροβιολογίας και την εποικοδομητική κριτική της.

Ευχαριστώ πολύ όλο το προσωπικό και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων και Βιοχημείας για το πολύ καλό κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Δ.Δ. και ιδιαιτέρως το Μεταπτυχιακό φοιτητή Γιάννη Σιώκο για την ανεκτίμητη βοήθειά του στο βιοχημικό τμήμα της διατριβής μου.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα όλη την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, κατανόηση και υποστήριξή της στην προσπάθειά μου όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς τη στήριξή της, ηθική και πρακτική, δε θα ήταν δυνατόν να ολοκληρώσω αυτήν τη διδακτορική διατριβή.

Διδώ Μαρία Μεϊμάρογλου

Αθήνα, 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΜΥΚΗΤΕΣ	2
1.1 Γενικά στοιχεία	2
1.1.1 Εισαγωγή	2
1.1.2 Περιγραφή των μυκήτων	3
1.1.3 Ιδιότητες των μυκήτων	3
1.2 Γένος <i>Aspergillus</i>	4
1.2.1 Εισαγωγή	4
1.2.2 Ταξινόμηση	5
1.2.3 Περιγραφή	5
1.2.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	6
1.2.5 <i>Aspergillus</i> και τρόφιμα	8
1.2.6 Δράση των μυκήτων του γένους <i>Aspergillus</i>	9
1.2.7 Η ομάδα „ <i>Aspergillus flavus</i> “	10
1.3 Είδος <i>Aspergillus parasiticus</i>	11
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	11
1.3.2 Συνθήκες ανάπτυξης	11
1.3.3 Συχνότητα εμφάνισης, χρησιμότητα και παθογένεια	12
1.4. Είδος <i>Aspergillus flavus</i>	13
1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά	13
1.4.2 Συνθήκες ανάπτυξης και οικολογία	14
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	15
2.1 Ιστορική αναδρομή	15
2.2 Οι μυκοτοξίνες σήμερα: ερευνητικά συμπεράσματα	16
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ	19
3.1 Εισαγωγή	19
3.2 Βιοσύνθεση Αφλατοξινών	22
3.2.1 Πρωτογενής και δευτερογενής μεταβολισμός	22
3.2.2 Η πορεία των πολυκετιδίων	23
3.2.3 Ο μηχανισμός της βιοσυνθετικής πορείας των Αφλατοξινών	24
3.2.4 Ένζυμα της βιοσυνθετικής πορείας των Αφλατοξινών	29
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών	30
3.3.1 Βιολογικοί παράγοντες	30
3.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	30
3.3.3 Χημικοί παράγοντες	31

3.3.4	Σύσταση υποστρώματος	32
3.3.5	Φυσικά προϊόντα και εκχυλίσματα φυτών	33
3.4	Παράγοντες που επιδρούν στην αποικοδόμηση των Αφλατοξινών	34
3.4.1	Εισαγωγή	34
3.4.2	Φυσική αποικοδόμηση	34
3.4.3	Χημική αποικοδόμηση	35
3.4.4	Βιολογική αποικοδόμηση	36
3.5	Τοξική δράση των Αφλατοξινών	37
3.6	Μέτρα περιορισμού των Αφλατοξινών στα τρόφιμα	40
3.7	Νομοθεσία και όρια επικινδυνότητας	41
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΙΑΣΜΟΝΙΚΑ ΟΞΕΑ	43
4.1	Εισαγωγή	43
4.2	Βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος	45
4.3	Λιποξυγένεση	47
4.4	Η δράση και ο ρόλος των ιασμονικών	48
4.5	Μηχανισμός σηματοδότησης μέσω ιασμονικών	52
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΚΑΠΠΑΡΗ	53
5.1	Ιστορικά στοιχεία – Προέλευση	53
5.2	Βοτανική ταξινόμηση της κάππαρης	53
5.3	Χημική σύσταση της κάππαρης	54
5.4	Επεξεργασία και εμπορική χρήση της κάππαρης	59
5.5	Φαρμακευτική χρήση της κάππαρης	60
	ΣΚΟΠΟΣ	61
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	62
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
6.1	Μέτρα προστασίας και παρατηρήσεις κατά την πειραματική πορεία	63
6.2	Στάδια πειραματικής πορείας	63
6.3	Παρασκευή θρεπτικών υλικών	64
6.3.1	Γενικά	64
6.3.2	Κρίσιμα στάδια στην παρασκευή των θρεπτικών υλικών και στον εμβολιασμό των μυκήτων	66
6.3.3	Σύσταση θρεπτικών υλικών	66
6.3.4	Διαδικασία παρασκευής θρεπτικών υλικών	67
6.4	Ενεργοποίηση – Διατήρηση του στελέχους <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare IMI 283883	68
6.4.1	Εισαγωγή – Τεχνικές συντήρησης μυκήτων	68
6.4.2	Προβλήματα συντήρησης μυκήτων – μολύνσεις	69
6.4.3	Προσδιορισμός ανάπτυξης μυκήτων	69
6.4.3.1	Μικροβιολογικές μέθοδοι – μέτρηση μυκηλιακής μάζας	69

6.4.4	Ιστορικό του μύκητα	70
6.4.5	Ενεργοποίηση του μύκητα	70
6.4.6	Διατήρηση του μύκητα	71
6.5	Αναγνώριση – Μελέτη του Στελέχους <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare IMI 283883	72
6.6	Προσδιορισμός Αφλατοξίνης B ₁	73
6.6.1	Αρχή της μεθόδου προσδιορισμού της Αφλατοξίνης B ₁	73
6.6.2	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων Αφλατοξίνης B ₁	73
6.6.3	Παραγωγοποίηση προτύπου διαλύματος ΑΦΒ ₁ προς ΑΦΒ _{2α}	75
6.6.4	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ΑΦΒ _{2α}	75
6.6.5	Προσδιορισμός της ΑΦΒ _{2α} με HPLC	76
6.6	Παρασκευή εναιωρήματος κονιδίων του μύκητα <i>Aspergillus parasiticus</i>	78
6.7	Προετοιμασία των τρυβλίων AFPA για τη μακροσκοπική παρατήρηση της επίδρασης του MeJA στη μυκηλιακή ανάπτυξη του <i>A. parasiticus</i>	80
6.8	Παρασκευή διαλυμάτων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA)	81
6.9	Εμβολιασμός των τρυβλίων θρεπτικού υλικού AFPA	82
6.10	Εμβολιασμός δειγμάτων θρεπτικού υλικού YES	82
6.11	Προσδιορισμός της μυκηλιακής μάζας του <i>A. parasiticus</i>	83
6.12	Παραλαβή της Αφλατοξίνης B ₁	85
6.13	Παραγωγοποίηση της Αφλατοξίνης B ₁	86
6.14	Ποσοτικός προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B ₁ με HPLC	86
6.15	Προετοιμασία πειράματος ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού της Αφλατοξίνης B ₁ στην κάππαρη	86
6.16	Επεξεργασία κάππαρης	87
6.17	Εμβολιασμός δειγμάτων κάππαρης	87
6.18	Προσδιορισμός της μυκηλιακής μάζας του <i>A. parasiticus</i>	88
6.19	Παραλαβή της Αφλατοξίνης B ₁	88
6.20	Παραγωγοποίηση της Αφλατοξίνης B ₁	89
6.21	Ποσοτικός προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B ₁ με HPLC	89
6.22	Μελέτη της επίδρασης του MeJA στα γονίδια <i>aflC</i> και <i>aflR</i> του μύκητα	89
6.22.1	Απομόνωση ολικού RNA από το μυκήλιο του <i>A. parasiticus</i>	89
6.22.1.1	Εμβολιασμός δειγμάτων θρεπτικού υλικού YES για την παραλαβή μυκηλίου του <i>A. parasiticus</i>	90
6.22.1.2	Παραλαβή μυκηλίου του <i>A. parasiticus</i>	90
6.22.1.3	Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας του ολικού RNA	91
6.22.1.4	Απομάκρυνση ιχνών γενωμικού DNA από το ολικό RNA	92
6.22.1.5	Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	93
6.22.2	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	94
6.22.3	Σχεδιασμός εκκινήτων	96

6.22.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – πολλαπλασιασμός των γονιδίων <i>aflC</i> , <i>aflR</i> και <i>β-tubulin</i>	96
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	99
7.1	Σχεδιασμός πειράματος σε καλλιέργειες AFPA	99
7.2	Σχεδιασμός πειράματος σε καλλιέργειες YES	100
7.3	Προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B ₁ που βιοσυντίθεται από το μύκητα <i>A. parasiticus</i> στην κάππαρη	100
7.3.1	Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού Αφλατοξίνης B ₁ στην κάππαρη	101
7.3.2	Σχεδιασμός πειράματος σε κάππαρη	101
7.4	Σχεδιασμός πειράματος για την παραλαβή μυκηλίου του <i>A. parasiticus</i>	101
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	102
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 – ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ MeJA ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>A. PARASITICUS</i> ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B₁ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ YES	103
8.1	Γενικά	103
8.2	Μελέτη της ανάπτυξης των αποικιών του <i>A. parasiticus</i> στο AFPA σε δείγματα control και με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA	106
8.3	Σχεδιασμός της καμπύλης αναφοράς	110
8.4	Υπολογισμός της ποσότητας Αφλατοξίνης B ₁ που παράγεται από το μύκητα <i>A. parasiticus</i> σε θρεπτικό υλικό YES	111
8.5	Γενικά	112
8.6	Μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα <i>A. parasiticus</i> και της βιοσύνθεσης της Αφλατοξίνης B ₁ σε δείγματα YES control	112
8.7	Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών ποσοτήτων MeJA στην ανάπτυξη του μύκητα <i>A. parasiticus</i> και στη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης B ₁ σε θρεπτικό υλικό YES	115
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	134
9.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 – ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B₁ ΣΤΗΝ ΚΑΠΠΑΡΗ	137
9.1	Χαρακτηριστικά ποιότητας μεθόδου	137
9.1.1	Καμπύλες αναφοράς	137
9.1.2	Ακρίβεια μεθόδου	140
9.1.3	Αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου – Συζήτηση	143
9.1.4	FISHER TEST	144
9.1.5	Επαναληψιμότητα	145
9.1.6	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	145
9.1.7	Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης	146
9.2	Αξιολόγηση της μεθόδου – Συζήτηση	147
10.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 – ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ MeJA ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ	

A.PARASITICUS ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B₁ ΣΤΗΝ ΚΑΠΠΑΡΗ	148
10.1 Γενικά	148
10.2 Μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα <i>A. parasiticus</i> και της βιοσύνθεσης της Αφλατοξίνης B ₁ σε δείγματα control	148
10.3 Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών ποσοτήτων MeJA στην ανάπτυξη του μύκητα <i>A. parasiticus</i> και στη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης B ₁ σε κάππαρη	151
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	163
11. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 – ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ MeJA ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B₁ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ <i>A.PARASITICUS</i>	170
11.1 Γενικά	170
11.2 Επιλογή των δύο γονιδίων	170
11.2.1 Γονίδιο <i>aflC</i>	170
11.2.2 Γονίδιο <i>aflR</i>	171
11.3 Σχεδιασμός εκκινήτων	171
11.4 Απομόνωση και καθαρισμός RNA από τον <i>A.parasiticus</i>	172
11.5 Φωτομέτρηση και προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	173
11.6 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής	174
11.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	174
11.8 Συζήτηση	176
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	178
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	180
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΥΚΗΤΕΣ

1.1 Γενικά στοιχεία

1.1.1 Εισαγωγή

Η θεμελίωση της κυτταρικής θεωρίας το 1840 από τους M.J. Schleiden και T. Schwann σηματοδότησε την έναρξη διατύπωσης νέων απόψεων σχετικά με την ταξινόμηση των μικροοργανισμών. Μέχρι τότε οι μύκητες κατατάσσονταν στα φυτά και ειδικότερα στα κρυπτογαμικά θαλλόφυτα. Το 1866 ο βιολόγος Ernst Haeckel, με σκοπό να αποφευχθούν αυθαίρετες ταξινομήσεις των μικροοργανισμών (στο φυτικό ή ζωικό βασίλειο) που διαρκώς ανακάλυπταν οι διάφοροι ερευνητές, πρότεινε την ταξινόμηση όλων των μικροοργανισμών σε ξεχωριστό βασίλειο, αυτό των πρωτίστων, το οποίο περιελάμβανε φύκη, πρωτόζωα, βακτήρια και μύκητες. Από τότε, οι μύκητες αναγνωρίστηκαν ως ξεχωριστό άθροισμα μεταξύ των πέντε βασιλείων των έμβιων όντων, σύμφωνα με το σύστημα των Whittaker και Margulis.^[1,2,3]

Η ονομασία μύκητας προέρχεται ετυμολογικά από την αρχαία ελληνική λέξη «μύκης» που σημαίνει στρογγυλό αντικείμενο. Οι μύκητες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής εξαιτίας της ικανότητάς τους να δρουν ως αποικοδομητές της οργανικής ύλης. Συγκεκριμένα, ως ετερότροφοι οργανισμοί, μετατρέπουν την οργανική ύλη (πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες κ.α.) σε ενέργεια και ανόργανες ενώσεις. Η μετατροπή αυτή της οργανικής ύλης πραγματοποιείται μέσω των επανομαζόμενων υφών, που θα περιγραφούν στη συνέχεια, οι οποίες εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα που με τη σειρά τους διασπούν την οργανική ύλη σε απλά μόρια που απορροφά ο μύκητας. Η έκκριση πρωτεϊνών – και πιο συγκεκριμένα ενζύμων, τα οποία στην πλειοψηφία τους είναι υδρολυτικά – διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στους νηματοειδείς μύκητες, ιδιαίτερα σε ό,τι αφορά τη διατροφή τους.^[4] Η αλλοίωση των τροφίμων από τους μικροοργανισμούς είναι στην πραγματικότητα η προσπάθεια της μικροχλωρίδας του τροφίμου να διεξάγει τέτοιου είδους αντιδράσεις. Πολλά είδη μυκήτων είναι υπεύθυνα για την παρασκευή πολλών βιομηχανικών προϊόντων, όπως το κιτρικό οξύ, οι βιταμίνες καθώς και διάφορα ένζυμα, αντιβιοτικά, βελτιωτικά και πρόσθετα τροφίμων. Επιπλέον, σε αυτούς οφείλεται η ωρίμανση ορισμένων τροφίμων αλλά και η βελτίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους, όπως για παράδειγμα διάφοροι τύποι τυριών (ροκφόρ), η σάλτσα σόγιας, το παραδοσιακό ιαπωνικό ποτό σάκε και άλλα. Ωστόσο, πολλές φορές οι μύκητες είναι υπεύθυνοι για την υποβάθμιση και σήψη τροφίμων και ζωοτροφών. Υπάρχουν επίσης πολλές ασθένειες φυτών που αποδίδονται σε μύκητες, ενώ μόνο ένας μικρός αριθμός αυτών είναι παθογόνοι για ζώα και ανθρώπους.

1.1.2 Περιγραφή των μυκήτων ^[5,6,7,8]

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί, παρασιτικοί ή σαπροφυτικοί μικροοργανισμοί. Στερούνται χλωροφύλλης (και επομένως φωτοσυνθετικής ικανότητας, οπότε πρόκειται για ετερότροφους οργανισμούς) και ορισμένες φορές συμβιώνουν με άλλους οργανισμούς.

Οι περισσότεροι μύκητες είναι κοινοκυτταρικοί οργανισμοί και διακρίνονται από μία χαρακτηριστική βλαστική μορφή που είναι γνωστή ως μυκήλιο. Το μυκήλιο αποτελείται από μία πολυπυρηνική μάζα κυτταροπλάσματος που περιέχεται σε ένα σύστημα διακλαδιζόμενων σωλήνων, οι οποίοι έχουν αρκετά σταθερή διάμετρο. Οι σωλήνες αυτοί αποτελούν μια προστατευτική κατασκευή που είναι ανάλογη προς το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων και αποτελείται από χιτίνη ή κυτταρίνη. Το μυκήλιο προκύπτει από τη βλάστηση και την ανάπτυξη ενός αναπαραγωγικού κυτάρου ή σπορίου. Το σπόριο των μυκήτων που ονομάζεται και κονίδιο, με τη βλάστησή του μετατρέπεται σε ένα νήμα κοίλο εσωτερικά που ονομάζεται υφή (hypha). Στο εσωτερικό αυτό κοίλο μέρος περιέχονται το πρωτόπλασμα, οι πυρήνες και τα άλλα υποκυτταρικά οργανίδια. Κάθε νέα υφή επιμηκύνεται από το άκρο της και διακλαδίζεται, ενώ ύστερα από διαδοχικές διακλαδώσεις μετατρέπεται σε μυκήλιο. Οι υφές μπορεί να είναι συνεχείς ή να χωρίζονται από εγκάρσια διαχωριστικά διαφράγματα (septa), τα οποία όμως επιτρέπουν την επικοινωνία ανάμεσα στις υφές, οι οποίες στην περίπτωση αυτή χαρακτηρίζονται ως πολυκύτταρες. Το μέγεθος του μυκηλίου δεν είναι σταθερό και με την προϋπόθεση αφθονίας θρεπτικών συστατικών, η διάμετρός του μπορεί να φτάσει σε ορισμένες περιπτώσεις αρκετά μέτρα.

Οι μύκητες πολλαπλασιάζονται είτε αγενώς με διάφορους τρόπους (κυτταρική διαίρεση, με κονίδια ή με πυκνιδιοσπόρια, τα οποία ελευθερώνονται από τις κορυφές των υφών) είτε εγγενώς (με ζυγοσπόρια, ασκοσπόρια, ωοσπόρια ή βασιδιοσπόρια).

Οι μύκητες περιλαμβάνουν 4 κύριες ομάδες: Μυξομύκητες, Φυκομύκητες, Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες και μία ακόμη ομάδα, τους Ατελείς μύκητες. Η ταξινόμηση αυτή δεν είναι οριστική.

1.1.3 Ιδιότητες των μυκήτων ^[1]

Ορισμένες σημαντικές ιδιότητες των μυκήτων που συνδέονται άμεσα με την Μικροβιολογία των Τροφίμων αναφέρονται παρακάτω:

- Ως χημειότροφοι οργανισμοί έχουν εκπροσώπους που κατατάσσονται στα ισχυρά παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα.
- Οι σαπροφυτικοί μύκητες παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη φύση και στον τομέα της ανοργανοποίησης της νεκρής οργανικής ύλης διότι εκκρίνουν μία εντυπωσιακή ποικιλία ενζύμων.

- Οι μύκητες, όταν αναπτύσσονται στα τρόφιμα προκαλώντας την αλλοίωση τους, σχηματίζουν ορατό μακροσκοπικά μυκήλιο, σε αντίθεση με τους άλλους μικροοργανισμούς που παραμένουν αόρατοι όταν αναπτύσσονται σε αυτά.
- Πολλοί μύκητες χρησιμοποιούνται στη Χημεία Τροφίμων για ωφελιμιστικούς σκοπούς, όπως την παραγωγή ενζύμων, αντιβιοτικών, βελτιωτικών και πρόσθετων τροφίμων.
- Οι μύκητες που αναπτύσσονται στα τρόφιμα θεωρούνταν μέχρι πριν λίγα χρόνια ακίνδunami και αδύναμοι να προκαλέσουν τοξινώσεις. Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι οι περισσότεροι μύκητες βιοσυνθέτουν μυκοτοξίνες (π.χ. αφλατοξίνες και ωχρατοξίνες).

1.2 Γένος *Aspergillus*

1.2.1 Εισαγωγή ^[9,10,11]

Το γένος *Aspergillus* ανήκει στους Hyphomycetes και έχει φτάσει να περιλαμβάνει περίπου 250 αναγνωρισμένα είδη μέχρι σήμερα. Ξεκίνησε το 1965 σαν μία συλλογή 150 διαφορετικών τάξεων, το 2000 προστέθηκαν 68 επιπλέον, ενώ ακολούθησε η δημοσίευση ακόμη 40 νέων ειδών^[12]. Μέλη του γένους απαντούν σε μία ευρεία ποικιλία προϊόντων του περιβάλλοντος. Είναι περισσότερο γνωστά ως σαπρόφυτα στο έδαφος και σε αποθηκευτικούς χώρους τροφίμων, ενώ προκαλούν αποσύνθεση σε φυτά σε τροπικές και ημιτροπικές περιοχές. Εκτός όμως από τη σαπροφυτική τους δράση, ορισμένα είδη είναι παράσιτα σε έντομα, φυτά και ζώα καθώς επίσης και στον ίδιο τον άνθρωπο. Τέλος, υπάρχουν και ορισμένα είδη με ιδιαίτερη οικονομική σημασία καθώς χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες ζυμώσιμων τροφίμων από το 1940, ως πηγή ενζύμων και άλλων χημικών προϊόντων, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή του κεφαλαίου. Πρέπει ακόμη να σημειωθεί ότι οι μύκητες του γένους αυτού παράγουν ισχυρές μυκοτοξίνες, ενώ άλλοι προκαλούν βιοαποσυνθέσεις.

Από τη στιγμή που ο *Aspergillus* αναγνωρίστηκε με τη βοήθεια του μικροσκοπίου ακολούθησαν χιλιάδες μελέτες. Ο ιταλός βοτανολόγος Pier Antonio Michelli ήταν εκείνος που ανακάλυψε πρώτος το 1729 το γένος αυτό. Η μικροσκοπική εικόνα του μύκητα τον παρέπεμψε στο aspergill, ένα εκκλησιαστικό σκεύος που χρησιμοποιείται για το ράντισμα (ραντίζω = aspergere (lat.)) του αγιασμού στη λειτουργία, το οποίο έδωσε στο μύκητα την ονομασία του, *Aspergillus*.^[13] Η πιο σημαντική εργασία για τον *Aspergillus* γράφτηκε το 1965 από τους K.B. Raper και D. Fennell,^[14] οι οποίοι δημιούργησαν τον πιο εύχρηστο οδηγό για την ταξινόμηση των ειδών του γένους. Οι δύο ερευνητές χρησιμοποιούν το όνομα αυτό τόσο για να περιγράψουν τελειομύκητες (teleomorphic) όσο και ατελείς μύκητες (anamorphic) και έρχονται σε αντίθεση με τις οδηγίες του ICBN (International Code of Botanical Nomenclature).

Σήμερα, καλλιέργειες του μύκητα χρησιμοποιούνται στην έρευνα για τη μελέτη διαφόρων μεταβολικών πορειών σε μικροοργανισμούς, ενώ συνεχώς ανακαλύπτονται και ταξινομούνται στο γένος αυτό νέα είδη και επίσης προτείνονται νέοι τρόποι ταυτοποίησης και ταξινόμησής του.^[12,15]

1.2.2 Ταξινόμηση

Οι απόψεις σχετικά με την ταξινόμηση του γένους *Aspergillus* ποικίλλουν. Σύμφωνα με μία πηγή προτείνεται η εξής ταξινόμηση:^[16]

- Διαίρεση: Δευτερομύκητες (Deuteromycota)
- Κλάση (class): Hyphomycetes
- Τάξη (order): Hyphomycetales
- Οικογένεια (family): Moniliaceae
- Γένος (gene): *Aspergillus*

Ενώ σύμφωνα με την ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Michelli^[14], τα στοιχεία έχουν ως εξής:

- Διαίρεση: Ασκομύκητες (Ascomycota)
- Κλάση (class): Eurotiomycetes
- Τάξη (order): Eurotiales
- Οικογένεια (family): Trichocomaceae
- Γένος (gene): *Aspergillus*

1.2.3 Περιγραφή

Οι ατελείς μύκητες του *Aspergillus* (anamorphic) παράγουν αγενή σπόρια (αλυσίδες κονιδίων), ενώ οι τελειομύκητες (teleomorphic) αναπαράγονται και εγγενώς. Οι τελειομύκητες αποτελούνται από κλειστοθήκια, τα οποία είναι ασκοί που όταν φθάσουν στο στάδιο της ωριμότητας σπάζουν και ελευθερώνονται τα περιεχόμενα σε αυτούς σπόρια (ασκοσπόρια). Η φύση του τοιχώματος του ασκοκάρπιου και το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα και η επιφάνεια των ασκοσπóriων είναι σημαντικά για την αναγνώριση των τελειόμορφων ειδών, στα οποία ανήκουν τα *Emericella* και *Eurotium*.^[17]

Η μορφή μιας αποικίας του μύκητα *Aspergillus* είναι συνάρτηση της σύστασης του υποστρώματος, της θερμοκρασίας, του φωτισμού και της ηλικίας της καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό πρέπει, για την ανάπτυξη της αποικίας, οι συνθήκες να διευκρινίζονται πλήρως. Τα χαρακτηριστικά μιας αποικίας που έχουν σημασία στην περιγραφή των ειδών του γένους *Aspergillus* είναι τα εξής:

1. Το χρώμα των υπέργειων τμημάτων της αποικίας που περιλαμβάνουν τη βλαστική μορφή του μυκηλίου, τις κεφαλές των κονιδίων και, στην περίπτωση που υπάρχουν, τα σκληρώτια.

2. Ο χρωματισμός του υποστρώματος γύρω από το μυκήλιο, ο οποίος εξαρτάται από τη σύνθεση του υποστρώματος και τις συνθήκες επώασης.
3. Η ταχύτητα ανάπτυξης μιας αποικίας που για συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό και συνθήκες διαφέρει από είδος σε είδος.
4. Η υφή του βασικού μυκηλίου (πυκνό ή αραιό) και η υφή της επιφάνειάς του.
5. Η εναλλακτική παραγωγή κονιδιοκεφαλών και σκληρωτίων ή κλειστοθηκίων. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται σε περιοδική έλλειψη θρεπτικών συστατικών, στην περιοδική παραγωγή ή βαθμιαία συγκέντρωση ορισμένων μεταβολιτών ή στις συνθήκες φωτισμού.
6. Η οσμή.

1.2.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά ^[8,18]

1. Κύτταρο βάση ή κύτταρο ποδός (foot cell)

Κύτταρα με ενισχυμένα κυτταρικά τοιχώματα. Από κάθε τέτοιο κύτταρο προκύπτει μία κατακόρυφη κονidioφόρος.

2. Κονidioφόρος ή στόλωνας ή στέλεχος (stalk)

Μη διακλαδισμένες υφές με κονιδιοκεφαλές. Η κονidioφόρος, σε σπάνιες περιπτώσεις, φέρνει εγκάρσια τοιχώματα.

3. Κυστίδιο (vesicle)

Μία σφαιροειδής ή ελλειπτική δομή στην απόληξη κάθε κονidioφόρου. Αναπτύσσει στην επιφάνειά του κύτταρα που φέρουν σπόρια.

4. Στηρίγματα (metulae)

Ένα στρώμα κυτάρων που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των κυστιδίων και παράγουν κονίδια. Το σχήμα και το μέγεθος των στηριγμάτων είναι χαρακτηριστικό του γένους *Aspergillus*. Τα στηρίγματα είναι κυλινδρικά και αφού φθάσουν σε ορισμένο μήκος στενεύουν στην άκρη σε ένα σωλήνα που παράγει κονίδια. Τα στηρίγματα δεν υπάρχουν σε όλα τα είδη του *Aspergillus*.

5. Κονίδια (conidia)

Τα σπόρια του μύκητα, με τα οποία πολλαπλασιάζεται αγενώς. Ο πυρήνας του στηρίγματος διαιρείται και ένας από τους θυγατρικούς πυρήνες περνά στον ακραίο σωλήνα και διαχωρίζεται από το στηρίγμα. Αν αυτό επαναληφθεί πολλές φορές παράγονται συνεχώς νέα κονίδια και τα παλαιότερα προωθούνται προς τα επάνω με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία αλυσίδας αποτελούμενης από αριθμό κονιδίων μικρότερο ή ίσο του 100 αποκομμένων από την άκρη του ίδιου στηρίγματος. Τα κονίδια κατά μέσον όρο είναι μονοπυρηνικά και όταν ωριμάσουν διαχωρίζονται τελείως από το μητρικό κύτταρο με δευτερεύον κυτταρικό τοίχωμα που τους προσδίδει χαρακτηριστικό χρώμα και υφή.

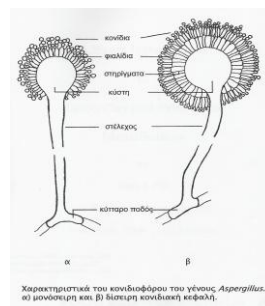
6. Σκληρώτια (sclerotia)

Πρόκειται για σώματα σφαιροειδή, πολυκύτταρα, σκληρής σύστασης που σχηματίζονται από πλεκτεγγηματικές – μεγάλοι σχηματισμοί υφών παραγόμενοι από νηματοειδείς μύκητες – διαφοροποιήσεις υφών, τα οποία βρίσκονται συνήθως σε κατάσταση λήθαργου. Χρησιμεύουν ως αποθησαυριστικά και ληθαργικά όργανα, καθώς περιέχουν γλυκογόνο και αποταμειωτικές ουσίες και επιτρέπουν στο μύκητα να επιβιώνει υπό δυσμενείς συνθήκες - ξηρασία, ψύχος ή ακόμη και σχετικά υψηλές θερμοκρασίες -. Σε ευνοϊκές συνθήκες βλαστάνουν και σχηματίζουν νέο μυκήλιο. Το χρώμα τους ποικίλλει από κίτρινο έως καφέ ή μαύρο.

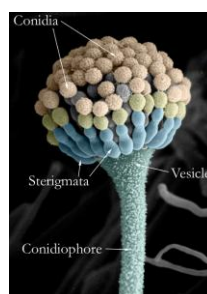
7. Κλειστοθήκια (cleistothecia)

Σφαιρικά κλειστά ασκοκάρπια που όταν ωριμάζουν ανοίγουν δια ρήξεως και ελευθερώνονται τα ασκοσπόρια.

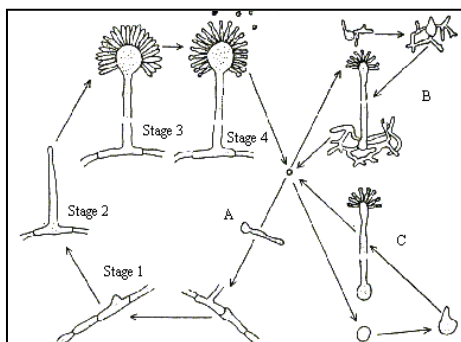
Τα μορφολογικά αυτά χαρακτηριστικά απεικονίζονται στα ακόλουθα σχήματα.



Σχήμα 1.1: Χαρακτηριστικά του κονιδιοφόρου του γένους *Aspergillus*. α) Μονόσειρη και β) δίσειρη κονιδιακή κεφαλή.



Σχήμα 1.2: Κονιδιοφόρος με μία σειρά στηριγμάτων



Σχήμα 1.3: Φάσεις ανάπτυξης του μύκητα

1.2.5 *Aspergillus* και τρόφιμα ^[19,20]

Στο γένος *Aspergillus* ανήκουν 18 είδη που αφορούν τη βιομηχανία τροφίμων. Οι μύκητες αυτοί είναι από τα πλέον διαδεδομένα γένη μυκήτων στη φύση. Δεν είναι τυχαίο ότι οι περισσότεροι μύκητες που αναπτύσσονται στους αποθηκευτικούς χώρους είναι του γένους *Aspergillus* και *Penicillium*, αφού αυτοί έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται άριστα σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες ακόμα και σε χαμηλές υγρασίες. ^[21]

Η εμφάνιση των μυκήτων του γένους *Aspergillus* στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων, ο καθένας εκ των οποίων επιδρά με το δικό του τρόπο στη μυκηλιακή ανάπτυξή του. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για την ενεργότητα νερού (a_w) ή τη σχετική υγρασία ισορροπίας (ERH), τη θερμοκρασία συγκομιδής, κυρίως όμως τη θερμοκρασία αποθήκευσης, παραγωγής και κατανάλωσης, το pH, την περιεκτικότητα του αέρα σε CO_2 και O_2 , τη φύση του τροφίμου (υγρή ή στερεή), τα θρεπτικά του συστατικά και τέλος, την ύπαρξη μικροβιακών ανταγωνιστών αλλά και συγκεκριμένων ουσιών, όπως π.χ. αλάτι, ζάχαρη, συντηρητικά.

Ο μύκητας *Aspergillus* χρειάζεται $a_w \sim 0,75$ και pH όξινο, σε υψηλότερες τιμές δεν ανταγωνίζεται τα βακτήρια με εξαίρεση μόνο χαμηλότερες ενεργότητες νερού. Τα κονίδια είναι ευαίσθητα στη θερμότητα, θανατώνονται σε λίγα δευτερόλεπτα ή λεπτά στους $70^\circ C$, ενώ αντίθετα τα ασκοσπόρια έχουν μεγαλύτερη θερμική αντίσταση αφού ορισμένα από αυτά αντέχουν στους $90^\circ C$ κατά τη θερμική επεξεργασία για λίγα λεπτά και αυτό προκαλεί προβλήματα στους χυμούς και στα παστεριωμένα τρόφιμα. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα είδη μυκήτων του γένους *Aspergillus* που εμφανίζονται σε ορισμένα είδη τροφίμων.

Εξαιτίας της ιδιότητάς τους να αναπτύσσονται στο έδαφος και σε χαμηλές ενεργότητες νερού (ξηρόφιλοι μύκητες), αποτελούν συχνό παράγοντα μόλυνσης των σιτηρών. Στην προαναφερθείσα ιδιότητά τους ($a_w : 0,7-0,8$) οφείλεται και η εμφάνισή τους σε αποξηραμένα τρόφιμα. Στα προϊόντα κρέατος η μόλυνση οφείλεται συχνά στα προστιθέμενα μπαχαρικά, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένο μικροβιακό φορτίο. Τέλος

στα παστεριωμένα προϊόντα, όπως το τυρί και το γάλα, οι πηγές μόλυνσης από μύκητες του γένους *Aspergillus* εντοπίζονται συνήθως στις εργοστασιακές εγκαταστάσεις.

Πίνακας 1.1: Μύκητες του γένους *Aspergillus* που απαντώνται σε διάφορα τρόφιμα^[19]

ΕΙΔΟΣ ΤΡΟΦΙΜΟΥ	ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>ASPERGILLUS</i>
Καλαμπόκι	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.restrictus</i>
Σιτάρι	<i>A.restrictus</i> , <i>A.candidus</i> , <i>A.versicolor</i> , <i>A.ochraceus</i> , <i>A.niger</i>
Κριθάρι	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>A.sydowii</i>
Ρύζι	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.restrictus</i> , <i>A.candidus</i> , <i>A.versicolor</i> , <i>A.ochraceus</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>A.terreus</i>
Καρύδια	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.parasiticus</i> , <i>A.restrictus</i> , <i>A.ficuum</i>
Μπαχαρικά	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>A.ochraceus</i>
Καφές	<i>A.ochraceus</i>
Αποξηραμένα φρούτα	<i>A.niger</i>
Προϊόντα αποξηραμένου κρέατος	<i>A.flavus</i> , <i>A.versicolor</i> , <i>A.parasiticus</i> , <i>A.sydowii</i>
Προϊόντα αποξηραμένων θαλασσινών	<i>A.restrictus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.versicolor</i> , <i>A.flavus</i> , <i>A.wentii</i>
Καπνιστό ψάρι	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.ochraceus</i> , <i>A.tamarii</i>
Κρεμμύδια	<i>A.niger</i>
Ντομάτες	<i>A.niger</i>
Τυρί	<i>A.versicolor</i>

1.2.6 Δράση των μυκήτων του γένους *Aspergillus* ^[19,22,23,24]

Οι μύκητες του γένους *Aspergillus* εξαιτίας της πολυπλευρικότητας που εμφανίζει ο μεταβολισμός τους, έχουν τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιδράσεις στην καθημερινή μας ζωή.

Η ικανότητα αντοχής του γένους αυτού σε ακραίες συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, pH, αλατότητα, ενεργότητα νερού, θρεπτικές απαιτήσεις) το καθιστά ιδανικό προς χρήση στο χώρο της βιοτεχνολογίας για την παραγωγή συστατικών τροφίμων (οργανικών οξέων όπως κιτρικού οξέος: *A. niger*, τροφίμων και ποτών με ζύμωση όπως το σάκε, το μίσο (miso): *A. oryzae*, η σάλτσα σόγιας: *A. oryzae*, *A. sojae*), φαρμακευτικών ουσιών, αντιοξειδωτικών ουσιών (*A. niger*) και ενζύμων (α-αμυλάση,

λακτάση, λιπάση, πρωτεάση: *A. niger*, *A. oryzae*). Ιδιαίτερη σημασία αποκτά δε το γεγονός ότι οι μύκητες *Aspergillus* μπορούν να χρησιμοποιήσουν -μέσω αποικοδόμησης-, διάφορα βιοπολυμερή, όπως άμυλο, ημικυτταρίνες, πηκτίνη και πρωτεΐνες, καθώς κατ'αυτόν τον τρόπο γίνεται δυνατή η εκμετάλλευση ανανεώσιμων πηγών, όπως η φυτική βιομάζα.

Από την άλλη πλευρά, αποτελούν την αιτία για την εμφάνιση ασπεργιλιώσεων σε ανθρώπους και ζώα (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*), μόλυνση τροφίμων και ζωοτροφών και παραγωγή μυκοτοξινών (*A. flavus*, *A. parasiticus*).

Η εξέλιξη της γενετικής και της μοριακής βιολογίας σε συνδυασμό με το αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι μύκητες του γένους *Aspergillus*, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα ευεργετικά τους χαρακτηριστικά, ενώ παράλληλα δίνεται η δυνατότητα μιας αποτελεσματικής παρεμπόδισης της μόλυνσης και κατ'επέκταση της παραγωγής αφλατοξινών με σκοπό την παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων.

1.2.7 Η ομάδα „*Aspergillus flavus*“

Η ομάδα „*Aspergillus flavus*“ αποτελεί μία από τις 14 συνολικά ομάδες του γένους *Aspergillus*.^[25] Σε αυτήν κατατάσσονται 5 είδη: *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae* και *A. tamarii*,^[26] εκ των οποίων δύο είναι εκείνα που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον – ο *A. flavus* και ο *A. parasiticus* –καθώς είναι τα κύρια είδη που παράγουν αφλατοξίνες. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες έρευνες, σε μικρότερο βαθμό, αφλατοξίνες εντοπίστηκαν και σε άλλες ομάδες του γένους αυτού και συγκεκριμένα στα ακόλουθα είδη: *A. parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*^[27], *A. pseudocaelatus* και *A. pseudonomius*.^[28]

Οι μύκητες *A. flavus* και *A. parasiticus* είναι πολύ διαδεδομένοι και έχουν τεράστια σημασία για την οικονομία πολλών χωρών, καθώς προκαλούν εκτεταμένες αλλοιώσεις σε διάφορες σημαντικές κατηγορίες τροφίμων. Τα δύο αυτά είδη έχουν εκπληκτικές μεταξύ τους ομοιότητες και πολύ δύσκολα μπορούν να διακριθούν. Ο Pitt^[27] προτείνει η αναγνώριση των δύο ειδών να γίνεται με βάση τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους, μία πρακτική που εφαρμόζεται σε ευρεία κλίμακα εξαιτίας της υψηλής της ακρίβειας και σαφήνειας (specificity)^[22]. Συγκεκριμένα αναφέρει ότι ο *A. flavus* παράγει κυρίως αφλατοξίνες B, ενώ ο *A. parasiticus* παράγει αφλατοξίνες B και G, δεν παράγει όμως κυκλοπιαζονικό οξύ, όπως κάποια στελέχη του *A. flavus*. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, το πιο αποτελεσματικό κριτήριο για το διαχωρισμό των *A. flavus* και ο *A. parasiticus* είναι η υφή των κονιδιακών τους τοιχωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα κονίδια του *A. flavus* έχουν σχετικά λεπτά τοιχώματα και όχι ιδιαίτερα άγρια, ενώ το σχήμα των κονιδίων ποικίλει από σφαιρικό έως ελλειψοειδές. Αντίθετα, ο *A. parasiticus*

παράγει κονίδια με τραχιά ή ακανθώδη υφή, τα οποία έχουν όλα σχεδόν σφαιρική μορφή και σχετικά χοντρά τοιχώματα. ^[26]

Στην παρούσα εργασία, για το πειραματικό μέρος προτιμήθηκε ο *A. parasiticus* γιατί:

- Είναι λιγότερο μελετημένος έναντι του μύκητα *A. flavus*.
- Παράγει ΑΦΒ₁ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και με μεγαλύτερη σταθερότητα στην απόδοση, καθώς ο *A. flavus* περιέχει υψηλότερο ποσοστό μη τοξινογόνων στελεχών.
- Είναι λιγότερο παθογόνος από τον *A. flavus*.

1.3 Είδος *Aspergillus parasiticus*

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά ^[14,25]

Οι αποικίες του μύκητα *A. parasiticus* σε θρεπτικό υλικό Czapek Agar αναπτύσσονται γρήγορα σε θερμοκρασία δωματίου 24-26 °C και η διάμετρός τους φτάνει στα 2,5-4,0 cm σε 8-10 ημέρες. Αποτελούνται από ένα βασικό μυκήλιο που είναι συμπαγές και αναπτύσσεται από το κέντρο προς την περιφέρεια. Ανεστραμμένες έχουν μία ελαφρώς καφέ απόχρωση. Μερικά στελέχη εμφανίζουν ορισμένα κενά από άσπρες, μη σποριογόνες, στείρες υφές. Σε άλλα στελέχη οι αποικίες αναπτύσσονται και υπόγεια όπου σχηματίζουν ακτινωτές αυλακώσεις.

Οι κονιδιοκεφαλές του μύκητα όταν είναι νέες έχουν κιτρινοπράσινο χρώμα ενώ με την πάροδο του χρόνου γίνονται σκούρες πράσινες. Οι κονιδιοφόροι ξεκινούν από μία στενή βάση και στο άκρο μεγενθύνονται δίνοντας κυστίδια σε σχήμα σφαιροειδές. Οι κονιδιοφόροι ποικίλουν σε μήκος από 200 μm μέχρι, σε σπάνιες περιπτώσεις, 1 mm. Συνήθως κυμαίνονται από 300-700 μm. Πάνω στο κυστίδιο υπάρχει μία σειρά στηριγμάτων άχρωμων ή κιτρινοπράσινων σε πυκνή διάταξη. Τα κονίδια είναι σφαιρικά, με τραχεία τοιχώματα, χρώματος κίτρινου ή πράσινου και έχουν διάμετρο 3,5-5,5 μm.

Σε θρεπτικό υλικό Malt Extract Agar (MEA), οι αποικίες απλώνονται εκτενώς και φθάνουν τα 5-6 cm σε 8-10 ημέρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Το βλαστικό μυκήλιο είναι σχεδόν ολόκληρο υπόγειο, πράσινο, με πλούσια σποριογονία. Εάν αναστραφούν τα τρυβλία, οι αποικίες είναι άχρωμες. Τέλος, ο *A. parasiticus* σπάνια σχηματίζει σκληρώτια.

1.3.2 Συνθήκες ανάπτυξης ^[14,25]

Οι συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα *Aspergillus parasiticus* καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δίνοντας με τον τρόπο αυτό στο μύκητα τη δυνατότητα υψηλής προσαρμοστικότητας αλλά και υψηλής συχνότητας εμφάνισής του. Οι συνθήκες αυτές έχουν ως εξής:

- ❖ *Θερμοκρασία*: 6-54 °C, με βέλτιστη περιοχή ανάπτυξής του τους 30 – 35°C.
- ❖ *pH*: 3,9 – 9,1 με βέλτιστη τιμή 5,5.
- ❖ *Σχετική υγρασία (RH)*: 80-85%.

- ❖ *Θρεπτικές απαιτήσεις*: πηγή άνθρακα, μέσω υψηλών επιπέδων σακχαρόζης (30 – 200 g/L), πηγή αζώτου (νιτρικά). Σημαντική ελάττωση στη διαθέσιμη ποσότητα του αζώτου οδηγεί σε σχηματισμό κονιδίων.
- ❖ *Απαιτήσεις σε O₂*: μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων του διοξειδίου του άνθρακα προκαλεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του μυκηλίου.
- ❖ *Φωτοευαισθησία*: η μυκηλιακή ανάπτυξη ευνοείται στο σκοτάδι, ενώ μικρής έντασης φως διεγείρει το σχηματισμό κονιδίων.

Η σποριογονία, η οποία αυξάνεται ραγδαία κατά τις πρώτες οκτώ ημέρες της καλλιέργειας και στη συνέχεια επιβραδύνεται, εξαρτάται από τη σύνθεση του θρεπτικού υλικού και τη θερμοκρασία. Η παραγωγή σπορίων είναι πιο έντονη στην περιοχή θερμοκρασιών από 22 – 32 °C, ενώ μειώνεται με την προσθήκη σακχαρόζης σε θρεπτικό υλικό βύνης. Τα κονίδια μπορούν να διατηρήσουν τη ζωτικότητά τους για χρόνια, αντέχουν σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και καταστρέφονται μόνο με θέρμανση πάνω από τους 53 °C.

Μία μέθοδο καταστροφής του μύκητα αποτελεί η χαμηλή δόση μικροκυματικής ακτινοβολίας, η οποία έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί σοβαρή διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης και βλάβη του DNA. Συγκεκριμένα, αυξάνεται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με συνέπεια την αύξηση διαρροής ηλεκτρολυτών, Ca²⁺, πρωτεϊνών και DNA. Επιπλέον η μυκηλιακή επιφάνεια διογκώνεται και γίνεται άγρια. ^[29]

1.3.3 Συχνότητα εμφάνισης, χρησιμότητα και παθογένεια

Ο *Aspergillus parasiticus*, όπως και τα άλλα μέλη του „*A.flavus* group“ είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση. Συνήθως απομονώνονται από το έδαφος, τα αποσυντιθέμενα φυτά, τους αποθηκευμένους καρπούς και σπόρους, καθώς και διάφορα άλλα τρόφιμα. Είναι παθογόνος για έντομα, φυτά και ανώτερα ζώα συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.

Λόγω της τοξικότητάς του, το είδος *Aspergillus parasiticus* αποκλείεται από τη βιομηχανία τροφίμων και πρέπει να γίνεται προσεκτικός έλεγχος για τη διάκριση των τοξινογόνων *Aspergilli*. Μαζί όμως με τον *A.flavus* και τον *A.oryzae*, ο *Aspergillus parasiticus* καλλιεργείται για τη βιομηχανική παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην αποτρίχωση και την κατεργασία δερμάτων.^[14] Επίσης έχει αναφερθεί η παραγωγή πολυγαλακτουρονάσης, πρωτοπηκτινάσης και λιπολυτικών ενζύμων.^[30]

Σε καλλιέργειες του *Aspergillus parasiticus* έχει ανιχνευθεί ασπεργιλλικό οξύ [6-sec-βουτυλο-1-υδροξυ-3-ισοβουτυλο-2(1H)-πυραζινόνη] (C₁₂H₂₀N₂O₂), ένα από τα προϊόντα μεταβολισμού του μύκητα που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1942 από τους White και Hill. Πρόκειται για μία κίτρινη, κρυσταλλική ουσία με αντιβιοτική δράση

όσον αφορά ένα μεγάλο αριθμό Gram⁺ και Gram⁻ βακτηρίων. Βιοσυντίθεται από λευκίνη και ισολευκίνη. Παράγωγα του ασπεργιλλικού οξέος είναι το νεοασπεργιλλικό και υδροξυασπεργιλλικό οξύ.^[30,31] Άλλο προϊόν μεταβολισμού αποτελεί το κοτζικό οξύ (kojic acid), [2-υδροξυμεθυλ-5-υδροξυ-4H-πυραν-4-όνη] (C₆H₆O₄),^[14] μία ουσία γνωστή από το 1907, οπότε απομονώθηκε από τον Saito, με αντιβιοτικές ιδιότητες απέναντι σε Gram⁺ και Gram⁻ οργανισμούς, η οποία έχει προταθεί ως εντομοκτόνο^[30] επειδή παρεμποδίζει την ανάπτυξη των εντόμων. Η παρασπερόνη Α αποτελεί μία πορτοκαλί χρωστική ουσία των σπόρων του μύκητα με πολυκετιδική δομή^[32]

Όσον αφορά την παθογένειά του, ο *Aspergillus parasiticus* περιγράφηκε από τον Spreare^[30] (1912) ως παράσιτο σε ένα είδος εντόμου (mealy bug) που προσβάλλει το σακχαροκάλαμο. Μέλη της ομάδας „*A. flavus*“ εμπλέκονται στην παράλυση μελισσών και στις ασθένειες μεταξοσκωλήκων.

Ο *Aspergillus parasiticus* προσβάλλει και μεγάλο αριθμό φυτών, όπως πορτοκάλια, grape fruit, καλαμπόκι, βαμβάκι, οπότε σχηματίζονται κίτρινες κηλίδες στην επιφάνειά τους.^[30]

Η παθογένεια των ειδών *A. flavus* και *A. parasiticus* σχετίζεται κυρίως με τις τοξινώσεις που προκαλούν σε φυτά με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών σε ζώα και πουλερικά και κατ' επέκταση στον άνθρωπο.

Πνευμονικές ασπεργιλλώσεις από εισπνοή κονιδίων έχουν παρατηρηθεί σε περιστέρια, γαλοπούλες, άγρια πουλιά, άλογα και πουλερικά. Τα είδη *A. flavus* και *A. parasiticus* σχετίζονται με ασθένειες στον άνθρωπο, συνήθως βρογχικές και πνευμονικές μολύνσεις. Επίσης έχουν αναφερθεί μολύνσεις δερματικές, της ρινικής κοιλότητας, καθώς επίσης και ενδοκαρδίτιδα και κύστες.

Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι η επικινδυνότητα των παραπάνω ειδών συνδέεται κυρίως με την ικανότητα παραγωγής των αφλατοξινών, ουσίες τοξικές, καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στην Αφλατοξίνη B₁, η οποία θεωρείται η πλέον επικίνδυνη φυσικώς παραγόμενη χημική ένωση.^[14]

1.4 Είδος *Aspergillus flavus*

1.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά^[20,33]

Οι αποικίες στο CYA (Czapek Yeast Extract Agar), μετά από επώαση 7 ημερών στους 25 °C, έχουν διάμετρο 50-70 mm, είναι επίπεδες, με ενδιάμεση πυκνότητα και περιμετρικά έχουν βελούδινη υφή. Στο κέντρο η αποικία είναι νηματοειδής και ορισμένες φορές αναπτύσσεται αρκετά βαθιά.

Το μυκήλιο είναι εμφανές μόνο στις νηματοειδείς περιοχές και είναι λευκό. Οι κονιδιακές κεφαλές συνήθως βρίσκονται ομοιόμορφα γύρω από όλη την αποικία, ενώ

είναι αραιές ή απουσιάζουν τελείως σε περιοχές με νηματοειδή ανάπτυξη ή παραγωγή σκληρωτίων. Οι κονιδιοκεφαλές έχουν χαρακτηριστικό γκρι – πράσινο χρώμα έως λαδί. Μερικές φορές αρχικά έχουν αμιγώς κίτρινο χρώμα, ενώ καθώς αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου μετατρέπεται σε πράσινο. Ανεστραμμένες, οι αποικίες είναι άχρωμες έως υποκίτρινες.

Τα σκληρώτια παράγονται στο 50% των δειγμάτων που έχουν επιμολυνθεί με τον *A. flavus*. Αυτά σε πρώτο στάδιο είναι λευκά, ενώ στη συνέχεια παίρνουν βαθύ καστανέρυθρο χρώμα. Τα σκληρώτια μπορεί να είναι πολύ λίγα, ώστε να μην είναι δυνατόν να παρατηρηθούν, μπορεί όμως και να υπερισχύουν στην αποικία.

Οι αποικίες στο MEA (Malt Extract Agar) έχουν διάμετρο 50-65 mm, είναι πανομοιότυπες με αυτές στο CYA, αλλά ορισμένες φορές έχουν περισσότερο νηματοειδή υφή.

Οι αποικίες στο G25N (25% Glycerol Nitrate Agar) έχουν διάμετρο 25-40 mm, είναι επίσης πανομοιότυπες με εκείνες του CYA, αλλά είναι πιο νηματοειδείς και με μικρότερη κονιδιακή παραγωγή. Ανεστραμμένες έχουν ανοιχτό πορτοκαλί ή ροζ χρώμα.

Στους 5°C δεν παρατηρείται καμία ανάπτυξη, ενώ στους 37°C υπάρχει ταχεία ανάπτυξη αποικιών.

Οι κονιδιοφόροι παράγονται από την επιφάνεια της υφής, έχουν μέγεθος που ξεκινάει από τα 400 μm και μπορεί να φτάσει το 1 mm ή και να το ξεπεράσει, είναι άχρωμες ή με ανοιχτό καφέ χρώμα, ενώ έχουν τραχεία τοιχώματα. Η κύστη στο άνω άκρο του στελέχους είναι σφαιρική, διαμέτρου 20-40 μm, τυπικά φέρει στηρίγματα και πάνω σε αυτά τα φιαλίδια. Ορισμένες φορές όμως, έχουν παρατηρηθεί μόνο φιαλίδια χωρίς στηρίγματα. Τα στηρίγματα και τα φιαλίδια είναι ίδιου μήκους (8-12 μm). Τα κονίδια είναι σφαιρικά ή ωοειδή, διαμέτρου 3,5-5,0 μm, με τοιχώματα ως επί το πλείστον τραχεία.

1.4.2 Συνθήκες ανάπτυξης και οικολογία ^[20]

Ο *A. flavus* είναι συγγενές είδος με τον *A. parasiticus* και αναπτύσσεται ταχύτατα σε θερμοκρασίες 25-37°C. Είναι ένας μύκητας που απαντάται σε ημιτροπικά και τροπικά κλίματα και μάλιστα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τον *A. parasiticus* στις περιοχές αυτές. Είναι ευρύτερα γνωστός για την παραγωγή αφλατοξινών. Προϊόντα που κυρίως προσβάλλει είναι: φυστίκια (Αιγίνης και cashew), αμύγδαλα, άλλοι ξηροί καρποί, βαμβακόσπορος, καλαμπόκι, δημητριακά, καρποί ελιάς, σύκα, μπαχαρικά. Εμφανίζεται επίσης συχνά, σε καλλιεργούμενα εδάφη ή ζει παρασιτικά σε έντομα και σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παθογόνο δράση στον άνθρωπο (ασπεργίλλωσις). Το 50% των στελεχών που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα ήταν τοξινογόνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

2.1 Ιστορική αναδρομή

Οι μυκοτοξίνες (mycotoxins) είναι στο σύνολό τους σύνθετες οργανικές ενώσεις φυσικής προέλευσης, χαμηλού μοριακού βάρους που αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των νηματοειδών μυκήτων. Πρόκειται για ένα συνοθύλευμα ετερόκλητων ενώσεων από τοξικής και χημικής άποψης και, ο μόνος λόγος για τον οποίο έχουν συμπεριληφθεί στην ίδια κατηγορία είναι ότι όλα μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες ή ακόμη και θάνατο σε ανθρώπους και ζώα,^[34] καθώς επίσης και το γεγονός ότι η πορεία βιοσύνθεσής τους ακολουθεί ένα πανομοιότυπο σχήμα μέσω απλών ενδιάμεσων ενώσεων.^[35] Οι ουσίες αυτές παράγονται όταν πρόδρομες ενώσεις τους, οι οποίες είναι προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού, σχηματίζονται σε μεγάλες ποσότητες μη χρήσιμες για το μύκητα. Παρά το γεγονός ότι δε φαίνεται να υπάρχει κάποιος προφανής ρόλος των μυκοτοξινών στην άμεση ανάπτυξη και στο μεταβολισμό των μικροοργανισμών, είναι πολύ πιθανό να εντάσσονται στο γενικότερο αμυντικό σύστημα των μυκήτων ως ένα αμυντικό μέσο ενάντια στους ανταγωνιστές μύκητες. Η υψηλή τοξικότητα της Αφλατοξίνης για παράδειγμα, ενδέχεται να προστατεύει το μύκητα απέναντι στους υπόλοιπους ανταγωνιστές μικροοργανισμούς που συμβιώνουν στο χώμα ή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας προσβολής των διαφορών καρπών και καλλιεργειών.^[36]

Πριν το 1900, στην Ιταλία, ερευνητές συμπέραναν ότι η κατανάλωση μouxλιασμένου καλαμποκιού από παιδιά οδηγούσε σε ανάπτυξη ασθενειών. Κάποια πειράματα που έγιναν τότε, οδήγησαν στην απομόνωση των μυκήτων του καλαμποκιού. Όμως, η τοξίνη που παρήγαγαν οι μύκητες αυτοί, λόγω ανεπάρκειας των αναλυτικών μεθόδων της εποχής, δε στάθηκε δυνατό να απομονωθεί και στη συνέχεια να ταυτοποιηθεί, με αποτέλεσμα η πρόκληση των ασθενειών να μην αποδοθεί σε αυτήν αλλά στον ίδιο το μύκητα.^[37]

Το 1957, οι Burnside et al.^[38] μελέτησαν ασθένειες που προήλθαν στις αρχές της δεκαετίας του 1950 από την κατανάλωση μouxλιασμένου καλαμποκιού και είχαν ως συνέπεια το θάνατο εκατοντάδων αγριόχοιρων στις νοτιοανατολικές Η.Π.Α. Οι ερευνητές απομόνωσαν από το καλαμπόκι διάφορους μύκητες και με τον καθένα από αυτούς εμβολίασαν αποστειρωμένο καλαμπόκι που καταναλώθηκε από πειραματόζωα. Δυστυχώς, τότε δε δόθηκε σημασία στο γεγονός ότι τα πειραματόζωα που τράφηκαν με

το καλαμπόκι που περιείχε το μύκητα *Aspergillus flavus* ανέπτυξαν ασθένειες. Θεωρήθηκε ως μία ακόμη δηλητηρίαση από κατανάλωση μouxλιασμένων ζωοτροφών.

Ο όρος μυκοτοξίνη θεσπίστηκε το 1962 ύστερα από το μυστηριώδη θάνατο περισσότερων από 100.000 γαλόπουλων και άλλων οικιακών πτηνών σε μια περιοχή κοντά στο Λονδίνο. Το γεγονός αυτό προκάλεσε ζημιά αρκετών εκατοντάδων χιλιάδων δολλαρίων και οι επιστήμονες θεώρησαν αρχικά ότι επρόκειτο για κάποιο άγνωστο μέχρι τότε ιό και ονόμασαν το σύνδρομο «Ασθένεια Χ» („turkey-X disease“). Επισταμένες και επίμονες έρευνες όμως, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ασθένεια προκλήθηκε από κάποιο παράγοντα που βρισκόταν σε μouxλιασμένες ζωοτροφές των πτηνών αυτών, οι οποίες αποτελούνταν από πάστα φυσιτικών. Από αυτές απομονώθηκε ο μύκητας *Aspergillus flavus*, όπως και στις Η.Π.Α λίγα χρόνια νωρίτερα. Η συμβολή των χημικών στην έρευνα αυτή οδήγησε στην πρώτη απομόνωση και ταυτοποίηση μυκοτοξίνης από εκείνη τη ζωοτροφή. Η μυκοτοξίνη ονομάστηκε Αφλατοξίνη και αποδείχθηκε πως είχε παραχθεί από τον παραπάνω μύκητα, ο οποίος με τη σειρά του είχε αναπτυχθεί λόγω ακατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης των ζωοτροφών.^[39]

Λίγο αργότερα, το 1966, μετά τις ανακαλύψεις για την Αφλατοξίνη, περιγράφεται για πρώτη φορά η παραγωγή της Ωχρατοξίνης Α από το μύκητα *Aspergillus ochraceus* και αναφέρονται οι επιπτώσεις σε πειραματόζωα στη Νότια Αφρική.^[40]

Από τότε ξεκίνησε το ενδιαφέρον γύρω από τις μυκοτοξίνες, κυρίως στις Η.Π.Α., οι υπηρεσίες των οποίων συνειδητοποίησαν νωρίς το πρόβλημα και έλαβαν τα πρώτα μέτρα μέσω του Κρατικού Φορέα Ελέγχου Τροφίμων FDA (Food and Drug Administration) αλλά και άλλων υπηρεσιών.

2.2 Οι μυκοτοξίνες σήμερα: ερευνητικά συμπεράσματα ^[5,7,20,41,42,43,44]

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 300 μυκοτοξίνες, οι οποίες παράγονται από 350 περίπου είδη μυκήτων. Έχει αποδειχθεί ότι μία συγκεκριμένη μυκοτοξίνη μπορεί να προέρχεται από περισσότερα του ενός είδη μυκήτων, ενώ αντίστοιχα ένας μύκητας μπορεί να παράγει περισσότερες από μία μυκοτοξίνες. Εκείνο πάντως που πρέπει να τονιστεί είναι το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μυκήτων δε βιοσυνθέτει τοξίνες. Τα κυριότερα γένη μυκήτων που είναι σε θέση να παράγουν μυκοτοξίνες είναι ο *Aspergillus*, ο *Penicillium*, ο *Fusarium* και ο *Altenaria*.

Οι μυκοτοξίνες δημιουργούνται κυρίως κατά το τέλος της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης των μυκήτων – μία ανάπτυξη, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, ευνοείται από μία συνισταμένη περιβαλλοντικών παραγόντων. Πρόκειται για ουσίες που εισάγονται στον οργανισμό μέσω της τροφής, του δέρματος ή της εισπνοής και προκαλούν τοξικώσεις, η ένταση των οποίων εξαρτάται από την ποσότητα της τοξίνης καθώς και από το είδος ή το στέλεχος του μύκητα από τον οποίο παράχθηκε. Μερικές από τις κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι Αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁, G₂ και M₁, η Ωχρατοξίνη Α, οι Φουμονισίνες,

η τάξη των Τριχοθεσινών που περιλαμβάνει τις τοξίνες T-2 και HT-2, τη Δεοξυνιβαλενόλη (DON) και τη Νιβαλενόλη, η Ζεαραλενόνη (ZEA), οι Πατουλίνες, οι Αματοξίνες κ.α. Από αυτές περισσότερες από 14 (κυρίως Αφλατοξίνες) έχουν καρκινογόνο δράση, ενώ άλλες προκαλούν άλλους τύπους βλαβών σε ανθρώπους και ζώα.

Στην ομάδα των Αφλατοξινών θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στο επόμενο κεφάλαιο. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η Ζεαραλενόνη παρουσιάζει υψηλή οιστρογόνο δράση και δρα ως αναβολικό. Έχει χαμηλή τοξικότητα και η ημερήσια ανεκτή δόση (Provisional Maximum Tolerable Daily Intake, PMTDI) είναι 0,5 μg/Kg βάρους ανθρώπινου σώματος. Η τάξη των Τριχοθεσινών αναστέλλει τη σύνθεση του RNA και προκαλεί ανοσοκαταστολή (ανώτερο επιτρεπτό όριο 5 μg/Kg τροφίμου). Η Πατουλίνη παράγεται σε μήλα και αχλάδια από το μύκητα *P.expansum*. Θεωρείται γονοτοξική όχι όμως καρκινογόνος και η προσωρινή ημερήσια ανεκτή δόση (tTDI) είναι 0,4 μg/Kg βάρους ανθρώπινου σώματος. Οι Φουμονισίνες σε μεγάλες ποσότητες είναι θανατηφόρες για τα άλογα (ανώτερο επιτρεπτό όριο: 1 mg/Kg καλαμποκιού). Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι προκαλούν όγκους στα νεφρά και το ήπαρ σε πειραματόζωα (ποντίκια), ενώ η ανεκτή ημερήσια δόση για κάθε μία από τις τρεις Φουμονισίνες (B_1 , B_2 , B_3) είναι 2 μg/kg βάρους ανθρώπινου σώματος. Η Δεοξυνιβαλενόλη βρίσκεται κυρίως στα δημητριακά και αποτελεί τη μυκοτοξίνη με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα αντίστοιχα τρόφιμα και ζωοτροφές. Οξεία έκθεση στην τοξίνη αυτή προκαλεί δύο από τις χαρακτηριστικές τοξικολογικές αντιδράσεις: ανορεξία και εμετό. Δεν ανήκει στην κατηγορία των καρκινογόνων (ταξινομείται στην ομάδα 3, IARC 1993) και η ημερήσια ανεκτή δόση είναι 1 μg/kg βάρους ανθρώπινου σώματος. Οι Αματοξίνες παράγονται από μανιτάρια του γένους *Amanita phalloides* και προκαλούν μαζική ηπατοκυτταρική νέκρωση με άμεση συνέπεια την πρόκληση οξείας ηπατικής ανεπάρκειας.

Ορισμένες από τις μυκοτοξίνες είναι παράγωγα της θρυπταμίνης και άλλες κυκλικά οκταπεπτίδια. Ο μύκητας *Fusarium graminearum*, όταν αναπτύσσεται στο καλαμπόκι, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την παραγωγή ζωοτροφών, προξενεί στους χοίρους μυκοτοξίνωση σοβαρής μορφής, όπως επίσης και οι τοξίνες που παράγονται από το μύκητα *Claviceps purpurea*, ο οποίος είναι παράσιτο της σίκαλης. Αντίθετα, αν και ορισμένα στελέχη του *Penicillium roquefortii* εκκρίνουν μυκοτοξίνες, αυτές απουσιάζουν από το αντίστοιχο τυρί τύπου ροκφόρ.

Οι σημερινές συνθήκες που απαιτούν ασφαλή και υψηλής ποιότητας τρόφιμα σε συνδυασμό με την επικινδυνότητα πολλών μυκοτοξινών, οδήγησαν τις σχετικές με την ποιότητα των τροφίμων εποπτικές αρχές ενός μεγάλου αριθμού χωρών στον καθορισμό ανώτατων επιπέδων των σημαντικότερων αυτών ουσιών (Αφλατοξίνη B_1 , Ωχροτοξίνη A, Δεοξυνιβαλενόλη, Ζεαραλενόνη κ.α.) σε πολλές κατηγορίες τροφίμων. Απαραίτητη

προϋπόθεση για τον έλεγχο των τροφίμων, όσον αφορά το βαθμό της μόλυνσής τους από διάφορες μυκοτοξίνες είναι η ανάπτυξη και χρήση ειδικών πρωτοκόλλων για την ποσοτική τους ανάλυση. Τα πρωτόκολλα αυτά περιλαμβάνουν διάφορα στάδια, για κάθε ένα από τα οποία υπάρχουν σχετικές οδηγίες προερχόμενες από τις εποπτικές αρχές και πλούσια βιβλιογραφία (Δειγματοληψία - Προετοιμασία δείγματος - Εκχύλιση μυκοτοξινών - Καθαρισμός εκχυλίσματος-Διαχωρισμός μυκοτοξινών - Παραγωγοποίηση, όπου απαιτείται, - Ανίχνευση και Ποσοτικοποίηση – Επιβεβαίωση).

Οι μυκοτοξίνες είναι χημικά σταθερές στην πλειοψηφία τους ενώσεις, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται δύσκολα ή και καθόλου με τις επεξεργασίες, στις οποίες υπόκεινται τα τρόφιμα κατά τις βιομηχανικές διαδικασίες παραγωγής ή με το μαγείρεμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

3.1 Εισαγωγή

Οι Αφλατοξίνες είναι μία ομάδα ισχυρά τοξικών, καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων ουσιών και αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού κάποιων ειδών μυκήτων. Οι μύκητες που βιοσυνθέτουν τις ουσίες αυτές ανήκουν στην επονομαζόμενη „*Aspergillus flavus*“ ομάδα – πρόκειται κυρίως για τους *A.flavus* και *A.parasiticus* και, σε μικρότερο βαθμό, τον *A.nomius* που αποτελούν τα τοξινογόνα γένη της ομάδας αυτής, από την οποία οι συγκεκριμένες τοξίνες πήραν και το όνομά τους (*Afla-toxins*). Σύμφωνα με κάποιες έρευνες, Αφλατοξίνες είναι σε θέση να βιοσυνθέσουν και ορισμένα τοξινογόνα στελέχη του μύκητα *A.tamarii*,^[45,46] όπως επίσης και κάποια άλλα είδη μυκήτων, για τους οποίους έγινε σύντομη αναφορά στο 1^ο κεφάλαιο. Τα φουρανοκουμαρικά αυτά παράγωγα πολυκετιδικής προέλευσης ανακαλύφθηκαν στη Μ.Βρετανία στις αρχές της δεκαετίας του 1960 στην προσπάθεια των επιστημόνων να εξηγήσουν τη μαζική δηλητηρίαση, κατά την οποία χάθηκαν περισσότερα από 100.000 πουλερικά. Όπως αποδείχθηκε, τα πουλερικά αυτά είχαν τραφεί με ζωοτροφές επιβαρημένες με μεγάλες ποσότητες Αφλατοξινών, οι οποίες προκάλεσαν την οξεία δηλητηρίασή τους.^[47]

Ανάμεσα στις 16 περίπου συγγενείς Αφλατοξίνες που έχουν αναγνωριστεί, τέσσερις είναι εκείνες που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, οι B₁, B₂, G₁ και G₂. Τα ονόματα των τύπων τους προκύπτουν από το χρώμα που εκπέμπουν όταν φθορίζουν, μπλε (Blue [B]) και πράσινο (Green [G]) αντίστοιχα, ενώ οι δείκτες 1 και 2 υποδεικνύουν τη σειρά εμφάνισής τους κατά τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) που αποτέλεσε και την πρώτη μέθοδο διαχωρισμού τους.^[48] Οι τοξίνες αυτές συνήθως βρίσκονται μαζί στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές σε διάφορες αναλογίες. Η κυρίαρχη τοξίνη όμως είναι η Αφλατοξίνη B₁, η οποία αντιπροσωπεύει το 75% του συνόλου των Αφλατοξινών που μολύνουν καλλιέργειες και ζωοτροφές. Εμφανίζει τη μεγαλύτερη τοξικότητα και είναι η πιο επικίνδυνη φυσικώς παραγόμενη χημική ένωση, χαρακτηρίζεται δε ως μεταλλαξιογόνος, τερατογόνος και καρκινογόνος.^[47,49] Η παρουσία της Αφλατοξίνης B₁ στα τρόφιμα προϋποθέτει κατά κανόνα και την παρουσία των υπολοίπων Αφλατοξινών, ενώ το αντίστροφο δεν ισχύει απαραίτητα. Κύριο μεταβολικό προϊόν της Αφλατοξίνης B₁ είναι η Αφλατοξίνη M₁, η οποία αποτελεί μονοϋδροξυλιωμένο παράγωγο της και εκκρίνεται στο γάλα και τα ούρα των βοοειδών που εκτρέφονται για την παραγωγή

γάλακτος, καθώς και άλλων θηλαστικών, όταν αυτά έχουν τραφεί με μολυσμένες ζωοτροφές.^[50] Η ονομασία της προκύπτει από την παρουσία της στο γάλα (M-milk) ^[51] και τυγχάνει μεγάλου ενδιαφέροντος από πλευράς υγείας των καταναλωτών και ειδικά της ευαίσθητης ομάδας των παιδιών και των βρεφών.

Οι μοριακοί τύποι και οι χημικές δομές όλων των Αφλατοξινών που προαναφέρθηκαν φαίνονται στον πίνακα 3.1 και στο σχήμα 3.1 αντίστοιχα. Πρόκειται για διφουρανικά παράγωγα που περιέχουν έναν κουμαρινικό πυρήνα.

Πίνακας 3.1: Οι μοριακοί τύποι των Αφλατοξινών

Αφλατοξίνη	Μοριακός τύπος	Χρώμα
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	Μπλε
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	Πράσινο
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Μπλε
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Πράσινο

Οι κυριότερες κατηγορίες τροφίμων, όπου εμφανίζονται οι Αφλατοξίνες είναι τα δημητριακά και παράγωγα αυτών, οι ξηροί καρποί, τα όσπρια, τα αποξηραμένα φρούτα, τα μπαχαρικά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και παράγωγα αυτών, οι ελιές, το ελαιόλαδο, τα βιομηχανοποιημένα προϊόντα (corn flakes), επίσης οι ζωοτροφές και επομένως και ζωικά προϊόντα μέσω της τροφικής αλυσίδας. Η μόλυνση ενός τροφίμου από Αφλατοξίνες είναι αθροιστική διαδικασία. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να ξεκινήσει στο φυτό πριν τη συγκομιδή και στη συνέχεια να συσσωρευτεί επιπλέον ποσότητα κατά τη συγκομιδή, την ξήρανση, την αποθήκευση ή την επεξεργασία έως την τελική κατανάλωσή του.^[52]

Η σύνθεση των Αφλατοξινών εξαρτάται από το στέλεχος του μύκητα, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, στις οποίες αναπτύσσονται οι αποικίες καθώς και τους θρεπτικούς παράγοντες. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ουσιών που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών, κυρίως μέσω της επίδρασής τους στη μυκηλιακή ανάπτυξη.^[53]

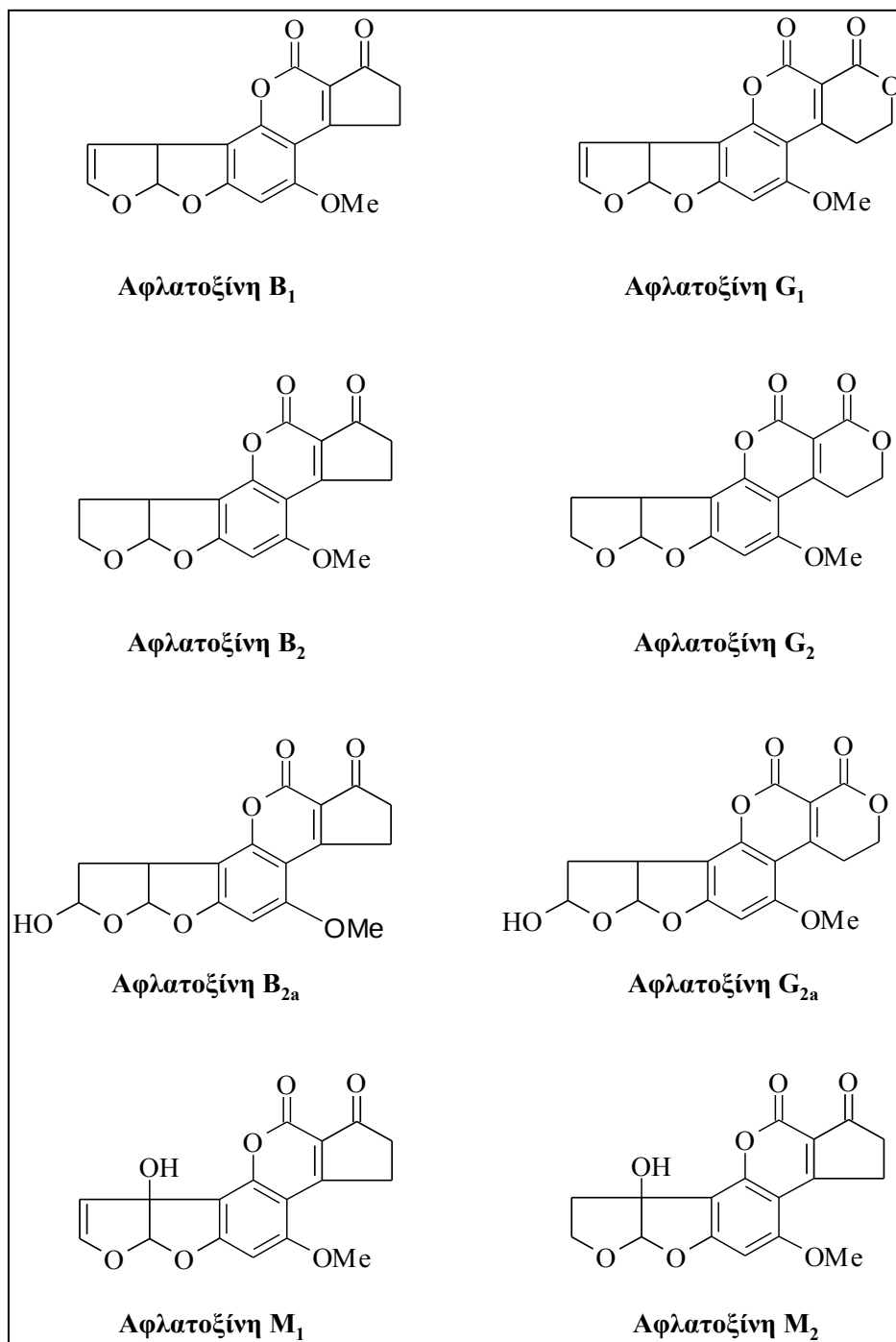
Υπάρχει η άποψη ότι η βιοσύνθεση των Αφλατοξινών σχετίζεται με την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus*, κυρίως μέσω του σχηματισμού σκληρωτίων. Τη σχέση αυτή εξάρτησης μεταξύ ανάπτυξης του μύκητα και παραγωγής Αφλατοξινών φαίνεται να στηρίζουν κάποια στοιχεία, όπως το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες τοξίνες εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις εκτός από το μυκήλιο, σε κονίδια και σκληρώτια του *A.flavus*.^[51] Αυτό δείχνει ότι πιθανόν οι Αφλατοξίνες να έχουν σχέση με τον αγενή τρόπο πολλαπλασιασμού.^[47] Μερικοί επιστήμονες μελετούν αν συσχετίζονται η μορφολογία του

μύκητα και η βιοσύνθεση Αφλατοξινών. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε παράλληλη παραγωγή Αφλατοξινών και σπορίων.^[55]

Η τοξίνη παράγεται σε χαμηλά ποσά σε υπό ανάδευση καλλιέργειες, στις οποίες δεν παρατηρείται σποριογονία, ενώ αντίθετα, παράγονται υψηλά ποσά σε υγρές ή στερεές καλλιέργειες που επωάζονται σε στατικές συνθήκες. Επίσης, οι χρωστικές που παράγονται από αγενή σπόρια (κονίδια) και εγγενή σπόρια (ασκοσπόρια) του μύκητα *Aspergillus*, είναι και αυτά πολυκετιδικά παράγωγα, όπως και οι Αφλατοξίνες. Έτσι, υπάρχουν υπόνοιες ότι η σύνθεση των χρωστικών αυτών και των Αφλατοξινών καθορίζονται από το ίδιο ρυθμιστικό στάδιο.^[53]

Τέλος, έχει αναφερθεί ότι το οξυγόνο παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των τοξινών αυτών. Αν ο *A.flavus* επωαστεί σε ατμόσφαιρα οξυγόνου 1% και αζώτου 99% παράγεται Αφλατοξίνη. Μία πιθανή εξήγηση για το αποτέλεσμα αυτό είναι η σχέση μεταξύ του οξειδωτικού σταδίου και της σποριογονίας του μύκητα.

