



Élelmiszertudományi Kar

**Romlást okozó, potenciálisan toxinképző penészgomba fajok
növekedésének modellezése a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében**

Csernus Olívia
doktori értekezése

Készült a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Mikrobiológiai Osztályán

Jogutódja: Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ
Agrárkörnyezet-tudományi Kutatóintézet
Környezeti és Alkalmazott Mikrobiológiai Osztály

Budapest

2014

A doktori iskola

megnevezése:	Élelmiszertudományi Doktori Iskola
tudományága:	Élelmiszertudományok
vezetője:	Dr. Felföldi József, PhD egyetemi tanár Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Fizika-Automatika Tanszék
Témavezetők:	Dr. Beczner Judit, CSc tudományos tanácsadó Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Dr. Baranyi József, PhD leader of the Computational Microbiology Research Group Institute of Food Research, Norwich, Anglia
Konzulens:	Dr. Farkas József, DSc emeritus professzor, az MTA rendes tagja Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar Hűtő és Állattermék Technológiai Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2014. március 18-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Hoschke Ágoston, CSc

Tagjai

Halász Anna, DSc

Szécsi Árpád, DSc

Rezessyné Szabó Judit, PhD

Péter Gábor, PhD

Opponensek

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD

Dobolyi Csaba, CSc

Titkár

János Anna, PhD

Szüleimnek
és
férjemnek

Minden, ami vagyok, Nekik köszönhetem.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	5
BEVEZETÉS	7
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
1.1 A penészgombák szerveződése és egyedfejlődése	9
1.1.1 A hifa felépítése	9
1.1.2 A micélium kialakulása	10
1.1.3 Ivartalan szaporodás	12
1.2 A gombák anyagcseréje és növekedési folyamatai	12
1.2.1 Szervetlen összetevők	12
1.2.2 Szerves anyagok	13
1.2.3 A gomba növekedésére ható tényezők	13
1.2.4 Növekedés szilárd szubsztrátumon	14
1.2.5 A gombák anyagcsere-folyamatai	14
1.2.6 Másodlagos anyagcsereutak, mikotoxinok	15
1.3 <i>Aspergillus niger</i>	18
1.3.1 Az <i>Aspergillus niger</i> jellemzése	18
1.3.2 Fiziológiai tulajdonságok	19
1.3.2.1 Növekedéshez szükséges tápanyagforrások	19
1.3.2.2 Környezeti tényezők hatása a növekedésre	19
1.4 <i>Penicillium expansum</i>	20
1.4.1 A <i>Penicillium expansum</i> jellemzése	20
1.4.2 Fiziológiai tulajdonságok	21
1.4.2.1 Növekedéshez szükséges tápanyagforrások	21
1.4.2.2 Környezeti tényezők hatása a növekedésre	21
1.5 Prediktív mikrobiológia	22
1.5.1 Prediktív mikrobiológiai modellek fő típusai	23
1.5.2 Elsődleges kinetikai modell	24
1.5.3 A penészgombák szaporodásának modellezése	25
1.5.4 Prediktív modell készítésének lépései	27
1.5.5 ComBase program	28
2. CÉLKITŰZÉSEK	29
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
3.1 A vizsgálatok során alkalmazott penészgomba törzsek	30
3.2 A vizsgálatok során alkalmazott módszerek	30
3.2.1 Mikrobiológiai módszerek	30
3.2.2 Fizikai módszerek – vízaktivitás mérés	33
3.2.3 Statisztikai módszerek	33
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	34
4.1 A penészgombák növekedésének eredményei	34
4.1.1 Az <i>Aspergillus niger</i> telepnövekedésének kinetikája	34
4.1.2 A <i>Penicillium expansum</i> telepnövekedésének kinetikája	41
4.2 A hőmérséklet és a vízaktivitás hatásának modellezése <i>Aspergillus niger</i> növekedésére	46
4.2.1 A prediktív modell hibaanalízise	46
4.2.2 Kombinált modell	54
4.2.3 Becslések ellenőrzése (validálása)	58
4.2.4 A kombinált modell alkalmazása <i>A. niger</i> növekedésére szőlőlé alapú táptalajon	59
4.2.5 A <i>Penicillium expansum</i> növekedése almale alapú táptalajon	66

4.3 ComBase – mikológiai adatbázis	69
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS TÉZISEK.....	71
KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	72
ÖSSZEFOGLALÁS	73
SUMMARY	74
Irodalomjegyzék.....	76
Köszönetnyilvánítás	81

BEVEZETÉS

A betakarítás / szüret utáni, az ún. postharvest veszteségeikért nagymértékben felelős mikrobás, főként penészes romlás nemcsak gazdasági veszteségeket okoz, hanem élelmiszerbiztonsági szempontból is kockázatot jelent. A penészgombák elszaporodásának mértékét döntően meghatározza a szubsztrátum érzékenysége, az oxigén jelenléte, a megfelelő hőmérséklet és a nedvességtartalom. Az élelmiszeralapanyag előállítás (növénytermesztés), feldolgozás, tárolás és forgalmazás minden fázisában számolni kell a penészgombák jelenlétével és növekedésével. Az élelmiszeripar számára alapvető a penészgombáktól és a gombák toxinjaitól lehetőleg mentes alapanyag (KOVÁCS, 1998).

Az élelmiszertermelés mennyiségi gondjai mellett világszerte előtérbe kerül az élelmiszerek minőségének problémája, és stratégiai kérdésként fogalmazódik meg a biztonságos élelem, a jó minőségű élelmiszer iránti igény. A minőségbiztosítás elengedhetetlenül szükséges a stabil és kiváló minőség fenntartásában és javításában. Kiváló minőségű terméket gazdaságosan csak és kizárólag kiváló minőségű alapanyagból lehet előállítani, és ezért a minőséget a technológiai folyamat minden szakaszában biztosítani kell, azaz komplexen kell nézni a rendszert.

Az élelmiszer-feldolgozó ipar számára is alapvető irány a penészgombák nagyfokú kontaminációjától és a gombák toxinjaitól mentes alapanyag. Fontos a növénytermesztés és a raktározás során keletkező gombafertőzések elleni védekezés.

A globális klímaváltozás egyre növekvő mértékben kihat az élelmiszerellátás biztonságossága („food security”) mellett az élelmiszer egészségügyi biztonságra is („food safety”) (FARKAS és BECZNER, 2010). Elősegíti a meleget kedvelő penészgombák, pl. az aszpergilluszok elterjedését és az általuk termelt mikotoxinoknak az élelmiszerekben észlelt egyre gyakoribb megjelenését. A klímaváltozás és az élelmiszergazdasági jelentőségű penészgombák ökofiziológiai kapcsolata az előbbieken említett mindkét szempont alapján nagy figyelmet érdemel, mert a penészgombák, különösen a toxikus anyagcseretermékeket (mikotoxinokat) képzők, a terményeink romlási és tárolási veszteségein túlmenően meghatározó élelmiszerbiztonsági jelentőségűek is (VARGA et al., 2005a, 2005b; FARKAS és BECZNER, 2009; GARCIA et al., 2009; RUSSELL et al., 2010; DOBOLYI et al., 2013).

Mindezek miatt és a megelőzésre / védekezésre való jobb felkészülés érdekében fontos a penészgombák növekedési törvényszerűségei ökofiziológiai összefüggéseinek elmélyült ismerete és lehetőség szerinti előrejelzése. Nagyszámú adat összegyűjtése szükséges ahhoz, hogy az

azokra épülő matematikai modellek segítségével eredményes kockázat-megelőző munka legyen végezhető (GIBSON et al., 1994; GARCIA et al., 2009). Célszerű tehát első közelítésben laboratóriumi, reprodukálható körülmények között a penészgombák növekedési hőmérséklet- és vízaktivitás függésének tanulmányozása.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A mikológia a mykes (gomba) és a logos (tudomány, tan) szavakból ered. A gombák a növény- és állatvilág mellett az eukarióták harmadik önálló csoportját jelentik.

A penészgomba név nem rendszertani fogalom, csak megjelenési formát jelent, a felületi laza telepszerkezetű, makroszkopikus termőtestet nem fejlesztő gombák gyűjtőneve. Az elnevezés nagyon különböző mikroszkopikus méretű, szaporodás- és életmódú hifafonális gombákra vonatkozik, amelyek rendszertani rokonsága olykor nagyon távoli. A penészgombák általában aerob, heterotróf szervezetek. A gombák rendszerében a penészgombák a járomspórás gombák (Zygomycota), a tömlősgombák (Ascomycota) és az imperfekt gombák (Fungi imperfecti vagy Deuteromycota) közé egyaránt tartozhatnak. Túlnyomó részük csak ivartalanul szaporodik, az ivaros alak csak ritkán fordul elő, vagy nem is ismert (DEÁK, 2006).

A penészgombák megjelenése mindennapi életünkben többnyire káros. Jelentős gazdasági és egészségügyi problémát jelentenek a növénytermesztésben, az állattenyésztésben és az élelmiszeriparban. Növényi nyersanyagokon elszaporodva és azok tápanyagait felhasználva azokat emberi és állati fogyasztásra alkalmatlanná teszik. Élelmiszereinken tevékenységük többnyire káros folyamatként, romlásként jelentkezik. A gyümölcs- és zöldségfélék jellegzetes romlási jelenségeit a pektin-, cellulóz- és fehérjebontásra képes parazita és szaprobionta penészgombák, köztük számos *Aspergillus* és *Penicillium* faj okozza.

A jelentős gazdasági veszteségen túl számos penészgomba élelmiszer-egészségügyi veszélyt is jelent, toxikus anyagcseretermékeik, a mikotoxinok képzése miatt.

A penészgombáknak azonban nem csak káros szerepét ismerjük az élelmiszeriparban. Sok példát találunk az élelmiszer-technológiában és a biotechnológiában, ahol gazdasági hasznot hozó tevékenységet fejtenek ki bizonyos fajok (DEÁK, 2006).

1.1 A penészgombák szerveződése és egyedfejlődése

1.1.1 A hifa felépítése

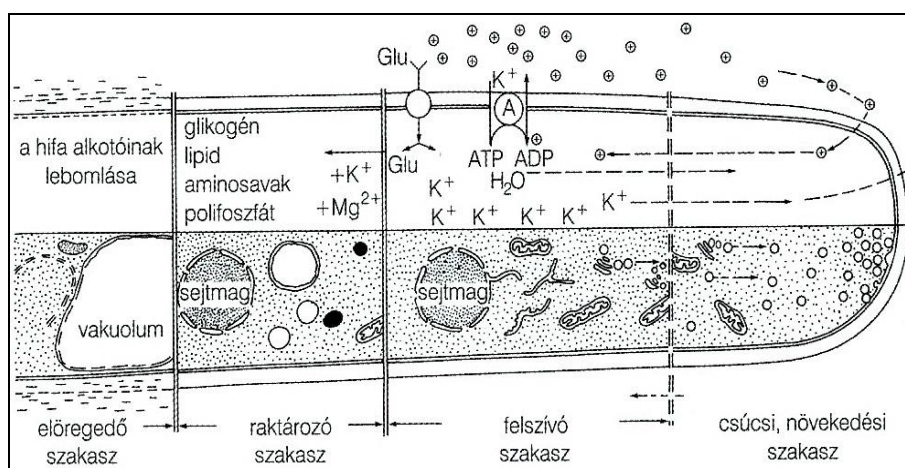
A csőszerű hifa hosszú, de általában csak 5-10 μm átmérőjű képlet, a gombák jellemző sejtalakja. Az alacsonyabb rendű gombavilág hifái még nem tartalmaznak válaszfalakat (szeptumokat), aszeptáltak, a fejlettebb tömlős és bazídiumos gombáknál viszont már kialakultak a szeptumok.

A hifák csúcsnövekedésűek, helyenként elágaznak és az elágazások csúcsai is hasonlóképpen osztódva nőnek tovább. A fonalgombákra a polarizált, egyirányú, intenzív növekedés a

jellemző. A polarizált növekedés eredményezi azt a jelenséget, hogy szilárd táptalaj felületén a fonalas gombatelep egy meghatározott tenyészedőn belül lineárisan növekedik.

A környezetükben lévő tápanyagforrások belsejébe a vékony hifák belenőnek és átszővik annak anyagát. A hifák annál dúsabban ágaznak el és szövik át a szubsztrátot, minél gazdagabb a szubsztrát tápanyagokban. A gombák növekedése és táplálkozása együttesen szabályozott, egymástól el nem választható folyamat, amelyet a fonalas szerveződés sajátosságai tesznek lehetővé.

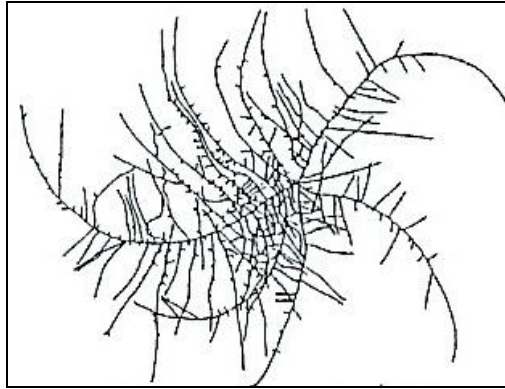
A penészgombákat a trofikus (táplálkozási) növekedés jellemzi. A hifa hosszirányban jellegzetes, funkcionális egységekre osztható (1. ábra). A csúcsi zóna (apikális szakasz) tartalmazza az intenzív növekedéshez, sejtfalszintézishez szükséges anyagokat, amelyek a nagyszámú vezikulumban halmozódnak fel. A hifa csúcs alatti zónáját (szubapikális zóna) a felszívási (abszorpciós) folyamatok jellemzik, ezt követi a hifa azon szakasza, ahol a felvett tápanyagok jelentős mennyiségben raktározódnak (glikogén, lipidcseppek, polifoszfátok stb. formájában), míg a hifa utolsó, legtávolabbi szakaszában a lebontási (katabolikus) folyamatok döntő aránya jellemző, ezt öregedési (szeneszcencia) zónának is nevezzük (JAKUCS, 2009).



1. ábra A hifa zónái és trofikus növekedése (JAKUCS, 2009)

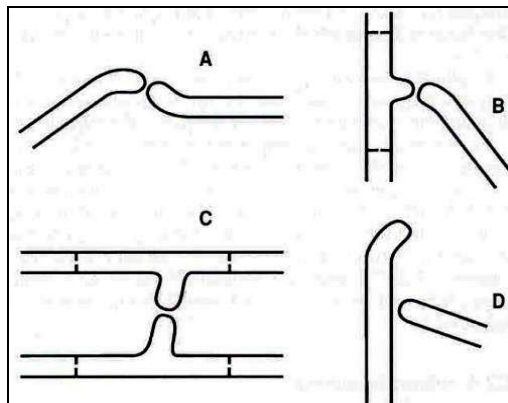
1.1.2 A micélium kialakulása

A hifák szövődéke képezi a gombák micéliumát, azaz vegetatív testét. Vattaszerű szövődékként szövi át a táptalajt. Ezt a szövődékszerű fonalhálózatot gyakran láthatjuk a megpenészesedett élelmiszereken. A fonalas gombák egyenletes tápanyagellátottság esetén (pl. mesterséges táptalajon) kör alakú kolóniát (ún. ideális micéliumot) alkotnak a csúcsi növekedés következtében. Egyetlen gombaspóra csírázását megfigyelve, a kihajtó hifa elágazásokat képez, és az optimális térkitöltés elérésére már néhány elágazás után apró, kör alakú kolónia alakul ki (2. ábra). Ez a micéliumrendszer a gomba egyik legjellemzőbb életmódformáját, a különféle alapanyagok (szubsztrátok) birtokbavételét, átszőződését, azaz kolonizációját eredményezi.



2. ábra A micélium sugaras növekedése. *Aspergillus nidulans* 36 órás tenyésztésében kialakult micélium természetes szerkezete (JAKUCS és VAJNA, 2003)

A sugárirányú növekedés közben a hifák a mellettük lévővel oldalirányban hifahidakat (anasztomózisokat) is képeznek, tehát valóságos hálózat alakul ki. Hifaanasztomózis nemcsak az apikális régió sejtjei között jöhet létre, hanem oldalági növekvő sejtek között, illetve egy növekvő és egy már leállt növekedésű hifa sejtjei, sőt konídiumok között is (3. ábra).



3. ábra A hifaanasztomózisok lehetőségei

A: anasztomózis hifacsúcsok között, **B:** hifacsúcs és oldalelágazás között, **C:** két elágazás között (hídképzés), **D:** hifacsúcs anasztomózisa hifa interkaláris részével (JAKUCS és VAJNA, 2003)

Nem ideális micélium esetében, ahol a tápanyagok eloszlása nem egyenletes, ezek az összeköttetések lehetővé teszik az anyagtranszportot a kolónia jobban és gyengébben ellátott részei között. Az anasztomózisok biztosítják a telep hifáinak szinkron növekedését. A micélium növekedése ugyanis bizonyos belső ritmus szerint nem teljesen egyenletes, hanem sűrűbb és ritkább elágazásokat alkothat (JAKUCS és VAJNA, 2003).

A gombatelepen, a talluszon belül van különbség a hifák helyzete, feladata között. A micéliumrendszer alapfunkciója a tápanyagok felvételét jelenti.

Az ún. aeriális laza (lég-) micélium és a szubsztrátot átszövő, sokkal vékonyabb, tömörebb, kompaktabb, ún. szubsztrát micélium alkotja a penésztelepet. Az ún. aeriális differenciálódás sok fajban előfeltétele az ivartalan és ivaros szaporítószervek létrejöttének. A léghifák rendszerint

vékonyabbak, sejtjeik hosszabbak, mint a szubsztrátban lévők. A szubsztrát- és a légmicélium sűrűsége eltérő a különböző fajoknál és függ a tápközeg összetételétől is (GYÖRFI, 2010).

1.1.3 Ivartalan szaporodás

Sejtegyesülés (ivarsejtek), azaz genetikai változások lehetősége nélkül vezet új hifa, micélium képződéséhez, azaz a faj terjedéséhez. Az ivartalan szaporodási formák közé tartozik az ún. vegetatív szaporodás, ami a fonalak, telepek egyes részeinek leválásával vagy feldarabolódásával jöhet létre. Legegyszerűbb esetben a hifa fragmentálódik, sok új hifát képez.

A legfontosabb, egyben leggyakoribb lehetőség az ivartalan szaporítósejtekkel, a mitospórákkal történő szaporodási mód. Keletkezésük szerint megkülönböztetünk sporangiumok belsejében keletkező, endogén spórákat és spóratartóról exogén módon lefűződő konídiumokat. Számtalan spóraelnevezés szerepel a mikológiai irodalomban. Szinte minden rendszertani csoportban külön spóratípusokat különítettek el.

Csak kis részük szaporodik ivarosán is, aszkospórákat (tömlősgombák (Ascomycota)), vagy bazidiospórákat (bazidiumos gombák (Basidiomycetes)) képezve. A mikrogombák nagy része csak konídiumokat képez, és bár ezek túlnyomó része a molekuláris és egyéb jegyek alapján szintén a tömlősgombákkal állnak rokonságban, ezeket az imperfekt (Deuteromycota) gombák törzsébe sorolják.

A konídium szóval a mikológia az exogén keletkezésű spórákat jelöli, amelyek a konídiumtartón jönnek létre. A csak ivartalan formában ismert gombák (ún. konídiumos gombák) esetében a hifa végső, ún. sporogén sejtje konídiummá alakul, leválik, majd a folyamat újra és újra ismétlődik. A konídiumok a konídiogén sejt csúcsán bújnak ki, és ha láncokat alkotnak, mindig a legelső konídium a legfiatalabb. Így képződnek az *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok konídiumai is (GYÖRFI, 2010).

1.2 A gombák anyagcseréje és növekedési folyamatai

1.2.1 Szervetlen összetevők

A gombákban a víz fordul elő a legnagyobb mennyiségben. A vizet a környezetükből veszik fel, ennek során mindig oldott ásványi anyagok, makro- és mikroelemek is bejutnak a sejtbe.

Nélkülözhetetlen tápelem a kálium, hiánya gátolja a szénhidrát anyagcserét, illetve fontos szerepe van a gombák membrántraszportjában. A kalciumnak fontos szerepe van a hifacsúcs növekedésének, valamint a cukor- és aminosavtraszport szabályozásában, továbbá a konídiumképzést indukálja. A magnézium minden sejtben jelentős enzimaktivátor. A foszfor, mint biogén elem jelentősége minden sejtben nagy, hiszen a nukleinsavak, az ATP, egyes

koenzimek és a membránalkotó foszfolipidek fontos alkotórésze. A foszfort a gombák legtöbbször foszfát alakjában veszik fel. A foszfáthiány a glükózfelhasználást és a légzést gátolja. A réz rendkívül kis mennyiségben szükséges egyes gombák normális növekedéséhez, magasabb koncentrációban mérgező (UBRIZSY és VÖRÖS, 1968).

1.2.2 Szerves anyagok

A gombavilág fő tápanyagain a szén- és a nitrogénforrások képezik. Az egyszerű cukrok (monoszacharidok) közül a leggyakrabban a glükóz és a fruktóz a legfontosabb energiaforrások. Az oligoszacharidok egyik tipikus képviselője a trehalóz, amely a legfőbb szállítódó szénhidrát. A nyugalmi állapotú spórákban is jelentős mennyiségben van jelen, de koncentrációja csírázáskor hirtelen csökkenni kezd. Feltehető, hogy a spóracsírázás energiaigényét szolgáló tartalék tápanyagként is szerepel. A poliszacharidok közül a gombasejtekben kimutatható a keményítő egyik típusa, az amilóz. Rendszerint a spórák falában található nagyobb mennyiségben. Az amilóz mellett a gombasejtek citoplazmájában gyakran fordul elő raktározott szemcsék formájában a glikogén, mint tartalék tápanyag.

A nitrogén tartalmú vegyületek alapvető életfolyamatok résztvevői. A penészgombák általános és jellemző fő vázanyaga a nitrogéntartalmú kitin.

A gombák lipidjei között szerepelnek mono-, di- és trigliceridek, szterolok, szterolészterek és foszfolipidek. A legtöbb gomba membránjának felépítésében specifikus ergoszterolok játszanak fontos szerepet.

A gombák másodlagos anyagcseretermékei között számos különleges szerkezetű, biológiailag aktív molekula van, mint például a gombatoxinok.

1.2.3 A gomba növekedésére ható tényezők

A genetikailag meghatározott növekedési folyamatok a külső (exogén) és a belső (endogén) tényezők rendszerének hatása alatt állnak. E rendszerek lassíthatják, gyorsíthatják vagy akár teljesen megállíthatják a növekedési folyamatokat. A külső tényezők a környezet minden faktora, illetve ezek kölcsönhatásai. A belső tényezők szabályozó (reguláló) anyagokat jelentenek.

A legfontosabb környezeti tényezőknek a hőmérsékletet, a víztartalmat, a pH-t és az oxigéntartalmat tekintjük. A gombaszaporodás és a toxintermelés optimális feltételei rendszerint nem azonosak. Normális anyagcsere- és növekedésintenzitás viszonylag szűk hőmérsékleti tartományban van, mely értékek fajoként eltérők. A nagy hőmérséklet általában gyorsan elpusztítja a gombákat, elsősorban a fehérjék koagulációja következtében. A kis hőmérséklet lassítja az anyagcserefolyamatokat, a növekedés lassul és a gomba számára jellemző hőmérsékleten leáll.

A fonalgombák környezetében a víz rendszerint nehezen hozzáférhető (különböző szerves vagy szervetlen anyagokhoz kötött formában van jelen). A mikroba számára hasznos, hozzáférhető víz mennyiségét a vízaktivitás (a_w) fogalmával fejezzük ki. A vízaktivitás az a viszonyszám, amely megmutatja, hogy a termék nedvességtartalmából képződő víz parciális gőznyomása hányad része a tiszta víz parciális gőznyomásának adott hőmérsékleten. Ez az érték 0 és 1 közé eső szám. Kis vízaktivitási értéken a hifanövekedés üteme lassul, egy határérték alatt pedig már semmilyen növekedés nem tapasztalható (JAKUCS és VAJNA, 2003).

1.2.4 Növekedés szilárd szubsztrátumon

A növekedés mértékének meghatározására a micéliumkultúra átmérőjének mérése a legegyszerűbb és leggyorsabb módszer. E módszer előnye gyorsasága és egyszerűsége mellett az, hogy szükség esetén ugyanazon tenyészetet a zavartalan növekedés mellett akár naponta többször mérhetünk, s így lehetőség van a növekedés időbeli dinamikáját is tanulmányozni. Egyenletes tápanyageloszlás mellett a telep lineárisan, sugárirányban növekedik mindaddig, amíg valamilyen akadályba nem ütközik (ilyen lehet a Petri-csésze széle). A szilárd táptalajok felszínén a gombamicélium fejlődése gyakorlatilag egy síkban történik (szubsztrát micélium). A táptalaj belsejébe a hifák csak kis mélységig nőnek bele, mert a felszíne alatt gyorsan csökken a táptalaj oxigéntartalma. A fonalgombák legtöbbször a szilárd aljzathoz való tapadási kényszerük miatt is fontos a szilárd táptalaj (JAKUCS és VAJNA, 2003).

A hifák a tápközeg felületét rendkívül alaposan behálózzák, hiszen a szubsztrátum anyagait így tudják minél hatékonyabban birtokba venni, vagyis így biztosíthatja legjobban a gomba anyagcseréjét és fennmaradását.

A mikológiai laboratóriumi munka során alkalmazott tápközegek összetételük szerint lehetnek természetes eredetűek vagy szintetikusak. A természetes tápközegek nagy előnye, hogy legtöbbször kiválóan kielégítik a gombák igényeit (a növekedés intenzív), hátrányuk viszont, hogy az adott mennyiség felhasználása után pontosan hasonló összetételű anyaghoz jutni nem lehet. A szintetikus tápközegek pedig csak ismert összetételű anyagokat tartalmaznak, rendszerint csak a gomba számára hasznosítható szénforrást és nitrogénforrást (DEÁK, 2006).

1.2.5 A gombák anyagcsere-folyamatai

Az új tenyészet a táptalaj beoltása után csak bizonyos idő elteltével (lag periódus) indul növekedésnek, amikor már az új környezethez alkalmazkodott. Ezután a tenyészet egy ideig exponenciálisan növekszik (logaritmikus skálán ábrázolva egyenest ad). Ez az ún. exponenciális vagy logaritmikus szakasz. Egy idő után azonban a tápanyagok fogyása és bizonyos gátló anyagok felszaporodása miatt a növekedés üteme csökken. Egy ideig állandó értéken van

(stacioner fázis). Az idő előrehaladtával az anyagcsere intenzitása és módja is megváltozik. Míg a korai szakaszban az ún. elsődleges anyagcseretermékek keletkeznek (pl. fehérjék, nukleinsavak), a stacioner fázisban már olyan új vegyületek (pl. pigmentek, toxinok) is kimutathatók, amelyeknek nincs közvetlen szerepük az élet fenntartásában. Ez utóbbiakat nevezzük másodlagos anyagcseretermékeknek, amelyek speciális, kémiai szempontból változatos vegyületek, csak egy-egy kisebb rendszertani csoportra, esetleg csak egyetlen fajra jellemzőek.

A gombák nagy molekulájú szénhidrátjai (poliszacharidjai) nagyrészt a sejtfal felépítésében játszanak szerepet. A hifacsúcson a sejtfal még plasztikus rendszert alkot, amely nyúlásra, deformációra képes. Ezt az itt termelődő kitinszintetáz és a már kialakult kötéseket fellazító kitinbontó (ún. kitináz) enzimek ellentétes hatásának jól szabályozott egyensúlya biztosítja.

