

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ

Πτυχιακή εργασία
του σπουδαστή Αθανασόπουλου Περικλή

Καλαμάτα, Ιούνιος 2006

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗΣ Α ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ

Πτυχιακή εργασία
του σπουδαστή Αθανασόπουλου Περικλή

Επιβλέποντες Καθηγητές : Δρ. Σπηλιόπουλος Ιωακείμ
Καραγγελής Γεώργιος

Καλαμάτα, Ιούνιος 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ	
1.1. Ωχρατοξίνες.....σελ. 1	σελ. 1
1.2. <i>Aspergillus</i>σελ. 2	σελ. 2
1.2.1. Περί ταυτοποίησης και ταξινόμησης του γένους <i>Aspergillus</i>σελ. 3	σελ. 3
1.2.1.1. Ταυτοποίηση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά.....σελ. 5	σελ. 5
1.2.1.2. Οι μαύροι <i>Aspergilli</i>σελ. 5	σελ. 5
1.2.1.2.1. Μαύροι <i>Aspergilli</i> και ασφάλεια.....σελ. 6	σελ. 6
2. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝσελ. 8	σελ. 8
2.1. Πρόληψη – HACCP ¹σελ. 8	σελ. 8
2.1.1. Μικροβιακός ανταγωνισμός ως προληπτικό μέτρο.....σελ. 9	σελ. 9
2.2. Απομίανση/ Αποτοξικοποίηση.....σελ. 10	σελ. 10
2.2.1. Φυσικές μέθοδοι.....σελ. 10	σελ. 10
2.2.2. Χημικές μέθοδοι.....σελ. 12	σελ. 12
2.2.3. Βιολογικές μέθοδοι.....σελ. 12	σελ. 12
2.3. Απομάκρυνση και καταστροφή της ΟΤΑ.....σελ. 13	σελ. 13
3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΙΝΔΥΝΕΥΣΗΣ² (RISK ANALYSIS)σελ. 14	σελ. 14
3.1. Αποτίμηση διακινδύνευσης (Risk assessment).....σελ. 14	σελ. 14
Τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, δευτερογενείς πηγές.	
3.1.1. Ταυτοποίηση κινδύνου (Hazard identification).....σελ. 17	σελ. 17
3.1.2. Χαρακτηρισμός κινδύνου (Hazard characterization).....σελ. 17	σελ. 17
3.1.3. Αποτίμηση έκθεσης (Exposure assessment).....σελ. 18	σελ. 18
3.1.4. Χαρακτηρισμός διακινδύνευσης (Risk characterization).....σελ. 18	σελ. 18
3.2. Διαχείριση διακινδύνευσης (Risk management).....σελ. 19	σελ. 19
3.3. Επικοινωνία διακινδύνευσης (Risk communication).....σελ. 19	σελ. 19
4. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑσελ. 20	σελ. 20
4.1. Νομοθεσία στην Ε.Ε.....σελ. 24	σελ. 24
5. ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Ασελ. 27	σελ. 27
5.1. Συμπεράσματα JECFA 2002.....σελ. 33	σελ. 33
6. ΜΥΚΗΤΟΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝσελ. 37	σελ. 37
7. ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ, ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΚΑΙ ΟΙΝΟΣσελ. 40	σελ. 40

¹ Με έμφαση στην ΟΤΑ.

² Η λέξη «Διακινδύνευση» προτιμήθηκε έναντι της λέξης «επικινδυνότητα», η οποία συνήθως χρησιμοποιείται για να αποδώσει το νόημα της αγγλικής λέξης "Risk", και ο λόγος αυτής της προτίμησης είναι ο εξής:

Οι μυκοτοξίνες, ως παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν αρνητικά συμπτώματα στην υγεία, χαρακτηρίζονται ως κίνδυνοι (Hazards), επομένως η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μυκοτοξίνες θεωρείται επικίνδυνη (πράξη που ενέχει κίνδυνο). Αυτός που τίθεται σε μια επικίνδυνη κατάσταση αφείλουμε να πούμε ότι διακινδυνεύει και αυτό ακριβώς συνοψίζεται στην λέξη risk : Την "διέλευση" των καταναλωτών από μια επικίνδυνη κατάσταση.

8.	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΤΑ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ.....σελ.	43
9.	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΒΛΕΨΕΙΣ.....σελ.	55
9.1.	Συμπεράσματα.....σελ.	55
9.2.	Σύγκριση επιπέδων μίανσης συμβατικών και βιολογικών προϊόντων.....σελ.	60
10.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....σελ.	62
10.1.	Φάσεις εργασίας.....σελ.	62
10.2.	Υλικά- Μέθοδοι.....σελ.	63
10.3.	Σχεδιασμός της πειραματικής οινοποίησης.....σελ.	67
10.4.	Αποτελέσματα- Σχόλια.....σελ.	68
	ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....σελ.	73

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

- I. Πίνακες εργαστηριακού μέρους
- II. Γραφήματα εργαστηριακού μέρους
- III. Εικόνες εργαστηριακού μέρους

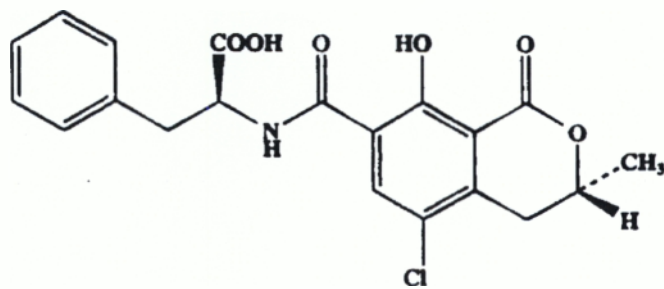
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ

1.1. Ωχρατοξίνες.

Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) αποτελεί το μέλος αυτής της ομάδας μυκοτοξινών με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Η ωχρατοξίνη Β διαφέρει δομικά από την Α μόνο με την απουσία του Cl από το μόριό της και είναι πολύ λιγότερο τοξική από την Α λόγω της ταχείας βιομετατροπής της [8]. Άλλα συγγενή



Εικόνα 1: Ωχρατοξίνη Α.

μόρια περιλαμβάνουν την ωχρατοξίνη C, την ωχρατοξίνη α και την ωχρατοξίνη β.

Η ΟΤΑ είναι μια άχρωμη κρυσταλλική ένωση που εκπέμπει μπλε φθορισμό υπό υπεριώδης ακτινοβολία. Μπορεί να συντηρηθεί σε αιθανόλη για τουλάχιστον ένα έτος υπό ψύξη και προστατευμένη από το φως. Η ΟΤΑ είναι ένα σχετικά σταθερό μόριο το οποίο επιβιώνει, έως ένα βαθμό, στις περισσότερες επεξεργασίες που υπόκεινται τα τρόφιμα (βρασμός, ψήσιμο, καβούρδισμα, ζύμωση) σε βαθμό που εξαρτάται από άλλους παράγοντες όπως pH, θερμοκρασία και την παρουσία άλλων συστατικών. Εντός βιολογικών συστημάτων προσδένεται στην αλβουμίνη του ορού. Λόγο της εμμονής της στην τροφική αλυσίδα οι τρέχουσες έρευνες επικεντρώνονται στην αποτροπή της παραγωγής της και αναπτύσσονται προσεγγίσεις τύπου HACCP για να εφαρμοστούν σ' ένα σύνολο εμπορικών διεργασιών.

Η ανάλυση των προϊόντων για ΟΤΑ γίνεται όπως και για τις αφλατοξίνες μόνο που η ευαισθησία ανίχνευσης με TLC μπορεί να μην είναι ικανοποιητική για τον καθορισμό της ΟΤΑ στα ζητούμενα χαμηλά επίπεδα που σήμερα πλέον ισχύουν σε αρκετές χώρες.

Μια ασθένεια που προκαλεί εξασθένηση στον άνθρωπο, γνωστή ως Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια (Balkan Endemic Nephropathy, BEN), (η επιδημιολογία της οποίας αποτελεί ακόμα μυστήριο), μπορεί να συσχετιστεί με την παρουσία χαμηλών επιπέδων νεφροτοξικών μυκοτοξινών, όπως είναι η ΟΤΑ, στην διατροφή ανθρώπων που κατά παράδοση καταναλώνουν χοιρινό κρέας το οποίο ωριμάζει με μύκητες για μεγάλες χρονικές περιόδους. Το γεγονός ότι η ΟΤΑ ανιχνεύεται στον ορό του αίματος των ασθενών της BEN σε συγκεντρώσεις 10 φορές υψηλότερες απ' αυτές των υπόλοιπων ανθρώπων υποδεικνύει ότι η ΟΤΑ μπορεί να διαδραματίζει ένα ρόλο σ' αυτήν την ασθένεια [31].

Η περίπτωση της ΟΤΑ αναλύεται σε ξεχωριστά κεφάλαια λεπτομερέστερα.

1.2. *Aspergillus*.