Γενικά, η πορεία βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών είναι μία περίπλοκη και μακρά διαδικασία του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η κατανόηση της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών καθώς και της ρύθμισής της είναι απαραίτητη για τη λήψη περιοριστικών μέτρων στο πρόβλημα της επιμόλυνσης των τροφίμων με τις συγκεκριμένες τοξίνες.



Σχήμα 3.1: Οι συντακτικοί τύποι των Αφλατοξινών

3.2 Βιοσύνθεση Αφλατοξινών

3.2.1 Πρωτογενής και Δευτερογενής μεταβολισμός

Ως πρωτογενής μεταβολισμός ορίζεται το σύνολο των αναβολικών (σύνθεση βιομάζας) και καταβολικών (αποικοδόμηση βιομάζας για παραγωγή ενέργειας) διεργασιών που λαμβάνει χώρα σε κάθε οργανισμό, συνεπώς και στους μύκητες.

Ο δευτερογενής μεταβολισμός διαφοροποιείται από τον πρωτογενή στα εξής σημεία:

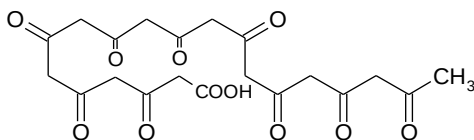
- Πραγματοποιείται με έντονους ρυθμούς κατά κανόνα μετά την ολοκλήρωση του μεγαλύτερου μέρους της κυτταρικής ανάπτυξης και συνδέεται στο μύκητα με μορφολογικές αλλαγές, όπως η σποριογονία.
- Περιορίζεται σε μικρό αριθμό ειδών ή ορισμένα στελέχη ενός είδους μυκήτων.
- Τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού δεν εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες του κυττάρου αλλά είναι δραστικά έναντι μικροοργανισμών, φυτών και ζώων, ως αντιβιοτικά, φυτοτοξίνες και μυκοτοξίνες αντίστοιχα.
- Δεν απαιτεί ένζυμα υψηλής εξειδίκευσης σε αντίθεση με τον πρωτογενή.

Ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι μια προσπάθεια των μικροοργανισμών να ανταποκριθούν και να επιβιώσουν κάτω από αντίξοες συνθήκες, όπως π.χ. σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Χαρακτηριστικό είναι ότι όταν κάποιο θρεπτικό υλικό εξαντληθεί και κατ' επέκταση η ανάπτυξη του μύκητα περιορισθεί, η βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ εξελίσσεται με ραγδαίους ρυθμούς.^[29] Είναι πάντως γεγονός ότι ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

3.2.2 Η πορεία των πολυκετιδίων

Μετά τη βιοσύνθεση της πενικιλλίνης, η πλέον μελετημένη βιοσυνθετική πορεία προϊόντος του δευτερογενούς μεταβολισμού μυκήτων είναι εκείνη των Αφλατοξινών. Ο δευτερογενής μεταβολισμός συνδέεται με τον πρωτογενή με απλά ενδιάμεσα, όπως το ακετυλο-CoA. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι από την ένωση αυτή ξεκινά η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων που ενεργοποιείται με τη βοήθεια της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS) και στην οποία καταλήγει η αποικοδόμησή τους (πρωτογενής μεταβολισμός), ενώ παράλληλα πρόκειται και για την ένωση, από την οποία ξεκινάει η πορεία του δευτερογενούς μεταβολισμού, η *πορεία των πολυκετιδίων*, όπως ονομάζεται, με τη συνδρομή της συνθετάσης των πολυκετιδίων (PKS), μέσω της οποίας σχηματίζονται οι Αφλατοξίνες. Όπως φαίνεται, οι δύο αυτές πορείες – βιοσύνθεση/αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων και βιοσύνθεση των Αφλατοξινών – συνδέονται μεταξύ τους έχοντας σαν συνδετικό τους κρίκο το ακετυλο-CoA.^[56,57,58,59]

Τα πολυκετίδια (σχήμα 3.2) είναι πολυ-β-κετονικά ενδιάμεσα που παράγονται κατά τη συμπύκνωση ακετυλο-CoA με μηλονικές ομάδες, αποκαρβοξυλίωση και σχηματισμό δακτυλίου.^[55] Ανάλογα με τον αριθμό των ακετυλο-ομάδων ταξινομούνται σε τρι-, τετρα-, πεντακετίδια κλπ. Τα πολυκετίδια είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται σε σημαντικά ποσά, από Ασκομύκητες και Ατελείς μύκητες.^[60]



Σχήμα 3.2: Η δομή ενός πολυκετιδίου (δεκακετίδιο)

3.2.3 Ο μηχανισμός της βιοσυνθετικής πορείας των Αφλατοξινών

Η βιοσύνθεση των Αφλατοξινών περιγράφεται από μία πολύπλοκη πορεία που περιλαμβάνει τουλάχιστον 15 ενδιάμεσες ενώσεις, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί με τη χρήση μεταλλαγμένων στελεχών, αναστολέων ενζύμων και ραδιενεργά επισημασμένων πρόδρομων ενώσεων.^[35,61] Από τα 4 βασικότερα είδη Αφλατοξινών, εκείνη που έχει μελετηθεί εκτενέστερα είναι η Αφλατοξίνη B₁ (ΑΦΒ₁) λόγω της μεγάλης οικονομικής της σημασίας.

Η διευκρίνηση και κατανόηση της πορείας βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ βασίζεται κυρίως στις ενζυμικές και γενετικές αναλύσεις που έχουν γίνει, ιδιαίτερα από το 1992 και ύστερα, οπότε απομονώθηκε και περιγράφηκε το πρώτο γονίδιο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση.^[62,63] Συνολικά εκτιμάται ότι υπάρχουν 27 ενζυματικά στάδια στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ και 29 γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθετη αυτή διαδικασία, ενώ έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί 17 γονίδια που καταλύουν 12 ενζυματικά στάδια στη βιοσυνθετική πορεία της ΑΦΒ₁.^[64,65,66]

Η έναρξη της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ πραγματοποιείται με τη σύνθεση ενός πολυκετιδίου, ενός δεκακετιδίου συγκεκριμένα, της Νορανθρόνης, από 1 μονάδα ακετυλο-CoA και 9 μονάδες μηλονυλο-CoA μέσω μίας συνθετάσης πολυκετιδίων (PKSA) (σχήμα 3.4).^[56,57,58,67] Σύμφωνα με μία άλλη εκδοχή, αρχικά δημιουργείται μία μονάδα εξανοϊκού οξέος μέσω ενός συγκεκριμένου ζεύγους συνθετάσης λιπαρών οξέων (FAS-1 και FAS-2), η οποία έχει το ρόλο εκκινητή, όπου ακολούθως μία PKS ομολογοποιεί μόρια μηλονυλου-CoA για το σχηματισμό της Νορανθρόνης (σχήμα 3.5).^[58,68] Το γονίδιο της PKS (*pksA*, το οποίο μετονομάστηκε σε *afI/C*) θεωρείται ως το πιο καθοριστικό γονίδιο για την ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών.^[69] Και στις δύο περιπτώσεις το εξαιρετικά ασταθές πολυκετιδικό παράγωγο οξειδώνεται, από μία μυκηλιακή οξειδάση που εκφράζεται μόνο υπό συνθήκες ευνοϊκές για το σχηματισμό Αφλατοξινών^[66,70] προς το Νορσολορινικό οξύ (NOR), την πρώτη σταθερή πρόδρομη ένωση της ΑΦΒ₁, η οποία είναι δυνατό να απομονωθεί.^[56] Η ύπαρξη του αλειφατικού τμήματος δίπλα στην κετονομάδα του μορίου του NOR στηρίζει τη νεώτερη θεωρία της εμπλοκής του εξανοϊκού οξέος ως αρχικής ένωσης.^[58] Για τη μετατροπή του NOR στο επόμενο παράγωγο ανθρακινόνης, την Αβεραντίνη (AVN), μεσολαβεί μία κετοαναγωγή, η οποία

μετατρέπει την 1'-κετονομάδα του NOR σε 1' – υδροξυλομάδα στην AVN αντίστοιχα.^[56,57,71] Ακολουθεί η μετατροπή της AVN σε Αβερουφίνη (AVF) μέσω της 5'-υδροξυαβεραντίνης (HAVN), για την οποία έχουν προταθεί δύο εναλλακτικές πορείες. Η πρώτη περιλαμβάνει την αφυδάτωση της HAVN προς τη λακτόνη Αβερουφανίνη (AVNN), η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται προς AVF, ενώ η δεύτερη προϋποθέτει την αφυδρογόνωση της HAVN προς 5'-κετοαβεραντίνη, η οποία μετατρέπεται μέσω μίας αυθόρμητης αντίδρασης κυκλοποίησης προς AVF.^[72] Η οξείδωση της Αβερουφίνης (AVF) μέσω μιας κυτοχρωμικής P450 μονοοξειδάσης^[56] οδηγεί στην οξική ημιακετάλη της Βερσικονάλης (VHA), η οποία δίνει διαδοχικά μέσω εστεροποίησης, κυκλοποίησης και τέλος αποκορεσμού Βερσικονάλη (VAL), Βερσικολορίνη Β (VERB) και Βερσικολορίνη Α (VERA) αντίστοιχα. Το στάδιο δημιουργίας της VERB αποτελεί ένα σημείο-κλειδί στη βιοσυνθετική πορεία της ΑΦΒ₁, καθώς περιλαμβάνει το σχηματισμό του διφουρανικού δακτυλίου, η ύπαρξη του οποίου είναι καθοριστικής σημασίας για την καρκινογόνο και τερατογόνο δράση της τοξίνης. Η μετατροπή της VERB προς VERA μέσω μιας κυτοχρωμικής P450 μονο-οξυγενάσης/αποκορεσμάσης (αντίδραση, η οποία σχηματίζει τον υψίστης σημασίας ακραίο διπλό δεσμό του διφουρανικού δακτυλίου) αποτελεί ένα σημείο διακλάδωσης της πορείας βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών, καθώς διαχωρίζει τη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ και ΑFG₁ από εκείνη της ΑΦΒ₂ και ΑFG₂.^[61,73,74,75,76,77] Στο σημείο αυτό μπορεί να δοθεί η εξήγηση για το γεγονός ότι ο *A.flavus* δεν είναι σε θέση να συνθέτει ΑFG₁ και ΑFG₂ σε αντίθεση με τον *A.parasiticus*. Για τη σύνθεση των συγκεκριμένων Αφλατοξινών από τις πρόδρομες ενώσεις τους, απαιτείται μία κυτοχρωμική P450 οξειδοαναγωγή, τα γονίδια για την έκφραση της οποίας απουσιάζουν από τον *A.flavus*.^[78]

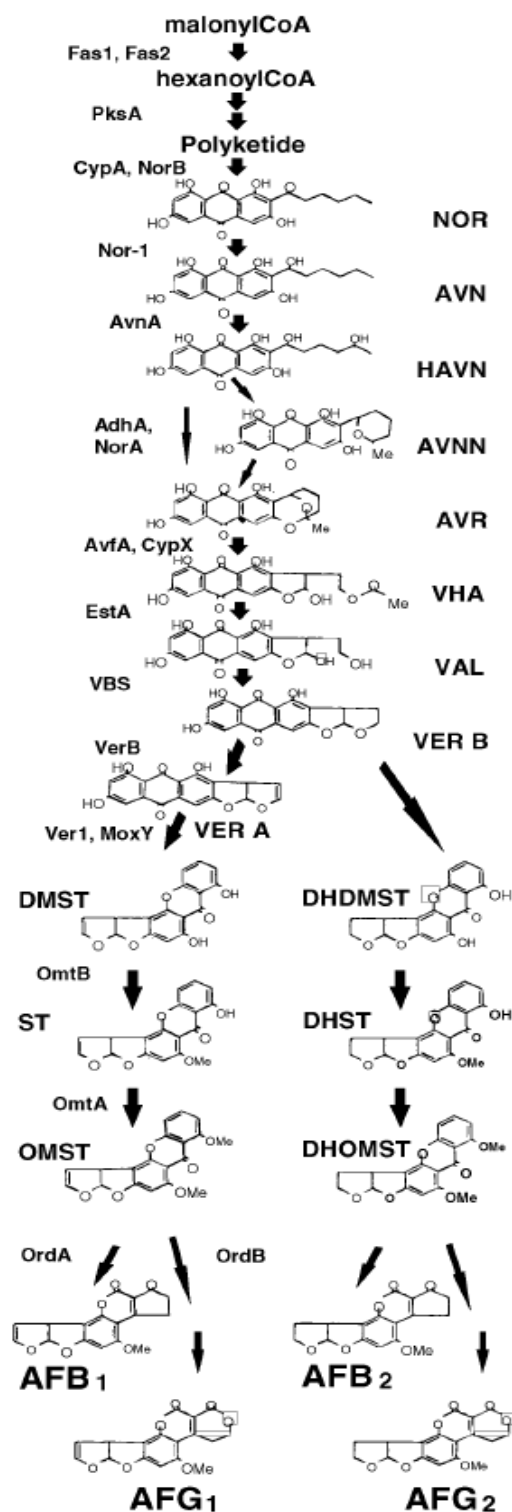
Σημαντικό είναι και το επόμενο βιοσυνθετικό βήμα καθότι περιλαμβάνει την αναδιάταξη της VERA – ενός παραγώγου ανθρακινόνης – στην ξανθική ένωση Διμεθυλοστεριγματοκυστίνη (DMST). Η μετατροπή αυτή περικλείει μία σειρά από οξειδωτικές και αναγωγικές αντιδράσεις που καταλύονται από μία κυτοχρωμική P450 μονοοξυγενάση και μία κετοαναγωγή. Αναλυτικότερα, ο αρωματικός δακτύλιος της VERA διασπάται μέσω μίας αρυλοεποξειδωσης από τη μεσολάβηση ενός κυτοχρώματος P450. Ακολουθεί αναγωγή που καταλύει μία οξειδοαναγωγή για να ξεκινήσει στη συνέχεια ένας δεύτερος κύκλος P450 οξείδωσης – πρόκειται για μία διάσπαση κατά Baeyer Villiger –, η οποία δίνει ύστερα από μία αποκαρβοξυλίωση τη DMST.^[79]

Από την επακόλουθη αντίδραση μεθυλίωσης μέσω της επονομαζόμενης Ο-μεθυλο-τρανσφεράσης Ι προκύπτει η Στεριγματοκυστίνη (ST). Πρόκειται για μία καρκινογόνο και τερατογόνο ένωση, η οποία αποτελεί εκτός από το προτελευταίο στάδιο στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁, το τελικό προϊόν βιοσύνθεσης ενός μεγάλου αριθμού μυκήτων, όπως ο *A.versicolor* και ο *A.nidulans*. Είναι αξιοσημείωτο ότι στην κατανόηση

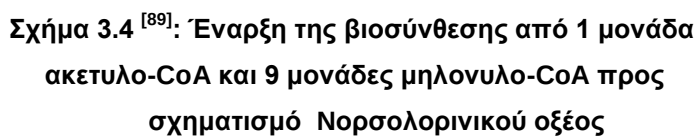
της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό ο όγκος πληροφοριών που υπήρχε σχετικά με τη βιοσύνθεση της ST από τον *A.nidulans*.^[34,59,67] Για τη μετατροπή της ST σε Ο-μεθυλο-στεριγματοκυστίνη (OMST) απαιτείται η συμβολή μίας δεύτερης Ο-μεθυλοτρανσφεράσης II, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *aflP* (*omt-A*). Η απουσία του συγκεκριμένου γονιδίου από τον *A.nidulans* αιτιολογεί την αδυναμία του μύκητα να βιοσυνθέσει Αφλατοξίνες.^[80] Μέχρι πρότινος επικρατούσε η θεωρία πως το τελευταίο βήμα της πορείας βιοσύνθεσης που περιλάμβανε τη μετατροπή της OMST στην ΑΦΒ₁ απαιτούσε μία κυτοχρωμική Ρ450 μονο οξυγενάση *ordA* που κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο *aflQ*, το οποίο φαίνεται ικανό και επαρκές να πραγματοποιήσει το τελευταίο αυτό στάδιο. Οι τελευταίες έρευνες στο παράδειγμα του *A.flavus* απέδειξαν πως η αρυλαλκολο αφυδρογονάση NorA (*aflE*) επηρεάζει τη συσσώρευση Αφλατοξινών στα τελευταία στάδια της βιοσύνθεσης. Απουσία του συγκεκριμένου ενζύμου, σχηματίζεται η αφλατοξικόλη, προϊόν αναγωγής της ΑΦΒ₁, η οποία εύκολα αφυδατώνεται στο όξινο περιβάλλον δίνοντας τη δεοξυ ΑΦΒ₁.^[81] Κατ'αυτόν τον τρόπο μια σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνει οξειδωτική διάσπαση του ξανθικού δακτυλίου, Ο-απομεθυλίωση, αφυδάτωση, αποκαρβοξυλίωση και αναδιάταξη, μετατρέπουν την ξανθική OMST στην κουμαρική ένωση της ΑΦΒ₁ ολοκληρώνοντας την εξαιρετικά σύνθετη αυτή πορεία.^[61,82,83,84,85,86]

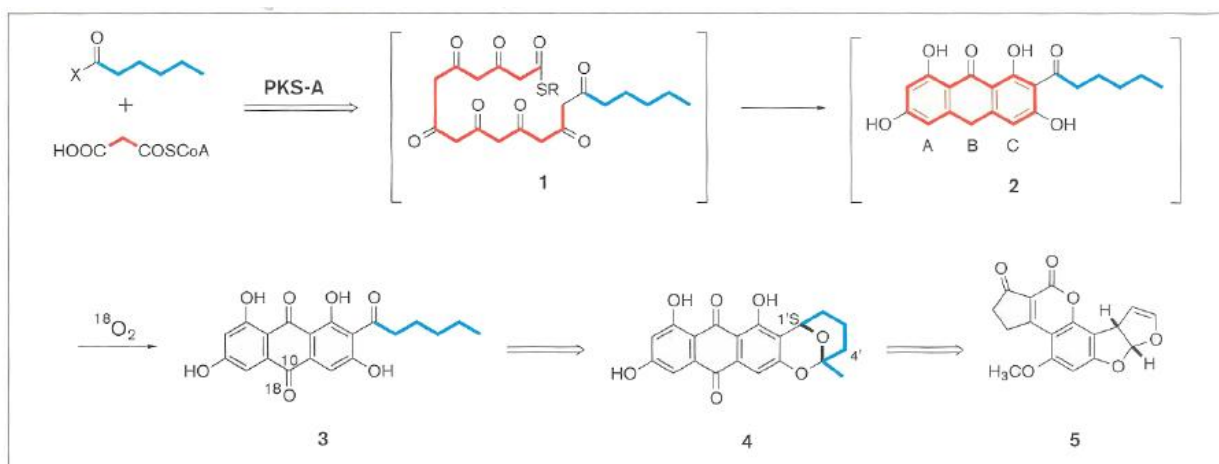
Η πορεία βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ και οι δύο διαφορετικές απόψεις που αφορούν τα αρχικά στάδια της πορείας φαίνονται στα σχήματα 3.3, 3.4 και 3.5 αντίστοιχα.

Ο λόγος της συγκέντρωσης NADPH/NADP (αναβολικό αναγωγικό φορτίο) έχει προταθεί ως παράγοντας πρωτογενούς μεταβολισμού που μπορεί να επιδράσει στη σύνθεση της Αφλατοξίνης. Αρκετά στάδια της βιοσυνθετικής πορείας εξαρτώνται από το NADPH. Επίσης, υψηλός λόγος NADPH/NADP ευνοεί τη σύνθεση λιπαρών οξέων, ενώ αντίθετα, χαμηλός λόγος NADPH/NADP ευνοεί το σχηματισμό πολυκετιδίων.^[66,87,88,89]



Σχήμα 3.3^[56]: Η πορεία βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών, όπου: NOR: Νορσολορινικό οξύ, AVN: Αβεραντίνη, HAVN: 5'-Υδροξυαβεραντίνη, AVNN: Αβερουφανίνη, AVR: Αβερουφίνη, VHA: οξική ημιακετάλη της Βερσικονάλης, VAL: Βερσικονάλη, Ver B: Βερσικολορίνη Β, Ver A: Βερσικολορίνη Α, DMST: Διμεθυλοστεριγματοκυστίνη, ST: Στεριγματοκυστίνη, OMST: Ο-μεθυλο-στεριγματοκυστίνη, AFB₁: Αφλατοξίνη Β₁, AFB₂: Αφλατοξίνη Β₂, AFG₁: Αφλατοξίνη Γ₁, AFG₂: Αφλατοξίνη Γ₂.





Σχήμα 3.5 ^[68]: Το εξανοϊκό τμήμα (μπλε) με το ρόλο εκκινητή συντίθεται από ένζυμο FAS και εν συνεχεία μία PKS ομολογοποιεί μηλονικές ομάδες (κόκκινο) για τη σύνθεση του NOR (3)

3.2.4 Ένζυμα της βιοσυνθετικής πορείας των Αφλατοξινών ^[82,83,84,85,90,91]

Η απομόνωση ενζύμων που καταλύουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών έγινε αρχικά από εκχυλίσματα του μυκηλίου του μύκητα *A.parasiticus*. Οι προσπάθειες αυτές όμως απέτυχαν καθώς οι συγκεντρώσεις των ενζύμων ήταν μικρές και ο χρόνος ζωής τους ελάχιστος. Με την ανάπτυξη όμως πιο σύγχρονων τεχνικών, οι οποίες πετύχαιναν διάσπαση μεγάλων ποσοτήτων μυκηλίων και παραλαβή δραστικών και σταθερών ελεύθερων κυττάρων, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση πολλών ενζύμων της πορείας αυτής. Η ανάκτηση των ενζύμων έγινε με την άλεση και την εκχύλιση ποσοτήτων ελεύθερων κυττάρων κάτω από υγρό άζωτο. Ο βέλτιστος χρόνος της καλλιέργειας των μυκήτων για την απομόνωση των συγκεκριμένων ενζύμων είναι 72-74 ώρες.

Κάποια από τα ένζυμα που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα και εμπλέκονται σε διάφορα ενδιάμεσα στάδια της βιοσυνθετικής πορείας των Αφλατοξινών αναφέρονται παρακάτω:

- Μία αναγωγή που ανάγει το NOR προς AVN και ένα ισοένζυμό της (42 kDa)
- Το ένζυμο HAVN αφυδρογονάση που καταλύει τη μετατροπή της HAVN σε ένα ενδιάμεσο, την 5' - οξοαβεραντίνη (OAVN)
- Η κυκλάση OAVN που μετατρέπει το προαναφερθέν ενδιάμεσο σε AVF
- Δύο μεθυλοτρανσφεράσες (168 kDa και 40 kDa) που καταλύουν τη μετατροπή της ST σε OMST
- Μία κυτοχρωμική P450 μονοοξυγενάση (60,2 kDa) που καταλύει στο τελευταίο βιοσυνθετικό στάδιο τη μετατροπή της OMST σε ΑΦΒ₁.

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών

Τα τελευταία χρόνια γίνονται εντατικές έρευνες για την εύρεση των παραγόντων που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Το ενδιαφέρον, όπως ήταν αναμενόμενο, εστιάζεται στους παράγοντες που δρουν ανασταλτικά, όπως και στο κατά πόσο αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ώστε να ελεγχθεί και κατά συνέπεια να περιοριστεί η βιοσύνθεση των Αφλατοξινών στα τρόφιμα. Πολλοί από τους παράγοντες αυτούς επιτυγχάνουν την αναστολή της βιοσύνθεσης των τοξινών προκαλώντας μία σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μύκητα, ενώ άλλοι δρουν χωρίς να επηρεάζουν τη μυκηλιακή ανάπτυξη. Σε γενικές γραμμές η βιοσύνθεση των Αφλατοξινών επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, οι οποίες περιγράφονται στα ακόλουθα υποκεφάλαια.

3.3.1 Βιολογικοί παράγοντες

Στους βιολογικούς παράγοντες ξεχωριστή θέση κατέχουν ορισμένοι μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium aurantiacum* και οι μύκητες *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Phoma sp.* και *Trichoderma sp.* που, όταν συνυπάρχουν με τους *A.flavus* ή *A.parasiticus* εμποδίζουν την ανάπτυξή τους και/ή την παραγωγή Αφλα-τοξινών.^[48,92] Αυτό επιτυγχάνεται είτε μέσω του ανταγωνισμού για θρεπτικό υλικό είτε με την παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων.

3.3.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι κυριότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών είναι: α) η θερμοκρασία, β) η ενεργότητα νερού (a_w), γ) το pH και δ) το διαθέσιμο οξυγόνο.

Σύμφωνα με μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η μέγιστη παραγωγή Αφλατοξινών πραγματοποιείται στους 24°C, ενώ στους 7°C και 41°C ο *A.flavus* δεν παράγει Αφλατοξίνες ακόμη και σε διάστημα 12 εβδομάδων.^[47] Οι τιμές της θερμοκρασίας καθορίζουν επίσης τις αναλογίες των B και G Αφλατοξινών. Έτσι, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παράγονται μεγαλύτερα ποσά G, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες (>30°C) η βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ είναι εκείνη που κυριαρχεί.^[93]

Όσον αφορά το pH, έχει βρεθεί ότι οι μεγαλύτερες ποσότητες Αφλατοξινών παράγονται σε pH = 6, ενώ σε pH = 4 παρατηρείται δραματική μείωση (περίπου 50%) στα ποσοστά των παραγόμενων Αφλατοξινών.

Επίσης, σημαντικό παράγοντα για τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών αποτελεί και η ενεργότητα νερού (a_w) σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία και το διαθέσιμο οξυγόνο. Η μέγιστη παραγωγή ΑΦΒ₁ σε φυστίκια παρατηρήθηκε σε a_w = 0,94 και οξυγόνο 10%.^[94]

Γενικότερα έχει βρεθεί ότι μείωση του διατιθέμενου οξυγόνου προκαλεί μείωση στην παραγωγή των Αφλατοξινών.

Καθοριστικό παράγοντα αποτελούν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες, στις οποίες η σοδιά καλλιεργείται και αποθηκεύεται. Η υγρασία σε συνδυασμό με υψηλές θερμοκρασίες αποτελούν συνθήκες ευνοϊκές για την επικράτηση τοξινογόνων μυκήτων και επομένως και τη βιοσύνθεση Αφλατοξινών.

3.3.3 Χημικοί παράγοντες

Από τους χημικούς παράγοντες αξίζει να αναφερθούν κάποιες χημικές ενώσεις, οι οποίες έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών συνήθως επιδρώντας αρνητικά και στη μυκηλιακή ανάπτυξη.^[95] Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στις εξής κατηγορίες:

- εντομοκτόνα-φυτοφάρμακα, όπως τα γνωστά με τις εμπορικές ονομασίες dichlorvos,^[77] CME 134 και Dowco 439^[95]
- επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. Triton X-100)^[96]
- συντηρητικά και πρόσθετα τροφίμων, όπως η διακετάλη (2,3-βουτανοδιόνη),^[97] το σορβικό, το προπιονικό, το κιτρικό και το βενζοϊκό οξύ,^[66,98] επίσης το BHA και το BHT. Η διακετάλη που χρησιμοποιείται ως αρωματική ουσία στο βούτυρο, στον καφέ και στο κρασί, έχει βρεθεί ότι καταστέλλει την ανάπτυξη και την παραγωγή τοξινών από τους *A.flavus* και *A.ochraceus*.

Επίσης, έρευνες που αφορούσαν κατεργασία πολτού από φυστίκια με διάφορες ποσότητες προπιονικού οξέος, όξινου θειώδους νατρίου και υδροξειδίου του νατρίου οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι σε 0,5% του επιπέδου κατεργασίας με προπιονικό οξύ ή 1% του επιπέδου κατεργασίας με όξινο θειώδες νάτριο, σε 10% υγρασία και θερμοκρασία δωματίου, αναστέλλεται πλήρως τόσο η μυκηλιακή ανάπτυξη, όσο και η παραγωγή ΑΦΒ₁. Από τις προαναφερόμενες τρεις χημικές ουσίες που μελετήθηκαν ως αναστολείς του μύκητα, το προπιονικό οξύ βρέθηκε το πλέον αποτελεσματικό, ακολουθεί το όξινο θειώδες νάτριο και τέλος το υδροξείδιο του νατρίου.^[99]

3.3.4 Σύσταση υποστρώματος

Η σύσταση του υποστρώματος αποτελεί μία ακόμη σημαντική παράμετρο. Έχει βρεθεί ότι η παραγωγή Αφλατοξινών διεγείρεται με υψηλά επίπεδα υδατανθράκων και χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών.^[47] Σε αντίθεση με πολλούς άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες, η βιοσύνθεση των Αφλατοξινών ευνοείται ιδιαίτερα από την παρουσία απλών υδατανθράκων, όπως η γλυκόζη, η σακχαρόζη, η φρουκτόζη, η σορβιτόλη, η μαλτόζη και η ξυλόζη.^[59,66,87,100] Το ελαϊκό και το φουμαρικό οξύ συνεργούν στη μυκηλιακή ανάπτυξη, αλλά όχι και στη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Επίσης, ο *A.parasiticus*

παρατηρήθηκε ότι δεν έχει την ικανότητα να παράγει Αφλατοξίνες παρουσία σύνθετων πηγών άνθρακα, όπως αυτές της σορβόζης, πεπτόνης, μη διαλυτού αμύλου, γλυκεριναλδεϋδης, γαλακτόζης, μανιτόλης ή λακτόζης.^[100,101] Αντίθετα, η παρουσία οργανικού αζώτου (yeast extract) διεγείρει τη σύνθεση των τοξινών, όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα.^[101]

Απαραίτητα για την ανάπτυξη μυκήτων είναι τα ιχνοστοιχεία K, Ca, Fe, Mn, Mg, Cu, Zn και Mo, τα οποία λειτουργούν και ως ενεργοποιητές ενζύμων. Ιδιαίτερη σημασία για το δευτερογενή μεταβολισμό έχει ο ψευδάργυρος (Zn) – η παρουσία του στα πρώτα στάδια ανάπτυξης είναι ουσιώδης για να ακολουθήσει παραγωγή τοξινών. Ο Zn θεωρείται ότι ευνοεί τη βιοσύνθεση πολυκετιδίων αντί εκείνη των λιπαρών οξέων, καθώς παρεμποδίζει το σχηματισμό NADPH αναστέλλοντας τη δράση δύο αφυδρογονασών.^[89,102]

Είναι επίσης πιθανό τα ιόντα Zn^{2+} να διεγείρουν τη γλυκόλυση κατά τη φάση στασιμότητας, εξασφαλίζοντας επαρκές ακετύλο-CoA για τη βιοσύνθεση Αφλατοξινών μέσω της πολυκετιδικής οδού.^[35] Παρατηρήθηκε ότι όταν ο Zn^{2+} προστεθεί νωρίς στη φάση ανάπτυξης, διεγείρει τη σύνθεση Βερσικολορίνης, η οποία ως γνωστό αποτελεί ενδιάμεση ένωση της ΑΦΒ₁.^[66,101] Έχει ακόμη αναφερθεί ότι η έλλειψη Zn (λόγω εξάντλησης των θρεπτικών υλικών) είχε σαν αποτέλεσμα πολύ μειωμένη έκκριση Αφλατοξίνης στο μέσο καλλιέργειας, ενώ το μυκήλιο περιείχε μεγάλες ποσότητες της τοξίνης. Είναι πιθανό λοιπόν, ο Zn να απαιτείται για την έκχυση της Αφλατοξίνης στο μέσο.^[103] Θεωρείται επίσης πιθανό ο Zn να συμμετέχει σε μερικά ενζυμικά συστήματα, υπεύθυνα για τη συμπύκνωση των οξικών ομάδων στο σχηματισμό πολυκετιδίων. Καθώς η βιοσύνθεση των Αφλατοξινών και των λιπαρών οξέων συνδέονται, είναι πιθανό η συνθετάση των λιπαρών οξέων στον *A.parasiticus* να μετατρέπεται, παρουσία Zn, σε συνθετάση των πολυκετιδίων – είναι άλλωστε γνωστό ότι πρόκειται για δύο ενζυμικά συστήματα με πάρα πολλές ομοιότητες στη δομή και τις περιοχές καταλυτικής δραστηριότητας.^[64,66,101]

Από τις βιταμίνες, το σύμπλεγμα των βιταμινών B έχει διεγερτική δράση στη σύνθεση των Αφλατοξινών. Η επίδραση αυτή αποδίδεται στη θειαμίνη, τη βιοτίνη και τη νιασίνη. Η θειαμίνη μετατρέπεται σε πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP). Η TPP είναι ένα συνένζυμο υπεύθυνο για έναν αριθμό αντιδράσεων τρανσκετολάσης, όπου μετατρέπονται σε κετονοξέα -όπως το πυροσταφυλικό οξύ- και σε ακετύλο-CoA. Καθώς η τελευταία αυτή ένωση αποτελεί πρόδρομη ένωση των Αφλατοξινών, δεν αποκλείεται ο μηχανισμός αυτός να εξηγεί τη διεγερτική επίδραση της θειαμίνης στη σύνθεση των Αφλατοξινών.^[101]

Έχει βρεθεί, τέλος, ότι η παραγωγή των Αφλατοξινών επηρεάζεται και από το στάδιο ωρίμανσης. Πιο συγκεκριμένα, από έρευνες που έχουν γίνει σε είδη φρούτων που καλλιεργούνται και καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες κυρίως σε Ισλαμικές χώρες,

έχει παρατηρηθεί ότι ποσότητες ΑΦΒ₁ εμφανίζονται μόνο στα αρχικά στάδια ωρίμανσης, ενώ στο τελικό στάδιο δεν εντοπίστηκαν μύκητες του γένους *Aspergillus* αλλά ούτε και Αφλατοξίνες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι στο στάδιο αυτό παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση των σακχάρων σε συνδυασμό με τη μειωμένη ενεργότητα νερού.^[104]

3.3.5 Φυσικά προϊόντα και εκχυλίσματα φυτών

Μια άλλη κατηγορία που έχει ελεγχθεί για την ανασταλτική της δράση έναντι των τοξινογόνων μυκήτων και των μεταβολιτών τους, είναι τα φυσικά προϊόντα. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τέτοιου είδους δράση εμφανίζουν τα εξής προϊόντα:

- Τα έλαια της κανέλλας και του γαρύφαλλου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 mg/mL, με την κανέλλα να εμφανίζει μεγαλύτερη αναστολή. Τα συστατικά του ελαίου της κανέλλας που είναι υπεύθυνα για την αναστολή φαίνεται να είναι η κινναμωμική και η ο-μεθοξικινναμωμική αλδεΐδη, καθώς και η ευγενόλη.^[105,106,107]
- Αιθέρια έλαια από λεμόνι, γεράνι, μαντζουράνα, μοσχοκάρυδο, βραζιλιάνικη ποικιλία πιπεριού και φύλλα από τα φυτά *santonica* και *hazanbal*, των οποίων τα κύρια συστατικά είναι αλειφατικές αλδεΐδες και αλκοόλες, κυκλικές μονοτερπενικές αλκοόλες και αρωματικοί και αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, προκαλούν μείωση της παραγωγής Αφλατοξινών.^[95,108]
- Ανθοκυανίδες και τα φλαβονοειδή δρουν επίσης ανασταλτικά.^[109]
- Η καφεΐνη αναστέλλει τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών πιθανότατα παρεμποδίζοντας τη λήψη υδατανθράκων που χρησιμοποιεί ο μύκητας για να συνθέσει τις συγκεκριμένες τοξίνες.^[110,111]
- Συστατικά του ελαιόκαρπου με αντιμικροβιακή δράση, όπως καφεϊκό, ο-κουμαρικό οξύ και ελευρωπαΐνη, προκάλεσαν έως και 90% αναστολή στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε εκχυλίσματα ελιάς.^[112]
- Έλαια εκχυλιζόμενα από δύο ποικιλίες φυτών θυμαριού (*Thymus eriocalyx* και *Thymus x-porlock*) προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα *A.parasiticus* και της παραγωγής ΑΦΒ₁. Τα κυριότερα συστατικά των ελαίων του *T. eriocalyx* και του *T. x-porlock* είναι η θυμόλη (64,3 και 30,7% αντίστοιχα), η φελλανδρίνη (13,2 και 39,4% αντίστοιχα) και η ένωση *cis-sabinene hydroxide* (8,4 και 9,7% αντίστοιχα).^[113]

Τα τελευταία χρόνια όλη η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην αντικατάσταση των αντιμυκητιακών και των χημικών ουσιών με ανασταλτική δράση στην παραγωγή ΑΦΒ₁, με φυσικά παράγωγα.

3.4 Παράγοντες που επιδρούν στην αποικοδόμηση των Αφλατοξινών

3.4.1 Εισαγωγή

Οι μελέτες για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές ολοένα και αυξάνονται, υπαγορεύοντας έτσι την επείγουσα ανάγκη για εύρεση πρακτικών και οικονομικών διαδικασιών αποτοξικοποίησης των προϊόντων αυτών. Οι ιδανικές μέθοδοι δε θα πρέπει απλώς να μειώνουν τις συγκεντρώσεις των τοξινών σε ασφαλή επίπεδα, αλλά θα πρέπει ταυτόχρονα να μην παράγουν τοξικά προϊόντα αποικοδόμησης των μυκοτοξινών και οπωσδήποτε να μην υποβαθμίζουν σε καμία περίπτωση την ποιότητα του τροφίμου με τη μείωση της διατροφικής του αξίας. Ένας μεγάλος αριθμός προσεγγίσεων έχει πραγματοποιηθεί προς την κατεύθυνση αυτή, όμως ορισμένες μόνο από αυτές έχουν πρακτική εφαρμογή. Οι έρευνες για την αποικοδόμηση των μυκοτοξινών εστιάζονται περισσότερο στις Αφλατοξίνες. Η αποικοδόμηση αυτή μπορεί να λάβει χώρα με την επίδραση βιολογικών, χημικών και φυσικών παραγόντων.

3.4.2 Φυσική αποικοδόμηση

Οι φυσικοί παράγοντες που επιδρούν στην αποικοδόμηση των Αφλατοξινών είναι α) η θερμότητα, β) η ακτινοβολία και γ) οι προσροφητικές ουσίες.

Οι Αφλατοξίνες είναι αρκετά σταθερές στη θερμότητα. Οι Peers και Linsell παρατήρησαν ότι η ΑΦΒ₁ δεν αποικοδομείται σε φυστίκια και καλαμποκέλαιο μέχρι η θερμοκρασία να πλησιάσει τους 250°C.^[114] Επίσης, η περιεχόμενη υγρασία του τροφίμου που πρόκειται να υποστεί θερμική επεξεργασία, είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την αποικοδόμηση των Αφλατοξινών. Οι Mann et al., μελέτησαν την επίδραση που έχει η θερμότητα και η υγρασία στις Αφλατοξίνες σε σπορέλαια και παρατήρησαν ότι αύξηση της περιεχόμενης υγρασίας οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας αποικοδόμησης των Αφλατοξινών, όταν η θερμοκρασία και ο χρόνος θερμικής επεξεργασίας κρατούνται σταθερά και δε διακόπτονται.^[115]

Όσον αφορά την ακτινοβολία, οι Αφλατοξίνες είναι ευαίσθητες στην υπεριώδη ακτινοβολία, όμως η πρακτική επεξεργασία των τροφίμων με αυτήν την ακτινοβολία, προκειμένου να καταστραφούν οι τοξίνες αυτές, είναι αμφισβητήσιμη. Ο Feuill ανέφερε ότι όταν ένα λεπτό στρώμα 10cm από φυστίκια εκτεθεί σε μια πηγή UV για 8h, καμία ορατή μεταβολή δεν προκαλείται στον φθορισμό της τοξίνης. Επίσης, όταν εκχυλίσματα από αυτά τα επεξεργασμένα με UV φυστίκια δόθηκαν σε πάπιες, αυτές πέθαναν μετά από λίγες μέρες με οργανική βλάβη στο ήπαρ, χαρακτηριστική αυτής που προκαλεί η Αφλατοξίνη.^[116]

Η γ-ακτινοβολία δεν καταστρέφει την Αφλατοξίνη, όπως απέδειξαν έρευνες χρησιμοποιώντας και πάλι ως υπόστρωμα τα φυστίκια. Αυτό συμβαίνει γιατί πολύπλοκες οργανικές ουσίες, όπως είναι οι Αφλατοξίνες, σπάνια μπορούν να αποικοδομηθούν από

ακτίνες γ άμεσα. Αντίθετα όμως, είναι δυνατό να υπάρξει μια έμμεση επίδραση, σύμφωνα με την οποία η ακτινοβολία αυτή προκαλεί ραδιόλυση του νερού του τροφίμου αποδίδοντας ελεύθερες ρίζες που εν συνεχεία αντιδρούν με τα οργανικά μόρια.^[117]

Τέλος, προσροφητικές ουσίες, όπως ο ενεργός άνθρακας ή ο μπεντονίτης μπορούν να απομακρύνουν με φυσικό τρόπο την Αφλατοξίνη από υγρά τρόφιμα.^[66,117]

3.4.3 Χημική αποικοδόμηση

Ένα πλήθος χημικών ουσιών που είναι ικανές να αποικοδομήσουν τις Αφλατοξίνες έχει μελετηθεί. Πρόκειται συγκεκριμένα για τις εξής κατηγορίες:

- *Οξέα και βάσεις.* Οι Αφλατοξίνες καταστρέφονται από υδατικά διαλύματα ισχυρών οξέων και βάσεων. Ισχυρά οξέα καταλύουν την προσθήκη νερού στην ΑΦΒ₁ και την μετατρέπουν σε ένα υδροξυ ανάλογο της ΑΦΒ₂, την ΑΦΒ_{2α}. Μάλιστα, όσο πιο χαμηλό είναι το pH, τόσο αποτελεσματικότερη είναι και η αποικοδόμηση. Μια ποικιλία οργανικών και ανόργανων βάσεων έχουν μελετηθεί για την επίδρασή τους στις Αφλατοξίνες. Από αυτές η αμμωνία παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον τόσο λόγω της επίδρασής της, όσο και του χαμηλού κόστους της. Η προσθήκη της ανοίγει το δακτύλιο της λακτόνης, ενώ η αποκαρβοξυλίωση που ακολουθεί δεν επιτρέπει την αναγέννηση της τοξίνης. Η αμμωνία μειώνει δραστικά την περιεχόμενη Αφλατοξίνη σε πολλά τρόφιμα (π.χ. σε καλαμπόκι).^[118,119]
- *Οξειδωτικοί παράγοντες.* Ένας μεγάλος αριθμός οξειδωτικών καταστρέφουν τις Αφλατοξίνες, αλλά μόνο ένας περιορισμένος αριθμός είναι κατάλληλος να χρησιμοποιηθεί στα τρόφιμα.^[118] Η επεξεργασία του γάλακτος με μικρά ποσά υπεροξειδίου του υδρογόνου, μπορεί να αντικαταστήσει τη διαδικασία της παστερίωσης και είναι αποδεκτή, όταν το γάλα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή ορισμένων τύπων τυριού.^[117] Ο συνδυασμός υπεροξειδίου του υδρογόνου, ριβοφλαβίνης και παστερίωσης έχει βρεθεί ότι καταστρέφει το 98% της υπάρχουσας ΑΦΜ₁, ενώ ο κάθε παράγοντας χωριστά έχει μικρή επίδραση. Αν και ο μηχανισμός δράσης τους είναι άγνωστος, η αποτελεσματικότητά τους ενδέχεται να οφείλεται στην ικανότητα δημιουργίας οξυγόνου απλής ενεργειακής κατάστασης (singlet), το οποίο αντιδρά άμεσα με τα τμήματα ενώσεων που περιέχουν υψηλή πυκνότητα ηλεκτρονίων και θα μπορούσε επομένως να αντιδράσει με το διπλό δεσμό του δακτυλίου του διϋδροφουρανικού δακτυλίου στο μόριο της ΑΦΜ₁ αλλάζοντας με τον τρόπο αυτό τη δομή του μορίου. Επίσης, τα θειώδη που είναι συνήθη πρόσθετα σε τρόφιμα, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλά και αποικοδομούν την ΑΦΒ₁.

3.4.4 Βιολογική αποικοδόμηση

Πάνω από 1000 μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες) είναι σε θέση να αποικοδομήσουν ή να απομακρύνουν την Αφλατοξίνη. Ανάμεσά τους ένα βακτήριο, το *Flavobacterium aurantiacum*, μπορεί να απομακρύνει μη αντιστρεπτά την AFB₁ και την AFM₁ από υδατικά διαλύματα και από φυσικά επιμολυσμένο γάλα, αντίστοιχα.

Ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να μετασχηματίζουν την AFB₁ σε Αφλατοξίνη R₀, η οποία είναι 18 φορές λιγότερο τοξική από τη B₁, όπως έδειξαν ιστοπαθολογικές έρευνες. Αυτός ο μετασχηματισμός είναι αργός και κατά κανόνα ατελής. Πραγματοποιείται δε από τους μικροοργανισμούς *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Mucor ambiguous*, *Dactylium dendroides*, *Mucor griseocyanus*, *Absidia repens*, *Mucor alternans*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* κ.α. [117,120,121,122]

Αξιοσημείωτα είναι τα συμπεράσματα ερευνών που αναφέρουν ότι οι μύκητες που παράγουν Αφλατοξίνες έχουν τη δυνατότητα και να τις διασπούν. Πολλοί ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι αποικίες του *A.parasiticus* και του *A.flavus* αφού παράγουν τη μέγιστη ποσότητα Αφλατοξινών, αρχίζουν να τις αποικοδομούν καθώς συνεχίζεται η επώαση των αποικιών. Η ικανότητα των *Aspergilli* να αποικοδομούν την Αφλατοξίνη εξαρτάται από: [117,123,124]

- *Την ηλικία του μυκηλίου.* Ένα μυκήλιο 8-10 ημερών δείχνει γενικά μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη διάσπαση της Αφλατοξίνης.
- *Τη διάσπαση του μυκηλίου.* Τεμαχισμένα ή από ανάδευση προερχόμενα μυκήλια διασπούν με ενεργό τρόπο την τοξίνη.
- *Τη φύση του υποστρώματος.* Ένα υπόστρωμα που ευνοεί τη δυναμική ανάπτυξη του μύκητα, δημιουργεί μυκήλια με τη μέγιστη ικανότητα να αποικοδομούν την Αφλατοξίνη.
- *Το στέλεχος του A.flavus και του A.parasiticus.* Τοξινογόνα στελέχη που παράγουν μεγάλες ποσότητες Αφλατοξίνης, διασπούν περισσότερο την τοξίνη τους.
- *Την ποσότητα του μυκηλίου.* Η ταχύτητα της αποικοδόμησης αυξάνεται, καθώς αυξάνεται και η ποσότητα και είναι μεγαλύτερη μόλις έχει δημιουργηθεί η μέγιστη ποσότητα της τοξίνης.
- *Τη θερμοκρασία.* Μέγιστη αποικοδομητική δραστηριότητα παρατηρείται στους 28°C.
- *Το pH.* Ευνοϊκότερη περιοχή είναι από 5 έως 6,5.

Όλες οι μέχρι τώρα έρευνες συγκλίνουν στην άποψη ότι η διάσπαση της Αφλατοξίνης είναι μια διαδικασία που ενεργοποιείται από τον ίδιο το μύκητα μέσω ενζύμων που

απελευθερώνονται κατά τη μυκηλιακή λύση. Επειδή όμως ο ρυθμός διάσπασης της τοξίνης δεν υποστηρίζει την πιθανότητα η Αφλατοξίνη να διασπάται απ' ευθείας λόγω ενζυμικής δραστηριότητας, πιστεύεται ότι ένα ή περισσότερα ένζυμα σχηματίζουν παραπροϊόντα ή τελικά προϊόντα που αντιδρούν με τις Αφλατοξίνες. Τέτοια ένζυμα μπορεί να είναι:

- Η υπεροξειδάση, η οποία καταλύει την αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελευθέρων ριζών που μπορούν να αντιδράσουν με την Αφλατοξίνη.^[117,125]
- Η μυελοϋπεροξειδάση, η οποία σχηματίζει παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και ιόντων χλωρίου, υποχλωριώδες οξύ και οξυγόνο απλής ενεργειακής κατάστασης, για τα οποία είναι γνωστό ότι καταστρέφουν την Αφλατοξίνη.^[117]
- Η κυτοχρωμική P450 μονοοξυγενάση, η δράση της οποίας συνδέεται με την αποικοδομητική δραστηριότητα του *A.flavus* χωρίς πάντως να είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου για τη συγκεκριμένη περίπτωση.^[126]

3.5 Τοξική δράση των Αφλατοξινών

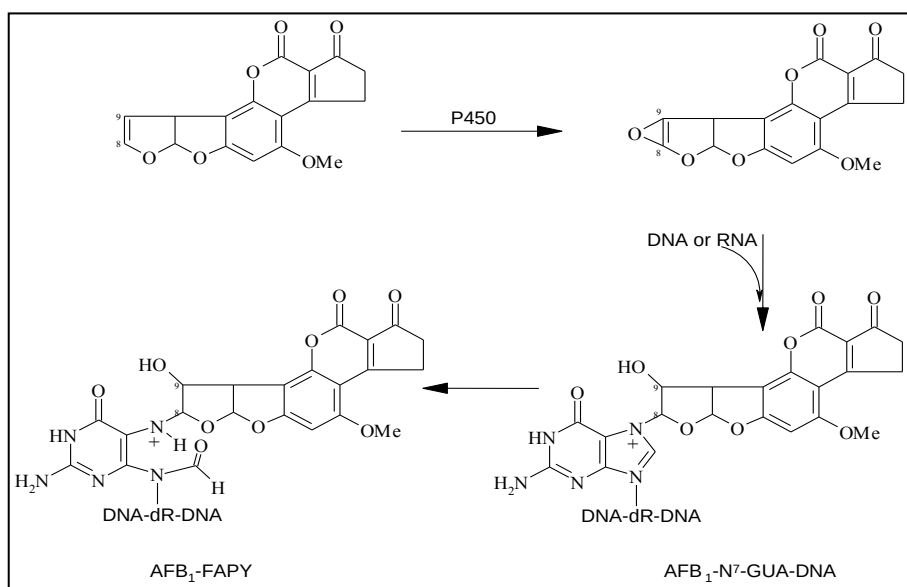
Παρά το γεγονός ότι το πρόβλημα της μόλυνσης των μυκοτοξινών τοποθετείται χρονικά σε πολύ παλιές ήδη εποχές, ήταν η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός της ΑFB₁ ως της πλέον ισχυρής φυσικά παραγόμενης καρκινογόνου ουσίας στις αρχές της δεκαετίας του '60 που προκάλεσε το έντονο ενδιαφέρον των επιστημόνων και έδωσε μια νέα ώθηση στην έρευνα γύρω από τις μυκοτοξίνες. Η τοξικότητα των Αφλατοξινών διακρίνεται σε οξεία και χρόνια. Η οξεία συνίσταται κυρίως από αιμορραγίες και οφείλεται κατά κύριο λόγο στον κουμαρινικό πυρήνα τους.

Η χρόνια τοξικότητα, συνίσταται από καρκίνο του ήπατος και τερατογενέσεις, αυξάνοντας τη συχνότητα των χρωμοσωμικών διαταραχών στο μυελό των οστών και υποβοηθώντας γονιδιακές μεταλλάξεις. Αυτή η τοξικότητα οφείλεται στην παρουσία ενός διπλού δεσμού στον ακραίο φουρανικό δακτύλιο. Ο διπλός αυτός δεσμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των Αφλατοξινών στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, οι Αφλατοξίνες μετά την είσοδό τους στον οργανισμό κατευθύνονται στο συκώτι, όπου ενεργοποιούνται από το κυτόχρωμα P450NF σχηματίζοντας ένα AFB₁-8,9-εξω-εποξειδίο και ένα AFB₁-8,9-ένδο-εποξειδίο, είναι όμως το έξω-εποξειδίο, το οποίο προκαλεί καρκινογένεση και τερατογένεση. Το ενδιάμεσο αυτό ακολουθεί μία από τις παρακάτω πορείες:

- I. μετατρέπεται σε υδροξυλιωμένα παράγωγα, τα οποία αποβάλλονται
- II. προσδένεται ομοιοπολικά σε DNA ή RNA
- III. σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με πρωτεΐνες

Στη δεύτερη περίπτωση το παράγωγο DNA-εποξειδίου σχηματίζεται μέσω πυρηνόφιλης προσβολής κυρίως από το N-7 της βάσης της γουανίνης. Έτσι η Αφλατοξίνη εισχωρεί στη διπλή έλικα του DNA με αποτέλεσμα την καρκινογένεση και την τερατογένεση.^[127] Η κύρια σύζευξη Αφλατοξίνης – DNA που σχηματίζεται αρχικά, βρέθηκε ότι είναι η 8,9-διϋδρο-8-(N⁷-γουανυλ)-9-υδροξυ-Αφλατοξίνη B₁ (ΑΦΒ₁-N⁷-GUA). Μελέτες κινητικής in vivo έδειξαν ότι η ΑΦΒ₁-N⁷-GUA υπόκειται σε γρήγορη μείωση στο συκώτι, εξαιτίας της αυθόρμητης υδρόλυσης του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Η ένωση που συνενώνεται με το DNA και συσσωρεύεται στο συκώτι, ταυτοποιήθηκε ως η 8,9-διϋδρο-8-(N⁷-φορμυλο-2',5',6'-τριαμινο-4'-οξο-N⁵-πυριμιδυλο) -9-υδροξυ-Αφλατοξίνη B₁ (ΑΦΒ₁-FAPY)^[47] (σχήμα 3.6)

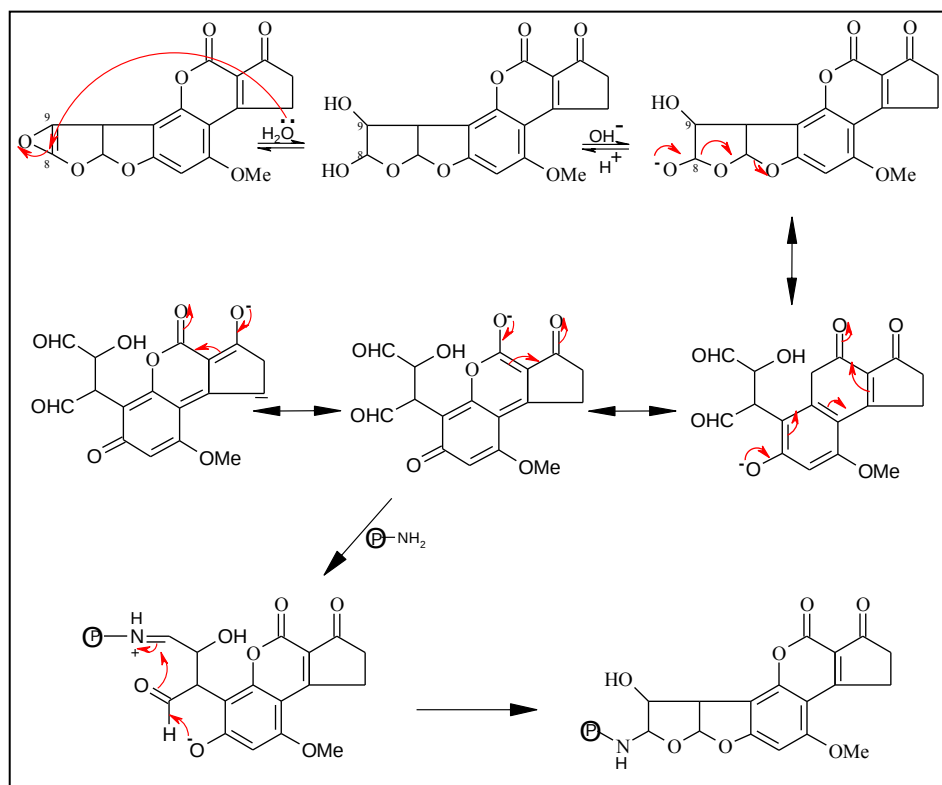
Στην τρίτη περίπτωση, το εποξειδίου της Αφλατοξίνης μετά από υδρόλυση μετατρέπεται σε ΑΦΒ₁-8,9-διϋδροδιόλη, η οποία σταθεροποιείται με συντονισμό (σχήμα 3.7). Οι αλδεϋδικές ομάδες μπορούν στη συνέχεια να σχηματίσουν μια βάση Schiff με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών.



Σχήμα 3.6: Μηχανισμός εισαγωγής Αφλατοξινών στο DNA

Τελευταία, γίνονται προσπάθειες να μελετηθούν τοξικές ουσίες, είτε μόνες τους, είτε σε συνδυασμό με άλλες. Στο παρελθόν, πειράματα σε πιθήκους, στους οποίους χορηγήθηκε κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA) και ΑΦΒ₁ έδειξαν ότι δεν υπάρχει συνεργιστική δράση των δύο τοξινών. Επίσης, διαπιστώθηκε πως η χορήγηση ΑΦΒ₁ σε υψηλές ποσότητες είχε σαν αποτέλεσμα γρηγορότερα εξελισσόμενες οργανικές βλάβες και γρηγορότερο θάνατο σε σχέση με τη χορήγηση υψηλών ποσοτήτων CPA στα ίδια πειραματόζωα.^[128]

Ο ρόλος της Αφλατοξίνης στην καρκινογένεση των ανθρώπων, περιπλέκεται με την μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV). Ένας αριθμός επιδημιολογικών ερευνών έχει δείξει μια θετική συσχέτιση μεταξύ της προσλαμβανόμενης Αφλατοξίνης από τη διατροφή και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) σε πολλές περιοχές της Γης (Κίνα, Κένυα, Ν.Αφρική κ.α.). Ωστόσο η επικράτηση της μετάδοσης της HBV έχει βρεθεί επίσης, ότι έχει συναφή σχέση με την εμφάνιση HCC στις ίδιες περιοχές. Συνεπώς, είναι πολύ δύσκολο να διαφοροποιηθούν οι ρόλοι των δύο αυτών κύριων παραγόντων (HBV, ΑΦΒ₁), στους οποίους οφείλεται η παθογένεση HCC. Σύμφωνα πάντως με έρευνες, ίσως πιο σημαντικές επιπτώσεις για το ήπαρ να προκαλεί η Αφλατοξίνη.^[129] Η εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου που έχουν συσχετισθεί με την ΑΦΒ₁ οφείλεται στη μετάθεση G → T στη 3^η θέση του κωδικονίου 249 του γονιδίου p53. Η διαφοροποιημένη αλληλουχία του ογκοκατασταλτικού αυτού γονιδίου μπορεί να προκαλέσει καρκινογενέσεις.^[130,131]



Σχήμα 3.7: Πορεία υδρόλυσης του εποξειδίου της ΑΦΒ₁

3.6 Μέτρα περιορισμού των Αφλατοξινών στα τρόφιμα ^[132]

Η μόλυνση τροφίμων και ζωοτροφών με βιοτοξίνες, όπως μυκοτοξίνες, είναι ένα υψίστης σημασίας ζήτημα που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας, όσον αφορά τρόπους αντιμετώπισης και επιτρεπτά όρια της παρουσίας των μυκοτοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές.

Τα επιτρεπτά όρια παρουσίας μυκοτοξινών στα τρόφιμα προκύπτουν από συνδυασμό πολλών παραγόντων, όπως:

- ✓ Η διαθεσιμότητα αξιόπιστων αναλυτικών δεδομένων, τα οποία και θα καθορίσουν τα προϊόντα για τα οποία πρέπει να εφαρμοστούν νομοθετικές ρυθμίσεις.
- ✓ Η διαθεσιμότητα τοξικολογικών δεδομένων και μεθόδων ανάλυσης απαραίτητων για τη δυνατότητα θέσπισης ορίων επικινδυνότητας.
- ✓ Η κατανομή των μυκοτοξινών στα προϊόντα, η οποία πρέπει να είναι ομοιογενής διότι διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος λανθασμένης εκτίμησης.
- ✓ Νομοθεσίες χωρών, οι οποίες συνεργάζονται εμπορικά, αφού οι μη αναγκαίες αυστηρές νομοθετικές ρυθμίσεις πιθανόν να προκαλέσουν προβλήματα σε χώρες που κάνουν εξαγωγές όσον αφορά την εύρεση αγοραστών για τα προϊόντα τους.

3.7 Νομοθεσία και όρια επικινδυνότητας ^[133,134,135]

Σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης που ορίζει τα ανώτατα όρια διαφόρων ουσιών που μολύνουν τα τρόφιμα, αναφέρεται ότι για ουσίες όπως οι Αφλατοξίνες, οι οποίες είναι καρκινογόνες, δεν υπάρχει όριο κάτω από το οποίο θεωρούνται αβλαβείς, με συνέπεια να μην μπορεί να οριστεί ανεκτή ημερήσια δόση των ουσιών αυτών. Οι σύγχρονες επιστημονικές και τεχνολογικές γνώσεις, καθώς και η βελτίωση των τεχνικών παραγωγής και αποθήκευσης δεν εξασφαλίζουν την παρεμπόδιση της ανάπτυξης τοξινογόνων μυκήτων και επομένως και την εμφάνιση Αφλατοξινών στα τρόφιμα. Για το λόγο αυτό, θεωρείται απαραίτητο να οριστούν όσο το δυνατόν χαμηλότερα όρια για τις ουσίες αυτές.

Σημειώνεται ότι η δραστηριότητα των Αφλατοξινών είναι σημαντικά υψηλότερη σε άτομα που είναι φορείς της ηπατίτιδας Β ή γενικότερα βρίσκονται σε κατάσταση ανοσοκαταστολής σε σχέση με υγιή άτομα. Έτσι, η μείωση της προσλαμβανόμενης μέσω της διατροφής Αφλατοξίνης σε ευπαθείς ομάδες είναι πολύ σημαντική.

Για τις Αφλατοξίνες ορίζονται δύο όρια, το συνολικό για όλες τις Αφλατοξίνες και το όριο που αφορά μόνο την ΑΦΒ₁. Τα όρια και στις δύο περιπτώσεις είναι λίγο μεγαλύτερα για τα τρόφιμα που πρόκειται να υποστούν κάποια φυσική επεξεργασία, κατά την οποία υπάρχει πιθανότητα να μειωθεί η ποσότητα των Αφλατοξινών σε σχέση με αυτά που πρόκειται να διατεθούν για άμεση κατανάλωση ή πρόκειται να αποτελέσουν συστατικά κάποιου άλλου τροφίμου.

Πίνακας 3.2: Όρια αφλατοξινών που ορίζει η Ε.Ε. για διάφορες κατηγορίες τροφίμων ^[133,134]

Τρόφιμο	Ανώτατο όριο (μg/Kg)		
	B ₁	B ₁ +B ₂ + G ₁ +G ₂	M ₁
Φυστίκια, ξηροί καρποί, αποξηραμένα φρούτα			
Φυστίκια, ξηροί καρποί, αποξηραμένα φρούτα και επεξεργασμένα προϊόντα αυτών , τα οποία πρόκειται να διατεθούν για άμεση κατανάλωση ή πρόκειται να αποτελέσουν συστατικά άλλων τροφίμων	2	4	-
Φυστίκια τα οποία πρόκειται να υποβληθούν σε κάποια φυσική διεργασία προτού να διατεθούν για κατανάλωση ή να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά άλλων τροφίμων	8	15	-
Ξηροί καρποί και αποξηραμένα φρούτα τα οποία πρόκειται να διατεθούν για άμεση κατανάλωση ή πρόκειται να αποτελέσουν συστατικά άλλων τροφίμων	5	10	-
Καρυκεύματα (πάπρικα, πιπέρι, μοσχοκάρυδο, ginger)	5	10	-
Δημητριακά (συμπεριλαμβανομένου και της σίκαλης) και επεξεργασμένα προϊόντα αυτών , τα οποία πρόκειται να διατεθούν για άμεση κατανάλωση ή πρόκειται να αποτελέσουν συστατικά άλλων τροφίμων	2	4	-
Δημητριακά (συμπεριλαμβανομένου και της σίκαλης) τα οποία πρόκειται να υποβληθούν σε κάποια φυσική διεργασία προτού να διατεθούν για κατανάλωση ή να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά άλλων τροφίμων	-	-	-
Γάλα (νωπό γάλα, γάλα το οποίο προορίζεται για παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων και γάλα θερμικά επεξεργασμένο)	-	-	0,05

Πίνακας 3.3: Όρια Αφλατοξινών για μια ποικιλία τροφίμων σε διάφορες χώρες ^[136]

Χώρα	Συγκέντρωση (ng/ cm ³)		
	Αφλατοξίνη B ₁	Συνολική αφλατοξίνη (ΣB ₁ B ₂ G ₁ G ₂)	Αφλατοξίνη M ₁
Γερμανία	2,0	4,0	0,05
Γαλλία	5,0	-	-
Ελβετία	1,0 ^α	5,0	0,05- 0,25 ^β
Η.Π.Α. (FDA)	-	20,0	0,5 ^γ
Ουγγαρία	2,0	5,0	-

^α : 2,0ng/ cm³ για καλαμπόκι και σιτάρι

^β : μόνο για γαλακτοκομικά προϊόντα

^γ : για γάλα

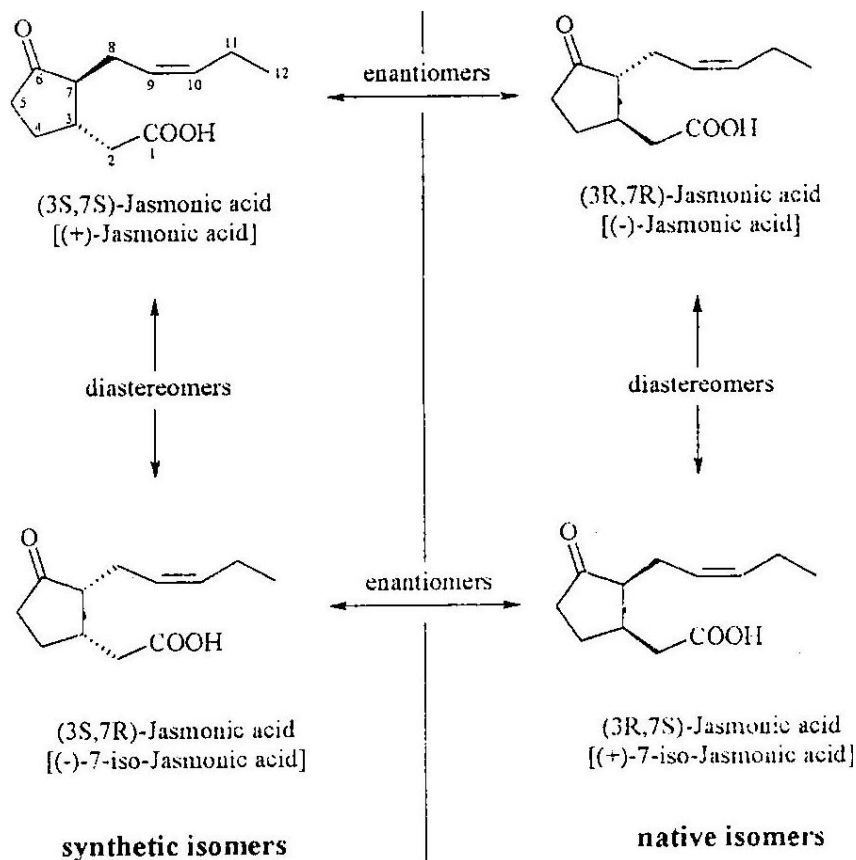
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΙΑΣΜΟΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

4.1 Εισαγωγή

Η ύπαρξη αγγελιοφόρων χημικής φύσεως υπεύθυνων για τη ρύθμιση της ανάπτυξης στα φυτά έχει αναφερθεί ήδη από τους Charles Darwin και Julius von Sachs πριν από 100 περίπου χρόνια. Η πρώτη ένωση που ταυτοποιήθηκε ήταν το ινδολο-3-οξικό οξύ τη δεκαετία του 1930. Από τότε και μέχρι σήμερα οι φυτοορμόνες συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον των ερευνητών και οι συνεχείς έρευνες έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού ενώσεων που δρουν ως φυτικοί σηματοδότες, ανάμεσα στις οποίες κύρια θέση κατέχουν τα ιασμονικά οξέα.^[137]

Κύριος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι το ιασμονικό οξύ (JA) με χημικό τύπο $C_{12}H_{18}O_3$. Πρόκειται για ένα οργανικό οξύ με βασικό δομικό χαρακτηριστικό ένα δακτύλιο κυκλοπεντανόνης υποκατεστημένο στις θέσεις 3, 6 και 7. Λόγω της ύπαρξης δύο χειραλικών κέντρων στο δακτύλιο, στις θέσεις C-3 και C-7 συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο διαστερομερείς μορφές και οι εναντιομερείς μορφές αυτών, όπως απεικονίζονται στο σχήμα 4.1.



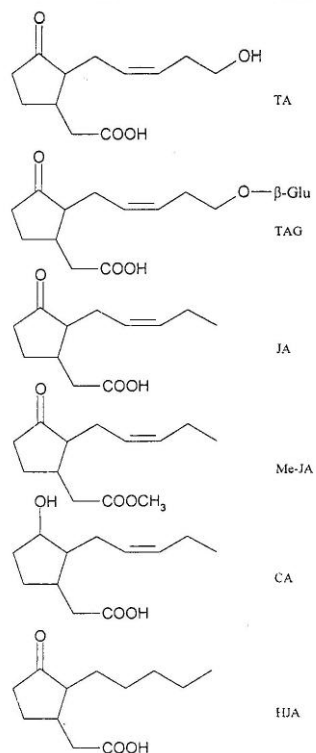
Σχήμα 4.1^[138]: Στερεοϊσομερείς μορφές του JA

Από τις δομές αυτές, μόνο τα (–)-JA και (+)-7-*iso*-JA βιοσυντίθενται στους μύκητες και στα φυτά αποτελώντας τους κύριους αντιπροσώπους των φυσικών βιορυθμιστών σε αυτά, ενώ τα εναντιομερή τους παρασκευάζονται συνθετικά.^[138] Το ιασμονικό οξύ απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1971 στο διήθημα του μύκητα *Botryodiplodia theobromae*^[139,140]

Εξίσου γνωστή και σημαντική ένωση αποτελεί και ο μεθυλεστέρας του ιασμονικού οξέος (MeJA) που αποτελεί βασικό συστατικό των αιθέριων ελαίων του γιασεμιού και στον οποίο οφείλεται και το χαρακτηριστικό άρωμα. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το αιθέριο έλαιο του *Jasminum grandiflorum* το 1962.^[141]

Στην ομάδα των ιασμονικών ανήκει μία ολόκληρη σειρά συζυγών ενώσεων του ελεύθερου οξέος, οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοια χημική δομή με το ιασμονικό οξύ και προέρχονται από βιοσυνθετικής άποψης, από οξυγονωμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα επιδεικνύοντας όλες βιολογική δραστηριότητα^[142] (Σχήμα 4.2).

Εκτός από την κύρια δράση τους ως βιορυθμιστές, το ιασμονικό και το μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA) χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία αρωμάτων^[143,144] και στον τομέα των τροφίμων όπου, όπως υποστηρίζουν διάφορες έρευνες, η προσθήκη τους επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής αποθηκευμένων φρούτων και άλλων καλλιεργούμενων προϊόντων.



Σχήμα 4.2: Ενώσεις με χημική δομή παρόμοια με εκείνη του JA, όπου TA: Τουμπερονικό οξύ, TAG: Γλυκοζίτης του TA, JA: Ιασμονικό οξύ, Me-JA: Μεθυλεστέρας του JA, CA: Κουκουρβικό οξύ, HJA ή DHJA: Διϋδροιασμονικό οξύ

4.2 Βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος

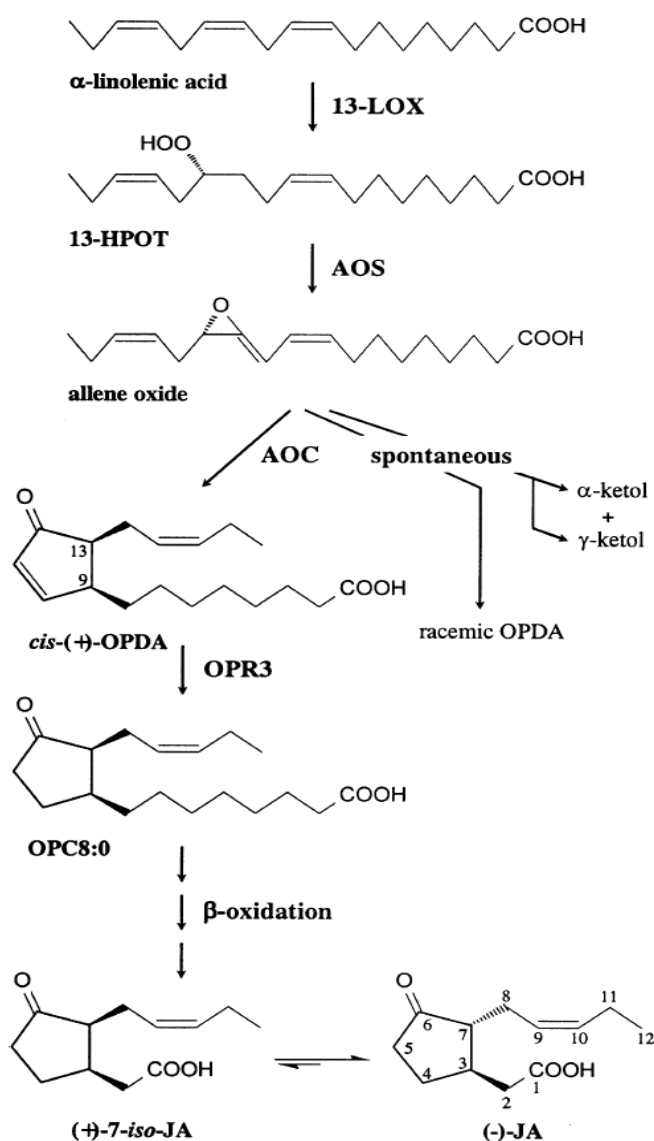
Στα ανώτερα φυτά η βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος (JA) λαμβάνει χώρα κυρίως στα άγουρα φρούτα, στις κοτυληδόνες των βλαστημένων σπόρων και στα φύλλα και πραγματοποιείται μέσω της δεκαοκτανοϊκής οδού, όπως ονομάζεται.^[137] Υπόστρωμα για την πορεία που πρότειναν οι Vick & Zimmerman,^[145] καθώς και πρόδρομη ένωση για τη βιοσύνθεση του JA είναι το λινολενικό οξύ (18:3). Το λινολενικό οξύ βρίσκεται στα κυτταρικά λιπίδια προερχόμενο από εστεροποιημένο ελαϊκό οξύ (18:1), το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται σε λινελαϊκό οξύ (18:2) αρχικά και στη συνέχεια, α-λινολενικό οξύ μέσω αποκορεσμάσων των λιπάρων οξέων που είναι προσδεμένες σε μεμβράνες.^[142]

Το α-λινολενικό οξύ ελευθερώνεται από τη μεμβράνη μέσω ενεργοποίησης φωσφολιπασών και αποτελεί υπόστρωμα για τη δράση λιποξυγενασών (LOXs) που καταλύουν την τοπο- και στερεο-εκλεκτική είσοδο μοριακού οξυγόνου στις θέσεις C-9 (μέσω της 9-LOX) ή C-13 (μέσω της 13-LOX). Η οξειδωση του α-λινολενικού οξέος στη θέση C-13 και μόνο, είναι εκείνη που δίνει την πρόδρομη ένωση του ιασμονικού οξέος, δηλαδή το 13-υδροϋπεροξυ-λινολενικό οξύ (13S-HPOTE).^[144] Στη συνέχεια, το υδροϋπεροξυ λιπαρό οξύ υφίσταται αφυδάτωση μέσω της συνθετάσης του αλλενοξειδίου (allene oxide synthase, AOS), ενός μέλους της οικογένειας του κυτοχρώματος P-450 και συγκεκριμένα των ενζύμων CYP74,^[146] για να δώσει σαν ενδιάμεση ένωση το ασταθές εποξειδίο 12,13(S)-εποξυ-λινολενικό οξύ, το οποίο μέσω μιας αντίδρασης κυκλοποίησης με τη συνδρομή του ενζύμου κυκλάση του αλλενοξειδίου (allene oxide cyclase AOC) μετατρέπεται στο κυκλοπεντενονικό 9(S),13(S)-12-οξο-φυτοδιενικό οξύ (OPDA).^[147] Παρά το γεγονός ότι η χημική φύση του OPDA επιτρέπει την ύπαρξη 4 στερεοεναντιομερών, η κοινή δράση των AOS και AOC οδηγεί αποκλειστικά στο σχηματισμό του 9S,13S-OPDA,^[148,149] την πρόδρομη ένωση του ενεργού 3R,7S-JA.^[150]

Εκτός από το α-λινολενικό οξύ, σαν υπόστρωμα για μία αντίστοιχη βιοσυνθετική πορεία κατά Vick & Zimmerman δρα και το λινελαϊκό οξύ (18:2), το οποίο όμως δίνει σαν τελικό προϊόν ένα παράγωγο του JA, το 9,10-διυδρο-JA (DHJA). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι από το σύνολο των ενζύμων που συμμετέχουν στη δεκαοκτανοϊκή αυτή πορεία, μόνο το διμερές ένζυμο AOC είναι σε θέση να διακρίνει την παράγωγη ενδιάμεση ένωση του α-λινολενικού οξέος (δηλαδή το 12,13(S)-επόξυ-λινολενικό οξύ) και να προωθήσει τη βιοσύνθεση του JA.^[142]

Το επόμενο βιοσυνθετικό βήμα περιλαμβάνει την αναγωγή του διπλού δεσμού του κυκλοπεντενονικού δακτυλίου του OPDA μέσω της 12-οξοφυτοδιενοϊκής αναγωγάσης (oxophytodienoic acid reductase, OPR), μία αντίδραση που εξαρτάται από το NADPH, καθώς εκείνο δρα ως δότης υδρογόνου.^[151,152] Το σχηματιζόμενο κυκλοπεντανονικό 3-οξο-2-κυκλοπεντανο-1-οκτανοϊκό οξύ (OPC-8:0) υφίσταται 3 διαδοχικούς κύκλους β-οξειδωσης, κατά τη διάρκεια των οποίων απομακρύνονται 6 άτομα άνθρακα και οι οποίοι

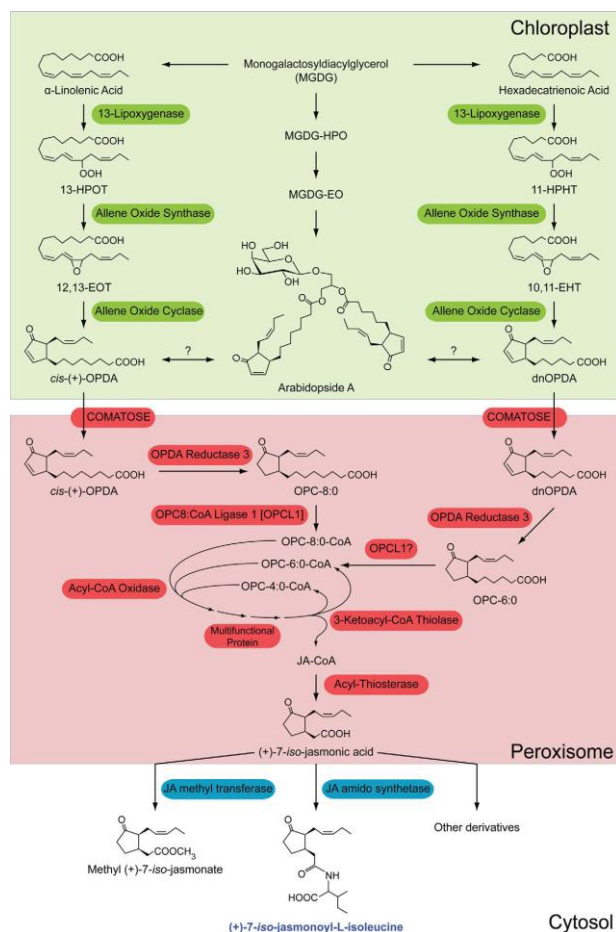
οδηγούν εκλεκτικά στο σχηματισμό του (+)-7-*iso*-JA [(3R,7S)-JA]. Λόγω στερικής παρεμπόδισης μεταξύ των δύο παράπλευρων αλυσίδων του κυκλοπεντανονικού δακτυλίου στη *cis*-διαμόρφωση, το (+)-7-*iso*-JA προχωρεί εύκολα σε αντίδραση ισομερίωσης στο θερμοδυναμικά προτιμώμενο (-)-7-*iso*-JA [(3R,7R)-JA], το οποίο αποτελεί και την επικρατέστερη μορφή JA στους φυτικούς ιστούς με μοριακή αναλογία (-)-JA : (+)-JA ίση προς 9:1.^[138,142] Στο σχήμα 4.3 φαίνεται η πορεία βιοσύνθεσης του JA, καθώς και τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτήν.