A fonalas gombáknál az elsődleges sejtfal a hifacsúcson képződik és növekedésének üteme szerint válik az érett sejtfal belső rétegévé. A sejtfal első szintetizált rétege a kitin. A csúcstól távolodva a sejtfal egyre vastagodik, és folyamatosan képződik rajta a másodlagos réteg. Így a sejtfal két szakaszban képződik: az elsőben a kitin, a másodikban olyan réteg keletkezik, mely glukánokat, mannánt és más polimereket tartalmaz, melyek az elsődleges rétegen helyezkednek el.

A gombák kitintartalma elég széles intervallumban ingadozik (0,2-26,2%). Az *Aspergillus* fajokban nagy kitintartalmat mutattak ki (20-22%), a *Penicillium* fajok esetében mennyiségük jóval kevesebb (4-5%). Egyazon nemzetség különböző fajai között igen jelentős az eltérés, de egy faj különböző törzsei között is lehetnek nagy eltérések. A sejtfal kitintartalma a tápközeg szén- és nitrogénforrásától, a pH-tól (savas közegben lényegesen több kitin képződik, mint lúgosban), a kultúra korától (idősebben több) és oxigén ellátásától is függ.

A gombák sejtfalában színyanyagok és melanin típusú pigmentek is előfordulhatnak (VETTER, 1992).

1.2.6 Másodlagos anyagcsereutak, mikotoxinok

A sok enzimátikus lépésből álló, bonyolult másodlagos anyagcsereutak olyannyira energiaigényesek, hogy csak abban az esetben maradhattak fenn az evolúció során, ha meglétük jelentős szelekciós előnyhöz juttatta az ilyen képességgel rendelkező szervezeteket. Bizonyos esetekben egyértelműen kimutatható közvetlen pozitív hatásuk a gomba életében pl. a gombatoxinok védőhatása az antagonista szervezetekkel szemben vagy a pigmentek fényvédő szerepe.

A toxinok előfordulásával a táplálékláncban mindenütt számolni kell, ahol lehetőség van a penészgombák elszaporodására. A penészgombák indirekt, a toxinjaik pedig direkt módon

hatnak károsan. A mikotoxinok kémiai szempontból sokfélék és erős biológiai aktivitással rendelkeznek. Másodlagos metabolitok, melyek a gomba növekedési folyamataiban közvetlenül nem játszanak szerepet. A szekunder metabolitok termelése általában a lineáris növekedési fázis végén indul meg, amikor a tápközeg összetevői közül egy vagy több teljesen elhasználódik. Ugyanazon toxint különböző gombafajok is képesek előállítani, ugyanakkor egy gombafaj egyidejűleg több mikotoxint is termelhet. A toxinogén gombák nem minden törzse termel toxint (KOVÁCS, 2001).

A toxintermelő gombákat gyakorlati szempontból a szántóföldi (pl. *Fusarium* fajok), ill. a raktári (pl. *Aspergillus* és *Penicillium* fajok) penészgombák csoportjába soroljuk. Természetesen ezt a csoportosítást nem lehet mereven alkalmazni, mert a két csoportba tartozó gombák a szántóföldön, a talajban és a raktárakban is megtalálhatók, tehát a velük való kontamináció bárhol megtörténhet.

Utólag hiába pusztítják el az élelmiszerekben elszaporodott gombákat pl. hőkezeléssel, mert méreganyagaik nem bomlanak le, hanem tartósan megőrzik aktivitásukat. A toxinok horizontális és vertikális mozgása a táplálékláncban a talajtól az emberi táplálékon át az anyatejig kimutatható. Régebben ezeknek a sokszor tömeges mérgezéseknek az okát nem ismerték föl, ezért járványos betegségnek hitték őket. A mikotoxin kutatást az 1960-as évektől számítjuk, amikor a mikotoxinok fontosságára az Angliában nagyméretű pulykaelhullás hívta fel a figyelmet, amelyet a táp aflatoxin-tartalma okozott. Manapság gyakoribbá válik a kis mennyiségben lévő toxinok egymásra hatása, szinergizmusa, a vegyes toxikózisok előfordulása (KOVÁCS, 2010).

Az imperfekt gombák közé tartozó *Aspergillus* és *Penicillium* fajok súlyos elváltozásokat hozhatnak létre a tüdőben és az idegrendszerben (aszpergillózis, penicilliózis). Ezek a betegségek gyakran halálos kimenetelűek, de szerencsére aránylag ritkák. A kórokozók inkább fakultatív patogénnek tekinthetők, vagyis csak a legyengült, beteg szervezetet támadják meg, de időnként kialakulhatnak erősebben patogén törzsek is. Aránylag gyakori az előfordulásuk olyan munkakörben dolgozóknál, ahol a tüdőhám a poros szemcséket tartalmazó levegő miatt sérül, pl. fűszerpaprika-feldolgozó munkások között.

A gombatoxinok rendszerint kémiaiag nagyon stabil vegyületek, így a különböző környezeti hatásoknak ellenállnak. A szervezetbe jutott toxin az emésztési folyamatokkal szemben is meglehetősen ellenálló. A felszívódás a vékonybélből történik. A szervezetben a gombatoxinok bizonyos átalakuláson mennek keresztül. Ez az átalakulás a mérgező hatás csökkentését vagy teljes megszűnését és a toxikus anyag kiürülését szolgálja. Azonban az is előfordulhat, hogy a metabolizáció során toxikusabb, biológiailag aktívabb vegyület keletkezik, mint az eredeti volt.

A patulin egyike azon gomba anyagcsere-termékeknek, amelyet az *Aspergillus*, *Penicillium* és más gomba nemzetségen belül igen sok faj termel. Ennek köszönhető, hogy antibiotikum szűrővizsgálatok során számos néven leírták. Antibiotikus hatása ellenére a magasabbrendű élőlényeken tapasztalt toxicitása, továbbá az élelmiszereken és takarmányokon észlelt gyakori előfordulása miatt mikotoxinnak tekintjük. Ember-egészségügyi szempontból különösen figyelemreméltó, hogy rákkeltő és teratogén hatása is van. Megnöveli az erek permeabilitását, így fokozza az ödémaképződést a tüdőben és az agyban. A patulint elsősorban gyümölcsökből és zöldségfélékből, illetve a belőlük előállított termékekből mutatták ki (BARKAI-GOLAN, 2008a).

Az ochratoxin-termelő fajok közül a hideg klímájú régiókban a leggyakoribbak a *Penicillium* fajok, míg a meleg és trópusi éghajlaton az *Aspergillus* fajok a fő toxin-termelők. Az ochratoxikózis hazánkban is komoly egészségügyi kockázatot jelent. Legnagyobb mennyiségben az ochratoxin A (OTA) képződik, amely biológiailag a legaktívabb. Az OTA mikotoxint 1965-ben az *Aspergillus ochraceus* metabolitjaként írták le, de számos rokon *Aspergillus* faj is termeli. Ki kell emelni a *Penicillium verrucosum*ot is. Ochratoxin képzők közé tartoznak az *A. niger* egyes törzsei is (VARGA et al., 2005a). Elsőként ABARCA és munkatársai (1994) írták le az *A. niger* ochratoxin A képző tulajdonságát. A fekete *Aspergillus* fajokat összefüggésbe hozzák a kávébab, a szőlő és a fűszerek OTA-szennyezettségével. Az ember közvetlenül (penészes növényi eredetű élelmiszerekkel) és közvetve (állati eredetű termékekkel) veszi fel a toxint. Az ochratoxin vese- és májkárosító, teratogén, mutagén, akut nefrotoxin, ezen kívül immunszuppresszív és karcinogén hatása is igazolt (BARKAI-GOLAN, 2008b).

1.3 *Aspergillus niger*

Az *Aspergillus* nemzetség anamorf alakjait a gombák Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) osztályába sorolják. Egy firenzei lelkész és mikológus, P. A. Micheli 1729-ben jegyezte fel először az *Aspergillus* nemzetséget, az ún. kannapenészeket. Konídiumtartó képletének a szentelt víz hintésének eszközére (latinul aspergillum) emlékeztető formája alapján nevezte el (KLICH, 2002).

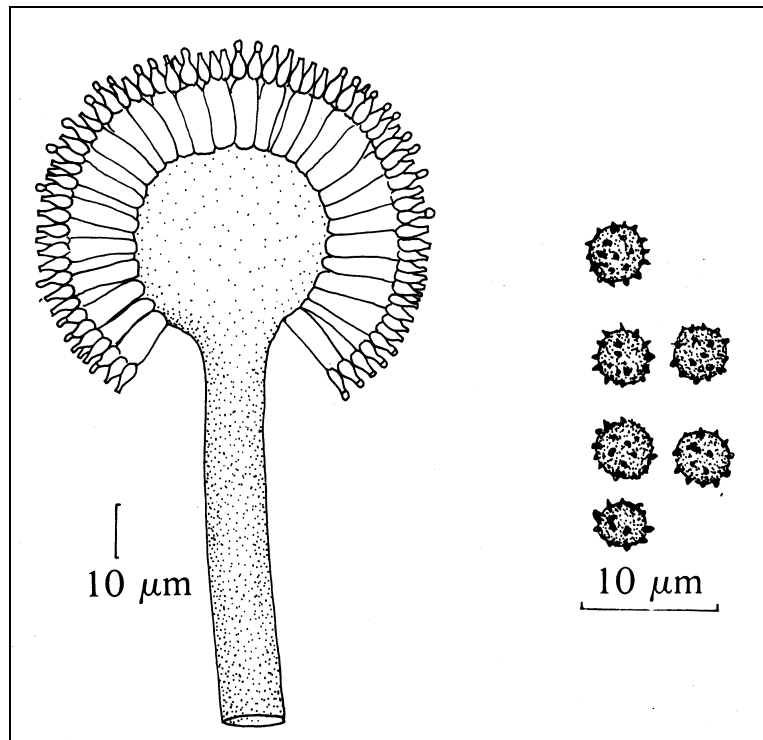
Az *Aspergillus* nemzetség az eukarióta fonalas mikroszervezetek egyik legintenzívebben vizsgált csoportja. Élelmiszeripari jelentőségük igen nagy. A nemzetség Janus-arcúságához tartozik, hogy a különböző iparágakban (gyógyszer-, fermentációs ipar) hasznosított aktivitásuk mellett egészségügyi szempontból veszélyt jelentenek az általuk termelt természetes méreganyagok, a mikotoxinok.

Az *A. niger* szőlőn elsősorban a trópusi és mediterrán klímájú országokban gyakori, de a klímaváltozás hatására hazánkban is valószínűsíthető elterjedése. Tehát az *A. niger* aktuális problémát jelent, ezért választottam ezt a penészgomba fajt a vizsgálatokhoz.

1.3.1 Az *Aspergillus niger* jellemzése

A fekete *Aspergillus* fajok közül az élelmiszeriparban ellenőrzött körülmények között használt *A. niger*-t az US Food and Drug Administration GRAS (generally regarded as safe) minősítéssel látta el, azaz e faj alkalmazásával létrehozott termékek (enzimek, szerves savak) felhasználhatók élelmiszer-adalékként. Gazdasági szempontból viszont nagy károkat okoznak szántóföldön és raktárban egyaránt. Az *Aspergillus* fajok közül az *A. niger* nagymértékben felelős a friss gyümölcsök és zöldségek posztharvest veszteségeiért.

A 4. ábra szemlélteti a jellegzetes konídiumtartóját és konídiumait. A konídiumtartó nem ágazik el, vége kiöblösödik, ún. vezikulumot képez, amelynek átmérője 50-75 μm . A vezikulum felszínét a metulák (10-15 μm hosszú) és fialidok (7-10 μm hosszú) borítják be. A konídiumtartó sima és színtelen, legfeljebb közvetlenül a vezikulum alatt válik színessé. A micélium fehér vagy sárgás színű. A konídiumok (4-5 μm átmérőjű) gömbölyűek, érdes, tüskés falúak. A fekete penész elnevezés a gomba konídiospóráinak színére utal, amely lehet barnásfekete, bíborbarna vagy fekete (PITT és HOCKING, 1997a).



4. ábra *Aspergillus niger* konídiumtartója és konídiumai (SAMSON és van REENEN-HOEKSTRA, 1988)

1.3.2 Fiziológiai tulajdonságok

1.3.2.1 Növekedéshez szükséges tápanyagforrások

A penészgombák nem egyformán preferálják a szubsztrátként szolgáló tápanyagokat. Az *A. niger* keményítóbontó amilázokat termel, így a keményítő szénforrásként történő hasznosítását teszi lehetővé a gomba számára. A mikroelemek közül a réznek fontos szerepe van, e nélkül pigmenthiány áll elő, ami különösen az *A. niger* sötét színű konídiospórái esetében szembetűnő (UBRIZSY és VÖRÖS, 1968).

1.3.2.2 Környezeti tényezők hatása a növekedésre

Az *A. niger* növekedésére a 6-8°C minimális, 45-47°C maximális és 35-37°C optimális hőmérséklet a jellemző (PITT és HOCKING, 1997a). Elsősorban a trópusi és szubtrópusi országokban szaporodik. A globális felmelegedés eredményeként azonban Magyarországon terjedése valószínűsíthető (FARKAS és BECZNER, 2009; VARGA et al., 2012).

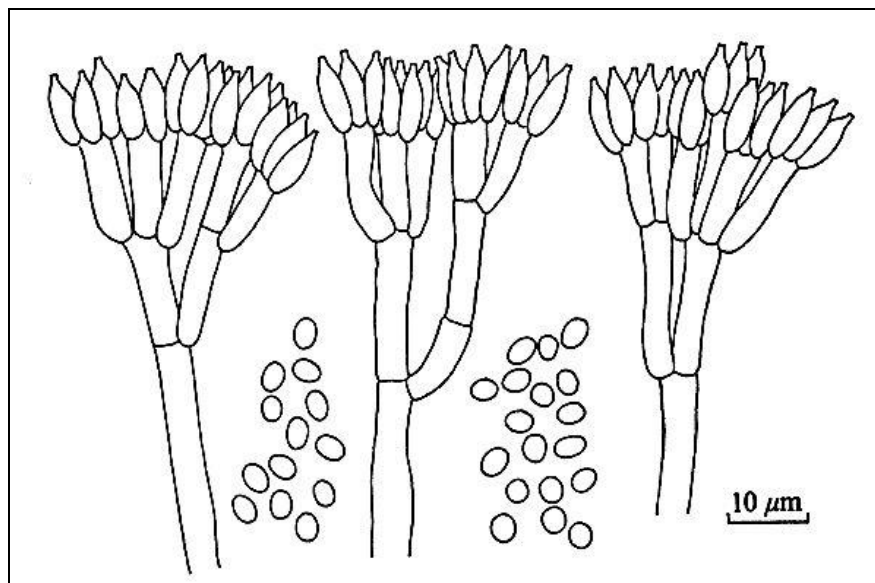
Szárazságtűrőként (xerofil) írták le, mivel 0,77 vízaktivitási értéken 35°C-on megfigyelték a konídium csírázását. A tápközeg vízaktivitását befolyásoló komponensek esetében a NaCl és a glicerin jelenléte hasonló módon befolyásolja a telep növekedését. Az *A. niger* növekedésére széles pH tartomány a jellemző, pH 2 értéken is képes növekedni (PITT és HOCKING, 1997a).

1.4 *Penicillium expansum*

A *Penicillium expansum*-ot az imperfekt gombák (Deuteromycetes) közé, azon belül a *Penicillium* nemzetségbe sorolják. Az almás termésűek és a citrus-félék romlását okozza, a patulin mikotoxin termeléséért elsősorban ez a penészgomba felelős (FAO, 2001) hazánkban is (TACZMAN-BRÜCKNER et al., 2005). Tehát a *P. expansum* által okozott romlás problémája aktuális, ezért esett erre a penészgomba fajra a választás.

1.4.1 A *Penicillium expansum* jellemzése

Az 5. ábra szemlélteti a jellegzetes konídiumtartóját és konídiumait. A konídiumtartó (konidiofor) többszörösen elágazik, az ágak végén ülnek a metulák (elsődleges sterigmák) és a fialidok (másodlagos sterigmák), amelyek a konídiumláncokkal együtt alkotják a jellegzetes „ecsetet”. A metula (12-15 µm hosszú) hengeres alakú, a fialid (8-12 µm hosszú) palack formájú, rövid nyakkal. A konídiumtartók részben vagy teljesen korémiumokat alkotnak, sima vagy finoman érdes falúak. A konídiumok (konídiospórák) felülete sima, 3,0-3,5 µm átmérőjűek és ellipszoid alakúak. A légmicélium gyengén fejlett. A telep többnyire a szubsztrátumból eredő konídiumtartókból áll, bársonyos megjelenésű, színe faközöld, fehér széllel.



5. ábra A *Penicillium expansum* konídiumtartója és konídiumai (SAMSON és van REENEN-HOEKSTRA, 1988)

1.4.2 Fiziológiai tulajdonságok

1.4.2.1 Növekedéshez szükséges tápanyagforrások

A *Penicillium* nemzetségbe tartozó fajok szénforrásként többnyire jól hasznosítják a mono- és diszacharidokat, a cukoralkoholokat, képesek lebontani a poliszacharidokat. Friss gyümölcsök és egyéb növényi nyersanyagok romlását okozó tulajdonságért pektinbontó enzimjei a felelősek. Több *Penicillium* faj képes a lipáz termelésére, amely lehetővé teszi a nagyobb zsírtartalmú termékeken való elszaporodását is. A szénforrások széles skáláján való növekedéssel szemben a *Penicillium* fajok nitrogén forrásként a legtöbb esetben csak a nitrátot képesek hasznosítani, ezen kívül csak pepton jelenlétében tapasztaltak gyorsabb növekedést. A *Penicillium* fajok többségére nem jellemző a komplex tápanyagforrások, illetve a vitaminok iránti igény (MOSS, 1987).

1.4.2.2 Környezeti tényezők hatása a növekedésre

A *Penicillium* fajok optimális szaporodási hőmérséklete 20-30°C között van. A legtöbb faj – köztük a *Penicillium expansum* – nem képes 37°C fölött növekedni. Ezzel szemben számos élelmiszer romlását okozó fajról ismert, hogy képes hűtött körülmények között növekedni, sőt PITT és HOCKING (1997b) -6°C-on is megfigyelte a gomba minimális mértékű hifa-növekedését.

A *Penicillium expansum* konídium csírázásához és a hifa növekedéséhez szükséges minimális vízaktivitása 0,82-0,83. A legtöbb *Penicillium* faj széles pH tartományban (pH 3,0-8,0) képes növekedni. Oxigén igénye nagyon kicsi, 2,1% oxigén ellátottság még nem zavarja a növekedését (PITT és HOCKING, 1997b).

1.5 Prediktív mikrobiológia

A prediktív mikrobiológiának a mikrobiológiai és a matematikai ismeretek ötvözésére építő koncepciója abból indult ki, hogy mikro-ökológiai tényezők, pl. a hőmérséklet, a pH és a vízaktivitás, egyértelműen meghatározzák a sejtek szaporodási-pusztulási kinetikáját, s ezért ez az összefüggés matematikai nyelven leírható.

Óriási közegészségügyi és gazdasági jelentőségű kérdés a mikroorganizmusok élelmiszereinkben való jelenlétét és viselkedését meghatározó tényezők és hatásainak az ismerete.

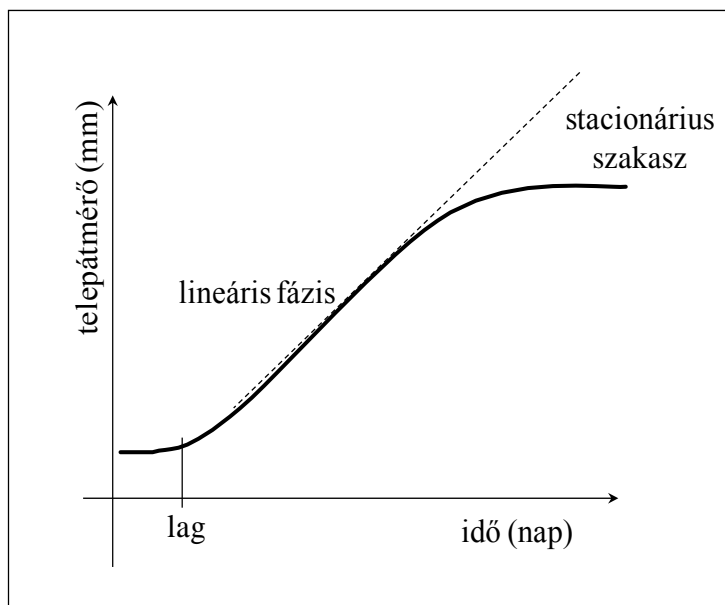
A prediktív mikrobiológia olyan matematikai modellek kidolgozásával, illetve már meglévő modellek alkalmazásával foglalkozik, amelyek képesek adott környezeti körülmények között a mikroba-szaporodás, illetve -pusztulás dinamizmusát előre jelezni. A jelenleg használt modellek döntően empirikus elemekből épülnek fel, azaz a kísérleti adatok illesztésén alapulnak. Amennyiben elegendően nagy adatbázis áll rendelkezésre, akkor lehetővé válik a szaporodás, illetve pusztulás előrejelzése olyan környezeti körülmények között is, amelyeket a modell megalkotása során nem vizsgáltak, feltéve, hogy azokhoz képest a kérdéses környezeti feltétel a vizsgált tartományon belül található (interpoláció).

A modellezés igen bonyolult feladat az élelmiszerek mikro-ökológiájának komplex rendszere miatt. Alkalmazásuk azonban hatékony, és gyors döntést tesz lehetővé az élelmiszerbiztonsággal kapcsolatos munkákban. A mikrobák különböző ökológiai feltételek közötti szaporodását leíró modellek segítségével gyors és viszonylag megbízható előrejelzést lehet kapni az egyes mikroorganizmusok várható viselkedéséről. Bár a modellekkel végzett számítások nem helyettesítik a valós élelmiszerekkel végzett vizsgálatokat, segítségükkel kiszűrhetők, hol kell nagyobb kockázattal számolni, illetve hol nincs reális esélye a szaporodásnak. Ezáltal csökkenthető az elvégzendő becslésekhez szükséges idő és költség. Előnyük továbbá, hogy használható becslést adnak olyan esetekben is, amikor több tényező együttes hatását kell megítélni.

1.5.1 Prediktív mikrobiológiai modellek fő típusai

A mikrobiológiai modelleknek három, egymásra épülő típusát különböztük el:

1. Az ún. elsődleges modell (primary model), amely az adott mikroba szaporodását írja le az idő függvényében, a penészgomba esetében a növekedés a telepátmérő változásának (mm/nap) mérésén alapszik. A kísérleti adatokra növekedési görbét illesztnek.



6. ábra Az elsődleges modell (primary model) ábrázolása

A 6. ábrán egy szigmoid növekedési görbét látunk, amelyen jellegzetes szakaszokat különíthetünk el. A kezdeti lappangási (lag) fázist egy lineáris fázis követi. Baktériumok szaporodási görbéjén a szaporodási sebesség ebben a szakaszban éri el a legnagyobb és közelítőleg állandó értéket, amikor a sejtek száma exponenciálisan növekszik, és ez lineárisan jelenik meg a log-skálán. A penészgombák esetében a telepátmérő nő lineárisan. Konstans körülmények mellett a növekedési sebesség ebben a fázisban éri el a legnagyobb értéket, ami viszonylag tartósan állandó. Két kezdeti érték jellemzi a rendszert: az inokulum nagysága (induló csíraszám), és a kezdeti fiziológiai állapot (az ún. α_0 érték); ezek befolyásolják, hogy mikor ér a tenyészet a lineáris fázisba. A kezdeti fiziológiai állapot a mikroba múltjától függ, és azt jelzi, hogy a beoltás pillanatában, amikor a sejtek környezete hirtelen megváltozik, azok mennyire állnak készen az új környezetre (BARANYI és ROBERTS, 1994).

2. Az ún. másodlagos modell (secondary model) azt írja le, hogy a különböző környezeti hatások, mint a hőmérséklet és a vízaktivitás változása (DANTIGNY, 2004), együttesen hogyan befolyásolják az elsődleges modell paramétereit.

3. Az ún. harmadlagos modell valójában nem matematikai modell, hanem olyan implementációs eszköz, amely összekapcsolja az elsődleges és a másodlagos modelleket, többnyire felhasználóbarát számítógépes szoftver-csomagok útján, mint pl. a PMP (Pathogen Modeling Program) (<http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx>) és a ComBase (Combined dataBase) (<http://www.combase.cc/index.php/en/>).

A legismertebb ilyen csomag a ComBase. Ennek két fő eleme van, egy szimulációs és egy adatkereső modul. Az első az előrejelzéshez használható matematikai modelleket szimulációra használja, a második ahhoz az adatbázishoz nyújt hozzáférési lehetőséget, amit a matematikai modell paramétereinek a meghatározásához, illetve az előrejelzések validálásához használtak.

Ezeket az előrejelző modelleket egyre szélesebb körben alkalmazzák az élelmiszerbiztonsági rendszerek tervezésénél és az élelmiszerbiztonságra irányuló döntések meghozatalánál. Jól használhatók előszűrésre, a tárolási feltételek hatásának gyors, olcsó megítélésére, kísérlet tervezésére, valamint a biztonságos fogyaszthatósági idő előzetes becslésére. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a prediktív modellezésen alapuló számítások önmagukban nem elegendőek az élelmiszerbiztonsági intézkedések megfelelőségének bizonyítására.

A mikrobaszaporodás és -pusztulás leírására használt matematikai modelleket alapvetően két csoportba lehet osztani: valószínűségi (probabilisztikus) és kinetikai modellek. A valószínűségi modellek arra szolgálnak, hogy egy adott mikroorganizmussal kapcsolatos bizonyos történésnek a valószínűségét jelezzék az ökológiai tényezőktől függően. Az ilyen valószínűségi információ rendkívül hasznos, ha a kérdéses mikroba olyan anyagot, pl. letális toxint termel, ami semmiképpen nem engedhető meg az élelmiszerben.

A kinetikai modellek célja az élelmiszer stabilitása vagy biztonságossága szempontjából kritikus mikroorganizmus szaporodásának vagy pusztulásának előrejelzése. Tehát kinetikai modelleket használunk, ha a szaporodási / pusztulási sebesség meghatározható, és az döntően befolyásolja a vizsgált problémára adandó választ.

1.5.2 Elsődleges kinetikai modell

A '90-es évekre elkészültek a prediktív mikrobiológiai modellek első verziói, amelyeket az élelmiszerekben leggyakrabban előforduló mikroorganizmusokra fejlesztettek ki. Ezek elfogadható pontosságú, a gyakorlatban is használható előrejelzést adtak a mikrobaszaporodás sebességére a fő környezeti tényezők függvényében. Viszont kevésbé pontos becslést adtak a

mikrobaszaporodás ún. lappangási szakaszának (a lag-fázis időtartamának) a becslésére, ami jelentős mértékben függ a jelenlévő mikroba populáció „előéletétől”, azaz az azt előzetesen ért (környezeti) behatásoktól. BARANYI és ROBERTS (1994) egy ún. dinamikus elsődleges baktériumszaporodási modellt vezetett be, amely először mutatta ki, hogy a lappangási idő egy addig elhanyagolt, a kezdeti fiziológiai állapotot jelző értéktől is függ, tehát közvetetten a sejtek múltjától. A modell a mikrobák adaptálódását az új környezethez egy úgynevezett nem-autonóm differenciál egyenlettel írja le, vagyis figyelembe veszi a sejtek múltját is. A tapasztalat szerint, amikor egy tenyészet új környezetbe kerül, akkor a szaporodás megindulása teljesen azonos genetikai állománnyal rendelkező populációkban is eltérő lehet. A különbség pedig a múltban történt külső hatásokból adódik, hogy milyen sokként éli meg a mikroba az új környezetet. A kezdeti fiziológiai állapot kvantifikálására egy dimenzió nélküli, 0 és 1 közötti mérőszámot (α_0) vezettek be, ami lényegében azt fejezi ki, hogy az aktuális körülményeknek mennyire megfelelő a szaporodási görbe kezdetén a sejtek „készenléte”. Ha ez az érték nulla, akkor a lag fázis hossza végtelen (a sejtek nem képesek szaporodni); ha 1, akkor a növekedés azonnal megindul. Az exponenciális szaporodáshoz történő konvergencia ekvivalens a fiziológiai állapotnak a környezetre jellemző optimális állapotához ($\alpha=1$) való közeledésével. Az exponenciális szaporodásnak akkor van vége, amikor a mikrobapopuláció szaporodási sebessége csökkenni kezd.