Στο γένος των *Aspergilli* υπάρχουν περίπου 150 ταυτοποιημένα είδη. Αν και η πλειοψηφία των *Aspergilli* είναι σαπροφυτικοί, μερικοί είναι παρασιτικοί σε έντομα, φυτά και ζώα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (*A. fumiganti*). Μερικά είδη έχουν οικονομική σημασία στην παρασκευή ζυμωμένων τροφίμων και στην παραγωγή ενζύμων. Ο *A. niger* χρησιμοποιείται εκτενώς στην βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή διαφόρων ενζύμων και οργανικών οξέων (π.χ. κιτρικό οξύ) και αποτελεί ένα από τα λιγιστά είδη μυκήτων που έχει το status GRAS από το US FDA [55]. Εφόσον τα τελευταία χρόνια βρέθηκε ότι μερικά από τα στελέχη του είναι ικανά να παράγουν ΟΤΑ θα πρέπει να γίνει προσεκτική επιλογή των στελεχών που χρησιμοποιούνται για βιομηχανική χρήση.

Μερικά είδη αυτού του γένους παράγουν ισχυρές τοξίνες.

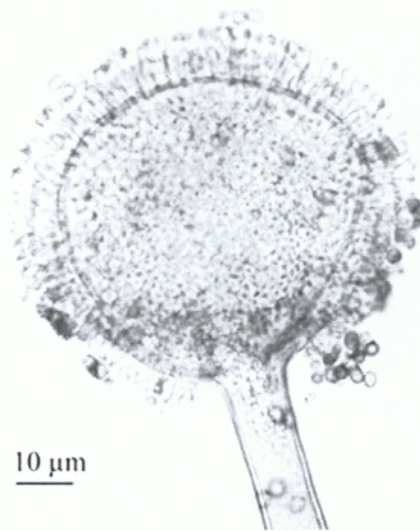
Το γένος αυτό χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αγενών σπορίων, αποκαλούμενα κονίδια, πάνω σε μια εξειδικευμένη κατασκευή, χαρακτηριστική του γένους, καλούμενη *aspergillum*¹.

Το *aspergillum* αποτελείται από το διογκωμένο ακραίο τμήμα της καρποφορίας, καλούμενο **κύστη** (*vesicle*) και από τα εξειδικευμένα αναπαραγωγικά κύτταρα που φέρει. Το απλούστερο *aspergillum* αποτελείται από μια διογκωμένη κύστη της οποίας τουλάχιστον ένα μέρος είναι καλυμμένο με ένα περίφραγμα επιμηκών κυττάρων, καλούμενα **φιαλίδια** (*phialides*), τα οποία φέρουν τα κονίδια. Αυτό το *aspergillum* ονομάζεται uniseriate. Ένα ελαφρώς πιο πολύπλοκο *aspergillum*, καλούμενο biseriate, έχει ένα δεύτερο περίφραγμα κυττάρων, καλούμενο **metulae**, που βρίσκεται μεταξύ της επιφάνειας της κύστης και των φιαλιδίων. Τα φιαλίδια ή το *metulae* σχηματίζονται στην επιφάνεια της κύστης. Η κύστη γεννιέται πάνω σ' έναν μακρύ **stipe** (στύλο). Το *stipe* είναι συνήθως χωρίς *septa* και το άκρο της βάσης κυρτώνει ή σχηματίζει ένα «T» το οποίο ενώνει την βλαστητική υφή. Αυτό το τμήμα της βάσης αναφέρεται ως “**foot cell**” αν και στην πραγματικότητα είναι μέρος του κυττάρου που αποτελεί το *stipe*. Η όλη κατασκευή, που περιλαμβάνει το *aspergillum*, το *stipe* και το *foot cell*, καλείται **κονιδιοφόρος** (*conidiophore*).

¹ Είναι λατινική λέξη και έτσι καλείται η διάτρητη σφαίρα που περιέχει ένα σφουγγάρι και χρησιμοποιείται για τον ψεκασμό του αγιασμού στους καθολικούς. Πληθυντικός: *aspergilla*.



Εικόνα 2:Κονιδιοφόρος uniseriate



Εικόνα 3:Εικόνα κονιδιοφόρου από μικροσκόπιο.



Εικόνα 4:Κονιδιοφόρος biseriate.

Μερικά είδη του *Aspergillus* αναπαράγονται επιπλέον και με τον σχηματισμό σκληρωτίων. Αυτές οι αγενώς σχηματιζόμενες συμπαγής μάζες σφιχτοσυσκευασμένων κυττάρων είναι συχνά ορατές χωρίς την βοήθεια μικροσκοπίου.

Κάποια είδη αυτού το γένους αναπαράγονται και εγγενώς. Αυτά τα τελειομορφικά στάδια χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό ασκών που περιέχουν, ακανόνιστα διατεταγμένα, ασκοσπόρια εντός του ασκοκαρπίου, το οποίο συνήθως είναι κλειστοθήκιο. Οι ασκοί διαλύονται με την ηλικία αφήνοντας ώριμα ασκοσπόρια εντός του ασκοκαρπίου.

1.2.1. Περί ταυτοποίησης και ταξινόμησης του γένους *Aspergillus*.

Ο σημαντικότερος οδηγός για την ταξινόμηση αυτού του γένους παραμένει το “The genus of *Aspergillus*” από τους Raper & Fennell (1965). Από τότε έχουν επέλθει αλλαγές στην ταξινόμηση των *Aspergilli* σύμφωνα με τις οποίες το γένος αυτό διαιρείται σε **6 υπογένη** καθ’ ένα εκ των οποίων περιλαμβάνει έναν ή περισσότερους **Τομείς** (Sections). Οι Τομείς αντιστοιχούν στις Ομάδες (Groups) του συστήματος Raper & Fennell. Αυτή η αλλαγή ήταν απαραίτητη επειδή ο όρος Ομάδα δεν έχει κανένα nomenclatorial status στον κώδικα.

Έχει βρεθεί ότι οι παραγωγοί ΟΤΑ ανήκουν στο υπογένος *Circumdati* και συγκεκριμένα κυρίως σε δύο τομείς του: Τον τομέα *Circumdati* και τον τομέα *Nigri* (ή αλλιώς μαύροι *aspergilli*, παλιότερα γνωστή ως Ομάδα *A. niger*). Ωστόσο έχουν αναφερθεί και παραγωγοί που

ανήκουν σε άλλους τομείς [46]². Παραδείγματα ειδών που ανήκουν σ' αυτούς τους δύο τομείς παρατίθενται στον πίνακα 6.

Πίνακας 1: Μέλη των τομέων Circumdati και Nigri [13].

Aspergillus Subgenus Circumdati	
Τομέας Circumdati	Τομέας Nigri (μαύροι Aspergilli)
<i>A. alliaceus</i>	<i>A. carbonarius</i>
<i>A. auricomus</i>	<i>A. foetidus</i>
<i>A. ochraceus</i> ³	<i>A. japonicus</i> Saito var. <i>aculeatus</i>
<i>A. ostianus</i>	<i>A. japonicus</i> Saito var. <i>japonicus</i>
<i>A. sclerotiorum</i>	<i>A. niger</i> van Tieghem var. <i>awamori</i>
<i>A. sulphureus</i>	<i>A. niger</i> van Tieghem var. <i>niger</i>
<i>A. melleus</i>	<i>A. tubingensis</i>
<i>A. albertensis</i>	<i>A. phoenicis</i>
<i>A. petrakii</i>	<i>A. brasiliensis</i> ⁴

Θεωρείται ότι οι παραγωγοί ΟΤΑ που ανήκουν στον τομέα Circumdati είναι ισχυροί παραγωγοί (π.χ. *A. alliaceus* και *A. ochraceus*), ενώ αυτοί που ανήκουν στον τομέα Nigri, θεωρείται ότι έχουν μικρό ωχρατοξινοπαραγωγικό δυναμικό. Σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι υπάρχουν ΟΤΑ-παραγωγικά είδη στο γένος των Aspergilli που δεν ανήκουν στο γένος Circumdati.

Καλό θα ήταν να αναφερθεί ότι στους μαύρους aspergilli εντάσσονται και δύο άλλα είδη, ο *A. heteromorphus* και ο *A. ellipticus*, τα οποία όμως είναι πάρα πολύ σπάνια και ταυτοποιούνται με πολύ μεγάλη δυσκολία.

Μια σημαντική πτυχή των μαύρων aspergilli είναι ότι παράγουν ένα ευρύ φάσμα endo- και exo- ενζύμων⁵ που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πολυσακχαριδίων των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων [66].

² Π.χ. στον τομέα Fumigati ο *A. fumigatus*, στον τομέα Terrei ο *A. terreus*, στον τομέα Usti ο *A. ustus*, στον τομέα Versicolores ο *A. versicolor* και ο *A. sydowii* και στον τομέα Wentii ο *A. wentii*.

³ Ο *A. ochraceus* αναφέρεται και ως *A. alutaceus*.

⁴ Το είδος αυτό διαχωρίζεται από τα άλλα που ανήκουν στο *A. niger* aggregate (*A. brasiliensis*, *A. phoenicis*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. foetidus*, τα οποία είναι μορφολογικά ταυτόσημα) από το γεγονός ότι με την RFLP ανάλυση δίνει ένα άλλο, τρίτο, pattern (βλ. κεφ. «Ταξινόμηση των μαύρων Aspergilli»). Στελέχη αυτού του είδους απομονώνονται στην Βραζιλία.