Σχήμα 4.3^[142]: Πορεία βιοσύνθεσης του JA

Λόγω του γεγονότος ότι τα πρώτα βήματα της βιοσύνθεσης του JA καταλύονται από τα χλωροπλαστικά ένζυμα LOX, AOS και AOC,^[153] πιστεύεται ότι η πηγή του λινολενικού οξέος (18:3) είναι οι χλωροπλαστικές μεμβράνες. Φαίνεται πάντως πως στη

βιοσύνθεση του JA εμπλέκονται συνολικά 3 διαφορετικά τμήματα του φυτού (σχήμα 4.4) ^[146,154]. Εκτός από τους χλωροπλάστες λοιπόν, συμμετέχει το κυτταρόλυμα, όπου βρίσκεται η 12-οξοφυτοδιενοϊκή αναγωγή ^[155] και τα υπεροξυσώματα, όπου πραγματοποιούνται οι κύκλοι β-οξειδωσης και τα οποία αποτελούν το μοναδικό γνωστό οργανίδιο ικανό να εκτελεί αυτές τις αντιδράσεις στα φυτά. ^[156, 157]



Σχήμα 4.4:^[146] Η βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος στα φυτά

Τα ιασμονικά οξέα διεγείρουν την ίδια τη βιοσύνθεσή τους μέσω ενός ανατροφοδοτικού κύκλου. Στους ιστούς που βρίσκονται κοντά σε σημείο τραυματισμού, ο ρυθμός ανατροφοδότησης είναι έντονος οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα παραγωγής ιασμονικών, ενώ στους περιφερειακούς ιστούς τα επίπεδα ιασμονικών είναι μεν αυξημένα, παραμένουν όμως σχετικά χαμηλά. ^[146]

Από το σύνολο των ενζύμων που παίρνουν μέρος στη βιοσύνθεση του JA το πλέον μελετημένο είναι η λιποξυγενάση (LOX).

4.3 Λιποξυγενάση

Οι λιποξυγενάσες (LOXs) είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν ένα άτομο σιδήρου με τη μορφή Fe^{3+} κρυμμένο βαθιά μέσα στις πτυχές του ενζύμου ^[158]. Η παρουσία του

είναι καθοριστική για την ενζυμική δραστηριότητα γεγονός που αποδεικνύεται από την απώλειά της κατά τη δέσμευση του μεταλλικού ιόντος μέσω χηλικού συμπλόκου. Απαντώνται ευρέως τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο ^[159] και καταλύουν την τοπο- και στερεο-εκλεκτική οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχουν ένα cis, cis 1,4-πενταδιενικό σύστημα.^[160,142,161,162] Τα προϊόντα που προκύπτουν είναι υδροϋπεροξυ παράγωγα λιπαρών οξέων, τα οποία είναι πολύ δραστικά και τοξικά για τα κύτταρα. Οι ενώσεις αυτές μεταβολίζονται όμως γρήγορα μέσω διαφόρων ενζύμων σε μία σειρά προϊόντων που αποκαλούνται οξυλιπίνες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα ιασμονικά οξέα, ενώ από την επίδραση της υδροϋπεροξειδωτικής λυάσης (hydroperoxide lyase, HPL) προκύπτουν αλδεΐδες που παίρνουν μέρος στις διαδικασίες ίασης των τραυματισμένων φυτών και αποτελούν επίσης μέλη της κατηγορίας αυτής,^[163,164] καθώς και διάφορες α- και γ-κετόλες που προκύπτουν από την επίδραση της υδροϋπεροξειδικής επιμεράσης.^[165] Η πορεία και τα προϊόντα που σχηματίζονται γενικά, εξαρτώνται από το υδροϋπεροξειδίο του πολυακόρεστου λιπαρού οξέος, την εξειδικευμένη θέση δράσης του συγκεκριμένου ισοενζύμου LOX και τις δραστικότητες των ενζύμων που καταλύουν τα ακόλουθα στάδια μετά τη LOX.

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα ισοένζυμα της LOX καταλύουν το σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων από το λινελαϊκό και λινολενικό οξύ με ειδικό στερεοχημικό τρόπο. Καταλύουν την προσθήκη O₂ στις θέσεις C-9 και/ή C-13. Έτσι, η οξειδωση του λινελαϊκού οξέος μπορεί να δώσει 9S-υδροϋπεροξυ-trans-10,cis-12-δεκαοκταδιενικό οξύ (9S-HPODE) και/ή 13S-υδροϋπεροξυ-cis-9,trans-11-δεκαοκταδιενικό οξύ (13S-HPODE), ενώ η οξειδωση του λινολενικού οξέος οδηγεί στο σχηματισμό των 9S-υδροϋπεροξυ-trans-10,cis-12,cis-15-δεκαοκτατριενικό οξύ (9S-HPOTE) και/ή 13S-υδροϋπεροξυ-cis-9, trans-11,cis-15-δεκαοκτατριενικό οξύ (13S-HPOTE). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η LOX από σόγια πρωταρχικά δίνει 13S-HPOTE, ενώ στο έμβρυο του καλαμποκιού η LOX παράγει κυρίως 9S-HPODE.^[160]

Τα 13S-HPOTE και 13S-HPODE μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω. Μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό αλδεϋδών αλλά μόνο το 13S-HPOTE μετέχει στη δεκαοκτανοϊκή πορεία βιοσύνθεσης του JA,^[166] στην οποία έγινε αναφορά στο προηγούμενο υποκεφάλαιο. Προσθήκη στη θέση C-9 ακολουθεί άλλη βιοσυνθετική πορεία με τελικά προϊόντα γ-κετόλες χωρίς γνωστό βιολογικό ρόλο.^[160]

4.4 Η δράση και ο ρόλος των ιασμονικών

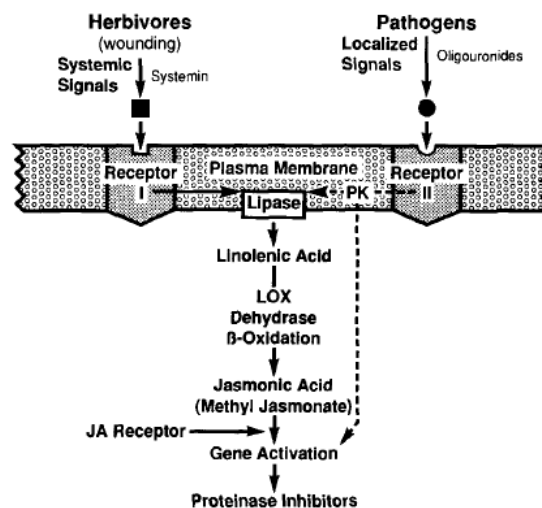
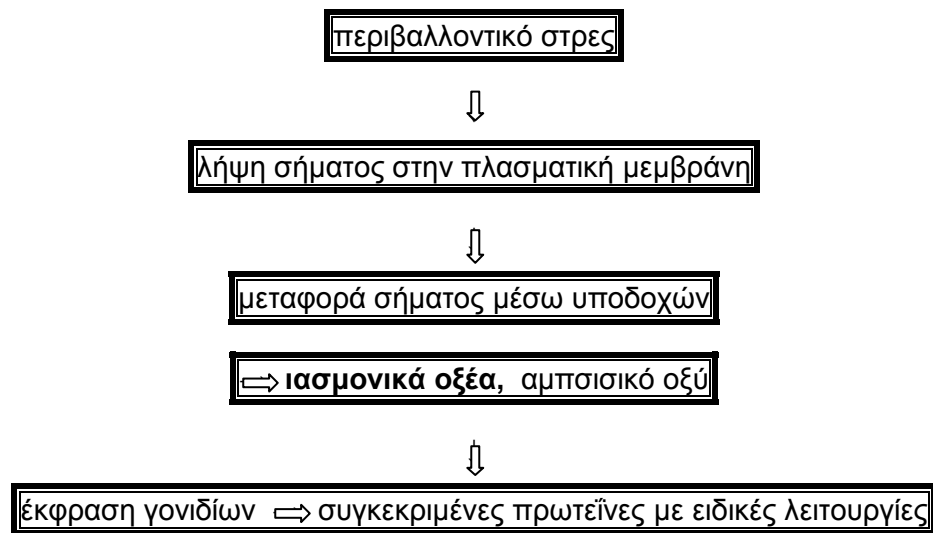
Έρευνες που έγιναν στο παρελθόν προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος και η δράση των ιασμονικών στα φυτά κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όταν οι ενώσεις αυτές προστίθενται εξωγενώς στα φυτά προκαλούν διέγερση ή αναστολή στις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Στα περισσότερα πειράματα χρησιμοποιούνται κυρίως συνθετικά

ρακεμικά μείγματα JA και MeJA, καθώς αυτά διατίθενται εύκολα από τη βιομηχανία αρωμάτων.^[138] Η δραστηριότητα του ελεύθερου οξέος διαφέρει από του μεθυλεστέρα εξαιτίας των ιδιοτήτων του τελευταίου. Το MeJA θεωρείται πιο δραστική ένωση διότι είναι πιο πτητικό, υδρόφοβο και δεν έχει ιοντικό χαρακτήρα, ιδιότητες που του επιτρέπουν να διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες και διευκολύνουν την ενσωμάτωσή του στους φυτικούς ιστούς.^[167,168] Το MeJA δρα διεγείροντας τη συσσώρευση αναστολέων πρωτεασών (proteinase inhibitors, PI) μετά τον τραυματισμό, τόσο τοπικά όσο και συστημικά, σε ολόκληρη τη μάζα του φυτού και ακόμη και στα γειτονικά φυτά. Η σηματοδότηση πραγματοποιείται τοπικά μέσω διάχυσης με τη συνδρομή ενδο- και εξωκυτταρικών υγρών που διαπερνούν τα σημεία τραυματισμού ή συστημικά μέσω του αγγειακού συστήματος των φυτών. Αερομεταφερόμενα μόρια MeJA μπορούν να εισέλθουν στο αγγειακό σύστημα του φυτού μέσω των στομάτων και να ενεργοποιήσουν με τη βοήθεια υποδοχέων μεταφοράς σημάτων τα γονίδια των αναστολέων πρωτεασών. Οι αναστολείς πρωτεασών αποτελούν μία από τις πλέον άφθονες ομάδες πρωτεϊνών των φυτών. Μία βασική λειτουργία τους είναι η μη αντιστρεπτή παρεμπόδιση της δράσης των πεπτικών ενζύμων των εντόμων και ζώων. ^[143,148,154,169,170, 171]

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για να προσδιορισθεί ο χρόνος που μεσολαβεί από τον τραυματισμό του φυτού έως τη σύνθεση των ιασμονικών έδειξαν πως η πρώτη σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης ιασμονικού οξέος στο τραυματισμένο φύλλο εμφανίζεται σε λιγότερο από 30 s μετά τον τραυματισμό, ενώ στα απομακρυσμένα φύλλα ο χρόνος εμφάνισης προσδιορίζεται στα 2 min. Ο ρυθμός βιοσύνθεσης του ιασμονικού οξέος διπλασιάζεται ανά 20 s μέσα στο πρώτο λεπτό από τον τραυματισμό, ενώ συνολικά η διαδικασία που περιλαμβάνει το μηχανισμό σηματοδότησης των ιασμονικών - όπως αυτός αναλύεται στο επόμενο υποκεφάλαιο - ολοκληρώνεται κατά προσέγγιση σε 45 min από τον τραυματισμό.^[172,173]

Η δομή, η βιοσύνθεση και ο ρόλος των ιασμονικών έχει πολλά κοινά σημεία με τα αντίστοιχα των προσταγλανδινών και λευκοτριενίων στα θηλαστικά. Πρόκειται για δύο εκπροσώπους των εικοσανοειδών, η βιοσύνθεση των οποίων ξεκινάει από το αραχιδονικό οξύ (20:4) που απελευθερώνεται από τα φωσφολιπίδια μέσω της φωσφολιπάσης A₂ (PLA₂). Τα λευκοτριένια σχηματίζονται μέσω μίας λιποξυγενάσης (5-LOX) και εμπλέκονται στο μεταβολισμό σε αλλεργικές αντιδράσεις και αντιδράσεις ερεθισμού. Αντίστοιχα, τα ιασμονικά σχηματίζονται όταν σαν συνέπεια βιοτικής και αβιοτικής πίεσης (stress), όπως π.χ. η ξηρασία, ο παγετός, η έλλειψη νερού ή O₂, η ακτινοβολία, ο τραυματισμός, η αλληλεπίδραση με μικροοργανισμούς, ενεργοποιούνται τα λεγόμενα γονίδια άμυνας. Συγκεκριμένα, η απόκριση του φυτού στις εξωτερικές αυτές προσβολές πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση της συστεμίνης - ενός ολιγοπεπτιδίου αποτελούμενου από 18 αμινοξέα - που προσδένεται σε έναν υποδοχέα της πλασματικής

μεμβράνης ενεργοποιώντας κατ'αυτόν τον τρόπο με τη σειρά του τη φωσφολιπάση PLA₂, η οποία υδρολύει τα λιπίδια της μεμβράνης απελευθερώνοντας ακόρεστα λιπαρά οξέα στο κυτταρόπλασμα, όπως το 18:2 και το 18:3.^[166,171] Το λινολενικό οξύ (18:3) οξειδώνεται στη συνέχεια από τη LOX δίνοντας σαν τελικό προϊόν μέσω της δεκαοκτανοϊκής πορείας που περιγράφηκε σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, τα ιασμονικά. Ο τρόπος απόκρισης των ιασμονικών (JAs) σε εξωτερικό παράγοντα απεικονίζεται στο σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.4:^[166] Μηχανισμός απόκρισης των φυτών μέσω των ιασμονικών

Όπως είναι αναμενόμενο για ενώσεις-ρυθμιστές, τα ιασμονικά επιδρούν σε διάφορες λειτουργίες των φυτών. Φαίνεται πως αναστέλλουν τις πορείες που σχετίζονται με την ανάπτυξη των φυτών, ενώ διεγείρουν τις πορείες εκείνες που αφορούν την ωρίμανση και γήρανσή τους. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι επιδράσεις

τους στην ανάπτυξη των φυτών. Πιο αναλυτικά, βλέπουμε ότι παρεμποδίζουν την επιμήκη ανάπτυξη της ρίζας, την ανάπτυξη της μυκόριζας, την εμβρυογένεση καθώς και το φύτερωμα των σπόρων. Επίσης δρουν ανασταλτικά στο σχηματισμό μπουμπουκιών και στις φωτοσυνθετικές διεργασίες.^[138] Τα ιασμονικά συμβάλλουν επιπλέον στη ρύθμιση του μεγέθους του μίσχου, των σπόρων, των πετάλων, ενώ επηρεάζουν και τη δομή των φλεβών του φυτού.^[146] Οι διεργασίες που διεγείρονται παρουσία ιασμονικών είναι η γήρανση των φύλλων διότι προκαλούν διάσπαση της χλωροφύλλης και της Rubisco, της πρωτεΐνης που βρίσκεται άφθονη στα φύλλα των φυτών, καθώς επίσης και τη γήρανση των περικορπίων αυξάνοντας την αναπνοή και την ενζυμική δραστηριότητα των πρωτεασών, της υπεροξειδάσης και της λιποξυγενάσης.^[138] Οι διαδικασίες αυτές σε συνδυασμό με την αύξηση της παραγωγής αιθυλενίου οδηγούν επίσης και στη γρήγορη ωρίμανση των φρούτων. Τέτοια παραδείγματα έχουν αναφερθεί για την ντομάτα, το μήλο αλλά και φράουλες, οι οποίες συλλέχθηκαν πριν ωριμάσουν και η ωρίμανσή τους έγινε *in vitro* σε διάλυμα σακχαρόζης. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η παρουσία MeJA ενισχύει την ανάπτυξη του χρώματος σε διάφορα φρούτα όπως μήλα, φράουλες και μάνγκο (όταν η ωρίμανσή τους γίνεται *in vitro*) ενισχύοντας τη βιοσύνθεση των χρωστικών τους.^[174]

Η συγκέντρωση των ιασμονικών σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεί σημαντικό παράγοντα, ο οποίος μπορεί να καθορίσει τη δράση τους, καθόσον έχει παρατηρηθεί ότι διαφορετικές συγκεντρώσεις προκαλούν αντίθετα αποτελέσματα. Έτσι για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή γύρης στα *Lilium* διεγείρεται σε συγκεντρώσεις 10^{-7} και 10^{-6} M JA, ενώ αναστέλλεται όταν η συγκέντρωση του JA είναι 10^{-5} M. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι συγκεντρώσεις JA που κυμαίνονται μεταξύ 10^{-7} και 10^{-6} M επιδρούν θετικά στην ανάπτυξη της πατάτας, ενώ συγκεντρώσεις της τάξεως του 10^{-5} M και άνω δρουν ανασταλτικά.^[138] Τέλος, έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις MeJA μεγαλύτερες από 10^{-4} M προκαλούν αύξηση στη μεταβολή του χρώματος και μη φυσιολογική ωρίμανση των μάνγκο.^[174]

Πίνακας 4.1: Επιδράσεις των ιασμονικών στην ανάπτυξη των φυτών

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ JA
Επιμήκυνση της ρίζας	Αναστολή
Αύξηση της μυκόριζας των μυκήτων	Αναστολή
Εμβρυογένεση	Αναστολή
Φύτερωμα καρπών	Αναστολή

Δημιουργία γύρης	Αναστολή/Διέγερση
Ωρίμανση φρούτων	Διέγερση
Γήρανση περικαρπίου	Διέγερση
Γήρανση φύλλων	Διέγερση
Σχηματισμός χλωροφύλλης	Αναστολή
Διάσπαση χλωροφύλλης	Διέγερση
Φωτοσυνθετική δραστηριότητα	Αναστολή
Αναπνοή	Διέγερση
Βιοσύνθεση αιθυλενίου	Διέγερση

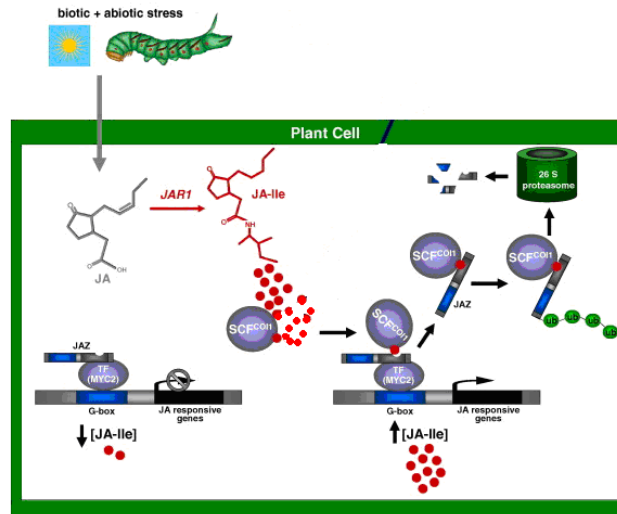
4.5 Μηχανισμός σηματοδότησης μέσω ιασμονικών ^[146,157,175,176,177]

Η σηματοδότηση των ιασμονικών αποτελεί ένα σύνθετο μηχανισμό που λαμβάνει χώρα μέσα στον πυρήνα και περιλαμβάνει μόρια-καταστολείς, παράγοντες μεταγραφής και πρωτεασωματική αποδόμηση.

Όταν ένα φυτό βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας, οι συγκεντρώσεις των ιασμονικών είναι πολύ χαμηλές. Στις συνθήκες αυτές οι πρωτεΐνες ZAJ (Jasmonate ZIM-Domain), που αποτελούν καταστολείς της μεταγραφής του ιασμονικού οξέος, προσδένονται στους κύριους παράγοντες μεταγραφής του ιασμονικού οξέος, τους MYC₂, παρεμποδίζοντας κατ'αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία τους και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση των γονιδίων που ρυθμίζονται από το ιασμονικό οξύ.

Στην περίπτωση βιολογικού ή αβιολογικού στρες, ενεργοποιείται η βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέος μέσω της δεκαοκτανοϊκής πορείας στις χλωροπλαστικές μεμβράνες και η εν συνεχεία μετατροπή του στη βιολογικά δραστική μορφή του την ιασμονοειδή ισολευκίνη [(+)-7-*iso*-JA-Ile] με τη βοήθεια του συζευκτικού ενζύμου JAR1. Αμέσως μετά το σχηματισμό της, η ορμόνη γίνεται αντιληπτή από την πρωτεΐνη COI1 (coronatine-insensitive 1), η οποία αποτελεί την υποομάδα Φ-κιβωτίων μίας λιγάσης της E3 ουβικιτίνης του τύπου SKP1-CUL1-F-box (SCF). Μέσω της (+)-7-*iso*-JA-Ile διευκολύνεται η πρόσδεση του συμπλόκου SCF^{COI1} στις πρωτεΐνες JAZ, μία διαδικασία που προωθεί την πολυ-ουβικιτινίωσή τους και την επακόλουθη αποδόμησή τους στο 26S

πρωτεάσωμα. Οι παράγοντες μεταγραφής (MYC₂) απαλλάσσονται πλέον από την καταστολή που προερχόταν από τις πρωτεΐνες JAZ και είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τα γονίδια απόκρισης στο ιασμονικό οξύ.



Σχήμα 4.5:^[176] Μοντέλο για το μηχανισμό αντίληψης και μεταγωγής του σήματος του JA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Η ΚΑΠΠΑΡΗ

5.1 Ιστορικά στοιχεία-Προέλευση

Η κάππαρη αποτελεί ένα αρωματικό φυτό γνωστό στον ανθρώπινο πολιτισμό εδώ και χιλιετίες. Οι πρώτες ενδείξεις τοποθετούν την κάππαρη ως τροφή στην Άνω Αίγυπτο πριν από περίπου 18.000 χρόνια και αργότερα γύρω στα 6.000 π.Χ. στις περιοχές του σημερινού Ιράκ και του Ιράν. Ο Διοσκουρίδης έχει αναφερθεί σ'αυτήν συνιστώντας τη φαρμακευτική χρήση των φύλλων και της ρίζας του φυτού και υπογραμμίζοντας πως είναι ένα είδος ξεχωριστό, αδύνατον να συγχυθεί με ο,τιδήποτε άλλο, ενώ αποτελούσε εμπορεύσιμο προϊόν της Αρχαίας Ελλάδας,^[178] όπου διατηρούσαν τους μίσχους, τα μπουμπούκια και τον καρπό του φυτού σε αλάτι και το χρησιμοποιούσαν σαν χορταρικό και σαν καρύκευμα. Ο κατάλογος καρυκευμάτων του ποιητή και δραματουργού Αντιφάνη περιλάμβανε μεταξύ άλλων (όπως θυμάρι, σουσάμι, κύμινο, ματζουράνα, ξύδι και ελιές) και κάππαρη. Ο Θεόφραστος στο έργο του «Περί φυτών ιστορίας» θα την περιγράψει ως εξής: *"μονόρριζον δι και επίγειον και χαμαίκαυλον, βλασταίνει δε και ανθεί του θέρους και διαμένει το φύλλον χλωρόν άχρι Πλειάδος"*. Παλαιότερες αναφορές για την κάππαρη υπάρχουν και από το Ρωμαίο Πλίνιο τον πρεσβύτερο, ενώ αναφέρεται και στην Παλαιά Διαθήκη (Εκκλησιαστής, ΙΒ'5).

Η προέλευση της κάππαρης δεν είναι γνωστή. Πιθανόν να κατάγεται από ξηρές περιοχές της Δυτικής ή Κεντρικής Ασίας, όπου το ζεστό και ξηρό κλίμα την ευνοεί, καθώς είναι φυτό ιδιαίτερα ανθεκτικό που απαιτεί ελάχιστο νερό. Η σημερινή της παρουσία απλώνεται από τις ατλαντικές ακτές των Καναρίων Νήσων και του Μαρόκο έως τη Μαύρη Θάλασσα, την Κριμαία και την Αρμενία μέχρι και ανατολικά της Κασπίας Θάλασσας, ενώ ευδοκimeί και στην Αυστραλία, τη Μαδαγασκάρη, τη Νότιο Αμερική και τα Νησιά του Ειρηνικού.^[179,180]

Η λατινική ονομασία *capparis* προέρχεται από την αντίστοιχη αρχαία ελληνική λέξη *κάππαρις*, όμως η ρίζα της λέξης είναι άγνωστη. Σύμφωνα με μία εκδοχή η ονομασία δόθηκε από το νησί Κύπρος, όπου η κάππαρη ανθεί σε αφθονία, ενώ σύμφωνα με την *Inocencio* επινοήθηκε από το Θεόφραστο και αργότερα την ενστερνίστηκε ο Διοσκουρίδης.^[181]

Βοτανική ταξινόμηση της κάππαρης

Η κάππαρη αποτελεί αγγειόσπερμο, δικότυλο φυτό που ανήκει στο γένος *Capparis*, το οποίο καταγράφηκε από τον Linnaeus^[182] και ανήκει στο άθροισμα των Ροιαδωδών (*Rhoeadales*), στην οικογένεια των Καππαριδών (*Capparidaceae*) και στην τάξη Καππαρώδη (*Capparidales*) που περιλαμβάνει περί τα 350 είδη θάμνων, μικρών

δέντρων και ερπόντων ή αναρριχόμενων φυτών που δεν ξεπερνούν το 1m.^[183] Η βοτανική της ονομασία είναι *Capparis spinosa* L.

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες, η σημαντικότερη ονομάζεται *Capparis spinosa* δηλαδή κάππαρη ή ακανθώδης και οφείλεται στα πολλά, ισχυρά της αγκάθια που σε κάποιες άλλες ποικιλίες λείπουν (π.χ. *Capparis inermis* δηλαδή «άσπλη»).

Άλλες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται ως βρώσιμες είναι οι ακόλουθες:

- *Capparis obvata*
- *Capparis sicula*
- *Capparis ovata*
- *Capparis decidua*
- *Capparis orientalis*

Πρόκειται για ένα αυτοφυές, φυλλοβόλο, πολυετές φυτό. Τα φύλλα της κάππαρης είναι επαλάσσοντα, ακέραια ελλειψοειδή ή ωοειδή με εμφανή νεύρα. Τα άνθη της είναι μεγάλα, μονήρη, λευκά ή ελαφρώς ιώδη, με πολλούς τοξοειδείς στήμονες που είναι μακρύτεροι των πετάλων. Ο καρπός είναι ραγοειδής, ατρακτοειδής και πολύσπερμος.

Τα αυτοφυή φυτά αναπτύσσονται κυρίως σε ρωγμές βράχων και πέτρινων τοίχων, σε εδάφη φτωχά δημιουργώντας ένα εκτεταμένο ριζικό σύστημα, το οποίο φτάνει σε μεγάλο βάθος προστατεύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα εδάφη αυτά από τη διάβρωση. Τα φυτά της κάππαρης παραμένουν θαλερά μέσα σε άνυδρα τοπία μεσογειακών περιοχών στην καρδιά του καλοκαιριού επειδή αντέχουν την ξηρασία. Η κάππαρη έχει ανακαλύψει το νερό που της χρειάζεται με τις βαθιές ρίζες της και με μηχανισμούς που έχει αναπτύξει για να αντιμετωπίσει την ξηρασία, όπως η οσμωτική προσαρμογή, η ρύθμιση του ανοίγματος στοματίων και η τροποποίηση των ιδιοτήτων των κυτταρικών τοιχωμάτων.^[184] Τα φύλλα της περιέχουν πολύ νερό και για το λόγο αυτό σε ορισμένες χώρες της Μεσογείου φυτεύεται κάππαρη σε αντιπυρικές ζώνες στα δάση.^[185]



Σχήμα 5.1: Άνθος κάππαρης

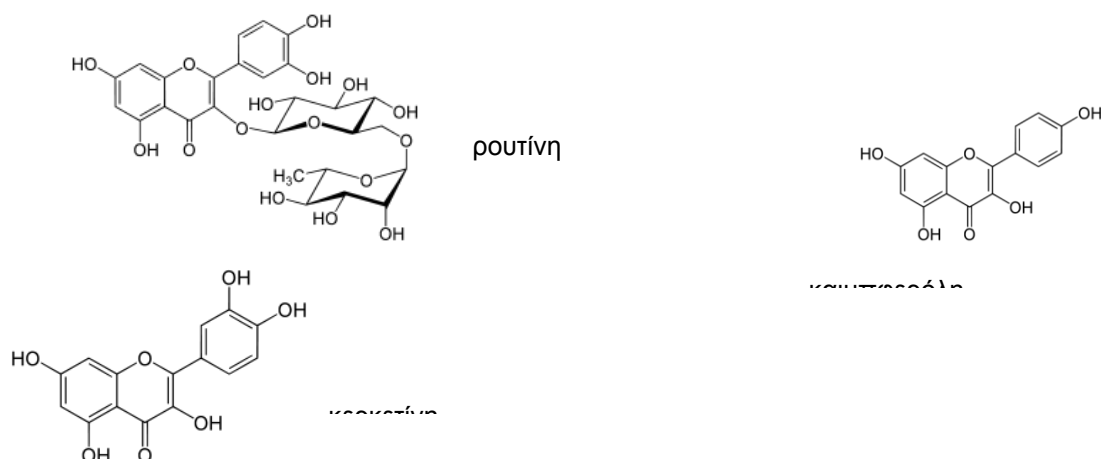
5.3 Χημική σύσταση της κάππαρης

Ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση της κάππαρης παρουσιάζονται κάποιες διαφοροποιήσεις στα επί μέρους συστατικά ή στο ποσοστό που υπάρχουν αυτά στο φυτό. Η βασική χημική σύσταση της κάππαρης σε ποιοτικό επίπεδο είναι όμως κοινή σε όλες τις ποικιλίες, από την πιο συνηθισμένη μέχρι τις πιο σπάνιες. Τα ποσοστά που αναφέρονται παρακάτω προέρχονται από την *C. spinosa*, η οποία αποτελεί από

εμπορικής απόψεως τη σημαντικότερη ποικιλία κάππαρης ενώ είναι ταυτόχρονα και ιδιαίτερα διαδεδομένη.

Η παρουσία φλαβονοειδών και ισοθειοκυανικών γλυκοζιτών υπάρχει σε βιβλιογραφικές αναφορές εδώ και χρόνια. Περισσότερες μελέτες που έγιναν γύρω από τα συστατικά της κάππαρης αποκάλυψαν μία πληθώρα χημικών ενώσεων με σημαντικές ιδιότητες που αντικατοπτρίζονται στις ιδιότητες του ίδιου του φυτού. Τα βασικά συστατικά της κάππαρης, όπως προκύπτουν από την εξέταση των ανθών, καρπών, φύλλων, σπόρων καθώς και του εκχυλίσματός της συνοψίζονται παρακάτω.

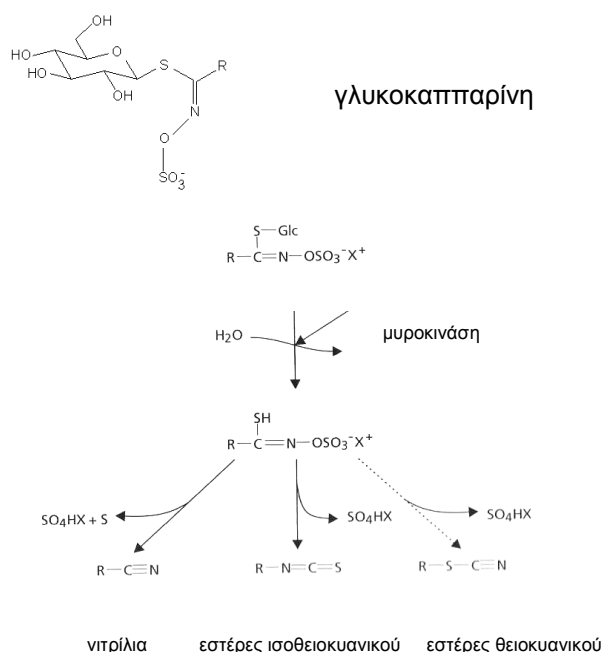
1. **Νερό**: αντιπροσωπεύει το 79% του νωπού ιστού.
2. **Φλαβονοειδή**: οι πολυφαινολικές αυτές ενώσεις αποτελούν λόγω των σπουδαίων ιδιοτήτων τους μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες συστατικών της κάππαρης. Σε μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζεται η ρουτίνη -γνωστή και ως βιταμίνη P- (σχήμα 5.2) ή αλλιώς ο 3-O-ρουτινοσίτης της κερκετίνης (κερκετινο-3-O-ρουτινοσίδης).^[186,187] Ανάλυση των διαφόρων τμημάτων του φυτού (φύλλα, άνθη και καρποί) έδειξε πως η περιεκτικότητα είναι 61,09, 43,72 και 6,03 mg/100g, αντίστοιχα. Η ρουτίνη είναι μία στερεά, υποκίτρινη ουσία, ελάχιστα διαλυτή στο νερό με πολλές και σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες που εμφανίζονται στην αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιθρομβωτική, κυτταροπροστατευτική και αγγειοπροστατευτική της δράση.^[188] Τα χαρακτηριστικά κιτρινωπά στίγματα στην κάππαρη τουρσί είναι ιζήματα ρουτίνης και άλλων φλαβονολών που προκύπτουν από την κρυσταλλοποίησή τους κατά τη διαδικασία αποξείδωσης. Ο 3-O-ρουτινοσίτης της καιμπφερόλης (καιμπφερόλο-3-O-ρουτινοσίδης) μαζί με τον 3-O-ραμνορουτινοσίτη της καιμπφερόλης (καιμπφερόλο-3-O-ραμνορουτινοσίδη) αποτελούν τα δύο έτερα γνωστά φλαβονοειδή της κάππαρης. Μελέτες της σύστασης σε διαφορετικές ποικιλίες αποκάλυψαν πως, ενώ η ποιοτική ανάλυση ήταν κοινή για όλα τα είδη, σε ποσοτικό επίπεδο υπήρχαν αρκετές διακυμάνσεις, που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς και φυσιολογικούς παράγοντες. Εκτός από τις παραπάνω πολυφαινόλες, η κάππαρη του εμπορίου περιέχει και σημαντικές ποσότητες των φλαβονολών κερκετίνη και καιμπφερόλη (σχήμα 5.2) που αποτελούν τα άγλυκα τμήματα των γλυκοζιτών και προκύπτουν από την υδρόλυσή τους (π.χ. κατά την παραμονή της κάππαρης σε άλμη).^[189]



Σχήμα 5.2: Φλαβονοειδή της κάππαρης

3. **Φαινολικά οξέα**: σε μεγαλύτερες ποσότητες εμφανίζεται το φερουλικό οξύ, ενώ ακολουθούν το καφεϊκό, το βανιλλικό και το π-κουμαρικό. Επιπλέον των προαναφερθέντων φαινολικών ενώσεων, στη σύσταση της κάππαρης περιέχονται υψηλές ποσότητες υδροξυτυροσόλης (11,2 mg/100g ξηρού δείγματος), η οποία αποτελεί κύριο συστατικό βιολογικής δράσης στις ελιές.^[190]
4. **Θειούχες ενώσεις**: η παρουσία τους είναι σημαντική σε όλα τα είδη κάππαρης. Ο πιο απλός από άποψη δομής αλλά ταυτόχρονα και ο πλέον διαδεδομένος εκπρόσωπος είναι η μεθυλογλυκοσινολάτη (ή μεθυλογλυκοζινόλη) ή αλλιώς γλυκοκαππαρίνη, η οποία ανέρχεται σε ποσοστό 90-95% του συνόλου των γλυκοσινολατών. Μέσω της ενζυματικής υδρόλυσής της προκύπτουν εστέρες του ισοθειοκυανικού οξέος με κυριότερους τον ισοθειοκυανικό μεθυλεστέρα και βενζυλεστέρα αντίστοιχα. Και τα δύο αυτά συστατικά έχουν δριμεία οσμή και οξεία γεύση, χαρακτηριστικά που ξεχωρίζουν και στην κάππαρη του εμπορίου. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν ισχυρές αντιβιοτικές ουσίες, έχουν αντικαρκινική δράση, ενώ δρουν και εντομοαπωθητικά για την ίδια την προστασία του φυτού. Η ομάδα των γλυκοσινολατών περιλαμβάνει περισσότερους από συνολικά 100 δευτερογενείς μεταβολίτες. Έχουν βρεθεί σε 15 βοτανικές οικογένειες, με πιο χαρακτηριστικές εκείνη των σταυρανθών (*Brassicaceae*) και της κάππαρης (*Capparaceae*). Η χημική δομή τους αποτελείται από ένα θειογλυκοσιδικό δεσμό στον άνθρακα μίας σουλφουρωμένης ιμίνης. Ο τεμαχισμός και εν συνεχεία η εμβροχή των φυτικών σπόρων, καρπών ή φύλλων ενεργοποιούν την υδρολυτική διάσπαση του θειογλυκοσιδικού δεσμού μέσω ενζύμων που ονομάζονται μυροκινάσες. Τα προϊόντα μίας τέτοιας αντίδρασης είναι η D-γλυκόζη και μία σειρά άγλυκων ενώσεων που περιλαμβάνει νιτρίλια και εστέρες του ισοθειοκυανικού και του θειοκυανικού οξέος. Ενώ οι γλυκοσινολάτες μπορεί να αποτελέσουν μία δεξαμενή θρεπτικών συστατικών, όπως αζώτου και θείου, τα προϊόντα υδρόλυσής τους παίζουν

σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών εναντίον εντόμων, μυκήτων και άλλων εισβολέων.^[191,192,193]

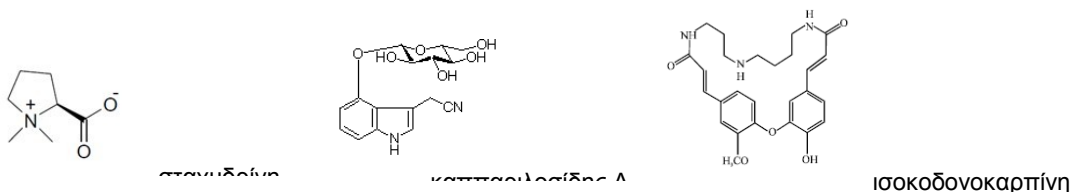


Σχήμα 5.3: Αντίδραση υδρόλυσης των γλυκοσινολατών

5. **Λιπαρές ουσίες:** οι σπόροι της κάππαρης περιέχουν έλαια σε ποσοστό ~30%. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ξεπερνούν το 50% του συνόλου των λιπαρών οξέων με κυριότερα το λινελαϊκό (~31%) και το ελαϊκό σε συνδυασμό με το ισομερές του βαξενικό οξύ, ενώ από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται το παλμιτικό (~10%) και ακολουθεί το στεατικό σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση (~3%). Ενδιαφέρον υπάρχει και στην παρουσία των στερολών που αποτελούν την πιο σημαντική κατηγορία των δευτερευόντων συστατικών της κάππαρης. Σε μεγαλύτερο ποσοστό (~60%) εντοπίζεται η β-σιτοστερόλη, η οποία εμφανίζεται ως κύρια στερόλη και στο ελαιόλαδο, το σουσάμι και τους κόκκους καφέ. Ακολουθούν η καμπεστερόλη (~17%), η στιγμαστερόλη (~11%) και η Δ⁵-αβεναστερόλη (3-10%). Τα υψηλά αυτά ποσοστά προσδίδουν στην κάππαρη θρεπτική και φαρμακευτική αξία.^[193,194,195]
6. **Πρωτεΐνες:** σε φρέσκια κάππαρη βρέθηκαν σε ποσοστό 5,8 %. ^[186] Μελέτες που έγιναν στους σπόρους της κάππαρης που παρουσιάζουν ξεχωριστό ενδιαφέρον, έδειξαν πως οι πρωτεΐνες κυμαίνονται σε ποσοστό μεταξύ 22,5-27,5% επί ξηρού βάρους, ανάλογα με τη γεωγραφική κατανομή.^[195,196]
7. **Πτητικά συστατικά:** στο αιθέριο έλαιο της κάππαρης, το οποίο απομονώθηκε από το εκχύλισμα των φύλλων, του καρπού και της ρίζας του φυτού, προσδιορίστηκαν περισσότερα από 100 διαφορετικά πτητικά συστατικά. Στα κυριότερα περιλαμβάνονται τερπένια (γ-τερπινένιο, trans-νερολιδόλη, 4-τερπινεόλη, θυμόλη,

λιναλοόλη, ισο-μενθόλη, β-ιονόνη, καρβόνη), τριτερπενικές αλκοόλες (κιτρο-σταδιενόλη, 2,4-μεθυλενο-κυκλοαρτενόλη, κυκλοαρτανόλη, β-αμιρίνη, γραμιστερόλη), αλειφατικές αλκοόλες (εξαδεκανόλη, οκταδεκανόλη, τετρακοσανόλη), αλδεΐδες (κινναμωμική, βενζαλδεΐδη, 2-εξενάλη), κετόνες (3,5-οκταδιε-2-νόνη, ακετοφαινόνη) και εστέρες (δεκαεξανικός αιθυλεστέρας, ισοθειοκυανικός ισοπροπυλεστέρας, ισοθειοκυανικός μεθυλεστέρας, ισοθειοκυανικός βουτυλεστέρας).^[180]

8. **Βιταμίνες:** σε όλα τα μέρη του φυτού έχουν βρεθεί τοκοφερόλες (α- και γ-), με κυριότερο εκπρόσωπο στα φύλλα την α-τοκοφερόλη, ενώ στα υπόλοιπα τμήματα η συγκέντρωση της γ-τοκοφερόλης ήταν σημαντική. Η παρουσία τους σε υψηλές τιμές ενδεχομένως να σχετίζεται με την εκπληκτική ικανότητα της κάππαρης να αξιοποιεί περιορισμένους πόρους νερού. Η υψηλή περιεκτικότητα γ-τοκοφερόλης ιδιαίτερα στα μπουμπούκια της κάππαρης, δεδομένων των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της, προσδίδει επιπλέον φαρμακευτική αξία στο συγκεκριμένο φυτό. Σε ο,τι αφορά τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, η κάππαρη περιέχει ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), του οποίου η περιεκτικότητα λόγω της ιδιαίτερης ευαισθησίας του στο φως και το οξυγόνο διαφοροποιείται κατά πολύ ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης αλλά και την ποικιλία.^[180,187,193]
9. **Χρωστικές ουσίες:** η κάππαρη περιέχει το καροτενοειδές β-καροτένιο και τις ξανθοφύλλες λουτεΐνη, νεοξανθίνη βιολαξανθίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις έναντι άλλων φυτών (ντομάτα, πιπεριά, πατάτα), καθιστώντας την μία αξιοσημείωτη πηγή καροτενοειδών, ιδιαίτερα β-καροτενίου (προ-βιταμίνη A) και λουτεΐνης (θεωρείται σημαντική για την υγεία των ματιών).^[197]
10. **Αλκαλοειδή:** απομονώθηκαν από το φλοιό της ρίζας, καθώς και από τα φύλλα και τους καρπούς του φυτού. Πρόκειται για τη σταχυδρίνη, τον καππαριλοσίδη A και διάφορα αλκαλοειδή της σπερμιδίνης, όπως η ισοκοδονοκαρπίνη (isocodonocarpine), η καππαρισίνη (capparisine), η καππαρισινίνη (capparisinine), καππαραδισίνη (capparadisine) και η καδαβικίνη (cadabicine).^[198]



Σχήμα 5.4: Αλκαλοειδή της κάππαρης

11. **Τέφρα:** βρίσκεται σε ποσοστό 1,6% στο φυτό.^[186]

12. **Ανόργανα συστατικά**: σε αυτά περιλαμβάνονται κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, φωσφόρος, μαγνήσιο που υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες, καθώς και τα ιχνοστοιχεία σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός και μαγγάνιο.^[180,186]
13. **Πολυσακχαρίτες**: ημικυτταρίνες (2,7%), πηκτίνες (3,5%) αποτελούμενες ως επί το πλείστον από αραβινόζη, γλυκόζη και γαλακτόζη, καθώς και υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες (3%) που αποτελούνται κυρίως από αραβινόζη, ξυλόζη και γαλακτόζη.^[199]

Το μέγεθος των μπουμπουκιών της κάππαρης επηρεάζει, σύμφωνα με σχετικές έρευνες που έγιναν, τη χημική σύσταση του φυτού. Έτσι λοιπόν φαίνεται πως η περιεκτικότητα σε νερό και υδατάνθρακες αυξάνει με την αύξηση του μεγέθους, ενώ αντίθετα η ποσότητα φλαβονοειδών, τέφρας, μετάλλων, λιπιδίων και πρωτεϊνών μειώνεται.^[180]

5.4 Επεξεργασία και εμπορική χρήση της κάππαρης

Η κάππαρη αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή αρωματικά φυτά της Μεσογειακής κουζίνας. Χρησιμοποιείται ευρέως ως άρτυμα και ορεκτικό, καθώς εκτιμάται η πικάντικη και δριμεία γεύση της. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής της είναι η Ισπανία, η Ιταλία, η Τουρκία, το Μαρόκο, η Γαλλία και η Ελλάδα με μία συνολική ετήσια παραγωγή που υπολογίζεται στους 10.000 τόνους.^[198] Η κάππαρη καλλιεργείται σε περιορισμένο βαθμό. Κατά κύριο λόγο συλλέγεται από τα αυτοφυή, άγρια φυτά που αφθονούν στη φύση. Τα άνθη της σχηματίζονται από το Μάιο έως τον Αύγουστο και πριν ανοίξουν, στο στάδιο που είναι ακόμη μπουμπούκια, συλλέγονται μαζί με τους τρυφερούς βλαστούς και τοποθετούνται σε ξύδι ή άλμη. Εκτός από τα κλειστά άνθη, βρώσιμα είναι επίσης τα φύλλα και οι καρποί (caperberries). Η τυπική επεξεργασία της κάππαρης προς τουρσί περιλαμβάνει την παραμονή της σε άλμη (περιεκτικότητας 16% NaCl w/v αρχικά και 20% μετά την πρώτη αλλαγή του διαλύματος), ενώ στη συνέχεια ξεπλένεται και η κάππαρη συσκευάζεται μέσα σε διάλυμα που περιέχει 6% αλάτι και 1% οξικό οξύ προκειμένου να διατηρηθεί, ως μη παστεριωμένο προϊόν και, να αποφευχθεί οποιαδήποτε ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η μικροβιακή χλωρίδα που έχει προσδιορισθεί στις περιπτώσεις αλλοίωσης, περιλαμβάνει γαλακτικά βακτήρια με κυρίαρχο το *Lactobacillus plantarum*. Η παστερίωση είναι μία μέθοδος που συνιστάται σαν εναλλακτικός τρόπος συντήρησης σε πιο ήπιες συνθήκες (χαμηλότερα επίπεδα σε αλάτι και ξύδι).^[186,189,200]

Από τα στοιχεία που υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τα συστατικά της φρέσκιας κάππαρης προκύπτει πως πρόκειται για ένα βρώσιμο φυτό υψηλής θρεπτικής αξίας. Η κάππαρη περιέχει μεγάλες ποσότητες φλαβονοειδών, ιδιαίτερα των φλαβονολών καιμυφερόλη και κερκετίνη. Θεωρείται μάλιστα μία από τις πλουσιότερες πηγές κερκετίνης, καθώς 10g (που αντιστοιχούν σε μία δυνατή ημερήσια πρόσληψη) παρέχουν τουλάχιστον ίση ποσότητα κερκετίνης με εκείνη που περιέχεται σε 100g κρεμμυδιών (μίας

από τις πλουσιότερες τροφές σε κερκετίνη).^[189] Επιπλέον, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας των σπόρων της κάππαρης σε πρωτεΐνες (22,5-27,5%), συγκριτικά με τα δημητριακά (10-15%) αλλά και τα όσπρια (18-25%), η ενδεχόμενη χρήση της ως νέας και ανέξοδης πηγής πρωτεϊνών για τον άνθρωπο παρουσιάζει ενδιαφέρον. Η κάππαρη αποτελεί γενικότερα μία ιδιαίτερα αξιόλογη πηγή φαινολικών συστατικών, λιπαρών οξέων, πρωτεϊνών, βιταμινών και καροτενοειδών.^[195,196]

Στην περίπτωση της επεξεργασμένης κάππαρης (τουρσί) πάντως διαπιστώνεται πως, ενώ τα φαινολικά συστατικά δεν έχουν επηρεαστεί ιδιαίτερα σε σύγκριση με το φρέσκο φυτό, η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, τοκοφερόλες και βιταμίνη C έχει μειωθεί δραματικά εξαιτίας των συνθηκών αποθήκευσης.^[180]

5.5 Φαρμακευτική χρήση της κάππαρης

Μελέτες που έγιναν πάνω στη χημική σύσταση του φυτού ανέδειξαν τον πλούτο των διαφόρων τμημάτων του σε πολλά ευεργετικά συστατικά.

Τις φαρμακευτικές ιδιότητες της κάππαρης εκμεταλλεύτηκαν οι περισσότεροι ανθρώπινοι πολιτισμοί. Στην Αρχαία Αίγυπτο και τις Αραβικές χώρες τα διάφορα μέρη του φυτού χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία ασθενειών του ήπατος, των νεφρών, του στομάχου, της σπλήνας, όπως επίσης και για το τσίμπημα του σκορπιού. Στην Αρχαία Ελλάδα η κάππαρη χρησίμευε σαν φάρμακο κατά του πονόδοντου, κατά του έλκους και σαν σπασμολυτικό, ενώ οι αρχαίοι Ρωμαίοι έκαναν με τα μπουμπούκια της κάππαρης θεραπεία κατά της παράλυσης και με τα άνθη έφτιαχναν παυσίπονα.^[198]

Στη σημερινή εποχή η κάππαρη χρησιμοποιείται ανά τον κόσμο σε ένα πλήθος φαρμακευτικών εφαρμογών, καθώς εμφανίζει αντιοξειδωτική, αντιϊκή, αντιϊσταμινική, αντιαλλεργική, αντιδιαβητική, αντιοιδηματική, αντικαρκινική, αναλγητική, αντιπυρετική και ηπατοπροστατευτική δράση. Χρησιμοποιείται επίσης για την αντιμετώπιση πονοκεφάλων, για στομαχικούς πόνους, σαν συστατικό σε κατάπλασμα, για τις δερματίτιδες, για τους ρευματισμούς, σαν αντιφλεγμονώδες, σαν σπασμολυτικό, τονωτικό, στυπτικό, υποτασικό, διουρητικό και σε πολλές ακόμη περιπτώσεις λιγότερο ή περισσότερο σοβαρές.

ΣΚΟΠΟΣ

Οι αφλατοξίνες αποτελούν μία τάξη ισχυρά τοξικών και καρκινογόνων ενώσεων που σχηματίζονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ορισμένων στελεχών του γένους *Aspergillus*, κυρίως των *A.flavus* και *A.parasiticus*. Σημαντικότερη όλων είναι η Αφλατοξίνη B₁, η οποία εμφανίζει τη μεγαλύτερη τοξικότητα και παράλληλα αποτελεί την κυρίαρχη τοξίνη σε ο,τι αφορά το ποσοστό επιμόλυνσης των καλλιεργειών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA), ρυθμιστικού παράγοντα των φυτών που αποτελεί ταυτόχρονα και την αμυντική απόκρισή τους σε εξωτερικές πιέσεις (stress), όπως είναι η προσβολή από κάποιο μύκητα, ως προς την επίδρασή τους στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus* και στη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης B₁ (ΑΦB₁) σε θρεπτικό υλικό YES. Ταυτόχρονα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα συγκεκριμένα αποτελέσματα μπορούν να βρουν εφαρμογή και στα τρόφιμα, επιλέχθηκε η κάππαρη, ένα ελληνικό προϊόν φυτικής προέλευσης, ως υπόστρωμα για την μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στις διεργασίες του μύκητα *A.parasiticus*.

Η επιλογή του *A.parasiticus* για τον εμβολιασμό των δύο υποστρωμάτων οφείλεται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μύκητας παράγει μεγαλύτερες ποσότητες ΑΦB₁ και με σταθερή απόδοση, ενώ είναι λιγότερο παθογόνος έναντι του *A.flavus*.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Μέτρα προστασίας και παρατηρήσεις κατά την πειραματική πορεία

Ο χειρισμός των καλλιιεργειών του μύκητα απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή διότι προκαλεί βλάβες στο αναπνευστικό σύστημα από την εισπνοή κονιδίων και συνδέεται με τοξικότητα και καρκινογένεση εξαιτίας της παραγόμενης Αφλατοξίνης B₁. Η ενεργοποίηση του μύκητα, οι εμβολιασμοί με κονίδια και γενικά όλες οι σχετικές μικροβιολογικές εργασίες απαιτούν ασηπτικές συνθήκες και για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar flow), ώστε να εξαιρεθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης της καθαρής καλλιέργειας. Οι εργασίες των εμβολιασμών γίνονται γύρω από αναμένο λύχνο Bunsen. Απαραίτητα είναι η εργαστηριακή φόρμα, η μικροβιολογική μάσκα και γάντια μιας χρήσεως.

Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στατικά, στο σκοτάδι, παρουσία αέρα και σε σταθερή θερμοκρασία 30°C. Ο αέρας είναι απαραίτητος για την ομαλή ανάπτυξη του μύκητα, αφού πρόκειται –στη συγκεκριμένη περίπτωση – για αερόβιο οργανισμό.

Για τον εμβολιασμό και την ετοιμασία των καλλιιεργειών επιλέχθηκε για λόγους ασφαλείας εμβόλιο με 10² κονίδια που είναι η μικρότερη ποσότητα κονιδίων που αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι παράγει αρκετή ποσότητα ΑΦΒ₁.^[15]

Πριν από την παραλαβή της ΑΦΒ₁ γίνεται αποστείρωση στους 115°C για 30 min. Σκοπός είναι η θανάτωση του μύκητα και των κονιδίων χωρίς παράλληλα να καταστρέφεται μεγάλο μέρος της παραγόμενης Αφλατοξίνης B₁.^[201]

Τα διαλύματα των κονιδίων, οι καλλιέργειες, καθώς και κάθε άλλο υλικό που έρχεται σε επαφή με το μύκητα αποστειρώνεται στους 125°C για 45 min σε ειδικές σακούλες αποστείρωσης και κατόπιν τα υπολείμματα της ΑΦΒ₁ διασπώνται με τη βοήθεια διαλύματος χλωρίνης 3,5%v/v για 24 ώρες. Στη συνέχεια, γίνεται αραίωση του διαλύματος χλωρίνης και απόρριψη αυτού στον απαγωγό κάτω από τρεχούμενο νερό. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιείται η μόλυνση του περιβάλλοντος από Αφλατοξίνες. Μετά από κάθε εργασία τα χέρια απολυμαίνονται με αντισηπτικό Hibitane Scrub Chlorhexidine Gluconate 4%w/v.

6.2 Στάδια πειραματικής πορείας

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται περιλαμβάνει επιγραμματικά τα ακόλουθα στάδια:

- 1) Παρασκευή θρεπτικών υλικών

- 2) Ενεργοποίηση και διατήρηση του στελέχους *Aspergillus parasiticus* Speare 283883
- 3) Αναγνώριση και μελέτη του στελέχους *Aspergillus parasiticus* Speare 283883
- 4) Προετοιμασία εμβολίου (παρασκευή διαλύματος κονιδίων του μύκητα *Aspergillus parasiticus*)
- 5) Παρασκευή διαλυμάτων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA)
- 6) Εμβολιασμός των τρυβλίων με θρεπτικό υλικό AFPA – Επώαση στους 30°C και παρακολούθηση της επίδρασης του MeJA στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus parasiticus*
- 7) Εμβολιασμός των δειγμάτων Yeast Extract Sucrose (YES) – Επώαση στους 30°C
- 8) Προσδιορισμός ΑΦΒ₁ σε πρότυπα διαλύματά της
- 9) Προσδιορισμός ΑΦΒ₁ και μυκηλιακής μάζας σε θρεπτικό υλικό YES
- 10) Επεξεργασία των δειγμάτων κάπαρης και εμβολιασμός τους με κονίδια του μύκητα *Aspergillus parasiticus* – επώαση στους 30°C
- 11) Προσδιορισμός ΑΦΒ₁ και μυκηλιακής μάζας σε δείγματα κάπαρης
- 12) Προετοιμασία δειγμάτων YES και εμβολιασμός με μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA) για την απομόνωση RNA του μύκητα *Aspergillus parasiticus* – επώαση στους 30°C
- 13) Απομόνωση RNA, μετατροπή σε cDNA και απομόνωση γονιδίων με επιλεγμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (primers) μέσω RT-PCR.

Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφονται αναλυτικά τα προαναφερθέντα στάδια.

6.3 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

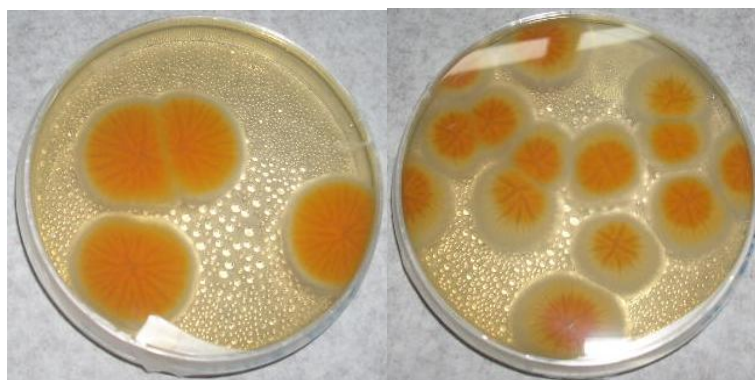
6.3.1 Γενικά

Τα θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται στη μικροβιολογία για την απομόνωση καθαρών καλλιεργειών και για τη διατήρησή τους, καθώς επίσης και για την προώθηση της ανάπτυξης μιας καθορισμένης κατηγορίας μικροοργανισμών ή ακόμα για την ανίχνευση μικροοργανισμών συγκεκριμένης κατηγορίας με την ενσωμάτωση κάποιου δείκτη στο θρεπτικό υλικό. Τα θρεπτικά υλικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται ως γενικής φύσεως θρεπτικά υλικά, ενώ εκείνα που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις μιας συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών ευνοώντας την εκλεκτική τους ανάπτυξη και παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των υπολοίπων ονομάζονται εκλεκτικά θρεπτικά υλικά.

Για την ενεργοποίηση, διατήρηση και ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus parasiticus* στα διάφορα στάδια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το γενικής φύσεως θρεπτικό υλικό CzA (Czapek Dox Agar) και το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό AFPA (*Aspergillus Flavus* and *Parasiticus* Agar), το οποίο είναι κατάλληλο για την ταχεία ανίχνευση των μυκήτων

A.parasiticus και *A.flavus*,^[202] ενώ ένα άλλο γενικής φύσεως θρεπτικό υλικό, το YES (Yeast Extract Sucrose), χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* παρουσία και απουσία μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) με σκοπό τον προσδιορισμό της παραγόμενης ΑΦΒ₁.

Η σύσταση του θρεπτικού υλικού AFPA είναι τέτοια που να εμποδίζει την ανάπτυξη άλλων μυκήτων επιτρέποντας την ικανοποιητική ανάπτυξη τοξινογόνων μυκήτων χάρη στην παρουσία του dichloran (2,6 διχλωρο-4-νιτροανιλίνη) – μίας ένωσης που χρησιμοποιείται ευρέως ως παρασιτοκτόνο –, η οποία παρεμποδίζει τους γρήγορα αναπτυσσόμενους μύκητες, ενώ παράλληλα ένα άλλο συστατικό του, η χλωραμφαινικόλη, αποτελεί αντιβιοτικό που αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Βασικό συστατικό του θρεπτικού υλικού αποτελεί επίσης ο κιτρικός σίδηρος (ferric ammonium citrate), στην παρουσία του οποίου οφείλεται η εμφάνιση χαρακτηριστικών ακτινωτών αποικιών χρώματος καφέ-πορτοκαλί των μυκήτων *A.parasiticus* και *A.flavus* που παρατηρούνται στη ανεστραμμένη όψη τους (σχήμα 6.1). Τα είδη των μυκήτων της ομάδας *A.flavus* παράγουν ασπεργιλλικό και νεο-ασπεργιλλικό οξύ, τα οποία αντιδρώντας με τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) σχηματίζουν ένα σύμπλοκο 3 μορίων ασπεργιλλικού οξέος με ιόντα σιδήρου. Πιθανή πηγή λάθους αποτελεί ο μύκητας *A.niger*, όμως η χρώση των ανεστραμμένων αποικιών του είναι υποκίτρινη και μετά από 48 ώρες επώασης αρχίζει η παραγωγή μαύρων κονιδίων που τον διαχωρίζει από τα είδη *A.parasiticus* και *A.flavus*. Ο *A.oryzae* που χρησιμοποιείται στη ζύμωση προϊόντων που προέρχονται από την Άπω Ανατολή και ο *A.tamarii* είναι σπάνιοι, ενώ ο *A.ochraceus* αναπτύσσεται αργά σε θρεπτικό υλικό AFPA και χρωματίζεται μετά από τρεις ημέρες.^[15,203] Κατά συνέπεια μετά την επώαση στους 30°C για 42-48 h, οι χαρακτηριστικές αποικίες αποδίδονται στα τοξινογόνα είδη των *A.parasiticus* και *A.flavus*.



Σχήμα 6.1: Ακτινωτές αποικίες του μύκητα *A.parasiticus* σε θρεπτικό υλικό AFPA

6.3.2 Κρίσιμα στάδια στην παρασκευή των θρεπτικών υλικών και στον εμβολιασμό των μυκήτων

Κατά την παρασκευή των θρεπτικών υλικών πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τα ακόλουθα.^[204]

- Τα τρυβλία πρέπει να ετοιμάζονται την προηγούμενη ημέρα ή τουλάχιστον 4 h πριν τη χρήση τους, έτσι ώστε να μπορούν να στερεοποιηθούν στους 20 -25°C ή σε θερμοκρασία δωματίου. Θρεπτικά υλικά που περιέχουν rose bengal πρέπει να φυλάγονται μακριά από το φως, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός τοξικού προϊόντος.
- Το εναιώρημα των μυκήτων είναι προτιμότερο να εμβολιάζεται επιφανειακά σε στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται καλύτερη ανάκτηση των κυττάρων, λόγω αφθονίας του διαθέσιμου οξυγόνου.
- Ο όγκος των εμβολίων που απλώνονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού κυμαίνεται από 0,1 έως το πολύ 0,3 mL εναιωρήματος κονιδίων σε διάλυμα TWEEN 80 0,05% v/ v.

6.3.3 Σύσταση θρεπτικών υλικών

Η σύσταση των θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στους Πίνακες 6.1, 6.2 και 6.3 που ακολουθούν.

Πίνακας 6.1: Σύσταση θρεπτικού υλικού CzA

Χημική ουσία	Ποσότητα σε g/100 mL H ₂ O
NaNO ₃	0,2
KCl	0,05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001
K ₂ HPO ₄	0,1
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	0,001
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0005
Σακχαρόζη	3
Άγαρ	1,5

Πίνακας 6.2: Σύσταση θρεπτικού υλικού AFPA

Χημική ουσία	Ποσότητα σε g/100 mL H ₂ O
Εκχύλισμα ζύμης	2
Βακτηριολογική πεπτόνη	1
Κιτρικός αμμωνιούχος σίδηρος	0,05
2,6 Διχλωρο-4-νιτροανιλίνη	0,1 mL (διάλυμα σε EtOH)
Χλωραμφαινικόλη	0,01
Άγαρ	1,5

Πίνακας 6.3: Σύσταση θρεπτικού υλικού YES

Χημική ουσία	Ποσότητα σε g/100 mL H ₂ O
Εκχύλισμα ζύμης	2
Σακχαρόζη	15

Σημείωση: Κατά την παρασκευή των θρεπτικών υλικών η σειρά προσθήκης των ουσιών συμπίπτει με τη σειρά που αναφέρονται στους παραπάνω πίνακες.

6.3.4 Διαδικασία παρασκευής θρεπτικών υλικών

Παρασκευάσθηκαν θρεπτικά υλικά με τα οποία πληρώθηκαν τρυβλία και υάλινα βιδωτά φιαλίδια (slants) σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια:

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) Telstar Bio-II-A
- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας $\pm 0,0001$, Mettler Delta Trak
- Μαγνητικός αναδευτήρας HI 200m Hanna
- Κωνικές φιάλες pyrex των 50, 100, 250 και 500 mL
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50, 100 και 250 mL
- Μεταλλική σπάτουλα
- Πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm (Sterilin)
- Υάλινα βιδωτά φιαλίδια Universal των 20 mL (αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες)
- Ανυδρόφιλο βαμβάκι και γάζες

Αντιδραστήρια

- Εκχύλισμα ζύμης, Yeast extract (Oxoid)
- Κιτρικός αμμωνιούχος σίδηρος, Ammonium iron citrate, 18% Fe (Merck)
- 2,6- Διχλωρο-4- νιτροανιλίνη, Dichloran, C₆H₄Cl₂N₂O₂ (Fluka)
- Χλωραμφαινικόλη, Chloramphenicol, C₁₀H₁₁N₂O₅Cl₂ (Oxoid)
- Άγαρ βακτηριολογικό (Oxoid)
- Σακχαρόζη, Saccharose for microbiology, C₁₂H₂₂O₁₁
- Νιτρικό νάτριο, NaNO₃ (Merck)
- Χλωριούχο κάλιο, KCl (Merck)

- Θειικό μαγνήσιο, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Θειικός σίδηρος (II), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Όξινο φωσφορικό κάλιο, K_2HPO_4 (Merck)
- Θειικός ψευδάργυρος, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Θειικός χαλκός, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Απεσταγμένο νερό

Πορεία

Σε κωνική φιάλη προστίθενται τα $\frac{3}{4}$ του απεσταγμένου νερού που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί προσθήκη των συστατικών των θρεπτικών υλικών στις κατάλληλες αναλογίες, με συνεχή ανάδευση μέσω μαγνητικού αναδευτήρα. Τέλος, προστίθεται η υπόλοιπη ποσότητα νερού και πωματίζεται η φιάλη με γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι.

Για την πλήρωση των τρυβλίων, η κωνική φιάλη με το εκάστοτε θρεπτικό υλικό (CzA ή AFPA) αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min, ώστε να είναι δυνατή η επίτευξη καθαρής καλλιέργειας. Μετά την αποστείρωση, το θρεπτικό υλικό αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους $40\text{--}50^\circ\text{C}$, οπότε και μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες – είναι το σύνολο των μέτρων και των χειρισμών με τους οποίους αποφεύγονται οι μολύνσεις αποστειρωμένων αντικειμένων και μέσων ^[202,205] – σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri. Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 25 mL θρεπτικό υλικό, ώστε το πάχος του να είναι τουλάχιστον 4 mm και να εξασφαλίζεται με αυτόν τον τρόπο η επαρκής ανάπτυξη των μυκήτων. Τα τρυβλία τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο, για την αποφυγή σχηματισμού υδρατμών και αφήνονται να κρυώσουν. Αφού περάσουν 4 ώρες και το περιεχόμενο θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί επαρκώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ή να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να χρησιμοποιηθούν (όχι περισσότερο από 4-5 ημέρες), αφού κλειστούν με parafilm, ώστε να διατηρείται η υγρασία τους και να μην επιμολύνονται. Παράλληλα παρασκευάζονται και slants, δηλαδή σωλήνες με στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό (CzA) υπό κλίση. Στην περίπτωση αυτή, ο απαιτούμενος αριθμός φιαλιδίων Universal έχει αποστειρωθεί στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό μεταγγίζεται υπό ασηπτικές συνθήκες στα φιαλίδια Universal, τα οποία αφήνονται να κρυώσουν υπό κλίση, αφού κλείσουν ερμητικά.

6.4 Ενεργοποίηση – Διατήρηση του στελέχους *Aspergillus Parasiticus* Speare IMI 283883

6.4.1 Εισαγωγή – Τεχνικές συντήρησης μυκήτων

Οι τεχνικές συντήρησης μυκήτων αποσκοπούν στη συντήρηση του μικροοργανισμού χωρίς διαφοροποίηση, μετάλλαξη ή εκφυλισμό. Επιτυγχάνεται με αυτόν

τον τρόπο η διατήρηση της ζωτικότητάς τους χωρίς ταυτόχρονη ανάπτυξη ή σποριογονία.^[14]

Οι τεχνικές συντήρησης των μικροοργανισμών κατατάσσονται σε 3 βασικές κατηγορίες:

- I. αφυδάτωση (desiccation)
- II. κατάψυξη (cryopreservation) και
- III. συνεχής ανάπτυξη (continuous growth)

Η μέθοδος agar-slant,^[14,25] περιλαμβάνει την ανά τακτά χρονικά διαστήματα μεταφορά σπορίων από ένα παλιό slant (φιαλίδιο με στερεό θρεπτικό υλικό υπό κλίση) σε ένα νέο slant, αφού προηγηθεί αναζωογόνηση του μύκητα σε τρυβλίο με καθορισμένης σύστασης στερεό θρεπτικό υλικό, ώστε να είναι εφικτή η πλήρης εξέταση της μορφολογίας και ο έλεγχος πιθανών μολύνσεων. Τα νέα slants διατηρούνται στους 2-4°C για 3 έως 6 μήνες και η πορεία επαναλαμβάνεται. Συνιστάται δε και ο τακτικός μικροσκοπικός έλεγχος των στελεχών για τη διαπίστωση της διατήρησης του μύκητα στην επιθυμητή κατάσταση. Στην παρούσα εργασία το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις ανακαλλιέργειες του μύκητα *A.parasiticus* ήταν το CzA, το οποίο διατηρεί σε σημαντικό βαθμό τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του μύκητα.

6.4.2 Προβλήματα συντήρησης μυκήτων – μολύνσεις

Η διαδικασία ανακαλλιέργειας του υπό μελέτη μύκητα (*Aspergillus parasiticus*) πρέπει να εκτελείται με ιδιαίτερη προσοχή, διότι τα κονίδια είναι εξαιρετικά ελαφριά και μεταφέρονται με τον αέρα, με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης ειδών του γένους *Aspergillus* από άλλα είδη ή μύκητες. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αντικατασταθεί ένα στέλεχος από έναν εισβολέα.

Για τους νηματοειδείς μύκητες, όπως ο *Aspergillus parasiticus*, η συνεχής ανακαλλιέργεια είναι μία καλή μέθοδος για μικρά χρονικά διαστήματα, ενώ για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μπορεί να εφαρμοστεί η παραλλαγή με το παραφινέλαιο (αποθήκευση της καλλιέργειας κάτω από στρώμα παραφίνης). Επιπλέον κάποια είδη μυκήτων εμφανίζουν ευαισθησία στις μεθόδους ξήρανσης, ενώ οι κρυοπροστατευτικές μέθοδοι προτείνονται για όλα τα είδη.^[206]

Η λυοφιλίωση, τέλος, εφαρμόζεται ευρέως στη μακρόχρονη συντήρηση καλλιεργειών *Aspergillus parasiticus*.

6.4.3 Προσδιορισμός ανάπτυξης μυκήτων

6.4.3.1 Μικροβιολογικές μέθοδοι – Μέτρηση μυκηλιακής μάζας ^[96,207]

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για να μετρηθεί η δραστηριότητα και η ανάπτυξη των μυκήτων. Οι μικροβιολογικές μέθοδοι είναι οι πιο κοινές. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες από αυτές:

- Μέτρηση αποικιών σε τρυβλία
- Μικροσκοπική παρατήρηση μυκηλίου
- Μέτρηση βιομάζας μυκηλίου
- Μέτρηση της ακτίνας των αποικιών του μύκητα πάνω σε στερεό θρεπτικό υλικό

υλικό

Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται ο σταθμικός προσδιορισμός της ξηρής μυκηλιακής μάζας ενός μύκητα. Ο μύκητας αναπτύσσεται σε ένα θρεπτικό υλικό, ξηραίνεται και ζυγίζεται η ξηρή μυκηλιακή μάζα. Με τον τρόπο αυτό παρακολουθείται η ανάπτυξη του μύκητα σε κάθε ημέρα επώασής του και μπορεί να κατασκευαστεί η καμπύλη ανάπτυξής του.