A Baranyi-modellnek négy fő paramétere a kezdeti sejtkoncentráció, a kezdeti fiziológiai állapot, a növekedési ráta és a sejtek maximális koncentrációja a stacionárius szakaszban (BARANYI és ROBERTS, 1994). A lappangási idő (lag) egy származtatott mennyiség, amit mind a jelenlegi, mind a múltbeli környezet befolyásol. A Baranyi-modell előnye, hogy lehetővé teszi a dinamikus környezetben való (például változó hőmérsékleti körülmények közötti) modellezést is. A modellt GIBSON és munkatársai (1994) sikerrel alkalmazták penészgombák növekedésének leírására is.

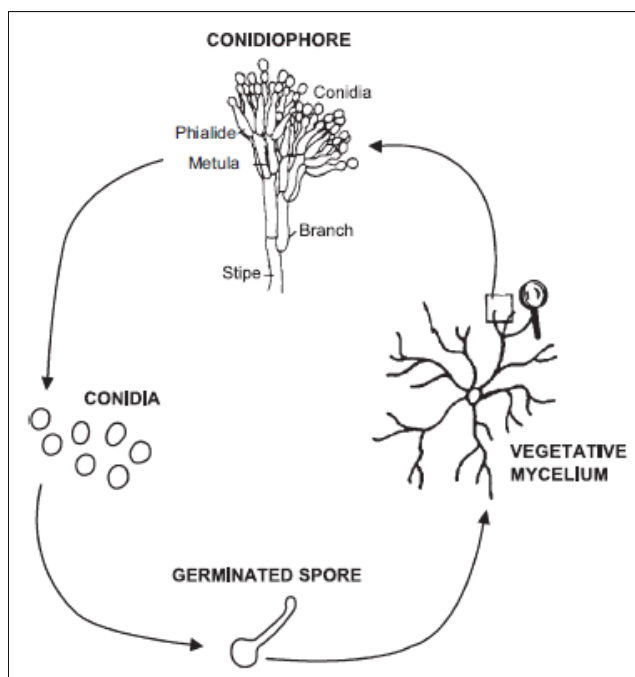
1.5.3 A penészgombák szaporodásának modellezése

Míg a baktériumokkal kapcsolatos prediktív mikrobiológia jelentős fejlődést ért el, addig a fonalas gombákkal kapcsolatban ez a munka nehezen indult meg (GIBSON és HOCKING, 1997; DANTIGNY, 2004). Az elmúlt években a prediktív mikológia témakörében megjelent publikációk száma nőtt, amiről GARCIA és munkatársai (2009) beszámoltak.

A penészgombák növekedésére elsődlegesen – a hozzáférhető tápanyag mellett – ugyanaz a két fontos környezeti paraméter van hatással, mint a baktériumokra: a hőmérséklet és a vízaktivitás. A két fő környezeti tényező közül a vízaktivitás hatása a penészgomba esetében markánsabb, mint a baktériumoknál (HOLMQUIST et al., 1983).

A baktérium szaporodási modelleket ugyan fel tudjuk használni a penészgombák növekedésének jellemzésére, de figyelembe kell venni a penészgombák sajátosságait. Míg a baktériumoknál tke/ml vagy tke/g-ban (telepképző egység, angolul cfu, colony forming unit) fejezzük ki a szaporodást, addig a gombatelep számszerű jellemzése hagyományosan a telep átmérőjének időegységenkénti (mm/nap) mérése útján történik.

A 7. ábra szemlélteti a *Penicillium chrysogenum* életciklusát. Míg az egysejtű baktériumok kettéosztódással szaporodnak, a penészgombákra komplexebb növekedés a jellemző. A telep előregedésével különböző színű sporangiospórák jelennek meg a micéliumtömegben, amely felismerhető küllemű és jellegzetes penész szagú bevonattá alakul.



7. ábra A *Penicillium chrysogenum* életciklusa. A konídium csírázását követően a hifák sűrű, fehér micéliumtömeget hoznak létre, amelyen a telep előregedésével megjelennek a konídiospórák (DANTIGNY et al., 2005)

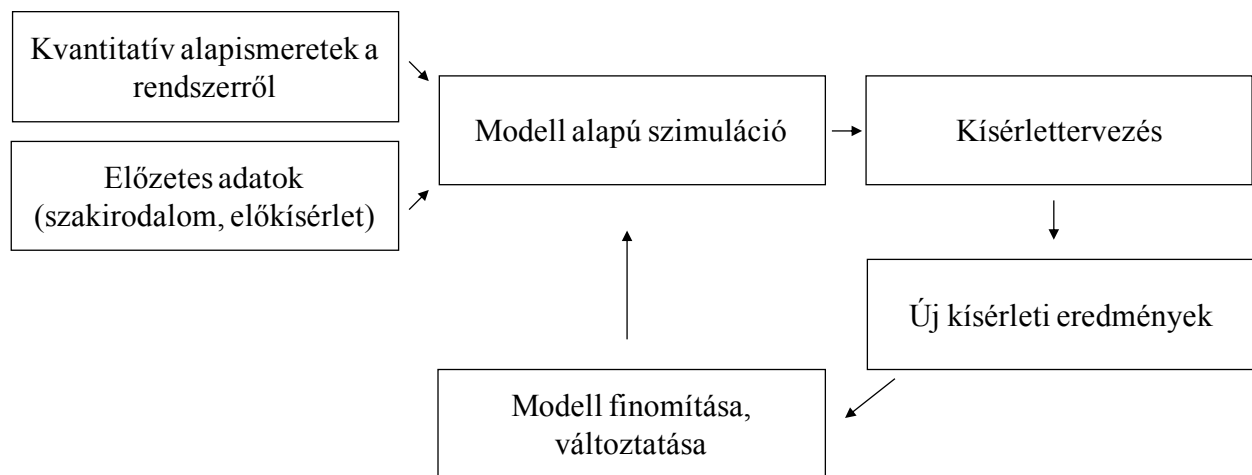
GIBSON és munkatársai (1994) a telepátmérők maximális növekedési sebességét nem közvetlenül a vízaktivitás függvényében írták le, hanem bevezették az alábbi transzformációt:

$$b_w = \sqrt{1 - a_w} \quad (1)$$

A transzformáció haszna hasonló ahhoz, amiért nem a sejtkoncentrációt, hanem annak logaritmusát modellezzük baktériumok esetében. Az ilyen ún. „átskálázások”-at kétféle célból szokás bevezetni: (1) a kérdéses probléma (pl. paraméter becslés) linearizálása; (2) a mérési adatok varianciájának egyenletessé tétele. A fenti esetben mindkettőről szó van; a növekedési ráta (g) helyett annak természetes alapú logaritmusát $\ln(g)$, és a vízaktivitás helyett a b_w értéket véve, az $\ln(g)$ és a b_w összefüggés parabolikus lesz, ami miatt a mért adatokat (illetve azok fenti transzformáltját) lineáris regresszióval lehet illeszteni.

1.5.4 Prediktív modell készítésének lépései

Minthogy az élelmiszer, mint a mikroorganizmusok környezete, egy komplex rendszer, bármilyen modellezés szükségszerűen számos leegyszerűsítésre és feltételezésre vezet. A feltételezett matematikai egyszerűsítések az egyes kiválasztott tényezők elsődlegességére épülnek: egyrészt, hogy kezelhető számú változóval, paraméterrel dolgozhassunk, másrészt, hogy a becslés kellően robusztus (pl. kis változásokra nem túlzottan érzékeny) lehessen. A 8. ábra szemlélteti egy modell készítésének folyamatát, s annak folytonos visszacsatolós rendszerét.



8. ábra A modellezés, mint visszacsatolós eljárás

Szakirodalmi vagy más adatokra támaszkodva mindig van valamilyen tudásunk, amit felhasználhatunk egy modell alapú szimulációhoz. A szimulált eredmények alapján megtervezzük az újabb kísérletet, amely eredményeinek birtokában már képesek vagyunk a meglévő modellen finomítani, oly módon változtatni, hogy a becslésünk alkalmas legyen az előrejelzésre.

Az alábbi lépések jellemzőek egy prediktív modell felállítása során:

1. kísérletek tervezése
2. adatgyűjtés
3. egyenletek kidolgozása, illesztése az adatokhoz
4. analitikus elemzés (pl. optimum hely, szélsőértékek)
5. a becslések ellenőrzése (validálása) független adatokon
6. a kifejlesztett modell alkalmazása élelmiszereken

A modellek elméleti és kísérletes validálása ugyanolyan fontos része a prediktív mikrobiológiának és eredményei hasznosításának, mint maga a modellezéshez szükséges adatgyűjtés és a matematikai függvények alkotása. A modellek validálása azért szükséges, hogy igazolják, hogy a mérési eredményekből regresszióval származtatott predikciók elfogadható egyezést mutatnak független adatokkal is. Végül a predikciókat ellenőrizni kell élelmiszer-kísérletekkel is, mert a mesterséges táptalajról az élelmiszerre való alkalmazás elengedhetetlenül extrapolációt jelent. A modellekkel végezhető becslések kiterjesztése (extrapolálása) akár más táptalajra, akár a modellek szerkesztéséhez használt mérési adatok és ökológiai paraméterek értéktartományán kívülre nem megbízható (BARANYI et al., 1999). Ez az empirikus modellezés nagy hátránya, tekintettel arra, hogy az ilyen határ-tartományok az élelmiszer mikrobiológia biztonsága számára különösen fontosak.

1.5.5 ComBase program

A prediktív mikrobiológia ma már sokféle mikroorganizmusra vonatkozó nagy adatbázisokra támaszkodik és különböző számítógépes modellrendszerek állnak rendelkezésre. A ComBase (Combined dataBase, <http://www.combase.cc/index.php/en/>) (BARANYI és TAMPLIN, 2004) adatbázis bárki által ingyenesen hozzáférhető, folyamatos továbbfejlesztés és kiterjesztés alatt álló nemzetközi adatbázis. Jelenleg mintegy 57000 kinetikai adatsort tartalmaz élelmiszerben előforduló baktériumok növekedéséről és túléléséről. Az adatok többsége laboratóriumi tápközegekben vagy élelmiszerben megfigyelt, élő csíraszámokkal mért görbét illusztrál. Prediktív mikrobiológia és kvantitatív mikrobiológiai kockázatelemzés végezhető el a ComBase adatbázis használatával. Hangsúlyozni kell, hogy a szoftvercsomag növekedési modelljei legtöbbször a „worst case” (legrosszabb eset) szituációt jelzik, azaz az élelmiszerben tapasztalható értékek valamilyen mértékben kisebbek lehetnek. Ugyanis az első prediktív modellek többségét a baktériumszaporodás szempontjából optimális laboratóriumi tápközegekkel és optimális tenyésztési körülmények között, tiszta tenyészetekkel, nagy kezdeti csíraszámokkal és a versengő mikrobiótától mentes esetekre dolgozták ki.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A penészgombák által okozott romlás jelentős termés kiesést, tárolási veszteséget okoz, az ezt kísérő toxintermelésnek a gazdasági káron túl jelentős élelmiszerbiztonsági vonzata / kockázata is van.

Ennek megelőzéséhez segítséget nyújt a penészgomba növekedés modellezése különböző környezeti feltételek között. A feladatok ennek megfelelően:

- szisztematikus adatgyűjtés a toxinogén penészgombák előfordulásáról, a növekedésüket befolyásoló fő ökofiziológiai (hőmérséklet és vízaktivitás) tényezők hatásáról;
- a hőmérséklet és a vízaktivitás együttes hatásának *in vitro* vizsgálata a kiválasztott penészgomba fajok (*Aspergillus niger* és *Penicillium expansum*) növekedésére;
- az *Aspergillus niger* penészgomba növekedését legjobban leíró matematikai modell kiválasztása/megalkotása;
- a ComBase továbbfejlesztésében való részvétel – egy ComBase-kompatibilis mikológiai adatbázis felépítése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 A vizsgálatok során alkalmazott penészgomba törzsek

A vizsgált penészgomba törzsek: *Aspergillus niger* F.00770 és *Penicillium expansum* F.00811 a Budapesti Corvinus Egyetem, Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből származnak. A két törzs toxintermeléséről a Gyűjteménynek adata nincsen, de mindkettő potenciálisan toxintermelő. A *P. expansum* F.00811 törzs patulin termeléséről TACZMANNÉ BRÜCKNER ANDREA (2005) doktori értekezésében találhatók adatok.

3.2 A vizsgálatok során alkalmazott módszerek

3.2.1 Mikrobiológiai módszerek

A vizsgálatokhoz használt tápközegek:

- Malt Extract Agar (MEA)
20 g maláta kivonat (Merck 1.05397)
20 g glükóz (Reanal 07071-1-08-38)
1 g pepton (Merck 1.07214)
20 g agar (Merck 1.01614)
1000 ml desztillált víz
Sterilezve 121°C-on 15 percig
- Szőlőlé alapú táptalaj
20 g agar (Merck 1.01614)
1000 ml frissen préselt szőlőlé (Olaszrizling, Kékfrankos - Mátrai borvidék; Furmint, Hárslevelű - Tokaj-hegyaljai borvidék)
Sterilezve 121°C-on 15 percig
- Almalé alapú táptalaj
20 g agar (Merck 1.01614)
1000 ml almalé (100% Alley almalé. Összetevők: víz, almasűrítmény, citromsav
Forgalmazó: Auchan)
Sterilezve 121°C-on 15 percig
- Tween 80-as hígító
9 g NaCl (Merck 1.06404)
1 g pepton (Merck 1.07214)
1 ml Tween 80 (Reanal 32370-1-99-63)

1000 ml desztillált víz

Sterilezve 121°C-on 15 percig

Hagyományos élelmiszer mikrobiológiai módszereket alkalmaztam, betartva a vonatkozó MSZ ISO szabványokat. Ennek megfelelően a táptalajokat az MSZ ISO 11133-1:2000 szerint készítettem el, a hígítási és egyéb általános mikrobiológiai lépéseket az MSZ EN ISO 6887-1:2000 szerint végeztem el.

Az almalé alapú tápközeg választását *P. expansum* növekedésének vizsgálatára az indokolta, hogy az alma hazai alapanyag, és aktuális probléma az almák kékpenészes romlása.

A mustok és borok ochratoxin szennyeződéséért főként a fekete aszpergillusok a felelősek, ezért vizsgáltuk az *A. niger* növekedését szőlőlé alapú táptalajon.

A szőlő- és az almalé alapú tápközegek készítése során a cukortartalmat Abbé-féle refraktométerrel ellenőriztem. A boltban vásárolt 100%-os almalé cukortartalma 10,98 g, refrakciója Brix%11. A szőlőlé alapú tápközeg készítésekor Brix%11-re hígítottam a cukortartalmat. Szintetikus szőlő táptalaj összeállításakor magasabb cukortartalmat állítanak be (kb. 200 g/l), ugyanis ez jobban modellezi a szőlőlevet. Viszont indokolt esetben a megközelítőleg 100 g/l összes cukortartalom is elfogadható. Arra törekedtem, hogy a két gyümölcs alapú táptalaj refrakció értéke azonos legyen.

Mind az alma-, mind a szőlőlevek pH értéke 3,5 volt, de mivel ezen a pH-n az agar szilárdító képessége kicsi és a lyukak fúrásához kemény agarra volt szükség, a gyümölcsle alapú és a maláta táptalajok pH-ját 6,5 értékre állítottam be NaOH adagolásával.

A penészgomba törzsek ferde maláta agaron 25°C-on 7 napig növesztett, bespórázott tenyészetekről steril Tween 80-as hígítóval a konídiumokat lemostam, és Bürker-kamrás mikroszkópi számolás után további steril Tween 80-as hígítással 10^6 konídium/ml koncentrációjú törzs-szuszpenziót állítottam elő.

A beoltásnál 4,5 mm átmérőjű lyukakat vájtam az agarba, és 100 μ l 1×10^6 /ml konídium szuszpenziót mértem a lyukakba. Mindegyik vízaktivitási szintből 3-3 Petri-csészét (párhuzamos leoltásokat) polietilén tasakokba csomagoltam és adott hőmérsékleti értékre beállított termosztátban inkubáltam.

A telepátmérőt vonalzóval naponta háromszor mértem, amíg az el nem érte a Petri-csésze szélét (90 mm), illetve 36 napig, amíg a kísérlet tartott. Gyakorlati tapasztalataim alapján a műanyag

vonalzó a legalkalmasabb a telep átmérőjének mérésére. A telepek fonák részéről tudtam lemérni a telepátmérőt, mivel a Petri-csésze tetejét levéve fennállt volna a befertőződés veszélye. Továbbá a Petri-csésze alján mérve sokkal biztosabban lehet leolvasni a telep átmérőjét, mint a telep tetején. A vonalzó rásimul a műanyag Petri-csészére, így nagy pontossággal tudtam lejegyezni a telep átmérőjét. A szakirodalom is azt igazolja, hogy a penésztelepek lemérésére vonalzót használnak (pl. GOUGOULI és KOUTSOUMANIS, 2010; GARCIA et al., 2011). Abban az esetben indokolt a telepeket két irányban lemérni, ha a telep növekedése aszimmetrikus (pl. ha oltótűvel az agart megszúrva végzik a beoltást). Ebben a kísérletben viszont kör alakú lyukba oltottam spóraszuszpenziót, így a telepek szabályos kör alakú kolóniát alkottak.

A kísérletet hét vízaktivitási értéken (a_w 0,85; 0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98 és 0,99) maláta táptalajon két egymást követő ismétlésben végeztem el. Ezt követően kibővítettem a kísérletsorozatot maláta táptalajon újabb ismétléssel, két vízaktivitási értéken (a_w 0,90 és 0,98), illetve alma- és szőlőlé alapú táptalajokon figyeltem meg a két penészgomba faj növekedését.

A telepátmérő leolvasásával egyidőben sztereomikroszkóp segítségével követtem nyomon a konídiumképzést.

3.2.2 Fizikai módszerek – vízáktivitás mérés

A mérés a NOVASINA LabMaster.aw (VITALIS, Magyarország) készülék segítségével történt, minden esetben három párhuzamos méréssel. A műszer kalibrálását minden kísérlet beállításánál hat ponton (a_w 0,75; 0,53; 0,32; 0,11; 0,90; 0,97) végeztem el. A gyakori újrakalibrálás szükséges, hogy minden kísérletnél pontos vízáktivítást tudjunk beállítani.

GARCIA és munkatársai (2010, 2011) cikkeit alapul véve állítottam be a maláta agar vízáktivítását megfelelő mennyiségű glicerinnel vagy NaCl-dal, kalibrációs egyenes felvételével (1. táblázat). Előzetes vizsgálatot végeztem arra vonatkozóan, hogy *A. niger* esetében van-e különbség, ha a táptalaj vízáktivítását glicerinnel vagy NaCl-dal állítom be. Nem tapasztaltam szignifikáns különbséget és ezt irodalmi adatok is alátámasztották (PITT és HOCKING, 1997a).

Az agarokat vízáktivítást mérő mintaedényekbe is leöntöttem, így ellenőrizni tudtam a pontos vízáktivítást, valamint a vízáktivitás esetleges változását különböző hőmérsékleten az inkubálási idő függvényében. A vízáktivitás megállapítása minden esetben három párhuzamos mérési eredményből történt. A kísérletsorozat során (36 nap) a vízáktivítási értékek nem változtak egyik inkubációs hőmérsékleten sem.

1. táblázat A MEA táptalaj vízáktivítás beállításához használt glicerinnel illetve NaCl koncentrációk

glicerinnel		NaCl	
g/100 ml	a_w	g/100 ml	a_w
0	0,99	0	0,99
9	0,98	3,5	0,98
20	0,96	7	0,96
30	0,94	10	0,94
40	0,92	13	0,92
50	0,90	16	0,90
75	0,85	24	0,85

3.2.3 Statisztikai módszerek

A statisztikai kiértékelés során regresszió számítást és varianciaanalízist alkalmaztam a Microsoft Excel[®] statisztikai makróinak használatával.

A szaporodási görbéket a DMFit – Excel makróval illesztettem, amely a Baranyi-modellt használja (IFR fejlesztésű szoftver, lásd <http://www.combase.cc/index.php/en/downloads/file/53-dmfit-30>). A válaszfelület illesztését a Stanford Graphics[®] (Visual Numerics Inc) programmal végeztem el.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

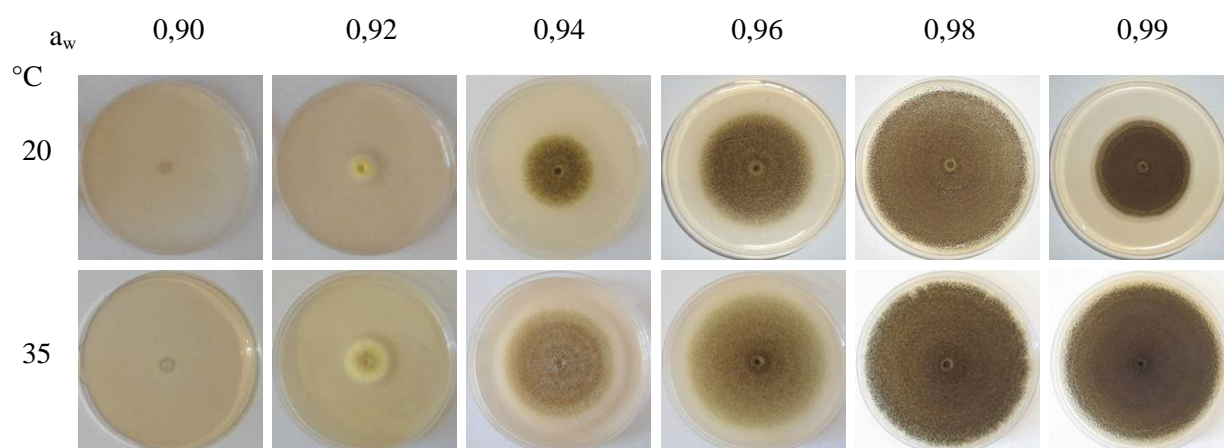
4.1 A penészgombák növekedésének eredményei

A kísérlet során két penészgomba faj (*Aspergillus niger* F.00770 és *Penicillium expansum* F.00811) növekedését követtem nyomon 36 napig. Lehetővé vált annak megfigyelése és mérése (kvantifikálása) is, hogy a vizsgált penészgomba törzsek hőmérséklettől (20, 25, 30 és 35°C) és vízaktivitástól (a_w 0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98 és 0,99) függő növekedési „válaszai” mennyire reprodukálhatóak.

Az ismételt kísérlet-sorozatokban a tesztorganizmusok növekedési válaszai az inkubációs hőmérsékletre és a tápközeg vízaktivitására hasonlóak voltak.

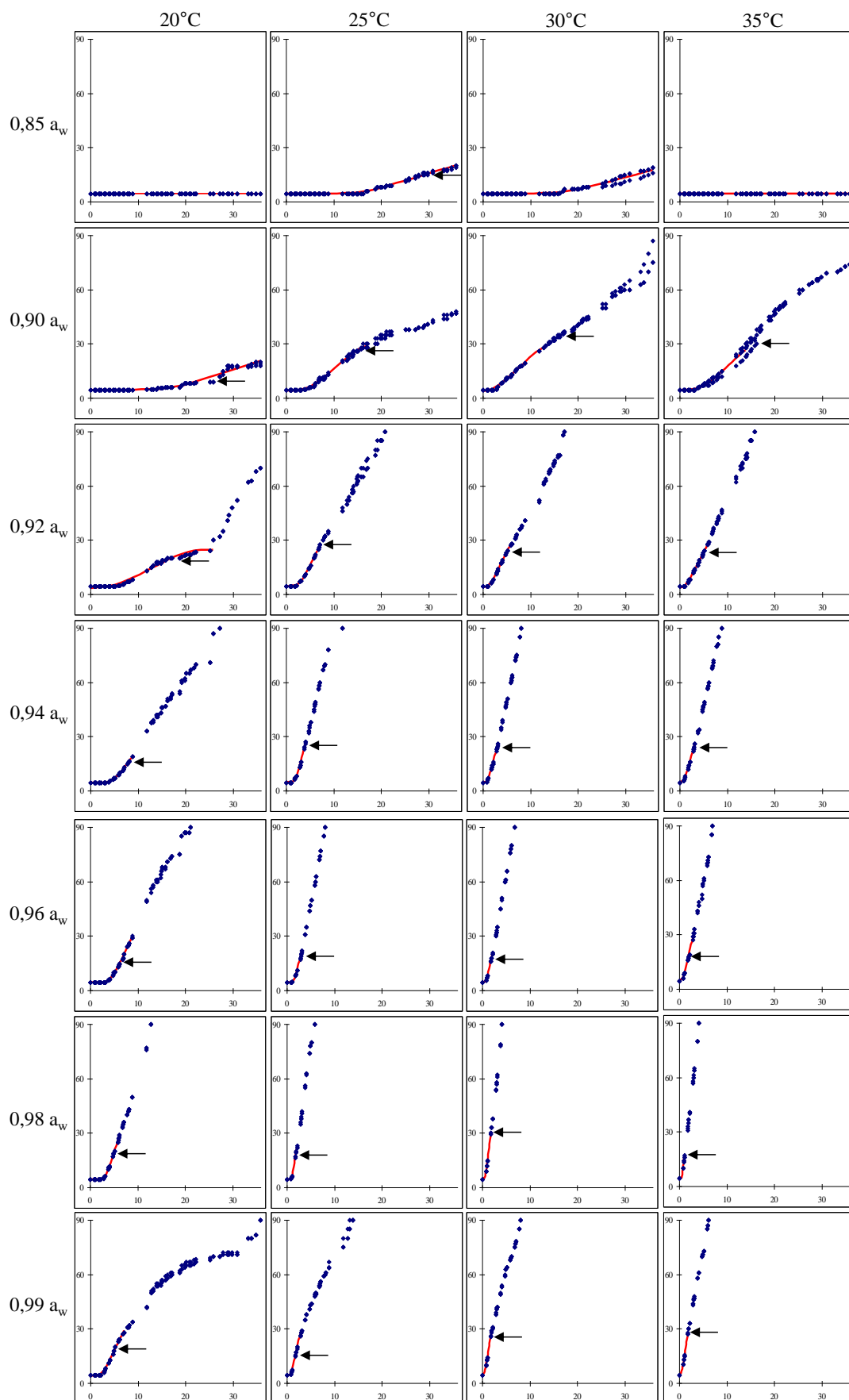
4.1.1 Az *Aspergillus niger* telepnövekedésének kinetikája

Makroszkopikus fotók is készültek az inkubáció 7. napján, amelyből a két szélső hőmérsékleti érték látható a 9. ábrán.



9. ábra Az *Aspergillus niger* telepméretének alakulása 20 és 35°C-on, a_w 0,90-0,99 vízaktivitási tartományban, maláta táptalajon, 7 napos inkubáció után

A 10. ábrán az *A. niger* telepek növekedése (mm) a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében, illetve a 30 mm-es telepátmérőig illesztett növekedése görbék láthatók. A nagyobb vízaktivitás nagyobb mértékben segíti az *A. niger* növekedését, mint a kisebb vízaktivitás. Az optimális növekedési hőmérséklet 30-35°C között van. A görbéken nyilakkal jelöltem a konídium megjelenését. Egyetlen esetben (30°C; a_w 0,85) nem tudtam megfigyelni konídiumképződést, csupán a micélium növekedett. Két esetben (20 és 35°C; a_w 0,85) a kísérleti idő alatt minimálisan nőtt vagy egyáltalán nem tapasztaltam növekedést, így a konídiumképződés is elmaradt.