⁵ Endo-action enzyme: Ένζυμο που δρα στο εσωτερικό του μορίου του υποστρώματος.

Exo-action enzyme: Ένζυμο που δρα στις άκρες του μορίου του υποστρώματος.

1.2.1.1. Ταυτοποίηση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά

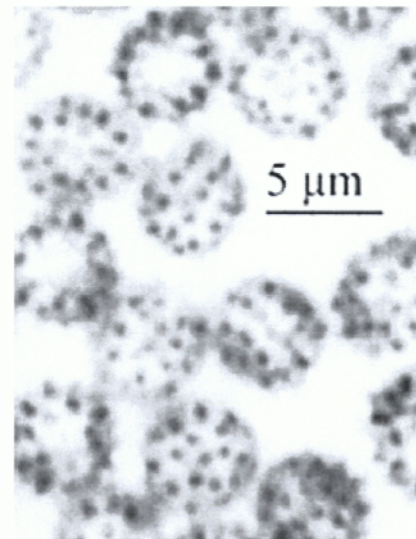
Η ταυτοποίηση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών παραμένει η πιο έγκυρη μέθοδος ταυτοποίησης. Συνήθως χρησιμοποιούνται τρία υποστρώματα και δύο θερμοκρασίες:

MEA (Malt Extract Agar) με επώαση στους 25 °C.

CYA (Czapek Yeast Extract Agar) με επώαση στους 25 και στους 37 °C.

CY20S (CYA με 20% σακχαρόζη) με επώαση στους 25 °C.

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνται 4 τρυβλία Petri διαμέτρου 10 mm: 2 με CYA και ένα για το καθένα από τα υπόλοιπα υποστρώματα. Κάθε τρυβλίο εμβολιάζεται σε 3 σημεία που ισαπέχουν μεταξύ τους και από τις άκρες του τρυβλίου. Όλα τα τρυβλία, έπειτα από 7 ημέρες επώασης στο σκοτάδι, εξετάζονται και περιγράφονται μακροσκοπικά (διάμετροι αποικιών, χρώμα κονιδίων, χρώμα μυκηλίου, έκκριμα, βάθος αποικίας, πτυχώσεις, βαφή υποστρώματος κλπ.) και μικροσκοπικά (uniseriate ή biseriate, μέγεθος, σχήμα, πάχος τοιχωμάτων, εξογκώματα κονιδίων, μέγεθος κύστης κλπ.). Τα στοιχεία της κάθε απομόνωσης οδηγούν στην ταυτοποίηση με βάση κάποια κλείδα ταυτοποίησης.



Εικόνα 5:Κονίδια.

1.2.1.2. Οι μαύροι *Aspergilli* [9].

Προϊόντα που παράγονται από στελέχη του *Aspergillus niger* (π.χ. εξωκυτταρικά ένζυμα και οξέα για την επεξεργασία τροφίμων) κατέχουν τον χαρακτηρισμό GRAS (Generally Recognized As Safe) από το FDA (1987), παρόλο ότι έχει αναφερθεί η ικανότητα παραγωγής OTA από στελέχη αυτού του είδους (1994). Παρόλη την βιομηχανική τους σημασία, η ταξινόμηση των μαύρων *aspergilli* απέχει πολύ από την σαφήνεια και πολλές προσπάθειες έχουν γίνει με στόχο την εύρεση κατάλληλων ταξινομικών κριτηρίων. Μερικά είδη, όπως ο *A. carbonarius* και κάποια uniseriate είδη, είναι εύκολα αναγνωρίσιμα. Στην *A. niger* aggregate (*A.*

brasiliensis, *A. phoenicis*, *A. tubingensis*, *A. niger*, *A. foetidus* κ.α.) δεν είναι δυνατόν να παρατηρηθούν μορφολογικές διαφορές, γι' αυτό και η ταυτοποίηση των ειδών θα παραμείνει προβληματική, αν και έχει προταθεί η κατηγοριοποίησή τους σε είδη σε μοριακό επίπεδο. Είναι σύνηθες οι απομονώσεις των *aspergilli* που δημιουργούν μαύρες αποικίες να χαρακτηρίζονται ως *A. niger* και από την άλλη, στελέχη του ίδιου είδους να διατηρούνται σε συλλογές υπό διαφορετικά ονόματα ειδών.

1.2.1.2.1. Μαύροι *Aspergilli* και ασφάλεια.

Ο *A. niger* είναι το 3^ο πιο κοινό από τα είδη που σχετίζονται με την *invasive pulmonary aspergillosis* και είναι επίσης, συχνά, ένας αιτιολογικός παράγοντας του *aspergilloma*. Μπορεί επίσης να προκύψει αλλεργική αντίδραση, όχι μόνο από την εισπνοή σπορίων αλλά και από την εισπνοή ενζύμων του.

Απομονώσεις των μαύρων *aspergilli* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*⁶) έχει βρεθεί ότι παράγουν διάφορους τοξικούς μεταβολίτες, όπως *malformins*, *naphthopyrones*⁷ και *secalonic acid D*, η σημασία των οποίων είναι μηδαμινή μπροστά στην παραγωγή OTA ή οποία είναι νεφροτοξική, τερατογόνος, καρκινογόνος για τα ζώα, ανοσοκατασταλτική⁸, πιθανώς καρκινογόνος για τα νεφρά στον άνθρωπο (group 2B, IARC 1993), εμπλέκεται στην BEN, στην δημιουργία όγκων στο εγγύς σωληνάριο (urinary tract) και σε νεφρικές ασθένειες στην Τυνησία και στην Αίγυπτο.

Από την πρώτη περιγραφή παραγωγής OTA από τον *A. niger var niger* το 1994, ο αριθμός των αναφορών που ασχολούνται με την παραγωγή OTA από τα μέλη του τομέα *Nigri* αυξάνεται συνεχώς. Ως παραγωγοί αναφέρονται ο *A. carbonarius*, ο *A. niger* (*var. awamori* και *var. niger*), ο *A. foetidus*, ο *A. usamii* και ο *A. japonicus*. Η ικανότητα του τελευταίου να παράγει OTA έχει αναφερθεί πρόσφατα (2002, 2003), γεγονός που χρειάζεται επιβεβαίωση, αφού μέχρι στιγμής δεν θεωρείται ωχρατοξινοπαραγωγικό είδος. Τα αναφερθέντα ποσοστά ωχρατοξικογόνων απομονώσεων του *A. carbonarius* κυμαίνονται από 25 μέχρι 100%, ενώ του *A. niger* είναι χαμηλότερα κυμαινόμενα από 0.6 μέχρι 50%. Κατά συνέπεια ο *A. carbonarius* είναι ο κύριος παραγωγός OTA μεταξύ των μαύρων *aspergilli* αλλά είναι δύσκολο να γνωρίζουμε την έκταση των φυσικών περιστατικών του στα τρόφιμα, αφού όλοι οι μαύροι

⁶ Ο αναφερόμενος από τους Raper and Fennell ως *A. aculeatus* αναφέρεται από την Al. Musallam (1980) ως *A. japonicus var. aculeatus*. Μέχρι πρόσφατα ο *A. awamori* αποτελούσε ξεχωριστό είδος αλλά αναταξινομήθηκε σε *A. niger*, *A. foetidus* και *A. tubingensis* [66]. Αυτά τα τρία είδη δεν έχουν φαινοτυπικές διαφορές όταν καλλιεργούνται στα καθιερωμένα υποστρώματα ταυτοποίησης και γίνονται προσπάθειες για την σαφή διάκρισή τους.

⁷ Αυτές δεν προκαλούν ανησυχία και δεν έχει βρεθεί η φυσική τους παρουσία στα δημητριακά.

⁸ Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι κατά πολύ το πιο ευαίσθητο σε σχέση με τα υπόλοιπα.

aspergilli πολύ συχνά θεωρούνται ως “*A. niger*”. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι χωρίς αμφιβολία οι μαύροι aspergilli είναι η κύρια πηγή ΟΤΑ σε προϊόντα όπως ο οίνος, τα σταφύλια και τ’ αποξηραμένα σταφύλια και πιθανώς μια δευτερεύουσα πηγή για τον καφέ.

Απλή κλείδα ταυτοποίησης

Καθώς μόνο μερικά είδη μπορούν εύκολα να διακριθούν με μορφολογικά κριτήρια, η ακόλουθη κλείδα ταυτοποίησης (βλ. πιν. 8) είναι ο μόνος τρόπος για να διακριθούν τα πιο απλά taxa.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες σε Czapek agar, CYA ή MEA με επώαση στους 25 °C για 7 ημέρες.

Πίνακας 2: Απλή κλείδα ταυτοποίησης για τους Aspergilli.

Μορφολογικό χαρακτηριστικό	Είδος
1 Uniseriate	<i>A. japonicus</i>
1 Biseriate	2
2 Κονίδια διαμέτρου μεγαλύτερης των 6 μm	<i>A. carbonarius</i>
2 Κονίδια διαμέτρου μικρότερης των 6 μm	<i>A. niger aggregate</i> ⁹

⁹ Μοριακά στοιχεία υποδεικνύουν, όπως εξάλλου προαναφέρθηκε, ότι η *A. niger aggregate* μπορεί να διαιρεθεί σε δύο, τρία ή ακόμα και τέσσερα taxa, σύμφωνα με διαφορετικούς συγγραφείς. Αυτά δεν είναι δυνατόν να τα διακρίνουμε με μορφολογικούς τρόπους.

2. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ.

Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος παραμένει η πρόληψη και η αποτροπή του σχηματισμού των μυκοτοξινών, προβαίνοντας στις κατάλληλες ενέργειες πριν την συγκομιδή, αμέσως μετά την συγκομιδή και κατά την αποθήκευση.

Οι κύριες προσεγγίσεις για αποτροπή σχηματισμού μυκοτοξινών πριν την συγκομιδή περιλαμβάνουν Ορθές Γεωργικές Πρακτικές, όπως είναι:

- Η εναλλαγή καλλιεργειών.
- Ο χρόνος άρδευσης, φύτευσης και συγκομιδής.
- Η δημιουργία και χρήση φυτών ανθεκτικών στους τοξικογόνους μύκητες.
- Γενετικώς τροποποιημένες καλλιέργειες ανθεκτικές στις προσβολές από έντομα και
- Ανταγωνιστικός αποκλεισμός με την χρήση μη τοξικογενών στελεχών στον αγρό.

Η αποτροπή με προσυλλεκτική διαχείριση και διαχείριση της συγκομιδής είναι ο καλύτερος τρόπος ελέγχου της μίανσης με μυκοτοξίνες. Αν ωστόσο συμβεί μίανση μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαδικασίες μετασυλλεκτικής απομείανσης/ αποτοξικοποίησης ώστε να απομακρυνθούν ή να μειωθούν οι ποσότητες της τοξίνης από τα γεωργικά προϊόντα που έχουν μianθεί σε ανεπιθύμητα επίπεδα.

2.1. Πρόληψη – HACCP.

Προσπάθεια γίνεται για την χρήση ενός συστήματος HACCP ως ένα εργαλείο αποτροπής σχηματισμού μυκοτοξινών. Σήμερα, το σύστημα HACCP, αν και έχει εδραιωθεί στην επεξεργασία και την παρασκευή τροφίμων, δεν χρησιμοποιείται ευρέως στην πρωτογενή παραγωγή και κατά τα πρώτα στάδια ζωής των προϊόντων τροφίμων, όπως είναι η αρχική αποθήκευση. Αναλογιζόμενοι λοιπόν ένα συγκεκριμένο τρόφιμο και την γραμμή παραγωγής του ευρύτερα, ολιστικά (από το χωράφι μέχρι την κατανάλωσή του), μπορούν να τεθούν προαπαιτούμενα και να δημιουργηθεί ένα σύστημα HACCP που ν' αφορά τις μυκοτοξίνες που αφορούν το τρόφιμο αυτό.

Το HACCP είναι ένα σύστημα διαχείρισης σχεδιασμένο έτσι ώστε να αποτρέπει την εμφάνιση προβλημάτων. Υπάρχουν μερικοί πολύ καλοί λόγοι που δικαιολογούν το γιατί θα πρέπει να αποτρέψουμε τον σχηματισμό μυκοτοξινών εξ' αρχής:

- Όταν σχηματιστούν είναι σχετικά δύσκολο να απομακρυνθούν με την χρήση των διαθέσιμων μεθόδων απομείανσης.
- Υπάρχουν σημαντικά προβλήματα που σχετίζονται με την λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, για την ανάλυση μυκοτοξινών. (οι μύκητες αναπτύσσονται σε μεμονωμένα σημεία).
- Η ακριβής ανάλυση μυκοτοξινών κοστίζει και συχνά είναι πολύ αργή για χρήση στην πράξη σε μια αλυσίδα προϊόντος.

Το γεγονός ότι οι μυκοτοξίνες μπορούν να σχηματιστούν πριν ακόμα την συγκομιδή (κυρίως όσον αφορά τις μυκοτοξίνες του γένους *Fusarium*), υποδεικνύει ότι ένα τέτοιο σχέδιο HACCP θα πρέπει να επεκταθεί και στον αγρό, λαμβάνοντας υπόψην του τις καιρικές συνθήκες, τις περιοχές προέλευσης των πρώτων υλών, τις προσβολές από παθογόνα, τις καλλιεργητικές τεχνικές κλπ. Αν και εξακολουθεί να υπάρχει ένα κενό γνώσης όσον αφορά τον σχηματισμό των μυκοτοξινών στον αγρό, η εφαρμογή Ορθών Γεωργικών Πρακτικών συνεισφέρει σημαντικά στην αποτροπή.

2.1.1. Μικροβιακός ανταγωνισμός ως προληπτικό μέτρο.

Ο δευτερεύον μεταβολισμός σχετίζεται συχνά με ένα στρεσογόνο στάδιο ή μια μορφολογική αλλαγή του μύκητα, επομένως, ο μικροβιολογικός ανταγωνισμός αναμένεται να έχει σημαντική επίδραση σ' αυτόν και οι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί, σε επίπεδα υπό-παρεμποδιστικά, μπορεί να διεγείρουν τον δευτερεύοντα μεταβολισμό, συνεπώς και την παραγωγή μυκοτοξίνης. Ωστόσο έχει επίσης βρεθεί ότι η συγκαλλιέργεια μικροοργανισμών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της παραγωγής μυκοτοξίνης και να έχουμε έτσι ένα ευεργετικό αποτέλεσμα του ανταγωνισμού.

Ελέγχοντας την δράση των ζυμών *Pichia anomala* και *Saccharomyces cerevisiae* έναντι δύο στελεχών του OTA-παραγωγικού *P. verrucosum* σε συνθετικό υπόστρωμα καλλιέργειας (στερεό MEA) [37] βρέθηκε ότι και οι δύο ζύμες παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του μύκητα καθώς και την παραγωγή OTA από τον ίδιο ενώ δεν διαπιστώθηκε διέγερση της παραγωγής OTA, ακόμα κι όταν τα εμβόλια των ζυμών ήταν μικρής συγκέντρωσης. Ο *Pichia anomala* άσκησε την ίδια παρεμποδιστική δράση στο ένα από τα δυο στελέχη του μύκητα και κατά την χρήση μη αποστειρωμένων σπόρων σιταριού.

Παρόμοια δράση φαίνεται να έχουν και οι ζύμες στα σταφύλια ενώ η αποκαλυφθείσα ικανότητά τους να προσροφούν στα κυτταρικά τους τοιχώματα την OTA, τους δίνει πλέον μια νέα δυναμική στον κλάδο της απομείανσης.

2.2. Απομίανση/ Αποτοξικοποίηση.

Αν και έχουν βρεθεί συγκεκριμένοι χειρισμοί που μειώνουν την συγκέντρωση ορισμένων μυκοτοξινών ωστόσο δεν έχει δημιουργηθεί μια μοναδική μέθοδος που να είναι εξίσου αποτελεσματική έναντι μιας ευρείας ποικιλίας μυκοτοξινών που μπορεί να συνυπάρχουν σε διαφορετικά προϊόντα τροφίμων. Η ιδανική διαδικασία απομίανσης θα πρέπει να είναι εύκολη στην χρήση, ανέξοδη, και δεν θα πρέπει να οδηγεί στον σχηματισμό ενώσεων που είναι επίσης τοξικές ή μπορούν να αλλάξουν τις θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου ή της ζωοτροφής.

Οι απαιτήσεις του FAO για μια αποδεκτή διεργασία απομίανσης ορίζουν ότι η διαδικασία θα πρέπει:

- Να καταστρέφει, να αδρανοποιεί ή να απομακρύνει την μυκοτοξίνη.
- Να μην παράγει ή αφήνει τοξικά και/ ή καρκινογόνα/ μεταλλαξιογόνα υπολείμματα στα τελικά προϊόντα ή στα προϊόντα τροφίμων που λαμβάνονται από ζώα που διατρέφθηκαν από απομιασμένες τροφές.
- Να μην αλλάζει σημαντικά κύριες τεχνολογικές ιδιότητες και θα ήταν ιδανικό να
- Καταστρέφει τα σπόρια των μυκήτων και τα μυκήλια που θα μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν εκ νέου τοξίνες υπό ευνοϊκές συνθήκες.

Παρόμοιες απαιτήσεις έχουν οριστεί στην Γαλλία και στις Η.Π.Α. Ωστόσο το FDA απαιτεί επιπλέον στοιχεία για την επίδραση της διαδικασίας στο περιβάλλον.

Υπάρχουν φυσικές, χημικές και βιολογικές μέθοδοι απομίανσης. Διαδικασίες αποτοξικοποίησης που εμφανίζονται αποτελεσματικές in vitro δεν είναι απαραίτητο να διατηρούν την αποτελεσματικότητά τους όταν δοκιμάζονται in vivo, γι' αυτό η αποτελεσματικότητα της εκάστοτε προτεινόμενης μεθόδου απομίανσης θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με πειράματα in vivo¹⁰. Οι βιοσημαντές έκθεσης σε μυκοτοξίνες αποτελούν ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την αξιολόγηση της in vivo αποτελεσματικότητας των μεθόδων απομίανσης.

2.2.1. Φυσικές μέθοδοι.