6.4.4 Ιστορικό του μύκητα

Το στέλεχος του μύκητα παραλήφθηκε σε λυοφιλιωμένη μορφή το Σεπτέμβριο του 1997 από την τράπεζα μικροοργανισμών IMI (International Mycological Institute) στην Αγγλία και διατηρήθηκε υπό ψύξη (2-8°C). Η ενεργοποίηση του στελέχους έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες από το IMI.^[20,29]

Χαρακτηριστικά του μύκητα:

- ❖ Διαίρεση (division): *Deuteromycota*
- ❖ Υποδιαίρεση (subdivision): *Deuteromycotina – Imperfect fungi*
- ❖ Κλάση (class): *Hyphomycetes*
- ❖ Τάξη (order): *Hyphales (Moniliales)*
- ❖ Οικογένεια: *Moniliaceae*
- ❖ Γένος: *Aspergillus*
- ❖ Ομάδα: *Aspergillus flavus group*
- ❖ Είδος: *Aspergillus parasiticus*
- ❖ Στέλεχος: *Aspergillus parasiticus* Speare IMI 283883

6.4.5 Ενεργοποίηση του μύκητα

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) Telstar Bio-II-A
- Αυτόματες πιπέτες των 25-250 μL , 100-1000 μL και των 10-100 μL Hirschmann Laborgeräte
- Πλαστικά ρύγχη (tips)
- Πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm (Sterilin)
- Κλίβανος επώασης FTC 90I (Velp Scientifica)
- Υάλινα βιδωτά φιαλίδια των 20mL (Universal)
- Μικροβιολογικός κρίκος (inoculation loop)
- Λύχνος Bunsen

- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica)
- Μαγνητικός αναδευτήρας HI 200m Hanna
- Υάλινες πιπέτες Pasteur
- Parafilm "M" Laboratory film American National Film
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας $\pm 0,0001$, Mettler Delta Trak

Αντιδραστήρια

- Λυοφιλιωμένο στέλεχος *Aspergillus parasiticus* Spreare IMI 283883
- Αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό
- Αιθυλική αλκοόλη 95% extra pure (Scharlau)
- NaOCl 3,5% v/v (αραίωση χλωρίνης εμπορίου περιεκτικότητας 4,5% σε ενεργό χλώριο)
- Θρεπτικό υλικό CzA

Πορεία

Με προσοχή αφαιρείται το πώμα, ώστε ο αέρας να περάσει σιγά–σιγά στο φιαλίδιο που περιέχει το λυοφιλιωμένο στέλεχος *Aspergillus parasiticus*. Προστίθενται βαθμιαία 0,5 mL αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό, για να μη δημιουργηθεί αερόλυμα. Αφού περάσουν 30 min για να απορροφηθεί το νερό, μεταφέρεται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό CzA. Με αυτόματη πιπέτα εμβολιάζονται 0,2 mL σε 5 σημεία πάνω στα τρυβλία. Τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 23°C για 8 ημέρες, ώστε να σχηματιστούν ώριμες αποικίες με κονίδια.^[96]

6.4.6 Διατήρηση του μύκητα

Σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας, εφαρμόστηκε η μέθοδος agar-slant.^[25] Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη μέθοδο συντήρησης των μυκήτων, η οποία περιλαμβάνει την περιοδική μεταφορά σπορίων από μία ώριμη αποικία που βρίσκεται σε τρυβλίο με κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό, σε φιαλίδιο με στερεό θρεπτικό υλικό υπό κλίση (slant) εις τριπλούν μέχρι να αναπτυχθεί μια νέα σοδειά σπορίων. Κατόπιν, ελέγχονται οι αποικίες μακροσκοπικά και επιλέγονται αυτές που θα αποθηκευτούν. Η ζωτικότητα του στελέχους επιμηκύνεται και η πιθανότητα βαθμιαίας μετάλλαξης ελαττώνεται με αποθήκευση στους 2-4°C. Στη συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκε για στερεό θρεπτικό υλικό το Czapek Dox Agar σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^[25,35] και τις οδηγίες του IMI.

Πορεία

Η ακόλουθη πορεία, γνωστή ως ανακαλλιέργεια του μύκητα, πραγματοποιείται κάθε 3 μήνες με σκοπό τη διατήρησή του σε άριστη κατάσταση. Τρυβλία με θρεπτικό υλικό CzA εμβολιάζονται, υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου, με κονίδια από παλαιότερη καλλιέργεια και επωάζονται στους 30°C για 5 ημέρες με σκοπό την αναζωογόνηση του μύκητα. Ακολουθεί εμβολιασμός φιαλιδίων που περιέχουν CzA

(slants) με κονίδια του αναζωογονημένου μύκητα. Οι ενέργειες που εκτελούνται κατά την ανακαλλιέργεια είναι οι εξής: α) πριν την έναρξη της διαδικασίας προετοιμάζεται ο θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (laminar flow) β) ο μικροβιολογικός κρίκος που θα χρησιμοποιηθεί πυρακτώνεται στην οξειδωτική φλόγα του λύχνου και ψύχεται ερχόμενος σε επαφή με την επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού Czα γ) με τη βοήθεια του κρίκου συλλέγονται κονίδια από την επιφάνεια μιας αποικίας που βρίσκεται στο τρυβλίο με θρεπτικό υλικό Czα και τοποθετούνται προσεκτικά σε δύο σημεία του υπό κλίση στερεού θρεπτικού υλικού Czα (slants) δ) τα slants επωάζονται στο σκοτάδι για 7 ημέρες στους 30°C (Σημείωση: κατά τη διάρκεια της επώασης τα πώματα των slants πρέπει να είναι βιδωμένα χαλαρά, ώστε να είναι δυνατή η είσοδος του αέρα) ε) τα slants με τα ώριμα μυκήλια διατηρούνται υπό ψύξη (2-4°C) για 3 περίπου μήνες.

6.5 Αναγνώριση – Μελέτη του Στελέχους *Aspergillus Parasiticus* Speare IMI 283883

Η μελέτη του μύκητα περιλαμβάνει τα εξής:

1. *Μακροσκοπική παρατήρηση των αποικιών σε:*

α) θρεπτικό υλικό AFPA, όπου οι αποικίες είναι άσπρες με υφές που φέρουν αυλακώσεις, ενώ ανεστραμμένες εμφανίζονται ακτινωτές με πορτοκαλί-καφέ χρώμα.

β) θρεπτικό υλικό Czα, όπου οι αποικίες έχουν υφή βελουτέ που απλώνονται γρήγορα σχηματίζοντας πλήθος κονιδιοφόρων με λίγες υφές. Το χρώμα τους την 8^η ημέρα είναι σκούρο πράσινο, ενώ ανεστραμμένες οι αποικίες είναι κιτρινωπές-μπεζ με αυλακώσεις.

2. *Μικροσκοπική παρατήρηση έπειτα από μονιμοποίηση (θανάτωση) και χρώση του μύκητα με μπλε της ανιλίνης.* Οι παρατηρήσεις μας βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ^[25,208] κατά τα οποία ο μύκητας έχει υφές με εγκάρσια τοιχώματα (septa), κονιδιοφόρους χωρίς septa με μη λεία τοιχώματα που καταλήγουν σε σφαιρική κολουμέλλα και γύρω από το κυστίδιο υπάρχει μια σειρά στηριγμάτων που φέρουν πλήθος σφαιρικών κονιδίων.

3. *Έλεγχος παραγωγής Αφλατοξίνης B₁* που αποτελεί τη σημαντικότερη επιβεβαίωση ότι ο πρότυπος μύκητας είναι όντως κάποιο στέλεχος *Aspergillus parasiticus*. Οι Αφλατοξίνες είναι χαρακτηριστικά προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού διακεκριμένων ειδών, κυρίως του *Aspergillus parasiticus* και του *Aspergillus flavus*, ενώ πλέον ενοχοποιούνται και κάποια άλλα είδη του γένους *Aspergillus*. Ο προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B₁ σε καλλιέργειες του πρότυπου μύκητα που χρησιμοποιήθηκε και μάλιστα σε αυξημένα επίπεδα επιβεβαίωσε ότι πρόκειται για ένα τοξινογόνο στέλεχος *Aspergillus parasiticus*.

Το μόνο παρεμφερές είδος που μπορεί να έχει τόσο κοντινά χαρακτηριστικά με τον *Aspergillus parasiticus* είναι ο *Aspergillus flavus*. Μικροσκοπικά τα δύο αυτά είδη πολύ δύσκολα μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Πλήρης διάκριση μπορεί να γίνει μόνο με βιοχημικές αναλύσεις και ανάλυση DNA.^[27]

6.6 Προσδιορισμός ΑΦΒ₁ (σε δείγματα και σε πρότυπα διαλύματα)

6.6.1 Αρχή της μεθόδου προσδιορισμού της ΑΦΒ₁

Ο προσδιορισμός της ΑΦΒ₁ βασίζεται στην ιδιότητά της να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, φθορίζει όταν διεγείρεται στα 365 nm και εκπέμπει στα 425 nm. Κατά τον προσδιορισμό της μέσω HPLC προηγείται η εκχύλιση της συγκεκριμένης τοξίνης με CH₃OH ή κατάλληλο μίγμα διαλυτών ανάλογα με το υπόστρωμα και η παραλαβή – απομόνωσή της με στήλες ανοσοσυγγένειας.^[15,209] Ακολουθεί η διαδικασία της παραγωγοποίησης της ΑΦΒ₁ σε ΑΦΒ_{2α} (ημιακετάλη της ΑΦΒ₁), επειδή η ΑΦΒ_{2α} παρουσιάζει μεγαλύτερη ένταση φθορισμού. Τέλος, πραγματοποιείται ισοκρατική έκλουση της μυκοτοξίνης με κινητή φάση H₂O:CH₃CN:CH₃OH (20:4:3v/v/v) σε στήλη ανάστροφης φάσης.



Σχήμα 6.2: Φθορισμός της ΑΦΒ₁ σε καλλιέργειες *A.parasiticus*

6.6.2 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ΑΦΒ₁

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Φασματοφωτόμετρο Helios β (Unicam)
- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica)
- Αυτόματες πιπέτες των 25-250 μL, 100-1000 μL, 10-100μL και 0,5-5 mL Hirschmann Laborgeräte
- Πλαστικά ρύγχη (tips)
- Σκουρόχρωμα φιαλίδια (vial) των 4mL (Supelco)
- Κυψελίδες από χαλαζία
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) Telstar Bio-II-A
- Συσκευή εξατμίσεως με ρεύμα αζώτου Pierce Reacti-Therm™ Heating Module 18790 and Reacti-Vap™ Model 18780
- Υδρόλουτρο BÜCHI-461 Water Bath
- Συσκευή Water Milli-Q, Millipore αντιστρόφου ωσμώσεως με αγωγιμότητα < 18μS
- Συσκευή διηθήσεως κενού της Millipore
- Συσκευή υπερήχων Elmasonic S15H
- Συσκευή HPLC: Hewlett Packard Series 1050
- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής Jasco FP-920
- Καταγραφέας: Hewlett Packard HP 3395 Integrator

- Φίλτρα διηθήσεως 0,45 μm type HVLP, Millipore
- Προστήλες Waters Novapak[®] C₁₈
- Στήλη ανάστροφης φάσης: Waters Novapak[®] C₁₈, 4,6x250 mm
- Σύριγγες εισαγωγής δείγματος 20 μL και 50 μL , Hellamco
- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακρίβειας $\pm 0,0001$, Mettler Delta Trak
- Ποτήρι ζέσεως των 1000mL

Αντιδραστήρια

- Απεσταγμένο νερό
- Μεθανόλη (CH_3OH) για HPLC (Fisher Scientific)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) για HPLC (Fisher Scientific)
- Πρότυπα Αφλατοξίνης B₁ σε μορφή σκόνης (Sigma crystal pure 1 mg)
- Εξάνιο (C_6H_{14}) 96% extra pure (Scharlau)
- Τριφθοροξικό οξύ (CF_3COOH) TFA (Merck)
- Απόλυτη αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (Merck, Reagent grade)
- Νερό καθαρότητας HPLC, παραγόμενο από ηλεκτρονική συσκευή φιλτραρίσματος και υπερδιήθησης της Waters Millipore, Milli Q αντιστρόφου ωσμώσεως με αγωγιμότητα $< 18 \mu\text{S}$

Τα διαλύματα πρότυπης Αφλατοξίνης B₁ παρασκευάζονται από πρότυπη Αφλατοξίνη B₁ σε μορφή σκόνης ή σε μορφή διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος Αφλατοξίνης B₁, όπως περιγράφεται από τις οδηγίες της Υπηρεσίας Υγιεινής και Ασφάλειας των Τροφίμων της Γαλλίας (AFSSA).^[208] Η τιμή της απορρόφησης πολλαπλασιάζεται με ένα ειδικό για κάθε Αφλατοξίνη συντελεστή και έτσι προκύπτει η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος Αφλατοξίνης B₁.

Πορεία

A. Παρασκευή μητρικού διαλύματος-1 συγκέντρωσης $c=0,5 \text{ mg/mL}$

Αραιώνουμε 1 mg πρότυπης Αφλατοξίνης B₁ σε 2 mL μεθανόλης και αναδεύουμε με αναδευτήρα vortex. Το διάλυμα-1 που προκύπτει έχει συγκέντρωση $c= 0,5 \text{ mg/mL}$.

B. Παρασκευή διαλύματος-2 συγκέντρωσης $c=5 \mu\text{g/mL}$

Για την παρασκευή του διαλύματος-2 συγκέντρωσης $c=5 \mu\text{g/mL}$ προσθέτουμε 100 μL του μητρικού διαλύματος σε 9.900 μL μεθανόλης. Το διάλυμα που προκύπτει φωτομετρείται έναντι μεθανόλης στα 335 nm. Σύμφωνα με τις οδηγίες του AFSSA η απορρόφηση του πρέπει να είναι 0,385. Επειδή πειραματικά η απορρόφηση βρέθηκε 0,235 η φωτομέτρηση επαναλήφθηκε στα 360 nm και η συγκέντρωσή του υπολογίζεται βάση του ακόλουθου τύπου:

$$c = \frac{A \cdot M \cdot 1000}{\epsilon}$$

όπου : A = η απορρόφηση στα 360 nm

M = 312 το μοριακό βάρος της ΑΦΒ₁

$\epsilon = 21800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ο συντελεστής ειδικής απορρόφησης της ΑΦΒ₁

Η απορρόφηση βρέθηκε $A = 0,248$, οπότε με βάση τον παραπάνω τύπο η συγκέντρωση του διαλύματος-2 υπολογίζεται ότι είναι ίση με $c = 3,549 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

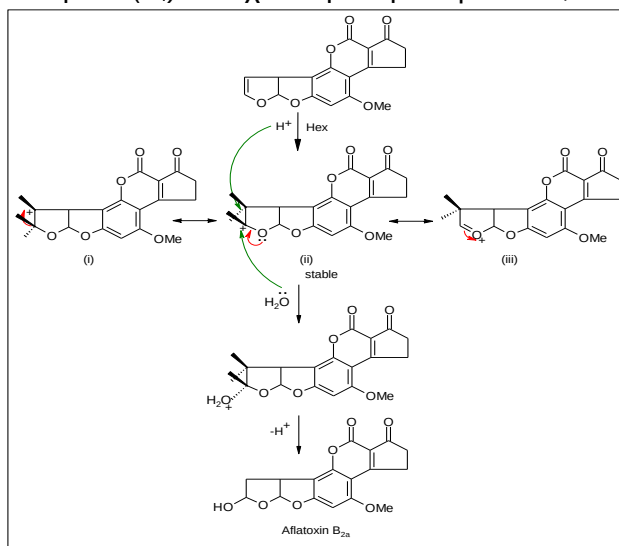
6.6.3 Παραγωγοποίηση προτύπου διαλύματος ΑΦΒ₁ προς ΑΦΒ_{2α}

Αρχή μεθόδου

Η Αφλατοξίνη Β₁ με την προσθήκη εξανίου και τριφθοροξικού οξέος και σε θερμοκρασία 40°C παραγωγοποιείται στην ημιακετάλη της Β_{2α}, η οποία φθορίζει περισσότερο.

Πορεία

Από το διάλυμα-2 που έχουμε παρασκευάσει, λαμβάνουμε σε φιαλίδιο 14 μL που αντιστοιχούν σε 49,69 ng Αφλατοξίνης Β₁ και τα εξατμίζουμε σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Ακολουθεί προσθήκη 200 μL εξανίου, ανάδευση στο vortex για 30 s, προσθήκη 200 μL τριφθοροξικού οξέος και ανάδευση για άλλα 30 s.^[210] Το φιαλίδιο τοποθετείται για 10 min σε υδρόλουτρο (40°C) στο σκοτάδι για να ολοκληρωθεί η αντίδραση παραγωγοποίησης (σχήμα 6.3). Το μίγμα εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε 1 mL διαλύματος H₂O : CH₃CN (9:1 v/v). Το διάλυμα που προκύπτει, καλείται διάλυμα-4 (δ₄) και έχει συγκέντρωση $c = 49,69 \text{ ng/mL}$.



Σχήμα 6.3: Πορεία σχηματισμού της ΑΦΒ_{2α} κατά την παραγωγοποίηση της ΑΦΒ₁

6.6.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ΑΦΒ_{2α} (ημιακετάλη της ΑΦΒ₁)

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων ΑΦΒ_{2α} χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα-4 (δ₄) της προηγούμενης παραγράφου. Η σύσταση των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν φαίνεται στον πίνακα 5.4 που ακολουθεί.

Πίνακας 6.4: Σύσταση προτύπων διαλυμάτων AFB_{2a}

Διάλυμα Δ ₁	<u>C = 10 ng/mL</u>	50μL δ/τος δ ₄ + 200μL δ/τος H ₂ O : CH ₃ CN (9:1)
Διάλυμα Δ ₂	<u>C = 5 ng/mL</u>	50μL δ/τος δ ₄ + 450μL δ/τος H ₂ O : CH ₃ CN (9:1)
Διάλυμα Δ ₃	<u>C = 2,5 ng/mL</u>	25μL δ/τος δ ₄ + 475μL δ/τος H ₂ O : CH ₃ CN (9:1)
Διάλυμα Δ ₄	<u>C = 2 ng/mL</u>	100μL δ/τος δ ₄ + 400μL δ/τος H ₂ O : CH ₃ CN (9:1)
Διάλυμα Δ ₅	<u>C = 1 ng/mL</u>	100μL δ/τος δ ₄ + 400μL δ/τος H ₂ O : CH ₃ CN (9:1)

6.6.5 Προσδιορισμός της ΑΦΒ_{2a} με HPLC

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ΑΦΒ₁, μετά την παραγωγοποίησή της σε ΑΦΒ_{2a}, εφαρμόζεται η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) ανάστροφης φάσης.^[211] Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ισοκρατική έκλυση των τοξινών με κινητή φάση H₂O:CH₃CN:CH₃OH (20:4:3v/v/v).

Συνθήκες λειτουργίας HPLC:

Κινητή φάση: H₂O:CH₃CN:CH₃OH (20:4:3 v/v/v)

Ροή κινητής φάσης: 1 mL/ min

Μήκη κύματος ανιχνευτή φθορισμού:

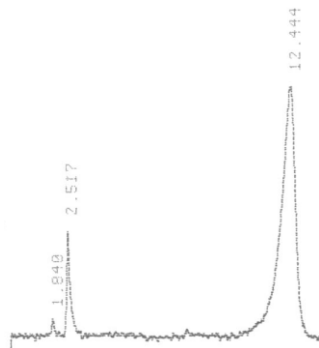
➤ m_{ex}: 365nm, m_{em}: 425nm

Χρόνος ανάσχεσης: 12,73 min (±0,25 min) στο YES, 12,60 min (±0,20 min) στην κάπαρη

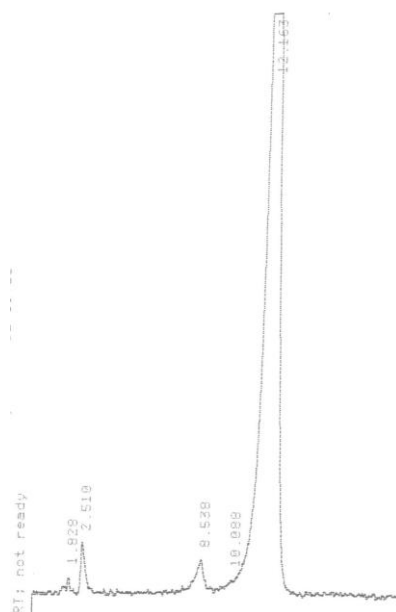
Ρυθμίσεις παραμέτρων καταγραφικού:

- Γραμμή βάσης (zero): 0
- Ευαισθησία (attenuation): 4 (επηρεάζει τη μορφή του χρωματογραφήματος. Συγκεκριμένα επηρεάζει τη σχέση σήματος με την κλίμακα καταγραφής, αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερες τιμές παίρνει, τόσο μικρότερες σε μέγεθος κορυφές καταγράφονται)
- Ταχύτητα εκτύπωσης χαρτιού (chart speed): 0,5 (επηρεάζει τη μορφή καθορίζοντας το πόσο οξείες και συρρικνωμένες θα εμφανίζονται οι κορυφές)
- Εμβαδόν απόρριψης (area rejection): 10000 (καθορίζει το όριο του εμβαδού, ώστε κορυφές με μικρότερο εμβαδό από το συγκεκριμένο όριο να μην καταγράφονται)
- Κατώφλι (threshold): 4 (καθορίζει την ευαισθησία αναγνώρισης μιας κορυφής. Όσο μεγαλύτερο τόσο λιγότερες κορυφές αναγνωρίζονται)
- Πλάτος κορυφής (peak width): 0,16

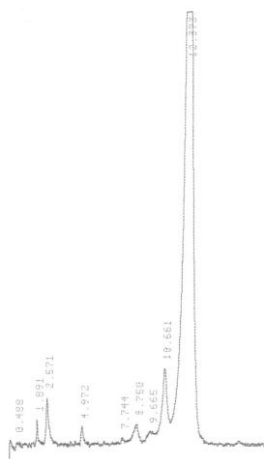
Στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποια χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση με HPLC δειγμάτων του πειραματικού σταδίου. Η ουσία που εκλύεται από τη στήλη της HPLC είναι η ΑΦΒ_{2a}.



Σχήμα 6.4: Πρότυπο διάλυμα ΑΦΒ_{2α} που αντιστοιχεί σε 0,10 ng όγκος έκχυσης 40 μL



Σχήμα 6.5: Δείγμα YES εμβολιασμένο με 10^2 κονίδια του μύκητα *A.parasiticus* τη 12^η ημέρα επώασης
όγκος έκχυσης 40 μL
αραίωση δείγματος 1:1000 (τοξίνη:διαλύτης)



Σχήμα 6.6: Δείγμα κάππαρης εμβολιασμένο με 10^2 κονίδια του μύκητα *A.parasiticus* τη 12^η ημέρα επώασης
όγκος έκχυσης 40 μL
αραίωση δείγματος 1:100 (τοξίνη:διαλύτης)

6.6 Παρασκευή εναιωρήματος κονιδίων του μύκητα *Aspergillus parasiticus*

Για την παρασκευή του εναιωρήματος κονιδίων λαμβάνονται κονίδια από ώριμο μυκήλιο 7 ημερών σε στερεό θρεπτικό υλικό CzA. Το αρχικό φορτίο των κονιδίων σε Αφλατοξίνη B₁ περιορίζεται με διαδοχικές φυγοκεντρίσεις. Ακολουθούν κατάλληλες αραιώσεις του πυκνού εναιωρήματος των κονιδίων και η συγκέντρωσή τους προσδιορίζεται με τη μέθοδο αρίθμησης των αποικιών σε εκλεκτικό για αφλατοξινογόνους μύκητες θρεπτικό υλικό, το AFPA. Με αυτόν τον τρόπο, ο οποίος πλεονεκτεί ως προς την ασφάλεια έναντι της μεθόδου προσδιορισμού της συγκέντρωσης των κονιδίων με αιματοκυτόμετρο,^[212] υπολογίζεται ο όγκος του εμβολίου, ώστε να επιτύχουμε αριθμό κονιδίων 10².^[96]

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) Telstar Bio-II-A
- Αυτόματες πιπέτες των 25-250 μ L, 100-1000 μ L και των 10-100 μ L Hirschmann Laborgeräte
- Πλαστικά ρύγχη (tips)
- Πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm (sterilin)
- Κλίβανος επώασης FTC 90I (Velp Scientifica)
- Υάλινα βιδωτά φιαλίδια των 20mL (universal)
- Μικροβιολογικός κρίκος (inoculation loop)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 mL, 100 mL και 250 mL
- Λύχνος Bunsen
- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica)
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (κεφαλή HS-4 7000 rev/min max, θήκες sorvall 00480)
- Σωλήνες φυγοκέντρου από polycarbonate των 50mL (2,5 x 10), αποστειρωμένοι στους 121°C για 15min
- Υάλινες πιπέτες Pasteur
- Parafilm "M" Laboratory film American National Film
- Αλουμινόχαρτο
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας $\pm 0,0001$, Mettler Delta Trak
- Κωνικές φιάλες pyrex των 50 mL
- Κωνικές φιάλες pyrex των 500 mL με πώμα από γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι
- Πλαστικά διάφανα φιαλίδια των 50 mL (Corning)

Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό
- NaOCl 3,5% v/v (αραίωση χλωρίνης εμπορίου περιεκτικότητας 4,5% σε ενεργό χλώριο)
- Διάλυμα Tween 80 0,05% v/v (σε νερό), αποστειρωμένο στους 121°C για 15min
- Θρεπτικό υλικό AFPA
- Θρεπτικό υλικό CzA
- Απόλυτη αιθανόλη (C₂H₅OH) (Merck)
- Μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA) σε υγρή μορφή (MB = 224,3) (Vioryl)
- Θρεπτικό υλικό YES
- Εναιώρημα κονιδίων 2 ημερών

Πορεία

1. Προετοιμασία μυκηλίου για την παραλαβή των κονιδίων

Η προετοιμασία του μύκητα περιλαμβάνει την ανακαλλιέργειά του, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.4.6. Τα slants που έχουν επωαστεί για 7 ημέρες χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του εναιωρήματος κονιδίων.

2. Παραλαβή κονιδίων

Στο slant που περιέχει το ώριμο μυκήλιο του *Aspergillus parasiticus* 7 ημερών, προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες μικρή ποσότητα (~ 10 mL) αποστειρωμένου διαλύματος Tween 80 0,05%v/v. Ανακινείται με ήπιες κινήσεις για να μεταφερθεί μικρή ποσότητα κονιδίων από την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού στο Tween και το προκύπτον εναιώρημα κονιδίων μεταφέρεται ασηπτικά σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγόκεντρου και καλύπτεται με parafilm.

Ακολουθεί φυγοκέντριση του διαλύματος στις 2500 r.p.m. για 10 min σε θερμοκρασία 12°C. Μετά τη φυγοκέντριση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται προσεκτικά με αποστειρωμένη πιπέτα μιας χρήσεως σε διάλυμα 3,5% NaOCl. Τα κονίδια αναδιαλύονται σε διάλυμα Tween 80 0,05%v/v και πραγματοποιείται δεύτερη φυγοκέντριση και απόχυση του υπερκείμενου. Τελικά τα κονίδια παραλαμβάνονται από το φυγοκεντρικό σωλήνα με διάλυμα Tween 80 0,05%v/v και μεταφέρονται σε αποστειρωμένο (121°C για 15 min) φιαλίδιο Universal. Το διάλυμα αυτό αποτελεί το πυκνό εναιώρημα κονιδίων, στο οποίο υπό ασηπτικές συνθήκες γίνονται οι αραιώσεις 1:10, 1:100, 1:1.000 και 1:10.000. Για το σκοπό αυτό έχουν ήδη αποστειρωθεί στους 121°C για 15 min 4 φιαλίδια Universal που περιέχουν από 10 mL διαλύματος Tween 80 0,05%v/v. Από το πυκνό εναιώρημα κονιδίων, αφού το αναδεύσουμε στο vortex για 2 min παραλαμβάνουμε 1 mL και το προσθέτουμε σε 1 φιαλίδιο Universal για να παρασκευάσουμε την πρώτη αραιώση 1:10 και στη συνέχεια ακολουθώντας την ίδια διαδικασία παρασκευάζουμε διαδοχικά και τις υπόλοιπες αραιώσεις.

3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του εναιωρήματος κονιδίων – Υπολογισμός όγκου εμβολίου

Από καθένα από τα παραπάνω εναιωρήματα (πυκνό και 4 αραιώσεις), αφού αναδευτεί 30 s με vortex, λαμβάνεται 0,1 mL και εμβολιάζονται, υπό ασηπτικές συνθήκες, τρυβλία με θρεπτικό υλικό AFPA (σε κάθε τρυβλίο προστίθεται 0,1 mL εμβολίου). Το εμβόλιο απλώνεται ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur, κατάλληλα μορφοποιημένη με τη βοήθεια του λύχνου. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C, στο σκοτάδι, για 42-48 ώρες.

Μετά την επώαση καταμετρούνται οι αποικίες του *Aspergillus parasiticus*, οι οποίες ανεστραμμένες είναι ακτινωτές με έντονη πορτοκαλί χροιά. Η καταμέτρηση βασίζεται στην αρχή ότι κάθε αποικία αντιστοιχεί σε ένα κονίδιο. Επιλέγονται τα τρυβλία της αραιώσης

εκείνης, όπου ο αριθμός των αποικιών, cfu (colony forming units), είναι 10-100. Βάσει αυτού του αριθμού αποικιών από τον παρακάτω τύπο υπολογίζεται ο όγκος του εμβολίου που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα, ώστε κάθε καλλιέργεια να περιέχει την επιθυμητή ποσότητα κονιδίων x . (Στο συγκεκριμένο πείραμα $x = 10^2$ κονίδια).

$$V = \frac{0,1 \cdot x}{A}$$

όπου V : ο όγκος του εμβολίου (mL)

A : αριθμός αποικιών στο τρυβλίο (μέσος όρος από 5 τρυβλία της επιθυμητής αραιώσης)

0.1 : όγκος εμβολίου στο τρυβλίο (mL)

x : ο εκάστοτε επιθυμητός αριθμός κονιδίων του εμβολίου εργασίας.

Για τη καλύτερη κατανόηση της παραπάνω διαδικασίας παρατίθεται στη συνέχεια ένα παράδειγμα.

Πίνακας 6.5: Αριθμός αποικιών σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό AFPA

Αραίωση διαλύματος κονιδίων σε Tween 80 0,05%v/v	Αριθμός αποικιών (μέσος όρος)
Πυκνό	Μεγάλος αριθμός αποικιών, δύσκολο να μετρηθούν
1:10	Μεγάλος αριθμός αποικιών, δύσκολο να μετρηθούν
1:100	86
1:1000	29
1:10000	3

Επιλέγοντας την αραιώση 1:100 και με βάση τον παραπάνω τύπο προκύπτει ότι ο απαιτούμενος όγκος του εμβολίου είναι 116 μ L.

6.7 Προετοιμασία των τρυβλίων AFPA για τη μακροσκοπική παρατήρηση της επίδρασης του MeJA στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus*

Παράλληλα με την ετοιμασία των τρυβλίων AFPA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλύματος κονιδίων, ετοιμάσθηκαν με το εκλεκτικό αυτό θρεπτικό υλικό τα τρυβλία για το πείραμα της παρακολούθησης της μυκηλιακής ανάπτυξης του *A.parasiticus*. Σε 17 δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται από 15 mL AFPA, οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονται με γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι και αποστειρώνονται στους 121°C για 15 min. Ακολουθεί η πλήρωση των αντίστοιχων τρυβλίων, τα οποία φυλάσσονται σκεπασμένα στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) έως ότου στερεοποιηθεί το θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια με τη βοήθεια αποστειρωμένου πλαστικού tip στη μέση κάθε τρυβλίου ανοίγεται μία κυκλική οπή, μέσα

στην οποία θα γίνει η έγχυση του εμβολίου των κονιδίων. Αμέσως μετά γίνεται η προσθήκη του μεθυλιασμονικού οξέος, το οποίο προστίθεται περιμετρικά της οπής που περιέχει τα κονίδια του μύκητα, έτσι ώστε η επίδρασή του στην ανάπτυξη των αποικιών του *A.parasiticus* να είναι εξασφαλισμένη.

6.8 Παρασκευή διαλυμάτων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA)

Πορεία

Σε κάθε περίπτωση ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) (MB = 224,30 d = 1,0045 g/mL), η καθαρότητα του οποίου ελέγχθηκε μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC),^[213] και αραιώνεται με κατάλληλο όγκο απόλυτης αιθανόλης, ώστε να προκύψει διάλυμα επιθυμητής συγκέντρωσης.

Πίνακας 6.6: Διαλύματα μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα

Ποσότητα (g) MeJA	Όγκος (mL) απόλυτης αιθανόλης	Όγκος (μL) διαλ/τος MeJA που εμβολιάστηκε	Ποσότητα (mg) MeJA στο δείγμα	Συγκέντρωση (M) MeJA στο δείγμα
0,002	10	11	0,0022 ^γ	0,000001 ^γ
0,020	3	34	0,227 ^γ	0,0001 ^γ
0,100	3	34	1,134 ^β	0,0005 ^β
0,105	3	34	1,190 ^α	0,00055 ^α
0,153	3	34	1,734 ^α	0,0008 ^α
0,200	3	34	2,267 ^{α,β,γ}	0,001 ^{α,β,γ}
0,400	3	34	4,534 ^β	0,002 ^β
0,800	3	34	9,067 ^β	0,004 ^β
1,050	3	34	11,900 ^α	0,0055 ^α
1,530	3	34	17,340 ^α	0,0078 ^α
1,600	3	34	18,134 ^β	0,008 ^β
2,000	3	34	22,667 ^γ	0,01 ^γ
3,200	3	34	36,267 ^β	0,016 ^β
2,000	0,3	34	226,67 ^{β,γ}	0,1 ^{β,γ}

^α: στα τρυβλία με το θ.υ. AFPA

^β: σε κωνικές φιάλες με 10 mL YES

^γ: σε κωνικές φιάλες με 15 g κάππαρη

6.9 Εμβολιασμός των τρυβλίων θρεπτικού υλικού AFPA

Τα τρυβλία χωρίζονται σε ομάδες και εμβολιάζονται με 10^2 κονίδια του μύκητα *A.parasiticus* και MeJA (σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος κεφάλαιο 7.1, πίνακας 7.1) και πραγματοποιείται μέτρηση της διαμέτρου της μεγαλύτερης και της μικρότερης αποικίας (σε cm) του μύκητα κάθε μέρα για 7 συνεχόμενες ημέρες.

Πορεία

Τα 17 τρυβλία που ετοιμάσθηκαν με θρεπτικό υλικό AFPA σύμφωνα με τις οδηγίες της παραγράφου 6.8 εμβολιάστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες ως εξής:

- Σε 2 τρυβλία προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L αιθανόλη (δείγματα control)
- Σε 3 τρυβλία προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA (c = 0,105g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 1,19 mg MeJA
- Σε 3 τρυβλία προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA (c = 0,153g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 1,734 mg MeJA
- Σε 3 τρυβλία προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA (c = 0,2g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 2,267 mg MeJA
- Σε 3 τρυβλία προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA (c = 1,05g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 11,9 mg MeJA
- Σε 3 τρυβλία προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA (c = 1,53g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 17,34 mg MeJA

Η προσθήκη του MeJA γίνεται περιμετρικά της οπής που περιέχει το εμβόλιο των 10^2 κονιδίων.

Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία σφραγίζονται με παραφίλμ -λόγω της μεγάλης πτητικότητας του MeJA- και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, όπου και θα παραμείνουν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τη στιγμή των μετρήσεων, μέχρι το πέρας των 7 ημερών παρακολούθησης.

6.10 Εμβολιασμός δειγμάτων θρεπτικού υλικού YES

Τα δείγματα χωρίζονται σε ομάδες και εμβολιάζονται με τον κατάλληλο όγκο (§ 6.7) από το εναιώρημα των κονιδίων του μύκητα *Aspergillus parasiticus* - το οποίο έχει αναδευτεί για 2 min - και μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA) (σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος κεφάλαιο 7.2, πίνακας 7.2).

Πορεία

Σε 198 κωνικές φιάλες προστίθενται από 10 mL YES, στη συνέχεια οι κωνικές κλείνονται με παραφίλμ και αλουμινόχαρτο και ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 min. Μετά το πέρας της αποστείρωσης αφήνονται να κρυώσουν και εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες ως εξής:

- Σε 30 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l αιθανόλη (δείγματα-control)
- Σε 24 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA (c = 0,1g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 1,134 mg MeJA
- Σε 24 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA (c = 0,2g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 2,267 mg MeJA
- Σε 24 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA (c = 0,4g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 4,534 mg MeJA
- Σε 24 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA (c = 0,8g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 9,067 mg MeJA
- Σε 24 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA (c = 1,6g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 18,134 mg MeJA
- Σε 24 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA (c = 3,2g/3mL σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 36,267 mg MeJA
- Σε 24 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA (c = 2g/300 μ L σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 226,67 mg MeJA

Μετά τον εμβολιασμό η κάθε κωνική φιάλη ανακινείται ελαφρώς και αριθμείται. Τα δείγματα που αντιστοιχούν στη 0^η ημέρα, μετά τον εμβολιασμό αποστειρώνονται στους 115°C για 30 min προκειμένου να σταματήσει η ανάπτυξη του μύκητα καθώς με τον τρόπο αυτό καταστρέφονται τα κονίδια.^[214] Ακολουθούν η παραλαβή και ο ποσοτικός προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B₁. Τα υπόλοιπα δείγματα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, όπου παραμένουν μέχρι την αντίστοιχη ημέρα παρακολούθησης, οπότε εξέρχονται και αποστειρώνονται, όπως τα αντίστοιχα της 0^η ημέρας. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιείται επιπλέον και ο προσδιορισμός της μυκηλιακής μάζας.

6.11 Προσδιορισμός της μυκηλιακής μάζας του *Aspergillus parasiticus*

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica) και μαγνητάκια
- Αυτόματες πιπέτες των 25-250 μ L, 100-1000 μ L, 10-100 μ L και 0,5-5 mL Hirschmann Laborgeräte
- Πλαστικά ρύγχη (tips)
- Σκουρόχρωμα φιαλίδια (vial) των 4mL (Supelco)
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) Telstar Bio-II-A
- Συσκευή εξατμίσεως με ρεύμα αζώτου Pierce Reacti-Therm™ Heating Module 18790 and Reacti-Vap™ Model 18780
- Υδρόλουτρο BÜCHI-461 Water Bath
- Συσκευή Water Milli-Q, Millipore αντιστρόφου ωσμώσεως με αγωγιμότητα < 18 μ S
- Συσκευή διηθήσεως κενού της Millipore
- Συσκευή υπερήχων Elmasonic S15H
- Συσκευή HPLC: Hewlett Packard Series 1050
- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής Jasco FP-920
- Καταγραφάας: Hewlett Packard HP 3395 Integrator

- Φίλτρα διηθήσεως 0,45 μm type HVLP, Millipore
- Προστήλες Waters Novapak[®] C₁₈
- Στήλη ανάστροφης φάσης: Waters Novapak[®] C₁₈, 4,6x250 mm
- Σύριγγες εισαγωγής δείγματος 20 μL και 50 μL , Hellamco
- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Συσκευή Εκχύλισης σε Στερεή Φάση (Solid Phase Extraction S.P.E.) Waters[™] Sep-Pak Vacuum Manifold
- Μηχανικός αναδευτήρας Thermolyne Maxi- mix III, type 65800
- Μαγνητικός αναδευτήρας P.Selecta
- Μικροστήλες ανοσοσυγγένειας AflaTest[®] (VICAM)
- Πλαστικές σύριγγες των 10 mL
- Πλαστικά διάφανα φιαλίδια των 50 mL (Corning)
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακρίβειας $\pm 0,0001$, Mettler Delta Trak
- Φούρνος ξήρανσης
- Ξηραντήρες με Silica gel με δείκτη υγρασίας (Merck)
- Χωνιά διηθήσεως και πτυχωτοί ηθμοί

Αντιδραστήρια

- Απεσταγμένο νερό
- Μεθανόλη (CH₃OH) extra pure (Merck)
- Μεθανόλη (CH₃OH) για HPLC (Fisher Scientific)
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN) για HPLC (Fisher Scientific)
- Εξάνιο (C₆H₁₄) 96% extra pure (Scharlau)
- Τριφθοροξικό οξύ (CF₃COOH) TFA (Merck)
- Απόλυτη αιθανόλη (CH₃CH₂OH) (Merck, Reagent grade)
- Νερό καθαρότητας HPLC, παραγόμενο από ηλεκτρονική συσκευή φιλτραρίσματος και υπερδιήθησης της Waters Millipore, Milli Q αντιστρόφου ωσμώσεως με αγωγιμότητα <18 μS

Αρχή μεθόδου

Το μυκήλιο διηθείται σε προζυγισμένο πτυχωτό ηθμό. Ξηραίνεται στους 80°C για μία περίπου ημέρα και στη συνέχεια ζυγίζεται, ώστε να προσδιοριστεί η μάζα του.^[215]

Πορεία

Η καλλιέργεια διηθείται από πτυχωτό ηθμό. Ο ηθμός έχει προξηρανθεί στους 80°C για μία ημέρα και έχει ζυγιστεί. Το μυκήλιο εκπλύνεται με απιονισμένο νερό και ξηραίνεται στους 80°C για μία ημέρα. Αφήνεται στον ξηραντήρα να ψυχθεί για 30 min και ζυγίζεται παρουσία ξηραντικού.

6.12 Παραλαβή της Αφλατοξίνης B₁

Οι Αφλατοξίνες παραλαμβάνονται από όλη την υγρή καλλιέργεια με εκχύλιση μέσω CH₃OH. Ακολουθεί καθαρισμός τους από στήλη ανοσοσυγγένειας (AflaTest[®]) και η Αφλατοξίνη προσδιορίζεται μετά από παραγωγοποίηση, με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η διαδικασία απομόνωσης της Αφλατοξίνης B₁ και ο ποσοτικός προσδιορισμός της απαιτεί τη χρήση μικροστηλών ανοσοσυγγένειας, οι οποίες περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα, εκλεκτικά ως προς την Αφλατοξίνη B₁, προσδεδεμένα στο χρωματογραφικό τους υλικό. Με τον τρόπο αυτό αποκλείεται ή

περιορίζεται στο ελάχιστο η πιθανότητα να απομονωθούν άλλα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των τοξινογόνων μυκήτων εκτός από την Αφλατοξίνη B₁.

Πορεία

Εκχύλιση ΑΦΒ₁ από τα δείγματα υγρής καλλιέργειας YES

Οι υγρές καλλιέργειες με το YES πριν από το χειρισμό τους αποστειρώνονται στους 115°C για 30 min,^[201] για λόγους ασφαλείας. Αφήνονται να κρυώσουν, προστίθενται 30 mL CH₃OH και η καλλιέργεια αναδεύεται για 10 min σε μαγνητικό αναδευτήρα. Από το μίγμα φυλάσσονται 2 mL σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο των 4 mL (μέγιστος χρόνος αποθήκευσης 24 ώρες στους - 20°C) που χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο, εκείνο του καθαρισμού με μικροστήλη.

Συνιστάται ο καθαρισμός της Αφλατοξίνης να γίνεται την ίδια ημέρα που πραγματοποιείται και η εκχύλιση.

Καθαρισμός – Απομόνωση ΑΦΒ₁ από στήλη ανοσοσυγγένειας ^[210,216]

α) *προετοιμασία στήλης*: η κάθε στήλη (AflaTest®) τοποθετείται σε μία από τις θέσεις της συσκευής εκχύλισης σε στερεή φάση (S.P.E.) και πάνω σε αυτή στηρίζεται μία πλαστική σύριγγα των 10 mL.

β) *καθαρισμός δείγματος*: 1 mL δείγματος προστίθενται σε φιαλίδιο Corning που περιέχει 10 mL H₂O και αναδεύονται στο vortex για 1 min. Το αραιωμένο δείγμα διέρχεται από τη στήλη, της οποίας το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) έχει ήδη απομακρυνθεί, με ροή 1 σταγόνα ανά δευτερόλεπτο (3 mL/min). Στη συνέχεια διέρχονται διαδοχικά αέρας, 10 mL H₂O, αέρας, 10 mL H₂O και τέλος αέρας μέχρι να απομακρυνθεί όλη η υγρασία από τη στήλη. Για το σκοπό αυτό η στήλη σκουπίζεται επιπλέον προσεκτικά με απορροφητικό χαρτί. Σημειώνεται ότι όλα τα απόβλητα κατά τη διάρκεια του καθαρισμού συλλέγονται σε υποδοχεία που περιέχει διάλυμα χλωρίνης 3,5%.

γ) *παραλαβή Αφλατοξίνης B₁*: για την παραλαβή της ΑΦΒ₁ διέρχεται από τη στήλη 1 mL CH₃CN, δύο φορές με τη χαμηλότερη δυνατή ροή και το έκλουσμα συλλέγεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο vial.

6.13 Παραγωγοποίηση της Αφλατοξίνης B₁

Το δείγμα που παραλαμβάνεται από το προηγούμενο στάδιο εξατμίζεται και παραγωγοποιείται. Η πορεία που ακολουθείται είναι όμοια με αυτήν που περιγράφεται στην παράγραφο 6.6.3

6.14 Ποσοτικός προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B₁ με HPLC

Μετά την παραγωγοποίηση ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 6.6.5 με τη διαφορά ότι στα παραγωγοποιημένα και εξατμισμένα δείγματα προστίθενται 200 μL διαλύματος H₂O:CH₃CN (9:1 v/v), αντί του 1 mL που προστίθεται κατά τον προσδιορισμό σε

πρότυπα διαλύματα.

6.15 Προετοιμασία πειράματος ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού της ΑΦΒ₁ στην κάππαρη

Στο πείραμα χρησιμοποιείται φρέσκια κάππαρη από τη Σύρο. Οι ανθοί της κάππαρης τεμαχίζονται και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 2 L, όπου γίνεται έκπλυση πρώτα με άφθονο νερό βρύσης και στη συνέχεια με απεσταγμένο νερό. Στεγνώνονται ελαφρά με διηθητικό χαρτί και ακολουθεί ζύγιση 15 g κάππαρης για κάθε αποστειρωμένη (121°C για 15 min) κωνική φιάλη, η οποία κλείνεται με πώμα από γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι.

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow) Telstar Bio-II-A
- Αυτόματη πιπέτα των 25-250 μ L, 100-1000 μ L και των 10-100 μ L Hirschmann Laborgeräte
- Πλαστικά ρύγχη (tips)
- Πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm (sterilin)
- Κλίβανος επώασης FTC 90I (Velp Scientifica)
- Υάλινα βιδωτά φιαλίδια των 20mL (universal)
- Μικροβιολογικός κρίκος (inoculation loop)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 mL, 100 mL και 250 mL
- Λύχνος Bunsen
- Αυτόκαυστο Selecta Autester-E Dry
- Κυκλοαναδευτήρας, vortex (Velp Scientifica)
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (κεφαλή HS-4 7000 rev/min max, θήκες sorvall 00480)
- Σωλήνες φυγοκέντρου από polycarbonate των 50mL (2,5 x 10), αποστειρωμένοι στους 121°C για 15min
- Υάλινες πιπέτες Pasteur
- Parafilm "M" Laboratory film American National Film
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας $\pm 0,0001$, Mettler Delta Trak
- Κωνικές φιάλες pyrex των 50 mL
- Κωνικές φιάλες pyrex των 500 mL με πώμα από γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι
- Κωνική φιάλη pyrex των 2 L με πώμα από γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πλαστικά διάφανα φιαλίδια των 50 mL (Corning)

Αντιδραστήρια

- Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό
- NaOCl 3,5% v/v (αραίωση χλωρίνης εμπορίου περιεκτικότητας 4,5% σε ενεργό χλώριο)
- Διάλυμα Tween 80 0,05% v/v (σε αποστειρωμένο νερό), αποστειρωμένο στους 121°C για 15min
- Θρεπτικό υλικό AFPA
- Θρεπτικό υλικό CzA
- Απόλυτη αιθανόλη (C₂H₅OH) (Merck)
- Μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA) σε υγρή μορφή (MB = 224,3) (Vioryl)
- Εναιώρημα κονιδίων 2 ημερών

6.16 Επεξεργασία κάππαρης

Πορεία

Η κάππαρη τεμαχίζεται και τοποθετείται σε κωνική φιάλη των 2 L, όπου γίνεται έκπλυση με άφθονο νερό βρύσης. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v, ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η ποσότητα κάππαρης. Η κωνική ανακινείται για 1 min και η αιθανόλη αποχύνεται. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος NaOCl 1,25% (γίνεται κατάλληλη αραιώση χλωρίνης εμπορίου), ώστε να καλυφθεί πλήρως όλη η κάππαρη και η κωνική ανακινείται για 3 min. Τέλος, μετά την απόχυση της χλωρίνης ακολουθεί έκπλυση της κάππαρης με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό δύο φορές.

Μετά τις εκπλύσεις, σε κάθε κωνική (όλες οι κωνικές οι φιάλες που θα χρησιμοποιηθούν, έχουν αποστειρωθεί στους 121°C για 15 min) εισάγονται υπό ασηπτικές συνθήκες 15g κάππαρης. Η ζύγιση γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες με τη βοήθεια ζυγού, ο οποίος προηγουμένως έχει καθαριστεί καλά με αντισηπτικό, χλωρίνη και αιθανόλη. Σημειώνεται το ακριβές βάρος κάθε κωνικής και κλείνονται με πώμα από γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι.

6.17 Εμβολιασμός δειγμάτων κάππαρης

Τα δείγματα χωρίζονται σε ομάδες και εμβολιάζονται με τον κατάλληλο όγκο (§ 6.7) από το εναιώρημα των κονιδίων του μύκητα *A.parasiticus* - το οποίο έχει αναδευτεί για 2 min - και μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA) (σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος κεφάλαιο 7.3, πίνακας 7.3).

Πορεία

Ο εμβολιασμός των κωνικών φιαλών που περιέχουν την κάππαρη γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες. Συνολικά εμβολιάζονται 120 δείγματα κάππαρης ως εξής:

- Σε 30 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L αιθανόλη (δείγματα-control)
- Σε 18 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 11 μ L διαλύματος MeJA ($c = 0,002\text{g}/10\text{mL}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 0,0022 mg MeJA
- Σε 18 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA ($c = 0,02\text{g}/3\text{mL}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 0,227 mg MeJA
- Σε 18 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA ($c = 0,2\text{g}/3\text{mL}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 2,267 mg MeJA
- Σε 18 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA ($c = 2\text{g}/3\text{mL}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 22,667 mg MeJA
- Σε 18 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ L διαλύματος MeJA ($c = 2\text{g}/300\mu\text{L}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 226,667 mg MeJA

Μετά τον εμβολιασμό η κάθε κωνική φιάλη πωματίζεται και αριθμείται. Τα δείγματα που αντιστοιχούν στην 0^η ημέρα, μετά τον εμβολιασμό τους αποστειρώνονται στους 115°C για 30 min και ακολουθούν η παραλαβή και ο ποσοτικός προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B₁. Τα υπόλοιπα δείγματα τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο μέχρι την αντίστοιχη ημέρα μελέτης τους, οπότε εξέρχονται και αποστειρώνονται, όπως εκείνα της 0^η ημέρας. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιείται επιπλέον και ο προσδιορισμός της μυκηλιακής μάζας.

6.18 Προσδιορισμός της μυκηλιακής μάζας του *Aspergillus parasiticus*

Οι συσκευές, τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς επίσης και η αρχή της μεθόδου προσδιορισμού της μυκηλιακής μάζας είναι όμοια με εκείνα που περιγράφονται στην παράγραφο 6.12 με τη μόνη διαφορά ότι στην προκειμένη περίπτωση μαζί με το μύκητα ζυγίζεται και η κάπαρη, καθώς ένας διαχωρισμός δεν είναι εφικτός.

6.19 Παραλαβή της Αφλατοξίνης B₁

Η εκχύλιση της τοξίνης από τα δείγματα της κάπαρης ακολουθεί την πορεία που περιγράφεται στην παράγραφο 6.13, διαφοροποιείται όμως ως προς το διαλύτη εκχύλισης που χρησιμοποιείται, ο οποίος στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ένα μείγμα CH₃OH:H₂O σε αναλογία 80:20 v/v. Ο καθαρισμός και η απομόνωση της Αφλατοξίνης B₁ γίνονται με τον τρόπο που αναφέρεται στο πείραμα με το θρεπτικό υλικό YES (§6.13).

6.20 Παραγωγοποίηση της Αφλατοξίνης B₁

Το δείγμα που παραλαμβάνεται από το προηγούμενο στάδιο εξατμίζεται και παραγωγοποιείται σύμφωνα με την πορεία της παραγράφου 6.6.3.

6.21 Ποσοτικός προσδιορισμός της Αφλατοξίνης B₁ με HPLC

Μετά την παραγωγοποίηση ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 6.6.5 με τη διαφορά ότι στα παραγωγοποιημένα και εξατμισμένα δείγματα προστίθενται 200 μL διαλύματος H₂O:CH₃CN (9:1 v/v), αντί του 1 mL που προστίθεται κατά τον προσδιορισμό σε πρότυπα διαλύματα.

6.22 Μελέτη της επίδρασης του μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) στα γονίδια *aflR* και *aflC* του μύκητα *A.parasiticus*

6.22.1 Απομόνωση ολικού RNA από το μυκήλιο του *A.parasiticus*

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Κυκλοαναδευτήρας (vortex) (Velp Scientifica)
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (κεφαλή HS-4 7000 rev/min max, θήκες sorvall 00480)
- Ψυκτικός θάλαμος 4°C
- Καταψύκτης -80°C
- Αποστειρωμένοι σωλήνες Eppendorf
- Αποστειρωμένες πιπέτες Hirschmann Laborgeräte, Transferpette και πλαστικά ρύγχη
- Γουδί με γουδοχέρι
- Χωνιά διηθήσεως και πτυχωτοί ηθμοί
- Πλαστικά σιφώνια μίας χρήσης
- Μεταλλική λαβίδα και μεταλλική σπάτουλα
- Πλαστικά διάφανα φιαλίδια των 15 mL (falcon)

Αντιδραστήρια

- Tri Reagent (Molecular Research Center)
Αντιδραστήριο για την απομόνωση του συνολικού RNA ή την ταυτόχρονη απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών. Το Tri Reagent συνδυάζει φαινόλη και θειοκυανική γουανιδίνη σε μία φάση, ώστε να διευκολυνθεί η άμεση και πιο αποτελεσματική αναστολή της δραστηριότητας της RNάσης.
- RNazap (AMBION)
Απομακρύνει αποτελεσματικά τα υψηλά επίπεδα μόλυνσης από RNάσες περιέχοντας τρία συστατικά που είναι γνωστό ότι έχουν δράση κατά των RNάσων
- Χλωροφόρμιο αναλυτικής καθαρότητας
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 75%
- Νερό απαλλαγμένο από RNάσες (DEPC) (Demo S.A.)
- Υγρό άζωτο
- Αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό
Για την απομόνωση του RNA πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα βήματα.

6.22.1.1 Εμβολιασμός δειγμάτων θρεπτικού υλικού YES για την παραλαβή μυκηλίου του *A.parasiticus*

Τα δείγματα χωρίζονται σε ομάδες και εμβολιάζονται με τον κατάλληλο όγκο (§ 6.7.2) από το εναιώρημα των κονιδίων του μύκητα *Aspergillus parasiticus* - το οποίο έχει αναδευτεί για 2 min - και μεθυλιασμονικό οξύ (MeJA) (σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος κεφάλαιο 7.4, πίνακας 7.4).

Πορεία

Σε 12 κωνικές φιάλες προστίθενται από 10 mL YES, στη συνέχεια οι κωνικές κλείνονται με παραφίλμ και αλουμινόχαρτο και ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15 min. Μετά το πέρας της αποστείρωσης αφήνονται να κρυώσουν και εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες ως εξής:

- Σε 3 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μl αιθανόλη (δείγματα-control)

- Σε 3 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 11 μ l διαλύματος MeJA ($c = 0,002\text{g}/10\text{mL}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 0,0022 mg MeJA
- Σε 3 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA ($c = 0,1\text{g}/3\text{mL}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 1,134 mg MeJA
- Σε 3 κωνικές προστίθενται 10^2 κονίδια + 34 μ l διαλύματος MeJA ($c = 1,6\text{g}/3\text{mL}$ σε αιθανόλη), τα οποία περιέχουν 18,134 mg MeJA

Μετά τον εμβολιασμό η κάθε κωνική φιάλη ανακινείται ελαφρώς και αριθμείται. Τα δείγματα θα παραμείνουν για διάστημα 7 ημερών στον επωαστικό κλίβανο στους 30°C στο σκοτάδι, οπότε και η μυκηλιακή ανάπτυξη φτάνει τη μέγιστη τιμή της. Στη συνέχεια τα δείγματα εξέρχονται και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όπου πραγματοποιείται η επεξεργασία του κάθε μυκηλίου.

6.22.1.2 Παραλαβή μυκηλίου του *A.parasiticus* ^[217]

Πορεία

Όλα τα όργανα και βοηθητικά μέσα που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Τα πλαστικά ρύγχη (tips) και τα γυάλινα σκεύη αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο, ενώ οι πιπέτες, τα υπόλοιπα βοηθητικά μέσα και ο απαγωγός ψεκάζονται με αιθανόλη 75% και αφήνονται να στεγνώσουν μόνα τους. Το μυκήλιο διηθείται από πτυχωτό ηθμό, εκπλύνεται με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Με λαβίδα μεταφέρεται σε στεγνό γουδί, όπου στη συνέχεια προστίθεται υγρό άζωτο. Με τη βοήθεια στεγνού γουδοχειριού το μυκήλιο κονιορτοποιείται. Η σκόνη μεταφέρεται με σπάτουλα σε falcon, το οποίο αριθμείται κατάλληλα. Ακολουθεί άμεσα η πορεία απομόνωσης ολικού RNA με χρήση του Tri Reagent. Να σημειωθεί ότι ο θάλαμος στον οποίο πραγματοποιείται η διαδικασία προαποστειρώνεται με ψεκασμό με αιθανόλη 75%, για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων με ξένο DNA και, με RNAzap για την καταστροφή των RNAσών. Ψεκασμοί πραγματοποιούνται καθόλη τη διάρκεια της απομόνωσης. Επίσης να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται φυλάσσονται σε πάγο για το χρονικό διάστημα που απαιτείται η χρήση τους.

Στο κονιορτοποιημένο μυκήλιο προστίθεται 1 mL Tri Reagent και, έπειτα από έντονη ανάδευση, το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα eppendorf. Αφήνεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σπάσουν οι μεμβράνες και να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες από τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μ L χλωροφορμίου/mL Tri Reagent, το eppendorf ανακινείται έντονα για 20 s και επωάζεται για 5-15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι σημαντικό να μην αφηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, καθώς το RNA είναι ευπαθές. Το μίγμα φυγοκεντρείται στα 12000 g για 10 min στους 4°C και λαμβάνεται τριφασικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει την υπερκείμενη άχρωμη υδατική φάση (που περιέχει το RNA), τη μεσόφαση (που περιέχει τη

μεγαλύτερη ποσότητα DNA) και την κατώτερη οργανική φάση (που περιέχει το υπόλοιπο DNA, τις πρωτεΐνες και πολυσακχα-ρίτες). Η υδατική φάση παραλαμβάνεται προσεκτικά με αυτόματη πιπέτα - χωρίς να διατα-ραχθεί η μεσόφαση - και μεταφέρεται σε σωλήνα erppendorf. Το RNA κατακρημνίζεται μετά από προσθήκη 500 μL κρύας ισοπροπανόλης/mL Tri Reagent, ανάδευση σε vortex για 10-15 s και ολοκληρώνεται με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Τελικά το RNA παραλαμβάνεται με τη μορφή πηκτού ιζήματος με φυγοκέντρηση στα 12000 g για 8 min στους 4°C και μετά από προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το RNA εκπλένεται με 1 mL παγωμένης αιθανόλης 75%/mL Tri Reagent και αναδεύεται σε vortex. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 7500 g για 5 min στους 4°C, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα (RNA) αφήνεται στον απαγωγό μέχρι να εξατμισθεί η ποσότητα αιθανόλης που έχει κατακρατήσει (για το σκοπό αυτό τοποθετείται ανάποδα πάνω σε χαρτί που έχει προ-ηγουμένως ψεκασθεί με RNAzap). Πριν στεγνώσει τελείως, επαναδιαλυτοποιείται σε 50-100 μL νερού DEPC, αναδεύεται έντονα και αποθηκεύεται στους -80°C.

6.22.1.3 Ποσοτικός προσδιορισμός και έλεγχος καθαρότητας του ολικού RNA

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Αποστειρωμένες πιπέτες Hirschmann Laborgeräte, Transferpette και πλαστικά ρύγχη
- Κυψελίδες από χαλαζία των 500 μL
- Φασματοφωτόμετρο Helios β (Unicam)

Αντιδραστήρια

- Νερό απαλλαγμένο από RNάσες (DEPC) (Demo S.A.)

Πορεία

Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260nm ($A_{260\text{nm}}$). Η καθαρότητα του RNA, δηλαδή RNA απαλλαγμένου από πρωτεΐνες, καθορίζεται από το λόγο Q που συνδέει τις απορροφήσεις του στα 260nm, 280nm ($A_{280\text{nm}}$) και 320nm ($A_{320\text{nm}}$), όπως ορίζεται από τη σχέση $Q=(A_{260\text{nm}}-A_{320\text{nm}})/(A_{280\text{nm}}-A_{320\text{nm}})$. Για καθαρό RNA ισχύει $Q=2$, ενώ μεγάλη απορρόφηση στα 280 nm δηλώνει την ύπαρξη πρωτεϊνών. Σημειώνεται ότι φωτομέτρηση πραγματοποιείται τόσο στο RNA που απομονώθηκε σύμφωνα με την πορεία της παραγράφου 6.22.1.2, όσο και στο καθαρό από υπολείμματα DNA, RNA που προκύπτει ύστερα από τον καθαρισμό του με DNάση I, όπως περιγράφεται παρακάτω στην παράγραφο 6.22.1.4. Η ποσότητα του καθαρού πλέον RNA που θα μετατραπεί με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης σε cDNA δίνεται από τη σχέση: $V=1/(A_{260\text{nm}} \times 4)$.

Σε κυψελίδα από χαλαζία φέρονται 198 μL νερού DEPC και 2 μL ολικού RNA και ακο-λουθεί έντονη ανάδευση. Η κυψελίδα τοποθετείται στο φωτόμετρο και μετρώνται οι $A_{260\text{nm}}$, $A_{280\text{nm}}$ και $A_{320\text{nm}}$. Ως τυφλό χρησιμοποιείται νερό DEPC (200 μL). Από τη σχέση

υπολογίζεται η συγκέντρωση του RNA σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ενώ από την τιμή του λόγου Q εκτιμάται η καθαρότητά του.

6.22.1.4 Απομάκρυνση ιχνών γενωμικού DNA από το ολικό RNA

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Αποστειρωμένοι σωλήνες erpendorf
- Αποστειρωμένες πιπέτες Hirschmann Laborgeräte, Transferpette και πλαστικά ρύγχη
- Επωαστήρας θερμοκρασίας 37°C
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

Αντιδραστήρια

- Νερό απαλλαγμένο από RNάσες (DEPC) (Demo S.A.)
- Dnase I (Fermentas)
- Dnase I Buffer 10x (Fermentas)
- Διάλυμα EDTA 100mM (σε νερό DEPC)
- Διάλυμα CH_3COONa 5M (σε νερό DEPC)
- Αιθανόλη 98%
- Αιθανόλη 75%

Πορεία

Λαμβάνονται 50 μL από το απομονωμένο RNA σε αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf σε πάγο. Το RNA αναμιγνύεται με προπαρασκευασμένο διάλυμα που περιέχει 5 μL Dnase I Buffer/δείγμα και 1 μL Dnase I/δείγμα. Ακολουθεί επώαση για 30 min στους 37°C και στη συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθενται 5,5 μL EDTA 100mM, 5,5 μL CH_3COONa 5M και 110 μL αιθανόλης 98% και τα δείγματα αναδεύονται σε vortex. Επώάζονται για 20 min στους -80°C (ή για 1,5h στους -20°C), φυγοκεντρούνται στα 12000 g για 15 min στους 4°C και το υπερκείμενο αποχύνεται. Το ίζημα εκπλένεται με 1 mL αιθανόλης 75%, αναδεύεται σε vortex και φυγοκεντρείται εκ νέου στα 7500 g για 5 min στους 4°C . Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.9.1.3. Τέλος, το καθαρό πλέον RNA αναδιαλύεται σε νερό DEPC υπό ανάδευση σε vortex.

6.22.1.5 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT)

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Αποστειρωμένοι σωλήνες erpendorf
- Αποστειρωμένες πιπέτες Hirschmann Laborgeräte, Transferpette και πλαστικά ρύγχη
- Επωαστήρας (37°C)
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο (Memmert)
- Ψυκτικός θάλαμος (-20°C)

Αντιδραστήρια

- Νερό απαλλαγμένο από RNάσες (DEPC) (Demo S.A.)
- RNA του μύκητα *A.parasiticus* (ποσότητα που υπολογίζεται από τη φωτομέτρηση § 6.22.1.3)

- Διάλυμα 20U/L M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) απαλλαγμένο από RNάσες (Fermentas). Η σύσταση του διαλύματος αποθήκευσης του ενζύμου είναι 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100 και 50% (v/v) γλυκερόλη. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C
- 5x ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής (250 mM Tris-HCl (pH 8,3 στους 25°C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT) (Fermentas). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C
- Διάλυμα 0,2 μg/μL εξαμερών εναρκτήριων μορίων τυχαίας αλληλουχίας βάσεων (random hexamer primer) (Fermentas)
- Διάλυμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών (dNTP) 10 mM το καθένα (HT Biotechnology LTD). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°

Αρχή μεθόδου

Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιήθηκε (M-MuLV) είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιεί ως εκμαγείο μονόκλωνο RNA και συνθέτει μονόκλωνο DNA. Στη συνέχεια, υδρολύεται διαδοχικά ο μητρικός κλώνος RNA και συντίθεται συμπληρωματικός κλώνος DNA, ώστε να ληφθεί τελικά δίκλωνο DNA. Η διαδικασία ξεκινά με την πρόσδεση ενός εκκινητή στην κατάλληλη αλληλουχία του RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση μπορεί τώρα να προσδεθεί και αυτή στο σύμπλοκο και να ξεκινήσει τη μεταγραφή του RNA σε cDNA με εκμαγείο το RNA-δείγμα. Σχηματίζεται έτσι δίκλωνο μόριο, υβρίδιο RNA: cDNA. Η υδρόλυση του RNA γίνεται από το ίδιο ένζυμο, το οποίο έχει επιπλέον και δράση RNάσης (ενδο-νουκλεάσης που υδρολύει ειδικά φωσφοδιεστερικούς δεσμούς RNA σε υβριδικά μόρια DNA:RNA). Ακολουθώς, νέος εκκινητής συνδέεται στο μονόκλωνο DNA και η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει τον συμπληρωματικό DNA κλώνο. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τυχαίοι εκκινητές (εξαμερή) γιατί σκοπός μας ήταν να μετατραπεί το ολικό RNA σε DNA. Συνηθέστερα, αυτό είναι το πρώτο βήμα της λεγόμενης RT-PCR και η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε κυκλοποιητή (συσκευή PCR), καθώς ακολουθεί πολλαπλασιασμός του cDNA που προκύπτει από το στάδιο αυτό.

Κατά τη διεργασία της αντίστροφης μεταγραφής έχει μεγάλη σημασία το RNA που χρησιμοποιείται να είναι καθαρό και απαλλαγμένο από υπολείμματα DNA, για το λόγο αυτό προηγείται καθαρισμός του ολικού RNA του μύκητα, κατεργασία με DNάσες και φωτομέρησή του για να υπολογιστεί ο βαθμός καθαρότητάς του. Βελτιστοποίηση της μεθόδου επιτυγχάνεται με αλλαγές στη συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου.

Πορεία

Σε σωλήνα erppendorf που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα RNA (η οποία έχει υπολογιστεί προηγουμένως) προστίθεται 1 μL/δείγμα διαλύματος εξαμερών και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τελικού όγκου 13,7 μL. Το μίγμα επωάζεται σε υδρόλουτρο 70°C για 5 min και στη συνέχεια προστίθενται 6,3 μL Mix RT (5 μL ρυθμιστικό διάλυμα αραιωμένο 5x, 2 μL dNTP, 0,3 μL αντίστροφης μεταγραφάσης), οπότε ο τελικός όγκος ανέρχεται στα 20 μL. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την επώαση στους 37°C για 1 h,

διάστημα κατά το οποίο η αντίστροφη μεταγραφάση δρα μετατρέποντας το RNA σε DNA. Θεωρούμε την αντίδραση πρακτικά ποσοτική, κάτι που σημαίνει ότι δε χρειάζεται να μετρηθεί η ποσότητα του παρασκευασθέντος DNA με φωτομέτρηση. Το cDNA που παρασκευάζεται φυλάσσεται στους -20°C .

6.22.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Αυτόματες πιπέτες Hirschmann Laborgeräte, και αποστειρωμένα πλαστικά ρύγχη
- Κωνική φιάλη pyrex των 250 mL
- Μεταλλική σπάτουλα
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Wide Mini-sub cell (BioRad)
- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος (BioRad Power Pac 300)
- Τράπεζα UV (Vilber Lourmat 365/312nm)
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή 10MP (Canon Digital IXUS 95IS)

Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη (BioRad)
- Βρωμιούχο αιθίδιο, 5mg/mL (Sigma)
- Πηκτή διαχωρισμού 1,5%
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50x TAE (Merck) (αποτελείται από Tris-Acetate 2M, EDTA 0,05M (pH 8,3), Tris-CH₃COOH 2M, EDTA 50mM (pH 8,3))
- Ρυθμιστικό διάλυμα 5x TAE (παρασκευάζεται με ανάμιξη 50 mL διαλύματος 50x TAE και 450 mL νερού)
- Μίγμα προτύπων μορίων DNA με μεγέθη: 100-10000bp (DNA Ladder) (Fermentas)

Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης είναι η κυριότερη μέθοδος διαχωρισμού, ταυτοποίησης και απομόνωσης τμημάτων DNA. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, με εφαρμογή ρεύματος τα μόρια του DNA κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Τα μεγαλύτερα σε μέγεθος μόρια επομένως, θα κινηθούν βραδύτερα και θα εντοπιστούν στο κάτω μέρος της πηκτής, σε αντίθεση με τα μικρότερα που θα κινηθούν ταχύτερα και θα διανύσουν στον ίδιο χρόνο μεγαλύτερη απόσταση. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές ύστερα από τη σύνδεση του DNA με ειδικά μόρια, τα οποία είναι κυρίως χημικές ουσίες, όπως για παράδειγμα τα βρωμιούχο αιθίδιο, SYBR green, SYBR gold κ.α. που έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα με αποτέλεσμα να φθορίζει το DNA μετά από έκθεση στο UV. Με την πηκτή αгарόζης διαχωρίζονται τμήματα DNA από 100 έως 17000 bp (είναι αποδοτικότερη για 250-10000 bp), ενώ για μικρότερα τμήματα DNA συνιστάται η χρήση πηκτής πολυακυλαμιδίου.

Πορεία

Για την παρασκευή πηκτής διαχωρισμού 1,5% αναμιγνύονται 1,5g αγαρόζης και 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος 5x TAE σε κωνική φιάλη των 250 mL και το μίγμα βράζεται έως ότου διαυγαστεί. Όταν πέσει η θερμοκρασία περίπου στους 60°C, προστίθενται 5 mL βρωμιούχου αιθιδίου (σε μεγαλύτερη θερμοκρασία το βρωμιούχο αιθίδιο διασπάται, ενώ σε μικρότερη η πηκτή αρχίζει να στερεοποιείται) και ύστερα από ανάδευση το διάλυμα αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προηγουμένως έχει τοποθετηθεί ειδική κτένα. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί (σε περίπου 30-45 min), η κτένα απομακρύνεται και η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα 5x TAE. Στη συνέχεια, στα φρεάτια της πηκτής που δημιουργήθηκαν από την κτένα τοποθετούνται τα δείγματα DNA (προϊόντα PCR) ή RNA, όπως επίσης και μίγμα DNA γνωστών μεγεθών (μοριακός δείκτης DNA), βάσει του οποίου υπολογίζεται το μέγεθος των προϊόντων της PCR. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 90V για 40 min για δείγματα DNA και υπό σταθερή τάση 120 V για 15 min για δείγματα RNA. Η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται συνήθως όταν το μέτωπο του ηλεκτρο-φορήματος φθάσει στο μέσον περίπου της πηκτής. Πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι το βρωμιούχο αιθίδιο κινείται επίσης και μάλιστα προς τον αρνητικό πόλο. Για το λόγο αυτό, όταν υπάρχουν ζώνες μικρού μοριακού βάρους, η ηλεκτροφόρηση πρέπει να διακόπτεται εγκαίρως για να μη βρεθούν σε μέρος της πηκτής, όπου δεν υπάρχει βρωμιούχο αιθίδιο και δε γίνουν επομένως ορατές στο UV. Σημειώνεται ότι για τα δείγματα που προήλθαν από την PCR με το αντιδραστήριο JumpStart, δε χρειάστηκε να αναμιχθούν με ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης διότι βρίσκονταν διαλυμένα στο ρυθμιστικό διάλυμα της PCR, το οποίο περιέχει χρωστική που στην ηλεκτροφόρηση μετακινείται μαζί με τα δείγματα DNA. Οι ζώνες DNA (ή RNA) γίνονται ορατές μετά από ακτινοβολία με UV ακτινοβολία εξαιτίας του φθορισμού που αναπτύσσει το βρωμιούχο αιθίδιο. Η πηκτή φωτογραφίζεται και η εικόνα της αποθηκεύεται σε υπολογιστή.

6.22.3 Σχεδιασμός εκκινήτων

Οι εκκινήτες τόσο για τα γονίδια *afIC* και *afIR*, όσο και για το γονίδιο ελέγχου *β-tubulin*, σχεδιάστηκαν αρχικά με το υπολογιστικό πρόγραμμα Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της συμπληρωματικότητάς τους με άλλα γονίδια του μύκητα *A.parasiticus* με τη βοήθεια του NCBI-Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Οι εκκινήτες που σχεδιάστηκαν παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 11, παράγραφος 11.3.

6.22.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) – Πολλαπλασιασμός των γονιδίων *aflC*, *aflR* και *β-tubulin*

Καταρχήν περιγράφονται οι συσκευές, τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμο-ποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα.

Συσκευές-Όργανα-Βοηθητικά μέσα

- Αποστειρωμένοι σωλήνες erppendorf και σωλήνες PCR
- Αυτόματες πιπέτες Gilson και αποστειρωμένα ρύγχη (tips)
- Συσκευή PCR (Multi Gene II, Labnet)

Αντιδραστήρια

- Προπαρασκευασμένο διάλυμα JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma-Aldrich) που περιέχει: JumpStart Taq DNA πολυμεράση, τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTP), ρυθμιστικό διάλυμα και αδρανή κόκκινη βαφή. Το ένζυμο είναι συνδεδεμένο με ένα αντίσωμα, το οποίο το κρατά ανενεργό κατά την πρώτη αποδιάταξη και στη συνέχεια η δραστηκότητά του ανακτάται πλήρως. Έτσι αποφεύγεται μη ειδική υβριδοποίηση. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- Διάλυμα πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών για την περιοχή-στόχο (στη συγκεκριμένη περίπτωση πρόκειται για τα γονίδια που θέλουμε να απομονώσουμε). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- Διάλυμα πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών γονιδίου β-τουμπουλίνης για τον *A.parasiticus*. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- Νερό απαλλαγμένο από RNάσες (DEPC) (Demo S.A.)

Αρχή μεθόδου

Η PCR είναι μία μέθοδος, η οποία εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του in vitro μηχανισμού αντιγραφής του γενετικού υλικού, ώστε να γίνει in vitro πολλαπλασιασμός του DNA. Ειδικότερα, με τη μέθοδο αυτή πολλαπλασιάζεται συγκεκριμένη περιοχή του DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο τμήματα γνωστής αλληλουχίας βάσεων. Η DNA πολυμεράση απαιτεί την παρουσία εναρκτήριων μορίων (πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές) γνωστής αλληλουχίας βάσεων, τα οποία είναι συμπληρωματικά ως προς τα άκρα της επιθυμητής περιοχής. Καθώς η πολυμεράση αντιγράφει μονόκλωνο DNA, σε πρώτη φάση πρέπει να γίνει αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, η οποία πραγματοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C περίπου. Ακολουθεί υβριδοποίηση των εκκινητών στις κατάλληλες περιοχές και επέκτασή τους με την επίδραση της DNA πολυμεράσης, παρουσία dNTP και $MgCl_2$ σε κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης. Κατ' αυτόν τον τρόπο, με εκμαγείο κάθε μητρικό κλώνο συντίθεται ένας νέος και το DNA είναι και πάλι δίκλωνο. Καθώς επέρχεται εκ νέου θερμικός διαχωρισμός των δίκλωνων μορίων, το DNA διπλασιάζεται για δεύτερη φορά. Η διαδοχή των σταδίων θερμικής αποδιάταξης, υβριδοποίησης, επέκτασης αποτελεί έναν κύκλο PCR και θεωρητικά διπλασιάζει την υπάρχουσα ποσότητα DNA, αφού κάθε νέος κλώνος που συντίθεται αποτελεί εκμαγείο για τη σύνθεση ενός άλλου, στον επόμενο κύκλο. Έτσι, τα αντίγραφα της αρχικής περιοχής αυξάνονται εκθετικά με το χρόνο.

Πορεία

Όλα τα στάδια του πειράματος πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης των δειγμάτων. Σε σωλήνες erppendorf PCR προστίθεται κατάλληλη ποσότητα νερού DEPC (ανάλογα με τον τελικό όγκο της αντίδρασης). Ακολουθεί η προσθήκη των ζευγών των πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών στα erppendorf PCR και στη συνέχεια η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας cDNA του μύκητα *A.parasiticus*. Στα αντίστοιχα τυφλά δείγματα (δείγματα ελέγχου) δεν προστίθεται cDNA αλλά κατάλληλη ποσότητα νερού προκειμένου να επιτευχθεί ο ίδιος τελικό όγκος. Στο επόμενο βήμα προστίθεται το αντιδραστήριο της Jumpstart στους σωλήνες erppendorf PCR, οι οποίοι στη συνέχεια μεταφέρονται στη συσκευή της αντίδρασης και το πρόγραμμα PCR ξεκινάει.