10. ábra Az *A. niger* telepek növekedése az inkubációs hőmérséklet és a maláta táptalaj vízaktivitásának függvényében. A diagramokon a telepátmmérőt (mm, y tengely) az idő függvényében (nap, x tengely) ábrázoltam. Szaporodási görbéket illesztettem 30 mm-es telepátmmérőig. Nyilak jelzik a konídium megjelenését

Az egyes görbék esetében diauxia figyelhető meg, ez leggyakrabban a mikroba szubsztrát váltásánál lép fel, tipikusan, amikor az elsődleges szénforrás elfogy. A maláta táptalajban lévő glükózt és malátacukrot, vagyis a mono- és diszacharidokat a penészgomba közvetlenül képes felhasználni. Egy idő után azonban a tápanyagok fogyása és bizonyos gátló anyagok felszaporodása miatt a növekedés üteme csökken. Ugyanis a lineáris szakaszban új sejtek és az őket felépítő anyagok (pl. fehérjék, nukleinsavak), közös néven ún. elsődleges anyagcseretermékek keletkeznek. Az elsődleges anyagcseretermékek nem specifikusak, hanem általánosak, tehát igen hasonlóak valamennyi előlényben. Ezzel szemben az ún. másodlagos anyagcseretermékek speciális, kémiai szempontból változatos vegyületek, amelyek esetlegesen csak egyetlen fajra jellemzőek. Valószínűsíthető, hogy valamely (saját maga által termelt) másodlagos anyagcseretermék gátló hatása figyelhető meg a szaporodási görbén. Ezután a penészgomba, hozzászokva az új környezethez ismét lineárisan növekszik (JAKUCS és VAJNA, 2003). A szaporodási görbét 30 mm-es telepátmérőig illesztettem (diauxiát megelőző növekedési szakasz), hogy a környezet ilyen hatásait minimalizáljam.

A 2. táblázatban a 10. ábrán bejelölt időpontok, a konídiumok megjelenésének ideje látható napban kifejezve.

2. táblázat Az *A. niger* telepek konídiumainak megjelenése (nap) a vízaktivitás és a hőmérséklet függvényében, maláta táptalajon

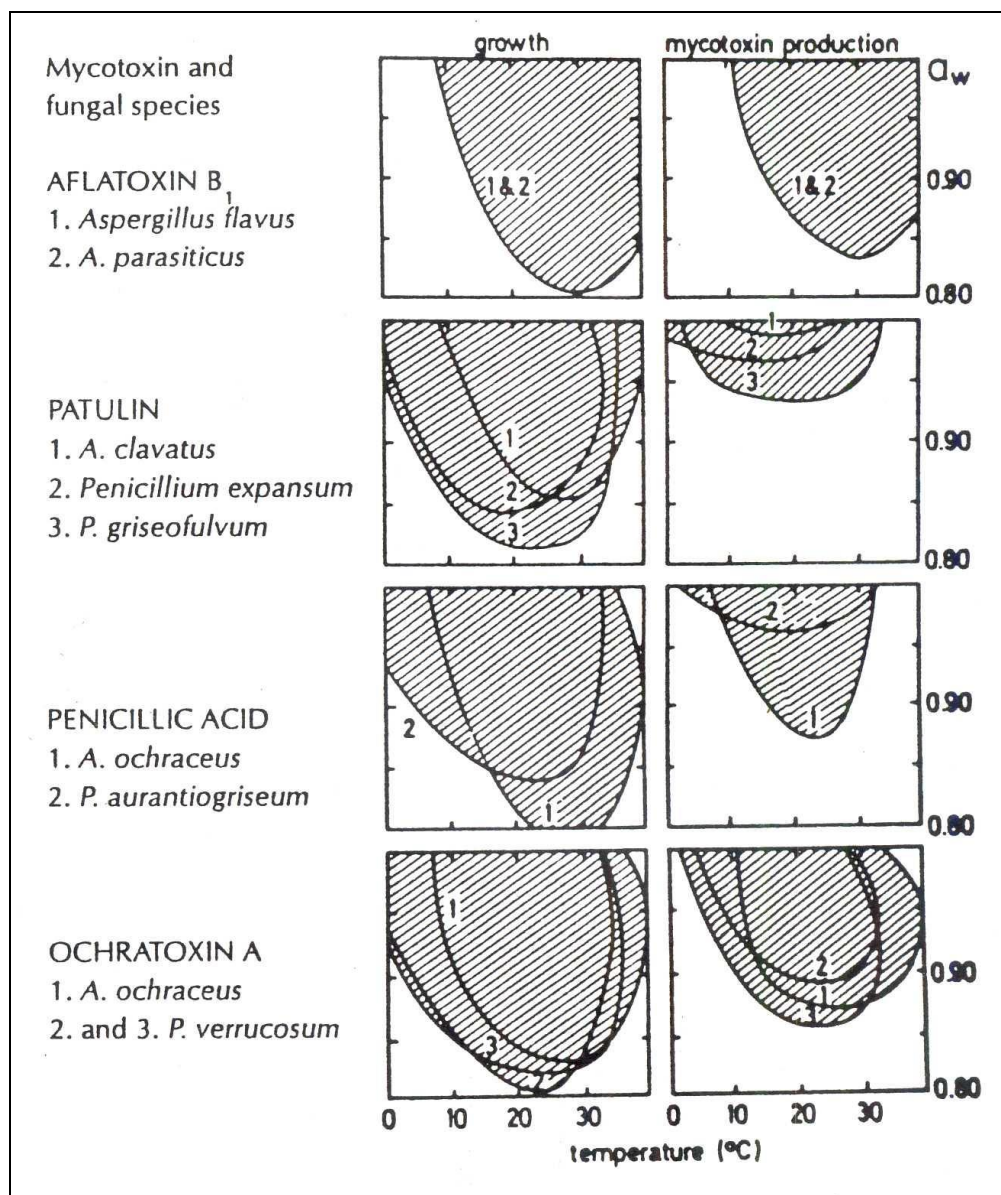
°C	a_w						
	0,85	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
20	-	26	14	8	6	5	5
25	29	14	7	4	3	2	2
30	-	15	5	3	2	2	2
35	-	15	5	3	2	1	1

A kísérletben beállított legkisebb vízaktivitáson (a_w 0,85) egy esetben (25°C) figyeltem meg konídiumképzést. Intenzív növekedésnél hamarabb megjelennek a konídiumok, míg vontatottabb növekedésnél később figyeltem meg konídiumképzést.

A mikotoxin-termelést számos belső (pl. a gombafaj, a szaporodás mértéke) és külső (környezeti körülmények pl. a_w , hőmérséklet, tápanyag ellátottság) tényező befolyásolja (NORTHOLT et al., 1979).

A konídiumok megjelenése és a mikotoxin-termelés kapcsolatáról több információt kaphatunk, ha lehetőség nyílik a mikotoxin mennyiségének mérésére.

A 11. ábra a hőmérséklet és a vízaktivitás hatását mutatja be a növekedésre és mikotoxin-termelésre NORTHOLT és munkatársai (1996) vizsgálatai alapján.



11. ábra A hőmérséklet és a vízaktivitás hatása a penészgomba növekedésére és mikotoxin-termelésére (NORTHOLT et al., 1996)

Kiemelve a patulin és ochratoxin A mikotoxinokat, sokkal kisebb tartományban termelődnek, mint ami a penészgomba növekedésére kedvező (optimális) környezeti tartomány.

Viszont a konídiumképzés és a mikotoxin termelés közötti kapcsolat feltérképezése már analitikai vagy molekuláris biológiai feladat.

Az idő függvényében mért telepátmérő adatokból a DMFit program segítségével kiszámítható a lappangási szakasz hossza (3. táblázat) és a növekedési sebesség (4. táblázat).

3. táblázat Az *A. niger* lappangási fázisának (λ , nap) hossza a vízaktivitás és a hőmérséklet függvényében, maláta táptalajon

°C	a_w						
	0,85	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
20	22,04	17,14	5,25	4,54	4,25	3,22	2,47
25	15,94	4,77	2,88	1,96	1,52	1,07	0,92
30	16,96	2,29	1,45	1,06	0,84	0,63	0,50
35	-	4,71	1,28	1,00	0,88	0,57	0,48

-, a kísérlet ideje (36 nap) alatt nem volt növekedés

A lappangási fázis (λ) hossza csökken a hőmérséklet növekedésével, és növekszik a vízaktivitási értékek csökkenésével. A lappangási idő többé-kevésbé fordított arányosságot mutat a növekedési sebességgel, ami alátámasztja, hogy a kezdeti fiziológiai állapot (α_0) hasonló a különböző környezeti feltételek között (a lappangási idő becslésére a modell a

$-\ln \alpha_0 = \mu \cdot \lambda = \text{const}$ összefüggést használja).

Nagyobb hőmérsékleten (30 és 35°C), a_w 0,90-0,99 tartományban a növekedés kevésbé érzékeny a vízaktivitás változására. Kis vízaktivitási értékeken (a_w 0,85 és 0,90) jelentősen megnő a lappangási szakasz hossza.

4. táblázat Az *A. niger* növekedési sebessége (mm/nap) a vízaktivitás és a hőmérséklet függvényében, maláta táptalajon

°C	a_w						
	0,85	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
20	min.	0,86	1,41	3,29	5,42	8,10	5,40
25	0,80	2,27	5,28	10,08	10,61	16,98	12,53
30	0,70	2,48	5,55	10,20	12,23	21,67	16,53
35	-	2,44	5,23	9,81	11,97	24,88	17,25

-, a kísérlet ideje (36 nap) alatt nem volt növekedés

min., minimális növekedés

Az a_w 0,85 kivételével a növekedési sebesség a hőmérséklet növekedésével nagyobb értéket mutat minden vízaktivitási értéken. A maximális növekedési sebesség 30-35°C között a_w 0,98 értéken figyelhető meg: ilyen feltételek mellett a telepek 4 nap alatt elérték a Petri-csésze szélét. A kísérlet során vizsgált legkisebb vízaktivitáson (a_w 0,85) 25-30°C között volt növekedés, 35°C-on egyáltalán nem volt micéliumnövekedés a kísérleti idő alatt, míg 20°C-on minimális növekedést tapasztaltam.

A hőmérséklet és a vízáktivitás együttes hatása a növekedési sebességre az alábbi kvadratikus polinommal írható le:

$$\ln g = c_o + c_1 T + c_2 b_w + c_3 T^2 + c_4 b_w^2 + c_5 b_w T \quad (2)$$

T = a hőmérséklet (°C)

$b_w = \sqrt{1 - a_w}$, a vízáktivitás transzformált értéke

c_i = koefficiensek

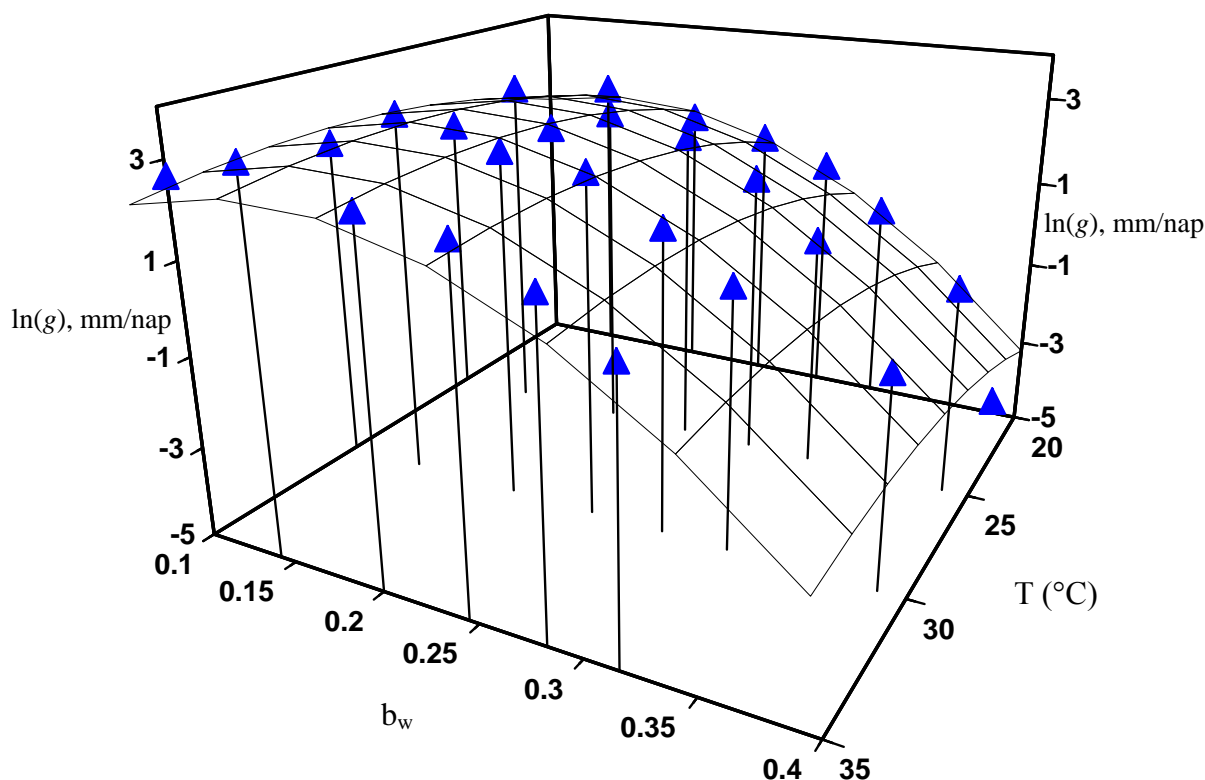
A fenti másodfokú polinomban a ($b_w * T$) tag együtthatójáról kimutatható, hogy az nem szignifikáns ($p > 0,1$), így elhagyható az eredeti modellből (Egyenlet 2). Így a hőmérséklet és a vízáktivitás vizsgált tartományában az alábbi egyenlettel jellemezhető az *A. niger* F.00770 törzsének növekedési sebessége:

$$\ln g = c_o + c_1 T + c_2 b_w + c_3 T^2 + c_4 b_w^2 \quad (3)$$

	Koefficiensek	Standard hiba
Tengelymetszet	-7.541	2.275
T	0.552	0.162
b_w	21.303	4.559
T^2	-0.009	0.003
b_w^2	-66.671	9.819

A nagy r^2 (0,903) érték azt mutatja, hogy az illeszkedés jósága megfelelő. Az illesztés standard hibája azt mutatja, hogy a mért növekedési ráták természetes logaritmusát átlagosan 0,36 egységgel tér el az illesztett értéktől (CSERNUS et al., 2013).

A 12. ábra szemlélteti a hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$) és a vízaktivitás transzformált értékének (b_w) hatását a növekedési sebesség természetes logaritmusára ($\ln(g)$).



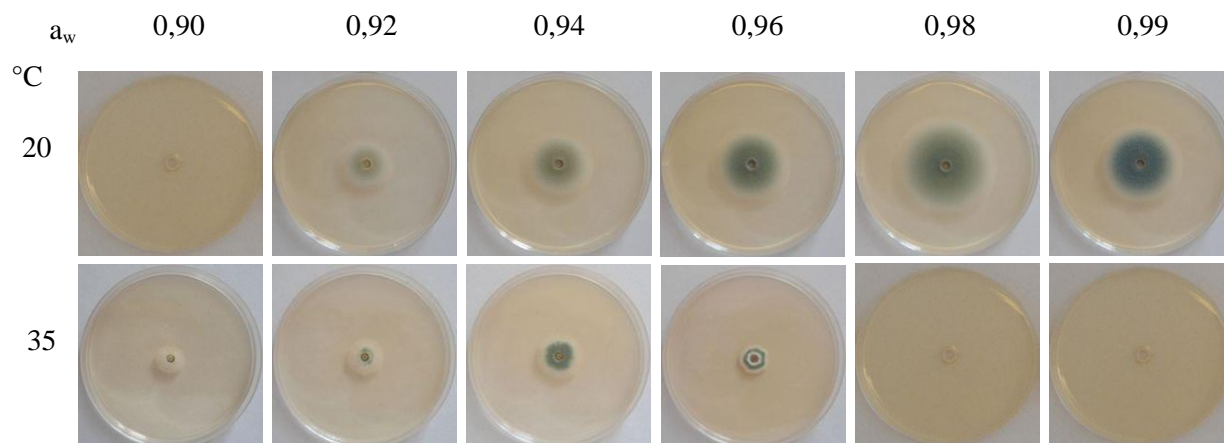
12. ábra Az *A. niger* növekedési adatainak ábrázolása válaszfelület illesztésével

A telepek növekedési sebessége b_w 0,39 (a_w 0,85) kivételével nő a hőmérséklet növekedésével. A maximális növekedési sebességet 30-35 $^{\circ}\text{C}$ között éri el $b_w=0,14$ értéken (a_w 0,98). Ezen a két hőmérsékleti értéken 4 nap alatt eléri a Petri-csésze átmérőjét (90 mm). Nagyon lassú növekedés volt tapasztalható 20-30 $^{\circ}\text{C}$ között b_w 0,39 (a_w 0,85) mellett. Egyáltalán nem mértem növekedést 35 $^{\circ}\text{C}$ és b_w 0,39 (a_w 0,85) kombinációnál a kísérlet időtartama alatt (36 nap). Eredményeim alapján az *A. niger* F.00770 törzsének optimális növekedési hőmérséklete 30-35 $^{\circ}\text{C}$, a_w 0,98-as ($b_w=0,14$) vízaktivitáson (CSERNUS et al., 2011). Ezek az eredmények jó összhangban vannak a szakirodalomban található adatokkal, miszerint az *A. niger* optimális növekedési feltételei 35-37 $^{\circ}\text{C}$ (PITT és HOCKING, 1997a), a_w 0,994; 30-37 $^{\circ}\text{C}$ (MARÍN et al., 1998), a_w 0,98; 35 $^{\circ}\text{C}$ (BELLÍ et al., 2004), a_w 0,97; 30-35 $^{\circ}\text{C}$ (PARRA és MAGAN, 2004), a_w 0,98; 35 $^{\circ}\text{C}$ (LEONG et al., 2006), 30-35 $^{\circ}\text{C}$ (GOUGOULI és KOUTSOUMANIS, 2010) és 30-35 $^{\circ}\text{C}$ (ALBORCH et al., 2011).

4.1.2 A *Penicillium expansum* telepnövekedésének kinetikája

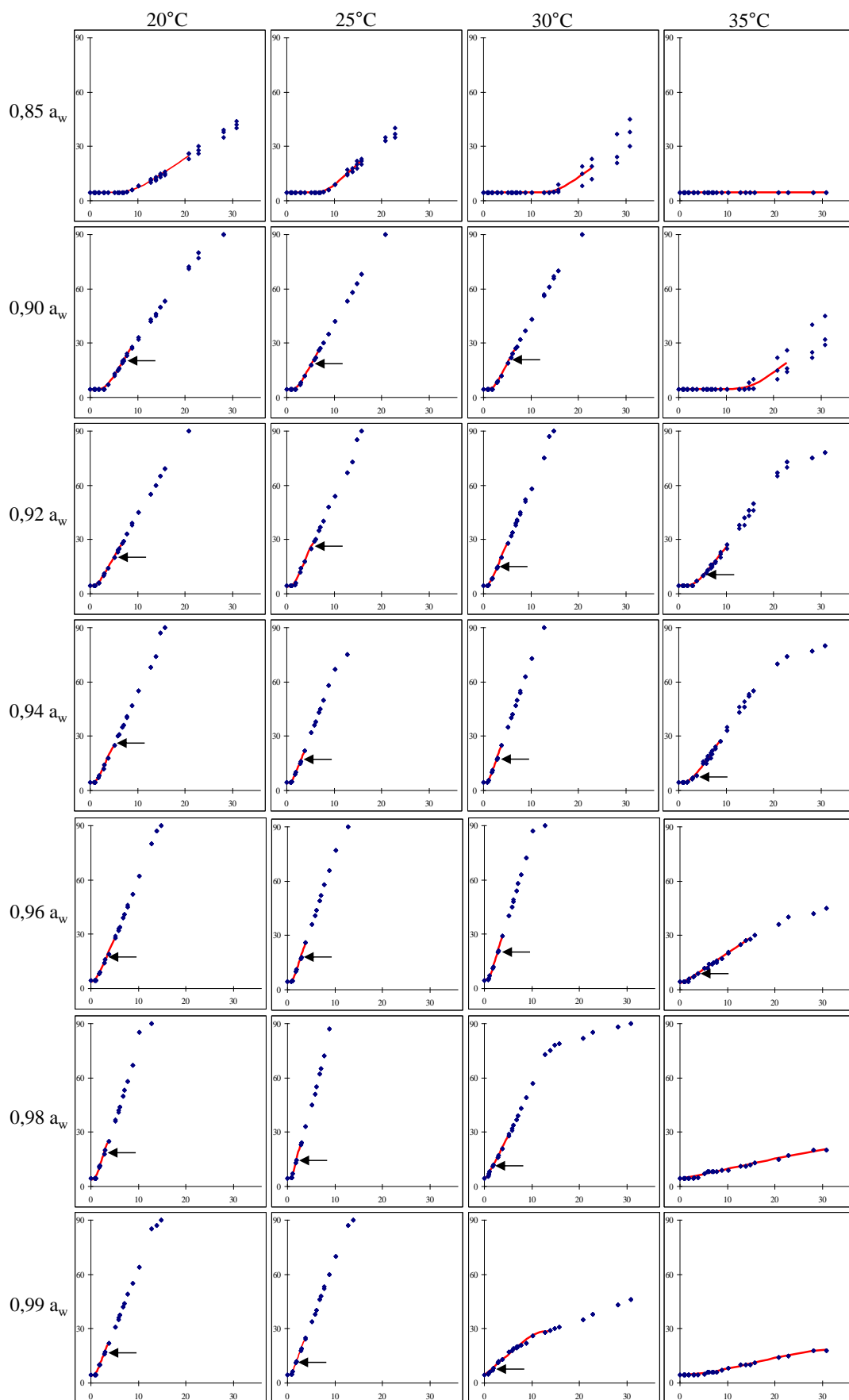
A *P. expansum* micéliumnövekedését 20, 25, 30 és 35°C-on és 0,90, 0,92, 0,94, 0,96, 0,98 és 0,99-es vízaktivitású maláta táptalajon vizsgáltam, 36 napig.

Az inkubáció 7. napján készült makroszkopikus fotók a 13. ábrán a jellemző telepalakulásokat mutatják a két szélső hőmérsékleti értéken.



13. ábra A *Penicillium expansum* telepméretének alakulása 20 és 35°C-on, a_w 0,90-0,99 vízaktivitási tartományban, maláta táptalajon, 7 napos inkubáció után

A 14. ábrán a *P. expansum* telepek növekedése (mm) a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében, illetve a 30 mm-es telepátmérőig illesztett szaporodási görbék láthatók. A *Penicillium expansum* az *A. niger*-nél kevésbé melegigényes penészgomba, optimális hőmérséklete 25°C körül van, a diagramok is jól mutatják, hogy a kisebb hőmérsékletet jobban kedveli, mint a nagyobbát. A görbéken nyilakkal jelöltem a konídium megjelenését. Ahol nincsenek nyilak, azokban az esetekben az kísérleti idő alatt (36 nap) nem figyeltem meg konídiumképzést.



14. ábra A *P. expansum* telepek növekedése az inkubációs hőmérséklet és a maláta táptalaj vízakтивitásának függvényében. A diagramokon a telepátmérőt (mm, y tengely) az idő függvényében (nap, x tengely) ábrázoltam. Szaporodási görbéket illesztettem 30 mm-es telepátmérőig. Nyilak jelzik a konídium megjelenését

Az 5. táblázatban a 14. ábrán bejelölt időpontok, a konídiumok megjelenésének ideje látható napban kifejezve.

5. táblázat A *P. expansum* telepek konídiumainak megjelenése (nap) a vízaktivitás és a hőmérséklet függvényében, maláta táptalajon

°C	a_w						
	0,85	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
20	-	7	5	5	3	3	3
25	-	5	5	3	3	2	2
30	-	5	3	3	3	2	2
35	-	-	5	4	4	-	-

A *P. expansum* esetében kevesebb kombinációban figyeltem meg a konídiumképzést, mint az *A. niger* esetében. A telepek növekedésének dinamikája és a konídiumképzés között összehasonlító elemzést nem tudtam végezni. A konídiumok megjelenése és a mikotoxin képződés tanulmányozása analitikai vagy molekuláris biológiai feladat.

Az idő függvényében ábrázolt telepátmérő-változást leíró görbéből a DMFit program segítségével kiszámítható a lappangási fázis (6. táblázat) és a növekedési sebesség értéke (7. táblázat).

6. táblázat A *P. expansum* telepnövekedésének lappangási fázisa (λ (nap)) különböző vízaktivitási és hőmérsékleti értékeken, maláta táptalajon

°C	a_w						
	0,85	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
20	9,29	3,29	1,62	1,38	1,13	1,08	1,05
25	8,42	2,26	1,56	1,11	1,16	0,99	0,89
30	15,51	2,22	1,28	1,08	1,13	0,49	0,31
35	-	15,17	3,60	2,52	0,70	1,57	4,57

-, a kísérlet ideje (36 nap) alatt nem volt növekedés

A lappangási szakasz hossza az esetek többségében csökken a hőmérséklet csökkenésével és a vízaktivitás növekedésével a vizsgált tartományban.

7. táblázat A *P. expansum* növekedési sebessége (mm/nap) különböző vízáktívítási és hőmérsékleti értékeken, maláta táptalajon

°C	a_w						
	0,85	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
20	1,75	4,24	4,67	5,89	6,14	8,60	7,02
25	2,38	4,76	6,25	6,67	8,17	10,78	7,43
30	1,84	5,10	6,50	7,66	9,15	5,23	2,30
35	-	1,91	3,33	3,66	1,77	0,57	0,61

-, a kísérlet ideje (36 nap) alatt nem volt növekedés

A maximális növekedési sebesség 25°C-on a_w 0,98 értéken figyelhető meg. Növekedést nem tapasztaltam 35°C-on a_w 0,85 vízáktívítási értéken.