Όπως: διαχωρισμός και διαίρεση της πρώτης ύλης σε κλάσματα με βάση την πυκνότητα, ξέπλυμα, αποφλοιώση, διαλογή, θερμική επεξεργασία, υγρή και ξηρή άλεση οι οποίες αφορούν σε προϊόντα όπως: τα δημητριακά, τα άλευρα κ.α.

¹⁰ Υπάρχουν διαθέσιμα υλικά στο εμπόριο που προστίθενται σε σιτηρέσια με σκοπό την μειωμένη απορρόφηση μυκοτοξινών από τα ζώα.

Προσρόφηση

Η εφαρμογή προσροφητικών ουσιών¹¹ σε μiasμένες τροφές για την μείωση της απορρόφησης μυκοτοξινών από το έντερο, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους και πιο εφαρμοσμένους τρόπους μείωσης της διακινδύνευσης, τόσο της μεταφοράς τοξικών μεταβολιτών στο γάλα, το κρέας και τ' αυγά, όσο και των αρνητικών επιπτώσεων στις αποδόσεις των κτηνοτροφικών ζώων. Πριν να εφαρμοστεί όμως αυτή η τεχνική στην πράξη είναι απαραίτητο να δειχθεί ότι η προσροφητική ουσία δεν απομακρύνει βασικά θρεπτικά συστατικά από την διατροφή.

Καμία προσροφητική ουσία δεν βρέθηκε να είναι αποτελεσματική ταυτόχρονα έναντι των περισσότερων τύπων μυκοτοξινών. Οι προσροφητικές ουσίες που δείχνουν *in vitro* υψηλή συγγένεια με μυκοτοξίνες, συχνά δεν παρουσιάζουν τα ίδια αποτελέσματα όταν διεξάγονται *in vivo* πειράματα.

Οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι προσροφητές είναι τα αργιλοπυριτικά (**aluminosilicates**) υλικά, ακολουθούμενοι από τον ενεργό άνθρακα και ειδικά πολυμερή, ωστόσο η αποτελεσματικότητα της προσρόφησης εξαρτάται από την χημική δομή τόσο της προσροφητικής ουσίας όσο και της μυκοτοξίνης.

Ο ενεργός άνθρακας¹² έχει ισχυρή επίδραση στην απορρόφηση της ΟΤΑ *in vitro* αλλά δεν έχει καμία επίδραση στην τοξικότητα της ΟΤΑ *in vivo*. Είναι αποτελεσματικός στην μείωση της μεταφοράς της αφλατοξίνης B₁ από την ζωοτροφή στο γάλα, ως αφλατοξίνη M₁, σε γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες.

Ο μπεντονίτης, χρησιμοποιούμενος σε ποσοστά 0.5-2% επί της τροφής, φαίνεται να δρα θετικά έναντι της τοξίνης T-2 *in vivo* (σε αρουραίους), μειώνοντας τον χρόνο διέλευσης της τροφής από τον γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά φαίνεται ότι είναι αδρανής έναντι της ζεαραλινόνης και της nivalenol.

Η **cholestiramine** (CH) είναι μια ρητίνη που χρησιμοποιούνταν για φαρμακευτικούς σκοπούς στην αύξηση της ολικής και της LDL χοληστερόλης. Η CH σε συγκέντρωση 1% σε *in vivo* πειράματα φαίνεται να είναι δραστική έναντι των fumonisins, της ζεαραλινόνης και της ΟΤΑ σε ποντίκια και /ή αρουραίους. Σε μελέτες σε αρουραίους η CH δοκιμάστηκε ως προστατευτικός παράγοντας έναντι της νεφροτοξικότητας που επάγεται από την ΟΤΑ και βρέθηκε ικανή να μειώσει την συγκέντρωση της ΟΤΑ στο πλάσμα του αίματος, την έκκριση της ΟΤΑ και των μεταβολιτών της στα ούρα και την χολή και να αυξήσει την έκκριση της ΟΤΑ στα

¹¹ Δεσμύουν ισχυρά και ακινητοποιούν τις μυκοτοξίνες στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων.

¹² Πρόκειται για αδιάλυτη σκόνη που σχηματίζεται από την πυρόλυση διαφορετικών ειδών οργανικών ουσιών. Επιδεικνύει διαφορετικές προσροφητικές ιδιότητες ανάλογα με την προέλευσή του.

κόπρανα. Ωστόσο το υψηλό κόστος της CH πιθανώς να καθιστά την εμπορική χρήση της απαγορευτική.

2.2.2. Χημικές μέθοδοι.

Οι χημικές μέθοδοι δεν επιτρέπονται στην Ε.Ε. για προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Αναφορικά:

Ammoniation, Nixtamalization, Sodium bisulfite, Ozonation, Μείωση σακχάρων

2.2.3. Βιολογικές μέθοδοι.

Μικροβιακή Απομίανση

Αυτή επιτυγχάνεται είτε μέσω της αποδόμησης της μυκοτοξίνης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή παραπροϊόντων, είτε μέσω της προσρόφησής της στα κυτταρικά τοιχώματα.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ικανός να αποδομήσει την πατουλίνη στον χυμό μήλου κατά την παραγωγή μηλίτη οίνου (cider) ενώ κατά την ζύμωση μύρας έχει διαπιστωθεί ότι ποσοστό της ΟΤΑ προσλαμβάνεται από τα τοιχώματά του [37].

Πρόσφατα διαπιστώθηκε η ικανότητα ζυμών που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση να προσροφούν στα τοιχώματά τους ΟΤΑ. Η ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση μπορούν να μειώσουν σημαντικά την συγκέντρωση της ΟΤΑ [48] μέσω προσρόφησης [39]¹³ ενώ ακόμα και τα θερμικώς επεξεργασμένα κύτταρα ζυμών επιφέρουν επίσης καλά αποτελέσματα [38]. Η ικανότητα αυτή των ζυμών και συγκεκριμένα των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαφώς και για την απομίανση των χυμών σταφυλιού. Ωστόσο αν οι ζύμες δεν απομακρυνθούν από τον οίνο τότε και η ΟΤΑ που προσροφήθηκε απ' αυτές παραμένει στον οίνο και είναι πολύ πιθανό τα στάδια της χρησιμοποιούμενης μεθόδου για την ανίχνευση της ΟΤΑ σ' αυτόν να μην επιτυγχάνουν την αποδέσμευσή της από τις ζύμες. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα οι πραγματικές συγκεντρώσεις να είναι μεγαλύτερες από τις φαινομενικές.

Ενδιαφέροντα είναι και τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με την προσθήκη βακτηρίων, συγκεκριμένα *Lactobacillus plantarum*, ή ενζύμων (papain και acid protease P3) τα οποία μπορούν να αποδομήσουν την ΟΤΑ στο ερυθρό γλεύκος [10].

Πρόσφατα διαπιστώθηκε η ικανότητα μαύρων *aspergilli*, ΟΤΑ-παραγωγικών και μη, να αποδομούν την ΟΤΑ [55, 56] γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό των υπεύθυνων ενζύμων και την μετέπειτα εφαρμογή τους στην απομίανση.

¹³ Κατά την εργασία αυτή, έπειτα από την ζύμωση 1l γλεύκους που είχε συγκέντρωση ΟΤΑ 2ppb βρέθηκε ότι στο τέλος της ζύμωσης η ΟΤΑ μειώθηκε σε βαθμό μεγαλύτερο του 50% ενώ μέρος της ΟΤΑ που εξαλείφθηκε βρέθηκε στα ιζήματα της ζύμωσης (ζύμες έπειτα από την ζύμωση).

Επιπλέον screening μικροοργανισμών μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση πιο αποτελεσματικών και περισσότερο εφαρμόσιμων μικροοργανισμών. Η σημασία των βιολογικών μεθόδων αποτοξικοποίησης είναι πολύ πιθανό να μεγαλώσει αν η αντίσταση των καταναλωτών στις χημικές εφαρμογές συνεχίσει ν' αυξάνεται.

2.3. Απομάκρυνση και καταστροφή της ΟΤΑ.

Υπό διερεύνηση είναι η επίδραση των διαφορετικών σταδίων οινοποίησης στο περιεχόμενο της ΟΤΑ. Πέρα από την επίδραση των ζυμών, η οποία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην μείωση του περιεχομένου της ΟΤΑ, υπάρχουν κι άλλα στάδια στην οινοποίηση (π.χ. διαύγανση με χρήση π.χ. μπεντονίτη και/ ή ζελατίνης) που πιθανώς να δρουν προς την ίδια κατεύθυνση. Κατά την χρήση διαφόρων παραγόντων διαύγανσης [57] διαπιστώθηκε ότι το στάδιο αυτό μειώνει την περιεκτικότητα του οίνου σε ΟΤΑ, με τον ενεργό άνθρακα να παρουσιάζει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και να έπεται το silica gel ενώ και άλλοι παράγοντες διαύγανσης (καζεϊνικό κάλιο, αλβουμίνη αυγού, ζελατίνη, μπεντονίτης), οι οποίοι χρησιμοποιούνται συχνά, έδωσαν επίσης καλά αποτελέσματα. Αν και ο ενεργός άνθρακας δρα αρνητικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου (χρώμα) όταν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλες δόσεις (>20g/hl)¹⁴, ωστόσο φαίνεται ότι μικρότερες δόσεις είναι αρκετές για να απομακρύνουν επαρκή ποσοστό της ΟΤΑ.