Οι κατηγορίες των δειγμάτων, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες των αντιδραστηρίων περιγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 11.4 της παραγράφου 11.7.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθείται στην παρούσα εργασία είναι το εξής:

	95°C για 105 s	Προ-αποδιάταξη (pre-denaturation)
	95°C για 15s	Αποδιάταξη (denaturation)
35x	56°C για 30 s	Υβριδοποίηση (annealing)
	72°C για 30s	Επέκταση (extension)
	72°C για 7 min, 4°C	Τελική επέκταση (final extension)

Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, εκ των οποίων το πλέον εμφανές είναι η σημαντική μείωση του χρόνου και κόπου που απαιτούνται για την προετοιμασία των δειγμάτων. Επιπλέον η προσθήκη του αντισώματος βελτιώνει την απόδοση της αντίδρασης, ενώ η προσθήκη της αδρανούς βαφής καθιστά αμέσως αντιληπτό, το αν έχει προστεθεί το ένζυμο ή όχι, καθώς και το αν έχει αναμιχθεί σωστά. Κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης το προϊόν PCR προστίθεται απευθείας, χωρίς επιπλέον ρυθμιστικό διάλυμα (loading buffer) ή χρωστική, κάτι που αποτελεί ένα ακόμη πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου. Η χρωστική αυτή δε σχετίζεται με την παρουσία ή μη και την ποσότητα του νουκλεϊνικού οξέος που περιέχεται στο δείγμα, παρά μόνο δείχνει πόσο έχουν προχωρήσει τα δείγματα κατά μήκος της πηκτής, έτσι ώστε να υπολογιστεί σε πόσο χρόνο πρέπει να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση. Καθώς με το έτοιμο διάλυμα αντίδρασης ελαχιστοποιούνται οι χειρισμοί που απαιτούνται, μειώνεται και ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων. Τέλος, το διάλυμα είναι έτσι κατασκευασμένο, ώστε να επιτρέπει την προετοιμασία των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ενότητα 1^η: αρχικά μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό *Aspergillus Flavus Parasiticus Agar* (AFPA) που εμβολιάστηκαν με το μύκητα *Aspergillus parasiticus*.

Ενότητα 2^η: σε συνέχεια των αποτελεσμάτων του προαναφερθέντος πειράματος, μελετήθηκε η επίδραση 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε θρεπτικό υλικό Yeast Extract Sucrose (YES).

Ενότητα 3^η: πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού της ΑΦΒ₁ σε κάππαρη ελληνικής προέλευσης.

Ενότητα 4^η: μελετήθηκε η επίδραση 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε κάππαρη ελληνικής προέλευσης ως υπόστρωμα.

Ενότητα 5^η: πραγματοποιήθηκε απομόνωση του RNA του μύκητα *Aspergillus parasiticus* από καλλιέργειες χωρίς προσθήκη και με προσθήκη 3 συγκεντρώσεων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) με διαφορετική επίδραση στην ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή ΑΦΒ₁ με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων του μύκητα που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ και της ρύθμισής της.

7.1 Σχεδιασμός πειράματος σε καλλιέργειες AFPA

Τρυβλία με θρεπτικό υλικό AFPA εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες με 10² κονίδια του μύκητα *A.parasiticus* και στη συνέχεια προστίθενται διαφορετικές ποσότητες MeJA και επωάζονται στατικά στους 30°C στο σκοτάδι. Ο εμβολιασμός των κονιδίων προηγήθηκε και ακολούθησε η προσθήκη του MeJA, με εξαίρεση τα δείγματα που δεν περιείχαν τη φυτοορμόνη, καθώς το φαινόμενο που εξετάζουμε περιλαμβάνει την επίδραση του MeJA σε ένα σύστημα, το οποίο έχει ήδη προσβληθεί από το μύκητα, όπως συμβαίνει αντίστοιχα στη φύση.

Την ίδια χρονική στιγμή για την κάθε μία από τις συνολικά επτά ημέρες παρατήρησης, τα δείγματα εξέρχονται από τον επωαστικό κλίβανο και μετράται η διάμετρος της μεγαλύτερης και της μικρότερης αποικίας που παρατηρείται. Κάθε φορά που γίνεται η μέτρηση παρακολουθείται η ανάπτυξη της ίδιας αποικίας. Ο σχεδιασμός του πειράματος περιγράφεται αναλυτικά στον πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1: Κατηγορίες δειγμάτων

Ομάδα	1	2	3	4	5	6
MeJA (mg · τρυβλίο ⁻¹)	-	1,190	1,734	2,267	11,900	17,340
Αιθανόλη	+	-	-	-	-	-
<i>A.parasiticus</i>	+	+	+	+	+	+
Τρυβλία	2	3	3	3	3	3

7.2 Σχεδιασμός πειράματος σε καλλιέργειες YES

Καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό YES εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες με 10² κονίδια και επώάζονται στατικά στους 30°C στο σκοτάδι. Υπενθυμίζεται πως και στην περίπτωση αυτή, στα δείγματα που εμβολιάστηκαν επιπλέον με MeJA, ο εμβολιασμός προηγήθηκε και ακολούθησε στη συνέχεια η προσθήκη του MeJA.

Εξετάζεται η παραγωγή Αφλατοξίνης B₁ σε όλα τα δείγματα κατά τη 0^η, 3^η, 7^η, 9^η, 12^η, 15^η, 18^η και 20^η ημέρα επώασης, ενώ στα δείγματα αναφοράς (control) εξετάζονται επιπλέον η 22^η και 25^η ημέρα επώασης.

Ο σχεδιασμός του πειράματος περιγράφεται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 7.2: Κατηγορίες δειγμάτων

Ομάδα	1	2	3	4	5	6	7	8
MeJA (mg · κωνική ⁻¹)	-	1,134	2,267	4,534	9,067	18,134	36,267	226,67
Αιθανόλη	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>A.parasiticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Κωνικές	3	3	3	3	3	3	3	3

Με σκοπό να διαπιστωθεί εάν και κατά πόσο διαφορετικές ποσότητες μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) επηρεάζουν την ανάπτυξη της μυκηλιακής μάζας του μύκητα *Aspergillus parasiticus*, προσδιορίζεται η μυκηλιακή μάζα για κάθε δείγμα σε κάθε ημέρα επώασης. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μέτρηση της μυκηλιακής μάζας των δειγμάτων control.

7.3 Προσδιορισμός της ΑΦΒ₁ που βιοσυντίθεται από το μύκητα *Aspergillus parasiticus* στην κάππαρη

Για τη συγκεκριμένη έρευνα χρειάστηκε αρχικά να αναπτυχθεί και να αξιολογηθεί η μέθοδος προσδιορισμού της ΑΦΒ₁ στην κάππαρη, ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν συνολικά 5 διαφορετικές ποσότητες MeJA (10⁻¹ M, 10⁻² M, 10⁻³ M, 10⁻⁴ M και 10⁻⁶ M) και προσδιορίστηκε η παραγόμενη ποσότητα ΑΦΒ₁ μετά από εμβολιασμό και επώαση των

δειγμάτων κατά τη 0^η, 3^η, 7^η, 9^η, 12^η και 15^η ημέρα.

Παράλληλα και σε αναλογία με τα πειράματα στο YES, εμβολιάστηκαν δείγματα μόνο με το μύκητα, τα οποία επωάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ΑΦΒ₁ κατά τη 0^η, 3^η, 7^η, 9^η, 12^η, 15^η, 18^η, 20^η, 22^η και 25^η ημέρα.

7.3.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΑΦΒ₁ στην κάππαρη

Σε δείγματα κάππαρης προστίθενται συγκεκριμένες ποσότητες ΑΦΒ₁ διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και στη συνέχεια προσδιορίζεται η ποσότητα της μυκοτοξίνης που ανακτήθηκε.

7.3.2 Σχεδιασμός πειράματος σε κάππαρη

Δείγματα κάππαρης εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες με 10² κονίδια και επωάζονται στατικά στους 30°C στο σκοτάδι. Όπως και στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις, αντίστοιχα και εδώ ο εμβολιασμός των κονιδίων προηγείται της προσθήκης του MeJA. Ακολουθεί η παραστατική περιγραφή του σχεδιασμού του πειράματος στον πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3: Κατηγορίες δειγμάτων

Ομάδα	1	2	3	4	5	6
MeJA (mg · κωνική ⁻¹)	-	0,0022	0,227	2,267	22,667	226,667
Αιθανόλη	+	-	-	-	-	-
<i>A.parasiticus</i>	+	+	+	+	+	+
Κωνικές	3	3	3	3	3	3

7.4 Σχεδιασμός πειράματος για την παραλαβή μυκηλίου του *A.parasiticus*

Αρχικά ετοιμάζονται οι καλλιέργειες του μύκητα, από τις οποίες θα απομονωθεί το RNA. Επιλέχθηκαν καλλιέργειες χωρίς προσθήκη (δείγματα control) και με προσθήκη 3 συγκεντρώσεων MeJA που διαφοροποιούνται ουσιαστικά ως προς την επίδρασή τους στη μυκηλιακή ανάπτυξη και τη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης.

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται οι κατηγορίες δειγμάτων που επιλέχθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα.

Πίνακας 7.4: Κατηγορίες δειγμάτων

Ομάδα	1	2	3	4
MeJA (mg · κωνική ⁻¹)	-	0,0022	1,134	18,134
Αιθανόλη	+	-	-	-
<i>A.parasiticus</i>	+	+	+	+

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

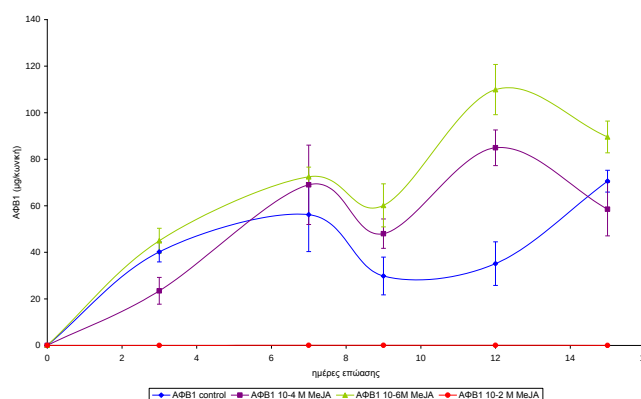
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΘΥΛΙΑΣΜΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (MeJA) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *ASPERGILLUS PARASITICUS* ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B₁ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΖΥΜΗΣ ΣΑΚΧΑΡΟΖΗΣ (YEAST EXTRACT SUCROSE - YES)

ΜΕΡΟΣ Α: ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΙΑΣΜΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (MeJA) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *ASPERGILLUS PARASITICUS* ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΦΡΑ

8.1 Γενικά

Οι πρώτες μελέτες στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής έδειξαν ότι ανάλογα με τη συγκέντρωση μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) που προστίθεται σε καλλιέργειες του μύκητα *A.parasiticus* σε θρεπτικό υλικό YES παρατηρείται διέγερση ή αναστολή της παραγόμενης Αφλατοξίνης B₁, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζεται και η μυκηλιακή ανάπτυξη κατ' αντίστοιχο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη 3 βασικών συγκεντρώσεων MeJA (10^{-2} M, 10^{-4} M και 10^{-6} M) είχε σαν αποτέλεσμα στην περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης (10^{-2} M) την πλήρη αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της παραγωγής της ΑΦΒ₁. Η παρουσία της συγκέντρωσης 10^{-4} M MeJA χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη αυξάνει το ρυθμό βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁, ενώ στην περίπτωση της χαμηλότερης συγκέντρωσης MeJA (10^{-6} M) υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση της παραγωγής της μυκηλιακής μάζας, καθώς και διέγερση της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁.^[218] Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στο διάγραμμα 8.1 και τους πίνακες (8.1-8.4) που ακολουθούν.



Σχήμα 8.1: Βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε δείγματα control και με προσθήκη 3 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA σε YES για διάστημα 15 ημερών

Πίνακας 8.1: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES control (10mL/κωνική)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	36,14	40,17	4,31	10,73
	2	44,72			
	3	39,65			
7 ^η	1	74,47	56,18	15,86	28,23
	2	47,84			
	3	46,24			
9 ^η	1	39,06	29,80	8,11	27,21
	2	23,95			
	3	26,40			
12 ^η	1	45,84	35,14	9,37	26,66
	2	31,15			
	3	28,43			
15 ^η	1	75,55	70,57	4,69	6,65
	2	69,92			
	3	66,24			
18 ^η	1	120,92	123,84	3,59	2,90
	2	127,85			
	3	122,74			
20 ^η	1	109,94	114,99	6,10	5,30
	2	113,26			
	3	121,77			
22 ^η	1	102,75	106,34	10,27	9,66
	2	98,34			
	3	117,92			
25 ^η	1	90,14	93,35	3,99	4,27
	2	97,82			
	3	92,10			

Πίνακας 8.2: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 0,0022 mg MeJA /κωνική (10⁻⁶ M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	38,92	44,94	5,39	11,99
	2	49,33			
	3	46,57			
7 ^η	1	75,94	72,44	4,17	5,76
	2	67,82			
	3	73,56			
9 ^η	1	52,08	60,16	9,26	15,39
	2	70,26			
	3	58,15			
12 ^η	1	97,89	109,91	10,78	9,81
	2	118,73			
	3	113,10			
15 ^η	1	81,96	89,58	6,82	7,61
	2	95,12			
	3	91,66			

Πίνακας 8.3: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 0,227 mg MeJA /κωνική (10⁻⁴ M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	18,58	23,45	5,76	24,56
	2	29,82			
	3	21,95			
7 ^η	1	75,04	69,01	17,06	24,72
	2	82,24			
	3	49,76			
9 ^η	1	42,88	48,00	6,30	13,13
	2	55,04			
	3	46,08			
12 ^η	1	76,32	84,91	7,66	9,02
	2	91,04			
	3	87,36			
15 ^η	1	71,20	58,51	11,45	19,57
	2	55,36			
	3	48,96			

Πίνακας 8.4: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 22,67 mg MeJA /κωνική (10⁻² M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,016	0,019	0,002	13,26
	2	0,019			
	3	0,021			
7 ^η	1	0,049	0,051	0,005	11,14
	2	0,057			
	3	0,046			
9 ^η	1	0,069	0,063	0,006	9,57
	2	0,057			
	3	0,064			
12 ^η	1	0,066	0,061	0,004	6,82
	2	0,058			
	3	0,060			
15 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			

ND = non-detect

Οι ιδιαίτερα σοβαρές συνέπειες της επιμόλυνσης των τροφίμων από την Αφλατοξίνη B₁ που καθιστά απαραίτητη την ανάγκη εύρεσης τρόπων αντιμετώπισης του προβλήματος σε συνδυασμό με τις ανασταλτικές ιδιότητες που εμφανίζει το MeJA έδωσαν αφορμή για μία πιο εξειδικευμένη μελέτη του φάσματος των συγκεντρώσεων του ρυθμιστικού αυτού παράγοντα που προκαλούν αναστολή στο φαινόμενο της βιοσύνθεσης της μυκοτοξίνης, προκειμένου να προσδιορισθεί με ακρίβεια η συγκέντρωση MeJA, η προσθήκη της οποίας - στις δεδομένες συνθήκες του εργαστηρίου - θα αναστείλει πλήρως τη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης B₁.

8.2 Μελέτη της ανάπτυξης των αποικιών του *A.parasiticus* στο AFPA σε δείγματα control και με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η περιοχή μεταξύ των συγκεντρώσεων 10⁻² M και 10⁻⁴ M MeJA, προκειμένου να ελεγχθεί η ανασταλτική επίδραση του MeJA στην παραγωγή της ΑΦΒ₁ (κεφάλαιο 6.7). Σε ένα πρώτο προκαταρκτικό στάδιο του πειράματος μελετήθηκε μακροσκοπικά η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στην ανάπτυξη του *A.parasiticus* στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό AFPA προκειμένου να περιορισθεί με έναν απλό και σύντομο τρόπο η αρχική ευρύτερη περιοχή συγκεντρώσεων MeJA που έπρεπε να ερευνηθεί. Πιο συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη 5 διαφορετικών ποσοτήτων MeJA -1,190 mg, 1,734 mg, 2,267 mg, 11,900 mg και 17,340 mg - (σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος κεφάλαιο 7.1, πίνακας 7.1) παρατηρήθηκε για συνολικά επτά ημέρες επώασης η επίδρασή τους στην ανάπτυξη των αποικιών του μύκητα σε σύγκριση με την ανάπτυξη των αποικιών αυτών στα τρυβλία που υπήρχε μόνο το θρεπτικό υλικό (δείγματα control). Η παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της διαμέτρου της μεγαλύτερης και της μικρότερης αποικίας (σε cm). Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μετρήσεων. Υπενθυμίζεται ότι στο θρεπτικό υλικό AFPA ο *A.parasiticus* χρειάζεται ~48 h για να σχηματίσει τις χαρακτηριστικές του αποικίες (§6.3.1). Για το λόγο αυτό, η 1^η ημέρα παρακολούθησης δεν περιλαμβάνεται στο συγκεκριμένο πίνακα, καθώς οι αποικίες δεν ήταν εμφανείς.

Πίνακας 8.5: Αποτελέσματα ανάπτυξης των αποικιών του *A.parasiticus* στο AFPA σε δείγματα control και με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA

Ημέρα ανάπτυξης		2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η
Δείγμα control	τρυβλίο 1	2,2 cm*	3,5 cm*	4,4 cm*	5,0 cm*	5,4 cm*	5,6 cm*
Δείγμα με προσθήκη 1,19 mg MeJA	τρυβλίο 1	1,0 cm* -	1,5 cm* 0,2 cm**	2,0 cm* 1,4 cm**	3,4 cm* 1,8 cm**	3,9 cm* 2,2 cm**	4,2 cm* 2,4 cm**
	τρυβλίο 2	0,4 cm* -	0,8 cm* 0,5 cm**	1,3 cm* 0,7 cm**	1,6 cm* 0,9 cm**	1,8 cm* 1,0 cm**	1,9 cm* 1,0 cm**
	τρυβλίο 3	0,4 cm* -	0,7 cm* 0,4 cm**	1,0 cm* 0,5 cm**	1,2 cm* 0,7 cm**	1,3 cm* 0,9 cm**	1,4 cm* 1,0 cm**
Δείγμα με προσθήκη 1,734 mg MeJA	τρυβλίο 1	- -	0,7 cm* 0,3 cm**	1,5 cm* 0,8 cm**	2,0 cm* 1,4 cm**	2,6 cm* 1,9 cm**	2,9 cm* 2,2 cm**
	τρυβλίο 2	- -	0,3 cm* -	1,2 cm* 1,0 cm**	1,6 cm* 1,3 cm**	2,0 cm* 1,7 cm**	2,4 cm* 2,0 cm**
	τρυβλίο 3	- -	0,6 cm* 0,3 cm**	1,1 cm* 0,7 cm**	1,6 cm* 1,1 cm**	2,0 cm* 1,4 cm**	2,2 cm* 1,5 cm**
Δείγμα με προσθήκη 2,267 mg MeJA	τρυβλίο 1	- -	0,6 cm* 0,2 cm**	0,8 cm* 0,7 cm**	1,5 cm* 1,0 cm**	1,8 cm* 1,5 cm**	2,1 cm* 1,9 cm**
	τρυβλίο 2	- -	0,2 cm* 0,1 cm**	0,4 cm* 0,4 cm**	1,7 cm* 0,8 cm**	2,2 cm* 1,3 cm**	2,5 cm* 1,5 cm**
	τρυβλίο 3	- -	- -	0,4 cm* -	1,6 cm* 0,9 cm**	1,9 cm* 1,4 cm**	2,2 cm* 1,8 cm**
Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA	τρυβλίο 1	- -	- -	- -	- -	- -	0,4 cm* -
	τρυβλίο 2	- -	- -	- -	- -	- -	0,6 cm* -
	τρυβλίο 3	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Δείγμα με προσθήκη 17,34 mg MeJA	τρυβλίο 1	- -	- -	- -	- -	- -	0,5 cm* -
	τρυβλίο 2	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	τρυβλίο 3	- -	- -	- -	- -	- -	- -

Σημείωση: * η διάμετρος της μεγαλύτερης αποικίας

** η διάμετρος της μικρότερης αποικίας

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στον Πίνακα 8.5, εκείνο που γίνεται σαφές και ισχύει για όλα τα δείγματα με προσθήκη MeJA, είναι το γεγονός ότι η παρουσία του προκαλεί αρχικά μία σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη του μύκητα *A.parasiticus*. Μετά την 3^η ημέρα επώασης μπορούμε πλέον να παρατηρήσουμε μία διαφοροποίηση της επίδρασης του MeJA ανάλογα με τη συγκέντρωσή του στο δείγμα.

Έτσι πιο συγκεκριμένα, στα τρυβλία με την προσθήκη της χαμηλότερης ποσότητας MeJA (1,19 mg) η ανάπτυξη των αποικιών υστερεί ως προς το control, όμως

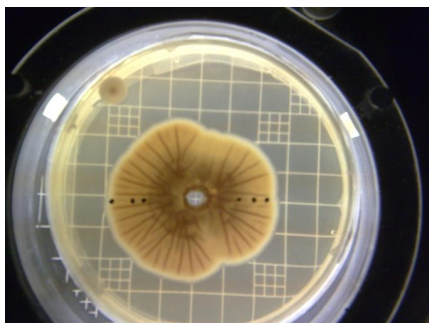
φαίνεται πως παρόλα αυτά υπάρχει ακόμη μία σημαντική αύξηση του μεγέθους τους μέσα στο διάστημα παρακολούθησης. Μία αντίστοιχη εικόνα με ακόμη πιο περιορισμένη όμως ανάπτυξη παρουσιάζουν και τα τρυβλία με τις ποσότητες 1,734 mg και 2,267 mg, όπου ο μύκητας αρχίζει να αναπτύσσεται μετά τη 2^η ημέρα.

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις, η προσθήκη των 2 μεγαλύτερων ποσοτήτων MeJA (11,9 mg και 17,34 mg) έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα για όλο το διάστημα παρακολούθησης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μακροσκοπική παρατήρηση που έγινε οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία MeJA σε συγκεντρώσεις μικρότερες από $10^{-3}M$ (που αντιστοιχούν σε ποσότητες MeJA μικρότερες των 2,267 mg) δε φαίνεται να έχει την ανασταλτική επίδραση που μας ενδιαφέρει στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* και κατ' επέκταση και στην παραγωγή της ΑΦΒ₁, καθώς τα δύο αυτά φαινόμενα συνδέονται άμεσα μεταξύ τους.

Ακολουθούν κάποιες αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του πειράματος, στις οποίες φαίνεται καθαρά ότι το μέγεθος της ανασταλτικής δράσης του MeJA εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωσή του στο εκάστοτε δείγμα. Οι φωτογραφίες για όλα τα δείγματα control και τα δείγματα με την προσθήκη των 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA για το σύνολο των ημερών παρακολούθησης παρατίθενται στο Παράρτημα II του βιβλίου.

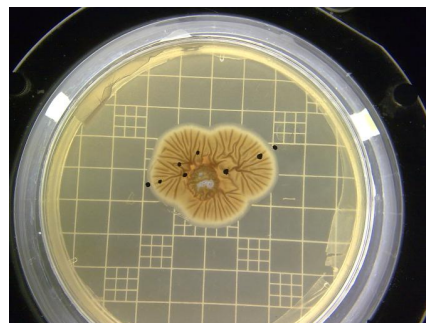
5^η ημέρα επώασης:



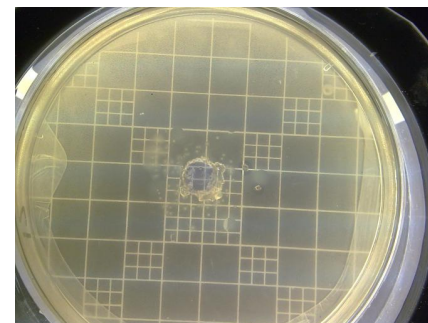
Δείγμα control



Δείγμα με προσθήκη 1,19 mg MeJA

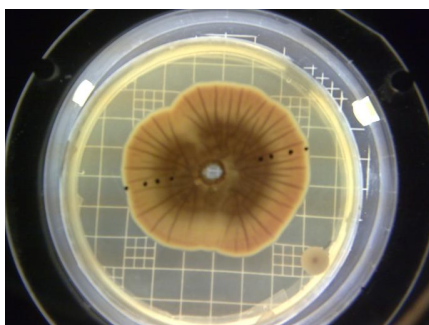


Δείγμα με προσθήκη 2,267 mg MeJA



Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA

7^η ημέρα επώασης:



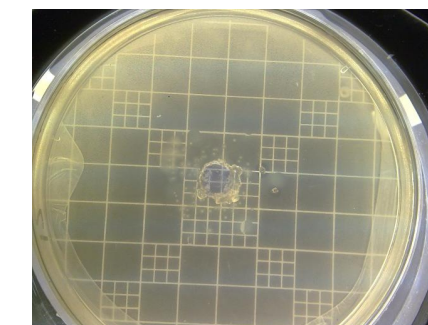
Δείγμα control



Δείγμα με προσθήκη 1,19 mg MeJA



Δείγμα με προσθήκη 2,267 mg MeJA



Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA

Εικόνα 8.1: Ανάπτυξη των αποικιών του *A.parasiticus* σε AFPA σε δείγματα control και με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA

**ΜΕΡΟΣ Β: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Β₁ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ YES**

8.3 Σχεδιασμός της καμπύλης αναφοράς

Για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς έγινε προσδιορισμός της ΑΦΒ₁ σε πρότυπα διαλύματα με τη μέθοδο της HPLC (§6.6.4, §6.6.5). Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Πίνακας 8.6: Δεδομένα κατασκευής καμπύλης αναφοράς

	C _{ΑΦΒ₁} (ng mL ⁻¹)	Ποσότητα ΑΦΒ ₁ (ng) που περιέχεται στα 40 µL	Μέσος όρος εμβαδών	Τυπική απόκλιση SD	Σχετική τυπική απόκλιση RSD%
D ₅	1	0,04	1020446,00	44257,81	4,34
D ₄	2	0,08	2620689,50	179847,66	6,86
D ₃	2,5	0,1	2948307,5	22437,21	0,76
D ₂	5	0,2	5908707,00	41204,53	0,70
D ₁	10	0,4	12028624,00	26836,12	0,22

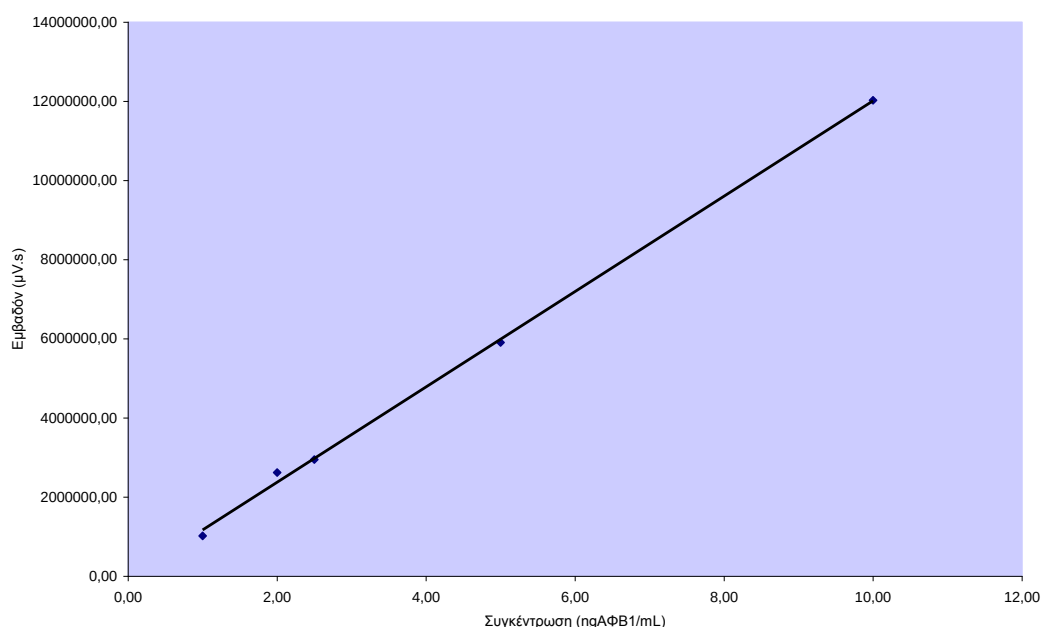
Με βάση τα δεδομένα του συγκεκριμένου πίνακα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς μιας ημέρας, ενώ με επεξεργασία τους στο πρόγραμμα Origin 8.0 υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας:

$$y = - 35270 (\pm 125404) + 1,21 (\pm 0,024) \cdot 10^6 x$$

$$R = 0,9994$$

Όπου x = ποσότητα της ΑΦΒ₁ που περιέχεται σε 40 µL (που ισοδυναμεί με τον όγκο έγχυσης).

- Η γραμμικότητα της ευθείας παλινδρόμησης με συντελεστή γραμμικής προσαρμογής r = 0,9994 κρίνεται αρκετά ικανοποιητική.
- Από τους συντελεστές διακύμανσης του πίνακα 8.6 και από το συντελεστή γραμμικής προσαρμογής της ευθείας του διαγράμματος 8.2 που ακολουθεί διαπιστώνεται ότι η μέθοδος έχει καλή επαναληψιμότητα.



Σχήμα 8.2: Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς

8.4 Υπολογισμός της ποσότητας AΦB₁ που παράγεται από το μύκητα *A.parasiticus* σε θρεπτικό υλικό YES

Η ποσότητα της παραγόμενης AΦB₁ υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\alpha = \frac{\beta \cdot \gamma \cdot \delta \cdot \varepsilon}{\zeta \cdot \eta}$$

όπου

α : $\mu\text{g A}\Phi\text{B}_1$ / κωνική (10 mL YES)

β : ο όγκος του συστήματος $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9, στο οποίο διαλύεται το ξηρό υπόλειμμα που προκύπτει από την εξάτμιση μετά την παραγωγοποίηση του δείγματος AΦB₁ (200 μL)

γ : ο συνολικός όγκος της καλλιέργειας (30 mL CH_3OH + 10 mL YES = 40 mL) μέσα στην κωνική

δ : η εκάστοτε αραίωση του διαλύματος των 200 μL (στις περιπτώσεις όπου είναι αναγκαία)

ε : η συγκέντρωση της AΦB₁ σε $\mu\text{g/mL}$ της ένεσης που γίνεται στην HPLC (προκύπτει από την καμπύλη προτύπων διαλυμάτων AΦB₁)

ζ : ο λαμβανόμενος όγκος εκχυλίσματος της καλλιέργειας (1 mL)

η : $\mu\text{L/mL}$ (ο συντελεστής ανάλογος με την εκάστοτε αραίωση, απαραίτητος για την εναρμόνιση των μονάδων ώστε να γίνει μετατροπή σε mL)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προγενέστερης ερευνητικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του εργαστηρίου,^[219] η μέθοδος προσδιορισμού της

ΑΦΒ₁ σε θρεπτικό υλικό YES έχει πολύ ικανοποιητικό ποσοστό ανάκτησης (99,5%), καλή επαναληψιμότητα, ευαισθησία, ακρίβεια και όριο ανίχνευσης 0,02 ng/ml YES.

**ΜΕΡΟΣ Γ: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ
ΜΕΘΥΛΙΑΣΜΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (MeJA) ΠΟΥ ΑΝΑΣΤΕΛΕΙ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Β₁ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΗΤΑ *ASPERGILLUS PARASITICUS* ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ
ΥΛΙΚΟ YES**

8.5 Γενικά

Σε συνέχεια των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το πείραμα στα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό AFPA, επιλέχθηκαν συνολικά επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις MeJA (0,0005 M, 0,001 M, 0,002 M, 0,004 M, 0,008 M, 0,016 M και 0,1 M), οι οποίες θα μελετηθούν για διάστημα 20 ημερών - και συγκεκριμένα τη 0^η, 3^η, 7^η, 9^η, 12^η, 15^η, 18^η και 20^η ημέρα - ως προς την επίδρασή τους στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus* και την παραγωγή Αφλατοξίνης Β₁ στο YES. Στόχος των πειραμάτων αυτών είναι ο προσδιορισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης MeJA που απαιτείται για την πλήρη αναστολή της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ σε ένα θρεπτικό υλικό που γνωρίζουμε ότι προάγει την παραγωγή υψηλών επιπέδων Αφλατοξίνης όπως είναι το YES.

Σε όλα τα δείγματα της συγκεκριμένης έρευνας υπολογίσθηκαν οι παραγόμενες ποσότητες ΑΦΒ₁ από τον *A.parasiticus*, καθώς επίσης και η μυκηλιακή του μάζα για κάθε ημέρα παρατήρησης, όπως προέβλεπε ο σχεδιασμός του πειράματος (κεφάλαιο 7.2, πίνακας 7.2).

8.6 Μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα *A.parasiticus* και της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ σε δείγματα YES control

Ως δείγματα control χαρακτηρίζονται τα δείγματα YES που περιέχουν 10² κονίδια του μύκητα *A.parasiticus* και απόλυτη αιθανόλη. Στο συγκεκριμένο πείραμα, παράλληλα με τα δείγματα YES, στα οποία προστέθηκε MeJA διαφορετικών συγκεντρώσεων, προσδιορίσθηκε η μυκηλιακή ανάπτυξη και η παραγόμενη ΑΦΒ₁ σε δείγματα YES χωρίς MeJA για ένα χρονικό διάστημα 25 ημερών.

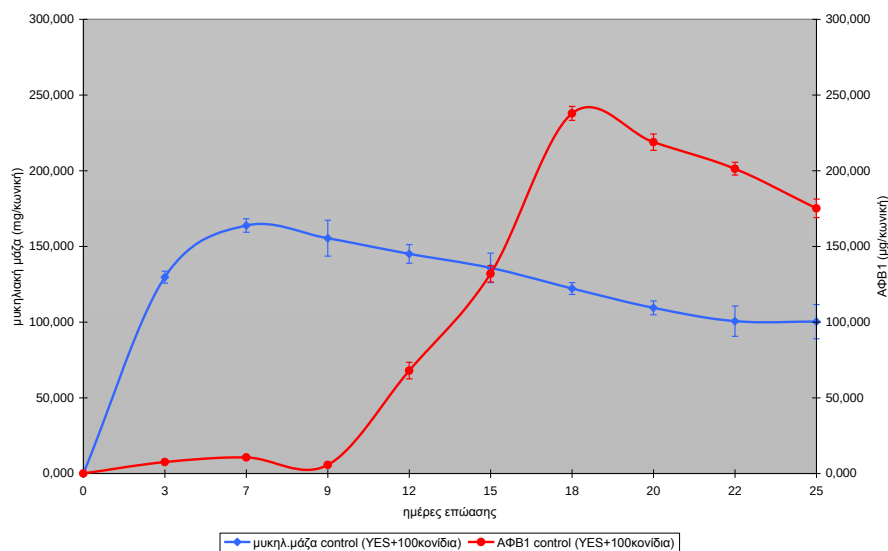
Στους πίνακες 8.7 και 8.8 παρουσιάζονται αντίστοιχα οι ποσότητες μυκηλιακής μάζας που προσδιορίσθηκαν πειραματικά (§6.12) και οι ποσότητες της παραγόμενης ΑΦΒ₁, ενώ το συνδυαστικό διάγραμμα (σχήμα 8.3) απεικονίζει ταυτόχρονα τη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus* και την πορεία της ΑΦΒ₁ που παράγεται για συνολικό διάστημα 25 ημερών.

**Πίνακας 8.7: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES control
(10mL/κωνική)**

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	133,5	129,7	3,91	3,01
	2	125,7			
	3	130,1			
7 ^η	1	168,7	163,8	4,50	2,75
	2	159,9			
	3	162,7			
9 ^η	1	142,4	155,4	11,89	7,65
	2	165,7			
	3	158,2			
12 ^η	1	139,0	145,0	6,16	4,25
	2	151,3			
	3	144,7			
15 ^η	1	125,9	135,8	9,71	7,15
	2	145,3			
	3	136,3			
18 ^η	1	119,1	122,2	3,92	3,21
	2	126,6			
	3	120,9			
20 ^η	1	114,7	109,4	4,57	4,18
	2	106,5			
	3	107,1			
22 ^η	1	109,3	100,6	10,05	9,99
	2	89,6			
	3	102,9			
25 ^η	1	101,7	100,3	11,32	11,28
	2	88,3			
	3	110,8			

Πίνακας 8.8: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES control (10mL/κωνική)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	8,72	7,58	1,14	15,04
	2	6,45			
	3	7,57			
7 ^η	1	11,35	10,59	1,14	10,76
	2	9,28			
	3	11,14			
9 ^η	1	4,86	5,62	0,66	11,74
	2	6,03			
	3	5,98			
12 ^η	1	63,44	67,95	5,44	8,01
	2	73,99			
	3	66,42			
15 ^η	1	129,77	131,90	5,39	4,09
	2	138,03			
	3	127,91			
18 ^η	1	235,61	237,83	4,60	1,93
	2	243,12			
	3	234,75			
20 ^η	1	212,80	218,80	5,45	2,49
	2	223,45			
	3	220,12			
22 ^η	1	205,94	201,30	4,22	2,10
	2	197,73			
	3	200,12			
25 ^η	1	181,61	175,13	6,09	3,48
	2	174,24			
	3	169,53			



Σχήμα 8.3: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus* και βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε δείγματα YES control για διάστημα 25 ημερών

Από τους πίνακες φαίνονται οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης, οι οποίες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την επαναληψιμότητα των μετρήσεων και οι οποίες κρίνονται και για τις δύο περιπτώσεις ικανοποιητικές. Η ανάπτυξη του *A.parasiticus*, που παριστάνεται από τη μεταβολή της ξηρής μυκηλιακής του μάζας συναρτήσει του χρόνου επώασης, αγγίζει το μέγιστο σημείο της κατά τη 7^η ημέρα επώασης, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται σταδιακή μείωση της μυκηλιακής μάζας μέχρι την 25^η ημέρα.

Μετά το σημείο της μέγιστης ανάπτυξης (7^η ημέρα) ξεκινάει η φάση κάμψεως του μύκητα, κατά την οποία λαμβάνει χώρα ο δευτερογενής μεταβολισμός, στη διάρκεια του οποίου βιοσυντίθεται και η ΑΦΒ₁. Στη φάση αυτή παρατηρείται περιορισμός της ανάπτυξης του μύκητα λόγω

- α) εξαντλήσεως των θρεπτικών συστατικών του μέσου καλλιέργειας
- β) απουσίας ειδικών συντελεστών ανάπτυξης και
- γ) συσσώρευσης τελικών προϊόντων μεταβολισμού, τα οποία μπορεί να είναι τοξικά για τον ίδιο το μικροοργανισμό

Στην πορεία βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ παρατηρείται ότι ήδη από τη 0^η ημέρα υπάρχει μία ανιχνεύσιμη ποσότητα ΑΦΒ₁ που δικαιολογείται από το γεγονός ότι τα κονίδια του εμβολιασμού περιέχουν ΑΦΒ₁ σε συνδυασμό με το ότι το YES αποτελεί ευνοϊκό θρεπτικό υλικό για το μύκητα *A.parasiticus*. Το μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης της τοξίνης εντοπίζεται τη 18^η ημέρα μετά από μία αύξηση του ρυθμού βιοσύνθεσης που γίνεται ιδιαίτερα αισθητή μετά την 9^η ημέρα. Το χρονικό διάστημα που ορίζεται μεταξύ της 18^η και της 25^η ημέρας περιγράφει τη διάσπαση της ΑΦΒ₁ που πραγματοποιείται με ήπιους ρυθμούς.

Συγκρίνοντας τις δύο προαναφερθείσες καμπύλες μεταξύ τους, είμαστε σε θέση να εξαγάγουμε τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Η σταδιακή αύξηση της παραγόμενης Αφλατοξίνης εντοπίζεται κυρίως μετά την 9^η ημέρα επώασης, όπου η φάση κάμψεως έχει ξεκινήσει και ο δευτερογενής μεταβολισμός έχει πλέον ενεργοποιηθεί.
- 2) Η φάση της σταδιακής διάσπασης της Αφλατοξίνης συμπίπτει χρονικά με τη φάση εκείνη, κατά την οποία επέρχεται η μυκηλιακή λύση, στη διάρκεια της οποίας απελευθερώνονται ένζυμα που εμπλέκονται στη διάσπαση της τοξίνης από τον ίδιο το μύκητα (κεφάλαιο 3.4.4).

8.7 Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών ποσοτήτων MeJA στην ανάπτυξη του μύκητα *A.parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε θρεπτικό υλικό YES

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της μυκηλιακής μάζας και της ΑΦΒ₁ που παράγεται από τον *A.parasiticus*

σε διάστημα 20 ημερών μετά από προσθήκη 1,134 mg, 2,267 mg, 4,534 mg, 9,067 mg, 18,134 mg, 36,267 mg και 226,67 mg MeJA.

Πίνακας 8.9: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 1,134 mg MeJA/κωνική (0,0005M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	113,9	103,9	8,74	8,41
	2	99,8			
	3	97,9			
7 ^η	1	152,8	150,7	2,15	1,55
	2	150,7			
	3	148,5			
9 ^η	1	140,0	142,6	7,58	6,03
	2	136,6			
	3	151,1			
12 ^η	1	142,2	138,6	3,65	1,87
	2	138,7			
	3	134,9			
15 ^η	1	118,6	119,4	3,13	2,62
	2	116,8			
	3	122,9			
18 ^η	1	102,9	107,4	6,38	5,94
	2	104,6			
	3	114,7			
20 ^η	1	99,3	96,1	6,25	6,50
	2	88,9			
	3	100,1			

Πίνακας 8.10: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 1,134 mg MeJA /κωνική (0,0005M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	2,12	2,49	0,44	17,67
	2	2,98			
	3	2,36			
7 ^η	1	7,01	6,28	0,80	12,74
	2	5,43			
	3	6,40			
9 ^η	1	6,25	6,19	0,65	10,50
	2	5,52			
	3	6,81			
12 ^η	1	67,15	63,18	4,51	7,14
	2	58,28			
	3	64,10			
15 ^η	1	38,96	42,96	5,26	12,24
	2	48,92			
	3	40,99			
18 ^η	1	27,24	32,33	9,41	29,11
	2	26,55			
	3	43,19			
20 ^η	1	18,74	21,40	3,13	14,63
	2	24,85			
	3	20,61			

Οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης που προκύπτουν κρίνονται και για τις δύο περιπτώσεις ικανοποιητικές. Το μέγιστο της μυκηλιακής ανάπτυξης εντοπίζεται την 7^η ημέρα επώασης και ακολουθεί η φάση κάμψης με τη μείωση της μυκηλιακής μάζας μέχρι την 20^η ημέρα παρατήρησης. Στην πορεία βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ η μέγιστη παραγωγή παρατηρείται τη 12^η ημέρα, ενώ τις πρώτες ημέρες οι τιμές κυμαίνονται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα. Ακολουθεί στη συνέχεια μία ομαλή πτώση του ρυθμού παραγωγής μέχρι την 20^η ημέρα.

Πίνακας 8.11: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 2,267 mg MeJA/κωνική (0,001M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣ Η SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	107,7	104,7	9,31	8,89
	2	112,2			
	3	94,3			
7 ^η	1	153,2	151,2	28,35	20,29
	2	121,9			
	3	178,5			
9 ^η	1	138,9	139,7	8,18	5,41
	2	148,3			
	3	132,0			
12 ^η	1	123,2	132,1	18,17	10,03
	2	120,1			
	3	153,0			
15 ^η	1	114,3	109,1	6,29	5,77
	2	102,1			
	3	110,9			
18 ^η	1	103,1	98,2	4,37	4,45
	2	94,7			
	3	96,8			
20 ^η	1	85,0	87,8	8,51	9,69
	2	97,4			
	3	81,1			

Πίνακας 8.12: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 2,267 mg MeJA/κωνική (0,001M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,87	0,98	0,11	11,22
	2	1,08			
	3	0,99			
7 ^η	1	1,21	1,18	0,03	2,63
	2	1,15			
	3	1,19			
9 ^η	1	1,17	1,12	0,12	10,71
	2	0,98			
	3	1,20			
12 ^η	1	71,75	64,67	6,27	9,70
	2	59,82			
	3	62,43			
15 ^η	1	38,26	44,56	5,72	12,84
	2	49,41			
	3	46,02			
18 ^η	1	24,29	31,09	5,94	19,11
	2	33,68			
	3	35,30			
20 ^η	1	22,97	20,17	2,56	12,69
	2	19,59			
	3	17,94			

Οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης είναι και σε αυτές τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν ικανοποιητικές. Η μυκηλιακή ανάπτυξη παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της την 7^η ημέρα και ακολουθεί σταδιακή μείωση μέχρι την 20^η ημέρα επώασης. Το μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης της ΑΦΒ₁ εμφανίζεται τη 12^η ημέρα, ενώ στο προηγούμενο διάστημα παρατήρησης (0^η έως 9^η ημέρα) οι ποσότητες της ΑΦΒ₁ είναι συγκριτικά πολύ χαμηλές. Μετά τη 12^η ημέρα ο ρυθμός βιοσύνθεσης μειώνεται.

**Πίνακας 8.13: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική)
με προσθήκη 4,534 mg MeJA/κωνική (0,002M)**

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	90,9	89,8	3,64	4,05
	2	85,7			
	3	92,7			
7 ^η	1	136,8	155,3	17,23	14,71
	2	158,1			
	3	170,9			
9 ^η	1	161,1	150,0	9,62	6,19
	2	144,0			
	3	144,9			
12 ^η	1	151,9	141,8	9,09	4,42
	2	139,1			
	3	134,3			
15 ^η	1	120,8	121,3	3,92	3,23
	2	117,6			
	3	125,4			
18 ^η	1	110,2	108,1	5,94	5,49
	2	101,4			
	3	112,7			
20 ^η	1	86,3	96,6	9,09	9,41
	2	100,2			
	3	103,4			

Πίνακας 8.14: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 4,534 mg MeJA/κωνική (0,002M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG AFB ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,28	0,29	0,02	7,24
	2	0,27			
	3	0,31			
7 ^η	1	0,43	0,41	0,02	5,12
	2	0,39			
	3	0,42			
9 ^η	1	0,37	0,40	0,03	7,75
	2	0,43			
	3	0,39			
12 ^η	1	58,97	56,87	2,42	4,26
	2	54,22			
	3	57,43			
15 ^η	1	35,37	38,41	2,64	6,87
	2	39,71			
	3	40,15			
18 ^η	1	26,25	27,55	3,76	13,65
	2	31,79			
	3	24,62			
20 ^η	1	16,13	19,15	2,65	13,84
	2	21,07			
	3	20,24			

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων που προκύπτει από τις τιμές του συντελεστή διακύμανσης κρίνεται ικανοποιητική. Η παραγωγή μυκηλιακής μάζας φθάνει στο μέγιστο σημείο της την 7^η ημέρα και μειώνεται σταδιακά στη συνέχεια. Η βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ ξεκινάει από πολύ χαμηλές τιμές μέχρι και την 9^η ημέρα, κορυφώνεται τη 12^η ημέρα παρατήρησης και έπειτα παρουσιάζει μία φθίνουσα πορεία μέχρι την 20^η ημέρα.

**Πίνακας 8.15: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική)
με προσθήκη 9,067 mg MeJA/κωνική (0,004M)**

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	88,6	80,3	7,19	8,95
	2	75,3			
	3	77,2			
7 ^η	1	115,7	109,2	8,54	7,82
	2	112,3			
	3	99,5			
9 ^η	1	99,3	102,5	9,99	9,75
	2	94,5			
	3	113,7			
12 ^η	1	104,0	99,9	3,59	3,59
	2	98,4			
	3	97,3			
15 ^η	1	95,2	84,7	9,57	11,30
	2	82,3			
	3	76,5			
18 ^η	1	77,9	76,2	6,91	9,07
	2	82,1			
	3	68,6			
20 ^η	1	66,3	68,6	4,39	6,40
	2	73,7			
	3	65,9			

Πίνακας 8.16: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 9,067 mg MeJA/κωνική (0,004M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG AFB ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
7 ^η	1	0,001	0,001	0	0
	2	0,001			
	3	0,001			
9 ^η	1	0,11	0,12	0,03	25,83
	2	0,15			
	3	0,09			
12 ^η	1	0,34	0,37	0,026	7,03
	2	0,39			
	3	0,38			
15 ^η	1	0,03	0,04	0,006	15,00
	2	0,04			
	3	0,04			
18 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			
20 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			

ND = non-detect

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η μέγιστη μυκηλιακή ανάπτυξη εντοπίζεται την 7^η ημέρα επώασης και μειώνεται σταδιακά μέχρι την 20^η ημέρα. Η μέγιστη τιμή της παραγόμενης ΑΦΒ₁ παρατηρείται τη 12^η ημέρα και μειώνεται συνεχώς μέχρι την 20^η ημέρα όπου δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμη. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων είναι ικανοποιητική.

Για τις επόμενες 3 περιπτώσεις προσθήκης MeJA τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζουν μεταξύ τους τα ίδια χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η μέγιστη τιμή μυκηλιακής μάζας εμφανίζεται την 7^η ημέρα παρατήρησης, ενώ σε ό,τι αφορά την παραγωγή ΑΦΒ₁ δεν παρατηρείται μέγιστη τιμή, καθώς μέχρι τη 15^η ημέρα οι ποσότητες κυμαίνονται στα ίδια ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα και στις τελευταίες ημέρες (18^η και 20^η) η ΑΦΒ₁ δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμη.

Πίνακας 8.17: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 18,134 mg MeJA/κωνική (0,008M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	67,7	65,3	6,24	9,56
	2	58,3			
	3	70,1			
7 ^η	1	85,2	86,9	8,09	9,31
	2	79,8			
	3	95,7			
9 ^η	1	79,8	84,2	5,04	5,99
	2	89,7			
	3	83,1			
12 ^η	1	77,1	81,7	4,19	5,13
	2	85,3			
	3	82,7			
15 ^η	1	90,2	77,2	11,37	14,73
	2	69,1			
	3	72,3			
18 ^η	1	62,5	69,5	7,92	11,40
	2	78,1			
	3	67,9			
20 ^η	1	59,1	62,2	2,83	4,55
	2	64,6			
	3	63,0			

Πίνακας 8.18: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 18,134 mg MeJA/κωνική (0,008M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG AFB ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
7 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
9 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
12 ^η	1	0,001	0,001	0	0
	2	0,001			
	3	0,001			
15 ^η	1	0,001	0,001	0	0
	2	0,001			
	3	0,001			
18 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			
	1	ND			

20 ^η	2	ND	ND	-	-
	3	ND			

Πίνακας 8.19: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 36,267 mg MeJA/κωνική (0,016M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	66,8	63,4	3,87	6,10
	2	59,2			
	3	64,3			
7 ^η	1	86,9	81,6	4,72	5,78
	2	77,8			
	3	80,2			
9 ^η	1	71,3	76,7	5,31	6,92
	2	81,9			
	3	77,0			
12 ^η	1	59,4	68,3	10,37	15,18
	2	79,7			
	3	65,9			
15 ^η	1	67,0	61,2	5,26	8,59
	2	59,7			
	3	56,8			
18 ^η	1	53,3	55,0	6,27	11,40
	2	61,9			
	3	49,7			
20 ^η	1	44,2	49,2	4,41	8,96
	2	52,4			
	3	51,1			

Πίνακας 8.20: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 36,267 mg MeJA/κωνική (0,016M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
7 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
9 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
12 ^η	1	0,001	0,001	0	0
	2	0,001			
	3	0,001			
15 ^η	1	0,001	0,001	0	0
	2	0,001			
	3	0,001			
18 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			

20 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			

Πίνακας 8.21: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 226,67 mg MeJA/κωνική (0,1M)

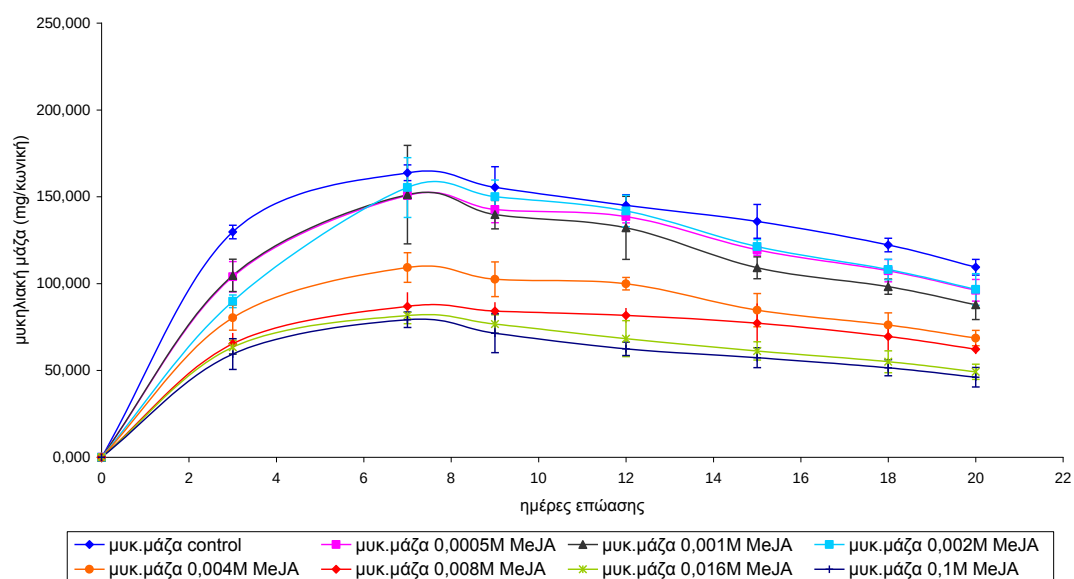
ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	-	-	-	-
	2	-			
	3	-			
3 ^η	1	68,9	59,4	8,89	14,97
	2	57,9			
	3	51,3			
7 ^η	1	76,1	79,2	4,45	5,62
	2	84,3			
	3	77,2			
9 ^η	1	84,2	71,4	11,17	15,64
	2	63,8			
	3	66,1			
12 ^η	1	59,3	62,4	3,84	6,15
	2	66,7			
	3	61,2			
15 ^η	1	51,3	57,3	5,73	10,00
	2	62,7			
	3	58,0			
18 ^η	1	46,3	51,5	4,63	8,99
	2	53,2			
	3	55,1			
20 ^η	1	39,7	46,1	5,65	12,26
	2	48,4			
	3	50,3			

Πίνακας 8.22: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα YES (10mL/κωνική) με προσθήκη 226,67 mg/κωνική MeJA (0,1M)

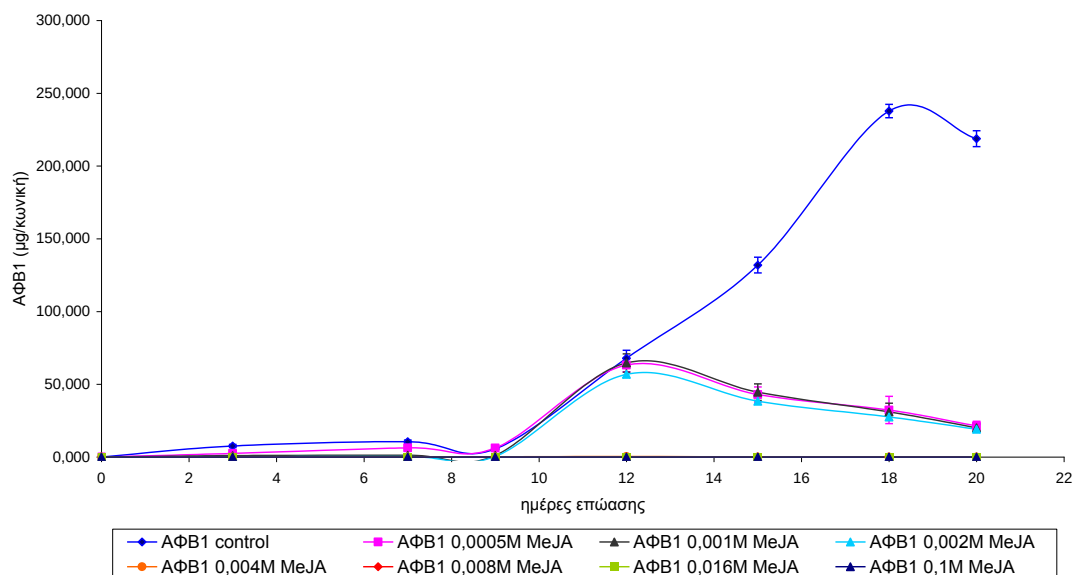
ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
7 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
9 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
12 ^η	1	0,001	0,001	0	0
	2	0,001			
	3	0,001			
15 ^η	1	0,001	0,001	0	0
	2	0,001			
	3	0,001			

18 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			
20 ^η	1	ND	ND	-	-
	2	ND			
	3	ND			

Τα διαγράμματα 8.4 και 8.5 απεικονίζουν τις καμπύλες μυκηλιακής ανάπτυξης και βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ των δειγμάτων με προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων MeJA και των δειγμάτων control.



Σχήμα 8.4: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. parasiticus* σε δείγματα YES control και σε δείγματα YES με προσθήκη 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλισμοονικού οξέος (MeJA) για διάστημα 20 ημερών



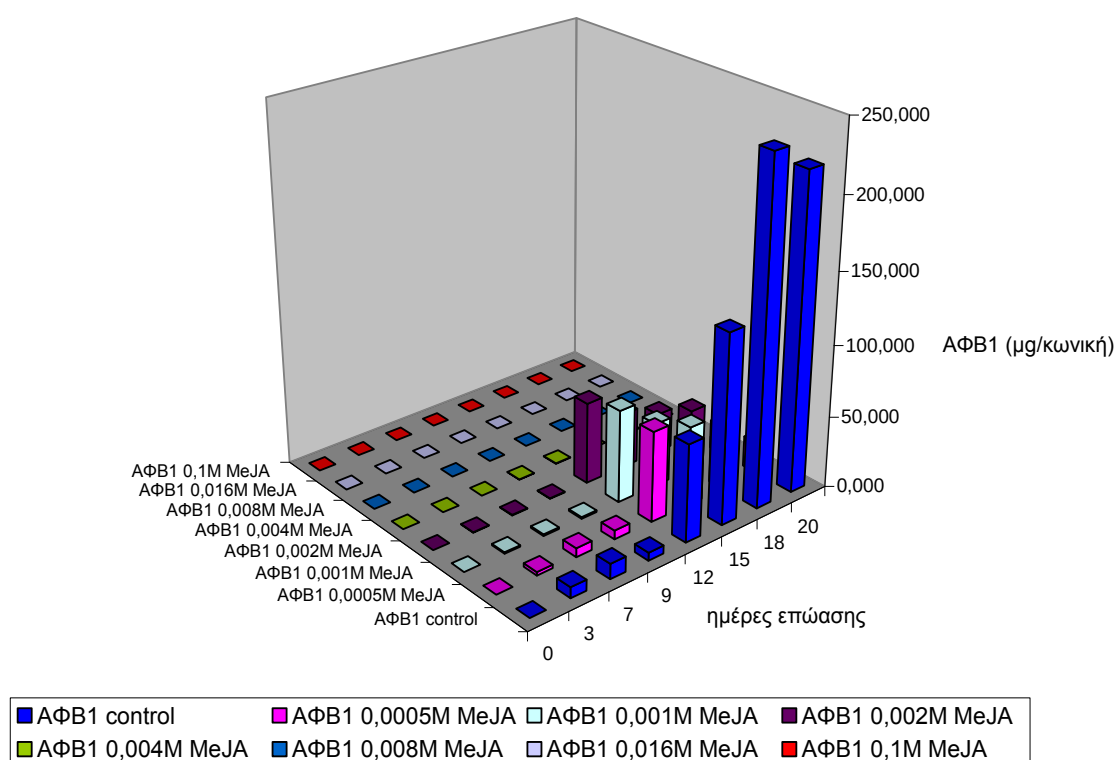
Σχήμα 8.5: Βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε δείγματα YES control και σε δείγματα YES με προσθήκη 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) για διάστημα 20 ημερών

Παρατηρώντας το διάγραμμα του σχήματος 8.4 διαπιστώνεται καταρχήν ότι σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, με ή χωρίς προσθήκη MeJA, η μέγιστη τιμή της μυκηλιακής μάζας παρουσιάζεται την 7^η ημέρα. Επιπλέον, ενώ σε καμία από τις περιπτώσεις προσθήκης MeJA δεν παρατηρείται διέγερση της μυκηλιακής ανάπτυξης έναντι των δειγμάτων control, στις συγκεντρώσεις 0,004M, 0,008M, 0,016M καθώς και 0,1M MeJA η μυκηλιακή ανάπτυξη είναι εμφανώς περιορισμένη. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι στα συγκεκριμένα αυτά δείγματα δεν υπήρχε εμφανής μακροσκοπικά μυκηλιακή ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της μυκηλιακής μάζας πάντως υποδεικνύουν ότι υπήρξε ανάπτυξη του *A. parasiticus*, η οποία όμως ήταν ελάχιστη, ώστε να μην γίνεται αντιληπτή με τη μορφή σχηματισμού μυκηλίου.

Η εικόνα που παρουσιάζει η πορεία της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ (σχήμα 8.5) επιβεβαιώνει καταρχήν τα συμπεράσματα των προηγούμενων πειραμάτων στο YES^[218], όπως επίσης και στα τρυβλία με το AFPA. Πιο αναλυτικά, προκειμένου να επικεντρωθούμε αποκλειστικά στην ανασταλτική δράση του MeJA στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁, επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις αρκετά μεγαλύτερες από 10^{-4} M, παρουσία της οποίας όπως αναφέρθηκε νωρίτερα^[218] υπάρχει διέγερση της παραγόμενης ΑΦΒ₁ - που κατά τη 12^η ημέρα είναι στατιστικά σημαντική -. Επιπλέον, η συγκριτική εικόνα που προέκυψε από το πείραμα στο AFPA τοποθετεί τη συγκέντρωση MeJA που μπορεί να προκαλέσει πλήρη αναστολή, στην περιοχή συγκεντρώσεων μεγαλύτερων από 10^{-3} M. Στο διάγραμμα του σχήματος 8.5 η ελάχιστη συγκέντρωση MeJA που φαίνεται να έχει πλήρη

ανασταλτική δράση στο φαινόμενο της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ είναι η συγκέντρωση 0,004M. Η διαπίστωση αυτή συμβαδίζει και με την εικόνα της μυκηλιακής ανάπτυξης που δείχνει ότι στα δείγματα που περιέχουν MeJA αυτής της συγκέντρωσης, καθώς και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτή, υπάρχει αναστολή της πορείας ανάπτυξης του *A.parasiticus* για όλο το διάστημα παρατήρησης.

Η ανασταλτική επίδραση των συγκεντρώσεων 0,004M, 0,008M, 0,016M και 0,1M MeJA στην παραγωγή ΑΦΒ₁ έναντι των δειγμάτων control απεικονίζεται και στο ακόλουθο τρισδιάστατο διάγραμμα στηλών.



Σχήμα 8.6: Βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε δείγματα YES control και σε δείγματα YES με προσθήκη 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) για διάστημα 20 ημερών

Η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στην ανάπτυξη του *A.parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ στο YES ολοκληρώνεται με τη στατιστική επεξεργασία που ακολουθεί και περιλαμβάνει την εφαρμογή της δοκιμασίας t-test για ζεύγη τιμών στο σύνολο των ημερών παρατήρησης, καθώς επίσης και την Ανάλυση Διακύμανσης για έναν παράγοντα (one-way ANOVA) (Παράρτημα Ι).

Αρχικά εξετάσθηκε η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στην ανάπτυξη του μύκητα. Προκειμένου να ελεγχθεί εάν σε κάθε περίπτωση προσθήκης MeJA η προκληθείσα αναστολή θεωρείται στατιστικά σημαντική, εφαρμόστηκε η δοκιμασία t-test για το σύνολο των ημερών παρατήρησης ανάμεσα στα δείγματα control και στα δείγματα με την εκάστοτε προσθήκη MeJA συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Η δοκιμασία t-test για ζεύγη τιμών εφαρμόζεται ως εξής: υποθέτουμε ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση, ότι δηλαδή δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών, υπολογίζουμε το $t_{πειρ}$ και στη συνέχεια συγκρίνουμε την τιμή αυτή με το $t_{θεωρ}$ για δεδομένους βαθμούς ελευθερίας (df) και στάθμη εμπιστοσύνης $p = 0,05$. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη στατιστική επεξεργασία.

Πίνακας 8.23: t-test για τις τιμές της μυκηλιακής μάζας ανάμεσα στα δείγματα YES control και στα δείγματα YES με προσθήκη 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA (εφαρμογή στο σύνολο των ημερών επώασης)

Δείγμα	Μυκηλιακή μάζα Μέσος όρος (mg/κωνική)	Τυπική απόκλιση SD	SD ²	df	$t_{πειρ}$	$t_{θεωρ}$
control	120,16	51,62	2.665,3316			
0,0005M MeJA	107,33	47,66	2.272,2916	7	4.85	2.365
0,001M MeJA	102,85	46,93	2.202,8482	7	5.50	2.365
0,002M MeJA	107,86	49,92	2.492,2400	7	2.81	2.365
0,004M MeJA	77,67	34,38	1.182,6046	7	6.77	2.365
0,008M MeJA	65,87	28,08	789,0048	7	6.42	2.365
0,016M MeJA	56,92	25,33	641,9047	7	6.73	2.365
0,1M MeJA	53,41	23,99	575,7585	7	6.73	2.365

Από τον πίνακα προκύπτει ότι η μηδενική υπόθεση δεν ισχύει για καμία περίπτωση προσθήκης MeJA αφού η τιμή $t_{πειρ}$ είναι μεγαλύτερη από την τιμή $t_{θεωρ}$ για

$df = n-1 = 7$ βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης $p = 0,05$. Επομένως, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της μυκηλιακής μάζας των δειγμάτων control και των δειγμάτων που περιέχουν MeJA για το σύνολο των ημερών.

Προκειμένου να γίνει επιπλέον και σύγκριση όλων των κατηγοριών δειγμάτων μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι η ύπαρξη ομοιογένειας των δειγμάτων. Για να ελεγχθεί η ομοιογένεια υπολογίζεται το $F_{\max}$ και συγκρίνεται με το F_{crit} που προκύπτει από πίνακες^[220] για αριθμό δειγμάτων 8 και βαθμούς ελευθερίας $df = 8-1 = 7$. Το $F_{\max}$ υπολογίζεται διαιρώντας τη μεγαλύτερη διακύμανση των δειγμάτων με τη μικρότερη. Έτσι λοιπόν από τους υπολογισμούς προκύπτει ότι $F_{\max} = 4.62$. Το $F_{\text{crit}} = 12.7$, επομένως $F_{\text{crit}} > F_{\max}$, οπότε η ομοιογένεια των διακυμάνσεων είναι εξασφαλισμένη και η Ανάλυση Διακύμανσης για έναν παράγοντα μπορεί να εφαρμοστεί. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας παρουσιάζονται στον πίνακα 8.20 που ακολουθεί.

Πίνακας 8.24: Αποτελέσματα δοκιμασίας one-way ANOVA για τη μυκηλιακή μάζα στα δείγματα YES control και στα δείγματα YES με προσθήκη 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA

Πηγή διακύμανσης	SS	df	s^2	$F_{\text{πειρ.}}$	$F_{\text{θεωρ.}}$
Between	38110,22	7	5444,31	3.396	2.166
Within	89753,89	56	1602,74		
Total	127864,11	63			

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, δεν ισχύει η μηδενική υπόθεση και επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, $F_{7,56} = 3.396$ $p < 0.05$.

Για το στατιστικό έλεγχο των αποτελεσμάτων της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στην αναστολή της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ εφαρμόστηκαν οι αντίστοιχες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και στη μυκηλιακή μάζα. Η δοκιμασία t-test για τα ζεύγη τιμών μεταξύ των δειγμάτων control και δειγμάτων με προσθήκη MeJA διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,0005M, 0,001M, 0,002M, 0,004M, 0,008M, 0,016M και 0,1M) έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Πίνακας 8.25: t-test για τις ποσότητες ΑΦΒ₁ ανάμεσα στα δείγματα YES control και στα δείγματα YES με προσθήκη 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA (εφαρμογή στο σύνολο των ημερών επώασης)

Δείγμα	ΑΦΒ ₁ Μέσος όρος (μg/κωνική)	Τυπική απόκλιση SD	SD ²	df	t _{πειρ.}	t _{θεωρ.}
control	85,034	99,143	9.829,3344			
0,0005M MeJA	21,854	22,688	514,7453	7	1.976	2.365
0,001M MeJA	20,470	24,472	598,8787	7	2.030	2.365
0,002M MeJA	17,886	21,635	468,0732	7	2.103	2.365
0,004M MeJA	0,066	0,128	0,0163	7	2.423	2.365
0,008M MeJA	0,001	0,0008	6,4·10 ⁻⁷	7	2.425	2.365
0,016M MeJA	0,001	0,0008	6,4·10 ⁻⁷	7	2.425	2.365
0,1M MeJA	0,001	0,0008	6,4·10 ⁻⁷	7	2.425	2.365

Τα αποτελέσματα που προέρχονται από τη δοκιμασία t-test επιβεβαιώνουν και στατιστικά τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τον πειραματικό προσδιορισμό της ΑΦΒ₁ στα εξεταζόμενα δείγματα. Η ανασταλτική επίδραση των συγκεντρώσεων 0,0005M, 0,001M και 0,002M MeJA στο φαινόμενο της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ δεν είναι στατιστικά σημαντική στο σύνολο των ημερών επώασης, κάτι που φαίνεται από τις αντίστοιχες τιμές t_{πειρ.}, οι οποίες είναι μικρότερες από την τιμή t_{θεωρ.} στις περιπτώσεις αυτές (t_{πειρ} (0,0005M MeJA) = 1.976 < t_{θεωρ} = 2.365, t_{πειρ} (0,001M MeJA) = 2.030 < t_{θεωρ} = 2.365, t_{πειρ} (0,002M MeJA) = 2.103 < t_{θεωρ} = 2.365 για n-1 = 7 βαθμούς ελευθερίας και p = 0,05). Εξετάζοντας όμως το χρονικό διάστημα από τη 15^η ημέρα και ύστερα, διαπιστώνεται ότι η αναστολή που προκύπτει από την παρουσία του MeJA στις συγκεντρώσεις αυτές (0,0005M, 0,001M και 0,002M) στην παραγόμενη ΑΦΒ₁ είναι στατιστικής σημασίας (πίνακας 8.26).

Πίνακας 8.26: t-test για τις ποσότητες ΑΦΒ₁ ανάμεσα στα δείγματα YES control και στα δείγματα YES με συγκέντρωση MeJA 0,0005M, 0,001M και 0,002M (εφαρμογή για τις ημέρες 15^η – 20^η)

Δείγμα	ΑΦΒ ₁ Μέσος όρος (μg/κωνική)	Τυπική απόκλιση SD	SD ²	df	t _{πειρ.}	t _{θεωρ.}
control	196,17	56,472	3.189,0867			
0,0005M MeJA	32,23	10,780	116,2084	2	4.363	4.303
0,001M MeJA	31,94	12,217	149,2551	2	4.306	4.303
0,002M MeJA	28,37	9,656	93,2383	2	4.500	4.303

Αντίθετα, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα κατά το σχολιασμό του σχήματος 8.5, στις συγκεντρώσεις 0,004M, 0,008M, 0,016M και 0,1M MeJA υπάρχει πλήρης αναστολή της παραγωγής της ΑΦΒ₁, η οποία είναι στατιστικά σημαντική για όλες τις ημέρες παρατήρησης σύμφωνα με τις τιμές $t_{\text{πειρ.}}$ που προσδιορίστηκαν. Από τη χρήση της Ανάλυσης Διακύμανσης για έναν παράγοντα προέκυψε ο ακόλουθος πίνακας δεδομένων.

Πίνακας 8.27: Αποτελέσματα δοκιμασίας one-way ANOVA για τις ποσότητες ΑΦΒ₁ στα δείγματα YES control και στα δείγματα YES με προσθήκη 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA

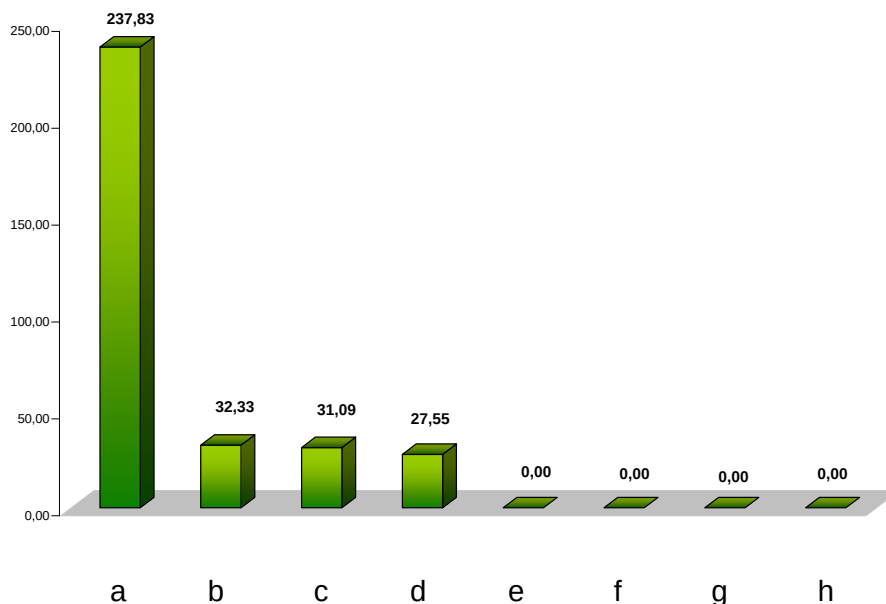
Πηγή διακύμανσης	SS	df	s^2	$F_{\text{πειρ.}}$	$F_{\text{θεωρ.}}$
Between	46462,33	7	6637,47	4.653	2.166
Within	79878,72	56	1426,40		
Total	126341,06	63			

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, δεν ισχύει η μηδενική υπόθεση και επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, $F_{7,56} = 4.653$ $p < 0.05$.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων τη 18^η ημέρα, κατά την οποία - σύμφωνα με το στατιστικό έλεγχο που εφαρμόστηκε μέσω της δοκιμασίας t-test - υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις ποσότητες της παραγόμενης ΑΦΒ₁ και κατά την οποία ταυτόχρονα εμφανίζεται και η μέγιστη ποσότητα ΑΦΒ₁ για τα δείγματα control, διαπιστώνουμε τα εξής ποσοστά (%) αναστολής από τις διάφορες συγκεντρώσεις MeJA.

Πίνακας 8.28: Αναστολή (%) της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ από το μύκητα *A.parasiticus* από την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA σε σύγκριση με τα δείγματα control τη 18^η ημέρα επώασης

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΕJA MG ΚΩΝΙΚΗ ⁻¹	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΦΒ ₁ MG ΚΩΝΙΚΗ ⁻¹	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ
0	237,83	-
1,134 (0,0005M)	32,33	86,41
2,267 (0,001M)	31,09	86,93
4,534 (0,002M)	27,55	88,42
9,067 (0,004M)	ND	99,99
18,134 (0,008M)	ND	99,99
36,267 (0,016M)	ND	99,99
226,67 (0,1M)	ND	99,99



Σχήμα 8.7: Σύγκριση των ποσοτήτων ($\mu\text{g} \cdot \kappa\omega\nu\iota\kappa\eta^{-1}$) της παραγόμενης ΑΦΒ₁ από το μύκητα *A.parasiticus* τη 18^η ημέρα επώασης σε δείγματα YES διαφορετικής συγκέντρωσης MeJA και δείγματα YES control

a: δείγματα control

b: δείγματα με προσθήκη 1,134 mg MeJA (0,0005M MeJA /κωνική)

c: δείγματα με προσθήκη 2,267 mg MeJA (0,001M MeJA /κωνική)

d: δείγματα με προσθήκη 4,534 mg MeJA (0,002M MeJA /κωνική)

e: δείγματα με προσθήκη 9,067 mg MeJA (0,004M MeJA /κωνική)

f: δείγματα με προσθήκη 18,134 mg MeJA (0,008M MeJA /κωνική)

g: δείγματα με προσθήκη 36,267 mg MeJA (0,016M MeJA /κωνική)

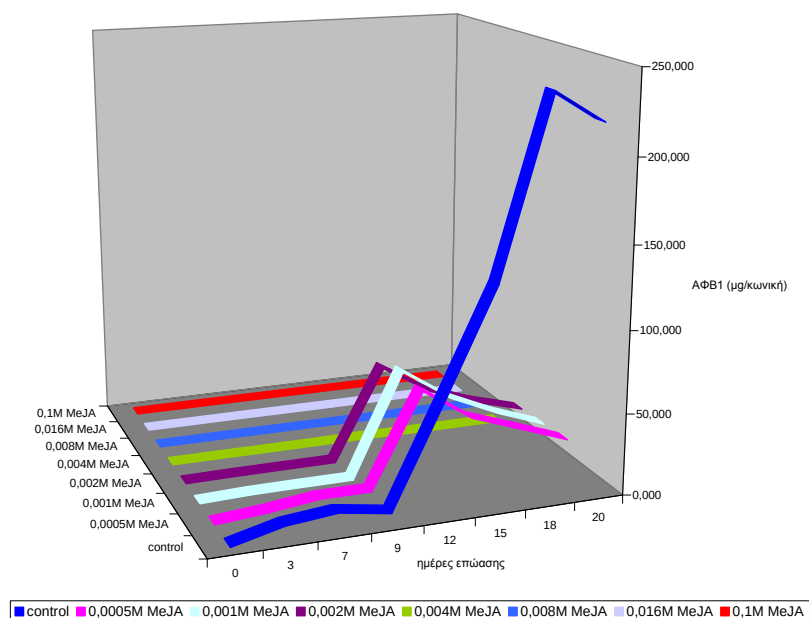
h: δείγματα με προσθήκη 226,67 mg MeJA (0,1M MeJA /κωνική)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων του μεθυλιασμονικού οξέος στη μυκηλιακή ανάπτυξη του *A.parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ στο YES οδήγησε στα κάτωθι συμπεράσματα.