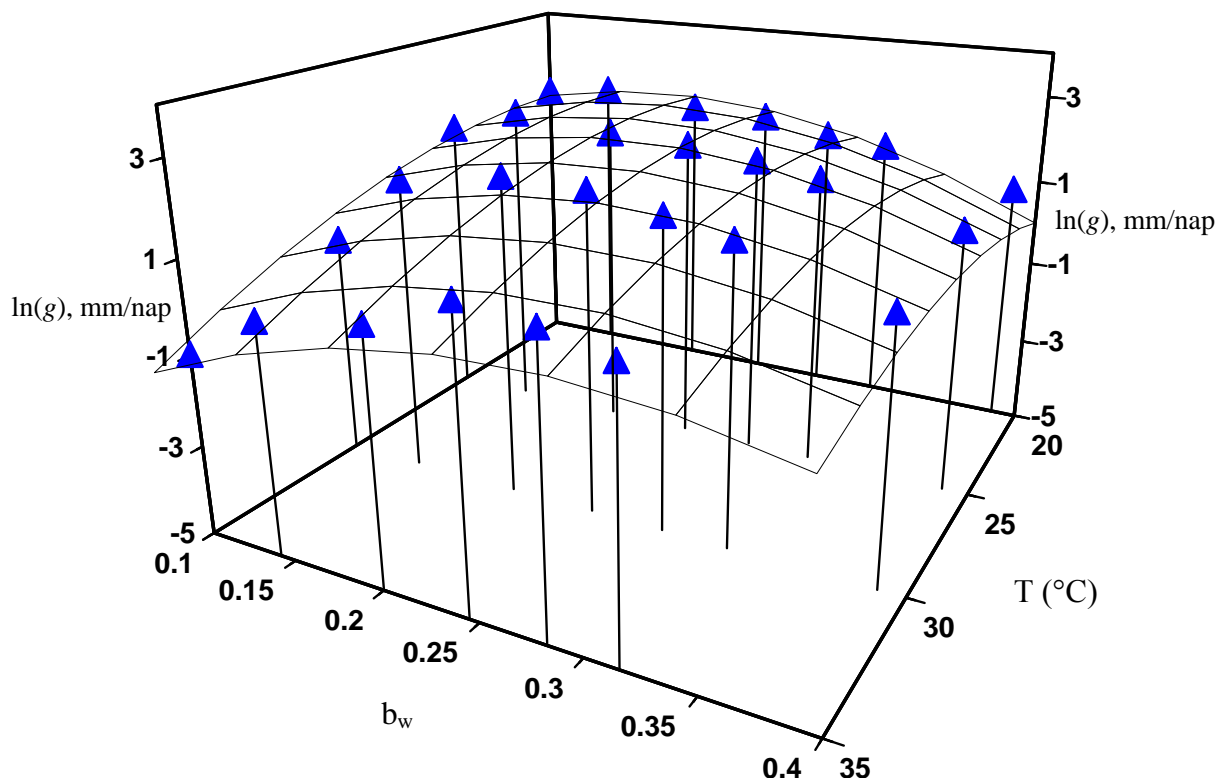
A másodfokú polinomban a b_w tag együtthatója nem szignifikáns ($p>0,1$), így elhagyható az eredeti modellből (Egyenlet 2). Így az alábbi egyenlettel jellemezhető a *P. expansum* növekedési sebessége:

$$\ln g = c_o + c_1 T + c_2 T^2 + c_3 b_w^2 + c_4 b_w T \quad (4)$$

	Koefficiensek	Standard hiba
Tengelymetszet	-2.795	1.662
T	0.432	0.125
T^2	-0.012	0.002
b_w^2	-42.048	4.528
$T * b_w$	0.705	0.080

A nagy r^2 (0,872) érték azt mutatja, hogy az illeszkedés jósága megfelelő. Az illesztés standard hibája azt mutatja, hogy a mért növekedési ráták természetes logaritmusa átlagosan 0,31 egységgel tér el az illesztett értéktől (CSERNUS et al, 2013).

A 15. ábra szemlélteti a két környezeti tényező (a hőmérséklet és a vízaktivitás transzformált értéke (b_w)) hatását a növekedési sebesség természetes logaritmusára ($\ln(g)$).



15. ábra A *P. expansum* növekedési adatainak ábrázolása válaszfelület illesztésével

A maximális növekedési sebességet 25°C-on és $b_w=0,14$ (a_w 0,98) értéken kaptam, a telep 11 nap alatt érte el a legnagyobb telepátmérőt (a Petri-csészében rendelkezésére álló területet benőtte) (CSERNUS et al., 2011).

Egyáltalán nem mértem növekedést 35°C b_w 0,39 (a_w 0,85) értéken a kísérleti idő alatt (36 nap). A kapott eredmények összhangban vannak a szakirodalomban található adatokkal (PITT és HOCKING, 1997b; LAHLALI et al., 2005; BAERT et al., 2007a; GARCIA et al., 2010; GOUGOULI és KOUTSOUMANIS, 2010; JUDET-CORREIA et al., 2010).

A telepek morfológiája 35°C-on eltérő volt, egyes kombinációkban csak micélium-növekedés volt tapasztalható, konídiumképzés nélkül, ahogyan azt BAERT és munkatársai (2007b) is tapasztalták.

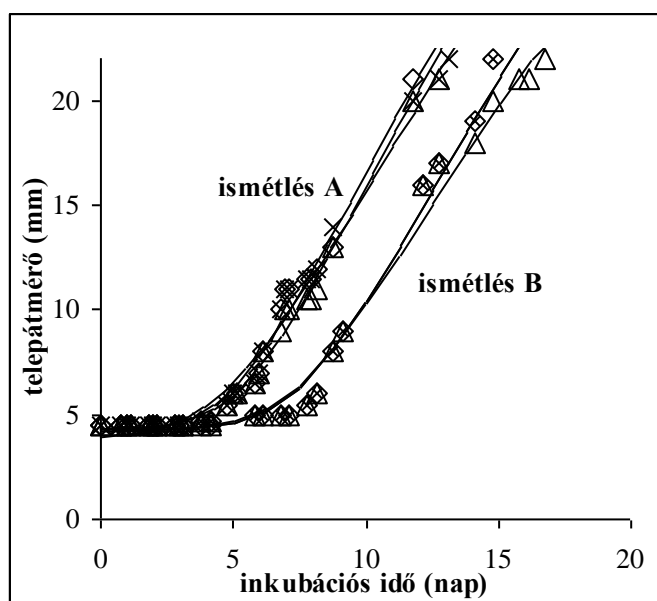
4.2 A hőmérséklet és a vízaktivitás hatásának modellezése *Aspergillus niger* növekedésére

A cél az *A. niger* növekedésének jellemzése volt új, pontosabb modell létrehozásával. Érdekes először megbecsülni, hogy milyen hibákkal kell majd számolni.

4.2.1 A prediktív modell hibaanalízise

Aspergillus niger telepek növekedését vizsgáltam a hőmérséklet (20, 25, 30 és 35°C) és a vízaktivitás (a_w 0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98 és 0,99) függvényében. A kísérletet két hét elteltével megismétltem. A kísérleteket (A és B) három párhuzamosban végeztem. A növekedést a penészgomba telepek átmérőjének mérésével jellemeztem. A mérést 36 napig végeztem.

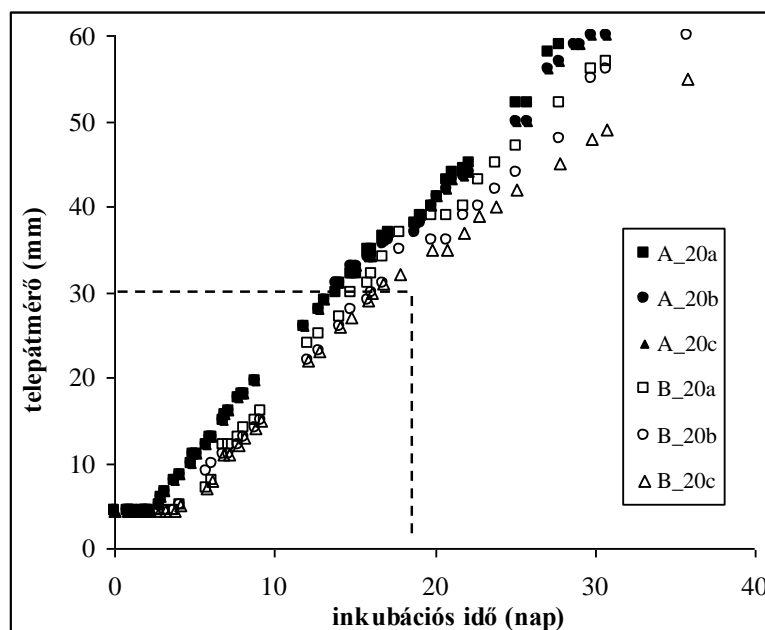
A 16. ábrán látható, hogy az ismétlések (A, B) között nagyobb az eltérés, mint az egy kísérleten belül a párhuzamosok között. Ennek magyarázata az lehet, hogy a párhuzamosoknak teljesen azonos környezeti feltételeket tudtam biztosítani, így ebben az esetben gyakorlatilag nincs, illetve elhanyagolható a környezeti variabilitás.



16. ábra Az *A. niger* telepek növekedésének vizsgálata két ismétlésben és 3-3 párhuzamosban (25°C, a_w 0,90). A telepátmérő és az inkubációs idő függvényében ábrázolt pontokra BARANYI és ROBERTS (1994) egyenlete alapján görbét illesztettem

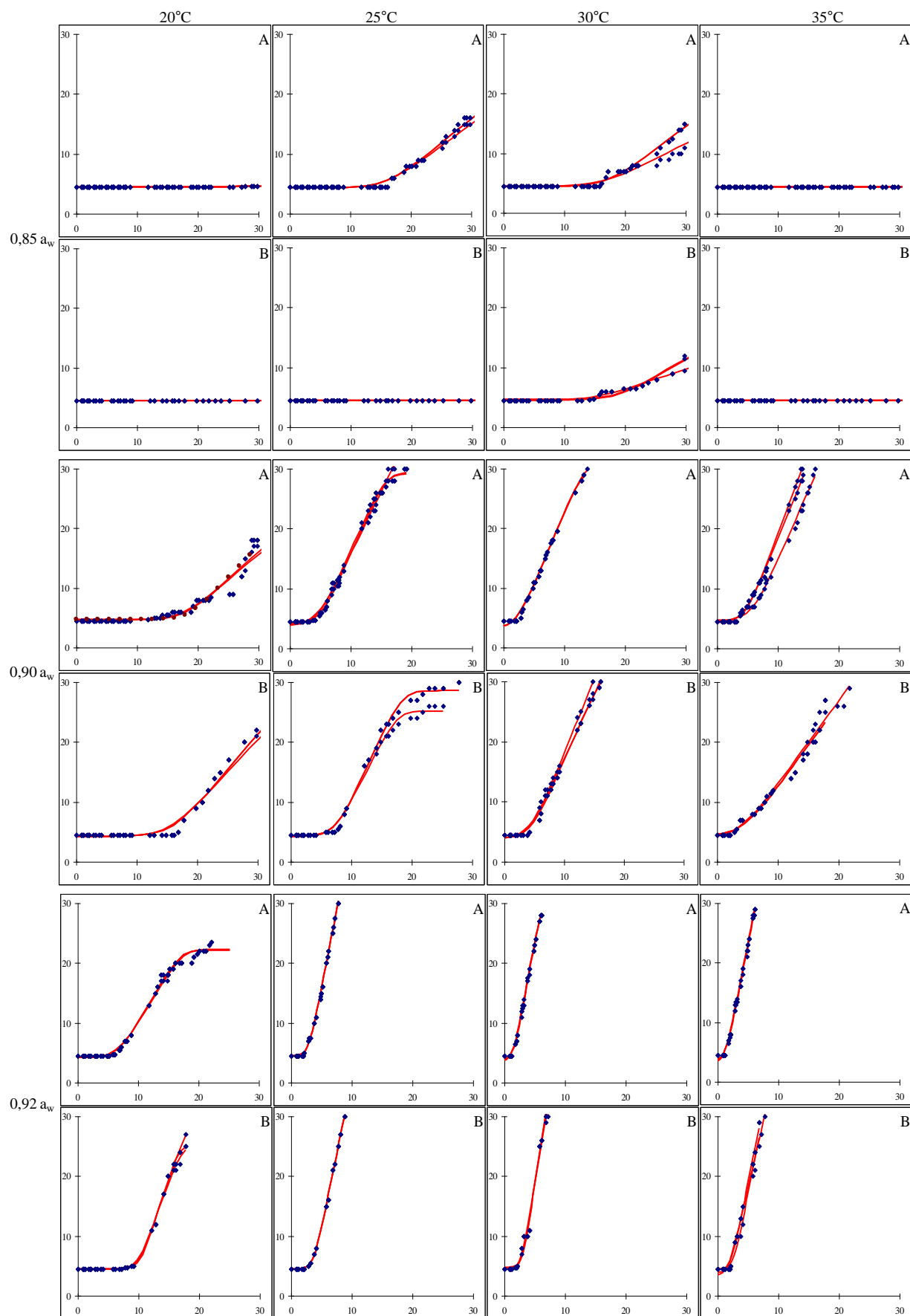
A növekedési sebesség megállapításánál célszerű volt csak a 30 mm-nél kisebb telepátmérővel rendelkező adatokat figyelembe venni, hogy csökkenjen a mikro-környezet változásának hatása. A 17. ábrán látható, hogy a párhuzamosok közötti szórás egyre nagyobb az idő előrehaladtával.

A 30 mm kiválasztása empirikus alapon történt, mivel eddig az értékig biztosított a robusztus linearitás. Ebben az esetben a növekedési modellben a DMFit m görbületi paraméterének értéke nulla (tehát nincs stacionárius fázis), míg az n paraméter az alapértelmezett érték, vagyis 1.

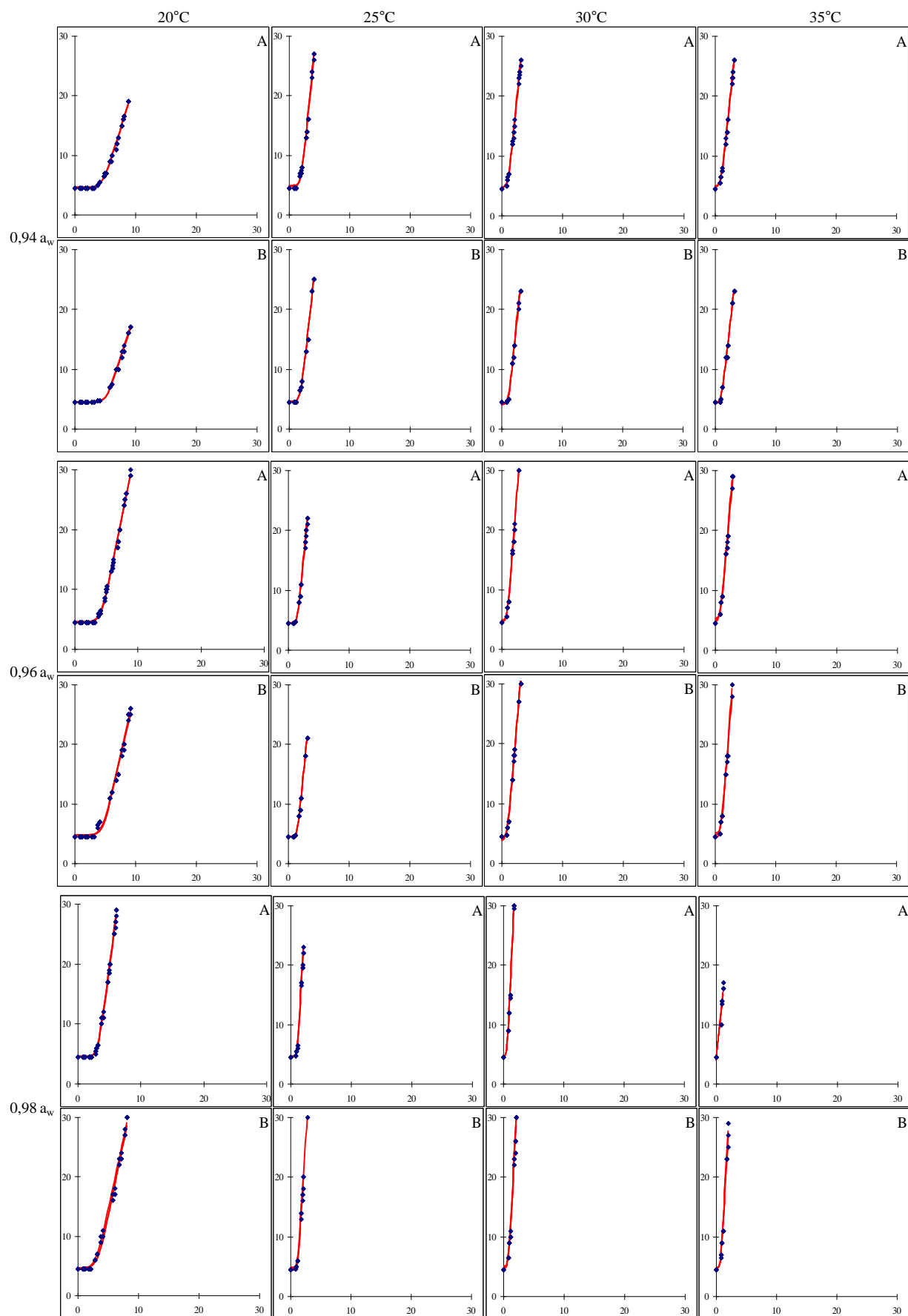


17. ábra Az *A. niger* telepek növekedésének vizsgálata három párhuzamosban és két-két ismétlésben (30°C, a_w 0,90). Ahhoz, hogy csökkentsem a mikro-környezetben való változás hatását, az elsődleges modellhez szükséges telepátmérő adatokat 30 mm-ig használtam

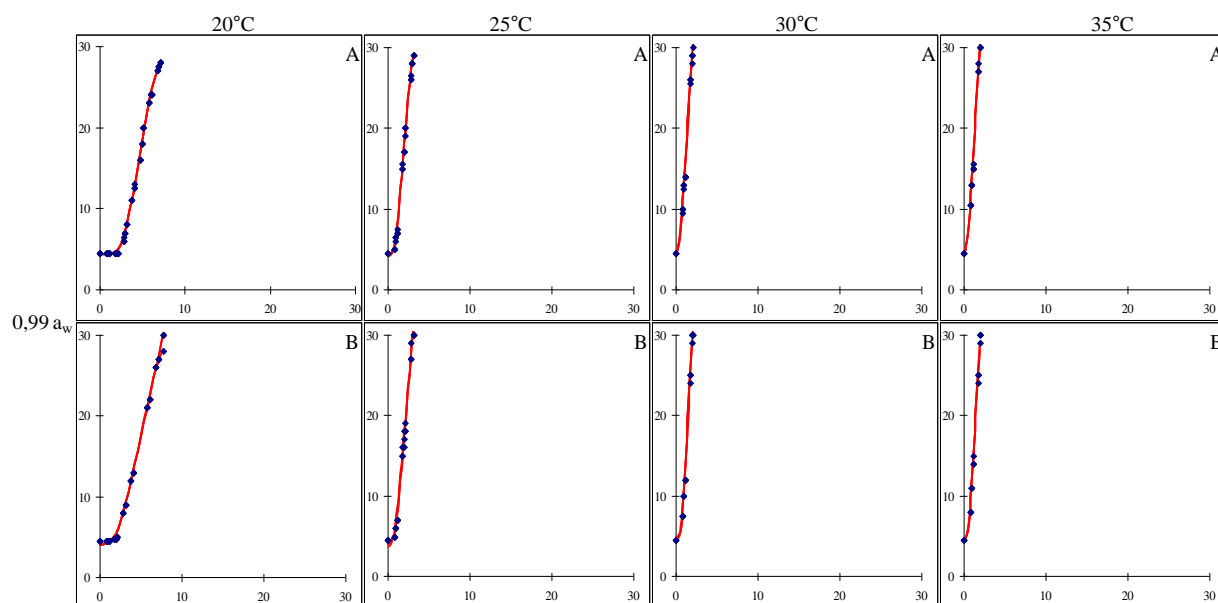
A 18. ábrán látható az *A. niger* telepek növekedése a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében, maláta táptalajon. A növekedési görbéknek csak a 30 mm alatti szakaszát illesztettem, ezzel csökkentve az elsődleges modell hibáját. Így lehetőség adódott a kísérleti és a környezeti hiba elkülönítésére. Az ábrákon feltüntettem a párhuzamos mérések eredményét (ugyanazon a grafikonon, valamint az ismétléseket (A, B) egymás alatti grafikonokon).



18. ábra Az *A. niger* telepek növekedése a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében, malátá táptalajon. A párhuzamosok ugyanazon a grafikonon, míg az ismételt kísérletek (A, B) egymás alatt láthatók (folyt.)



18. ábra Az *A. niger* telepek növekedése a hőmérséklet és a vízaktivitás függvényében, maláta táptalajon. A párhuzamosok ugyanazon a grafikonon, míg az ismételt kísérletek (A, B) egymás alatt láthatók (folyt.)



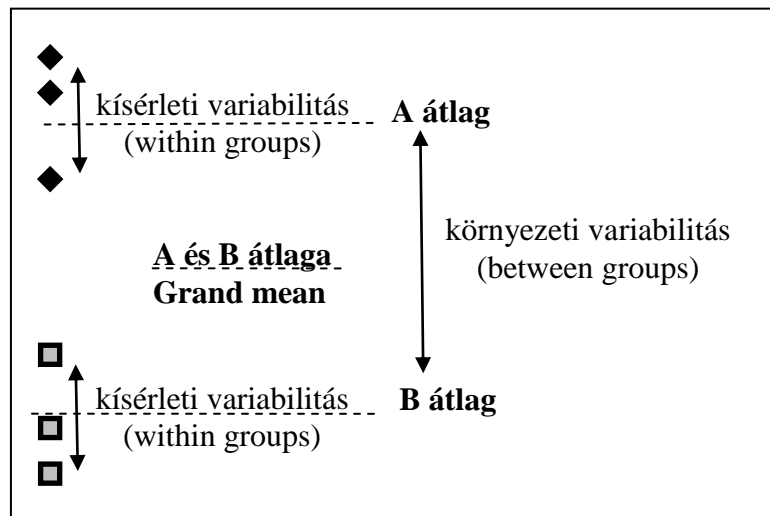
18. ábra Az *A. niger* telepek növekedése a hőmérséklet és a vízáktivitás függvényében, malátá táptalajon. A párhuzamosok ugyanazon a grafikonon, míg az ismételt kísérletek (A, B) egymás alatt láthatók

Hibaanalízis tárta fel a kísérletek között jelentkező eltérések okait, hogy vajon a kísérleti vagy a környezeti variabilitás befolyásolja-e jobban a növekedés ütemét. Mivel egy kísérleten belül a párhuzamos mérések esetében egy spóra szuszpenzióból indultam ki, azonos körülmények között inkubáltam a lemezeket, így a környezeti variabilitás a lemezek között minimális. Ezért a párhuzamosok között jelentkező eltérést kísérleti variabilitásnak lehet nevezni.

Egy kísérlet megismétlésénél a kísérleti variabilitás mellett környezeti és biológiai variabilitással is számolni kell. A második kísérletnél ugyanis új spóra szuszpenziót használtam; erre szükség is volt, mivel a szuszpenzió azonos fiziológiai állapota / homogenitása ily módon garantálható. Viszont minden kísérlet megismétlésére igaz, hogy a kultúra mikro-környezetét nem lehet teljes hűséggel reprodukálni. Feltételezve, hogy a párhuzamos kísérletek átlaga a kísérleti variabilitást minimalizálja, a környezet variabilitásának hatását az ismételt párhuzamosok átlagának varianciája kvantifikálhatja.

A bevezetett fogalmak analóg módon értelmezhetők azzal, amikor szórásanalízist végzünk (analysis of variance, ANOVA). A kísérleti variabilitás (experimental variability) megfelel a csoportokon belüli (within groups) variancia fogalmával (19. ábra), s ezt a w^2 paraméterrel jelöljük. Az A és B kísérletek megfelelő átlagai közötti variabilitás a környezeti variabilitásnak tudható be (environmental variability), ami analóg az ANOVA-ban használatos csoportok közötti (between groups) varianciával, amit a b^2 fog jelölni (19. ábra). A predikció teljes

variabilitása (ε^2) részben a modell hibájából, részben a (w^2+b^2) teljes varianciából ered. Ha a másodlagos modell elegendően pontos, akkor $\varepsilon^2=w^2 + b^2$.



19. ábra A kísérleti variabilitás analóg a csoportokon belüli (within groups) variabilitással. Az A és B kísérletek átlagai közötti eltérést környezeti variabilitásnak neveztük, és ez analóg az ANOVA-ban használatos csoportok közötti (between groups) variabilitás fogalmával

A növekedési ráta (g) standard hibáját (se) az elsődleges modellből lehet becsülni. A standard hiba értéke nő, amint a növekedési ráta nagyobb értéket ad, de a relatív hiba (re) állandó érték körül marad, függetlenül a környezeti hatásoktól.

$$re(g) = \frac{se(g)}{g}$$

Ez indokolja a természetes alapú logaritmus használatát a másodlagos modellnél. Ugyanis, ha a növekedési ráta $\ln(g)$ standard hibája (se) kicsi, akkor az közel lesz a növekedési ráta (g) relatív hibájához (BARANYI et al., 1999).

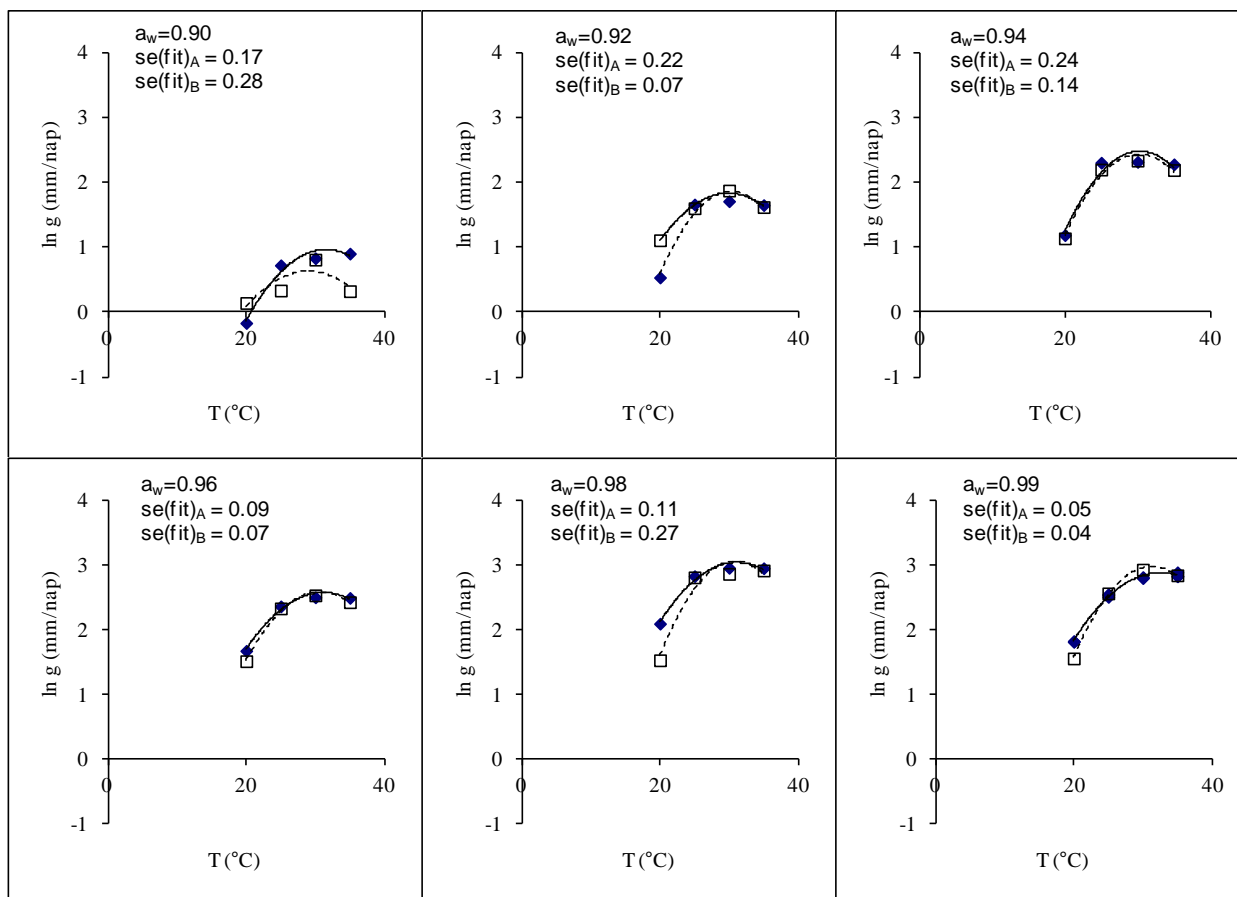
A relatív hibák átlaga az A kísérlet esetében 0,04, míg a B kísérlet esetében 0,05 körüli értéket adott.

A kísérleti variabilitás $w^2 = 0,00262$ (vagyis $w = \sqrt{0,00262} \approx 0,051$) értékkel jellemezhető. Úgy is mondhatjuk, hogy egy adott növekedési görbe kb. 5%-os pontossággal tudja meghatározni a növekedési sebességet.