Φαίνεται [10] ότι κατά την διάρκεια της εκχύλισης (maceration) αυξάνει η ΟΤΑ στο γλεύκος ενώ παρατηρείται μια μείωση έπειτα από μηλογαλακτική ζύμωση.

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι μέρος της ΟΤΑ, κατά την ερυθρά οινοποίηση, παραμένει εγκλωβισμένο στους φλοιούς ακόμα κι έπειτα από την πίεσή τους [48].

¹⁴ Χρήση μεγάλων ποσοτήτων (≥ 50 g/hl), ακόμα και με τον συνδυασμό οινολογικών ταννινών, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στους φαινολικούς συντελεστές του ερυθρού οίνου. Μέχρι 20 g/hl δεν τροποποιεί ουσιαστικά το χρώμα.

3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΙΝΔΥΝΕΥΣΗΣ (RISK ANALYSIS).

Η ανάλυση διακινδύνευσης αποτελείται από τρία κύρια μέρη:

- Την αποτίμηση της διακινδύνευσης (risk assessment) η οποία περιλαμβάνει:
 - Την ταυτοποίηση του κινδύνου (Hazard identification).
 - Τον χαρακτηρισμό του κινδύνου (Hazard characterization).
 - Την αποτίμηση της έκθεσης (Exposure assessment) και
 - Τον χαρακτηρισμό της διακινδύνευσης (Risk characterization).
- Την διαχείριση της διακινδύνευσης (Risk management) και
- Την επικοινωνία διακινδύνευσης (Risk communication).

Αυτά τα τρία κύρια μέρη αλληλεπικαλύπτονται.

3.1. Αποτίμηση διακινδύνευσης (Risk assessment).

Η αποτίμηση διακινδύνευσης είναι η επιστημονική αξιολόγηση των γνωστών ή των εν δυνάμει αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία που προκύπτουν από την ανθρώπινη έκθεση σε τροφιογενείς μυκοτοξίνες. Παρέχει μια ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της δριμύτητας και της πιθανότητας προσβολής που προκύπτει από την έκθεση σ' αυτούς τους κινδύνους.

Η αποτίμηση διακινδύνευσης πρέπει να λάβει υπόψην της:

- Την παρουσία μυκοτοξινών και μικροοργανισμών ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες σε ποικίλα προϊόντα τροφίμων είτε λόγω αλλοίωσης είτε λόγω σκόπιμης χρήσης μυκήτων για την διεξαγωγή ζυμώσεων.

- Τις τοξικολογικές ιδιότητες των τοξινών. Ο τοξικολογικός χαρακτηρισμός περιλαμβάνει μια εκτίμηση των βασικών τοξικών επιδράσεων που παρουσιάζονται στους οργανισμούς, η οποία ελέγχεται και υποστηρίζεται από επιδημιολογικά δεδομένα που υποδεικνύουν τον ρόλο των μυκοτοξινών στην αιτιολόγηση ανθρώπινων ασθενειών.

Η τοξικολογική δράση των μυκοτοξινών εξαρτάται από τους εξής παράγοντες [70]:

- Φύση μυκοτοξίνης.
- Δόση.
- Τρόπος εισόδου.
- Χρόνος έκθεσης.

Επιδεκτικότητα του είδους, η οποία επηρεάζεται από γενετικούς και φυσιολογικούς παράγοντες, π.χ.:

1. Ηλικία.
2. Ορμόνες.
3. Θρέψη.
4. Μικροχλωρίδα πεπτικού.
5. Προσβολές και παράσιτα.
6. Περιβαλλοντική έκθεση (περιλαμβάνει καιρικές συνθήκες και χημικά).

- Επιδημιολογικά στοιχεία.

Παρά την μεγάλη συχνότητα μίανσης με μυκοτοξίνες και τον μεγάλο αριθμό τοξινών που εμπλέκονται, η πληροφόρηση για τις δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου είναι λιγοστή και συχνά βασίζεται σε ιστορικές αναφορές οξέων περιστατικών. Στο γεγονός αυτό συντελεί η εξάπλωση των μυκοτοξινών σ' ένα ευρύ φάσμα τροφίμων (καθένα εκ των οποίων απαιτεί διαφορετική προσέγγιση¹⁵) και χωρών καθώς και το γεγονός ότι απαιτείται πολυτοξινική ανάλυση στις περισσότερες των περιπτώσεων αφού, ένα ευρύ φάσμα τοξικογόνων μυκητιακών στελεχών παράγει περισσότερες από μία μυκοτοξίνες.

Όσον αφορά τις βιολογικές αναλύσεις, η πλειοψηφία τους έχει αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό από δοκιμές σε κύτταρα καλλιέργειας, οι οποίες δεν απαιτούν ζώντες οργανισμούς. Είναι ταχύτερες και επιτρέπουν έναν πιο λεπτομερή έλεγχο των βιολογικών επιπτώσεων χωρίς να περιορίζονται απλώς στην υπόδειξη της θανατηφόρου δόσης. Απ' αυτές εξάγονται συμπεράσματα που περιλαμβάνουν κυτταροτοξικότητα, σύνθεση μακρομορίων, βιοχημικές αντιδράσεις, συγκεκριμένα χαρακτηριστικά γνωρίσματα ορισμένων τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων την σύνθεση νευροδιαβιβαστών, σύνθεση ανοσογλοβουλινών και ορμονών. Ένας ξεχωριστός κλάδος της *in vivo* τοξικότητας ασχολείται με μεταλλαξιογόνες και γονιδιοτοξικές επιπτώσεις.

Ο συσχετισμός των μυκοτοξινών με την δημόσια υγεία μπορεί είτε να υπερεκτιμηθεί, όταν η ανάλυση διακινδύνευσης (risk analysis) βασιστεί μόνο σε μηχανιστικές μελέτες (mechanistic studies), είτε να υποεκτιμηθεί, όταν λαμβάνονται υπόψη μόνο οι άμεσες επιδράσεις (acute effects) που μπορούν να συνδεθούν ευθέως με μια υπερβολική κατανάλωση τροφίμου-πηγής.

¹⁵ Απαιτούνται διαφορετικά πρωτόκολλα δειγματοληψίας για κάθε τρόφιμο. Απαιτείται εκτίμηση των διαδικασιών παραλαβής και καθαρισμού για την πολύπλοκη μήτρα του εκάστοτε τροφίμου. Τα προβλήματα αυτά είχαν αντίκτυπο στα αποτελέσματα της αποτίμησης της διατροφικής πρόσληψης OTA από τον πληθυσμό των Μελών Κρατών της Ε.Ε (task 3.2.7, έκθεση 2002). Συχνά ποικίλουν οι μύκητες που παράγουν μια μυκοτοξίνη από καλλιέργεια σε καλλιέργεια και από χώρα σε χώρα.

Η ποσότητα μυκοτοξίνης που προσλαμβάνεται (βαθμός μίανσης της ανθρώπινης διατροφής) είναι περιορισμένης αξίας για την πρόβλεψη της βιολογικής ανταπόκρισης, καθώς άλλοι παράγοντες, όπως ο βαθμός απορρόφησης και τα βήματα βιομετατροπής, καθορίζουν το εύρος της υπεύθυνης για τις τοξικές επιπτώσεις δόσης. Το πρόβλημα αυτό ξεπερνιέται με την χρήση βιοσημαντών (biomarkers) (π.χ. για την αφλατοξίνη βιοσημαντές είναι οι ουρικοί μεταβολίτες αφλατοξίνη M_1 και η αφλατοξίνη P_1) οι οποίοι, όχι μόνο παρέχουν μια διορατικότητα στην βιολογικά αποτελεσματική δόση αλλά ανακλούν και πιο έμπιστα την συνολική διατροφική έκθεση ενός πληθυσμού. Στην περίπτωση της ΟΤΑ, η μέτρηση της συγκέντρωσης του ανθρωπίνου αίματος, αντί της αξιολόγησης όλων των διατροφικών προϊόντων, είναι ένα επιπλέον παράδειγμα της αξίας των βιοσημαντών στην αξιολόγηση της έκθεσης στις μυκοτοξίνες.

Όσον αφορά τις πηγές πρόσληψης μυκοτοξινών υπάρχουν τρεις γενικές κατηγορίες: Η πρωτογενής, που αποτελεί και την σημαντικότερη και περιλαμβάνει τρόφιμα φυτικής προέλευσης, τα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση και οι δευτερογενείς πηγές. Οι δύο τελευταίες αναλύονται στην συνέχεια.

Τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση.