- Η παρουσία του MeJA στις εμβολιασμένες καλλιέργειες του θρεπτικού υλικού YES επηρεάζει ποικιλοτρόπως το σύστημα του *A.parasiticus* ανάλογα με τη συγκέντρωση του φυτικού αυτού ρυθμιστικού παράγοντα στο δείγμα που εξετάζεται. Σε κάθε περίπτωση η επίδραση στη μυκηλιακή ανάπτυξη και στην παραγωγή της ΑΦΒ₁ είναι αντίστοιχες, σε αντίθεση με άλλους αντιαφλατοξινογόνους παράγοντες, παρουσία των οποίων παρατηρείται επίδραση μόνο στην παραγωγή της τοξίνης.

- ▶ Η προσθήκη MeJA στη μικρότερη ποσότητα από όλες συνολικά μελετήθηκαν (0,0022 mg) προκαλεί στατιστικά σημαντική διέγερση στην παραγωγή της μυκηλιακής μάζας στο σύνολο των ημερών επώασης και διέγερση στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁, η οποία είναι στατιστικά σημαντική κατά τη 12^η ημέρα επώασης (σε ποσοστό 212,8%), οπότε και εντοπίζεται η μέγιστη ποσότητα ΑΦΒ₁ του συγκεκριμένου δείγματος.
- ▶ Η αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση MeJA σε δείγμα YES που εξετάσθηκε (10^{-4} M) αύξησε το ρυθμό της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ σε μικρότερο όμως ποσοστό (141,6%) χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη.
- ▶ Στα πλαίσια της μελέτης του φαινομένου της αναστολής της παραγωγής ΑΦΒ₁ από το μύκητα, που συγκεντρώνει και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, χρησιμοποιήθηκαν 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις MeJA, οι οποίες σύμφωνα με τα αποτελέσματα της επίδρασης που παρουσίασαν μπορούν να χωριστούν σε 2 κατηγορίες (σχήμα 8.8). Στην 1^η κατηγορία περιλαμβάνονται οι συγκεντρώσεις 0,0005M, 0,001M και 0,002M MeJA, οι οποίες σε όλο το διάστημα επώασης των 20 ημερών προκαλούν μείωση της παραγωγής της ΑΦΒ₁, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική στο σύνολο των ημερών. Η αναστολή που προκαλούν γίνεται στατιστικά σημαντική μετά τη 15^η ημέρα επώασης, χρονικό διάστημα, κατά το οποίο η ποσότητα της παραγόμενης τοξίνης στα δείγματα control αυξάνει δραματικά. Η 2^η κατηγορία περιλαμβάνει τις συγκεντρώσεις 0,004M, 0,008M, 0,016M και 0,1M MeJA, οι οποίες προκαλούν πλήρη αναστολή στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις η αναστολή είναι στατιστικά σημαντική στο σύνολο των ημερών παρατήρησης.
- ▶ Επιπλέον, η αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης που παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις προσθήκης MeJA αν και διαφέρει ως προς το βαθμό αναστολής (μεγαλύτερη συγκέντρωση MeJA προκαλεί και μεγαλύτερη μείωση της ανάπτυξης), είναι σε όλα τα δείγματα στατιστικής σημασίας.
- ▶ Από την προηγούμενη έρευνα ^[218] είχε προκύψει ότι η συγκέντρωση 10^{-2} M MeJA - η οποία αντιστοιχεί σε 22,667 mg MeJA/10 mL YES - προκαλεί πλήρη αναστολή της παραγωγής της ΑΦΒ₁. Η πιο πρόσφατη μελέτη που κινήθηκε σε ένα αναλυτικότερο φάσμα γύρω από αυτήν τη συγκέντρωση έδειξε ότι τελικά απαιτείται μία αρκετά μικρότερη ποσότητα MeJA (9,067 mg/10 mL YES αντίστοιχα) για να επιτευχθεί πλήρης αναστολή στο φαινόμενο της βιοσύνθεσης υπό τις δεδομένες συνθήκες του εργαστηρίου μας.



Σχήμα 8.8: Καμπύλες βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ για τα δείγματα YES control και τα δείγματα YES διαφορετικής συγκέντρωσης MEJA για διάστημα 20 ημερών

- Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι από σύγκριση που έγινε μεταξύ των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου πειράματος έως τη 14^η ημέρα επώασης με τα αποτελέσματα άλλων μελών της εργαστηριακής μας ομάδας που πραγματοποίησαν το ίδιο πείραμα για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα (14 ημέρες επώασης) στο παρελθόν,^[219] διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή της ΑΦΒ₁ είναι επαναλήψιμη. Το γεγονός ότι μεταξύ των εν λόγω πειραμάτων μεσολαβεί ένα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, επικυρώνει την επιλογή του *A.parasiticus*, ο οποίος σύμφωνα με το Yu^[65] εμφανίζει σταθερή συμπεριφορά όσον αφορά την παραγωγή ΑΦΒ₁ και για το λόγο αυτό προτιμάται έναντι του *A.flavus*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Β₁ ΣΤΗΝ ΚΑΠΠΑΡΗ

9.1 Χαρακτηριστικά ποιότητας μεθόδου

9.1.1 Καμπύλες αναφοράς

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς μιας ημέρας

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς μιας ημέρας και τον έλεγχο της, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα ΑΦΒ₁. Σε σκουρόχρωμα φιαλίδια των 4 mL προστέθηκαν 1,0, 2,0, 2,5, 5,0 και 10,0 ng ΑΦΒ₁ και αραιώθηκαν με 1000 μL μίγματος $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}_{(\text{HPLC})}$ αναλογίας 1:9. Από κάθε ένα από τα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκαν δύο ενέσεις όγκου 40 μL στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), όπου ελήφθησαν τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα εντός της ίδιας εργαστηριακής ημέρας. Ο ακόλουθος πίνακας αποτυπώνει τα δεδομένα των χρωματογραφημάτων.

Πίνακας 9.1: Δεδομένα κατασκευής καμπύλης αναφοράς μιας ημέρας

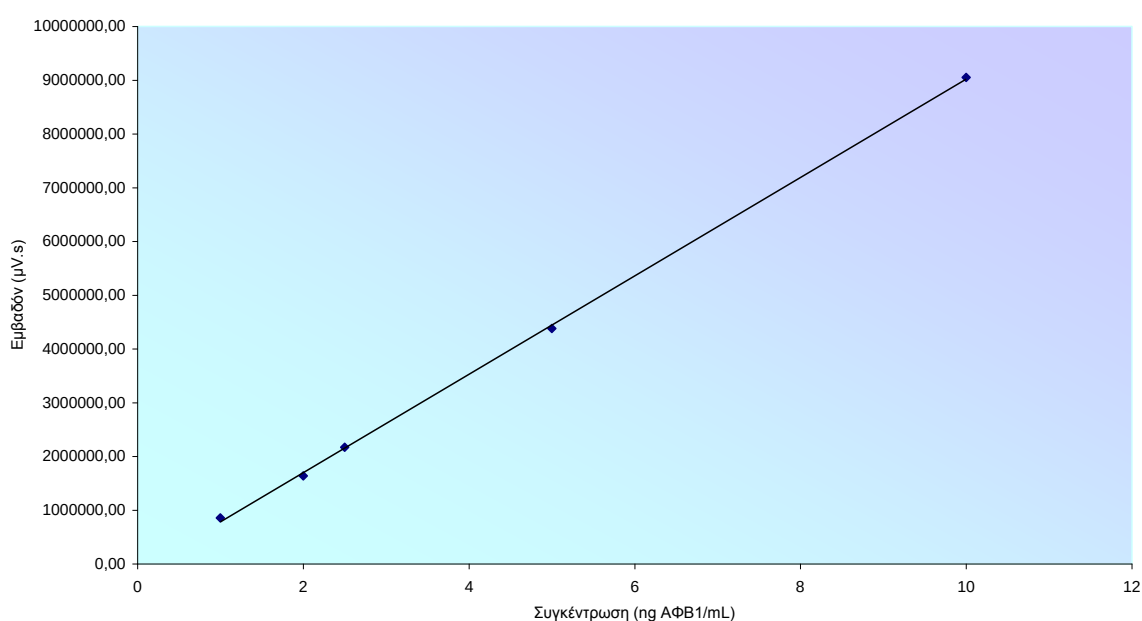
	C _{ΑΦΒ1} (ng mL ⁻¹)	Ποσότητα ΑΦΒ ₁ (ng) που περιέχεται στα 40 μL	Μέσος όρος εμβαδών	Τυπική απόκλιση SD	Σχετική τυπική απόκλιση RSD%
D ₅	1	0,04	855779,45	29581,88	3,46
D ₄	2	0,08	1636632,30	53375,67	3,26
D ₃	2,5	0,1	2169787,15	5103,26	0,24
D ₂	5	0,2	4378956,30	103787,29	2,37
D ₁	10	0,4	9052622,80	34423,66	0,38

Με βάση τα δεδομένα του συγκεκριμένου πίνακα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς μιας ημέρας, ενώ με επεξεργασία τους στο πρόγραμμα Origin 8.0 υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας:

$$y = -1,34 (\pm 0,50) \cdot 10^5 + 9,15 (\pm 0,09) \cdot 10^5 x$$

$$R = 0,9998$$

Όπου x = ποσότητα της ΑΦΒ₁ που περιέχεται σε 40 μL (που ισοδυναμεί με τον όγκο έγχυσης).



Σχήμα 9.1: Καμπύλη αναφοράς μιας ημέρας

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος

Η καμπύλη βαθμονόμησης για το σύνολο των πειραμάτων προσδιορίζει τη γραμμικότητα της μεθόδου και υπολογίζεται από τους μέσους όρους των εμβασών των προτύπων διαλυμάτων που ελήφθησαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στον πίνακα που ακολουθεί περιλαμβάνονται τα δεδομένα του συνόλου των χρωματογραφημάτων των προτύπων αυτών, βάσει του οποίου κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς για όλη τη διάρκεια του πειράματος.

**Πίνακας 9.2: Δεδομένα κατασκευής καμπύλης αναφοράς για
όλη τη διάρκεια του πειράματος**

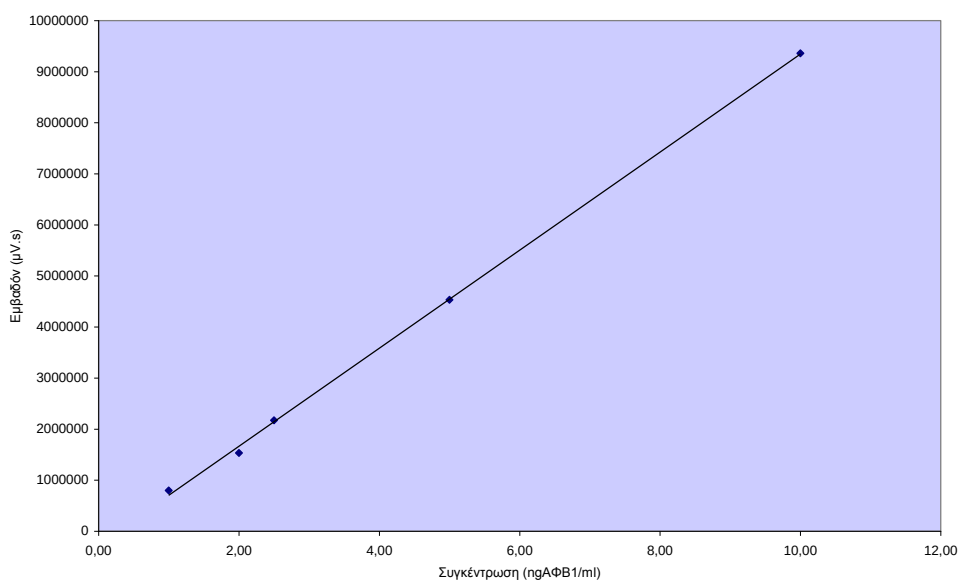
C _{AΦB1} (ng mL ⁻¹)	1	2	2,5	5	10
Όγκος έγχυσης (μL)	40	40	40	40	40
Ποσότητα ΑΦB ₁ (ng)	0,04	0,08	0,1	0,2	0,4
Μέσος όρος εμβαδών	798813,35	1533565,40	2172898,16	4533658,22	9358882,74
Τυπική απόκλιση SD	80562,24	145758,61	4399,63	218781,55	433116,96
Σχετική τυπική απόκλιση RSD%	10,09	9,50	0,20	4,83	4,63

Με επεξεργασία στο πρόγραμμα Origin 8.0 υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας:

$$y = -2,57 (\pm 0,69) \cdot 10^5 + 9,6 (\pm 0,13) \cdot 10^5 x$$

$$R = 0,9997$$

Όπου x = ποσότητα της ΑΦB₁ που περιέχεται σε 40 μL (που ισοδυναμεί με τον όγκο έγχυσης).



Σχήμα 9.2: Καμπύλη αναφοράς για το σύνολο των πειραμάτων

9.1.2 Ακρίβεια μεθόδου

Σαν ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου, θεωρείται η εγγύτητα μεταξύ των μέσων τιμών των αποτελεσμάτων μιας παραμέτρου που προήλθαν από μια μεγάλη σειρά μετρήσεων και μιας συμφωνημένης τιμής αναφοράς.

Ο έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου εξετάστηκε μετά από την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων πρότυπης ΑΦΒ₁ σε δείγματα κάππαρης και προσδιορισμό των ποσοτήτων που ανακτήθηκαν μετά την ανάλυση προσδιορισμού του δείγματος.

Κατά την προσθήκη χρησιμοποιήθηκαν πέντε επίπεδα χαμηλών συγκεντρώσεων πρότυπης ΑΦΒ₁: 2 ng g⁻¹, 5 ng g⁻¹, 10 ng g⁻¹, 15 ng g⁻¹ και 20 ng g⁻¹. Για τον έλεγχο της ανάκτησης της μεθόδου στις χαμηλές συγκεντρώσεις ζυγίστηκαν δείγματα κάππαρης των 15 g και σε αυτά προστέθηκαν ποσότητες 30 ng, 75 ng, 150 ng, 225 ng και 300 ng ΑΦΒ₁ δίνοντας τελικές συγκεντρώσεις στα δείγματα 2 ng g⁻¹, 5 ng g⁻¹, 10 ng g⁻¹, 15 ng g⁻¹ και 20 ng g⁻¹ αντίστοιχα. Τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά αφού είχε προηγηθεί προσθήκη 30 mL διαλύτη εκχύλισης που είναι ένα μίγμα CH₃OH:H₂O, 80:20 v/v. Ακολούθησε διήθηση και παραλαβή 1 mL διηθήματος. Στον έλεγχο χρησιμοποιήθηκε και ένα δείγμα κάππαρης ως τυφλό για την καλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Η πειραματική πορεία που οδήγησε στην παραλαβή της ΑΦΒ₁, την παραγωγή-ποίηση και τον προσδιορισμό της με τη μέθοδο της HPLC, περιγράφονται στις §6.6.3, §6.6.5 και §6.13.

Οι πίνακες 9.3 και 9.4 περιέχουν τα αποτελέσματα των σχετικών μετρήσεων. Στο τυφλό δείγμα δε βρέθηκε ΑΦΒ₁.

Πίνακας 9.3: Ανακτήσεις της ΑΦΒ₁ (ng · g⁻¹) των επιμολυσμένων δειγμάτων κάππαρης σύμφωνα με τη μέθοδο

Δείγμα	Συγκεντρώσεις ΑΦΒ ₁ σε (ng g ⁻¹) που προστέθηκαν στα δείγματα της κάππαρης				
	2	5	10	15	20
	Συγκεντρώσεις ΑΦΒ ₁ σε (ng g ⁻¹) που ανακτήθηκαν				
1	1,82	4,45	8,14	12,91	16,90
2	1,87	4,48	7,90	12,98	14,96
3	1,88	4,50	7,75	12,47	16,70
4	1,81	4,52	8,25	12,24	15,44
Μέσος όρος	1,85	4,49	8,01	12,65	16,00
Τυπική απόκλιση SD	0,04	0,03	0,23	0,35	0,95
% Σχετική τυπική απόκλιση (%RSD)	1,90	0,66	2,83	2,80	5,92
Εύρος	0,07	0,07	0,5	0,74	1,94

Πίνακας 9.4: Ποσοστά % των ανακτήσεων των επιμολυσμένων δειγμάτων κάππαρης όπως αυτά προέκυψαν από τη μέθοδο

Δείγμα	Συγκεντρώσεις ΑΦΒ ₁ σε (ng g ⁻¹) που προστέθηκαν στα δείγματα της κάππαρης				
	2	5	10	15	20
	Ποσοστά % ΑΦΒ ₁ που ανακτήθηκαν				
1	91,00	89,00	81,40	86,07	84,50
2	93,50	89,60	79,00	86,54	74,80
3	94,00	90,00	77,50	83,14	83,50
4	90,50	90,40	82,50	81,60	77,20
Μέσος όρος	92,25	89,75	80,10	84,34	80,00
Τυπική απόκλιση SD	1,76	0,60	2,27	2,37	4,74
% Σχετική τυπική απόκλιση (%RSD)	1,90	0,67	2,83	2,80	5,93
Εύρος	3,50	1,40	5,00	4,94	9,70

Πίνακας 9.5: Συγκεντρωτικός πίνακας και στατιστική ανάλυση της μεθόδου

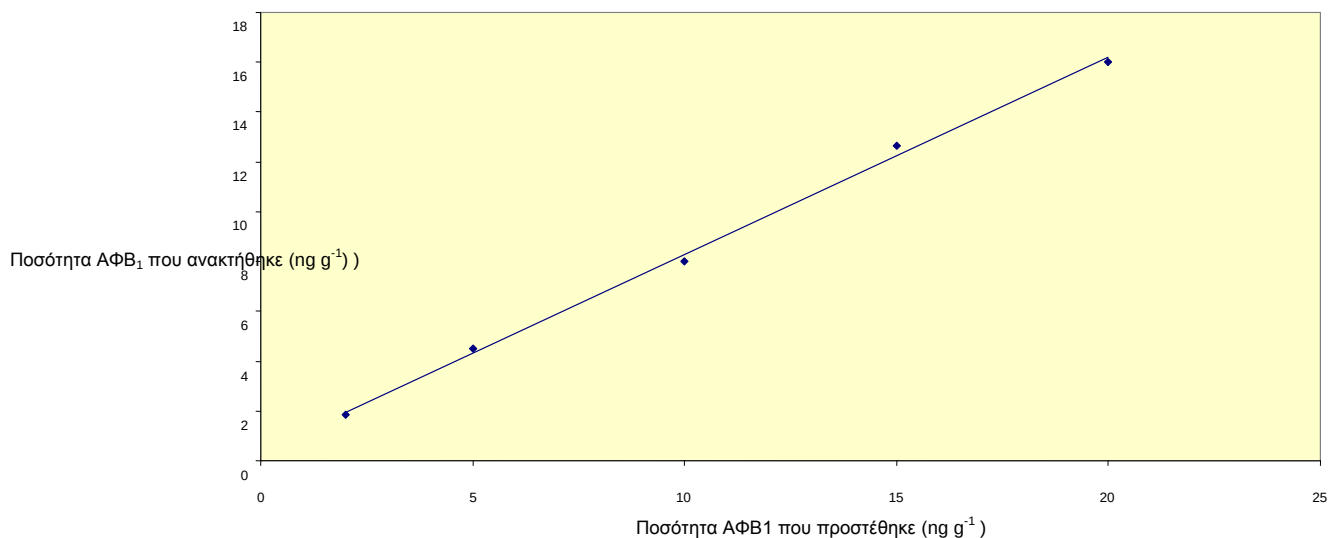
Υπολογισμός επί των % ποσοστών	
Παράμετρος	Τιμές
Αριθμός δειγμάτων	20
Μέσος όρος ανακτήσεων	85,29%
Τυπική απόκλιση των μέσων όρων	5,57
% Σχετική τυπική απόκλιση (%RSD)	6,53%
Ελάχιστη τιμή	74,80
Μέγιστη τιμή	94,00
Εύρος	19,20

Η κατασκευή της ευθείας παλινδρόμησης για τις ποσότητες ΑΦΒ₁ που προστέθηκαν στα δείγματα κάππαρης σε σχέση με τις ποσότητες ΑΦΒ₁ που ανακτήθηκαν αντίστοιχα, ολοκληρώνει την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του ελέγχου της ανάκτησης. Η ευθεία κατασκευάζεται τοποθετώντας στον άξονα των x τις τιμές των ποσοτήτων που προστέθηκαν σε ng g^{-1} , ενώ στον άξονα των y τοποθετούνται οι μέσοι όροι των τιμών της ΑΦΒ₁ που ανακτήθηκαν για το κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων (δεδομένα Πίνακα 9.3). Με την επεξεργασία των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα Origin 8.0 υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης (σχήμα 9.3):

$$y = 0,36 (\pm 0,27) + 0,79 (\pm 0,02) x$$

$$R = 0,9984$$

Όπου x = ποσότητα ΑΦΒ₁ (ng g^{-1}) που προστέθηκε.



Σχήμα 9.3: Ευθεία παλινδρόμησης για τον έλεγχο της ανάκτησης της μεθόδου για την ΑΦΒ₁

9.1.3 Αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου – Συζήτηση

Η μέθοδος που περιγράφηκε ελέγχθηκε ως προς την ανάκτησή της για μία σειρά χαμηλών συγκεντρώσεων επιμόλυνσης με Αφλατοξίνη Β₁, όπως παρουσιάστηκε στους Πίνακες 9.3 και 9.4.

Τα επί τοις εκατό ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 74,8 και 94% και κρίνονται ικανοποιητικά. Σε ό,τι αφορά τα ποσοστά των επί τοις εκατό σχετικών τυπικών αποκλίσεων (%RSD) των ποσοστών ανάκτησης σε κάθε επίπεδο συγκεντρώσεως, κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 0,67-5,93% και κρίνονται επίσης ικανοποιητικά.

Η ανάκτηση της μεθόδου, όπως αυτή φαίνεται στην εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης, για τον έλεγχο της ανάκτησης της μεθόδου αναφορικά με την ΑΦΒ₁, ισούται με 79% και κρίνεται ικανοποιητική, καθώς βρίσκεται εντός των θεσμοθετημένων ορίων που τίθενται για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΑΦΒ₁ στα τρόφιμα.^[221]

Για την ευθεία παλινδρόμησης διαπιστώνεται ότι υπάρχει πολύ καλή γραμμικότητα ($R = 0,9984$). Παρ' όλα αυτά η ευθεία θα πρέπει να ελεγχθεί ως προς την απόκλιση της από την ιδανική ευθεία, η μορφή της οποίας είναι $y=x+0$, που σημαίνει πως ανακτάται όση ποσότητα Αφλατοξίνης Β₁ προστίθεται.

9.1.4 FISHER TEST

Οι ορισμοί, η περιγραφή των συμβόλων και οι φόρμουλες των μαθηματικών τύπων που χρησιμοποιήθηκαν στις ακόλουθες στατιστικές επεξεργασίες παρατίθενται αναλυτικά στο Παράρτημα Ι της διατριβής.

Στην παρούσα εργασία η εύρεση του συντελεστή Fisher για τα δεδομένα του Πίνακα 9.3 πραγματοποιήθηκε με βάση το γαλλικό πρότυπο μεθόδων ποσοτικής ανάλυσης (AFNOR,1993) και για την εφαρμογή του χρησιμοποιήθηκε το Λογιστικό Φύλλο Microsoft® EXCEL – 2000 (έκδοση 9/0/3007).

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές των μαθηματικών σχέσεων που οδηγούν στην τιμή του Fisher test γραμμικότητας, καθώς και τα όρια εντός των οποίων η τιμή του Fisher test θεωρείται αποδεκτή, ώστε κατ' επέκταση να γίνει αποδεκτό το μοντέλο παλινδρόμησης για δεδομένους βαθμούς ελευθερίας και ποσοστό αβεβαιότητας 0.1%. Τα δεδομένα, με τα οποία υπολογίζονται οι ακόλουθες τιμές (Πίνακας 9.6) λαμβάνονται από τον Πίνακα 9.3.

Πίνακας 9.6: Τεστ γραμμικότητας

Πηγές απόκλισης	Βαθμοί ελευθερίας	DEVSQ	Τιμές διακύμανσης	Fisher F	Κρίσιμες τιμές (όρια)
Regression	1	534,94	534,94	$F_1=1258,38$	16,59
Lack-of-fit	3	1,27	0,42	$F_2=1,97$	9,33
Pure error	$5 \times (4-1)=15$	3,23	0,21		
Total error	19	539,44			

Για την αποδοχή ή μη του μοντέλου συγκρίνονται οι τιμές Fisher (F_1 , F_2) που προέκυψαν με τα αντίστοιχα όρια. Προκειμένου το μοντέλο να είναι αποδεκτό, θα πρέπει να ισχύουν τα εξής:

- ▶ Πρέπει η τιμή F_1 να είναι μεγαλύτερη από την τιμή της αντίστοιχης κρίσιμης τιμής $F_{INV}(1, 15, 0,999)$. Όπως διαπιστώνεται, $1258,38 > 16,59$, επομένως το μοντέλο παλινδρόμησης γίνεται δεκτό για αβεβαιότητα 0.1% και βαθμούς ελευθερίας 1 και 15.
- ▶ Πρέπει η τιμή F_2 να είναι μικρότερη από την τιμή της αντίστοιχης κρίσιμης τιμής $F_{INV}(3, 15, 0,999)$. Όπως διαπιστώνεται, $1,97 < 9,33$ και επομένως για αβεβαιότητα 0.1% και βαθμούς ελευθερίας 3 και 15, το πεδίο γραμμικότητας που επιλέχθηκε μπορεί να γίνει αποδεκτό με στατιστική ασφάλεια.

9.1.5 Επαναληψιμότητα

Ο έλεγχος της επαναληψιμότητας στην παρούσα μέθοδο πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό του ποσοστού ανάκτησης της ΑΦΒ₁, σε 5 δείγματα κάππαρης, στα οποία είχαν προστεθεί 100 ng πρότυπης ΑΦΒ₁. Η πειραματική διαδικασία και ο προσδιορισμός έγιναν υπό τις ίδιες συνθήκες και εντός της ίδιας ημέρας. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 9.7: Αποτελέσματα και στατιστική επεξεργασία για την επαναληψιμότητα

Αριθμός δείγματος	Ανάκτηση σε ΑΦΒ ₁ (ng g ⁻¹)	% Ποσοστό ανάκτησης
1	88,18	88,18
2	101,58	101,58
3	94,16	94,16
4	103,04	103,04
5	99,86	99,86
Μέσος όρος	97,36	97,36
Τυπική απόκλιση (S.D.)	6,14	6,14
% Σχετική τυπική απόκλιση (% RSD)	6,31	6,31
Όριο επαναληψιμότητας $r = 2,8 \times s_r$	17,19	17,19

Με βάση το όριο επαναληψιμότητας (17,19) και τη % σχετική τυπική απόκλιση (6,31%) διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι επαναλήψιμα και ο βαθμός επαναληψιμότητας της μεθόδου αρκετά ικανοποιητικός.

9.1.6 Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Για τον έλεγχο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν σε διαφορετικές ημερομηνίες δείγματα που προέκυψαν από την προσθήκη ΑΦΒ₁ σε κάππαρη. Να σημειωθεί πως σε όλα τα πειράματα που έγιναν (επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας) συμπεριλήφθησαν και τυφλά δείγματα, στα οποία δε βρέθηκε ΑΦΒ₁. Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται τα σχετικά αποτελέσματα.

Πίνακας 9.8: Αποτελέσματα και στατιστική επεξεργασία για την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Ημερομηνία Ανάλυσης	Ανάκτηση (ng g ⁻¹)	% Ποσοστό ανάκτησης
1.2.2009	101,58	101,58
10.2.2010	94,16	94,16
1.3.2009	103,04	103,04
15.4.2009	91,07	91,07
2.5.2009	93,59	93,59
15.5.2009	89,81	89,81
% Μέσος όρος	95,54	95,54
Τυπική απόκλιση (S.D.)	5,50	5,50
% Σχετική τυπική απόκλιση (% R.S.D.)	5,76	5,76
Όριο αναπαραγωγιμότητας $R = 2,8 \times S_R$	15,40	15,40

Με βάση το όριο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (15,40) και την % σχετική τυπική απόκλιση (5,76%) διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι επαναλήψιμα και ο βαθμός αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου είναι αρκετά ικανοποιητικός.

9.1.7 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης υπολογισμένα σύμφωνα με το στατιστικό τύπο του γαλλικού προτύπου για τις ποσοτικές αναλύσεις (AFNOR,1993).

$$\text{Χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι: } DL = \frac{b_0 + 3 \times s(b_0)}{b_1} \text{ και } QL = \frac{b_0 + 10 \times s(b_0)}{b_1}$$

Πίνακας 9.9: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης υπολογισμένα με το στατιστικό τύπο

Όριο ανίχνευσης της μεθόδου	DL = 0,08 ng g ⁻¹
Όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου	QL = 0,21 ng g ⁻¹

Στον ακόλουθο πίνακα παρατίθενται το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της σχέσης σήματος δείγματος ελάχιστης ποσότητας ως προς το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος, για την οποία ισχύει η σχέση

$$3/1 \left(\frac{Signal}{Noise} = \frac{3}{1} \right) \text{ για το DL και } 6/1 \left(\frac{Signal}{Noise} = \frac{6}{1} \right) \text{ για το QL.}$$

Πίνακας 9.10: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης με βάση τις σχέσεις 3/1 και 6/1

Όριο ανίχνευσης της μεθόδου	DL = 0,06 ng g ⁻¹
Όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου	QL = 0,12 ng g ⁻¹

Ο πρώτος τρόπος υπολογισμού του ορίου ανίχνευσης, όπως επίσης και του ορίου ποσοτικοποίησης, είναι στατιστικά περισσότερο αποδεκτός αν και ο δεύτερος τρόπος χρησιμοποιείται αρκετά συχνά στη βιβλιογραφία. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο δεύτερος τρόπος, καθώς οι υπολογισμένες τιμές για τα όρια είναι μικρότερες και κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν, ίχνη της επικίνδυνης αυτής τοξίνης να ενταχθούν στα θετικά δείγματα.

9.2 Αξιολόγηση της μεθόδου - Συζήτηση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο που περιγράφηκε για τον προσδιορισμό της Αφλατοξίνης B₁ στην κάππαρη, την τοποθετούν ανάμεσα στις μεθόδους που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις ρουτίνας για τον επίσημο έλεγχο της κάππαρης ως προς την περιεκτικότητά της σε ΑΦΒ₁ αφού πληρεί τα θεσμοθετημένα χαρακτηριστικά απόδοσης. Επίσης τόσο το όριο ανίχνευσης (0,06 ng g⁻¹) όσο και το όριο ποσοτικοποίησης (0,12 ng g⁻¹) της μεθόδου είναι πολύ χαμηλότερα από τα όρια που επιβάλλει η νομοθεσία όσον αφορά στην περιεκτικότητα των τροφίμων σε ΑΦΒ₁.

Τέλος, το ποσοστό ανάκτησης (79%), η επαναληψιμότητα (r =17,19) και η αναπαραγωγιμότητα (R = 15,40) της μεθόδου κρίνονται αρκετά ικανοποιητικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΘΥΛΙΑΣΜΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (MeJA) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *ASPERGILLUS PARASITICUS* ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B₁ ΣΤΗΝ ΚΑΠΠΑΡΗ

10.1 Γενικά

Το φαινόμενο της αναστολής της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ από το MeJA στο YES παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς ανοίγει προοπτικές για πιθανές του εφαρμογές και στα τρόφιμα. Έτσι, λοιπόν, προκειμένου να ελεγχθεί αν τα αποτελέσματα από τη μελέτη στο YES μπορούν να εφαρμοσθούν και πέρα από τα θρεπτικά υλικά, επιλέχθηκε ένα φυτικό βρώσιμο προϊόν ελληνικής προέλευσης, όπως είναι η κάππαρη, ως υπόστρωμα για τη μελέτη της επίδρασης του MeJA στην ανάπτυξη του *A. parasiticus* και στην παραγωγή της ΑΦΒ₁.

Στην προκειμένη περίπτωση η επιλογή των συγκεντρώσεων MeJA έγινε με στόχο την κάλυψη ενός ευρέως φάσματος συγκεντρώσεων, καθώς σε αντίθεση με το YES, η κάππαρη αποτελεί ένα σύνθετο σύστημα πολύπλοκης σύστασης, όπου υπεισέρχονται παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το φαινόμενο της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών. Ανάμεσα στις 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις MeJA ($10^{-1}M$, $10^{-2}M$, $10^{-3}M$, $10^{-4}M$ και $10^{-6}M$) περιλαμβάνονται συγκεντρώσεις που προκάλεσαν τόσο διέγερση ($10^{-4}M$, $10^{-6}M$) όσο και αναστολή ($10^{-1}M$, $10^{-2}M$, $10^{-3}M$) στην παραγωγή της ΑΦΒ₁ στο YES. Κατ'αυτόν τον τρόπο μας δίνεται η ευκαιρία να διαπιστώσουμε αν οι ίδιες συγκεντρώσεις MeJA έχουν αντίστοιχη επίδραση σε διαφορετικά υποστρώματα στην ανάπτυξη του *A. parasiticus* και στην παραγωγή της ΑΦΒ₁.

Η επίδραση της παρουσίας διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA στην κάππαρη μελετήθηκε για διάστημα 15 ημερών - 0^η, 3^η, 7^η, 9^η, 12^η και 15^η ημέρα - . Για κάθε ημέρα παρατήρησης υπολογίζεται η παραγόμενη ποσότητα ΑΦΒ₁ από τον *A. parasiticus*, όπως επίσης και η μυκηλιακή ανάπτυξη σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος (κεφάλαιο 7.3.2, πίνακας 7.3). Η κάππαρη που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για τα συγκεκριμένα πειράματα ήταν φρέσκια ολόκληρη κάππαρη (με μπουμπούκια, φύλλα και μίσχους) από τη Σύρο.

10.2 Μελέτη της ανάπτυξης του μύκητα *A. parasiticus* και της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ σε δείγματα control

Ως δείγματα control χαρακτηρίζονται τα δείγματα κάππαρης που περιέχουν 10^2 κονίδια του μύκητα *A. parasiticus* και απόλυτη αιθανόλη. Αντίστοιχα με τα πειράματα στο YES και στο συγκεκριμένο πείραμα παράλληλα με τα δείγματα, στα οποία προστέθηκε

MeJA διαφορετικών συγκεντρώσεων, προσδιορίστηκε η μυκηλιακή ανάπτυξη και η παραγόμενη ΑΦΒ₁ σε δείγματα κάππαρης control για ένα χρονικό διάστημα 25 ημερών.

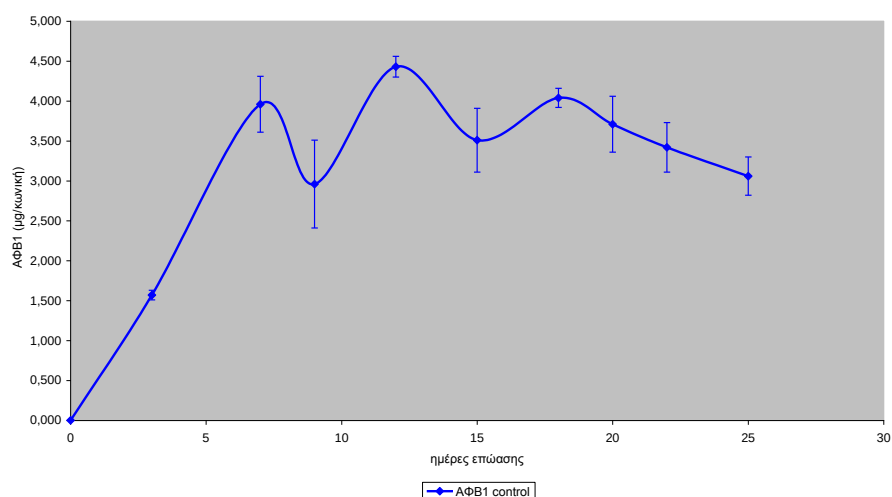
Στους πίνακες 10.1 και 10.2 παρουσιάζονται αντίστοιχα οι ποσότητες μυκηλιακής μάζας που προσδιορίστηκαν πειραματικά (§6.12) και οι ποσότητες της παραγόμενης ΑΦΒ₁, ενώ το διάγραμμα (σχήμα 10.1) απεικονίζει την πορεία της ΑΦΒ₁ που παράγεται για συνολικό διάστημα 25 ημερών.

Πίνακας 10.1: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα control σε κάππαρη (15g/κωνική)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	1.692,1	1.677,0	15,00	0,89
	2	1.676,8			
	3	1.662,1			
3 ^η	1	1.977,4	1.975,9	9,54	0,48
	2	1.984,6			
	3	1.965,7			
7 ^η	1	1.697,1	1.700,1	8,98	0,53
	2	1.710,2			
	3	1.693,0			
9 ^η	1	1.456,5	1.435,3	18,93	1,32
	2	1.420,1			
	3	1.429,3			
12 ^η	1	2.230,5	2.264,5	31,62	1,40
	2	2.293,0			
	3	2.270,1			
15 ^η	1	961,3	989,3	25,41	2,57
	2	995,7			
	3	1.010,9			
18 ^η	1	969,7	957,1	14,53	1,52
	2	941,2			
	3	960,4			
20 ^η	1	912,6	933,6	18,74	2,01
	2	939,5			
	3	948,7			
22 ^η	1	901,5	912,4	9,64	1,06
	2	919,8			
	3	915,9			
25 ^η	1	889,7	903,8	15,50	1,71
	2	901,3			
	3	920,4			

Πίνακας 10.2: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα control σε κάππαρη (15g/κωνική)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	1,59	1,57	0,06	3,82
	2	1,62			
	3	1,51			
7 ^η	1	3,69	3,96	0,35	8,84
	2	3,84			
	3	4,35			
9 ^η	1	2,57	2,96	0,55	18,58
	2	2,72			
	3	3,59			
12 ^η	1	4,40	4,43	0,13	2,93
	2	4,31			
	3	4,57			
15 ^η	1	3,31	3,51	0,40	11,40
	2	3,25			
	3	3,97			
18 ^η	1	4,18	4,04	0,12	2,97
	2	3,97			
	3	3,98			
20 ^η	1	4,11	3,71	0,35	9,43
	2	3,55			
	3	3,47			
22 ^η	1	3,14	3,42	0,31	9,06
	2	3,76			
	3	3,37			
25 ^η	1	2,80	3,06	0,24	7,84
	2	3,27			
	3	3,10			



Σχήμα 10.1: Βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε δείγματα control σε κάππαρη για διάστημα 25 ημερών

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της μυκηλιακής μάζας θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των δειγμάτων της κάππαρης, η πορεία ανάπτυξης του *A.parasiticus* δεν μπορεί να αποτυπωθεί όπως στο πείραμα με το θρεπτικό υλικό YES. Η εξήγηση δίνεται από το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο πείραμα μαζί με το μύκητα ζυγίζεται αναπόφευκτα και η κάππαρη, από την οποία όμως ο *A.parasiticus* κατά τη διάρκεια των ημερών επώασης αφαιρεί συστατικά, καθώς τη χρησιμοποιεί για την ανάπτυξή του. Όπως αναφέρεται για παράδειγμα στη βιβλιογραφία, ο μύκητας μπορεί μέσω ενός εξωκυτταρικού ενζυμικού συστήματος να αποικοδομήσει το φλαβονοειδές ρουτίνη – που όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 5 αποτελεί βασικό συστατικό της κάππαρης – ως πηγή άνθρακα.^[4] Επομένως, η μάζα της αποξηραμένης κάππαρης δεν παραμένει σταθερή για όλες τις ημέρες παρατήρησης αφού χάνοντας σε συστατικά αλλάζει και κατά συνέπεια διαφοροποιεί τις μετρήσεις της ποσότητας της μυκηλιακής μάζας του *A.parasiticus*. Εν τούτοις, προσδιορισμοί της μυκηλιακής ανάπτυξης έγιναν για όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν και οι καμπύλες ανάπτυξης που προέκυψαν αποτυπώνονται σε ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα παρακάτω.

Οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης των μετρήσεων που προκύπτουν από τους δύο πίνακες κρίνονται ικανοποιητικές. Στην πορεία βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ υπάρχει από την αρχή της παρατήρησης μία ανιχνεύσιμη ποσότητα ΑΦΒ₁, η οποία προέρχεται από τα κονίδια του εμβολιασμού. Το μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης της τοξίνης εντοπίζεται τη 12^η ημέρα. Στη συνέχεια, παρατηρείται μέχρι την 25^η ημέρα μία συνεχής μείωση της παραγωγής της ΑΦΒ₁.

10.3 Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών ποσοτήτων MeJA στην ανάπτυξη του μύκητα *A.parasiticus* και στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε κάππαρη

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της μυκηλιακής μάζας και της ΑΦΒ₁ που παράγεται από τον *A.parasiticus* σε διάστημα 15 ημερών κατόπιν προσθήκης 0,0022 mg, 0,227 mg, 2,267 mg, 22,667 mg και 226,67 mg MeJA.

Πίνακας 10.3: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 0,0022 mg/κωνική MeJA (10^{-6} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	1.696,8	1.683,5	11,72	0,70
	2	1.674,7			
	3	1.679,0			
3 ^η	1	1.885,9	1.894,7	8,07	0,43
	2	1.896,3			
	3	1.901,8			
7 ^η	1	1.355,8	1.352,0	4,59	0,34
	2	1.346,9			
	3	1.355,3			
9 ^η	1	1.107,4	1.101,4	7,55	0,69
	2	1.092,9			
	3	1.103,8			
12 ^η	1	1.539,2	1.551,8	14,48	0,93
	2	1.567,6			
	3	1.548,5			
15 ^η	1	1.008,2	1.010,2	6,63	0,66
	2	1.017,6			
	3	1.004,8			

Πίνακας 10.4: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 0,0022 mg/κωνική MeJA (10^{-6} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG AFB ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	1,98	2,12	0,15	7,08
	2	2,27			
	3	2,10			
7 ^η	1	3,94	3,61	0,31	8,59
	2	3,33			
	3	3,55			
9 ^η	1	4,89	4,52	0,39	8,63
	2	4,11			
	3	4,57			
12 ^η	1	6,22	6,33	0,23	3,63
	2	6,59			
	3	6,17			
15 ^η	1	5,58	5,36	0,20	3,73
	2	5,29			
	3	5,20			

Οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης που προκύπτουν κρίνονται και για τις δύο περιπτώσεις πολύ ικανοποιητικές. Η μέγιστη τιμή της ΑΦΒ₁ παρατηρείται τη 12^η ημέρα, ενώ στη συνέχεια ο ρυθμός βιοσύνθεσης μειώνεται.

Πίνακας 10.5: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 0,227 mg/κωνική MeJA (10^{-4} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	1.712,3	1.702,1	9,03	0,53
	2	1.695,2			
	3	1.698,7			
3 ^η	1	1.982,3	1.995,8	11,69	0,59
	2	2.002,7			
	3	2.002,4			
7 ^η	1	1.359,8	1.375,3	14,25	1,04
	2	1.387,8			
	3	1.378,4			
9 ^η	1	911,7	904,0	10,21	1,13
	2	892,4			
	3	907,8			
12 ^η	1	1.642,7	1.651,0	16,41	0,99
	2	1.669,9			
	3	1.640,4			
15 ^η	1	1.252,6	1.263,4	9,85	0,78
	2	1.271,9			
	3	1.265,7			

Πίνακας 10.6: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 0,227 mg/κωνική MeJA (10^{-4} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑFB ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,88	0,87	0,08	9,20
	2	0,79			
	3	0,94			
7 ^η	1	2,34	2,29	0,06	2,62
	2	2,22			
	3	2,30			
9 ^η	1	1,20	1,23	0,07	5,69
	2	1,31			
	3	1,17			
12 ^η	1	3,04	2,90	0,13	4,48
	2	2,85			
	3	2,80			
15 ^η	1	0,58	0,49	0,10	20,41
	2	0,50			
	3	0,39			

Οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης είναι και στην περίπτωση αυτή πολύ ικανοποιητικές. Η μέγιστη παραγωγή της ΑΦΒ₁ εντοπίζεται τη 12^η ημέρα επώασης, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται μία σημαντική μείωση.

Πίνακας 10.7: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 2,267 mg/κωνική MeJA (10^{-3} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	1.684,5	1.669,8	21,04	1,26
	2	1.679,2			
	3	1.645,7			
3 ^η	1	1.772,7	1.794,2	19,63	1,09
	2	1.811,2			
	3	1.798,6			
7 ^η	1	1.306,7	1.298,7	12,00	0,92
	2	1.284,9			
	3	1.304,5			
9 ^η	1	1.042,1	1.030,4	10,42	1,01
	2	1.027,0			
	3	1.022,1			
12 ^η	1	1.833,3	1.855,4	20,09	1,08
	2	1.872,6			
	3	1.860,2			
15 ^η	1	1.019,2	1.011,5	6,77	0,67
	2	1.006,4			
	3	1.009,0			

Πίνακας 10.8: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 2,267 mg/κωνική MeJA (10^{-3} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,96	0,85	0,10	11,76
	2	0,82			
	3	0,77			
7 ^η	1	1,03	0,91	0,11	12,09
	2	0,81			
	3	0,89			
9 ^η	1	0,54	0,51	0,08	15,68
	2	0,42			
	3	0,57			
12 ^η	1	1,56	1,45	0,10	6,90
	2	1,41			
	3	1,38			
15 ^η	1	0,10	0,08	0,02	25,00
	2	0,06			
	3	0,07			

Η επαναληψιμότητα των τιμών κρίνεται ικανοποιητική από το συντελεστή διακύμανσης. Και σε αυτήν την περίπτωση, η παραγωγή της ΑΦΒ₁ φτάνει τη μέγιστη τιμή της τη 12^η ημέρα για να μειωθεί στη συνέχεια σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Πίνακας 10.9: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 22,667 mg/κωνική MeJA (10^{-2} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	1.667,2	1.675,7	7,58	0,45
	2	1.681,7			
	3	1.678,3			
3 ^η	1	1.902,2	1.894,7	7,93	0,42
	2	1.886,4			
	3	1.895,5			
7 ^η	1	1.527,3	1.530,1	18,71	1,22
	2	1.550,1			
	3	1.513,0			
9 ^η	1	905,2	887,6	22,81	2,57
	2	861,8			
	3	895,7			
12 ^η	1	1.815,9	1.804,0	11,16	0,62
	2	1.793,8			
	3	1.802,2			
15 ^η	1	979,4	997,2	18,70	1,88
	2	1.016,7			
	3	995,6			

Πίνακας 10.10: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 22,667 mg/κωνική MeJA (10^{-2} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG AFB ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,10	0,12	0,024	19,51
	2	0,15			
	3	0,11			
7 ^η	1	0,29	0,32	0,076	23,75
	2	0,41			
	3	0,27			
9 ^η	1	0,13	0,17	0,036	21,18
	2	0,20			
	3	0,18			
12 ^η	1	0,09	0,10	0,021	21,00
	2	0,08			
	3	0,12			
15 ^η	1	0,007	0,008	0,002	25,00
	2	0,006			
	3	0,010			

Στα δείγματα με προσθήκη 10^{-2} M MeJA η μέγιστη τιμή της παραγόμενης ΑΦΒ₁ εντοπίζεται την 7^η ημέρα επώασης. Ακολουθεί μείωση του ρυθμού βιοσύνθεσης μέχρι τη 15^η ημέρα, όπου τα επίπεδα της ΑΦΒ₁ είναι πλέον πολύ χαμηλά.

Πίνακας 10.11: Μυκηλιακή μάζα του μύκητα *A. parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 226,67 mg/κωνική MeJA (10^{-1} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	1.658,9	1.681,2	19,89	1,18
	2	1.697,1			
	3	1.687,6			
3 ^η	1	1.897,0	1.896,3	7,62	0,40
	2	1.888,4			
	3	1.903,6			
7 ^η	1	1.596,4	1.569,1	26,67	1,70
	2	1.543,1			
	3	1.567,9			
9 ^η	1	1.358,4	1.378,2	17,22	1,25
	2	1.389,7			
	3	1.386,5			
12 ^η	1	1.891,3	1.873,3	15,60	0,83
	2	1.863,6			
	3	1.865,0			
15 ^η	1	1.055,6	1.048,3	8,68	0,83
	2	1.038,7			
	3	1.050,6			

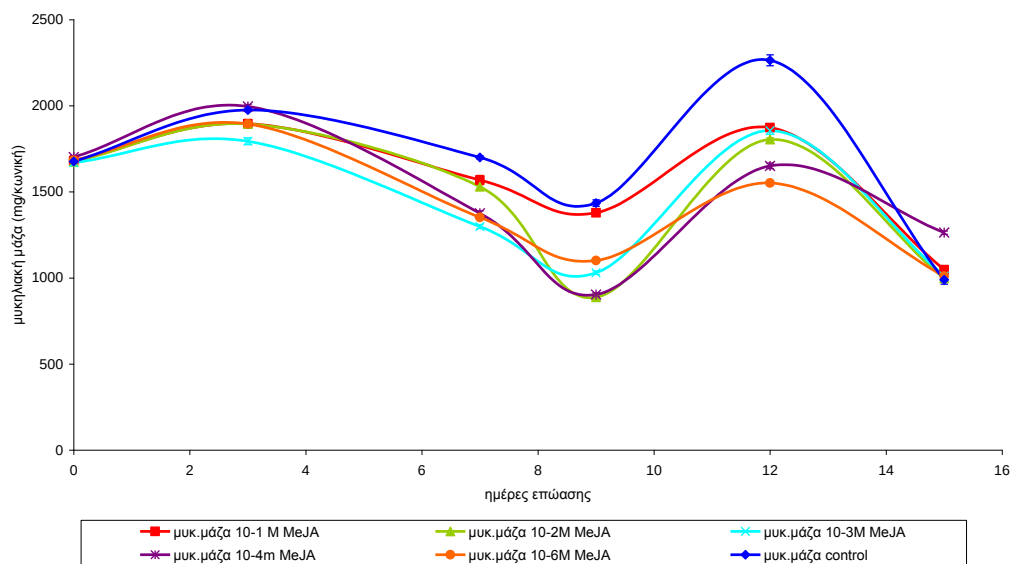
Πίνακας 10.12: Ποσότητες ΑΦΒ₁ που παράγονται από το μύκητα *A.parasiticus* σε δείγματα κάππαρης (15g/κωνική) με προσθήκη 226,67 mg/κωνική MeJA (10^{-1} M)

ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	(MG ΑΦΒ ₁ /ΚΩΝΙΚΗ)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ (MG/ΚΩΝΙΚΗ)	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ SD	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ RSD%
0 ^η	1	0,002	0,002	0	0
	2	0,002			
	3	0,002			
3 ^η	1	0,11	0,15	0,03	20,00
	2	0,17			
	3	0,16			
7 ^η	1	0,21	0,22	0,11	25,45
	2	0,17			
	3	0,28			
9 ^η	1	0,076	0,077	0,005	6,49
	2	0,083			
	3	0,074			
12 ^η	1	0,068	0,070	0,016	22,86
	2	0,055			
	3	0,086			
15 ^η	1	0,041	0,042	0,010	23,81
	2	0,033			
	3	0,052			

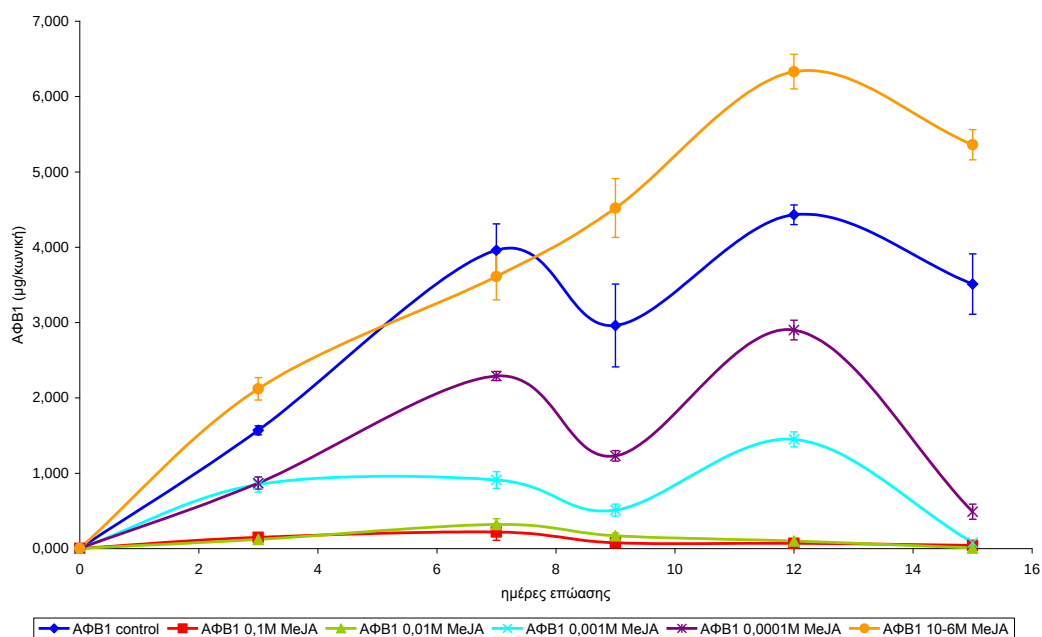
Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης κρίνονται ικανοποιητικές κάτι που ισχύει και για τα δείγματα με προσθήκη 10^{-2} M MeJA. Ο ρυθμός βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ που κινείται σε όλο το διάστημα σε πολύ χαμηλά επίπεδα φτάνει

σε ένα μέγιστο σημείο την 7^η ημέρα για να μειωθεί αμέσως μετά μέχρι τη 15^η ημέρα παρατήρησης σε ακόμη μικρότερες τιμές.

Στα ακόλουθα διαγράμματα απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης του μύκητα και η πορεία βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ των δειγμάτων κάππαρης control και με προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων MeJA για το διάστημα παρατήρησης των 15 ημερών.



Σχήμα 10.2: Μυκηλιακή ανάπτυξη του *A. parasiticus* σε δείγματα κάππαρης control και σε δείγματα κάππαρης με προσθήκη 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλισμονικού οξέος (MeJA) για διάστημα 15 ημερών



Σχήμα 10.3: Βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ σε δείγματα κάππαρης control και σε δείγματα κάππαρης με προσθήκη 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων μεθυλισμονικού οξέος (MeJA) για διάστημα 15 ημερών

Παρατηρήσεις-Συζήτηση

Η εικόνα του σχήματος 10.2 αποτυπώνει τη συμμετοχή της κάππαρης σαν υπόστρωμα στον προσδιορισμό της μυκηλιακής μάζας. Έτσι, τη 0^η ημέρα επώασης αντί για μηδενικές τιμές, παίρνουμε τιμές σχετικά υψηλές - σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τιμές του συνόλου - που αντιστοιχούν στη μάζα της αποξηραμένης κάππαρης. Στη συνέχεια μεταξύ της 3^{ης} και της 9^{ης} ημέρας η μυκηλιακή ανάπτυξη φαίνεται να μειώνεται για να εμφανίσει όμως τη 12^η ημέρα τη μεγαλύτερη τιμή της και τη 15^η ημέρα να περιορισθεί εκ νέου. Είναι σαφές πως μία τέτοια πορεία δεν προέρχεται από το μύκητα *A.parasiticus* μόνο αλλά από το συνδυασμό του με την κάππαρη -όπως αναφέρθηκε νωρίτερα (§10.2)-. Εκείνο που παρατηρείται επίσης είναι μία ομοιομορφία της πορείας αυτής σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

Το διάγραμμα της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ (σχήμα 10.3) παρουσιάζει μία εικόνα, όπου τις πρώτες ημέρες επώασης οι πορείες είναι περίπλοκες, ενώ από την 9^η ημέρα και ύστερα τα φαινόμενα γίνονται πιο σαφή και έχουν μεγαλύτερη βαρύτητα ως προς τη συνολική επίδραση του ρυθμιστικού παράγοντα στις διεργασίες του *A.parasiticus*.

Ξεκινώντας από την προσθήκη της χαμηλότερης συγκέντρωσης MeJA (10^{-6} M) παρατηρούμε ότι η καμπύλη της παραγόμενης ΑΦΒ₁ ακολουθεί μία συνεχώς αυξητική πορεία, η οποία μάλιστα από την 9^η ημέρα και ύστερα βρίσκεται σαφώς ψηλότερα από την αντίστοιχη των δειγμάτων control, υποδηλώνοντας μία διέγερση της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁. Επιδιώκοντας μία σύγκριση μεταξύ των 2 περιπτώσεων για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διέγερση, εφαρμόστηκε η δοκιμασία t-test για τα ζεύγη τιμών στο σύνολο των ημερών, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται παρακάτω στον πίνακα 10.13. Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα $t_{πειρ} = -2.288 < t_{θεωρ} = 2.571$ για $n-1 = 5$ βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης $p = 0,05$. Επομένως, στο σύνολο των ημερών επώασης η διέγερση της παραγόμενης ΑΦΒ₁ δε θεωρείται στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας t-test που εφαρμόστηκε στο χρονικό διάστημα μεταξύ 9^{ης} και 15^{ης} ημέρας φανερώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά στις ποσότητες ΑΦΒ₁ για τις δύο κατηγορίες δειγμάτων με $t_{πειρ} = -16.70 > t_{θεωρ} = 4.303$ για $n-1 = 2$ βαθμούς ελευθερίας και $p = 0,05$.

Η προσθήκη της αμέσως μεγαλύτερης ποσότητας MeJA (0,227 mg) στα δείγματα της εμβολιασμένης κάππαρης οδηγεί σε μία αρκετά διαφορετική εικόνα σε σχέση με την προηγούμενη. Πιο συγκεκριμένα, η καμπύλη που περιγράφει την πορεία της ΑΦΒ₁ κινείται σε χαμηλότερες τιμές έναντι εκείνων των δειγμάτων control σε όλο το διάστημα παρατήρησης, ενώ τη 15^η ημέρα η ποσότητα της παραγόμενης τοξίνης μειώνεται σημαντικά σε σχέση με το control. Από την εφαρμογή του στατιστικού ελέγχου μέσω της δοκιμασίας t-test για το σύνολο των ημερών επώασης, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον πίνακα 10.13, προκύπτει ότι η αναστολή που φαίνεται να

προκαλείται από τη συγκέντρωση 10^{-4} M MeJA είναι στατιστικά σημαντική ($t_{\text{πειρ}} = 3.442 > t_{\text{θεωρ}} = 2.571$ για $n-1 = 5$ βαθμούς ελευθερίας και $p = 0,05$).

Στα δείγματα με συγκέντρωση 10^{-3} M MeJA η καμπύλη της πορείας βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ διατρέχει ακόμη χαμηλότερες τιμές, καταλήγοντας τη 15^η ημέρα σε πολύ χαμηλά πλέον επίπεδα. Ο στατιστικός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία t-test έδειξε πως και σ' αυτήν την περίπτωση υπάρχει στατιστικά σημαντική αναστολή στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ στο σύνολο των ημερών επώασης ($t_{\text{πειρ}} = 3.667 > t_{\text{θεωρ}} = 2.571$ για $n-1 = 5$ βαθμούς ελευθερίας και $p = 0,05$).

Με την προσθήκη της ποσότητας 22,667 mg MeJA η αντίστοιχη εικόνα της παραγωγής της ΑΦΒ₁ δείχνει μία σημαντική αναστολή του φαινομένου της βιοσύνθεσης με τιμές που παραμένουν ιδιαίτερα χαμηλές καθ' όλη τη διάρκεια της παρατήρησης σε σχέση με τα δείγματα control. Και σ' αυτήν την περίπτωση η δοκιμασία t-test διακρίνει μία στατιστικά σημαντική μεταβολή στις ποσότητες της προσδιοριζόμενης ΑΦΒ₁ ($t_{\text{πειρ}} = 3.977 > t_{\text{θεωρ}} = 2.571$ για $n-1 = 5$ βαθμούς ελευθερίας και $p = 0,05$).

Η πορεία της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ στα δείγματα με την υψηλότερη συγκέντρωση MeJA (10^{-1} M), έχει μεγάλη ομοιότητα ως προς την εικόνα που παρουσιάζει με εκείνη της συγκέντρωσης 10^{-2} M με τη διαφορά ότι κινείται σε ακόμη χαμηλότερες τιμές. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας t-test για το σύνολο των ημερών υποδεικνύουν ότι η αναστολή είναι στατιστικά σημαντική ($t_{\text{πειρ}} = 3.962 > t_{\text{θεωρ}} = 2.571$ για $n-1 = 5$ βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης 95%).

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας t-test που εφαρμόσθηκε για όλα τα ζεύγη τιμών που αναφέρθηκαν για το σύνολο των ημερών παρατήρησης παρατίθενται στο συγκεντρωτικό πίνακα 10.13 που ακολουθεί.

Πίνακας 10.13: t-test για τις ποσότητες ΑΦΒ₁ ανάμεσα στα δείγματα κάππαρης control και στα δείγματα κάππαρης με προσθήκη 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA (εφαρμογή στο σύνολο των ημερών επώασης)

Δείγμα	ΑΦΒ ₁ Μέσος όρος (μg/κωνική)	Τυπική απόκλιση SD	SD ²	df	t _{πειρ.}	t _{θεωρ.}
control	2,738	1,664	2,768			
10 ⁻¹ M MeJA	0,009	0,078	0,006	5	3.962	2.571
10 ⁻² M MeJA	0,120	0,117	0,013	5	3.977	2.571
10 ⁻³ M MeJA	0,633	0,549	0,301	5	3.667	2.571
10 ⁻⁴ M MeJA	1,297	1,101	1,212	5	3.442	2.571
10 ⁻⁶ M MeJA	3,657	2,302	5,299	5	-2.288	2.571

Προκειμένου να γίνει επιπλέον και σύγκριση όλων των κατηγοριών δειγμάτων μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA. Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 10.14: Αποτελέσματα one-way ANOVA για τις ποσότητες ΑΦΒ₁ στα δείγματα κάππαρης control και στα δείγματα κάππαρης με προσθήκη 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA

Πηγή διακύμανσης	SS	df	s ²	F _{πειρ.}	F _{θεωρ.}
Between	64,94835	5	12,98967	8.110	2.533
Within	48,04608	30	1,60154		
Total	112,99443	35			

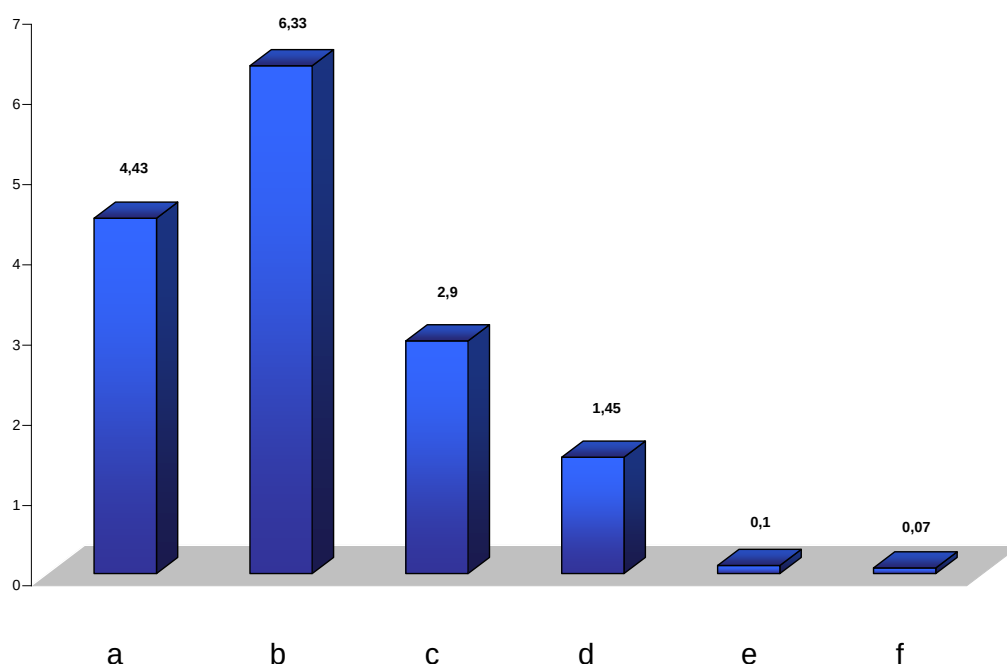
Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, δεν ισχύει η μηδενική υπόθεση και επομένως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, $F_{5,30} = 8.110$ $p < 0.05$.

Κάθε μία από τις συγκεντρώσεις MeJA που μελετήθηκαν επιδρά διαφορετικά στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ και όπως δείχνουν τα συνολικά αποτελέσματα οι διαφορές στο βαθμό αναστολής είναι σημαντικές. Ο πίνακας 10.15 παρουσιάζει συνοπτικά τα ποσοστά διέγερσης και αναστολής της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις MeJA σε σύγκριση με τα δείγματα control κατά τη 12^η ημέρα επώασης, όπου εμφανίζεται η μέγιστη ποσότητα ΑΦΒ₁ για τα δείγματα control, καθώς και για τα δείγματα με συγκέντρωση MeJA 10^{-3} M, 10^{-4} M και 10^{-6} M και κατά την οποία - σύμφωνα με το στατιστικό έλεγχο που εφαρμόστηκε μέσω της δοκιμασίας t-test - υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις ποσότητες της παραγόμενης ΑΦΒ₁.

Πίνακας 10.15: Ποσοστό διέγερσης και αναστολής της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ από το μύκητα *A.parasiticus* από την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA σε σύγκριση με τα δείγματα control τη 12^η ημέρα επώασης

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MEJA MG ΚΩΝΙΚΗ ⁻¹	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΦΒ ₁ MG ΚΩΝΙΚΗ ⁻¹	% ΑΝΑΣΤΟΛΗ	% ΔΙΕΓΕΡΣΗ
0	4,43	-	-
0,0022 (10^{-6} M)	6,33	-	42,89
0,227 (10^{-4} M)	2,90	34,54	-
2,267 (10^{-3} M)	1,45	67,27	-
22,667 (10^{-2} M)	0,10	97,74	-

226,667(10^{-1} M)	0,07	98,42	-
-----------------------	------	-------	---



Σχήμα 10.4: Σύγκριση των ποσοτήτων ($\mu\text{g} \cdot \kappa\omega\nu\iota\kappa\eta^{-1}$) της παραγόμενης ΑΦΒ₁ από το μύκητα *A.parasiticus* τη 12^η ημέρα επώασης σε δείγματα κάππαρης διαφορετικής συγκέντρωσης MeJA και δείγματα κάππαρης control

a: δείγματα control

b: δείγματα με προσθήκη 0,0022 mg MeJA (10^{-6} M MeJA /κωνική)

c: δείγματα με προσθήκη 0,227 mg MeJA (10^{-4} M MeJA /κωνική)

d: δείγματα με προσθήκη 2,267 mg MeJA (10^{-3} M MeJA /κωνική)

e: δείγματα με προσθήκη 22,667 mg MeJA (10^{-2} M MeJA /κωνική)

f: δείγματα με προσθήκη 226,667 mg MeJA (10^{-1} M MeJA /κωνική)

Η διαφοροποίηση του ποσοστού αναστολής της παραγόμενης ΑΦΒ₁ ανάλογα με τη συγκέντρωση MeJA, όπως διακρίνεται στον πίνακα 10.15 και στο σχήμα 10.4 συμβαδίζει και με το γεγονός ότι στα δείγματα με τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις MeJA (10^{-1} M και 10^{-2} M) η μέγιστη τιμή της ΑΦΒ₁ εμφανίζεται αρκετά πιο νωρίς (7^η ημέρα) σε σχέση με το control, κάτι που υποδεικνύει μεγαλύτερη αναστολή έναντι των υπολοίπων δειγμάτων με χαμηλότερες συγκεντρώσεις MeJA (10^{-3} M και 10^{-4} M).

Στο τέλος της συγκεκριμένης μελέτης υπολογίσθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Origin 8.0 η συγκέντρωση ic_{50} (half maximal inhibitory concentration), η οποία εκφράζει την ποσότητα MeJA που απαιτείται για να έχουμε το 50% της

παρεμπόδισης της παραγωγής ΑΦΒ₁. Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα για το σύνολο των ημερών παρατήρησης, η μέση ανασταλτική συγκέντρωση που προκύπτει για το MeJA στην κάππαρη είναι $ic_{50} = 0,433 \text{ mg} \cdot \text{κωνική}^{-1}$.

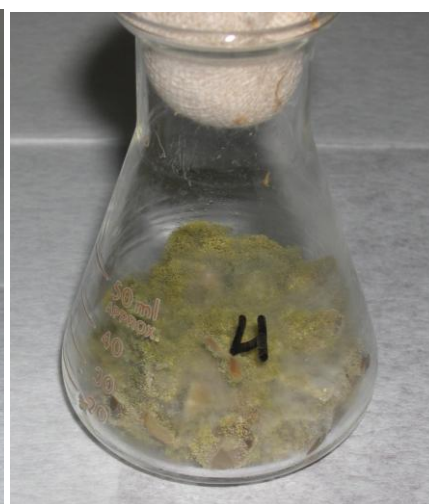
Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζονται κάποια αντιπροσωπευτικά δείγματα κάππαρης με και χωρίς προσθήκη MeJA, στα οποία μπορεί κανείς να διακρίνει τη διαφορά στην ανάπτυξη του μύκητα ανάλογα με την περίπτωση. Στα δείγματα με τη μεγαλύτερη προσθήκη MeJA (10^{-1}M) είναι σαφής η μειωμένη μυκηλιακή ανάπτυξη σε σχέση με τα δείγματα control και ακόμη περισσότερο με τα δείγματα που περιέχουν τη μικρότερη ποσότητα MeJA (10^{-6}M).



**Δείγμα κάππαρης control
την 7^η ημέρα επώασης**



**Δείγμα κάππαρης με 10^{-1}M MeJA
την 7^η ημέρα επώασης**



**Δείγμα κάππαρης με 10^{-6}M MeJA
την 7^η ημέρα επώασης**



**Δείγμα κάππαρης control
την 9^η ημέρα επώασης**



**Δείγμα κάππαρης με 10^{-1}M MeJA
την 9^η ημέρα επώασης**



**Δείγμα κάππαρης με 10^{-6}M MeJA
την 9^η ημέρα επώασης**

Σχήμα 10.5: Δείγματα εμβολιασμένης κάππαρης χωρίς προσθήκη MeJA και με προσθήκη MeJA δύο ακραίων συγκεντρώσεων (10^{-1}M και 10^{-6}M)

Συμπεράσματα

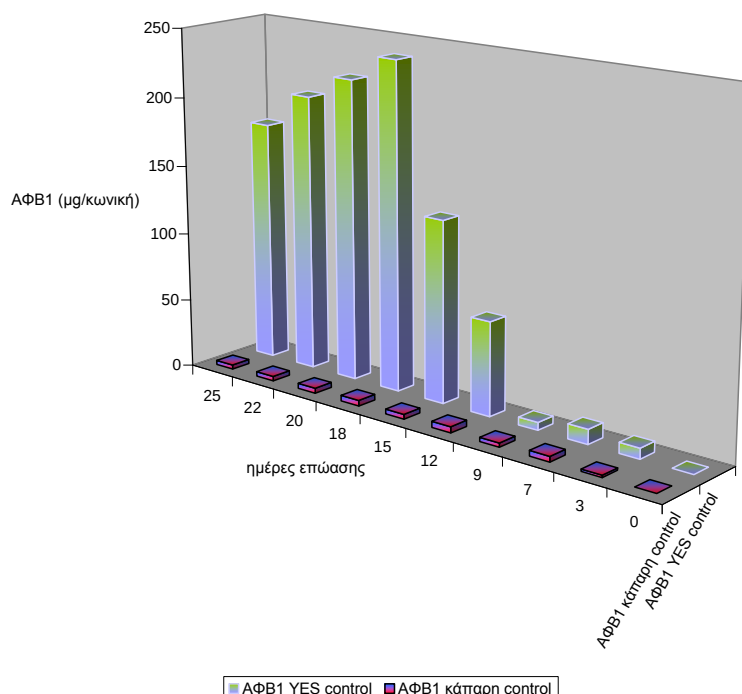
Μετά την έρευνα και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη χρήση της κάππαρης ως υποστρώματος για τη μελέτη της ανάπτυξης του *A.parasiticus* και την ικανότητά του να βιοσυνθέσει ΑΦΒ₁ στο υπόστρωμα αυτό σε συνδυασμό με την παρουσία μεθυλιασμονικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, καταλήγουμε στα ακόλουθα συμπεράσματα.

- ▶ Στα τυφλά δείγματα κάππαρης που εξετάσθηκαν δε βρέθηκε ΑΦΒ₁. Όταν όμως η ίδια φρέσκια κάππαρη εμβολιάσθηκε με κονίδια του μύκητα *A.parasiticus* και επώασθηκε υπό τις συνθήκες του εργαστηρίου μας, ο μύκητας μπόρεσε να αναπτυχθεί και να βιοσυνθέσει ΑΦΒ₁ σε κάποιες ποσότητες που σε καμία περίπτωση δεν μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες.
- ▶ Η προσθήκη μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA) στα δείγματα της εμβολιασμένης κάππαρης έχει επίδραση στις διεργασίες του μύκητα και η επιρροή αυτή εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωση του MeJA.
- ▶ Παρά το γεγονός ότι μία μέτρηση της μυκηλιακής μάζας του *A.parasiticus* μεμονωμένα δεν είναι εφικτή, καθώς ο μύκητας και η κάππαρη δεν μπορούν να διαχωριστούν, η μακροσκοπική εικόνα των δειγμάτων υποδηλώνει μία υστέρηση της μυκηλιακής ανάπτυξης στα δείγματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μεθυλιασμονικού οξέος (MeJA).
- ▶ Η προσθήκη της χαμηλότερης ποσότητας MeJA (0,0022 mg) προκαλεί διέγερση στην παραγωγή της ΑΦΒ₁, η οποία είναι στατιστικά σημαντική για το χρονικό διάστημα από την 9^η έως και την 15^η ημέρα (μία χρονική περίοδο κατά την οποία τα φαινόμενα είναι πλέον πιο σαφή σε σχέση με τις πρώτες ημέρες επώασης).
- ▶ Η παρουσία MeJA σε συγκέντρωση 10^{-4}M προκαλεί αναστολή στο φαινόμενο της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁, η οποία είναι στατιστικά σημαντική στο σύνολο των ημερών επώασης. Αντίστοιχη είναι και η επίδραση της συγκέντρωσης 10^{-3}M MeJA.
- ▶ Η μέση ανασταλτική συγκέντρωση ic_{50} για το MeJA ισούται με 0,433 mg · κωνική⁻¹ και επομένως βρίσκεται μεταξύ των συγκεντρώσεων 10^{-3}M και 10^{-4}M MeJA.
- ▶ Η προσθήκη των δύο μεγαλύτερων συγκεντρώσεων MeJA έχει σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αναστολή της παραγωγής της ΑΦΒ₁ σε ποσοστό που φτάνει το 97,74% στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10^{-2}M MeJA και το 98,42% στην περίπτωση της συγκέντρωσης 10^{-1}M MeJA τη 12^η ημέρα, αντίστοιχα, οπότε και εντοπίζεται η μεγαλύτερη παραγωγή ΑΦΒ₁ από τα δείγματα control.

Σύγκριση των δύο υποστρωμάτων που μελετήθηκαν (YES και κάππαρη) ως προς την ανάπτυξη του μύκητα *A.parasiticus* και την παραγωγή της ΑΦΒ₁ μετά την προσθήκη μεθυλιασμονικού οξέος

Τα αποτελέσματα της μελέτης γύρω από τη συμπεριφορά του μύκητα *A.parasiticus* στα δύο διαφορετικά συστήματα του YES και της φρέσκιας κάππαρης αποκάλυψαν μερικά ενδιαφέροντα στοιχεία.