A környezeti variabilitás kvantifikálására kapott $b^2 = 0,02966$ érték, amiből $b = \sqrt{0,02966} \approx 17\%$. Más szóval, a párhuzamosok átlagát vevő módszerrel, kb. 17%-os pontossággal ismételhető meg

a növekedési sebesség mérése adott hőmérséklet és vízáktivitás esetén. Ezt a pontosságot akkor lehet elérni, ha a másodlagos modell az ismételések átlagához tökéletesen illeszkedik.

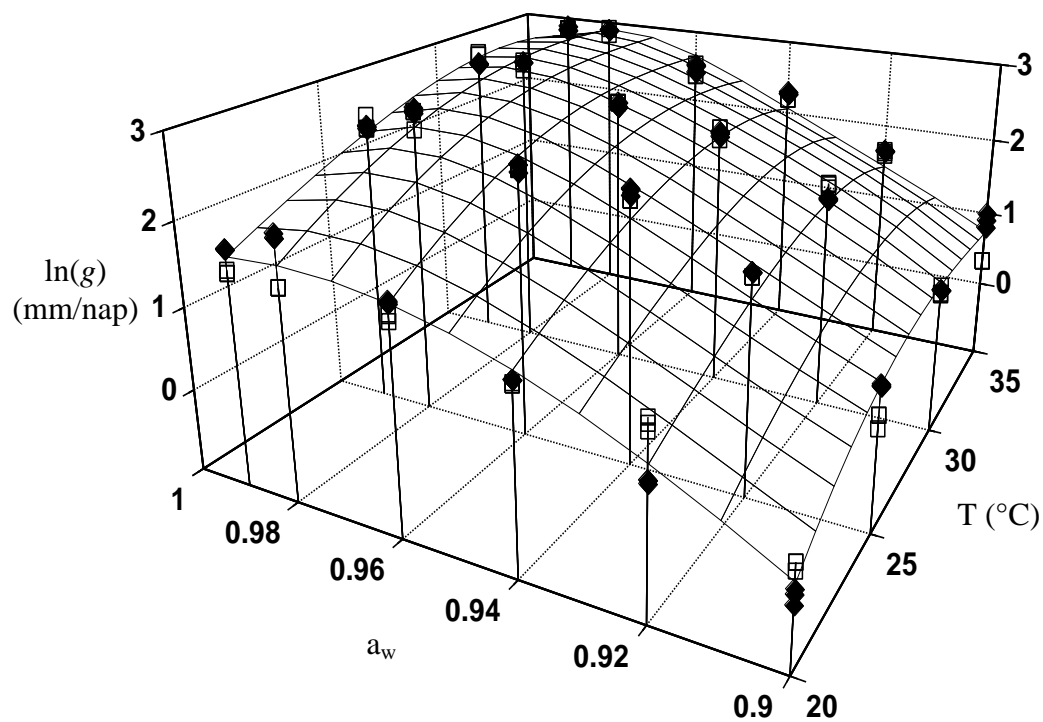
A 20. ábrán a növekedési ráta kvadratikus modelljét használtuk állandó vízáktivitätsi értékeken. Tehát egy görbe esetében konstans vízáktivitás mellett csak a hőmérséklet változik. Az illesztés standard hibái leolvashatók.



20. ábra A másodlagos modell ábrázolása a növekedési sebesség $\ln(g)$ és a hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$) függvényében. Az A (\blacklozenge) és B (\square) kísérletek eredményei láthatók 6 különböző vízáktivitätsi értéken (0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98; 0,99). Az $\varepsilon=se(\text{fit})$ értékek 0,17-0,19 között változnak

Ha a hőmérséklet és a vízáktivitás együttes hatását kvadratikus válaszfelület illesztésével ábrázoljuk (21. ábra), akkor az illeszkedés jósága (ε , „standard error of fit”) 0,19 értéket ad a koefficiensek becslésével, amelyek a t-eloszlás alapján mind szignifikánsak:

	Koefficiensek Standard hiba	
Tengelymetszet	-7,962	0,532
T	0,596	0,036
b_w	23,290	1,783
$T * b_w$	-0,131	0,037
T^2	-0,009	0,001
b_w^2	-67,836	3,481



21. ábra Az A (-♦-) és B (-□-) kísérletek növekedési sebesség $\ln(g)$, vízaktivitás (a_w) és hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$) értékeinek ábrázolása válaszfelület illesztésével

Tehát a kísérlet egy újabb ismételése során a növekedési ráta várhatóan kb. 20%-kal fog eltérni a predikciótól ($e^{\pm 0,19} = 1 \pm 0,209$) (BARANYI et al., 2014).

4.2.2 Kombinált modell

Az *A. niger*-rel végzett két egymást követő kísérlet eredményeit alapul véve írtuk le a penészgomba növekedési sebességének változását matematikai nyelven.

A ROSSO és munkatársai (1993) által megalkotott ún. kardinális modell, a szaporodási környezeti jellemző kardinális (minimum, optimum, maximum) értékeinek ismeretén alapszik. A 8. táblázat tartalmazza a kardinális paramétereket (T_{min} , T_{max} , T_{opt} , b_{wOpt}). Ezek a kardinális hőmérsékleti értékek nem becsült adatok, hanem irodalmi forrásból származnak. Ezáltal a regressziót mintegy „tehermentesítjük” az alól, hogy ezen paramétereket az adatok segítségével mutassa ki, így a predikció kevésbé érzékeny a véletlen hibákra.

A b_w és $\ln(g)$ adatokra illesztett kvadratikus modell (GIBSON et al., 1994) módosítása a Gamma elv (Gamma-concept) (ZWIETERING et al., 1996) felhasználásával történt. A Gamma elv direkt alkalmazása pontatlan modellhez vezetett volna, mivel az egyszerűen összeszorozza a vízaktivitástól és a hőmérséklettől függő parciális modelleket, így a minimum vízaktivitás független lenne a hőmérséklettől és viszont. Ez viszont a penészgomba esetében ellentmond a tényeknek. Például a b_w maximuma (ami megfelel a vízaktivitás minimumának), nyilvánvalóan növekszik a hőmérséklet növekedésével (22. ábra). A Gamma elv fenti hátrányát úgy lehetett kiküszöbölni, hogy a Gibson-féle parabolikus modellben a parabola főegyütthatója a Rosso-féle képlet szerint függjön a hőmérséklettől. Ezután a parabola nyújtását biztosító konstans ($const_1$, $const_2$) variálásával lehetővé vált, hogy a válaszfelület aszimmetrikus legyen, ami jobban tükrözi az adatok trendjét. Így a hőmérséklet és a b_w hatása a növekedési ráta természetes logaritmusára egy alulról konvex aszimmetrikus paraboloiddal írható le (BARANYI, személyes közlés).

A teljes négyzet alakra parametrizált egyenletben (Egyenlet 5), a mérési adatokon látható trend alapján érdemes a parabola nyújtását biztosító konstansokat ($const_1$, $const_2$) attól függően megválasztani, hogy b_w kisebb vagy nagyobb, mint b_{wOpt} ; emellett biztosítani, hogy a főegyüttható és az additív tag függyenek a hőmérséklettől (Egyenlet 6) (BARANYI, személyes közlés). A kombinált modell paramétereit a 8. táblázat tartalmazza.

$$\ln(g) = \begin{cases} const_1 / a_T \cdot (b_w - b_{wOpt})^2 + (L_{rOpt} + a_T) & \text{ha } b_w \leq b_{wOpt} \\ const_2 \cdot (b_w - b_{wOpt})^2 + (L_{rOpt} + a_T) & \text{ha } b_w > b_{wOpt} \end{cases} \quad (5)$$

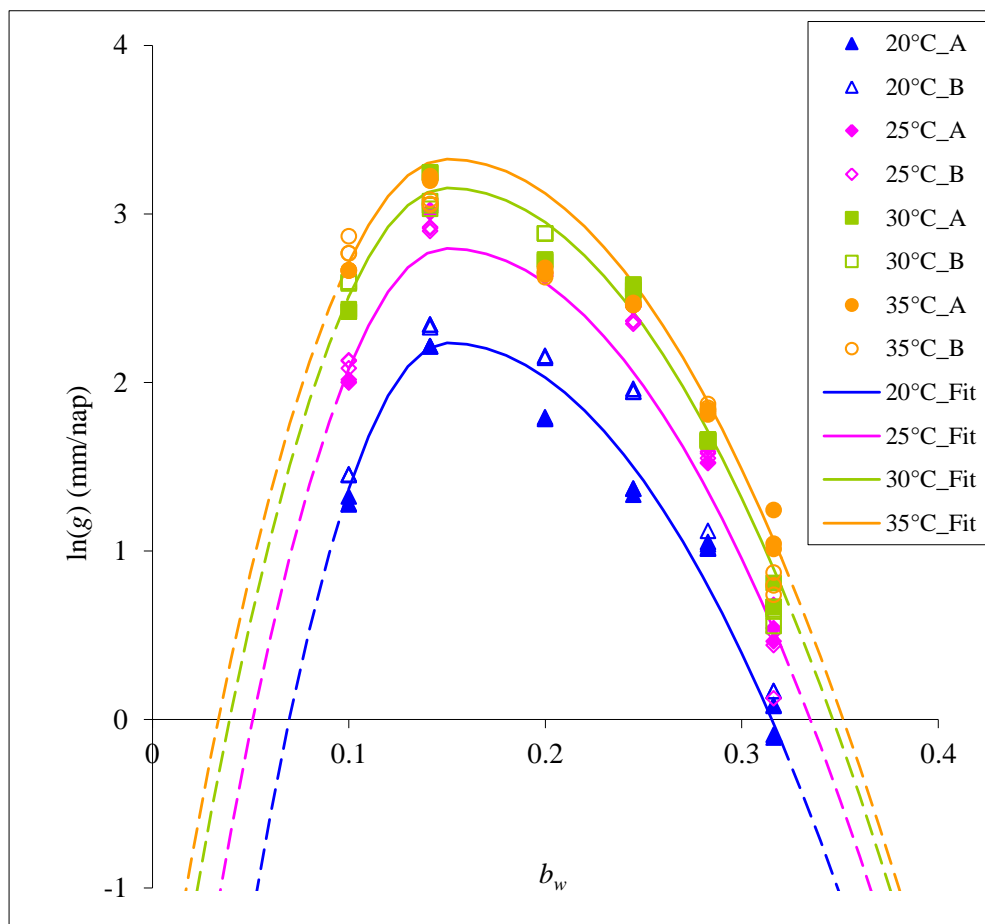
$$a_T = \ln r_{max} + \ln(((T - T_{max})(T - T_{min}))^2 / (((T_{opt} - T_{min})(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)))) \quad (6)$$

A b_{wOpt} paraméter becslése nem a mért növekedési rátákból történt, hanem az irodalomban leggyakrabban megadott érték használatával ($b_{wOpt}=0,15$), amely a_w 0,98 értéknek felel meg.

8. táblázat A kombinált modell paramétereit

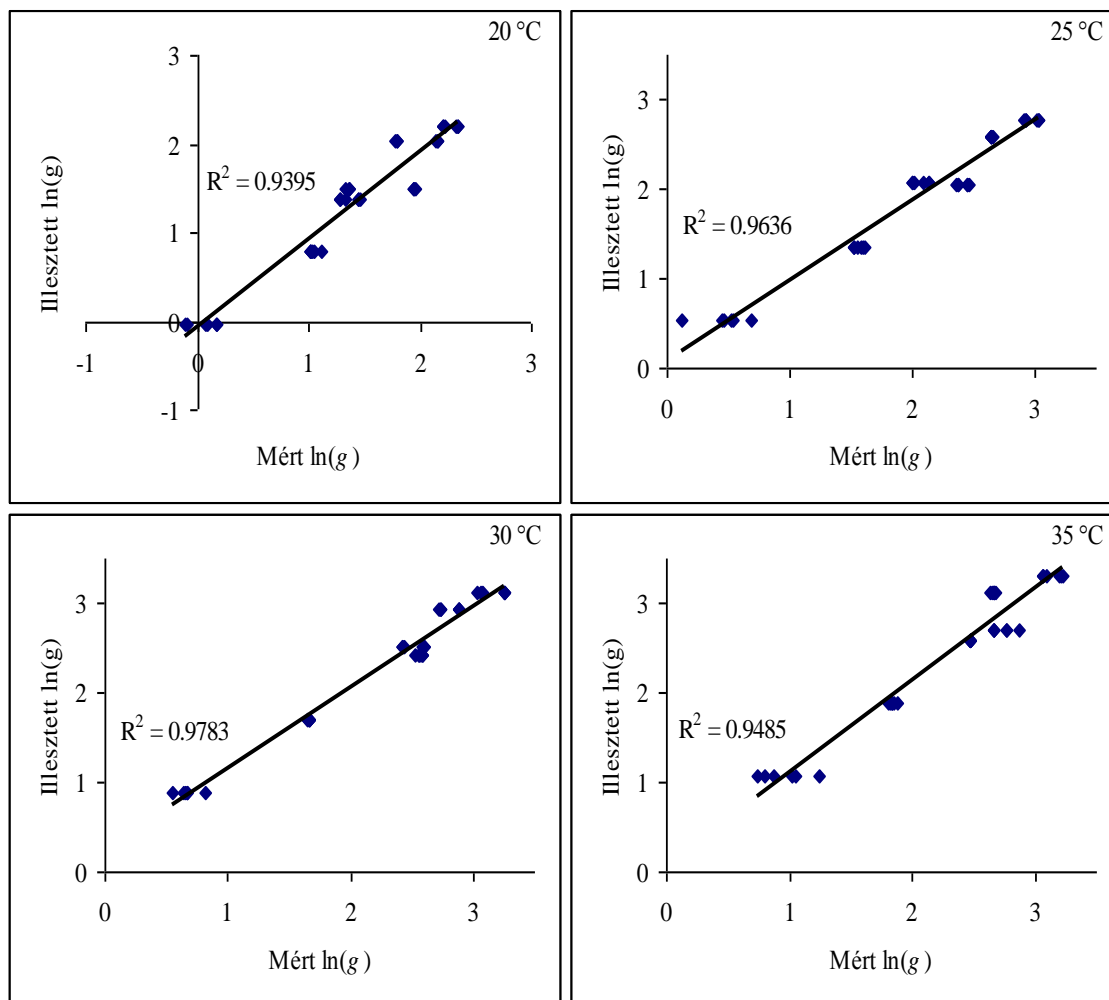
Izolátum	Paraméterek	Értékek
<i>Aspergillus niger</i>	T_{min} (°C)	7
	T_{max} (°C)	45
	T_{opt} (°C)	36
	b_{wOpt}	0,15
	$const_1$	-918
	$const_2$	-81,82
	$\ln r_{max}$	3,749
	L_{rOpt}	-0,417

A 22. ábrán látható, hogy a laboratóriumi mérési adatainkra jól illeszkedik a kombinált modell.



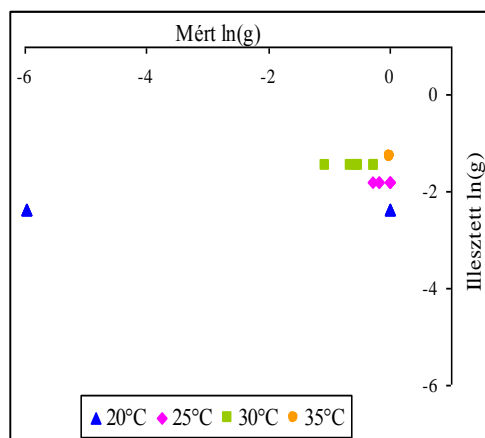
22. ábra A mért párhuzamos adatokra (pontok) a kombinált modell segítségével kapott illesztések. Az ismétlések (A, B) azonos színnel jelölve

Az illeszkedés hibáját a modelltől való átlagos négyzetes eltérés kvantifikálja. A laboratóriumi mérési adatokra az egyenlet segítségével kiszámoltuk a predikciót. A 23. ábrán látható a mért eredmények és az illesztett értékek közötti eltérés.



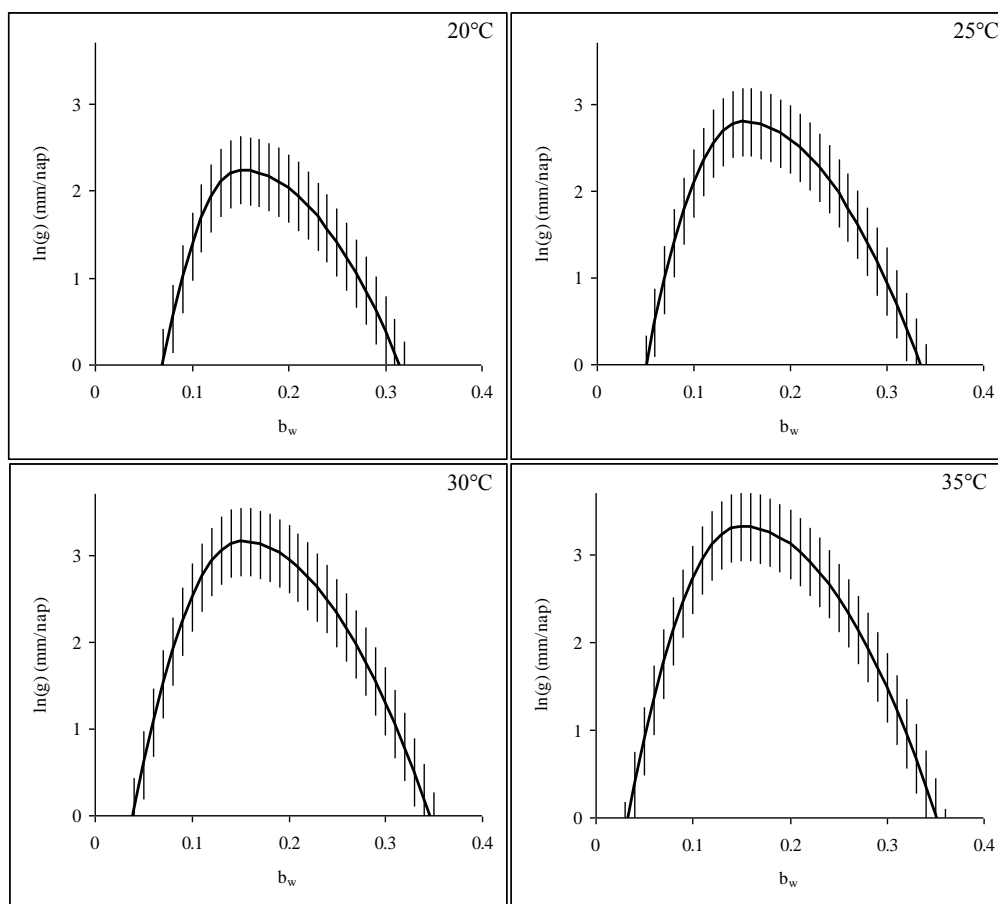
23. ábra A mért és az illesztett adatok összehasonlítása. A pontok a penészgomba növekedési sebességét ábrázolják $\ln(g)$ -ben kifejezve. Egy hőmérséklet esetében hat vízáktivási érték adatai olvashatók le (a_w 0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98; 0,99)

A 24. ábrán a 0,85 vízáktivási értéken mért (két kísérlet eredményei) és a modell által kiszámolt adatok láthatók. A mért és az illesztett adatok nagyon távol esnek egymástól. Ez az ábra jól reprezentálja az extrapoláció veszélyét. A várható hiba annál nagyobb, minél távolabb generálunk predikciót a kísérleti adatoktól.



24. ábra A valós és a kombinált modell által kiszámított adatok összehasonlítása a_w 0,85 értéken

A kombinált modell átlagos illeszkedési hibája 0,20, ami alig nagyobb, mint a kvadrátikus polinom esetében kapott 0,19-es illeszkedési hiba (25. ábra). A jóslási tartomány (predikciós intervallum) azt mutatja, hogy a kísérlet egy újabb ismételése során a pontok 95%-os megbízhatósággal az intervallumon belül lesznek.

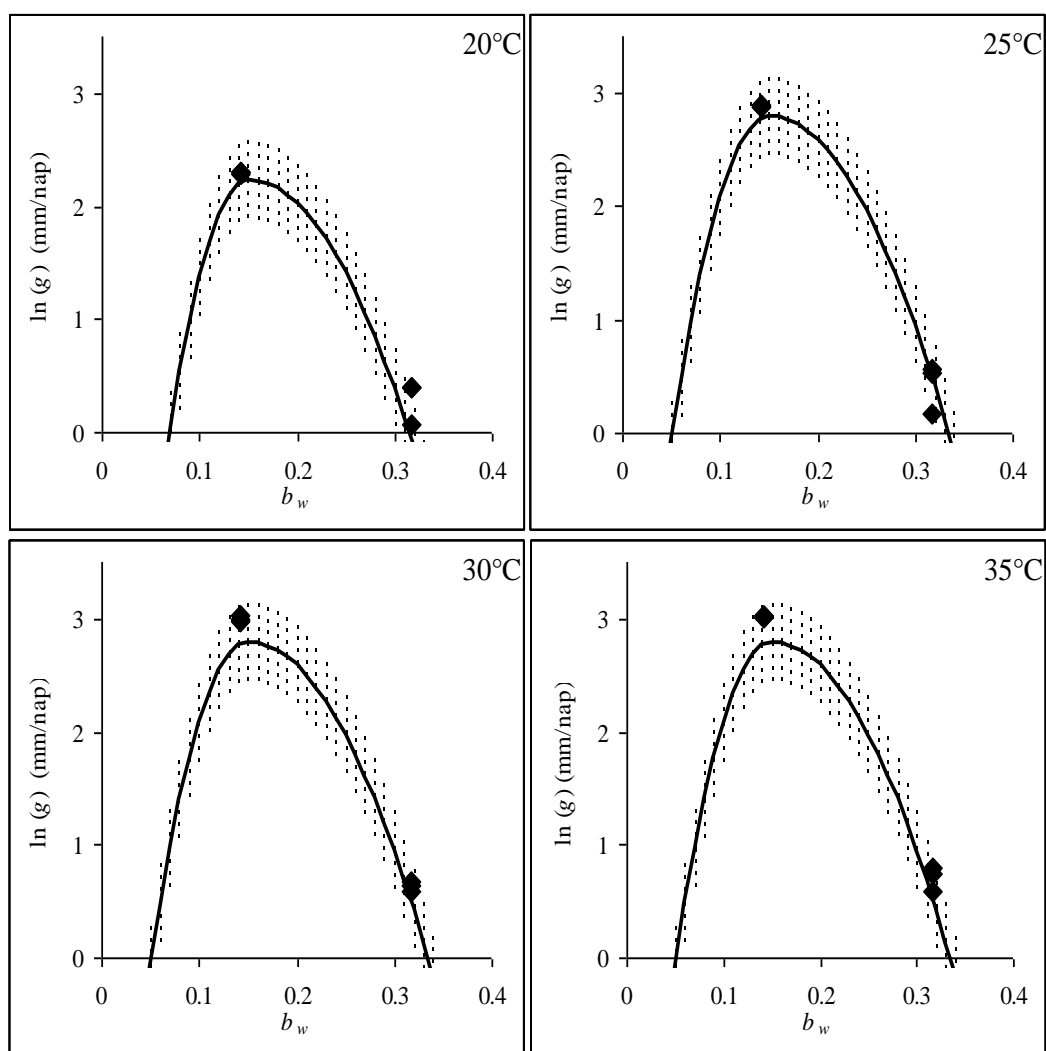


25. ábra A kombinált modell és jóslási tartománya

Ez a hibanövekedés az ára annak, hogy a kombinált modell viszont jobban alkalmazható predikcióra a növekedés határaihoz közel fekvő pontokban, mint a kvadrátikus modell.

4.2.3 Becslések ellenőrzése (validálása)

Maláta táptalajon (MEA), három párhuzamos mérésben, két vízaktivitási értéken (a_w 0,90, 0,98), és négy inkubációs hőmérsékleten (20, 25, 30 és 35°C) végeztem újabb kísérletet. Tehát azonos környezeti körülmények között, mint aminek alapján a kombinált modell készült, hasonlítottuk össze az adatokat. Ezek a független eredmények alkalmasak a prediktív modell ellenőrzésére. A 26. ábrán az *A. niger* telepek növekedéséből számolt $\ln(g)$ értékeket a b_w függvényében ábrázoltam. A kombinált modell jóslási tartományába 24 adatból kettő nem esik bele, ami reprezentálja a 95%-os pontosságát.