Σε αντίθεση με τα Ασιατικά ζυμωμένα τρόφιμα, τα οποία βασίζονται κυρίως σε φυτικής προέλευσης υποστρώματα, στην **Ευρώπη** οι μύκητες χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριών και συγκεκριμένων προϊόντων κρέατος. Στελέχη των *P. camemberti* και *P. roqueforti* χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριών, αν και τα δύο είναι γνωστό ότι παράγουν ποικίλες μυκοτοξίνες¹⁶. Σε αντίθεση με τα τυριά, τα παραδοσιακά ζυμούμενα κρέατα και τα λουκάνικα δεν εμβολιάζονται με ένα συγκεκριμένο στέλεχος, αλλά αυθόρμητα αποικούνται από ποικίλους μύκητες των γενών *Penicillium* και *Aspergillus*. Ποικιλία μυκοτοξινών έχουν αναφερθεί σε σαλάμια¹⁷, ενώ από παστωμένα χοιρινά έχει απομονωθεί *A. flavus* και *A. parasiticus*. Η σύγχρονη βιομηχανοποιημένη παραγωγή ζυμωμένων κρεάτων -όπως γίνεται και με την παραγωγή τυριού- χρησιμοποιεί επιλεγμένες εκκινητήριες καλλιέργειες μυκήτων στην διαδικασία ζύμωσης. Ωστόσο, κατά την διάρκεια αποτίμησης του μεταλλαξιογόνου και γονιδιοτοξικού δυναμικού 12 διαφορετικών εκκινητήριων καλλιεργειών που εφαρμόζονταν σε εμπορική παραγωγή λουκάνικων, μόνο ένα στέλεχος βρέθηκε αρνητικό, με τα υπόλοιπα να ανταποκρίνονται θετικά είτε στο AMES test ή σε ένα κυτταροτοξικό test.

¹⁶ Συμπεριλαμβανομένων των cyclopiazonic acid, roquefortines, mycophenolic acid, PR toxin και penicillic acid.

¹⁷ Μεταξύ των οποίων: brevianamid A, citreoviridin, ochratoxin A, rugulosin, fumitremorgen B, verruculogen, cyclopiazonic acid και griseofulvin B

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι η επιλογή ενός στελέχους ως εκκινήτρια καλλιέργεια δεν μπορεί να βασίζεται μόνο σε τεχνολογικά χαρακτηριστικά αλλά και σε τοξικολογικά. Αλλά θα πρέπει να προσδιοριστεί και ο απαιτούμενος βαθμός τοξικολογικής εξέτασης πριν ένα είδος μύκητα θεωρηθεί ασφαλές.

Δευτερογενείς πηγές.

Περιλαμβάνουν ζωικούς ιστούς, γάλα αυγά κ.α. Έχει πλέον εδραιωθεί ότι το ανθρώπινο μητρικό γάλα μπορεί να περιέχει αφλατοξίνες καθώς και ωχρατοξίνη Α. Επιπλέον μύκητες χρησιμοποιούνται εκτενώς για παραγωγή βιομάζας, οργανικών οξέων, ενζύμων, ενώσεων γεύσης και φαρμάκων. Η εισπνοή κονιδίων θεωρείται ένας σημαντικός δρόμος έκθεσης, αφού μπορεί να περιέχουν αναλογίσιμα ποσά μυκοτοξινών.

3.1.1. Ταυτοποίηση κινδύνου (Hazard identification).

Η ταυτοποίηση του κινδύνου αποτελεί το πρώτο βήμα αποτίμησης της διακινδύνευσης και προσδιορίζει τις μυκοτοξίνες που μπορεί να είναι παρούσες στο τρόφιμο και έχουν την δυναμικότητα να προσβάλουν την υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Το τελικό σημείο αυτού του σταδίου είναι ο υπολογισμός του «επιπέδου μη πρόκλησης εμφανούς επιδράσεως» (“no-observed-effect-level”, NOEL, mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα), που εκφράζει την μέγιστη συγκέντρωση ή ποσό μυκοτοξίνης που δεν προκαλεί ανιχνεύσιμες δυσμενείς επιδράσεις.

3.1.2. Χαρακτηρισμός κινδύνου (Hazard characterization).

Ο χαρακτηρισμός του κινδύνου είναι η ποιοτική και/ή ποσοτική αξιολόγηση της φύσης των δυσμενών επιπτώσεων που σχετίζονται με μυκοτοξίνες που μπορεί να είναι παρούσες στο τρόφιμο. Θα πρέπει επίσης να διεξαχθεί μια αποτίμηση δόσης-αντίδρασης με τον συνδυασμό δεδομένων έκθεσης με τα δεδομένα τοξικότητας. Το τελικό σημείο αυτού του σταδίου είναι ο υπολογισμός μιας «ασφαλούς δόσης» όπως είναι για παράδειγμα η «προσωρινή ανώτατη ανεκτή ημερήσια πρόσληψη» (PMTDI, “provisional¹⁸-maximum-tolerable-daily-intake”, μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα). Η PMTDI για τους ανθρώπους προκύπτει από την διαίρεση του NOEL ή του LOEL με έναν συντελεστή ασφάλειας (ή αβεβαιότητας) που προκύπτει από

¹⁸ Ο όρος “provisional” εκφράζει την προσεγγιστική φύση της εκτίμησης, λόγω της σπανιότητας των αξιόπιστων στοιχείων όσον αφορά τις συνέπειες της ανθρώπινης έκθεσης, σε επίπεδα που προσεγγίζουν αυτά με τα οποία ασχολείται η JECFA.

πειράματα σε ζώα. Π.χ. η PMTDI για την OTA είναι 0.014 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Σ.Β./ ημέρα υπολογιζόμενη με συντελεστή ασφάλειας το 1500.

Ο συντελεστής ασφάλειας ή αβεβαιότητας έχει συνήθως την τιμή 100, πράγμα που σημαίνει ότι το μικρότερο NOAEL στις μελέτες με ζώα διαιρείται με το 100: 10 για την προέκταση από τα ζώα στους ανθρώπους και 10 για την διακύμανση μεταξύ μεμονωμένων ατόμων, ώστε να καταλήξουμε σε ένα ανεκτό επίπεδο πρόσληψης. Στις περιπτώσεις όπου τα δεδομένα είναι ανεπαρκή η JECFA χρησιμοποιεί έναν μεγαλύτερο συντελεστή ασφάλειας.

Η αρχή **ALARA** (As Low As Reasonable Achievable) αφορά καρκινογόνες ενώσεις και επειδή είναι καρκινογόνες δεν μπορεί να τεθεί ανώτερο επιτρεπτό όριο. Όμως, η παρουσία των μυκοτοξινών, κάποιες από τις οποίες είναι καρκινογόνες (π.χ. αφλατοξίνες), δεν μπορεί να εξαλειφθεί από τα τρόφιμα επομένως θα πρέπει να τεθούν κάποια επίπεδα ανοχής.

3.1.3. Αποτίμηση έκθεσης (Exposure assessment).

Η αποτίμηση έκθεσης είναι η ποσοτική εκτίμηση της πιθανής πρόσληψης μυκοτοξινών μέσω των τροφίμων. Η έκθεση των ανθρώπων σ' αυτούς τους κινδύνους αποτιμάται με τον καθορισμό των επιπέδων μίανσης των τροφίμων με μυκοτοξίνη και την πρόσληψη αυτών των καθορισμένων τροφίμων. Π.χ. η συνολική πρόσληψη **OTA** κατά την Ευρωπαϊκή διατροφή είναι **0.045 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους ανά εβδομάδα**.

Εξαιρετικά σημαντική είναι η χρήση αξιολογημένων αναλυτικών μεθόδων και η εφαρμογή της διασφάλισης της ποιότητας στην αναλυτική διαδικασία ώστε να διασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα των ερευνών παρέχουν μια αξιόπιστη αποτίμηση της πρόσληψης. Στις περισσότερες από τις αναφορές της JECFA για τις μυκοτοξίνες, τα αναλυτικά δεδομένα είναι ανεπαρκή για τις ανεπτυγμένες χώρες και ανύπαρκτα για τις αναπτυσσόμενες.

Η ανομοιογένεια της μίανσης με μυκοτοξίνες, και η ανεπάρκεια των χρησιμοποιούμενων σχεδίων δειγματοληψίας, συνεισφέρουν στην αναξιοπιστία των τελικών συμπερασμάτων. Ωστόσο οργανώνονται συζητήσεις και ομάδες εργασίας, σε παγκόσμιο επίπεδο (FAO, CAC), με σκοπό την εύρεση εναρμονισμένης διεθνικής προσέγγισης του θέματος της δειγματοληψίας.

3.1.4. Χαρακτηρισμός διακινδύνευσης (Risk characterization).

Ο χαρακτηρισμός της διακινδύνευσης αποτελεί την συγκέντρωση της ταυτοποίησης του κινδύνου, του χαρακτηρισμού του κινδύνου και της αποτίμησης της έκθεσης σε έναν ποιοτικό και/ ή ποσοτικό υπολογισμό της δριμύτητας και της εμφάνισης των δυσμενών επιδράσεων που

είναι πιθανό να συμβούν σ' ένα δεδομένο πληθυσμό, συμπεριλαμβάνοντας και τις αβεβαιότητες που συνοδεύουν αυτόν τον υπολογισμό. Ο χαρακτηρισμός της διακινδύνευσης μπορεί επίσης να καταλήγει στην εδραίωση επιπέδων ημερήσιας πρόσληψης στα οποία η διακινδύνευση είναι ασήμαντη ακόμα κι αν τα επίπεδα αυτά προσλαμβάνονται καθ' όλη την διάρκεια της ζωής.