Στη σύσταση της κάππαρης περιέχονται ταυτόχρονα ουσίες που παρεμποδίζουν και άλλες που ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα. Συστατικά όπως τα φαινολικά οξέα (π.χ. καφεϊκό οξύ), τα αλκαλοειδή, οι τοκοφερόλες και τα προϊόντα υδρόλυσης των γλυκοσινολατών (π.χ. εστέρες του ισοθειοκυανικού οξέος) έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη των μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών. Στον αντίποδα, αν και έχει διαπιστωθεί επανειλημμένα σε έρευνες που έγιναν η αντιμικροβιακή δράση των φλαβονοειδών,^[106,190,222] στην περίπτωση της κάππαρης φαίνεται πως η ρουτίνη, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό της, προσφέρεται σαν πηγή άνθρακα για το μύκητα και επομένως ως αρωγός στην ανάπτυξή του. Αντίστοιχα και οι πολυσακχαρίτες (ημικυτταρίνες και πηκτίνες) της κάππαρης είναι μία ακόμη κατηγορία ουσιών, τις οποίες ο *Aspergillus* μπορεί να χρησιμοποιήσει σαν θρεπτικό συστατικό. Στο σύνθετο αυτό υπόστρωμα ο *A.parasiticus* δέχεται κατά συνέπεια ποικίλες επιδράσεις. Είναι φανερό πως σε σύγκριση με το YES, το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ένα εξαιρετικό θρεπτικό υλικό για το συγκεκριμένο μύκητα, η κάππαρη χωρίς να δρα εξ ολοκλήρου ανασταλτικά - όπως κάποια άλλα τρόφιμα - δεν αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευνοϊκό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *A.parasiticus*, κάτι που επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι κανένα από τα δείγματα που ελέγχθηκαν δεν ήταν επιμολυσμένο. Επιπλέον, αφενός η ιδιαίτερα μειωμένη παραγωγή ΑΦΒ₁ που διαπιστώθηκε στην κάππαρη σε σχέση με τις ποσότητες ΑΦΒ₁ που προσδιορίστηκαν στο YES (σε ποσοστό 93,48% κατά τη 12^η ημέρα επώασης), όπως φαίνεται σαφώς και στο διάγραμμα του σχήματος 10.6, αφετέρου το γεγονός ότι στα δείγματα control της κάππαρης μετά τη 12^η ημέρα ο ρυθμός βιοσύνθεσης μειώνεται, ενώ στα αντίστοιχα δείγματα control στο YES ο ρυθμός βιοσύνθεσης στο διάστημα αυτό συνεχίζει να αυξάνει, ενισχύει την άποψη ότι ο *A.parasiticus* δεν ευνοείται από την κάππαρη για την ανάπτυξή του και κυρίως για τη βιοσύνθεση της τοξίνης του.



Σχήμα 10.6: Συγκριτικό διάγραμμα της ποσότητας ΑΦΒ₁ που παράγεται σε δείγματα YES control και σε δείγματα κάππαρης control για συνολικό διάστημα 25 ημερών

Αφήνοντας τις παρατηρήσεις που αφορούν στα δείγματα control των δύο περιπτώσεων, εστιάζουμε στις συνέπειες από την παρουσία του MeJA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Μία σύντομη σύγκριση της επίδρασης του MeJA ίδιας συγκέντρωσης στα δύο είδη δειγμάτων (Πίνακας 10.16) μας οδηγεί στη διαπίστωση ότι, αν και τα δύο υποστρώματα είναι τόσο διαφορετικά μεταξύ τους, η επίδραση του MeJA στο φαινόμενο της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ είναι αντίστοιχη και επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από τη συγκέντρωση του ρυθμιστικού παράγοντα στο δείγμα.

Πίνακας 10.16: Σύγκριση της επίδρασης του MeJA στην παραγωγή της ΑΦΒ₁ στο YES και στην κάππαρη στις ίδιες συγκεντρώσεις

Συγκέντρωση MeJA στο δείγμα mg κωνική ⁻¹	Επίδραση του MeJA στη βιοσύνθεση ΑΦΒ ₁ στο YES	Επίδραση του MeJA στη βιοσύνθεση ΑΦΒ ₁ στην κάππαρη
0,0022 (10 ⁻⁶ M)	Διέγερση	Διέγερση
0,227 (10 ⁻⁴ M)	Διέγερση	Αναστολή
2,267 (10 ⁻³ M)	Αναστολή	Αναστολή
22,667 (10 ⁻² M)	Αναστολή	Αναστολή
226,667(10 ⁻¹ M)	Αναστολή	Αναστολή

Με εξαίρεση τη συγκέντρωση 10^{-4} M, το MeJA φαίνεται να ακολουθεί ένα συγκεκριμένο «σχέδιο δράσης». Λαμβάνοντας υπόψιν τα νεότερα στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μυκήτων και των φυτών και τη σχέση των ιασμονικών οξέων με το μύκητα *A.parasiticus* και τις Αφλατοξίνες που παρατίθενται παρακάτω, θα προσπαθήσουμε να εξηγήσουμε κάποια από τα φαινόμενα που παρατηρήσαμε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τα ιασμονικά οξέα και τα παράγωγά του είναι ενώσεις που μεσολαβούν στην απόκριση ενός φυτού σε κάποιον ξένο εισβολέα (π.χ. μύκητα) ή σε τραυματισμό και εκφράζεται με την ενεργοποίηση της βιοσύνθεσής τους. Έτσι, σε φυτά, τα οποία είναι επιρρεπή σε μόλυνση από τους μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* (καλαμπόκι, σιτάρι, ηλιόσποροι, ρύζι) έχουν προσδιοριστεί ιασμονικά. Επίσης, μετά από μηχανικό τραυματισμό, όπου το φυτό κινδυνεύει περισσότερο να προσβληθεί από τον *A.parasiticus*, η παραγωγή ιασμονικών ενισχύεται. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την παραγωγή Αφλατοξινών σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας καθιστούν πιθανή την έκθεση αφλατοξινογόνων μυκήτων σε ιασμονικά.

Η σχέση των ιασμονικών με τις Αφλατοξίνες έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εάν ληφθεί υπόψιν η βιοσύνθεσή τους. Όταν οι μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* προσβάλλουν τους φυτικούς καρπούς, καταστρέφουν πρώτα τα λιπιδικά συστατικά μέσω των λιπασών τους παράγοντας κυρίως παλμιτικό, ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ. Παράγοντες που προωθούν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών είναι η υπεροξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και η παρουσία εποξειδίων. Τα υδροϋπεροξειδία και εποξειδία των λιπαρών οξέων μπορούν να σχηματιστούν μέσω αυτοξειδωσης ή ενζυμικά μέσω της λιποξυγενάσης που καταλύει την οξειδωση του α-λινελαϊκού και α-λινολενικού οξέος. Πολλά παράγωγα της πορείας των λιποξυγενασών συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον των ερευνητών. Μία πιθανή τύχη των υδροϋπεροξειδίων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα φυτά είναι ο σχηματισμός ιασμονικών, μία σίγουρη πορεία στην περίπτωση προσβολής του φυτού από μύκητες. Στη βιοσύνθεση των ιασμονικών ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν τα δύο πρώτα στάδια, όπου σχηματίζονται υδροϋπεροξειδία και εποξειδία που όπως αναφέρθηκε ενισχύουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Επιπλέον, στα τρία τελευταία στάδια βιοσύνθεσης του JA πραγματοποιείται β-οξειδωση, κατά την οποία ελευθερώνεται ακετυλο-CoA, η ένωση από την οποία ξεκινάει η πορεία βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών.

Η σχέση μεταξύ των Αφλατοξινών και των ιασμονικών αποτελεί αντικείμενο μελέτης και έρευνας από τους επιστήμονες και τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δε συμφωνούν στο αν τελικά τα ιασμονικά αναστέλλουν ή διεγείρουν τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Το 1995 οι Goodrich-Tanrikulu et al. παρατήρησαν ότι το MeJA σε συγκεντρώσεις από 10^{-3} έως 10^{-8} M προκαλεί αναστολή στη βιοσύνθεση Αφλατοξινών

από αποικίες του μύκητα *A.flavus* σε θρεπτικό υλικό Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA) και στα φυστίκια.^[223] Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τόσο το MeJA όσο και το JA σε συγκέντρωση 10^{-4} M προωθούν την παραγωγή της Αφλατοξίνης από το μύκητα *A.parasiticus* σε θρεπτικό υλικό YES ^[224] από την 7^η ημέρα επώασης και μετά, καθώς επίσης και ότι παρουσιάζεται αναστολή στη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης B₁ στις ελιές παρουσία MeJA σε συγκέντρωση 10^{-4} M ^[225] από την 9^η έως τη 15^η ημέρα επώασης. Αναστολή της βιοσύνθεσης της Αφλατοξίνης B₁ παρουσία MeJA παρατηρήθηκε επίσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα βαμβάκι.^[226]

Το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί διάφορα μεταβολικά φαινόμενα σε όλους τους οργανισμούς. Ποικίλοι παράγοντες που συνδέονται με την οξείδωση, όπως η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και τα υποπροϊόντα τους προερχόμενα από ενζυματικές ή μη ενζυματικές αντιδράσεις (π.χ. οι παράγοντες πρόωρης γενετικής επαγωγής -psi- και λιποϋπεροξειδία) έχει αποδειχθεί ότι έχουν ανάμιξη στο σχηματισμό των Αφλατοξινών.

Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως το ανιόν υπεροξειδίου, η ρίζα υδροξυλίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα λιποϋπεροξειδία που σχηματίζονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα και παράγονται στα κύτταρα κατά τη διάρκεια μεταβολικών διεργασιών, είναι δυνατόν να υπερπαραχθούν υπό τη δράση οξειδωτικών παραγόντων στρες που υπάρχουν στο περιβάλλον.

Για την αντιμετώπιση μίας συσσώρευσης ROS που ελλοχεύει πολλούς κινδύνους, τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς εξουδετέρωσης που βασίζονται σε ενζυμικά ή μη συστήματα. Ανάλογα με το επίπεδο συγκέντρωσης των ROS στα κύτταρα παρουσιάζεται θετική δραστηριότητα (διαδικασίες ανάπτυξης και μηχανισμοί άμυνας) ή αρνητική (γηρασμός κυττάρου, βλάβη κυτταρικής μεμβράνης). Στους μύκητες η παρουσία των ROS διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη. Στον *Aspergillus* οι ενώσεις που προκύπτουν από τη δράση των διοξυγενασών (DOX) και λιποξυγενασών (LOX), όπως το HPODE διεγείρουν την κονιδιογένεση, κάτι που στην περίπτωση του *A.flavus* συνδέεται με τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Στον *A.parasiticus*, οι ROS ελέγχουν το σχηματισμό σκληρωτίων βελτιώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την αντίσταση του οργανισμού στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες.^[227] Στον *A.parasiticus* παρατηρήθηκε επίσης ότι η παρουσία των ROS διέγειρε την παραγωγή ΑΦΒ₁, γεγονός που ίσως σημαίνει ότι η βιοσύνθεση του δευτερογενούς αυτού μεταβολίτη είναι μία αντισταθμιστική απάντηση του οργανισμού στη συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου.^[228] Η διαπίστωση ότι το οξειδωτικό στρες επηρεάζει σημαντικά το σχηματισμό Αφλατοξινών ενισχύεται από την απομόνωση και μελέτη του γονιδίου *AryarA* του *A.parasiticus*, τα προϊόντα έκφρασης του οποίου τροποποιούν την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Απουσία του συγκεκριμένου γονιδίου, η ισορροπία μεταξύ

οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών διαταράσσεται έχοντας ως αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση Αφλατοξινών.

Οι οξυλιπίνες, για τις οποίες έγινε αναφορά στο κεφάλαιο 4, υπάρχουν τόσο στα φυτά όσο και στους νηματοειδείς μύκητες. Στα φυτά προέρχονται κυρίως από το α-λινολενικό (C18:3), το λινελαϊκό (C18:2) οξύ και το δεκαεξατριενικό οξύ (C16:3), ενώ στους μύκητες οι οξυλιπίνες προέρχονται κυρίως από το ελαϊκό (C18:1) και ακολουθούν το λινελαϊκό (C18:2) και το α-λινολενικό (C18:3) οξύ. Στο γένος *Aspergillus* συμμετέχουν στη ρύθμιση της αναπαραγωγής τους και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Επιπλέον, μεσολαβούν ως σηματοδότες μεταξύ των ξενιστών τους και των ίδιων.

Η βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ από τον *A. parasiticus*, υπό τις συνθήκες που επικρατούν στο υλικό YES, αποτελεί μία φυσιολογική αντίδραση του μύκητα όταν επέρχεται η φάση κάμψεως, όπου ξεκινάει ο δευτερογενής μεταβολισμός. Για την περίπτωση της προσθήκης του MeJA όμως, όπου τόσο στο YES όσο και στην κάππαρη παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στη βιοσύνθεση της μυκοτοξίνης μπορούμε να κάνουμε μόνο κάποιες υποθέσεις, καθώς ο τρόπος δράσης του MeJA δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Η θεωρία που αναφέρεται στην επανομαζόμενη «αλληλεπίδραση ξενιστή – μύκητα» θα μπορούσε να ερμηνεύσει ως ένα βαθμό τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας. Σύμφωνα με αυτήν, καθώς οι οξυλιπίνες των φυτών (ιασμονικά οξέα, MeJA) και των μυκήτων (παράγοντες psi) παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες τόσο από πλευράς δομής όσο και βιοσύνθεσης, θεωρείται πιθανό οι μύκητες να χρησιμοποιούν ενδογενή μεταβολικά ένζυμα λιπιδίων, όπως επίσης και ενδογενείς οξυλιπίνες προκειμένου να αποικίσουν αρχικά τον ξενιστή και στη συνέχεια να αναπαραχθούν και να συνθέσουν τις τοξίνες τους. Άλλωστε πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι μέλη διαφόρων μυκήτων εξελίχθηκαν, ώστε να είναι σε θέση να εκμεταλλευτούν τις αμυντικές αποκρίσεις που προέρχονται από τις φυτικές οξυλιπίνες για τον πολλαπλασιασμό τους.^[176] Στην περίπτωση αυτή λοιπόν, όπου οι φυτικές οξυλιπίνες μιμούμενες τη δράση των αντίστοιχων οξυλιπινών του μύκητα επηρεάζουν τις φυσιολογικές του διεργασίες, η διέγερση της μυκηλιακής ανάπτυξης και της παραγωγής της ΑΦΒ₁ που παρατηρήθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση του MeJA, μπορεί να προέρχεται από τη «χειραγώγηση» του ρυθμιστικού αυτού παράγοντα - ο οποίος στη φύση αποτελεί την αμυντική απόκριση του φυτού - προς όφελος του μύκητα.

Στην περίπτωση της αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης και της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁, ενδέχεται το MeJA σε μεγάλες συγκεντρώσεις να επηρεάζει τις φυσιολογικές δραστηριότητες του μύκητα καταπιέζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό μυκηλίου και τη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁, αφού σύμφωνα με τη θεωρία της «αμοιβαίας διασταυρούμενης συζήτησης» (reciprocal cross-talk) μεταξύ ξενιστή και μύκητα, οι φυτικές οξυλιπίνες αλληλεπιδρούν με το σύστημα του μύκητα.^[229]

Μία δεύτερη εκδοχή είναι το ενδεχόμενο η υψηλότερη συγκέντρωση του MeJA να προκαλεί ταυτόχρονα δύο αντίθετα φαινόμενα. Αφενός τη θετική εκμετάλλευσή του από το μύκητα για την επιπλέον ενεργοποίηση του δευτερογενούς μεταβολισμού του, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και αφετέρου την αναστολή της ανάπτυξης του *A.parasiticus* και της παραγωγής της ΑΦΒ₁, ενδεχομένως σε γονιδιακό επίπεδο, το οποίο και υπερτερεί με συνολικό αποτέλεσμα την μερική ή πλήρη αναστολή. Να σημειωθεί επιπλέον ότι η εξάρτηση της επίδρασης των φυτικών ρυθμιστών (MeJA, αμπισικό οξύ κ.α.) από τη συγκέντρωση, στην οποία βρίσκονται έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία.^[230]

Οι εξηγήσεις αυτές θα δικαιολογούσαν και το γεγονός ότι ο ρόλος του υποστρώματος είναι δευτερεύων και ελάχιστα συμμετέχει στη αντίδραση του μύκητα με το MeJA.

Κρίνεται βέβαια απαραίτητο η περίπτωση της εξαρτημένης από τη συγκέντρωση δράσης του MeJA να δοκιμασθεί σε περισσότερα υποστρώματα, η διαπίστωση πάντως πως μία συγκεκριμένη συγκέντρωση MeJA σ' ένα δείγμα τροφίμου μπορεί να έχει την ίδια πάντα επίδραση στο φαινόμενο της ανάπτυξης του *A.parasiticus* και του δευτερογενούς μεταβολισμού του, ανοίγει ενδιαφέρουσες προοπτικές για τη χρήση του MeJA και στον τομέα της πρόληψης, πέρα από την πληθώρα των άλλων χρήσεων που έχει βρει μέχρι σήμερα, στη βιομηχανία των τροφίμων. Άλλωστε, η επιλογή ουσιών σαν το MeJA ως μέσο προστασίας από τις Αφλατοξίνες υποστηρίζεται από ερευνητές που έχουν ασχοληθεί με το θέμα των αναστολέων της βιοσύνθεσης των μυκοτοξινών και οι οποίοι θεωρούν ότι ένα τέτοιο μέσο θα πρέπει να είναι φυτικής προέλευσης (ή ακόμη καλύτερα να υπάρχει ήδη στο φυτό), θετικής ή ουδέτερης διατροφικής αξίας και να είναι δυνατή η βιοσύνθεσή του με ακρίβεια^[231], κριτήρια δηλαδή που πληρεί το MeJA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΙΑΣΜΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (MeJA) ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B₁ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *ASPERGILLUS PARASITICUS*

11.1 Γενικά

Η ανασταλτική επίδραση του MeJA στη βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ από τον *A.parasiticus* παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αλλά όπως αναφέρθηκε και στη συνολική εκτίμηση των αποτελεσμάτων (κεφαλαίο 10), ο τρόπος δράσης του MeJA σε σχέση με το μύκητα και τις Αφλατοξίνες δεν είναι γνωστός. Πολλοί ερευνητές^[231] υποστηρίζουν ότι η αναστολή της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών πραγματοποιείται στο επίπεδο ρύθμισης της βιοσύνθεσης. Σε μία προσπάθεια να διαφωτίσουμε το φαινόμενο που μελετήσαμε, επιχειρήσαμε να απομονώσουμε δύο γονίδια της διαδρομής σχηματισμού της ΑΦΒ₁^[232] και να δούμε τη δράση (εφόσον υπάρχει) του MeJA σε αυτά.

11.2 Επιλογή των δύο γονιδίων

11.2.1 Γονίδιο *aflC*

Προηγούμενες έρευνες, κατά τις οποίες μελετήθηκε το γονίδιο *aflC* από τον *A.parasiticus* έδειξαν με τη βοήθεια της τεχνικής απενεργοποίησης (knockout) γονιδίων πως η παρουσία του είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης και πως η διακοπή του οδηγεί στην αδυναμία σχηματισμού της τοξίνης.^[65,68] Σύμφωνα με τους Goodrich-Tanrikulu η αναστολή της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ από τον *A.flavus* πραγματοποιείται πριν το σχηματισμό των πρόδρομων ενώσεων της Στεριγματοκυστίνης και της Ο-μεθυλο-στεριγματοκυστίνης και πιθανότατα πριν το σχηματισμό των ενδιάμεσων έγχρωμων ενώσεων ανθρακινόνης στην αρχή της διαδρομής, παραπέμποντας στο Νορσολορινικό οξύ (NOR).^[223] Επιπλέον, έχει βρεθεί από άλλους ερευνητές^[106,231] ότι η πλειοψηφία των αναστολών της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών δρα πριν το σχηματισμό του NOR. Τα παραπάνω στοιχεία σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το συγκεκριμένο γονίδιο θεωρείται ως το πλέον καθοριστικό για την ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ οδήγησαν στην επιλογή του για τη μελέτη της πιθανής επίδρασης του MeJA στη βιοσύνθεση της μυκοτοξίνης σε γονιδιακό επίπεδο.

11.2.2 Γονίδιο *aflR*

Από τις πληροφορίες που υπάρχουν σχετικά με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ (Παράρτημα III), προκύπτει ότι η παρουσία του γονιδίου *aflR* είναι καθοριστικής σημασίας για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των υπολοίπων γονιδίων της πορείας σχηματισμού της ΑΦΒ₁. Επομένως ενδέχεται η αναστολή της παραγωγής της τοξίνης από το MeJA να οφείλεται σε κάποια παρέμβαση του φυτικού αυτού ρυθμιστή στο συγκεκριμένο γονίδιο ή στην έκφρασή του.

11.3 Σχεδιασμός εκκινητών

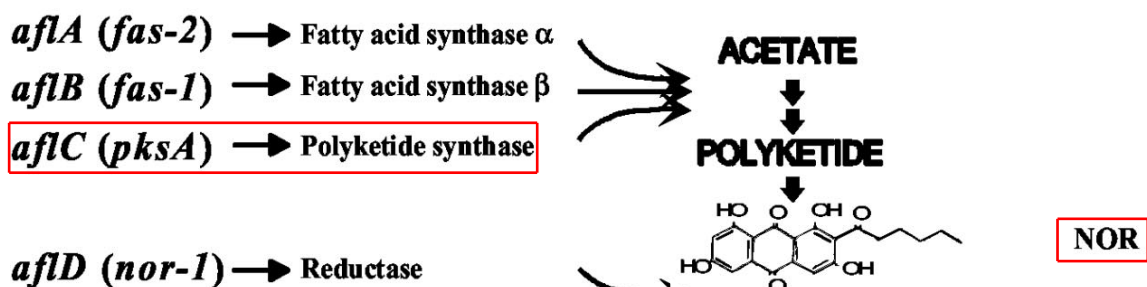
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα τρία ζεύγη των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που σχεδιάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό μέσω της RT-PCR των επιθυμητών τμημάτων DNA (*aflC*, *aflR*, *β-tubulin*) του *A.parasiticus*. Η *β-τουμπουλίνη* είναι ένα συστατικό γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ως γονίδιο αναφοράς.

Πίνακας 11.1: Περιγραφή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

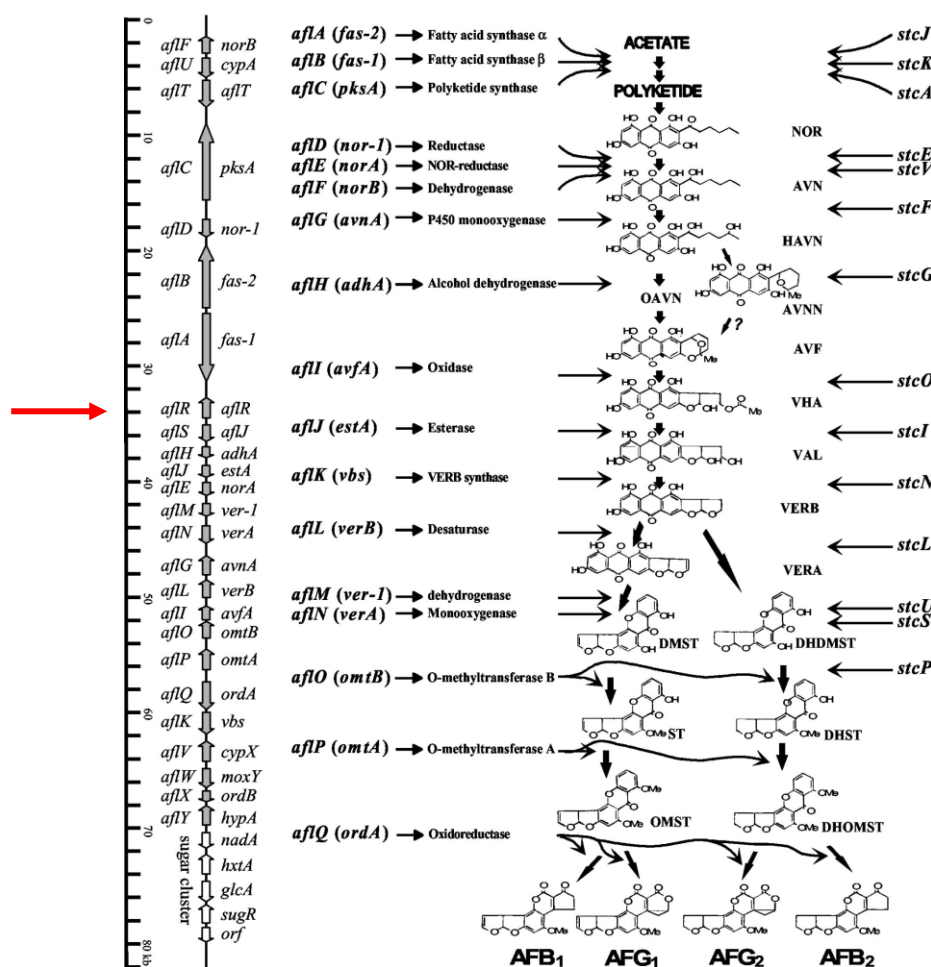
Εκκινητής	Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Tm [°C]	Ποσοστό GC (%)	Αριθμός βάσεων	Μήκος DNA που περικλείουν (bp)
aflC F	<i>aflC</i>	CACGGTTGATCACAAGTTGG	51.0	50.0	20	330
aflC R		ACTGCCACTTAGGGTGATGG	51.4	55.0	20	
aflR F	<i>aflR</i>	CGCGCTCCCAGTCCCCTTGATT	64.9	63.6	22	630
aflR R		CTTGTTCCCCGAGATGACCA	54.6	55.0	20	
btub F	<i>β-tubulin</i>	GGTAACCAAATAGGTGCCGCT	54.8	52.4	21	598
btub R		TAGGTCTGGTTCTTGCTCTGGATG	56.4	50.0	24	

F = forward

R = reverse



Σχήμα 11.1: Το γονίδιο *aflC*, η συνθετάση πολυκετιδίων που κωδικοποιεί και το προϊόν της αντίδρασής της, το νορσολορινικό οξύ NOR



Σχήμα 11.2: ^[61] Η πορεία βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ με τα εμπλεκόμενα γονίδια και τα αντίστοιχα ένζυμά τους και η θέση του γονιδίου *aflR* στο σύμπλεγμα των 75 kb

11.4 Απομόνωση και καθαρισμός RNA από τον *A.parasiticus*

Η απομόνωση του RNA του μύκητα έγινε από 4 διαφορετικά δείγματα σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος (κεφάλαιο 7.4, πίνακας 7.4). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά το πρώτο στάδιο, όπου γίνεται η προσθήκη του 1 mL Tri Reagent, όλα τα δείγματα παρουσίασαν δυσκολία στη διάλυσή τους γεγονός που οφείλεται στη σύσταση των τοιχωμάτων του μύκητα. Έτσι, στο τελικό πρωτόκολλο διάσπασης του μύκητα καταλήξαμε μετά από δοκιμές.

11.5 Φωτομέτρηση και προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Τα δείγματα RNA που προέκυψαν από το προηγούμενο στάδιο καθαρίστηκαν από τα ίχνη γενωμικού DNA με επίδραση DNάσης (κεφάλαιο 6.22.1.4) και ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους μέσω φωτομέτρησης, τα αποτελέσματα της οποίας παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 11.2: Αποτελέσματα προσδιορισμού καθαρότητας και συγκέντρωσης RNA του *A.parasiticus* στα δείγματα control και με προσθήκη 3 διαφορετικών συγκεντρώσεων MeJA

Δείγμα	Συγκέντρωση RNA [μg/μL]	Λόγος Q (καθαρότητα)
Δ ₁	0,5391	1,97
Δ ₂	0,5502	2,00
Δ ₃	0,8597	2,05
Δ ₄	0,3282	2,02

Δ₁: control

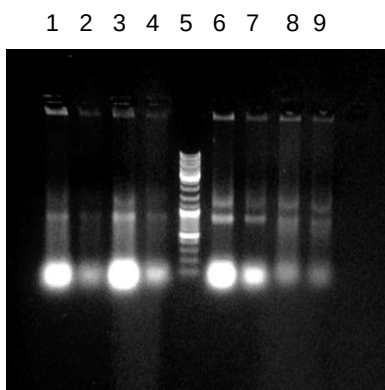
Δ₂: προσθήκη 0,0022 mg MeJA (10⁻⁶M)

Δ₃: προσθήκη 1,134 mg MeJA (0,0005M)

Δ₄: προσθήκη 18,134 mg MeJA (0,008M)

Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης προκύπτει ότι ο καθαρισμός του RNA σε όλα τα δείγματα ήταν ικανοποιητικός, κάτι που φαίνεται και στο σχήμα 11.3, όπου ηλεκτροφορούνται τα δείγματα πριν και μετά την αντίδραση της DNάσης.

Από τις τιμές απορρόφησης που λάβαμε υπολογίσθηκαν η συγκέντρωση RNA κάθε δείγματος και στη συνέχεια ο όγκος που θα χρειαστεί για την αντίδραση μετατροπής του RNA σε cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης.



Σχήμα 11.3: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA σε πηκτή αγαρόζης 1.5% πριν (διαδρομές 1, 3, 6, 8) και μετά (διαδρομές 2, 4, 7, 9) τον καθαρισμό τους με DNάση

Διαδρομή 1: RNA του Δ₁ πριν τον καθαρισμό
 Διαδρομή 2: RNA του Δ₁ μετά τον καθαρισμό
 Διαδρομή 3: RNA του Δ₂ πριν τον καθαρισμό
 Διαδρομή 4: RNA του Δ₂ μετά τον καθαρισμό
 Διαδρομή 5: Δείκτης μοριακών βαρών DNA 100-10000bp
 Διαδρομή 6: RNA του Δ₃ πριν τον καθαρισμό
 Διαδρομή 7: RNA του Δ₃ μετά τον καθαρισμό
 Διαδρομή 8: RNA του Δ₄ πριν τον καθαρισμό
 Διαδρομή 9: RNA του Δ₄ μετά τον καθαρισμό

11.6 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Για την παρασκευή του cDNA από το καθαρό πλέον RNA των 4 δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα RNA που υπολογίστηκε με τη βοήθεια της φωτομέτρησης (πίνακας 11.2). Πιο αναλυτικά ετοιμάστηκαν τα ακόλουθα μείγματα.

Πίνακας 11.3: Δείγματα για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Δείγμα	Όγκος RNA [μL]	Όγκος Εξαμερών [μL]	Όγκος μίγματος αντιδραστηρίων*	Νερό DEPC [μL]	Τελικός όγκος [μL]
Δ ₁	1,9	1,0	6,3	4,5	13,7
Δ ₂	1,8	1,0	6,3	4,6	13,7
Δ ₃	1,2	1,0	6,3	5,2	13,7
Δ ₄	3,0	1,0	6,3	3,4	13,7

*το μίγμα αντιδραστηρίων αποτελείται από 0,3 μL διαλύματος M-MuLV, 2 μL διαλύματος τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοζιτών (dNTP) και 4 μL 5x ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης μεταγραφής

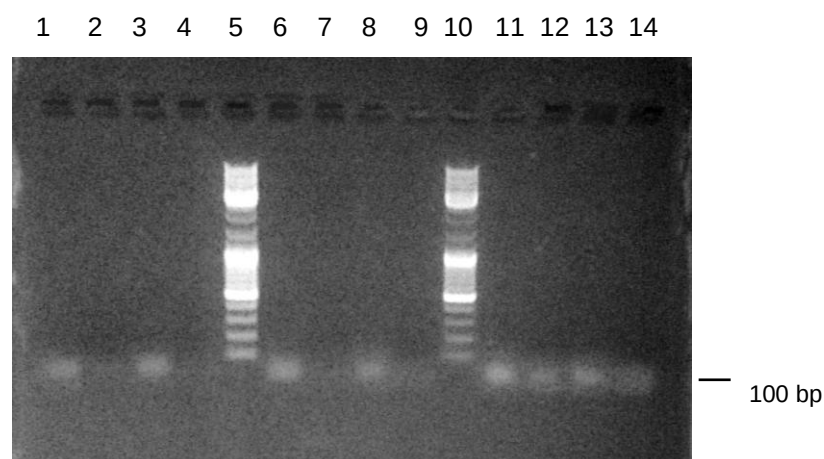
11.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την απομόνωση των δύο γονιδίων της βιοσυνθετικής πορείας της ΑΦΒ₁ και του γονιδίου της β-τουμπουλίνης από τα δείγματα cDNA του *A.parasiticus* χωρίς MeJA και με προσθήκη 3 διαφορετικών ποσοτήτων MeJA παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα δείγματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε η PCR.

Πίνακας 11.4: Κατηγορίες δειγμάτων για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Δείγμα	Περιγραφή δείγματος	cDNA [μL]	Εκκινητής πρόσθιος [μL]	Εκκινητής ανάστροφος [μL]	JumpStart™ [μL]	Νερό DEPC [μL]	Τελικός όγκος [μL]
1	aflR Δ ₁	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
2	aflR Δ ₁ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
3	aflR Δ ₃	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
4	aflR Δ ₃ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
5	aflC Δ ₁	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
6	aflC Δ ₁ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
7	aflC Δ ₃	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
8	aflC Δ ₃ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
9	btub Δ ₁	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
10	btub Δ ₁ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
11	btub Δ ₃	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
12	btub Δ ₃ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
13	aflR Δ ₂	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
14	aflR Δ ₂ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
15	aflR Δ ₄	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
16	aflR Δ ₄ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
17	aflC Δ ₂	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
18	aflC Δ ₂ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
19	aflC Δ ₄	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
20	aflC Δ ₄ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
21	btub Δ ₂	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
22	btub Δ ₂ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0
23	btub Δ ₄	5,0	2,5	2,5	10,0	-	20,0
24	btub Δ ₄ (T)	-	2,5	2,5	10,0	5,0	20,0

Ακολουθεί η εικόνα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1.5% ενός μέρους των προϊόντων της PCR.



Σχήμα 11.4: Προϊόντα της PCR για τα δείγματα Δ_1 και Δ_3

- Διαδρομή 1: Δείγμα aflR Δ_1
- Διαδρομή 2: Δείγμα aflR Δ_1 (T)
- Διαδρομή 3: Δείγμα aflC Δ_1
- Διαδρομή 4: Δείγμα aflC Δ_1 (T)
- Διαδρομή 5: Δείκτης μοριακών βαρών DNA 100-10000bp
- Διαδρομή 6: Δείγμα btub Δ_1
- Διαδρομή 7: Δείγμα btub Δ_1 (T)
- Διαδρομή 8: Δείγμα aflR Δ_3
- Διαδρομή 9: Δείγμα aflR Δ_3 (T)
- Διαδρομή 10: Δείκτης μοριακών βαρών DNA 100-10000bp
- Διαδρομή 11: Δείγμα aflC Δ_3
- Διαδρομή 12: Δείγμα aflC Δ_3 (T)
- Διαδρομή 13: Δείγμα btub Δ_3
- Διαδρομή 14: Δείγμα btub Δ_3 (T)

11.8 Συζήτηση

Όπως φαίνεται στην εικόνα του σχήματος 11.4, όπου έχει τρέξει μέρος των δειγμάτων της PCR, δεν έχουν σχηματισθεί τα προϊόντα που περιμέναμε, καθώς το μέγεθος όλων των δειγμάτων υπολογίζεται σε 60-70 bp, ενώ θα περιμέναμε προϊόντα μεγέθους 330 bp, 598 bp και 630 bp. Με δεδομένο ότι οι primers που χρησιμοποιήσαμε δεν είναι συμπληρωματικοί, καθώς η πιθανότητα αυτή ελέγχθηκε με τη βοήθεια του NCBI-Blast (κεφάλαιο 6.22.3), μία πιθανή αιτία για τα αποτελέσματα που προέκυψαν οφείλεται ίσως σε λανθασμένους primers, για το λόγο αυτό παραγγέλθηκαν καινούργιοι. Μία άλλη πιθανή ερμηνεία περιλαμβάνει τις συνθήκες της PCR που εφαρμόστηκαν (95°C για

105 s, 95°C για 15s, 35 κύκλοι στους 56°C για 30 s, στη συνέχεια στους 72°C για 30s και τέλος στους 72°C για 7 min και ψύξη στους 4°C). Για τη νέα αντίδραση PCR, όπου θα χρησιμοποιηθούν οι καινούργιοι primers, θα επιλέξουμε τις συνθήκες PCR που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ^[232] για την απομόνωση των γονιδίων αυτών. Τέλος, πιθανή αιτία για τα αποτελέσματα που λάβαμε αποτελεί και η πιθανότητα κακής απομόνωσης RNA - δηλαδή το RNA, το οποίο επεξεργαστήκαμε να ήταν σπασμένο -, αν και η εικόνα της ηλεκτροφόρησης δεν υποδεικνύει κάτι τέτοιο. Σε κάθε περίπτωση, η συγκεκριμένη μελέτη είναι σε εξέλιξη και, όπως αναφέρθηκε, πρόκειται να γίνουν επιπλέον δοκιμές με τους καινούργιους primers και διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης PCR.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Σύντμηση ή ακρωνύμιο	Αγγλική ονομασία	Ελληνική απόδοση
YES	Yeast Extract Saccharose	Εκχύλισμα ζύμης σακχαρόζης
MEA	Malt Extract Agar	Εκχύλισμα βύνης σε αγαρόζη
CYA	Czapek Yeast Extract Agar	Czapek εκχύλισμα ζύμης σε αγαρόζη
AFPA	Aspergillus Flavus Parasiticus Agar	Aspergillus Flavus Parasiticus Αγαρόζη
ZEA	Zearalenone	Ζεαραλενόνη
DON	Deoxynivalenol	Δεοξυνιβαλενόλη
CPA	Cyclopiazonic acid	Κυκλοπιαζονικό οξύ
AΦΒ ₁	Aflatoxin B ₁	Αφλατοξίνη Β ₁
AΦΜ ₁	Aflatoxin M ₁	Αφλατοξίνη Μ ₁
JA	Jasmonic acid	Ιασμονικό οξύ
MeJA	Methyl jasmonate	Μεθυλιασμονικό οξύ
FAS	Fatty acid synthase	Συνθετάση λιπαρών οξέων
PKS	Polyketide synthase	Συνθετάση πολυκετιδίων
NOR	Norsolorinic acid	Νορσολορινικό οξύ
AVN	Averantin	Αβεραντίνη
AVF	Averufin	Αβερουφίνη
HAVN	5'-hydroxyaverantin	5'-υδροξαβεραντίνη
OAVN	5'-oxoaverantin	5'-οξοαβεραντίνη
AVNN	Averufanin	Αβερουβανίνη
VHA	Versiconal hemiacetate	Οξική ημιακετάλη της βερσικονάλης
VAL	Versiconal	Βερσικονάλη
VERB	Versicolorin B	Βερσικολορίνη Β
VERA	Versicolorin A	Βερσικολορίνη Α
DMST	Dimethylsterigmatocystin	Διμεθυλοστεριγματοκυστίνη
ST	Sterigmatocystin	Στεριγματοκυστίνη
OMST	O-methylsterigmatocystin	Ο-μεθυλο-στεριγματοκυστίνη
TPP	Thiamine pyrophosphate	Πυροφωσφορική θειαμίνη
TA	Tuberonic acid	Τουμπερονικό οξύ
CA	Cucurbitic acid	Κουκουρβικό οξύ

DHJA	Dehydrojasmonic acid	Διϋδροϊασμονικό οξύ
LOX	Lipoxygenase	Λιποξυγενάση
13S-HPOTE	13S-Hydroperoxy-cis-9,trans-11, cis-15-octadecatrienoic acid	13S-υδροϋπεροξυ- cis-9, trans-11, cis-15-οκταδεκατριενικό οξύ
AOS	Allene oxide synthase	Συνθετάση του αλλενοξειδίου
AOC	Allene oxide cyclase	Κυκλάση του αλλενοξειδίου
OPDA	Oxophytodienoic acid	Οξοφυτοδιενοϊκό οξύ
OPR	Oxophytodienoic acid reductase	12-οξοφυτοδιενοϊκή αναγωγάση
HPL	Hydroperoxide lyase	Υδροϋπεροξειδωτική λυάση
HPLC	High performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
PBS	Phosphate buffer saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφωρικών αλάτων
SPE	Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεής φάσης
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
ANOVA	Analysis of variance	Ανάλυση διακύμανσης

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κ.Δ. Μπαλής, Εισαγωγικά μαθήματα μυκητολογίας, Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή, 1993.
2. R.H. Whittaker, New concepts of kingdoms of organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms, *Science*, vol. 163, no. 863, 1969, pp. 150-160.
3. L. Margulis, Whittaker's five kingdoms of organisms: minor revisions suggested by considerations of the origin of mitosis, *Evolution*, vol. 25, no. 1, 1971, pp. 242-245.
4. M.L. Medina, P.A. Haynes, L. Breci and W.A. Francisco, Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*, *Proteomics*, vol. 5, 2005, pp. 3153-3161.
5. Σ. Κολιάης, Μικροβιολογία, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1992.
6. Ε.Κ. Βουδούρης, Τεχνολογία Τροφίμων, Τόμος Α', Γ' Έκδοση, Αθήνα, 1973.
7. Γ.Δ. Μπαλατσούρας, Μικροβιολογία Τροφίμων, Γεωργικό Πανεπιστήμιο, Αθήνα, 1993.
8. Σ.Γ. Μαράκης και Α.Δ. Καραγκούνης, Σημειώσεις Μαθήματος και Εργαστηρίου Γενικής Μικροβιολογίας, Εργαστήριο Γενικής Βοτανικής, Αθήνα, 1985.
9. K.H. Domsch, W. Gams and T.H. Anderson, *Compendium of Soil Fungi*, Academic Press, London, 1980.
10. M. Christensen and D.E. Tuthill, *Aspergillus, An overview* In: *Advances on Penicillium and Aspergillus Systematics*, R.A. Samson, J.I. Pitt eds., New York: Plenum Press, 1985, pp. 195-210.
11. J.I. Pitt and A.D. Hocking, *Fungi and Food Spoilage*, Blackie Academic and Professional, London, 1997.
12. D.M. Geiser, M.A. Klich, J.C. Frisvad, S.W. Peterson, J. Varga and R.A. Samson, The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*, *Studies in Mycology*, vol. 59, 2007, pp. 1-10.
13. J.W. Bennett, *An overview of the genus Aspergillus* In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, Caister Academic Press, Japan, 2010, pp. 1-18.
14. K.B. Raper and D. Fennell, *The genus Aspergillus*, MD: Williams and Wilkins, Baltimore, 1965, pp. 1-686.
15. D. Abramson and R.M. Clear, A convenient method for assessing mycotoxin production in cultures of *Aspergillus*, *J. Food Prot.*, vol. 59, no. 6, 1996, pp. 642-644.
16. Π. Κοτζεκίδου-Ρούκα, Μικροβιολογία Τροφίμων, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, 1993.

17. M.A. Klich and J.I. Pitt, *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*, North Ryde, N.S.W.: CSIRO Division of Food Science and Technology, 1988, pp. 1-116.
18. H. Gourama and L.B. Bullerman, *A.flavus* and *A.parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds, *J. Food Prot.*, vol. 58, no. 12, 1995, pp. 1395-1404.
19. R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, 2000, pp. 1-2372.
20. J.I. Pitt, Identification Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*, Food Safety and Public Health Challenges, Διατμηματικό Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, Αθήνα, 2005.
21. M.D. Northolt and L.B. Bullerman, Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions, *J. Food Prot.*, vol. 46, no. 6, 1982, pp. 519-526.
22. J.C. Frisvad, T.O. Larsen, R. de Vries, M. Meijer, J. Houbraken, F.J. Cabañes, K. Ehrlich and R.A. Samson, Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins, *Stud. Mycol.*, vol. 59, 2007, pp. 31-37.
23. V. Meyer, B. Wu and A.F.J. Ram, *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives, *Biotechnol. Lett.*, vol. 33, 2011, pp. 469-476.
24. D. Lubertozzi and J.D. Keasling, Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression, *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, 2009, pp. 53-75.
25. C. Thom and K.B. Raper, *Manual of the Aspergilli*, MD: Williams and Wilkins, Baltimore, 1945.
26. M.A. Klich and J.I. Pitt, Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A.parasiticus* and other closely related species, *T. Brit. Mycol. Soc.*, vol. 91, no. 1, 1988, pp.99-108.
27. J.I. Pitt, Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *J. Food Prot.*, vol. 56, no. 3, 1993, pp. 265-269.
28. J. Varga, J.C. Frisvad and R.A. Samson, Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*, *Stud. Mycol.*, vol. 69, 2011, pp. 57-80.
29. Y. Fang, J. Hu, S. Xiong and S. Zhao, Effect of low-dose microwave radiation on *Aspergillus parasiticus*, *Food Control*, vol. 22, 2011, pp. 1078-1084.
30. C. Moreau and M. Moss, *Moulds, Toxins and Food*, eds. John Wiley & Sons, New York, 1979, pp. 1-477.

31. B.J. Wilson, Toxins other than Aflatoxins produced by *Aspergillus flavus*, *Bacteriol. Rev.*, vol. 30, no. 2, 1966, pp. 478-484.
32. D.W. Brown, F.M. Hauser, R. Tommasi, S. Corlett and J.J. Salvo, Structural elucidation of a putative conidial pigment intermediate in *Aspergillus parasiticus*, *Tetrahedron Lett.*, vol. 34, 1993, pp. 419-422.
33. Centraalbureau voor Schimmel cultures, www.cbs.knaw.nl, March 2012.
34. J.W. Bennett and M.A. Klich, Mycotoxins, *Clinic. Microbiol. Rev.*, vol. 16, no. 3, 2003, pp. 497-516.
35. J.E. Smith and M.O. Moss, *Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance*, eds. John Wiley & Sons, New York, 1985, pp. 1-148.
36. A.L. Demain and A. Fang, The natural functions of secondary metabolites, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 69, 2000, pp. 1-39.
37. C.M. Christensen, *Molds, Mushrooms and Mycotoxins*, University of Minnesota Press, Minneapolis, 1975.
38. J.E. Burnside, W. Sippel, J. Forgacs, W. Carll, M. Atwood and E. Doll, A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn. Experimental production with pure cultures of molds, *Am. J. Vet. Res.*, vol. 18, no. 69, 1957, pp. 817-824.
39. G. Wong, First Botany 135 Exam, October 2005, University of Botany, Hawaii.
40. J.J. Theron, K.J. Van der Merwe, N. Liebenberg, H.J.B. Joubert and W. Nel, Acute liver injury in ducklings and rats as a result of Ochratoxin poisoning, *J. Path. Bact.*, vol. 91, 1966, pp. 521-529.
41. Ι. Γιαννάκης, Μυκοτοξίνες στα τρόφιμα – Κίνδυνοι και Τρόποι Αντιμετώπισης, *Υγιεινή και Ασφάλεια Τροφίμων*, vol. 8, 1998, pp. 13-18.
42. M. Jay James, *Modern Food Microbiology, 4th Edition*, Van Norstand Renl, New York, 1992.
43. E.E. Creppy, Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicol. Lett.*, vol. 127, 2002, pp. 19-28.
44. J.E. Smith, C.W. Lewis, J.G. Anderson and G.L. Solomons, Mycotoxins in human nutrition and health, Directorate-General XII, Science, Research and Development, European Commission, 1994.
45. C.P. Kurzman, B.W. Horn and C.W. Hesseltine, *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*, *A Van Leeuw. J. Microb.*, vol. 53, 1987, pp. 147-158.
46. T. Goto, D.T. Wicklow and Y. Ito, Aflatoxin and Cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamari* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, no. 11, 1996, pp. 4036-4038.

47. D.L. Eaton and J.D. Groopman, *The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*, Academic Press, San Diego, 1994, pp. 1-544.
48. M.J. Sweeney and A.D.W. Dobson, Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 43, 1998, pp.141-158.
49. R.A. Squire, Ranking animal carcinogenesis: a proposed regulatory approach, *Science*, vol. 214, no. 4523, 1981, pp. 877-880.
50. R. Frobisch, B. Bradley, D. Wagner, P. Long-Bradley and H. Hairston, Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain, *J. Food Prot.*, vol. 49, 1986, pp. 781-785.
51. <http://www.fda.gov>, March 2012.
52. W. Ellis, J. Smith, B. Simpson and J. Oldhman, Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 30, 1991, pp. 403-439.
53. D. Guzman de Pena and J. Herrera, Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*, *J. Fungal Genet. Biol.*, vol. 21, 1997, pp. 198-205.
54. D. Thanaboripat and N. Mongkontanawut, Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil, *Asian Food J.*, vol. 4, 1988, pp. 71-72.
55. J. Reiss, Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B₁ under the influence of conidiogenesis affecting compounds, *Arch. Microbiol.*, vol. 133, 1982, pp. 236-238.
56. D. Bhatnagar, K.C. Ehrlich and T.E. Cleveland, *Oxidation-reduction reactions in biosynthesis of secondary metabolites* In: *Handbook of applied mycology, vol.5, mycotoxins in ecological systems*, Marcel Dekker, New York, 1992, pp. 255-286.
57. M.F. Dutton, Enzymes and aflatoxin biosynthesis, *Microbiol. Rev.*, vol. 52, no. 2, 1988, pp. 274-295.
58. C.A. Townsend, S.B. Christensen and K. Trautwein, Hexanoate as a starter unit in polyketide biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, 1984, pp. 3868-3869.
59. G.A. Payne and M.P. Brown, Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis, *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 36, 1988, pp. 329-362.
60. J.W. Bennett and L.S. Lee, Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: aflatoxins and other bisfuranoids, *J. Food Prot.*, vol. 42, no. 10, 1979, pp. 805-809.
61. J. Yu, P.K. Chang, K.C. Ehrlich, J.W. Cary, D. Bhatnagar, T.E. Cleveland, G.A. Payne, J.E. Linz, C.P. Woloshuk and J.W. Bennett, Clustered pathway genes in

- aflatoxin biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 3, 2004, pp. 1253-1262.
62. C.D. Scory, P.K. Chang, J. Cary and J.E. Linz, Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of Versicolorin A to Sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, no. 11, 1992, pp. 3527-3537.
 63. P.K. Chang, C.D. Scory and J.E. Linz, Cloning of a gene associated with aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*, *Curr. Genet.*, vol. 21, 1992, pp. 231-233.
 64. M.P. Brown, C.S. Brown-Jenco and G.A. Payne, Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis, *Fungal Genet. Biol.*, vol. 26, 1999, pp. 81-98.
 65. J. Yu and K.C. Ehrlich, Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes, *Biochem. Molec. Biol.*, 2011, pp. 41-66.
 66. K.C. Ehrlich, Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis, *Toxins*, vol. 1, 2009, pp. 37-58.
 67. D.W. Brown, T.H. Adams and N.P. Keller, *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, 1996, pp. 14873-14877.
 68. C.M. Watanabe, D. Wilson, J.E. Linz and C.A. Townsend, Demonstration of the catalytic roles and evidence for the physical association of type I fatty acid synthases and a polyketide synthase in the biosynthesis of aflatoxin B₁, *Chemistry and Biology*, vol. 3, no. 6, 1996, pp. 463-469.
 69. G.H. Feng and T.J. Leonard, Characterization of the polyketide synthase gene (*pksL1*) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*, *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 21, 1995, pp. 6246-6254.
 70. K.C. Ehrlich, P. Li, L. Scharfenstein and P.K. Chang, HypC, the Anthrone Oxidase Involved in Aflatoxin Biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 10, 2010, pp. 3374-3377.
 71. K. Yabe, Y. Nakamura, H. Nakajima, Y. Ando and T. Hamasaki, Enzymatic Conversion of Norsolorinic Acid to Averufin in Aflatoxin Biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 57, no. 5, 1991, pp. 1340-1345.
 72. P.K. Chang, J. Yu, K.C. Ehrlich, S.M. Boue, B.G. Montalbano, D. Bhatnagar and T.E. Cleveland, *adhA* in *Aspergillus parasiticus* Is Involved in Conversion of 5'-Hydroxyaverantin to Averufin, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 11, 2000, pp. 4715-4719.

73. N.C. Wan and D.P. Hsieh, Enzymatic Formation of the Bisfuran Structure in Aflatoxin Biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 39, no. 1, 1980, pp. 109-112.
74. K. Yabe and T. Hamasaki, Stereochemistry during Aflatoxin Biosynthesis: Cyclase Reaction in the Conversion of Versiconal to Versicolorin B and Racemization of Versiconal Hemiacetal Acetate, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, no. 8, 1993, pp. 2493-2500.
75. K. Yabe, Y. Ando and T. Hamasaki, Biosynthetic Relationship among Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, no. 8, 1988, pp. 2101-2106.
76. D. Bhatnagar, T. Cleveland and D. Kingston, Enzymological evidence for separate pathways for aflatoxin B₁ and B₂ biosynthesis, *Biochemistry*, vol. 30, 1991, pp. 4343-4350.
77. R.C. Yao and D.P. Hsieh, Step of Dichlorvos Inhibition in the Pathway of Aflatoxin Biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 28, no. 1, 1974, pp. 52-57.
78. J. Yu, P.K. Chang, K.C. Ehrlich, J.W. Cary, B. Montalbano, J.M. Dyer, D. Bhatnagar and T.E. Cleveland, Characterization of the Critical Amino Acids of an *Aspergillus parasiticus* Cytochrome P-450 Monooxygenase Encoded by *ordA* That Is Involved in the Biosynthesis of Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 12, 1998, pp. 4834-4841.
79. K.M. Henry and C.A. Townsend, Ordering the Reductive and Cytochrome P450 oxidative Steps in Dimethylsterigmatocystin Formation Yields General Insights into the Biosynthesis of Aflatoxin and Related Fungal Metabolites, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, 2005, pp. 3724-3733.
80. K. Yabe, Y. Ando, J. Hashimoto and T. Hamasaki, Two distinct O-Methyltransferases in Aflatoxin Biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 55, no. 9, 1989, pp. 2172-2177.
81. K.C. Ehrlich, P.K. Chang, L. Scharfenstein Jr., J.W. Cary, J.M. Crawford and C.A. Townsend, Absence of the aflatoxin biosynthesis gene, *norA*, allows accumulation of deoxyaflatoxin B₁ in *Aspergillus flavus* cultures, *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 305, no. 1, 2010, pp. 65-70.
82. M. Chatterjee and C.A. Townsend, Evidence for the Probable Final Steps in Aflatoxin Biosynthesis, *J. Org. Chem.*, vol. 59, 1994, pp. 4424-4429.
83. T.E. Cleveland and D. Bhatnagar, Evidence for *de novo* synthesis of an aflatoxin pathway methyltransferase near the cessation of active growth and the onset of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* mycelia, *Can. J. Microbiol.*, vol. 36, 1990, pp. 1-5.

84. N.P. Keller, H.C. Dischinger, D. Bhatnagar, T.E. Cleveland and A.H. Ullah, Purification of a 40-Kilodalton Methyltransferase Active in the Aflatoxin Biosynthetic Pathway, B₁, B₂ G₁ and G₂, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, no. 2, 1993, pp. 479-484.
85. R. Prieto and C.P. Woloshuk, *ordl*, an Oxidoreductase Gene Responsible for Conversion of O-Methylsterigmatocystin to Aflatoxin in *Aspergillus flavus*, B₁, B₂ G₁ and G₂, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 5, 1997, pp. 1661-1666.
86. D.W. Udway, L.K. Casillas and C.A. Townsend, Synthesis of 11-Hydroxyl O-Methylsterigmatocystin and the Role of a Cytochrome P-450 in the Final Step of Aflatoxin Biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, 2002, pp. 5294-5303.
87. J. Yu, D. Bhatnagar and K.C. Ehrlich, Aflatoxin Biosynthesis, *Rev. Iberoam. Micol.*, vol. 19, 2002, pp. 191-200.
88. W. Niehaus and W. Jiang, Nitrate induces enzymes of the mannitol cycle and suppresses Versicolorin synthesis in *A.parasiticus*, *Mycopathologia*, vol. 107, 1989, pp. 131-137.
89. W. Niehaus and R. Dilts, Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *A.parasiticus*, *J. Bacteriol.*, vol. 151, 1982, pp. 243-250.
90. D. Bhatnagar, A.H. Ullah and T.E. Cleveland, Purification and Characterization of a methyltransferase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 163 involved in aflatoxin biosynthetic pathway, *Prep. Biochem.*, vol. 18, no. 3, 1988, pp. 321-349.
91. E. Sakuno, K. Yabe and H. Nakajima, Involvement of two cytosolic enzymes and a novel intermediate 5'- Oxoaverantin, in the pathway from 5'- Hydroxyaverantin to Averufinin Aflatoxin biosynthesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 11, 2003, pp. 6418-6426.
92. M.D. Northolt and L.B. Bullerman, Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions, *J. Food Prot.*, vol. 45, 1982, pp.519-526.
93. ICMSF, *Microorganisms in Foods, 5, Characteristics of Chemical Pathogens*, Blackie Academic & Professional, London, 1996.
94. W.O. Ellis, J.P. Smith, B.K. Simpson, H. Ramaswamy and G. Doyon, Growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts stored under modified atmosphere packaging (MAP) conditions, *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 22, 1994, pp. 173-187.
95. I.M. Refai, O.A. Awadalla and A.M. Abou Zeid, Effects of some insect growth regulators on growth of *Aspergillus flavus* and its productivity of Aflatoxin B₁ and lipids, *Food Addit. Contam.*, vol. 12, no. 4, 1995, pp. 585-890.

96. S.B. Rodriguez and N.E. Mahoney, Inhibition of Aflatoxin Production by Surfactants, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, 1994, pp. 106-110.
97. G.R. Devi and H. Polasa, Diacetyl: A growth and toxin inhibitor of *Aspergilli*, *J. Stored Prod. Res.*, vol. 21, no. 4, 1985, pp. 195-197.
98. J.R. Chipley and N. Uraih, Effects of various acids and salts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 40, 1976, pp. 352-357.
99. M.K. Ghosh, A. Chabra, P.P. Atreya and R.C. Chopra, Effect of treating with propionic acid and sodium hydroxide on biosynthesis of aflatoxin on groundnut cake, *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 60, 1996, pp. 43-49.
100. A.M. Calvo and S. Dhingra, *Conserved regulatory mechanisms controlling aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis* in: *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*, R.G. Guevara-González, Intech, 2011, pp. 67-88.
101. R.H. Luchese and W.F. Harrigan, Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors, *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 74, 1993, pp. 5-14.
102. W. Niehaus and R. Dilts, Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *A.parasiticus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 228, 1984, pp. 113-119.
103. J. Park and S. Han, Effects of trace elements on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*, *Korean J. Vet. Public Health*, vol. 12, 1988, pp. 85-108.
104. M. Shenasi, K.E. Aidoo and A.A.G. Candlish, Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 79, 2002, pp. 113-119.
105. K.K. Sinha., A.K. Sinha and G. Prasad, The effect of clove and cinnamon oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*, *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 16, 1993, pp. 114-117.
106. S. Morozumi, Isolation, purification, and antibiotic activity of o- methoxy-cinnamaldehyde from cinnamon, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 36, no. 4, 1978, pp. 958-962.
107. K.S. Bilgrami, K.K. Sinha. and A.K. Sinha, Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol & onion & garlic extracts *Indian J. Med. Res.*, vol. 96, 1992, pp. 171-175.
108. N.D. Davis, U.L. Diener and D.W. Eldridge, Production of Aflatoxins B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 14, no. 3, 1966, pp. 378-380.

109. R.A. Norton, Inhibition of Aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus flavus* by anthocyanidins and related flavonoids, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 3, 1999, pp. 1230-1235.
110. R.L. Buchanan, D.G. Hoover and S.B. Jones, Caffeine Inhibition of Aflatoxin production: Mode of Action, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.46, no. 5, 1983, pp. 1193-1200.
111. R.L. Buchanan and D.F. Lewis, Caffeine Inhibition of Aflatoxin Synthesis: Probable Site of Action, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.47, no. 6, 1984, pp. 1216-1220.
112. H. Gourama and L.B. Bullerman, Effects of oleuropein on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 299, *Lebens. Wiss. Tech.*, vol. 20, 1987, pp. 226-228.
113. I. Rasooli and M.R. Abyaneh, Inhibitory effects on Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, *Food Control*, vol. 6, 2004, pp. 479-483.
114. F.G. Peers and C.A. Linsell, Aflatoxin contamination and its heat stability in Indian cooking oils, *Trop. Sci.*, vol. 17, 1975, pp. 229-232.
115. R. Mann and H.J. Rehm, Degradation products from Aflatoxin B₁ by *Corynebacterium rubrum*, *A.niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambiguous*, *European. J. Appl. Microbiol.*, vol. 2, 1976, pp. 297-306.
116. A.J. Feuel, Aflatoxin in groundnuts. IV. Problems of detoxification, *Trop. Sci.*, vol. 8, 1966, pp. 61-70.
117. M.P. Doyle, R.S. Applebaum, R.E. Brackett and E.H. Marth, Physical, Chemical and Biological Degradation of Mycotoxins in Foods and Agricultural Commodities, *J. Food Prot.*, vol. 45, no. 10, 1982, pp. 964-971.
118. E.H. Marth and M.P. Doyle, Update on molds: degradation of aflatoxin, *Food Technol.*, vol. 33, 1979, pp. 81-87.
119. W.P. Norred, Use of ammonia treatment to destroy aflatoxins in corn, *J. Food Prot.*, vol. 45, 1982, pp. 972-976.
120. R.W. Detroy and C.W. Hesseltine, Isolation and biological activity of a microbial conversion product of Aflatoxin B₁, *Nature*, vol. 219, 1968, p. 967.
121. J.A. Robertson, D.J. Teunissen and G.J. Boudreaux, Isolation and structure of a biologically reduced Aflatoxin B₁, *J. Agr. Food Chem.*, vol. 18, 1970, pp. 1090-1091.
122. L.A. Goldblatt, Control and removal of aflatoxin, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, vol. 48, 1970, pp. 605-610.

123. M.P. Doyle and E.H. Marth, Aflatoxin at several initial concentrations is degraded by different amounts of mycelium of *A.parasiticus*, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, vol. 166, 1978, pp. 359-362.
124. M.P. Doyle and E.H. Marth, Aflatoxin is degraded by fragmented and intact mycelia of *Aspergillus parasiticus*, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 6, 1978, pp. 95-100.
125. M.P. Doyle and E.H. Marth, Peroxidase activity in mycelia of *Aspergillus parasiticus* that degrade aflatoxin, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 7, 1979, pp. 211-217.
126. A.B. Hamid and J.E. Smith, Degradation of aflatoxin by *Aspergillus flavus*, *J. Gen. Microbiol.*, vol. 133, no. 8, 1987, pp. 2023-2029.
127. C.P. Wild and P.C. Turner, The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions, *Mutagenesis*, vol. 17, no. 6, 2002, pp. 471-481.
128. K. Jaskiewicz, P.M. Close, P.G. Thiel and R.G. Cole, Preliminary on toxic effects of cyclopiazonic acid alone and in combination with Aflatoxin B₁ in non-humans primates, *Toxicology*, vol. 3, 1988, pp. 297-307.
129. F.S. Chu, Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures, *Mutat. Res.* vol. 259, 1991, pp. 291-396.
130. C.P. Woloshuk, Genetic organization and function of the Aflatoxin B₁ biosynthetic genes-Mini Review, *FEMS Microbiol. Letters*, vol. 160, 1998, pp. 169-176.
131. F. Aguilar, S.P. Hussain and P. Cerutti, Aflatoxin B₁ induces the transversion of G→T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, 1993, pp. 8586-8590.
132. H.P. Van Egmond, Introduction to food borne fungi, *Food Addit. Contam.*, vol. 12, no. 3, 1995, pp. 321-330.
133. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8th March 2001, *Official Journal of the European Communities*, L 77/1, 16.3.2001.
134. J.L. Herrman and R. Walker, Risk analysis of mycotoxins by the joint FAO/WHO expert Committee on food additives (JECFA), *Food Nutrition and Agriculture*.
135. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12th March 2002, *Official Journal of the European Communities*, L 75/18, 16.3.2002.
136. E.H. Papp, K. Otta, G. Zaray and E. Mincsovcics, Liquid chromatographic determination of aflatoxins, *Microchemical Journal*, vol. 73, 2002, pp. 39-46.
137. F. Schaller, Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules, *J. Exp. Bot.*, vol. 52, no. 354, 2001, pp. 11-23.

138. G. Semblner and B. Parthier, The biochemistry and the physiological and molecular actions of Jasmonates, *Annu. Rev. Plant Phys. And Plant Mol. Biol.*, vol. 44, 1993, pp. 569-589.
139. D.C. Altridge, S. Galt, D. Giles and W.B. Turner, Metabolites of *Lasioidiploidia theobromae*, *J. Chem. Soc. Section C*, 1971, pp. 1623-1627.
140. Y. Koda, The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development, *Intern. Rev. Cytol.*, vol. 135, 1992, pp. 155-197.
141. E. Demole, E. Lederer and D. Mercier, Isolement et determination de la structure du jasmonate de methyle, constituant odorant caracteristique de l'essence de jasmine, *Helv. Chim. Acta*, vol. 45, 1962, pp. 675-685.
142. F. Schaller, A. Schaller and A. Stintzi, Biosynthesis and metabolism of jasmonates, *J. Plant Growth Regul.*, vol. 23, 2005, 179-199.
143. E.E. Farmer and C.A. Ryan, Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 87, 1990, pp. 7713-7716.
144. B.A. Vick and D.C. Zimmermann, Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species, *Plant Physiol.*, vol. 75, 1984, pp. 458-461.
145. B.A. Vick and D.C. Zimmermann, The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 111, no. 2, 1983, pp. 470-477.
146. I.F. Acosta and E.E. Farmer, Jasmonates, *Am. Soc. Plant Biol.*, 2010, pp. 1-13.
147. M. Hamberg and P. Fahlstadius, Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 276, no. 2, 1990, pp. 518-526.
148. A. Stintzi, H. Weber, P. Reymond, J. Browse and E.E. Farmer, Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones, *PNAS*, vol. 98, no. 22, 2001, pp. 12837-12842.
149. J. Ziegler, I. Stenzel, B. Hause, H. Maucher, M. Hamberg, R. Grimm, M. Ganai and C. Wasternack, Molecular cloning of allene oxide cyclase, *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 25, 2000, pp. 19132-19138.
150. R.A. Creelman and J.E. Mullet, Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 48, 1997, pp. 355-381.
151. F. Schaller, C. Biesgen, C. Müssig, T. Altmann and E.W. Weiler, 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis, *Planta*, vol. 210, 2000, pp. 979-984.
152. H. Sobajima, M. Takeda, M. Nishiyama and H. Yamane, Cloning and characterization of a jasmonic acid-responsive gene encoding 12-

- oxophytodienoic acid reductase in suspension-cultured cells, *Planta*, vol. 216, no. 4, 2003, pp. 692-698.
153. B.A. Vick and D.C. Zimmerman, Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts, *Plant Physiol.*, 1987b, pp. 1073-1078.
 154. H. Weber, Fatty acid-derived signals in plants, *Trends Plant Sci.*, vol. 7, no. 5, 2002, pp. 217-230.
 155. F. Schaller and E. Weiler, Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants, 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase, *Eur. J. Biochem.*, vol. 245, 1997, pp. 294-299.
 156. B. Gerhardt, *Catabolism of fatty acids (α - and β -oxidation)* in: Moore T.S. eds. *Lipid Metabolism in Plants*, Boca Raton, CRC, Press Florida, pp. 527-565, 1993.
 157. N.C. Avanci, D.D. Luche, G.H. Goldman and M.H.S. Goldman, Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction, *Gen. Mol. Res.*, vol. 9, no. 1, 2010, pp. 484-505.
 158. E. Dainese, B.C. Angelucci, A. Sabatucci, V.De Filippis, G. Mei and M. Maccarrone, A novel role for iron in modulating the activity and membrane-binding ability of a trimmed soybean lipoxygenase-1, *FASEB J.*, vol. 24, 2010, pp. 1725-1736.
 159. J. Siedow, Plant lipoxygenase: structure and function, *Annu. Rev. Plant Phys.*, vol. 42, 1991, pp. 145-188.
 160. G.B. Burow, T.C. Nesbitt, J. Dunlap and N.P. Keller, Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis, *MPMI*, vol. 10, no. 3, 1997, pp. 380-387.
 161. E.K. Pistorius and B. Axelrod, Iron, an essential component of lipoxygenase, *J. Biol. Chem.*, vol. 249, no. 10, 1974, pp. 3183-3186.
 162. M. Williams, J.J. Salas, J. Sanchez and J.L. Harwood, Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*), *Phytochemistry*, vol. 53, pp. 13-19.
 163. A. Hatanaka, The biogeneration of green odour by green leaves, *Phytochemistry*, vol. 34, 1993, pp. 1201-1208.
 164. K. Matsui, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf and T. Kajiwara, Molecular cloning and expression of Arabidopsis fatty acid hydroperoxide lyase, *Plant Cell Physiol.*, vol. 40, 1999, pp. 477-481.
 165. E. Blee and F. Schuber, Biosynthesis of cutin monomers: involvement of a lipoxygenase/peroxygenase pathway, *Plant J.*, vol. 4, 1993, pp. 123-133.
 166. E.E. Farmer and C.A. Ryan, Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors, *Plant Cell*, vol. 4, 1992, pp. 129-134.

167. H. Warzecha and M. Müller, Long distance signaling in plants, *Phytochemistry*, vol. 60, 2002, pp. 233-240.
168. P.E. Staswick, Jasmonate, genes and fragrant signals, *Plant Physiol.*, vol. 99, 1992, pp. 804-807.
169. J. Leon, E. Rojo and J. Sanchez-Serrano, Wound signaling in plants, *J. Exp. Bot.*, vol. 52, no. 354, 2001, pp. 1-9.
170. C. Stuhlfelder, M.J. Müller and H. Warzecha, Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase, *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, 2004, pp. 2976-2983.
171. A. Schaller, Oligopeptide signaling and the action of systemin, *Plant Mol. Biol.*, vol. 40, 1999, pp. 763-769.
172. G. Glauser, E. Grata, L. Dubugnon, S. Rudaz, E.E. Farmer and J.L. Wolfender, Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding, *J.Biol.Chem.*, vol. 283, 2008b, pp. 16400-16407.
173. G. Glauser, L. Dubugnon, S.A. Mousavi, S. Rudaz, J.L. Wolfender and E.E. Farmer, Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*, *J.Biol.Chem.*, vol. 284, 2009, pp. 34506-34513.
174. G.A. González-Aguilar, J.G. Buta and C.Y. Wang, Methyl jasmonate reduces chilling injury symptoms and enhances colour development of “Kent” mangoes, *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, 2001, pp. 1244-1249.
175. A. Santner and M. Estelle, The JAZ proteins link jasmonate perception with transcriptional changes, *The Plant Cell*, vol. 19, 2007, pp. 3839-3842.
176. S.A. Christensen and M.V. Kolomiets, The lipid language of plant-fungi interactions, *Fungal Gen. Biol.*, vol. 48, no. 1, 2011, pp. 4-14.
177. S. Fonseca, A. Chini, M. Hamberg, B. Adie, A. Porzel, R. Kramell, O. Miersch, C. Wasternack and R. Solano, (+)-7-*iso*-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate, *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 5, 2009, pp. 344-350.
178. S. Rhizopoulou, Physiological responses of *Capparis Spinosa* L. to drought, *J. Plant Physiol.*, vol. 136, 1990, pp. 341-348.
179. M. Jacobs, The genus *Capparis* from the Indus to the Pacific, *Blumea*, vol. 12, no. 3, 1965, pp. 385-541.
180. V. Romeo, M. Ziino, D. Giuffrida, C. Condurso and A. Verzera, Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS, *Food Chem.*, vol. 101, 2007, pp. 1272-1278.

181. C. Inocencio, D. Rivera, F. Alcaraz and J.A. Barrena, *A systematic revision of Capparis section Capparis (Capparaceae)*, Faculty of Biology, Murcia, Spain, 2006.
182. C. Linnaeus, *Species Plantarum*, Stockholm, 1753, pp. 1-1200.
183. G.H. Lawrence, *Taxonomy of vascular plants*, The Macmillan Company, New York, 1951.
184. Π. Μπρέστα, *Επίδραση της υδατικής καταπόνησης σε φυσιολογικές και ανατομικές παραμέτρους των φύλλων σε ανθεκτικές και μη ποικιλίες σίτου*, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009.
185. S. Rhizopoulou, K. Heberlein and A. Kassianou, Field water relations of *Capparis spinosa* L., *J. Arid. Environ.*, vol. 36, 1997, pp. 237-248.
186. M. Rodrigo, M.J. Lazaro, A. Alvarruiz and V. Giner, Composition of capers (*Capparis Spinosa*): Influence of cultivar, size and harvest date, *J. Food Sci.*, vol. 57, no. 5, 1992, pp. 1152-1154.
187. N. Tlili, A. Khaldi, S. Triki and S. Munné-Bosch, Phenolic compounds and vitamin antioxidants of caper (*Capparis Spinosa*), *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 65, 2010, pp. 260-265.
188. Z. Ramezani, N. Aghel and H. Keyghobadi, Rutin from different parts of *Capparis Spinosa* growing wild in Khuzestan/Iran, *Pakistan J. Biol. Sci.* vol. 11, no. 5, 2008, pp. 768-772.
189. C. Inocencio, D. Rivera, F. Alcaraz and F.A. Tomas-Barberan, Flavonoid content of commercial capers (*Capparis spinosa*, *C. sicula* and *C. orientalis*) produced in Mediterranean countries, *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 212, 2000, pp. 70-74.
190. C. Proestos, I.S. Boziaris, G.-J.E. Nychas and M. Komaitis, Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, *Food Chem.*, vol. 95, 2006, pp. 664-671.
191. A. Kjaer, *The natural distribution of glucosinolates: a uniform group of sulfur-containing glucosides*, In: Bendy and Santesson Editors, *Chemistry in Botanical Classification*, Academic Press, London, 1974, pp. 229-234.
192. A. Kjaer, *Glucosinolates in the Cruciferae*, In: Vaughan, MacLeod and Jones Editors, *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*, Academic Press, London, 1976, pp. 207-219.
193. B. Matthäus and M. Özcan, Glucosinolates and fatty acid, sterol and tocopherol composition of seed oils from *Capparis Spinosa* Var. *Spinosa* and *Capparis*

- ovata Desf. Var. *canescens* (Coss.) Heywood, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, 2005, pp. 7136-7141.
194. N. Tlili and S. Triki, Sterol composition of caper (*Capparis spinosa*), *African J. Biotechnol.* Vol. 9, no. 22, 2010, pp. 3328-3333.
 195. N. Tlili and A. Khaldi, Fatty acids, total phenols and protein of caper, acacia, cactus and carob seeds, *As. J. Biotechnol. Res.*, vol. 2, no. 4, 2011, pp. 384-390.
 196. N. Tlili and S. Triki, Protein, lipid, aliphatic and triterpenic alcohol content of caper seeds, "*Capparis spinosa*", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 88, 2011, pp. 265-270.
 197. N. Tlili, N. Nasri, E. Saadaoui, A. Khaldi and S. Triki, Carotenoid and tocopherol composition of leaves, buds and flowers of *Capparis Spinosa* grown wild in Tunisia, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, 2009, pp. 5381-5385.
 198. N. Tlili, W. Elfalleh, E. Saadaoui, A. Khaldi, S. Triki and N. Nasri, The caper (*Capparis* L.): Ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties, *Filoterapia*, vol. 82, no. 2, 2011, pp. 93-101.
 199. A. Yili, W. Tao, B.T. Sagdullaev, H.A. Aisa, N.T. Ul'chenko, A.I. Glushenkova and R.K. Rakhmanberdyeva, Lipids and carbohydrates from *Capparis Spinosa* roots, *Chem. Nat. Comp.*, vol. 42, no. 1, 2006, pp. 100-101.
 200. A. Alvarruiz, M. Rodrigo, J. Miquel, V. Giner, A. Fera and R. Vila, Influence of brining and packing conditions on product quality of capers, *J. Food Sci.*, vol. 55, no. 1, 1990, pp. 196-227.
 201. J.I. Lauer, D.R. Battles and D. Vesley, Decontaminating Infectious Laboratory Waste by Autoclaving, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 44, no. 3, 1982, pp. 690-694.
 202. Π. Μαρκάκη, Εργαστηριακές Σημειώσεις Μικροβιολογίας, Αθήνα, 1996.
 203. J.I. Pitt, A.D. Hocking and D.R. Glenn, An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus*, *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 54, 1983, pp. 109-114.
 204. J.I. Pitt, Methods for the Mycological Examination of Food, *NATO ASI Series*, vol. 122, 1986, pp. 63-65.
 205. Σ.Γ. Μαράκης, Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, 1994.
 206. D. Smith, *Maintenance of filamentous fungi* In: B.E. Kirsop and A. Doyle eds. *Maintenance of Microorganisms and cultured cells*, London, Academic Press, 1991, pp. 133-159.
 207. H. Gourama, Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species, *Lebensm. Wiss. Technol.*, vol. 30, 1997, pp. 279-283.