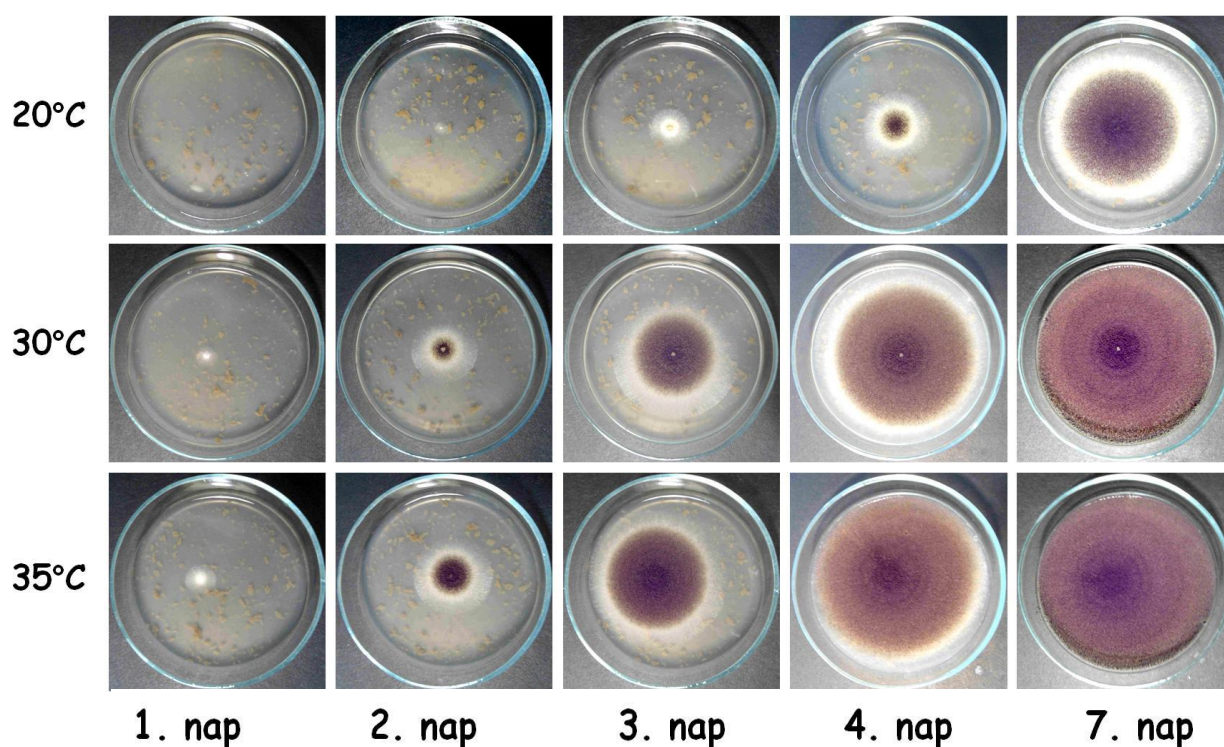


26. ábra Az *A. niger* növekedési sebessége $\ln(g)$ -ben kifejezve (pontok), a kombinált modell és a konfidencia sáv

4.2.4 A kombinált modell alkalmazása *A. niger* növekedésére szőlőlé alapú táptalajon

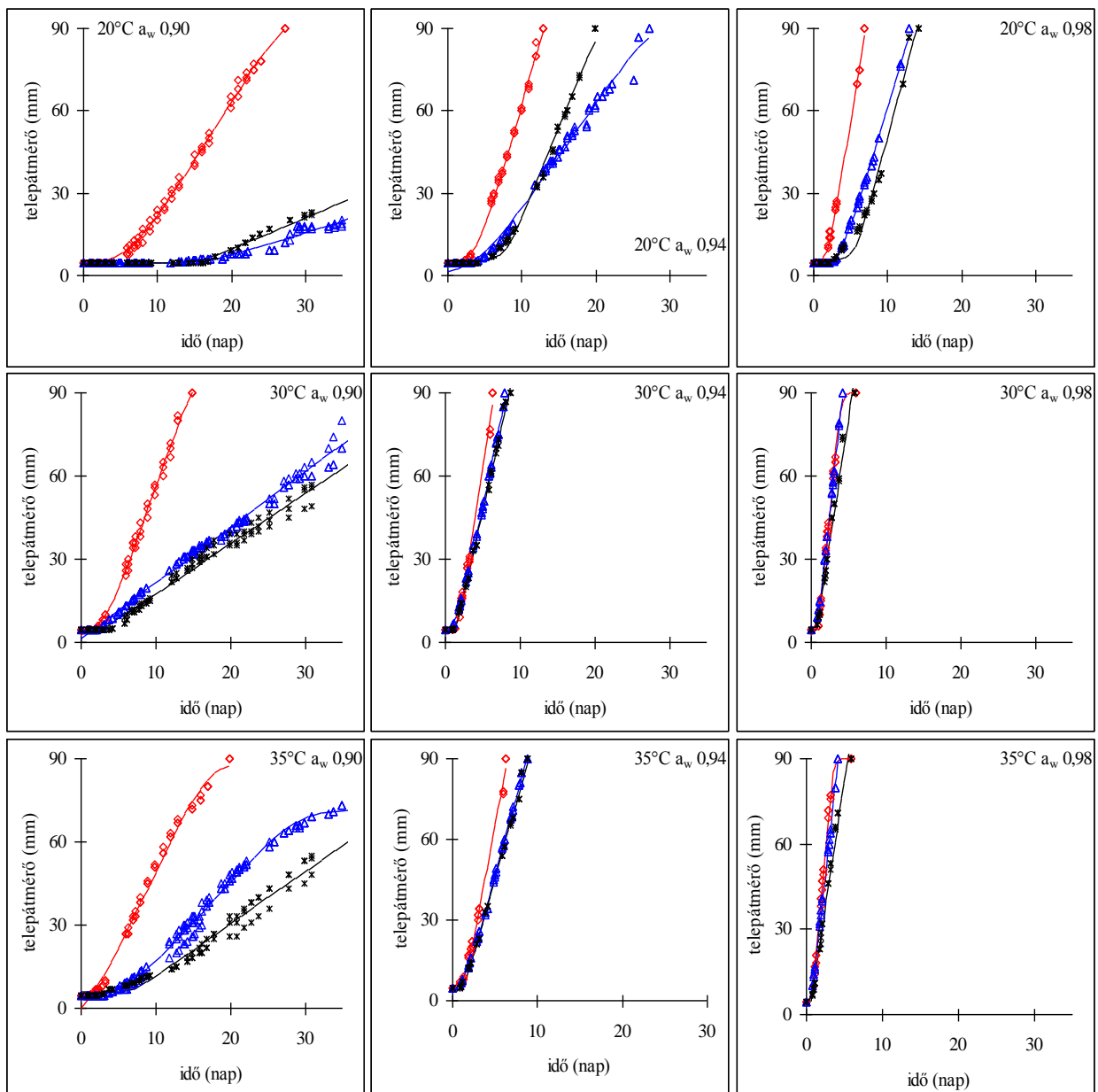
További vizsgálatokkal adatokat gyűjtöttem az *A. niger* növekedésének jellemzésére gyümölcs alapú táptalajon. A méréseket ugyanazon vízaktivitási és hőmérsékleti tartományban végeztem el, mint aminek alapján a kombinált modell készült.

Három vízaktivitási értékre (a_w 0,90; 0,94; 0,98) beállított szőlőlé alapú táptalajon mértem az *A. niger* telepek növekedését. Négy szőlőfajtát használtam, két különböző borvidékről, hogy egy évjáraton belül rámutassak az esetleges különbségekre, összehasonlítsam a penészgomba növekedését szőlőlé alapú és maláta táptalajokon és vizsgáljam a maláta táptalajon megalkotott kombinált modell alkalmazhatóságát. A 27. ábrán a_w 0,98 vízaktivitási értéken és 20, 30, valamint 35°C-on látható az *A. niger* telepek növekedése.

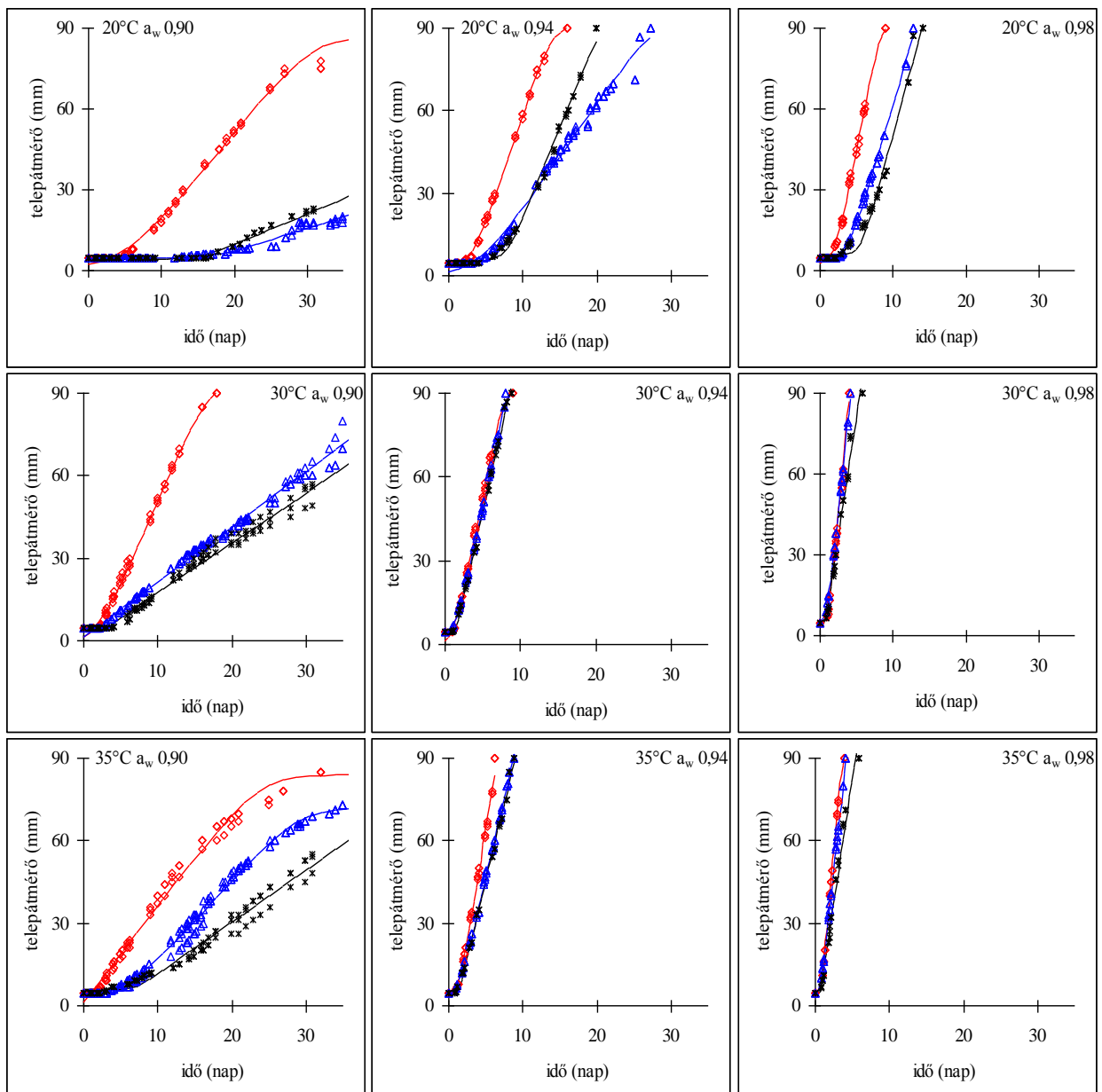


27. ábra Az *Aspergillus niger* telepek növekedése szőlőlé alapú táptalajon (Furmint, Tokaj-hegyaljai borvidék), 20°C, 30°C és 35°C-on, a_w 0,98 vízaktivitási értéken

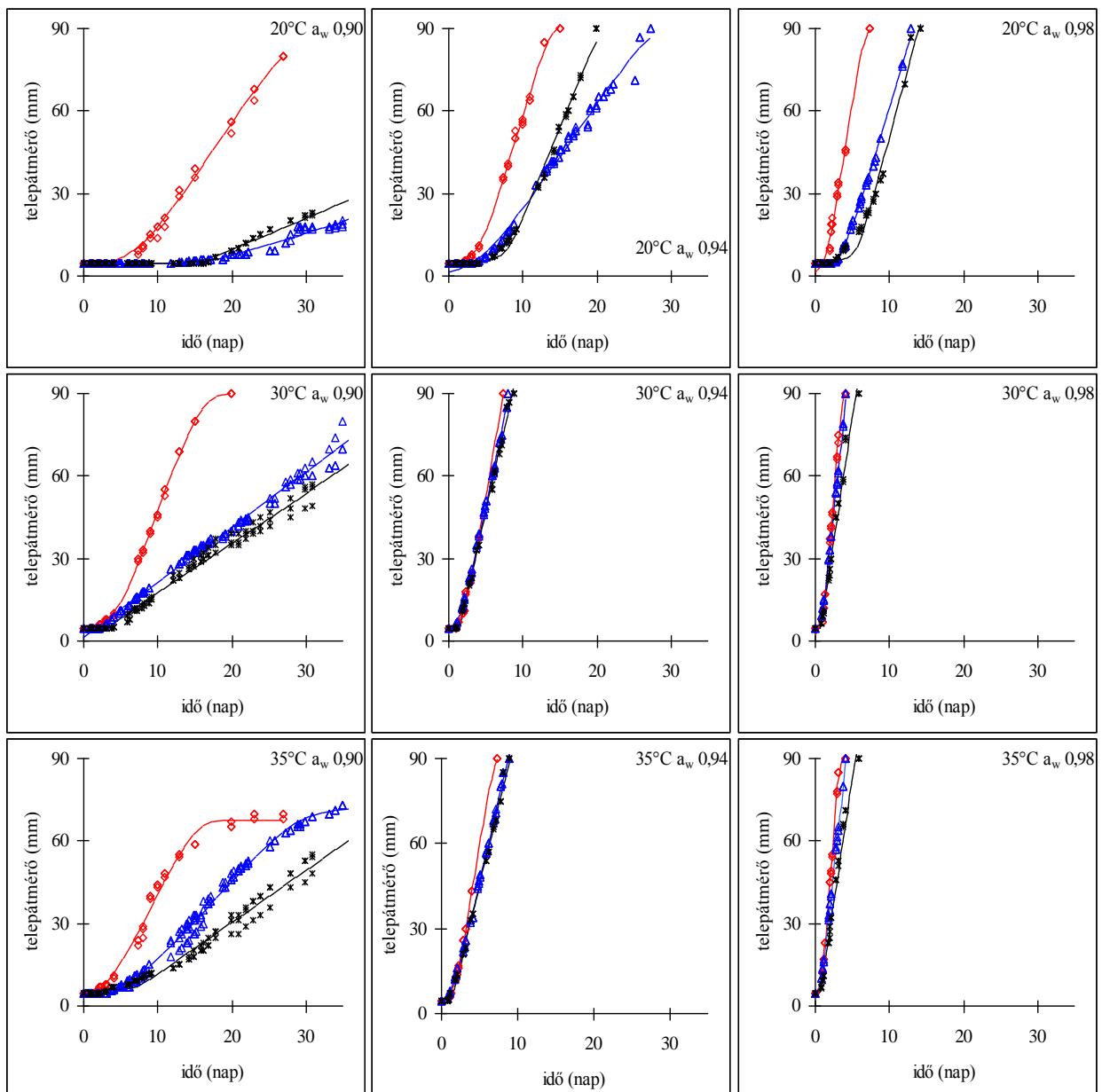
A maláta táptalajon (A, B kísérletek) és különböző szőlőfajtákból készített táptalajokon mért telepátmérő adatokra szaporodási görbét illesztettem (28-31. ábrák).



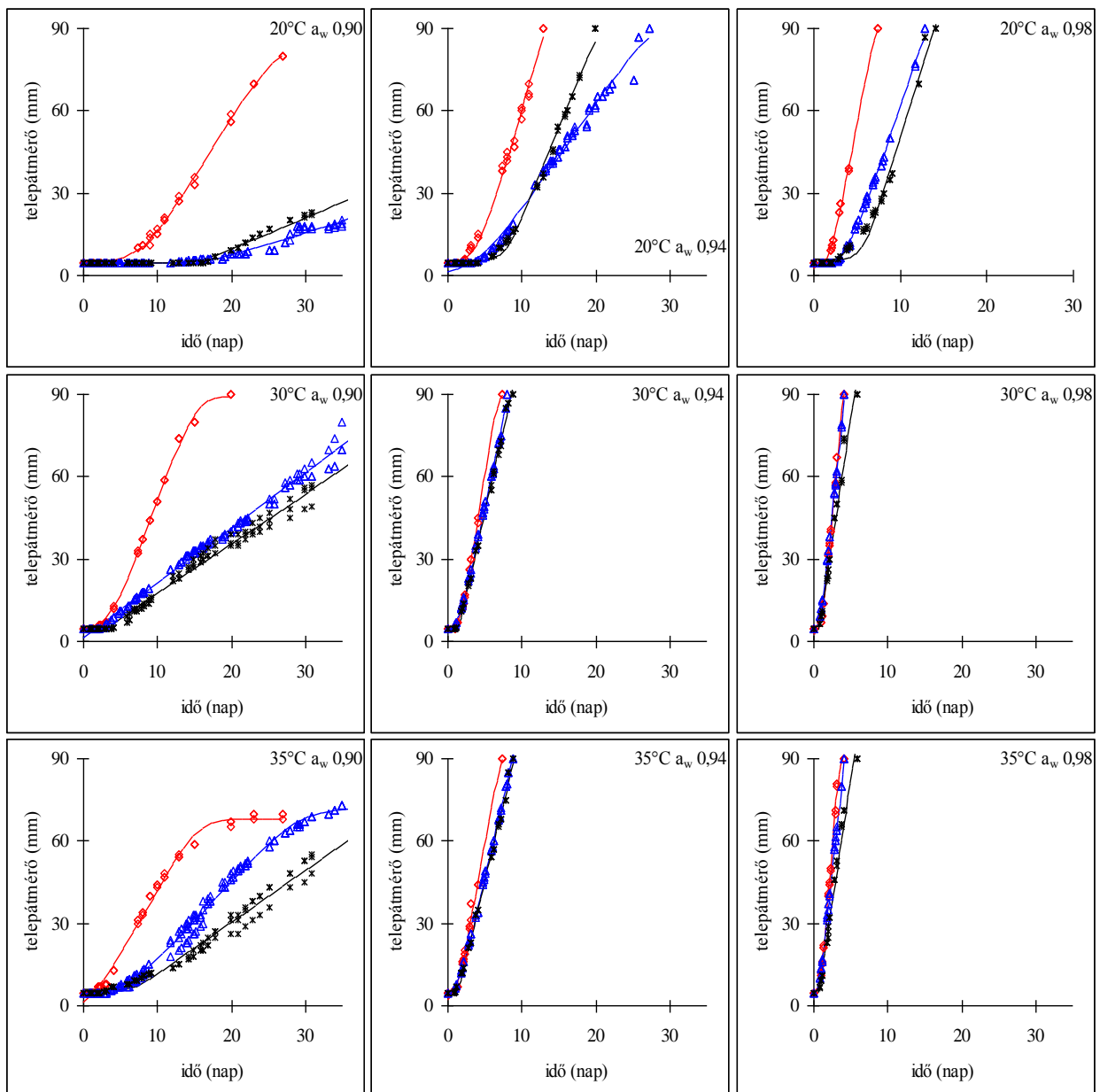
28. ábra Az *A. niger* telepek növekedése maláta (-△- A kísérlet), (-*- B kísérlet) és szőlőlé alapú (Furmint) táptalajon (-◇-)



29. ábra Az *A. niger* telepek növekedése maláta (- Δ - A kísérlet); (-*- B kísérlet) és szőlőlé alapú (Hárslevelű) táptalajon (- \diamond -)

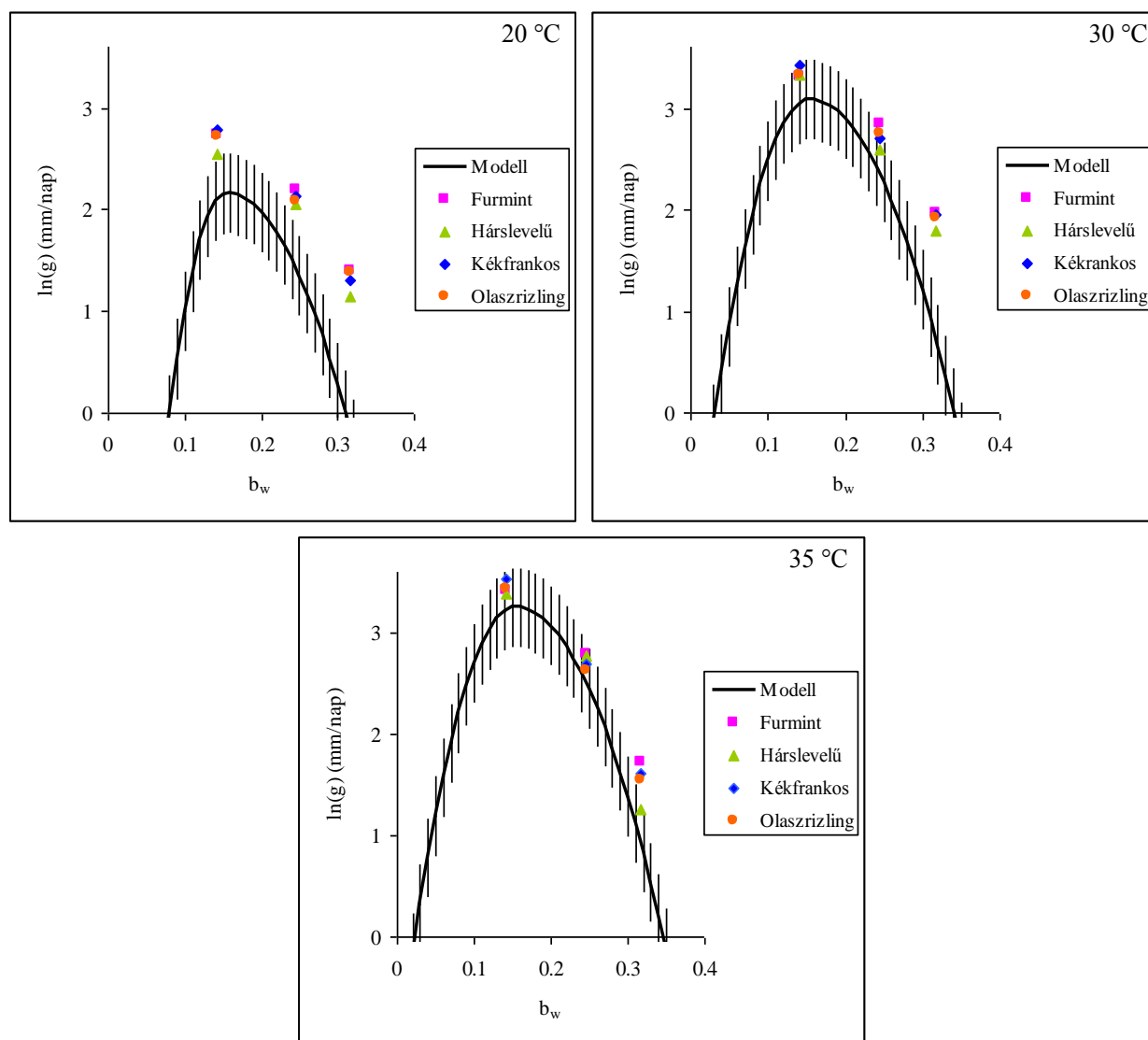


30. ábra Az *A. niger* telepek növekedése maláta (- Δ - A kísérlet); (-*- B kísérlet) és szőlőlé alapú (Kékfrankos) táptalajon (- \diamond -)



31. ábra Az *A. niger* telepek növekedése maláta (- Δ - A kísérlet); (-*- B kísérlet) és szőlőlé alapú (Olaszrizling) táptalajon (- \diamond -)

A 32. ábrán az *A. niger* penészgomba növekedési sebesség értékek természetes alapú logaritmus $\ln(g)$ látható b_w függvényében.



32. ábra Az *A. niger* növekedési sebessége $\ln(g)$ -ben kifejezve (pontok) és illeszkedése a maláta táptalajon végzett kísérletek alapján készült kombinált modellhez

A 32. ábrán minden mért növekedési sebesség nagyobb, mint a kombinált modell által jósolt érték. Ezt torzításnak (bias) nevezzük, ami azt jelenti, hogy a becslésünk a mért adattól szisztematikusan eltér.

A szőlőfajták között nem tapasztalható szignifikáns különbség, bár a Hárslevelű szőlőfajtából készített táptalajon nő a legkisebb intenzitással a penészgomba. Elmondható, hogy a szőlőlé alapú táptalajon mért adatokból számolt növekedési ráták azonos tendenciát írnak le, mint a kombinált modell, bár enyhe szisztematikus torzítással. Kedvezőtlenebb hőmérsékleten (20 °C) a maláta táptalajon mért adatokon alapuló kombinált modell alulbecsüli a szőlőlé alapú táptalajon mért penészgomba növekedési rátáját, bár az optimális növekedési hőmérséklethez (35 °C) közel az utóbbiak már beleesnek a kombinált modell jóslási tartományába. Ezek alapján arra lehet

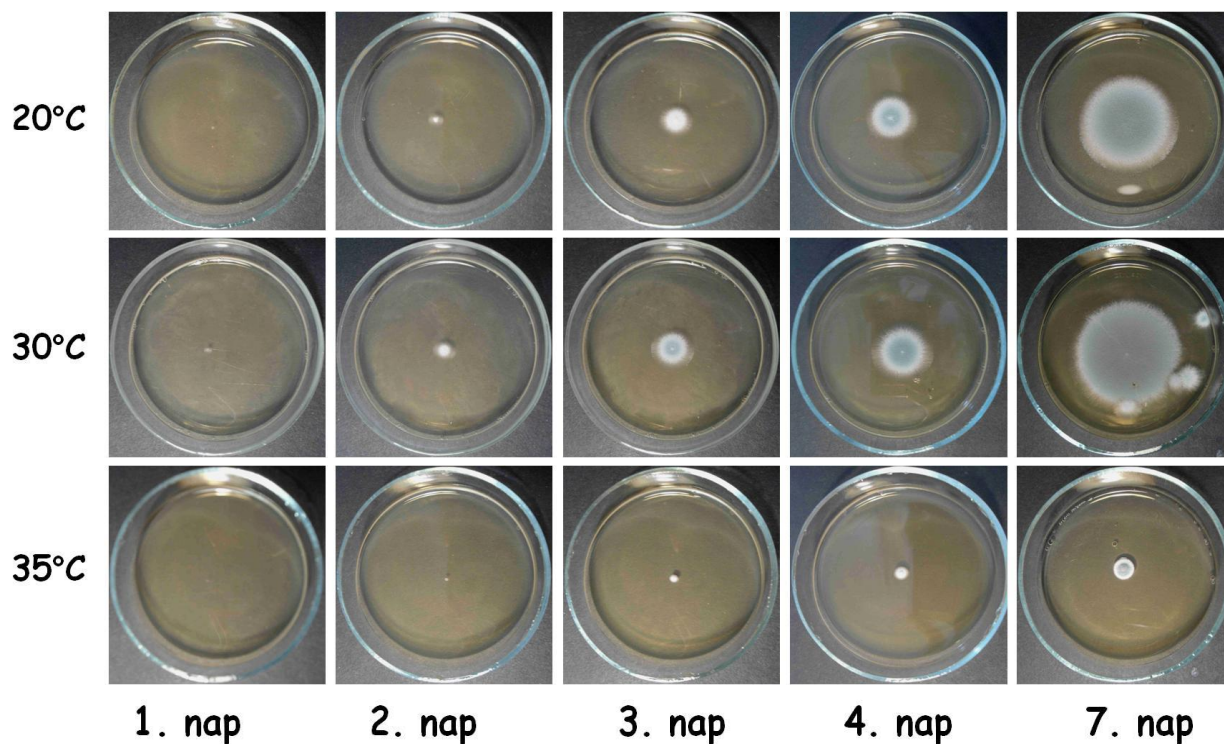
következtetni, hogy kedvezőtlen körülmények között, a szőlőlé alapú tápközeg alkalmasabb az *A. niger* növekedésének becslésére. Az előnyös tulajdonságok eltűnnek, ahogy a penészgomba számára optimális környezeti feltételek felé haladunk. Ezek az összehasonlítások azt sejtetik, hogy maláta táptalajon végzett mérési eredményekből származó prediktív modell csak a penészgomba növekedését erősen támogató környezeti feltételek mellett írja le jól a gyümölcs alapú táptalajon történő növekedést.

Az eredmények alapján két fontos következtetés vonható le:

1. Kedvezőtlen környezeti feltételek között a természetben (szőlőn) eltérő (a vizsgált fajtákon nagyobb) mértékű aszpergilluszos penészedéssel lehet/kell számolni, mint azt a laboratóriumi kísérletek alapján ki lehet következtetni.
2. A szőlővel végzett kísérletek arra utalnak, hogy a laboratóriumi „mesterséges” táptalajjal és a „természetes” táptalajjal, szőlőlével végzett kísérletek között penészgombák esetében nagyobb a különbség, mint a baktériumoknál (a laboratóriumi és az élelmiszerekben történő szaporodás összevetése esetén). Az adatok alapján az általánosan használt maláta táptalaj csak a mérési konzisztenciára optimális, nem pedig a növekedési sebességre. Ez arra utal, hogy a prediktív mikológia bizonyos alapelvei eltérhetnek azoktól, amire a baktériumok prediktív mikrobiológiája épül.

