**Η ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΤΗΤΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ *ASPERGILLUS CARBONARIUS, PENICILLIUM VERRUCOSUM* ΚΑΙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Σ. Παναγουλάκου1, Π. Τρυφινοπούλου1, Α. Μαλλούχος2, Ε.Ζ. Πανάγου1,\***

1 Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855

2 Εργαστήριο Χημείας & Ανάλυσης Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 11855

*\** [*stathispanagou@aua.gr*](mailto:stathispanagou@aua.gr)

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Οι μύκητες παράγουν πτητικές οργανικές ενώσεις κατά τον μεταβολισμό τους που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και ταυτοποίησή τους [1]. Το πτητικό προφίλ των μυκήτων μπορεί να προσδιοριστεί μέσω ενόργανης ανάλυσης και να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό συγκεκριμένων πτητικών ουσιών, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτες για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό μεταξύ τους. Στο πλαίσιο αυτό, αξιολογήθηκε η χρήση των πτητικών ενώσεων για τον διαχωρισμό των ωχρατοξινογενών μυκήτων *Aspergillus carbonarius* και *Penicillium verrucosum* και της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* που απομονώθηκαν από επιτραπέζια σταφύλια και κρασί, αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν *in vitro* ως μονοκαλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα Czapek Yeast Agar (CYA) και επωάστηκαν σε θερμοκρασία 25°C για 7 ημέρες. Η παραλαβή των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) σε χρονικά διαστήματα 3, 5 και 7 ημερών. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση χωρίς επίβλεψη (ανάλυση κυρίων συνιστωσών, PCA) αλλά και με επίβλεψη (διακριτική ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS-DA) με τη χρήση του λογισμικού Metaboanalyst ([www.metaboanalyst.com](http://www.metaboanalyst.com)), για τον διαχωρισμό των μικροοργανισμών με βάση το προφίλ των πτητικών ενώσεων. Η επιλογή των βιοδεικτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των τιμών VIP από το μοντέλο PLS-DA [2]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάλυση PCA μπόρεσε να διαχωρίσει αποτελεσματικά τους μικροοργανισμούς με βάση το προφίλ των πτητικών ουσιών. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε παραιτέρω από την ανάλυση PLS-DA. Το πτητικό προφίλ της ζύμης *S. cerevisiae* παρουσίασε μεγαλύτερη ποικιλομορφία συγκριτικά με τους δύο μύκητες. Με βάση τις τιμές του δείκτη VIP, 13 πτητικές ενώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό της ζύμης *S. cerevisiae,* μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται 8 εστέρες (προπανοϊκός αιθυλεστέρας, 2-μεθυλοπροπανοϊκός αιθυλεστέρας, οξικός 3-μεθυλοβουτυλεστέρας, οξικός 2-μεθυλοπροπυλεστέρας, βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, δεκανοϊκός αιθυλεστέρας, εξανοϊκός αιθυλεστέρας) και 5 οργανικά οξέα (2-μεθυλοβουτανοϊκό οξύ, 3-μεθυλοβουτανοϊκό οξύ, βουτανοϊκό οξύ, 2-μεθυλοπροπανοϊκό οξύ, οξικό οξύ). Δύο πτητικές ενώσεις παρουσίασαν υψηλή συσχέτιση με το μύκητα *P. verrucosum* (δεκάνιο, πεντανοϊκός αιθυλεστέρας) και τρεις με τον μύκητα *A. carbonarius* (2-βουτανόνη, cis-θουγιοψένιο, 3- μεθυλοφουράνιο).

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** *Aspergillus carbonarius, Penicillium verrucosum, Saccharomyces cerevisiae,* GC-MS, volatilome

**ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

[1] Schnürer, J., Olsson, J., & Börjesson, T. (1999). *Fungal Genet. Biol.* 27: 209-217.

[2] Chong, I.G., & Jun, C.H. (2015). *Chemometr. Intell. Lab.* 78: 103-112.

**THE USE OF VOLATILE METABOLIC FINGERPRINTs IN TANDEM WITH CHEMOMETRIC ANALYSIS FOR THE DISCRIMINATION OF THE FUNGI *Aspegillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum* and *Saccharomyces cerevisiae***

**S. Panagoulakou1, P. Tryfinopoulou1, A. Mallouchos2, E.Z. Panagou1,\***

1 Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Human Nutrition, School of Food and Nutritional Sciences, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, Greece, GR-11855

2 Laboratory of Food Chemistry & Analysis, Department of Food Science and Human Nutrition, School of Food and Nutritional Sciences, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, Greece, GR-11855

*\** [*stathispanagou@aua.gr*](mailto:stathispanagou@aua.gr)

**ABSTRACT**

Fungi produce volatile organic compounds (VOCs) during primary and secondary metabolism that could be used for detection and identification [1]. The volatile pattern of fungi during growth, known as volatilome, could be mapped by analytical instruments (e.g., GC-MS) and employed for the determination of specific volatile compounds that could be used as biomarkers for identification and discrimination of fungal species. The purpose of the present work was to assess the potential use of qualitative volatile patterns to discriminate between two OTA producing filamentous fungi, namely *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium verrucosum* and the yeast species *Saccharomyces cerevisiae*, isolated from grapes and wine, respectively. The profile of VOCs was identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The microorganisms were grown as mono cultures in 20 mL headspace vials containing Czapek Yeast agar medium (CYA), incubated for 7 days at 25℃. The volatile compounds were extracted at days 3, 5, and 7 by headspace Solid Phase Microextraction at 35 °C for 30 min. Data were initially log transformed and normalized by Pareto scaling to reduce the impact of artifacts and noise and subjected to unsupervised (principal components analysis, PCA) and supervised (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) chemometric analysis using Mataboanalyst ([www.metaboanalyst.com](http://www.metaboanalyst.com)) to compare VOCs profiles. Potential biomarkers were selected from VIP scores generated from the PLS-DA model [2]. Results showed that PCA could provide a clear discrimination among the three microorganisms based on their VOCs profile. The outcome of PCA was further confirmed by PLS-DA analysis. The volatile profile of *S. cerevisiae* was richer compared to the other two filamentous fungi. According to the VIP scores, 13 compounds were found to be significant for *S. cerevisiae* differentiation, including 8 esters (ethyl propanoate, ethyl 2-methylpropanoate,3-methylbutyl acetate, isobutyl acetate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate)and 5 organic acids (acetic acid, butanoic acid, 2-methylbutanoic acid, 3-methylbutanoic acid, 2-methylpropanoic acid). Two volatile compounds were found to be highly correlated with *P. verrucosum* (decane, ethyl pentanoate), while three volatile compounds were highly correlated with *A. carbonarius* (2-butanone; cis-thujopsene; 3-methylfuran).

**KEYWORDS:** *Aspergillus carbonarius, Penicillium verrucosum, Saccharomyces cerevisiae,* GC-MS, volatilome

**REFERENCES**

[1] Schnürer, J., Olsson, J., & Börjesson, T. (1999). *Fungal Genet. Biol.* 27: 209-217.

[2] Chong, I.G., & Jun, C.H. (2015). *Chemometr. Intell. Lab.* 78: 103-112.