208. AFSSA, Protocole de dosage de l'aflatoxine B₁ dans le foie de volaille par immunoaffinité HPLC-fluorimétrie, Ref. CNEVA/TOMI/CDB0399.
209. A. Bottalico and A. Logrieco, Mycotoxins in *Alternaria alternata* – infected olive fruits and their possible transfer into oil, *EPPO Bulletin*, vol. 23, no. 3, 1993, pp. 473-479.
210. M.W. Trucksess, M.E. Stack, S. Neisheim, S.W. Page, R.H. Albert, J.T. Hansen and K.F. Donahue, Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts and peanut butter: collaborative study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 94, no. 1, 1991, pp. 76-81.
211. J. Leitaó, G. De Saint Blanquat, J.R. Bailly and Ch. Paillas, Quantitation of aflatoxins from various strains of *Aspergillus* in foodstuffs, *J. Chromatogr.*, vol. 435, 1988, pp. 229-234.
212. D.M. Wilson and J.K. King, Production of aflatoxins H, B₁, B₂ and G in pure and mixed cultures of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*, *Food Addit. Contam.*, vol. 12, no. 3, 1995, pp. 521-525.
213. G. Leondaritis and D. Galanopoulou, Characterization of inositol phospholipids and identification of a mastoparan-induced polyphosphoinositide response in *Tetrahymena pyriformis*, *Lipids*, vol. 35, 2000, pp. 525-532.
214. Σ.Γ. Μαράκης, Μαθήματα Γενικής Μικροβιολογίας, Βιολογικό Τμήμα, Αθήνα, 1995.
215. M.L. Abarca, M.R. Bragulat, G. Castellá and F.J. Cabañes, Mycoflora and aflatoxin producing strains in animal mixed feeds, *J. Food Prot.*, vol. 57, 1994, pp. 256-258.
216. A.L. Patey, M. Sharman and J. Gilbert, Liquid chromatographic determination of aflatoxin levels in peanut butters using an immunoaffinity column cleanup method: international collaborative trial, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 74, no. 1, 1991, pp. 76-81.
217. C. Ruger-Herreros, J. Rodriguez-Romero, R. Fernández-Barranco, M. Olmedo, R. Fischer, L.M. Corrochano and D. Canovas, Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*, *Genetics*, vol. 188, 2011, pp. 809-822.
218. D.M. Meimaroglou, D. Galanopoulou and P. Markaki, Study of the effect of methyl jasmonate concentration on aflatoxin B₁ biosynthesis by *Aspergillus parasiticus* in yeast extract sucrose medium, *Int. J. Microbiol.*, vol. 2009, 2009, pp. 1-7.
219. Β.Ν. Δημητροκάλλης, Μελέτη της επίδρασης της ωχρατοξίνης Α στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης Β₁ από το μύκητα *Aspergillus parasiticus* σε θρεπτικό υλικό,

- Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2002.
220. J. Fowler and L. Cohen, *Practical Statistics for Field Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1990, pp. 175-192.
 221. A. Molinié, V. Faucet, M. Castegnaro and A. Pfohl-Leszkowicz, Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin, *Food Chem.*, vol. 92, no. 3, 2005, pp. 391-400.
 222. S.M. Romero, M.R. Alberto, M.C. Manca de Nadra and G. Vaamonde, Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds, *Mycotox. Res.*, vol. 25, 2009, pp. 165-170.
 223. M. Goodrich-Tanrikulu, N.E. Mahoney and S.B. Rodriguez, The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*, *Microbiology*, vol. 141, 1995, pp. 2831-2837.
 224. S. Vergopoulou, D. Galanopoulou and P. Markaki, Methyl jasmonate stimulates aflatoxin B₁ biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 7, 2001, pp. 3494-3498.
 225. Δ. Γιαννίσης, Το μεθυλιασμονικό οξύ ως διεγέρτης της βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης B₁ από το μύκητα *A.parasiticus* σε μαύρες ελιές, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2002.
 226. H.J. Zeringue, Effects of methyl jasmonate on phytoalexin production and aflatoxin control in the developing cotton boll, *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 30, 2002, pp. 497-503.
 227. M. Reverberi, S. Zjalic, A. Ricelli, F. Punelli, E. Camera, C. Fabbri, M. Picardo, C. Fanelli and A.A. Fabbri, Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene, *Eukaryot. Cell*, vol. 7, no. 6, 2008, pp. 988-100.
 228. K.V. Narasaiah, R.B. Sashidhar and C. Subramanyam, Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates, *Mycopathologia*, vol. 162, no. 3, pp. 179-189.
 229. M. Brodhagen, D. Tsitsigiannis, E. Hornung, C. Goebel, I. Feussner and N. Keller, Reciprocal oxylipin-mediated cross-talk in the *Aspergillus*-seed pathosystem, *Mol. Microbiol.*, vol. 67, no. 2, 2008, pp. 378-391.
 230. C.M. Bucio-Villalobos, H.A. Luna-Olvera, G.L. Anguiano-Ruvalcaba and D.A. Guzmán de Peña, Effect of plant growth regulators on mycotoxigenic *Aspergillus* spp. In vitro, *Rev. Mex. Fitopatol.*, vol. 23, no. 1, 2005, pp. 68-73.

231. R.A. Holmes, R.S. Boston and G.A. Payne, Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 78, 2008, pp. 559-572.
232. M.J. Sweeney, P. Pàmies and A.D.W. Dobson, The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 56, 2000, pp. 97-103.
233. E. Daradimos, P. Markaki and M. Koupparis, Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B₁ in olive oil, *Food. Addit. Contam.*, vol. 17, no. 1, 2000, pp. 65-73.
234. C. Fanelli and A.A. Fabbri, Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis, *Mycopathologia*, vol. 107, 1989, pp. 115-120.
235. S. Passi, M. Nazzaro-Porro, C. Fanelli, A.A. Fabbri and P. Fasella, Role of lipoperoxidation in aflatoxin production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 19, 1984, pp. 186-190.
236. C. Fanelli and A.A. Fabbri, Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* during incubation with lipid sources in culture media, *T. Brit. Mycol. Soc.*, vol. 77, 1981, pp. 416-419.
237. C. Fanelli, A.A. Fabbri, E. Finotti, P. Fasella and S. Passi, Free radicals and aflatoxin biosynthesis, *Experientia*, vol. 40, 1984, pp. 191-193.
238. C.D. Luca, S. Passi, A.A. Fabbri and C. Fanelli, Ergosterol oxidation may be considered a signal for fungal growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*, *Food Addit. Contam.*, vol. 12, no. 3, 1995, pp. 445-450.
239. D. Bhatnagar, S. Ahmad, K. Kohli, K. Mukerji and T. Venkitasubramanian, Induction of polysubstrate monooxygenase and aflatoxin production by phenobarbitone in *Aspergillus parasiticus*, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, vol. 104, 1982, pp. 1287-1292.
240. G.S. Sidhu, Mycotoxin genetics and gene clusters, *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 108, 2002, pp. 705-711.
241. C.P. Woloshuk, G.L. Yousibova, J.A. Rollins, D. Bhatnagar and G.A. Payne, Molecular Characterization of the *afl-1* Locus in *Aspergillus flavus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 8, 1995, pp. 3019-3023.
242. D.W. Brown, J.-H. Ju, H.S. Kelkar, M. Fernandes, T.C. Nesbitt, N.P. Keller, T.H. Adams and T.J. Leonard, Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, 1996, pp. 1418-1422.
243. K.C. Ehrlich, J. Yu and P.J. Cotty, Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 99, 2005, pp. 518-527.

244. J.W. Cary, L. Szerszen and A.M. Calvo, *Regulation of Aspergillus flavus aflatoxin biosynthesis and development* In: *Mycotoxin prevention and control in Agriculture*, D. Kendra and M. Appell eds., 2009, pp. 183-203.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. Δοκιμασία (t-test)

Η δοκιμασία t εφαρμόζεται όταν ο αριθμός παρατηρήσεων ανά δείγμα είναι σχετικά μικρός, δηλαδή στο καθένα αντιστοιχούν λιγότερες από 30 παρατηρήσεις και εξετάζει κατά πόσο οι πειραματικές μετρήσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους για δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Η δοκιμασία t μπορεί να εφαρμοστεί στην περίπτωση ελέγχου των μέσων τιμών διαφορετικών δειγμάτων που προέρχονται από δυο διαφορετικούς πληθυσμούς, καθώς επίσης και στην περίπτωση ελέγχου δυο μέσων τιμών, που η καθεμία προέρχεται από αριθμό μετρήσεων από διαφορετικό δείγμα. Όπως σε όλες τις στατιστικές δοκιμές ξεκινάμε θεωρώντας ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση, δηλαδή, ότι τα συγκρινόμενα μεγέθη δεν διαφέρουν στατικά σημαντικά μεταξύ τους. Στην πρώτη περίπτωση για την εφαρμογή της δοκιμασίας ακολουθούμε την εξής διαδικασία:^[220]

1. Κατασκευή πίνακα δεδομένων

Δείγμα A	Δείγμα B	d	d ²
α_1	β_1	$\alpha_1 - \beta_1$	$(\alpha_1 - \beta_1)^2$
α_2	β_2	$\alpha_2 - \beta_2$	$(\alpha_2 - \beta_2)^2$
$\vdots$	$\vdots$		
α_n	β_n	$\alpha_n - \beta_n$	$(\alpha_n - \beta_n)^2$
		Σd	Σd^2

2. Υπολογισμός του t

Το $t_{\text{πειρ.}}$ υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο

$$t = \frac{\sum d}{\sqrt{\frac{n \sum d^2 - (\sum d)^2}{n-1}}} \quad (I)$$

3. Συγκρίνουμε το $t_{\text{πειρ.}}$ με το $t_{\text{θεωρ.}}$ το οποίο το βρίσκουμε από πίνακες για (n-1) βαθμούς ελευθερίας και για δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης οπότε διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις :

α) αν $t_{\text{πειρ.}} > t_{\text{θεωρ.}}$ τότε η μηδενική υπόθεση δεν ισχύει και υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων τιμών

β) αν $t_{\text{πειρ.}} < t_{\text{θεωρ}}$ τότε η μηδενική υπόθεση ισχύει και επομένως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων τιμών

Για τη δεύτερη περίπτωση όπου γίνεται σύγκριση μόνο δύο μέσων τιμών, οι τύποι που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:^[233]

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (\text{II}) \quad df = \frac{\left[\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right]}{\left[\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1} \right]} - 2 \quad (\text{III})$$

όπου x_1, x_2 : οι μέσοι όροι των τιμών των μετρήσεων

n_1, n_2 : το πλήθος των τιμών των από τις οποίες προέκυψαν οι μέσοι όροι

s_1, s_2 : οι τυπικές αποκλίσεις

df : οι βαθμοί ελευθερίας

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση το $t_{\text{πειρ.}}$ συγκρίνεται με το $t_{\text{θεωρ.}}$ για τους υπολογιζόμενους βαθμούς ελευθερίας.

2. Ανάλυση Διακύμανσης για έναν παράγοντα (one-way Analysis of Variance ANOVA)

Στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο ANOVA είναι μία αρκετά ευέλικτη τεχνική στατιστικής επεξεργασίας μετρήσεων διότι επιτρέπει με σχετικά απλό τρόπο τον έλεγχο της μεταβλητότητας μεγάλου αριθμού μετρήσεων, διαδικασία που με απλούστερες τεχνικές στατιστικής επεξεργασίας απαιτεί πολλές επαναλήψεις, καθώς η σύγκριση γίνεται ανά ζεύγη. Στην ανάλυση μεταβλητότητας ελέγχονται α) η μεταβλητότητα μεταξύ των τιμών των μετρήσεων για κάθε δείγμα (variability within) και β) η μεταβλητότητα μεταξύ των μέσων όρων όλων των μετρήσεων (variability between). Οπότε η συνολική μεταβλητότητα (variability total) δίνεται από τη σχέση

$$\text{Variability}_{\text{total}} = \text{variability}_{\text{within}} + \text{variability}_{\text{between}}$$

Η τεχνική ANOVA διακρίνεται στη στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο “One-Way” και τη μέθοδο “Two-Way”. Στην “One-Way” διαδικασία γίνεται έλεγχος της μεταβλητότητας των μετρήσεων ως προς μία παράμετρο, η οποία στην παρούσα εργασία αποτελεί τις διαφορετικές συγκεντρώσεις MeJA.

Για την εφαρμογή της διαδικασίας “One-Way” ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Δημιουργία πίνακα τιμών

Δείγμα Α	Δείγμα Β	Δείγμα i	
α_1	β_1	i_1	
α_2	β_2	i_2	
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	
α_j	β_j	i_j	
η_α	η_β	η_i	η_{Total}
$\bar{x}_\alpha$	$\bar{x}_\beta$	$\bar{x}_i$	
s_α	s_β	s_i	
s_α^2	s_β^2	s_i^2	
Σx_α	Σx_β	Σx_i	Σx_{Total}
$(\Sigma x_\alpha)^2$	$(\Sigma x_\beta)^2$	$(\Sigma x_i)^2$	
Σx_α^2	Σx_β^2	Σx_i^2	Σx_{Total}^2

Όπου $\eta_\alpha, \eta_\beta, \dots, \eta_i$ = το πλήθος των j μετρήσεων των δειγμάτων από Α έως i

$\bar{x}_\alpha, \bar{x}_\beta, \dots, \bar{x}_i$ = ο μέσος όρος των j μετρήσεων των δειγμάτων από Α έως i

$s_\alpha, s_\beta, \dots, s_i$ = οι τυπικές αποκλίσεις του πλήθους των j μετρήσεων των δειγμάτων από Α έως i

$\Sigma x_\alpha, \Sigma x_\beta, \dots, \Sigma x_i$ = το άθροισμα των j μετρήσεων των δειγμάτων από Α έως i

$\Sigma x_\alpha^2, \Sigma x_\beta^2, \dots, \Sigma x_i^2$ = το άθροισμα των τετραγώνων των j μετρήσεων των δειγμάτων από Α έως i

2. Έλεγχος της ομοιογένειας των διακυμάνσεων των τιμών, όπου υπολογίζεται ο λόγος

$$F_{\max} = \frac{s_{\max}^2}{s_{\min}^2}$$

Η υπολογιζόμενη τιμή $F_{\max}$ συγκρίνεται με τη θεωρητική τιμή F_{critical} από πίνακες με βάση τον αριθμό των δειγμάτων και τους βαθμούς ελευθερίας ($d_f = j-1$) και για την επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης. Προκειμένου να μπορούμε να προχωρήσουμε στο κύριο μέρος της στατιστικής επεξεργασίας πρέπει να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια των διακυμάνσεων, δηλαδή $F_{\max} < F_{\text{critical}}$.

3. Υπολογισμός του συντελεστή C_T (correction term)

$$C_T = \frac{(\Sigma x_T)^2}{\eta_T}$$

4. Υπολογισμός του SS_T (total sum of squares)

$$SS_T = \sum x_T^2 - C_T$$

5. Υπολογισμός του SS_{between} (between samples of sum of squares)

$$SS_{\text{between}} = \frac{(\sum x_\alpha)^2}{n_\alpha} + \frac{(\sum x_\beta)^2}{n_\beta} + \dots + \frac{(\sum x_i)^2}{n_i} - C_T$$

6. Υπολογισμός του SS_{within} (within samples of sum of squares)

Ο υπολογισμός του SS_{within} γίνεται είτε από τη σχέση $SS_{\text{within}} = SS_T - SS_{\text{between}}$ είτε αναλυτικά από τους τύπους

$$SS_{w\alpha} = \sum x_\alpha^2 - \frac{(\sum x_\alpha)^2}{n_\alpha} \quad SS_{w\beta} = \sum x_\beta^2 - \frac{(\sum x_\beta)^2}{n_\beta} \quad SS_{wi} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n_i}$$

$$SS_{\text{within}} = SS_{w\alpha} + SS_{w\beta} + \dots + SS_{wi}$$

7. Προσδιορισμός των βαθμών ελευθερίας

$$df = n_T - 1 \quad df_{\text{between}} = i - 1 \quad df_{\text{within}} = n_T - 1$$

8. Υπολογισμός των μεγεθών s^2_{between} και s^2_{within}

$$s^2_{\text{between}} = \frac{SS_{\text{between}}}{df_{\text{between}}} \quad s^2_{\text{within}} = \frac{SS_{\text{within}}}{df_{\text{within}}}$$

9. Υπολογισμός του $F_{\text{πειρ.}}$

$$F_{\text{πειρ.}} = \frac{s^2_{\text{between}}}{s^2_{\text{within}}}$$

10. Σύγκριση $F_{\text{πειρ.}}$ με $F_{\text{θεωρ.}}$

Το $F_{\text{πειρ.}}$ που υπολογίσθηκε συγκρίνεται με το $F_{\text{θεωρ.}}$, το οποίο προκύπτει από πίνακες με βάση το df_{between} και το df_{within} για την επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης. Αν $F_{\text{πειρ.}} < F_{\text{θεωρ.}}$ αποδεχόμαστε τη μηδενική υπόθεση, η οποία λέει ότι η μεταβλητότητα των συγκρινόμενων μεγεθών δεν είναι στατιστικά σημαντική, αν $F_{\text{πειρ.}} > F_{\text{θεωρ.}}$ απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση και συμπεραίνουμε ότι η μεταβλητότητα μεταξύ των συγκρινόμενων τιμών είναι στατιστικά σημαντική.^[220]

3. FISHER TEST

Κατά τη στατιστική επεξεργασία προσδιορίζεται η γραμμικότητα (linearity) των αποτελεσμάτων των ανακτήσεων. Η ικανότητα, δηλαδή, (εντός καθορισμένων ορίων) της αναλυτικής μεθόδου που εξετάζεται, να παρέχει αποτελέσματα ανάλογα της πραγματικής ποσότητας της ουσίας που προσδιορίζεται στο εργαστηριακό τμήμα. Τα όρια της γραμμικότητας αυτής είναι τα όρια της συγκέντρωσης στο πείραμα, μεταξύ των οποίων ένα μοντέλο γραμμικής βαθμονόμησης μπορεί να εφαρμοστεί για κάποιο γνωστό βαθμό εμπιστοσύνης (συνήθως 1%).

Οι ορισμοί και τα σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό του συντελεστή Fisher παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Ι.1: Περιγραφή συμβόλων

Σύμβολο	Περιγραφή
x	Θεωρητική συγκέντρωση ΑΦΒ ₁ που εμβολιάστηκε
y	Μέτρηση της απόκρισης του οργάνου
p	Αριθμός των επιπέδων ΑΦΒ ₁ που εμβολιάστηκαν
n	Αριθμός των ενώσεων σε κάθε επίπεδο
b_0	Απόκριση τυφλού σήματος (intercept)
b_1	Ευαισθησία (slope)
$S^2_{(e)}$	Πειραματική απόκλιση της παλινδρόμησης
$S_{(b_0)}$	Τυπική απόκλιση της απόκρισης του τυφλού σήματος
$S_{(b_1)}$	Τυπική απόκλιση της ευαισθησίας
$F_{(v_1, v_2)}$	Τιμή του Fisher test με v_1 και v_2 βαθμούς ελευθερίας

Η περιγραφή και η εξίσωση των μαθηματικών τύπων που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας Ι.2: Περιγραφή των βασικών στατιστικών τύπων που απαιτούνται

Μαθηματική σχέση EXCEL	Περιγραφή	Μαθηματική εξίσωση
$SUM_{(x)}$	Αποδίδει το άθροισμα των αριθμών ενός πίνακα	$SUM_{(x)} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$
$DEVSQ_{(x)}$	Αποδίδει το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων των σημείων δεδομένων από τον αριθμητικό μέσο του δείγματός τους	$DEVSQ_{(x)} = \sum_i (x_i - \bar{x})^2$
$STDEV_{(x)}$	Υπολογίζει τη μέση απόκλιση τετραγώνου βάσει ενός δείγματος	$STDEV_{(x)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$
$COVAR_{(x,y)}$	Αποδίδει τη συνδιακύμανση, το μέσο όρο των γινομένων για ζεύγη αποκλίσεων	$COVAR_{(x,y)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
$REGRESSION$	Αποδίδει την παλινδρόμηση των προσδιορισμένων σημείων από τις πρότυπες τιμές	$REG = \frac{[npCOVAR_{(x,y)}]^2}{DEVSQ_{(x)}}$
$FINV_{(a,v1,v2)}$	Αποδίδει το αντίστροφο της κατανομής πιθανοτήτων F για τα όρια της τιμής Fisher	-

4. ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται υπό ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα.

Επιπλέον:

r: Όριο επαναληψιμότητας, τιμή κάτω από την οποία αναμένεται η απόλυτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών, που λαμβάνονται σε συνθήκες επαναληψιμότητας (δηλαδή το ίδιο δείγμα, ο ίδιος χειριστής, ο ίδιος εξοπλισμός, το ίδιο εργαστήριο και μικρή χρονική απόσταση), να βρίσκεται εντός των ορίων της πιθανότητας, κατά κανόνα 95%.

$$r = 2,8 \times s_r$$

s_r: Σχετική τυπική απόκλιση, υπολογιζόμενη με βάση τα ληφθέντα αποτελέσματα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας.

RSD_r: Σχετική τυπική απόκλιση, υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, $\left(\frac{s_r}{\bar{x}}\right) \times 100$, όπου $\bar{x}$ είναι ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων για όλα τα εργαστήρια και δείγματα.

4. ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα είναι το μέτρο διασποράς των αποτελεσμάτων ελέγχων στο ίδιο δείγμα που εκτελούνται σε ένα εργαστήριο κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Εκείνο που μπορεί να διαφέρει είναι η μέθοδος, ο αναλυτής, η συσκευή, καθώς και η χρονική περίοδος που γίνεται ο έλεγχος.

Για τον έλεγχο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικά δείγματα και να γίνει σύγκριση των επί τοις εκατό ποσοστών ανάκτησης που δίνει η ανάλυση για το κάθε ένα από αυτά.

Επίσης:

R: Όριο αναπαραγωγιμότητας, η τιμή κάτω από την οποία αναμένεται η απόλυτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεμονωμένων δοκιμών, που ελήφθησαν υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (δηλαδή από το ίδιο υλικό που ελήφθη από χειριστές σε διάφορα εργαστήρια, χρησιμοποιώντας την τυποποιημένη μέθοδο δοκιμασίας), να βρίσκεται εντός ορισμένου ορίου πιθανότητας, κατά κανόνα 95%.

$$R = 2,8 \times s_R$$

S_R: Τυπική απόκλιση, υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

RSD_R: Σχετική τυπική απόκλιση υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας, $\left(\frac{s_R}{\bar{x}}\right) \times 100$.

5. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το όριο ανίχνευσης (Detection Limit, DL) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$DL = \frac{3.3 \times SD}{b}$$

Όπου SD είναι η τυπική απόκλιση των μετρήσεων για ένα αραιό πρότυπο και b είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Το όριο ποσοτικοποίησης (Quantification Limit, QL) υπολογίζεται από τον αντίστοιχο τύπο:

$$QL = \frac{10 \times SD}{b}$$

Αντί της τυπικής απόκλισης του πλέον αραιού προτύπου, μπορούμε για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης να χρησιμοποιήσουμε τον ακόλουθο τύπο, ο οποίος προσεγγίζει το όριο ανίχνευσης από στατιστική σκοπιά λαμβάνοντας υπόψιν τις μεταβολές στις τιμές θορύβου σε σχέση με ένα τυφλό δείγμα:

$$DL = X_{\text{blank}} + 3 \times SD_{\text{blank}}$$

Όπου X_{blank} είναι το σήμα υποβάθρου που καταγράφεται και SD_{blank} η τυπική απόκλιση για το σύνολο των καταγραφών των σημάτων υποβάθρου. Ο αντίστοιχος τύπος για το όριο ποσοτικοποίησης είναι:

$$QL = X_{\text{blank}} + 10 \times SD_{\text{blank}}$$

Στη βιβλιογραφία, ως όριο ανίχνευσης αναφέρεται συχνά η σχέση σήματος δείγματος ελάχιστης ποσότητας ως προς το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος, για την οποία ισχύει η σχέση $3/1 \left(\frac{\text{Signal}}{\text{Noise}} = \frac{3}{1} \right)$.

Αντίστοιχα, ως όριο ποσοτικοποίησης αναφέρεται η σχέση σήματος δείγματος ελάχιστης ποσότητας ως προς το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος, για την οποία ισχύει η σχέση $6/1 \left(\frac{\text{Signal}}{\text{Noise}} = \frac{6}{1} \right)$.

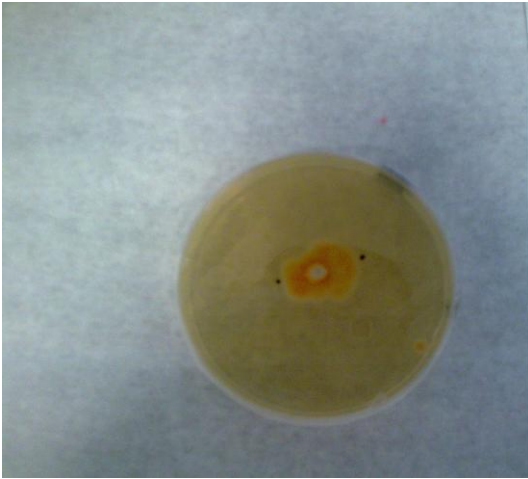
Οι μαθηματικοί τύποι που εμπλέκονται στον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, υπολογισμένοι σύμφωνα με το στατιστικό τύπο του γαλλικού προτύπου για τις ποσοτικές αναλύσεις (AFNOR, 1993), παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας Ι.3: Μαθηματικοί τύποι για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

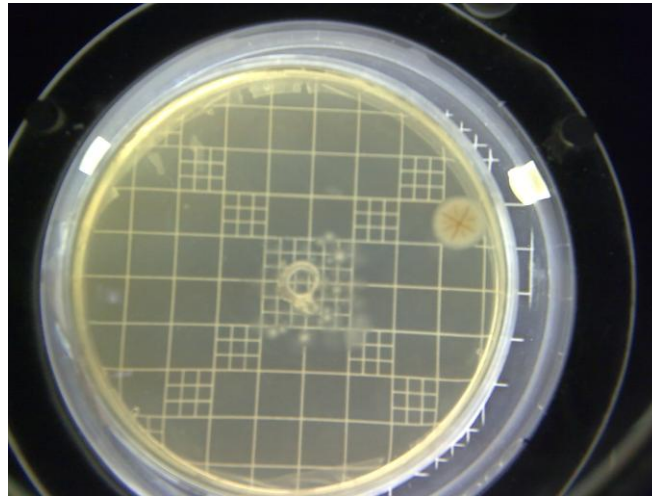
Σύμβολο	Περιγραφή	Μαθηματική εξίσωση
b_0	Αποδίδει το σημείο τομής της γραμμής παλινδρόμησης, η οποία προσαρμόζεται σε γνωστά σημεία δεδομένων, με τον άξονα των y	$b_0 = \frac{SUM(y) - b_1 SUM(x)}{np}$
b_1	Αποδίδει την κλίση της γραμμής γραμμικής παλινδρόμησης που προσαρμόζεται στα σημεία δεδομένων των ορισμάτων	$b_1 = \frac{np COVAR(x, y)}{DEVSQ(x)}$
$s^2(e)$	Αποδίδει το τετράγωνο της πειραματικής διακύμανσης της παλινδρόμησης	$s^2(e) = \frac{DEVSQ(y) - b_1 np COVAR(x, y)}{np - 2}$
$s(b_0)$	Αποδίδει την τυπική απόκλιση της απόκρισης του τυφλού σήματος	$s(b_0) = \sqrt{s^2(e) \left(\frac{1}{np} + \frac{SUM^2(x)}{(np)^2 DEVSQ(x)} \right)}$
$s(b_1)$	Αποδίδει την τυπική απόκλιση της ευαισθησίας του σήματος	$s(b_1) = \sqrt{\frac{s^2(e)}{DEVSQ(x)}}$
DL	Αποδίδει το όριο ανίχνευσης της μεθόδου	$DL = \frac{b_0 + 3 \times s(b_0)}{b_1}$
QL	Αποδίδει το όριο Ποσοτικοποίησης της μεθόδου	$QL = \frac{b_0 + 10 \times s(b_0)}{b_1}$

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

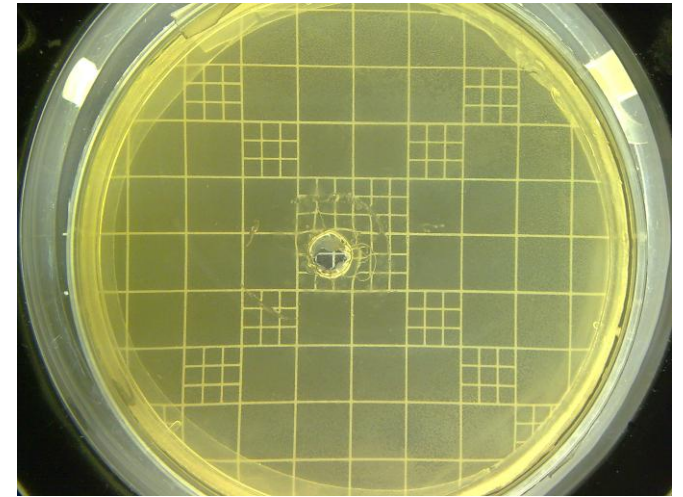
Φωτογραφίες από τη μακροσκοπική μελέτη της επίδρασης του MeJA στην ανάπτυξη του *A.parasiticus* σε θρεπτικό υλικό AFPA



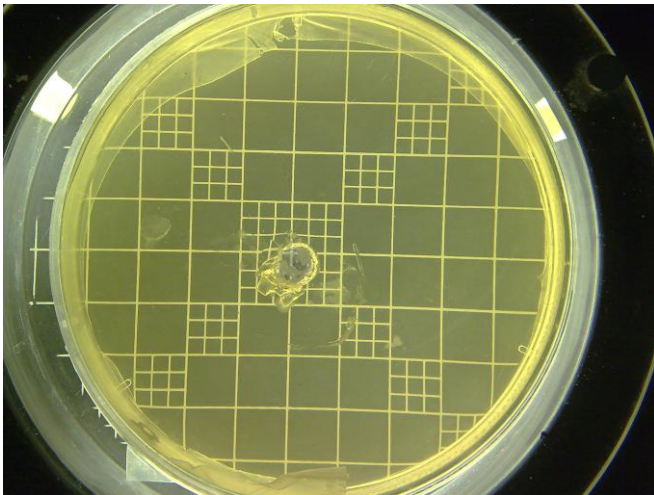
Δείγμα control τη 2^η ημέρα επώασης



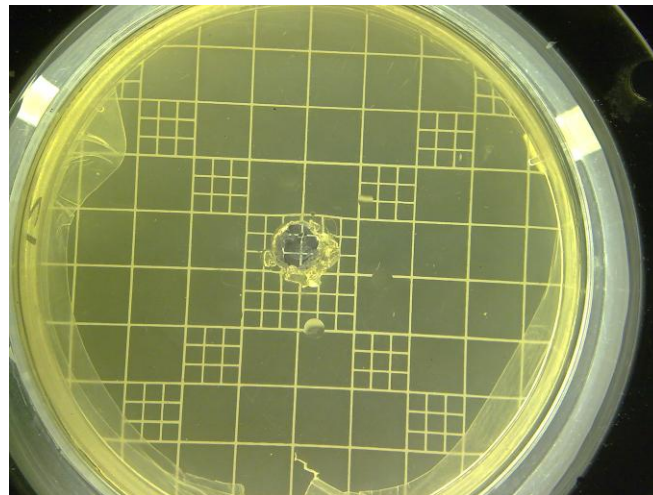
Δείγμα με προσθήκη 1,19 mg MeJA τη 2^η ημέρα επώασης



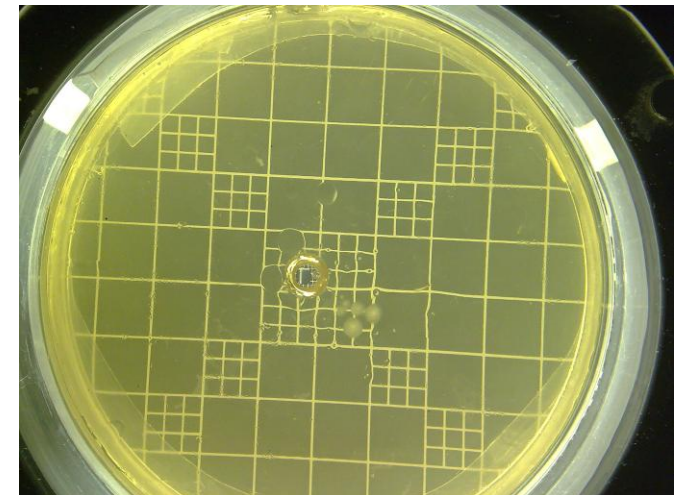
Δείγμα με προσθήκη 0,000823 M MeJA τη 2^η ημέρα επώασης



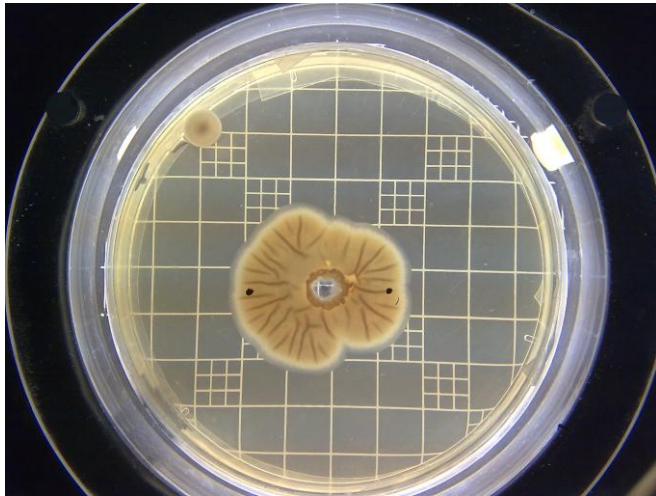
Δείγμα με προσθήκη 0,001 M MeJA τη 2^η ημέρα επώασης



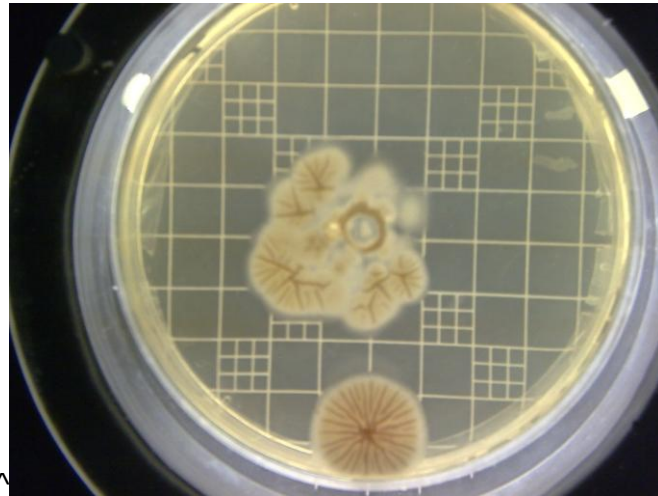
Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA τη 2^η ημέρα επώασης



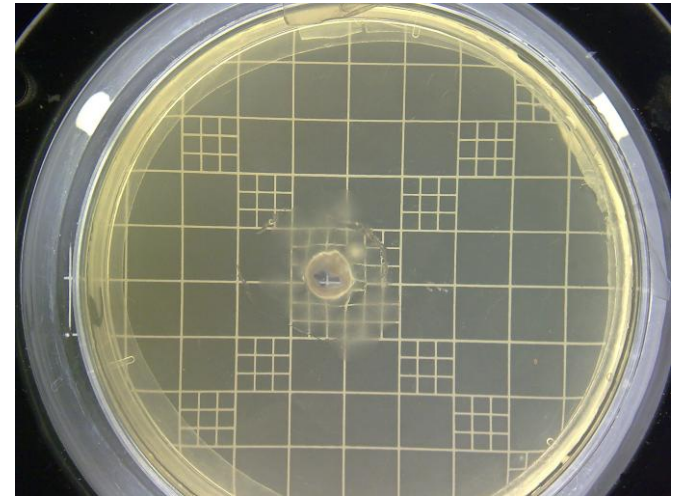
Δείγμα με προσθήκη 0,00823 M MeJA τη 2^η ημέρα επώασης



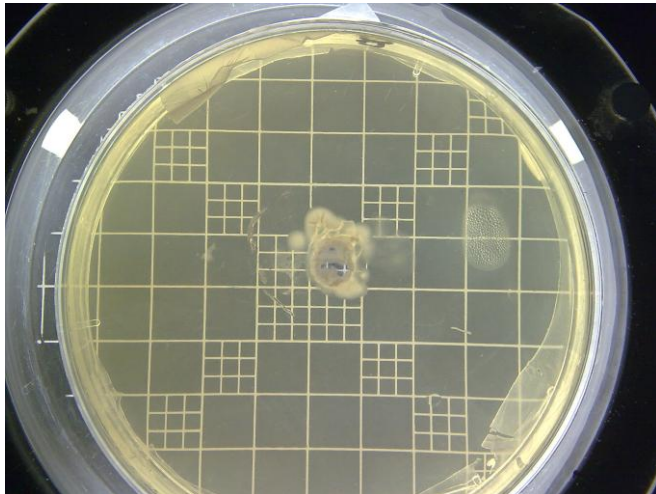
Δείγμα control την 3^η ημέρα επώασης



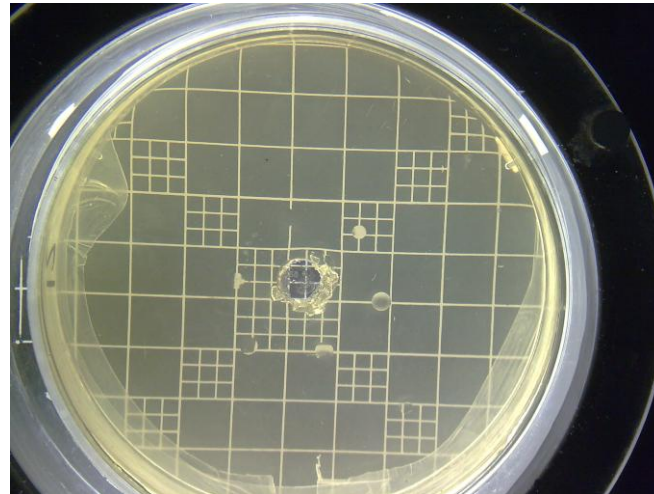
Δείγμα με προσθήκη 0,00056 M MeJA την 3^η ημέρα επώασης



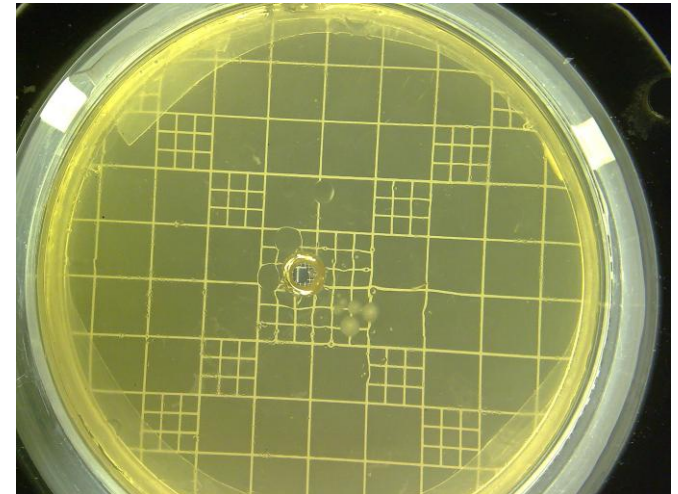
Δείγμα με προσθήκη 0,000823 M MeJA την 3^η ημέρα επώασης



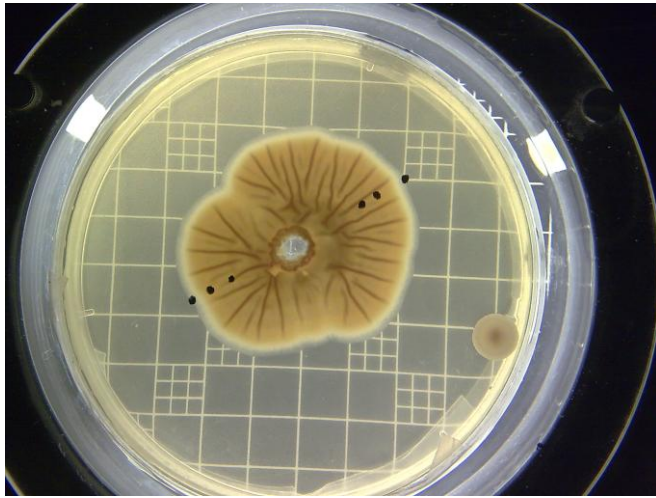
Δείγμα με προσθήκη 0,001 M MeJA την 3^η ημέρα επώασης



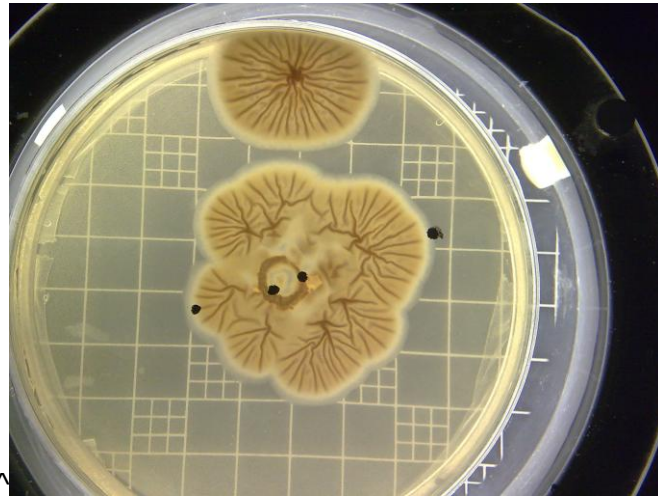
Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA την 3^η ημέρα επώασης



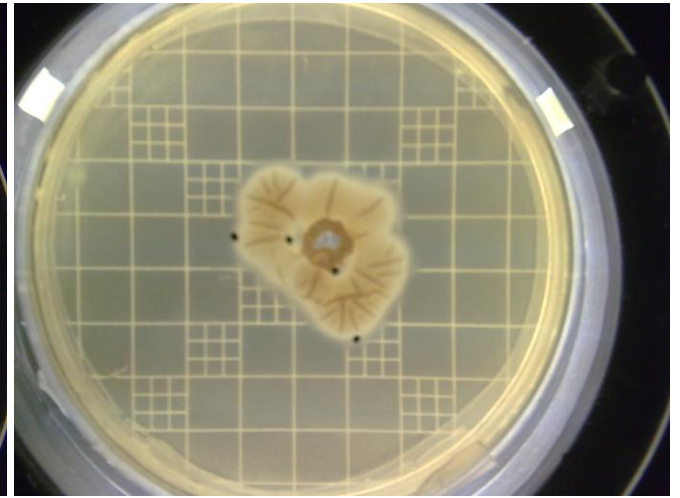
Δείγμα με προσθήκη 0,00823 M MeJA την 3^η ημέρα επώασης



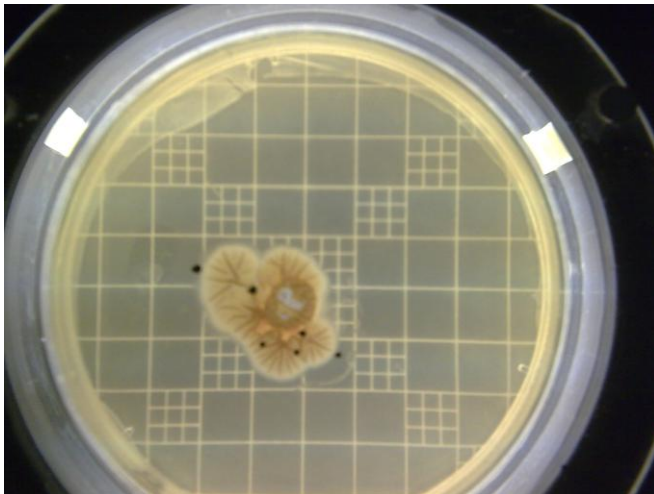
Δείγμα control την 4^η ημέρα επώασης



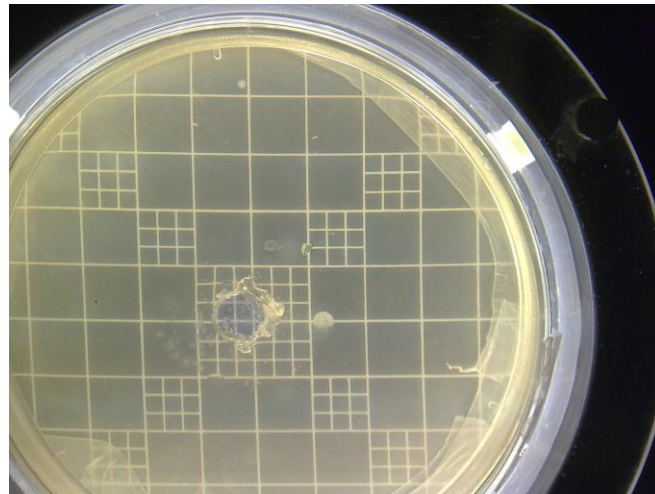
Δείγμα με προσθήκη 0,00056 M MeJA την 4^η ημέρα επώασης



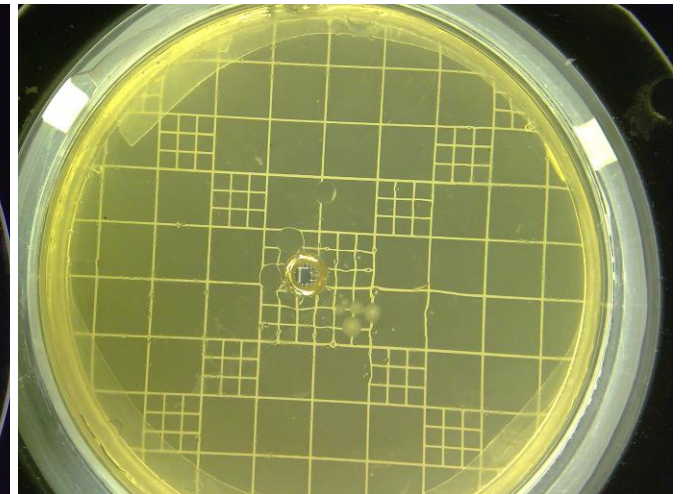
Δείγμα με προσθήκη 0,000823 M MeJA την 4^η ημέρα επώασης



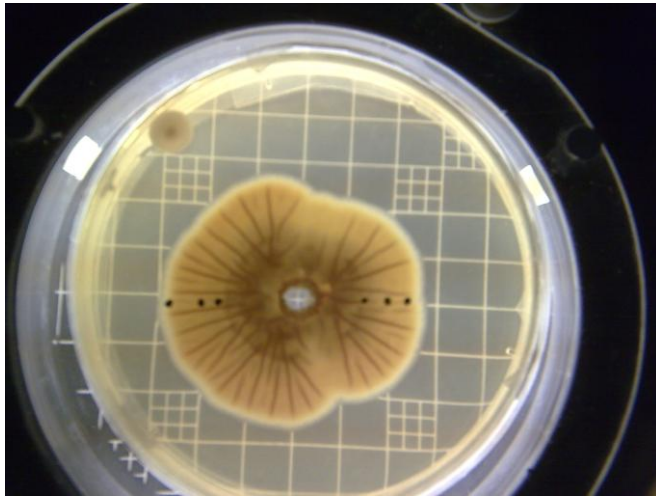
Δείγμα με προσθήκη 0,001 M MeJA την 4^η ημέρα επώασης



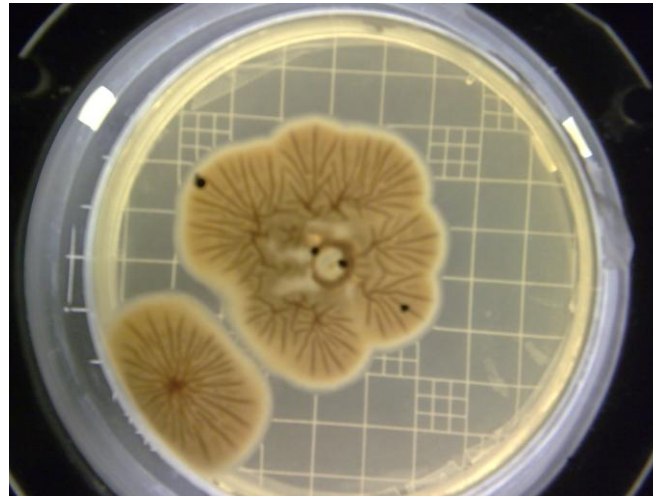
Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA την 4^η ημέρα επώασης



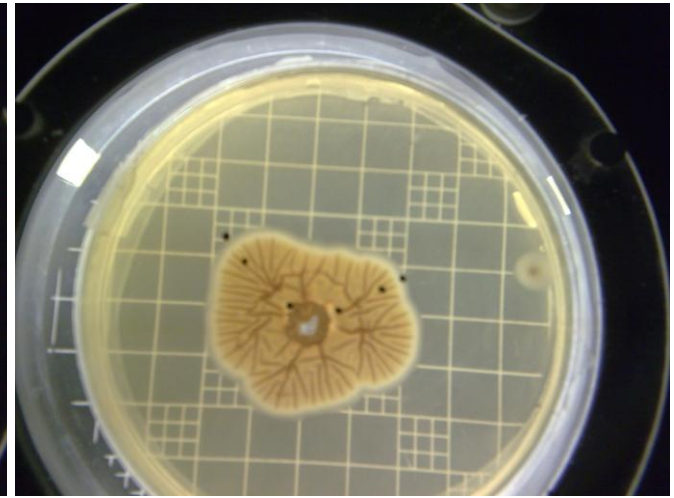
Δείγμα με προσθήκη 0,00823 M MeJA την 4^η ημέρα επώασης



Δείγμα control την 5^η ημέρα επώασης



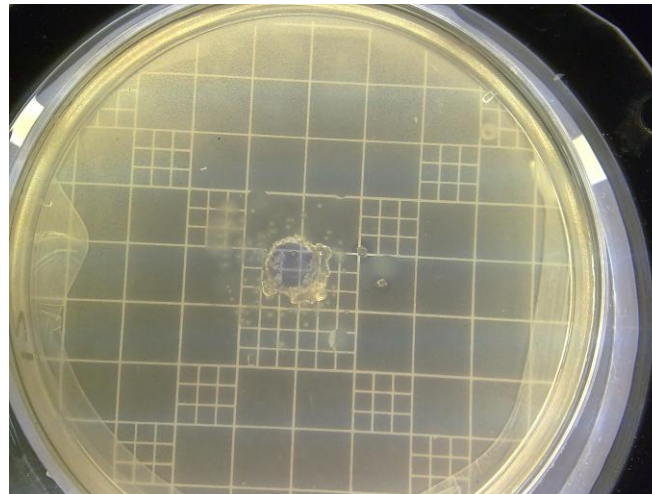
Δείγμα με προσθήκη 0,00056 M MeJA την 5^η ημέρα επώασης



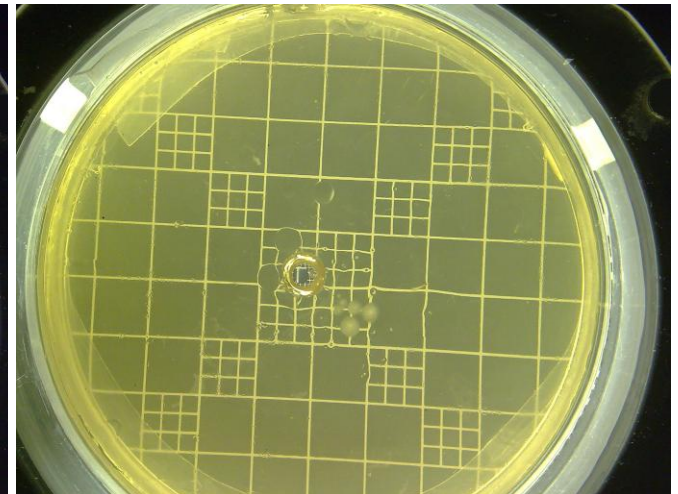
Δείγμα με προσθήκη 0,000823 M MeJA την 5^η ημέρα επώασης



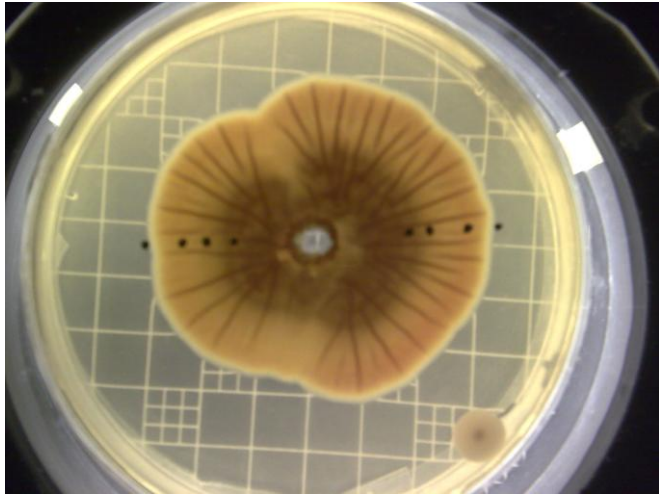
Δείγμα με προσθήκη 0,001 M MeJA την 5^η ημέρα επώασης



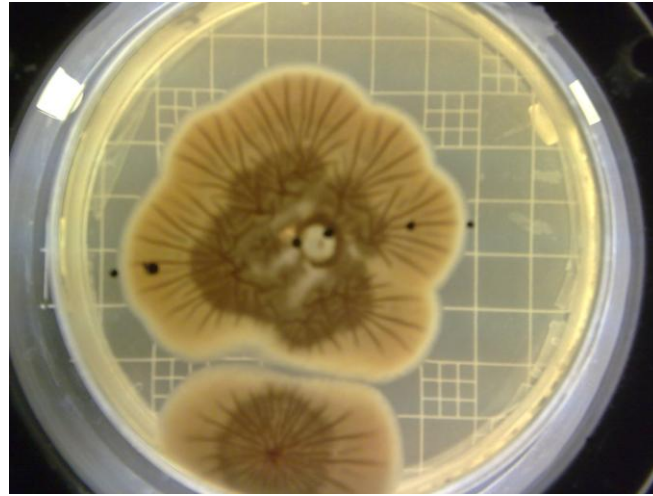
Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA την 5^η ημέρα επώασης



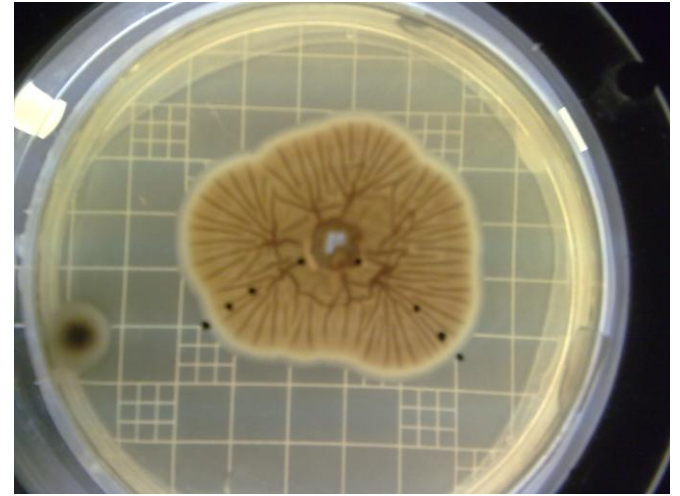
Δείγμα με προσθήκη 0,00823 M MeJA την 5^η ημέρα επώασης



Δείγμα control την 6^η ημέρα επώασης



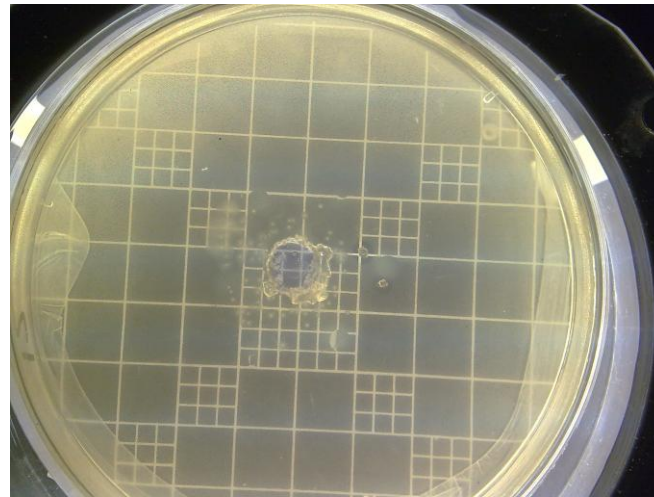
Δείγμα με προσθήκη 0,00056 M MeJA την 6^η ημέρα επώασης



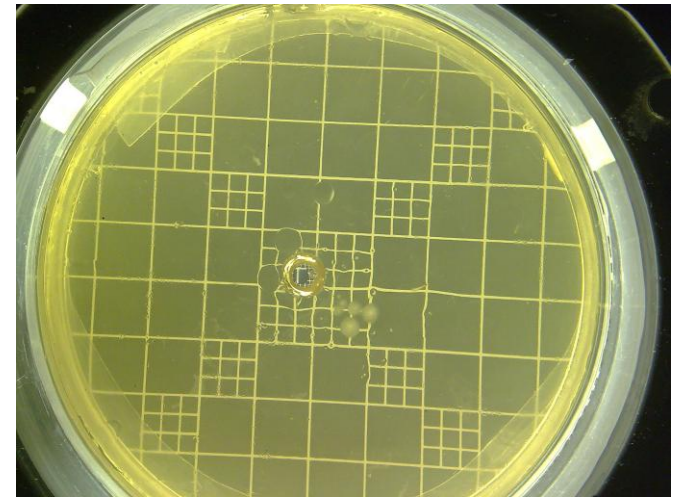
Δείγμα με προσθήκη 0,000823 M MeJA την 6^η ημέρα επώασης



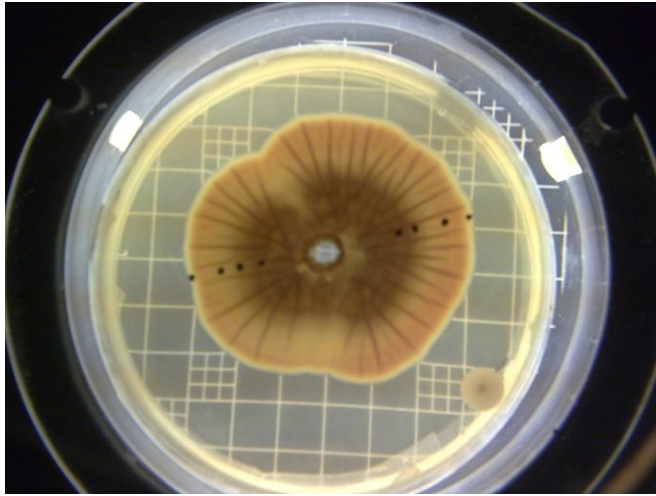
Δείγμα με προσθήκη 0,001 M MeJA την 6^η ημέρα επώασης



Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA την 6^η ημέρα επώασης



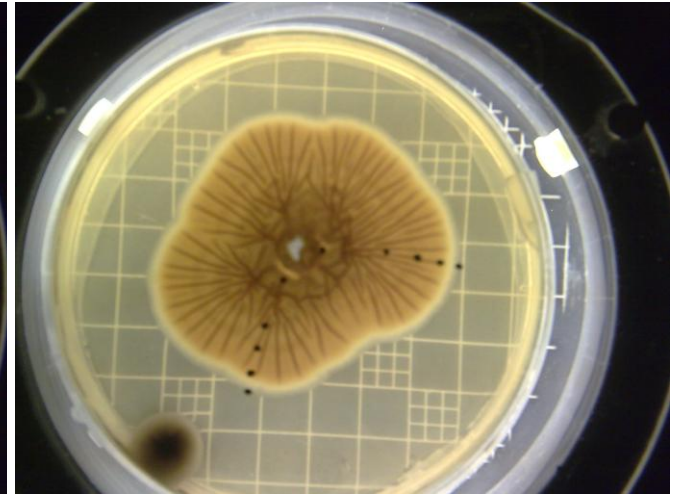
Δείγμα με προσθήκη 0,00823 M MeJA την 6^η ημέρα επώασης



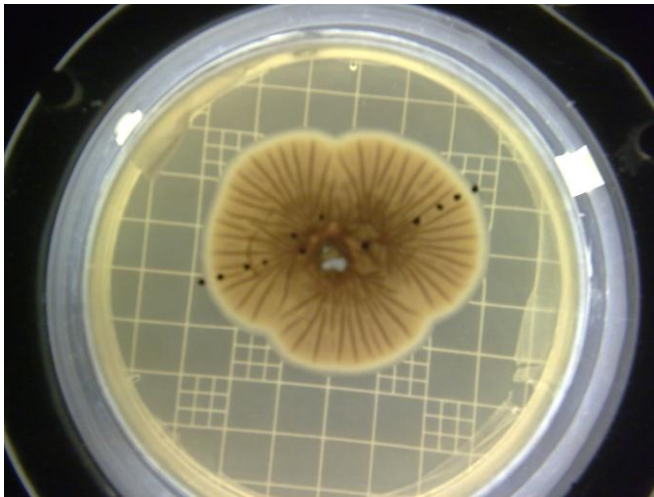
Δείγμα control την 7^η ημέρα επώασης



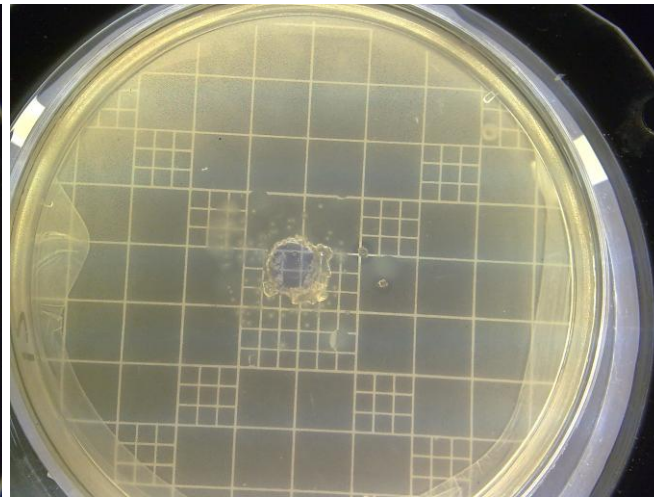
Δείγμα με προσθήκη 0,00056 M MeJA την 7^η ημέρα επώασης



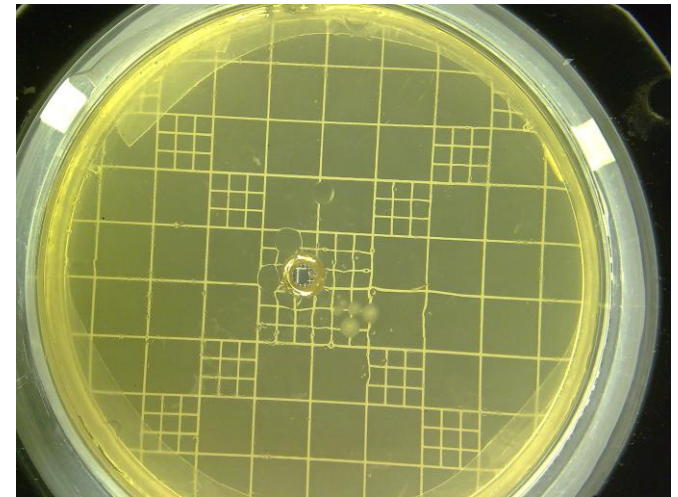
Δείγμα με προσθήκη 0,000823 M MeJA την 7^η ημέρα επώασης



Δείγμα με προσθήκη 0,001 M MeJA την 7^η ημέρα επώασης



Δείγμα με προσθήκη 11,9 mg MeJA την 7^η ημέρα επώασης



Δείγμα με προσθήκη 0,00823 M MeJA την 7^η ημέρα επώασης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Συσχέτιση της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών με τα λιπίδια

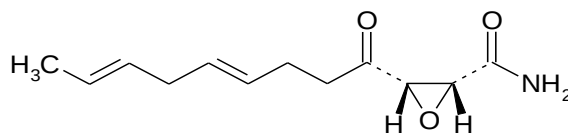
Η σχέση της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών με τα λιπίδια έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πολλούς επιστήμονες λόγω του εξαιρετικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει. Έχει λοιπόν παρατηρηθεί ότι η σύνθεση λιπιδίων πραγματοποιείται με υψηλούς ρυθμούς σε συνθήκες που δεν ευνοούν το σχηματισμό Αφλατοξινών. Για παράδειγμα, το όξινο περιβάλλον ευνοεί την παραγωγή Αφλατοξινών, ενώ το ουδέτερο ή ελαφρώς αλκαλικό αντίθετα, τη σύνθεση λιπιδίων.^[99] Στο υποκεφάλαιο της βιοσύνθεσης αναφέρεται επίσης η αντιστρόφως ανάλογη σχέση του λόγου NADPH/NADP ως προς το σχηματισμό λιπιδίων και Αφλατοξινών. Υπάρχουν πολλά ακόμη αντίστοιχα δεδομένα που ενισχύουν την ύπαρξη μίας αντίστροφης σχέσης μεταξύ λιπιδίων και Αφλατοξινών.

Έχει, ωστόσο, διαπιστωθεί ότι η παραγωγή Αφλατοξινών από τους μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* είναι πολύ μεγαλύτερη σε ελαιώδεις καρπούς παρά σε αμυλούχους.^[234] Σε υγρή καλλιέργεια του *A.flavus*, όμως, που προστέθηκαν συνθετικά τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα και στερόλες, τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. Τα λιπίδια αυτά λειτούργησαν αποκλειστικά σαν πηγές άνθρακα και προκάλεσαν την αύξηση του μύκητα χωρίς να διεγείρουν καθόλου τη βιοσύνθεση των τοξινών.^[235]

In vitro, η παραγωγή Αφλατοξινών διεγείρεται κατά την προσθήκη σε καλλιέργειες των *A.parasiticus* και *A.flavus* :

- συνθετικών λιποϋπεροξειδίων ή φυσικά παραγόμενων στα φυτά με τη δράση λιποξυγενασών ή με τη βοήθεια των περιβαλλοντικών συνθηκών ^[96,236]
- ενώσεων που φέρουν έναν ή περισσότερους δακτύλιους εποξειδίου ^[236]
- αλογομεθανίων που είναι σε θέση να σχηματίσουν ρίζες ^[237]
- ενώσεων που οξειδώνουν την εργοστερόλη των μυκηλιακών κυττάρων ^[238]

Η διαπίστωση της επίδρασης των ενώσεων αυτών στην παραγωγή Αφλατοξινών ξεκίνησε με την παρατήρηση ότι δύο παρεμποδιστές της συνθετάσης των λιπαρών οξέων, η σερουλενίνη (cerulenin) (σχήμα 3.6) και η τετραϋδροσερουλενίνη (tetrahydrocerulenin) διεγείρουν την παραγωγή Αφλατοξίνης, όταν οι ενώσεις προστίθενται σε υπόστρωμα εμβολιασμένο με *A.parasiticus* κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης του μύκητα.^[105] Περαιτέρω μελέτες έδειξαν πως η συμπεριφορά της σερουλενίνης και της τετραϋδροσερουλενίνης αποδίδεται στη δομή εποξειδίου. Η παραπάνω υπόθεση της σημασίας του εποξειδικού δακτυλίου επιβεβαιώθηκε μέσω και άλλων πειραμάτων, κατά τα οποία λιποφιλικά εποξείδια όπως το 9,10-εποξυμεθυλοστεατικό και το 9,10:12,13 διεποξυ-μεθυλοστεατικό οξύ εμφάνισαν μία σημαντικότερη διέγερση στην παραγωγή Αφλατοξίνης απ' ό,τι η σερουλενίνη και η τετραϋδροσερουλενίνη.



Cerulenin

[2R-[2.alpha.,3.alpha.(4E,7E)]]-3-(1-oxo-4,7-nonadienyl)oxiranecarboxamide

Τα λιπιδικά εποξειδία σχηματίζονται σε μικρά ποσά κατά την οξειδωση ακόρεστων λιπιδίων, της οποίας τα κύρια προϊόντα είναι τα λιποϋπεροξειδία. Η λιποϋπεροξειδωση παίζει βασικό ρόλο στην επαγωγή της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών. In vitro, συνθετικά λιποϋπεροξειδία διεγείρουν σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή Αφλατοξινών αν προστεθούν σε καλλιέργειες τοξινογόνων στελεχών των *A.flavus* ή *A.parasiticus*. In vivo, η ποσότητα σχηματιζόμενης τοξίνης σε ηλιόσπορους διαφορετικής ηλικίας που εμβολιάστηκαν με *A.parasiticus* συνδέεται άμεσα με τον αριθμό υπεροξειδίων του ελαιώδους περιεχομένου τους: όσο μεγαλύτερος ο αριθμός υπεροξειδίων, τόσο πιο έντονοι οι ρυθμοί παραγωγής Αφλατοξινών.^[235]

Τα λιποϋπεροξειδία που υπάρχουν in vivo βρίσκονται κυρίως στους γηρασμένους και αποθηκευμένους καρπούς προκαλώντας διέγερση της βιοσύνθεσης της Αφλατοξίνης. Η γήρανση των σπόρων -ουσιαστικά των κυττάρων-, η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με το φαινόμενο της λιποϋπεροξειδωσης, έχει σαν συνέπεια τη διατάραξη των ενζυματικών τους συστημάτων άμυνας με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της ανάπτυξης των *Aspergilli*. Η διέγερση της παραγωγής Αφλατοξινών μέσω της λιποϋπεροξειδωσης τοποθετείται χρονικά κατά πάσα πιθανότητα πριν τη βιοσύνθεση του NOR.^[234]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι μεταβολίτες προερχόμενοι από την πορεία της λιποξυγενάσης των φυτών μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν την παραγωγή μυκοτοξινών -συγκεκριμένα Αφλατοξίνης και Στεριγματοκυστίνης- από τους *Aspergilli*. Οι Burow et al.^[160] έλεγξαν την πιθανότητα η εμφάνιση ισοενζύμων της λιποξυγενάσης που παράγουν διαφορετικά υδροϋπεροξυ λιπαρά οξέα να ευθύνεται για τις διαφορετικές αυτές επιδράσεις στη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Αναφέρεται ως παράδειγμα η προσθήκη O₂ στη θέση C-13 του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος από τη λιποξυγενάση-1 της σόγιας και η αντίστοιχη προσθήκη O₂ στη θέση C-9 από τη λιποξυγενάση του καλαμποκιού. Τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν ότι τα 13S-υδροϋπεροξυ λιπαρά οξέα σε συγκεντρώσεις 10-100 μM ανέστειλαν τη γονιδιακή έκφραση της πορείας της Αφλατοξίνης και της Στεριγματοκυστίνης και μείωσαν σημαντικά την παραγωγή των δύο τοξινών από τους *A.parasiticus* και *A.nidulans* αντίστοιχα, ενώ

αντίθετα ίδιες συγκεντρώσεις των 9S-υδροϋπεροξυ λιπαρών οξέων είχαν αντίθετα αποτελέσματα. Μία πιθανή εξήγηση για την αναστολή της βιοσύνθεσης της Αφλατοξίνης από το 13S-HPODE θα μπορούσε να δοθεί από το γεγονός ότι επηρεάζει τις διαδικασίες μυκηλιακής ανάπτυξης που απαιτούνται για τη φυσιολογική βιοσύνθεση της τοξίνης.

Τέλος, θεωρείται πιθανό η παραγωγή Αφλατοξινών από μύκητες του γένους *Aspergillus* να αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό αποτοξίνωσης ενάντια στα τοξικά λιποϋπεροξειδία και τα προϊόντα αποικοδόμησής τους.^[235] Η άποψη αυτή ενισχύεται από δύο δεδομένα. Οι οξυγενάσεις, όπως το κυτόχρωμα P450, εμπλέκονται κυρίως στην αποτοξίνωση ξеноβιοτικών και ενδογενών ενώσεων.^[57] Η παρουσία του κυτοχρώματος P450 καθώς και της NADPH κυτοχρωμικής P450 αναγωγάσης έχει διαπιστωθεί στα μικροσωμάτια του *A.parasiticus*.^[239]

Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης των Αφλατοξινών ^[59,61,65,82,240,241]

Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁ είναι ιδιαίτερα σύνθετη και περιλαμβάνει περισσότερα δίκτυα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους. Προκειμένου να περιγραφεί με πλήρη σαφήνεια το πολυδιάστατο αυτό φαινόμενο, θα μπορούσε να χωριστεί σε τρία τμήματα ξεκινώντας με τη ρύθμιση μέσα στο βιοσυνθετικό σύμπλεγμα. Η αφλατοξίνη αποτελεί έναν από τους πρώτους γνωστούς δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων, όπου όλα τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσυνθετική πορεία συμπεριλαμβανομένων και των ρυθμιστικών γονιδίων *aflR* και *aflS* (πρώην *aflJ*) είναι οργανωμένα σε ένα σύμπλεγμα DNA 75 kb. Πλέον η τακτοποίηση των γονιδίων σε ένα σύμπλεγμα θεωρείται σύνηθες φαινόμενο στο δευτερογενή μεταβολισμό των μυκήτων με σημαντικά παραδείγματα, όπως εκείνα της βιοσύνθεσης της πενικιλίνης, των τριχοθεσινών, της μελανίνης, καθώς επίσης και της στεριγματοκυστίνης, το γονιδιακό σύμπλεγμα της οποίας έχει μέγεθος 60 kb και περιέχει πολλά ομόλογα γονίδια -22 συνολικά- με εκείνα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών.^[242] Μία ενδιαφέρουσα πληροφορία προέρχεται από τη μελέτη της σειράς των γονιδίων μέσα στους μύκητες του τμήματος Flavi, από την οποία προκύπτει πως τόσο η σειρά των γονιδίων όσο και η περιοχή των θέσεων πρόσδεσης του *aflR* και οι διαγονιδιακές αποστάσεις έχουν διατηρηθεί για τουλάχιστον 25 εκατομμύρια χρόνια.^[243]

Με τη βοήθεια γενετικών μελετών που απασχολούν πολλές ερευνητικές ομάδες τα τελευταία χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 25 γονίδια, για 19 εκ των οποίων έχουν διευκρινιστεί οι λειτουργίες στη βιοσύνθεση της Αφλατοξίνης, ενώ οι λειτουργίες των υπόλοιπων 6 δεν έχουν ακόμη πλήρως προσδιοριστεί. Το γονίδιο *aflR* ευθύνεται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής όλων των υπόλοιπων βιοσυνθετικών γονιδίων των Αφλατοξινών συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου. Απομονώθηκε αρχικά από το μύκητα *A.flavus* και στη συνέχεια από τον *A.parasiticus*. Στα γονίδια *aflR* των δύο αυτών μυκήτων

υπάρχει ταύτιση της αλληλουχίας του DNA μεγαλύτερη του 95%. Πρόκειται για ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη, η οποία προσδένει στο DNA στην παλίνδρομη αλληλουχία 5'- TCGN₅CGA - 3' στην περιοχή του εκκινητή των δομικών γονιδίων των *A.flavus* και *A.parasiticus*. Αυτού του είδους οι πρωτεΐνες μετονομάστηκαν σε Zn(II)2Cys₆ και ανήκουν στη μεγάλη τάξη των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που περιορίζονται στους μύκητες. Ο αριθμός των αντίγραφων του γονιδίου *aflR* επηρεάζει άμεσα το βαθμό έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Έτσι, το γεγονός ότι ο *A.parasiticus* φαίνεται να έχει ένα επιπλέον αντίγραφο αρκετών γονιδίων του, υποδεικνύει ότι τουλάχιστον ένα μέρος του γονιδιακού συμπλέγματος υπάρχει εις διπλούν, κάτι που θα μπορούσε να δώσει μια ικανοποιητική εξήγηση για τη μεγαλύτερη παραγωγή Αφλατοξινών από αυτόν σε σχέση με τον *A.flavus*.

Σε αντίθεση με το *aflR*, το άλλο ρυθμιστικό γονίδιο *aflS*, δεν είναι απολύτως απαραίτητο για την παραγωγή της Αφλατοξίνης, καθώς μία διαγραφή του μείωσε την έκφραση κάποιων βιοσυνθετικών γονιδίων στο σύμπλεγμα χωρίς να επηρεάζει όμως την έκφραση του *aflR*. Έτσι υπήρχε παραγωγή Αφλατοξίνης, σε μειωμένα όμως επίπεδα. Η διαγραφή του *aflR* αντίθετα, προκάλεσε αδυναμία στο μύκητα να παράξει Αφλατοξίνες, ενώ διαφοροποίησε την έκφραση 18 γονιδίων της βιοσυνθετικής διαδρομής.^[65,100,244]

Η οργάνωση των γονιδίων σ'ένα σύμπλεγμα ευνοεί την επιτυχή προσαρμογή του οργανισμού στο περιβάλλον του. Καθώς οι τοξινογόνοι μύκητες καλούνται να επιβιώσουν κάτω από ακατάλληλες για ανάπτυξη συχνά συνθήκες (π.χ. ξηρασία), η σωστή γονιδιακή λειτουργία είναι απαραίτητη και η ύπαρξη ενός τέτοιου γονιδιακού συμπλέγματος φαίνεται πως δρα προστατευτικά.

Στα πλαίσια μιας άλλης μελέτης γονιδιακού χαρακτήρα, κλωνοποιήθηκε μία ομάδα τεσσάρων γονιδίων - *sugR* (1), *hxtA* (2), *glcA* (3) και *nadA* (4) -, τα οποία συνιστούν ένα σύμπλεγμα γονιδίων που σχετίζεται με τη χρησιμοποίηση των σακχάρων από το μύκητα *A.parasiticus*, ένα γονιδιακό σύμπλεγμα που βρίσκεται στο ένα άκρο του γονιδιακού συμπλέγματος που ευθύνεται για τη βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Η έκφραση του γονιδίου *hxtA* που κωδικοποιεί μία εξόζη (μεταφορέα πρωτεΐνης), βρέθηκε ότι συντρέχει με το γονιδιακό σύμπλεγμα των 75 Kb, σε θρεπτικό υλικό για αφλατοξινογόνους μύκητες. Η συσχέτιση μεταξύ των δύο συμπλεγμάτων γονιδίων είναι μεγάλης σημασίας, καθώς κάτι τέτοιο δύναται να εξηγήσει την εκκίνηση της βιοσυνθετικής πορείας της ΑΦΒ₁ από απλά σάκχαρα, όπως η γλυκόζη και η σακχαρόζη.^[65]