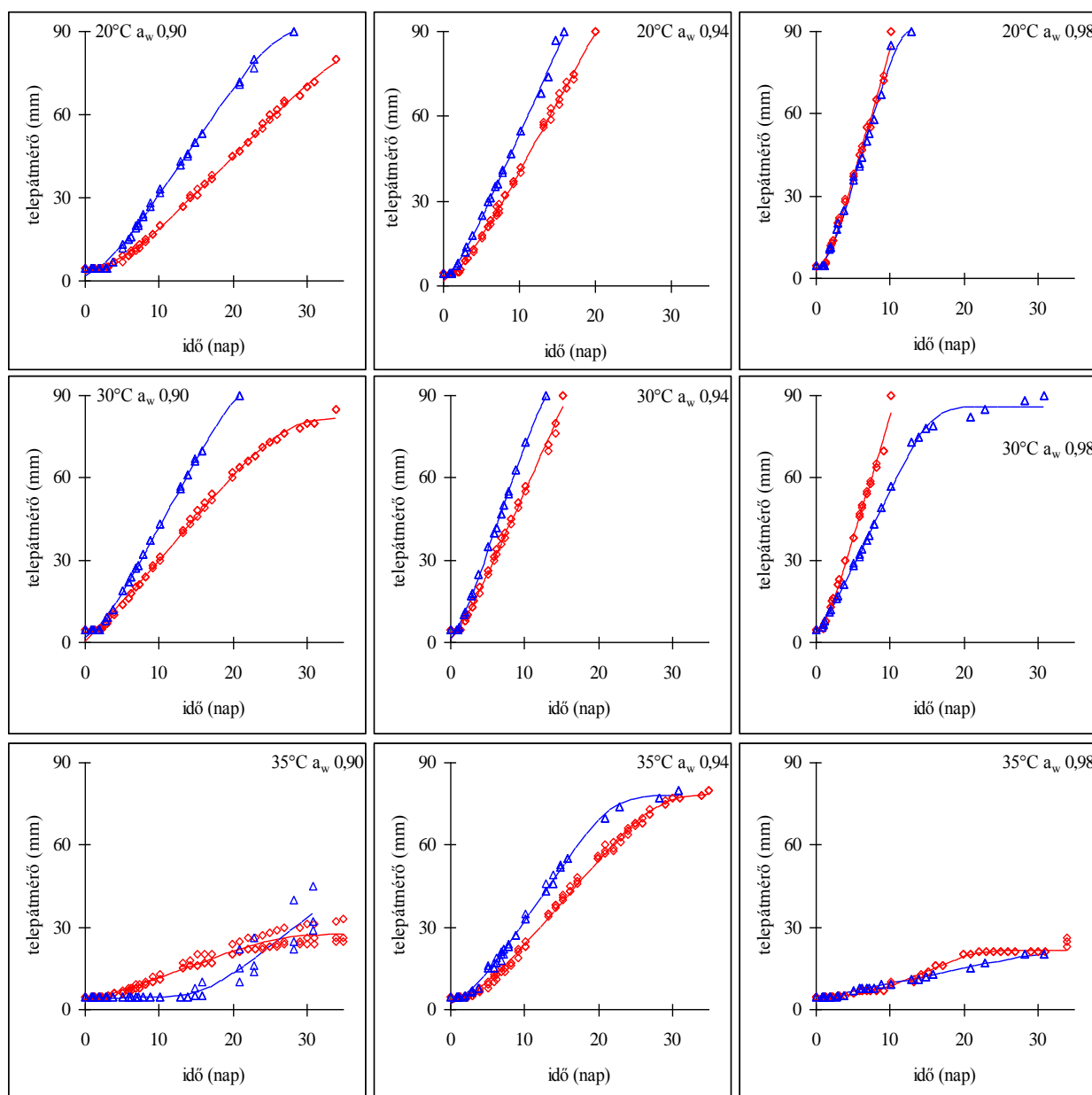
4.2.5 A *Penicillium expansum* növekedése almalé alapú táptalajon

A *Penicillium expansum* telepek növekedését 100%-os almaléből (Alley) készült táptalajon vizsgáltam három vízaktivitási (a_w 0,90; 0,94; 0,98) és három hőmérsékleti értéken (20°C, 30°C, 35°C). A 33. ábrán a_w 0,98 vízaktivitási értéken láthatók felvételek a telepek növekedéséről, a három különböző inkubációs hőmérsékleten.



33. ábra A *Penicillium expansum* telepek növekedése almalé alapú táptalajon, 20°C, 30°C és 35°C-on, a_w 0,98 vízaktivitási értéken

A 34. ábrán a maláta és az almalé alapú táptalajon mért telepátmérő adatokra növekedési görbét illesztettem.



34. ábra A *P. expansum* telepek növekedése maláta- (-△-) és almalé alapú táptalajon (-◇-)

Az esetek nagy részében maláta táptalajon jobban nőtt a *P. expansum* mint almalé alapú táptalajon. Az almalé alapú táptalaj készítése nem gyümölcs préselésével történt, hanem boltban vásárolt 100%-os almaléből (Alley). A gyártó cégtől (Rauch) bekértem a táptalaj készítésére használt almalé specifikációját. Ez alapján a késztermék savtartalma 5,3 g/l borkősavban kifejezve és 4,522 g/l citromsavban kifejezve.

Az eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy az almalé gyengébb/hiányosabb tápanyagforrás a *P. expansum* számára, mint a maláta. Mivel az *in vitro* kísérletben maláta táptalajon kapott adatok alapján ebben az esetben felülbecsülhetjük a penészgomba növekedés mértékét, ez kisebb kockázatot jelent a predikció során, mint az *A. niger* esetében. Az

eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy a maláta táptalajon kapott eredményeket validálni szükséges gyümölcs alapú táptalajokon is.

A kétféle gyümölcs alapú táptalaj közötti különbséget az adhatja, hogy a szőlőlé nagyszámú ásványi anyagot tartalmaz, gazdagabb tápanyagforrás, főleg nitrogén vegyületekben, azok közül is a könnyen hozzáférhető szabad aminosav és a biogén aminosav tartalmában, mint az alma. A biogén aminosavak közül a spermidin a sejtszaporodást kedvezően befolyásolja.

4.3 ComBase – mikológiai adatbázis

A prediktív mikrobiológia egyik alapvető eszköztárát az élelmiszerekben előforduló mikrobákra vonatkozó nagy adatbázisok alkotják, amelyek többnyire a romlást okozó és kórokozó baktériumok adott körülmények között mért növekedési és túlélési görbéit tartalmazzák.

A ComBase (Combined dataBase, <http://www.combase.cc/index.php/en/>) web-alapú rendszer adatbázisának fejlesztésében vettem részt, mely során a meglévő baktérium adatbázishoz hasonló penészgomba adatbázis elindításában dolgoztam. Egyelőre nem létezik olyan adatbázis, amely a penészgombák növekedési és/vagy mikotoxin termelési tulajdonságaival foglalkozna.

A ComBase-kompatibilis mikológiai adatbázis felépítésével célunk a penészgomba növekedés előrejelzése. Az adatbázis a penészgombák növekedésére fókuszál, különböző környezeti feltételek között. A bevitt adatok saját mérési eredményeinkből, publikált cikkekből, illetve kooperáló egyetemek és kutatóintézetek mérési eredményeiből származnak. A 35. ábrán az adatok feltöltéséhez használt háttér munkalap látható.

Records

key	organism	specification	source	details	b_f	meas_method	temp	aw	tObs	diam
Pe_019-1Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	25	0,98	14	1;0;2;0;1;3;0;6;4;7		
Pe_019-2Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	25	0,98	14	1;0;2;0;1;3;0;7;4;7		
Pe_019-3Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	25	0,98	12	1;0;1;0;1;0;1;0;1;0;1;0		
Pe_020-1Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	25	0,92	23	1;0;2;0;3;0;1;4;0;7		
Pe_020-2Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	25	0,92	23	1;0;2;0;3;0;4;0;4;6		
Pe_020-3Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	25	0,92	26	1;0;1;0;1;0;1;0;1;0;1;0		
Pe_021-1Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	15	0,98	31	1;0;2;0;3;0;4;0;1;5		
Pe_021-2Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	15	0,98	32	1;0;2;0;3;0;4;0;5;0		
Pe_021-3Pe	Strain(s): UdL-TA-3.80 Garcia_10a	d_04	Culture_medium	colony_diameter	15	0,98	32	1;0;1;0;1;0;1;0;1;0;1;0		

Master Sheet

An_diamPe_diamAn_tempPe_tempAc_diamB_FDetailsConditionMeas_methodPropertyMasterPlot

35. ábra A ComBase-kompatibilis mikológiai adatbázis háttér táblája

Az ún. Master munkalapon (35. ábra) nyilakkal jelöltem a fontosabb oszlopok neveit. A mikroba nevének rövidítése (organism), forrás (source), ahonnan az adatok származnak, hőmérséklet (temp), vízaktivitás (a_w), illetve telepátmérő (diam) adatok. Minden egyes sor egy növekedési görbét jelöl.

Az adatok bevitele precíz munkát igényel. Makrók segítségével, amelyekkel a szintaktikai hibákat is ki lehet szűrni, analizáltam a bevitt adatokat és ezután kerülnek feltöltésre a ComBase programba.

Az egyetemek, kutatóintézetek és az élelmiszeripar számára egy ilyen jellegű adatbázis értékes információ forrást jelent. Segítségével a közzétett adatok gyorsan és költségmentesen elérhetők, illetve precíz (kvantitatív és a további számításokhoz matematikai) alapokat szolgáltatnak további mikrobiológiai kutatásoknak. Cél, hogy a fölösleges, párhuzamos kísérletek számának minimalizálásával növeljük a kutatómunka hatékonyságát, javítva ugyanakkor az élelmiszerek biztonságát és minőségét az előrejelzésre alkalmas (prediktív) modellek tökéletesítésével. Az adatbázis bővítése folyamatosan zajlik.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS TÉZISEK

1. Az *Aspergillus niger* növekedés prediktív modellének hibaanalízise a kísérletek között jelentkező eltérések okait azonosította. Új fogalmak kerültek bevezetésre: (1) a *kísérleti variabilitás* (a párhuzamosok között jelentkező eltérés), amely analóg az ANOVA-ban használatos csoportokon belüli variabilitás (within groups) fogalommal; (2) a *környezeti variabilitás* (az ismétlések között jelentkező eltérés), amely analóg az ANOVA-ban használatos csoportok közötti (between groups) variabilitás fogalommal.
A kétféle variabilitás kvantifikálása szerint 5%, illetve 17% volt a kísérleti és a környezeti hozzájárulás a teljes variabilitáshoz. Ez azt jelenti, hogy egy újabb kísérlet során a növekedési ráta várhatóan kb. 20%-kal fog eltérni a megjósolttól (predikció).
2. Az *Aspergillus niger* növekedésének leírásához elsőként alkalmaztam egy olyan ún. kombinált másodlagos modellt, amely a környezeti változók minimum, optimum és maximum értékein alapuló ún. kardinális modell egy kvadratikus válaszfelület kombinációjából származtatható. A kombinált modell jobban alkalmazható predikcióra a növekedés határaihoz közel eső pontok esetében, mint a hibaanalízisre használt kvadratikus válaszfelület, amely csak interpolációra alkalmas. A parabola nyújtását biztosító konstans variálásával ($const_1$, $const_2$) lehetővé vált, hogy a válaszfelület aszimmetrikus legyen, ami jobban tükrözi az adatok trendjét.
3. Bemutattam, hogy a szőlőlé alapú táptalajon mért adatokból számolt növekedési ráták azonos tendenciát írnak le, mint a kombinált modell. Kedvezőtlen környezeti feltételek (elsősorban a növekedésre nézve minimum feltételek) között a szőlőlé alapú tápközeg jobban támogatja az *A. niger* növekedését, mint a maláta táptalaj. Az almaléből készült táptalaj viszont kevésbé támogatja a *P. expansum* növekedését, még optimális környezeti feltételek között is. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a modellek ellenőrzése/validálása természetes eredetű tápközegen is feltétlenül szükséges.
4. A ComBase prediktív mikrobiológiai adatbázis továbbfejlesztése során létrehozott adatbázis a penészgombák növekedésére fókuszál, különböző környezeti feltételek között. A ComBase mikológiai adatbázisának felépítése, Dr. Baranyi József témavezetőmmel végzett együttműködésben, ezen kísérlet adataival kezdődött el.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A minőségbiztosítás elengedhetetlenül szükséges a stabil és kiváló minőség fenntartásában és javításában. A modellek használata a mikrobiológiai minőség és biztonság biztosításához objektív segítséget nyújt, alkalmazásával részben előre „megjósolható” a termék biztonságos eltarthatósági ideje, illetve retrospektív módon megállapítható, hogy hol következhetett be hiba a tárolásban és a technológiában.

A munka folytatásaként fontosnak tartom a penészgomba növekedés 0,90 vízaktivitás alatti értékeken való vizsgálatát, hogy információnk legyen a növekedéshez szükséges minimális vízaktivitásról. Ezen adatok birtokában egy újabb modell, az ún. valószínűségi modell bevezetésére lenne szükség.

További terveink között szerepel a *Penicillium expansum* növekedésének előrejelzése a laboratóriumi eredmények és a kombinált modell segítségével.

A kísérletek arra is rámutatnak, hogy az *in vitro* maláta táptalajon kapott eredmények alapján felállított modell ellenőrzése szükséges természetes alapú tápközegen is, hogy ne becsüljük alá (vagy fölé) a kockázatot.

A 2007-2012 közötti időszakban a RASFF (gyorsriasztási) rendszerbe érkező bejelentések megoszlását tekintve a legtöbb bejelentés a mikotoxinokkal volt kapcsolatos. Nagyság szerinti sorrendben dióféle és olajos magvak, gyümölcs- és zöldségféle, takarmány alapanyag, fűszer és gyógynövény, gabona és pékáru, tej és tejtermék. A gabonafélék a magyar szántóterület kétharmadát foglalják el. Takarmánybiztonsági problémát a *Fusarium* fajok jelentik, amelyek a világon mindenütt permanens vagy időszakos járványokat okoznak. Legveszélyesebb mikotoxinok: aflatoxinok, ochratoxinok, *Fusarium* toxinok és patulin, ezért az ezeket termelő penészgombák vizsgálatát tartanám fontosnak különös tekintettel a globális és lokális klímaváltozásra.

Szükséges a ComBase mikológiai adatbázisának növelése mind mesterséges mind természetes növényi kivonatokból készült táptalajokon mért adatokkal a megbízható előrejelzés alkalmazása céljából. A ComBase adatbázist a mikotoxin-termelésre vonatkozó adatokkal ki kellene egészíteni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Miután a penészgombák növekedése és toxintermelése erősen függ az időjárástól (hőmérséklet, páratartalom), a fertőzöttség / szennyezettség mértéke évről évre változhat, továbbá jelentős lehet a regionális eltérés is. Az élelmiszertermelés mennyiségi gondjai mellett világszerte előtérbe kerül az élelmiszerek minőségének problémája, és stratégiai kérdésként fogalmazódik meg a biztonságos élelem, a jó minőségű élelmiszer iránti igény.

Hibaanalízist végeztünk annak érdekében, hogy a kísérletek között jelentkező eltérések okait azonosítsam. A penészgomba növekedés esetében a kísérleti variabilitás, tehát a párhuzamosok közötti különbség kb. 5%. Amennyiben a másodlagos modell a mért adatokra tökéletesen illeszkedik, kb. 17%-os pontossággal tudjuk a növekedési sebesség mérését megismételni adott hőmérséklet és vízáktivitás esetén. Várhatóan a növekedési ráta kb. 19-20%-kal fog eltérni a predikciótól egy újabb ismételten során.

A hibaanalízisnél használt kvadratikus modell lokális környezetben (az elvégzett kísérlet intervallumán belül) használható. A másik másodlagos modell, az ún. kombinált modell jobban alkalmazható predikcióra a növekedés határaihoz közel eső pontok esetében is. Az eredmények alátámasztották, hogy a disszertációban használt kombinált modell alkalmas megbízható predikció felállítására.

Gyümölcs alapú táptalajokat is használtam; *Penicillium expansum* esetében almalé alapú tápközeget, *Aspergillus niger* esetében pedig szőlőlé alapú táptalajt, a penészgombák növekedésének további jellemzésére.

A ComBase mikológiai adatbázisának létrehozásával cél, hogy a kutatómunkát hatékonyabbá tegyük az adatbázisban elérhető adatok segítségével, és az a gyakorlat számára is jól hasznosítható legyen.

Vizsgálati eredményeim megerősítették azt a feltételezést, hogy a nyári hőhullámok gyakoriságának és intenzitásának feltételezett várható növekedése az élelmiszerek fokozott mikológiai kockázatát idézheti elő a régiókban, nemcsak a most is elterjedt *Penicillium* fajok szaporodását stimulálva, hanem lehetőséget teremtve a melegkedvelő *Aspergillus* fajok fokozott megtelepedésének, illetve kertészeti terményeink és tárolt élelmiszereink velük való erőteljes szennyeződésének is. Az eredmények hozzájárulnak a toxinogén penészgombák növekedésének kvantitatív előrejelzésének lehetőségéhez a hőmérséklet és a vízáktivitás függvényében. Segítséget jelentenek a gyakorlatnak, továbbá a kockázatbecslés számára is hasznos információt nyújtanak.

SUMMARY

The extreme weather conditions have unwanted impact on our food security and food safety, particularly due to the increasing hazard caused by toxigenic moulds. The growth of filamentous fungi on food and feed plants, on the field and during storage is an important quality problem and may lead to significant economic losses and health risks.

A set of predictive models on the growth of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* as a function of temperature and water activity was developed and analysed.

The sources of the error were determined when the model is used for prediction. The experimental variability was quantified by the relative accuracy of measuring the colony growth rate. Its value was estimated as ca. 5% when colonies grew in parallel. The environmental variability was estimated by the accuracy (17%) of the averages of repeated growth experiments on the colony growth rates. This accuracy for a secondary model can be achieved only if it fits the grand-means of the repeats perfectly. This is less and less achievable as the studied region of the environmental variables increases. We can say that, in the region we focus on, an independent single measurement of the growth rate, which is carried out similarly as we did, will deviate from our prediction by ca. 19-20%.

The quadratic model used in error analysis is only valid in local environments, therefore a new, so-called combined secondary model has been developed. It combined the quadratic response surface model of GIBSON and co-workers (1994) and the cardinal values model of ROSSO and co-workers (1993). The new model proved to be suitable to capture the observed dependence of cardinal values of one environmental variable on the other. Besides, by the application of the new model, the predictions could be extended towards the growth limits of the mould. The results demonstrated that the combined model elaborated here is suitable for reliable prediction on the medium used for the experiments.

Model food substrates: grape juice (prepared in the lab) and apple juice (commercial) media were inoculated with conidia of *A. niger* and *P. expansum*, respectively, to get more information about mould growth. Comparative analysis was carried out to study the effect of the different media on mould growth.

A Combase-compatible new database has been developed for mould growth under various environmental conditions. The objective is to provide an electronic repository that can help to increase the efficiency of research in predictive microbiology and its application.

The results demonstrated that *Aspergillus niger* has significantly higher temperature requirement than *Penicillium expansum*. Therefore, the projected increase of environmental temperature, particularly the increasing frequency and duration of heat-wave periods may cause an elevated

risk of compromising mycological food safety by stimulating the growth of the presently common *Penicillium* species and creating better opportunity for growth and toxin formation of the rather thermophilic aspergilli that will contaminate more intensively our fresh produce in the field and cause problems also during storage.

These results contribute to the prediction of mould growth as a function of temperature and water activity. They can be utilized in risk assessment procedures as well.

- ABARCA M.L., BRAGULAT M.R., GASTELLA G., CABANES F.J. (1994): Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 2650-2652. p.
- ALBORCH L., BRAGULAT M.R., ABARCA M.L., GABANES F.J. (2011): Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. *International Journal of Food Microbiology*, 147 53-57. p.
- BAERT K., DEVLIEGHERE F., FLYPS H., OOSTERLINCK M., AHMED M.M., RAJKOVIC A., VERLINDEN B., NICOLAI B., DEBEVERE J., DE MEULENAER B. (2007a): Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119 170-181. p.
- BAERT K., VALERO A., DE MEULENAER B., SAMAPUNDO S., AHMED M.M., BO L., DEBEVERE J., DEVLIEGHERE F. (2007b): Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 118 (2) 139-150. p.
- BARANYI J., ROBERTS T.A. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23 277-294. p.
- BARANYI J., PIN C., ROSS T. (1999): Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, 48 159-166. p.
- BARANYI J., TAMPLIN M. (2004): ComBase: A common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection*, 67 (9) 1967-1971. p.
- BARANYI J., CSERNUS O., BECZNER J. (2014): Error analysis in predictive modelling demonstrated on mould data. *International Journal of Food Microbiology*, 170 78-82. p.
- BARKAI-GOLAN R. (2008a): *Penicillium* mycotoxins. 153-185. p. In: BARKAI-GOLAN R., PASTER N. (Szerk.): *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Academic Press, 395 p.
- BARKAI-GOLAN R. (2008b): *Aspergillus* mycotoxins. 115-153. p. In: BARKAI-GOLAN R., PASTER N. (Szerk.): *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Academic Press, 395 p.
- BELLÍ N., MARÍN S., SANCHIS V., RAMOS A.J. (2004): Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 96 19-27. p.
- CSERNUS O., ANDRÁSSY É., BATA-VIDÁCS I., BECZNER J., FARKAS J. (2011): *Penicillium expansum* és *Aspergillus niger* növekedési hőmérséklet- és vízaktivitás-függésének

vizsgálata, különös tekintettel a klímaváltozásra. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 57 209-218. p.

CSERNUS O., BATA-VIDÁCS I., FARKAS J., BECZNER J. (2013): Effects of environmental conditions on growth of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 42 (4) 640-648. p.

DANTIGNY P. (2004): Predictive Mycology. 313-321. p. In: MCKELLAR R.C., LU X. (Szerk.): *Modeling microbial responses in food*. CRC Press, Boca Raton, 343 p.

DANTIGNY P., GUILMART A., BENSOUSSAN M. (2005): Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100 187-196. p.

DEÁK T. (2006): *Élelmiszermikrobiológia*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 382 p.

DOBOLYI CS., SEBŐK F., VARGA J., KOCSUBÉ S., SZIGETI G., BARANYI N., SZÉCSI Á., TÓTH B., VARGA M., KRISZT B., SZOBOSZLAY S., KRIFATON C., KUKOLYA J. (2013): Occurrence of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* isolates in maize kernel in Hungary. *Acta Alimentaria*, 42 (3) 451-459. p.

FAO (2001): Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) Rome, Italy FAO *Food and Nutrition Paper*, 74 281-415. p.

FARKAS J., BECZNER J. (2009): A klímaváltozás és a globális felmelegedés várható hatása a mikológiai élelmiszerbiztonságra. *Klíma-21 Füzetek*, 56 3-17. p.

FARKAS J., BECZNER J. (2010): A klímaváltozás lehetséges hatásai az élelmiszerbiztonságra. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 56 (4) 219-230. p.

GARCIA D., RAMOS A.J., SANCHIS V., MARIN S. (2009): Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology*, 26 (8) 757-769. p.

GARCIA D., RAMOS A.J., SANCHIS V., MARÍN S. (2010): Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. *Food Microbiology*, 27 909-917. p.

GARCIA D., RAMOS A.J., SANCHIS V., MARÍN S. (2011): Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Microbiology*, 28 406-417. p.

GIBSON A.M., BARANYI J., PITT J.I., EYLES M.J. (1994): Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23 419-431. p.

GIBSON A.M., HOCKING A.D. (1997): Advances in the predictive modelling of fungal growth in food, Review. *Trends in Food Science & Technology*, 8 353-358. p.

- GOUGOULI M., KOUTSOUMANIS K.P. (2010): Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 140 (2-3) 254-262. p.
- GYÖRFI J. (2010): Gombabiológia, gombatermesztés. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 350 p.
- HOLMQUIST G.U., WALKER H.H., STAHR H.M. (1983): Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48 778-782. p.
- JAKUCS E. (2009): A mikológia alapjai. Budapest: Elte Eötvös Kiadó, 225 p.
- JAKUCS E., VAJNA L. (Szerk.) (2003): Mikológia. Budapest: Agroinform Kiadó, 477 p.
- JUDET-CORREIA D., BOLLAERT S., DUQUENNE A., CHARPENTIER C., BENSOUSSAN M., DANTIGNY P. (2010): Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 142 106-113. p.
- KLICH M.A. (2002): Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 111 p.
- KOVÁCS F. (Szerk.) (1998): Mikotoxinok a táplálékláncban. Budapest: Agroinform Kiadó, 160 p.
- KOVÁCS F. (Szerk.) (2001): Penészgombák – mikotoxinok a táplálékláncban. Budapest: Agroinform Kiadó, 212 p.
- KOVÁCS M. (Szerk.) (2010): Aktualitások a mikotoxin kutatásban. Budapest: Agroinform Kiadó, 156 p.
- LAHLALI R., SERRHINI M.N., JIJAKLI M.H. (2005): Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 103 315-322. p.
- LEONG S.L., HOCKING A.D., SCOTT E.S. (2006): Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 110 209-216. p.
- MARÍN S., SANCHIS V., SÁENZ R., RAMOS A.J., VINAS I., MAGAN N. (1998): Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 84 25-36. p.
- MOSS M.O. (1987): Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. 37-71. p. In: PEBERDY J.F. (Szerk.): *Penicillium* and *Acremonium*. New York: Plenum Press, 634 p.

- NORTHOLT M.D., VAN EGMOND H.P., PAULSCH W.E. (1979): Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, 42 485-490. p.
- NORTHOLT M.D., FRISVAD J.C., SAMSON R.A. (1996): Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. 243-250. p. In: SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., FILTENBORG O. (Szerk.): Introduction to food-borne fungi. 5th edition Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor schimmelcultures.
- PARRA R., MAGAN N. (2004): Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *Journal of Applied Microbiology*, 97 429-438. p.
- PITT J.I., HOCKING A.D. (1997a): *Aspergillus* and related teleomorphs. 339-417. p. In: *Fungi and food spoilage*. Cambridge: Great Britain at the University Press, 593 p.
- PITT J.I., HOCKING A.D. (1997b): *Penicillium* and related genera. 203-339. p. In: *Fungi and food spoilage*. Cambridge: Great Britain at the University Press, 593 p.
- ROSSO L., LOBRY J.R., FLANDROIS J.P. (1993): An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology*, 162 (4) 447-463. p.
- RUSSEL R., PATERSON A.J., LIMA N. (2010): How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43 (7) 1902-1914. p.
- SAMSON R.A., van REENEN-HOEKSTR E.S. (1988): Identification of the common food-borne fungi. 3-219. p. In: SAMSON R.A., van REENEN-HOEKSTR E.S. (Szerk.): Introduction to food-borne fungi. CBS, 299 p.
- TACZMANNÉ BRÜCKNER A. (2005): Gyümölcsök és zöldségek romlását okozó *Penicillium expansum* gátlása élesztőgombákkal. Doktori értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, 113 p.
- TACZMAN-BRÜCKNER A., MOHÁCSI-FARKAS CS., BALLA CS., KISKÓ G. (2005): Comparison of biocontrol activity of *Kluyveromyces lactis* with other yeast strains against *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 34 (1) 71-80. p.
- UBRIZSY G., VÖRÖS J. (1968): Mezőgazdasági mykológia. Budapest: Akadémia Kiadó, 576 p.
- VARGA J., KISS R., MÁTRAI T., TÉREN J. (2005a): Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. *Acta Alimentaria*, 34 (4) 381-392. p.
- VARGA J., TÓTH B., TÉREN J. (2005b): Mycotoxin producing fungi and mycotoxins in foods in Hungary in the period 1994-2002. Review. *Acta Alimentaria*, 34 (3) 267-275. p.

VARGA J., KOCSUBÉ S., SZIGETI GY., MAN V., TÓTH B., VÁGVÖLGYI CS., BARTÓK, T. (2012): Black aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Alimentaria*, 41 (4) 414-423. p.

VETTER J. (1992): Az általános mikológia alapjai. Budapest: Kézirat Tankönyvkiadó, 211 p.

ZWIETERING M.H., DE WIT J.C., NOTERMANS S. (1996): Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 30 55-70. p.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet egykori igazgatójának, dr. Bánáti Dianának, valamint a Mikrobiológiai Osztály egykori vezetőjének, dr. Beczner Juditnak, hogy lehetőséget biztosítottak kísérleteim elvégzésére.

Köszönöm két témavezetőmnek – dr. Beczner Juditnak és dr. Baranyi Józsefnek – valamint konzulensemnek, dr. Farkas Józsefnek, hogy mind emberileg, mind szakmailag támogattak. A velük való megbeszélések irányadóak voltak, sokszor mutattak rá újabb és újabb lehetőségekre munkámmal kapcsolatban, lendületet és kedvet adtak a folytatáshoz.

Továbbá köszönöm a Mikrobiológiai Osztály munkatársainak, köztük Andrásy Évának és Batáné dr. Vidács Ildikónak a szakmai segítséget.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom férjemnek és családomnak, azért hogy mindvégig megfelelő háttérrel biztosítottak, bíztattak, vagy egyszerűen meghallgattak.