3.2. Διαχείριση διακινδύνευσης (Risk management).

Η διαχείριση διακινδύνευσης είναι η διαδικασία εύρεσης εναλλακτικών πολιτικών λύσεων για την αποδοχή, ελαχιστοποίηση ή μείωση των αποτιμημένων διακινδυνεύσεων και η επιλογή και εφαρμογή κατάλληλων μέτρων ελέγχου, που περιλαμβάνουν την καθιέρωση και επιβολή ανώτατων ορίων μυκοτοξινών στα τρόφιμα.

3.3. Επικοινωνία διακινδύνευσης (Risk communication).

Η επικοινωνία διακινδύνευσης αποτελεί μια διαλεκτική διαδικασία ανταλλαγής πληροφοριών και απόψεων μεταξύ των αξιολογητών διακινδύνευσης, των διαχειριστών διακινδύνευσης και άλλων ενδιαφερομένων μερών.

4. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.

Από την ανακάλυψη των αφλατοξινών την δεκαετία του '60, έχουν εδραιωθεί κανονισμοί σε πολλές χώρες για την προστασία των καταναλωτών από τις δυσμενείς επιπτώσεις των μυκοτοξινών, αλλά και για την διασφάλιση δίκαιων πρακτικών στο εμπόριο τροφίμων.

Ποικίλοι παράγοντες συνυπολογίζονται στις διαδικασίες λήψης αποφάσεων που επικεντρώνονται στην θέσπιση ορίων για τις μυκοτοξίνες. Οι παράγοντες αυτοί, τόσο επιστημονικοί όσο και κοινωνικοοικονομικοί περιλαμβάνουν:

- Διαθεσιμότητα τοξικολογικών δεδομένων (πληροφορίες για την αποτίμηση κινδύνου).
- Διαθεσιμότητα δεδομένων σχετικά με την παρουσία των μυκοτοξινών σε ποικίλα προϊόντα (πληροφορίες για την αποτίμηση έκθεσης).
- Στοιχεία σχετικά με την κατανάλωση τροφίμων (πληροφορίες για την αποτίμηση έκθεσης).
- Γνώση της κατανομής των συγκεντρώσεων της μυκοτοξίνης εντός μιας παρτίδας.
- Διαθεσιμότητα αναλυτικών μεθόδων.
- Νομοθεσία στις χώρες με τις οποίες εκτελούνται εμπορικές συναλλαγές και
- Ανάγκη επάρκειας τροφικών αποθεμάτων.

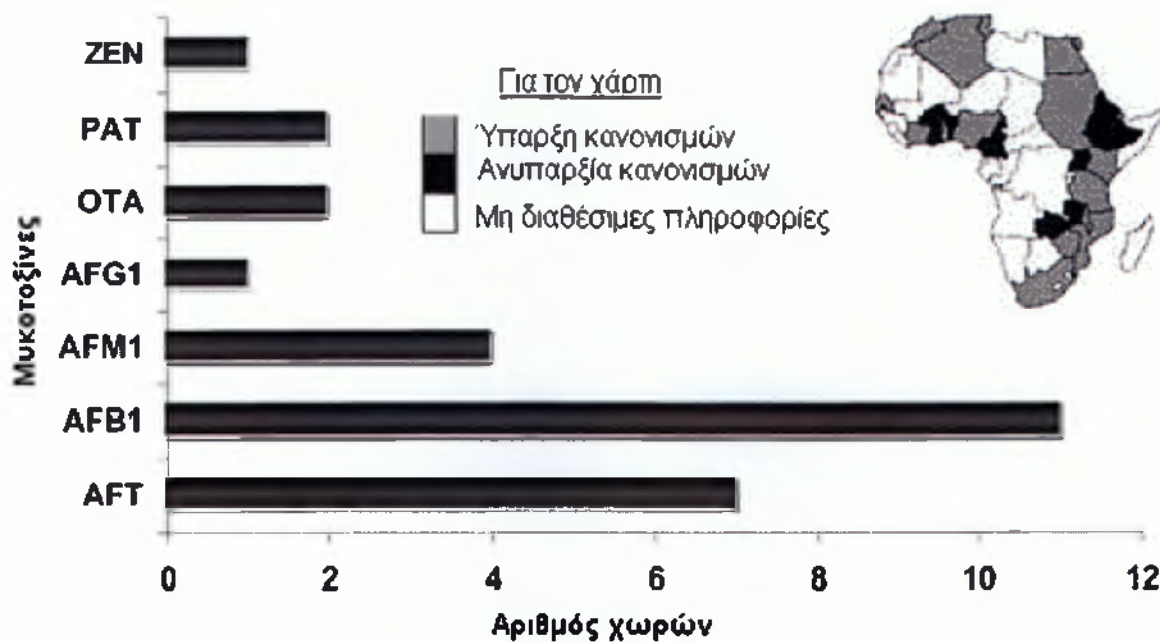
Επομένως κρίσιμης σημασίας είναι η συνεκτίμηση των διαφόρων παραγόντων που διαδραματίζουν ένα ρόλο στην διαδικασία λήψης αποφάσεων για την εδραίωση των επιπέδων ανοχής όσον αφορά τις μυκοτοξίνες. Μπορεί ο κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία που ενέχουν οι μυκοτοξίνες, να είναι ο ίδιος για κάθε άνθρωπο, όμως η έκθεση σ' αυτές δεν είναι η ίδια εξαιτίας των διαφορών στα επίπεδα μίανσης και στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες στα διάφορα μέρη του κόσμου. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια την θέσπιση διαφορετικών ορίων από χώρα σε χώρα πράγμα που δημιουργεί προβλήματα στις διεθνείς εμπορικές συναλλαγές.

Μέχρι το τέλος του 2003 περίπου 100 χώρες παγκόσμια¹⁹ είχαν θεσπίσει συγκεκριμένα όρια, είτε με την μορφή κανονισμών είτε με την μορφή οδηγιών, για τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και ο αριθμός αυτών των χωρών συνεχίζει να αυξάνεται. Μέχρι το 2003, ο αριθμός των κρατών που είχε κανονισμούς σχετικά με τις μυκοτοξίνες για τα τρόφιμα ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από τον αριθμό των κρατών που είχε κανονισμούς σχετικά με τις

¹⁹ Το σύνολο των πληθυσμών αυτών των χωρών αποτελεί το 87 % του παγκόσμιου πληθυσμού.

μυκοτοξίνες για τις ζωοτροφές, αλλά αναμένεται σημαντική αύξηση και των τελευταίων, ιδιαίτερα όσον αφορά την Ε.Ε.

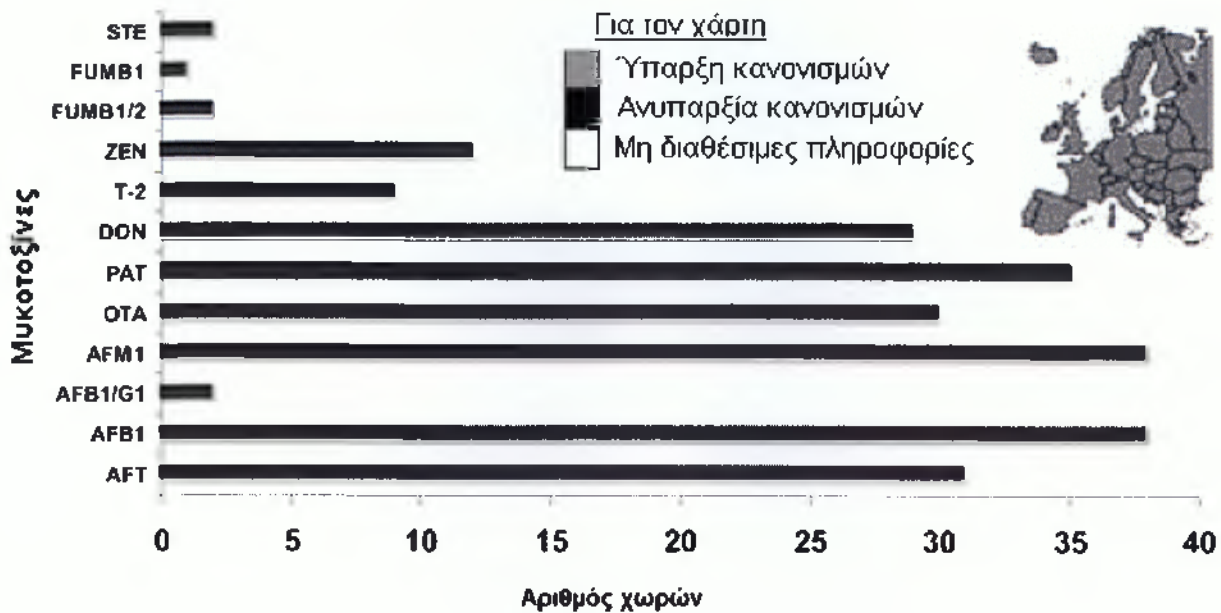
Όσον αφορά την Αφρική, το Μαρόκο έχει τις πιο λεπτομερείς ρυθμίσεις για τις μυκοτοξίνες.



Εικόνα 6: Μυκοτοξίνες νομοθετικά ρυθμιζόμενες στα τρόφιμα στην Αφρική [7].

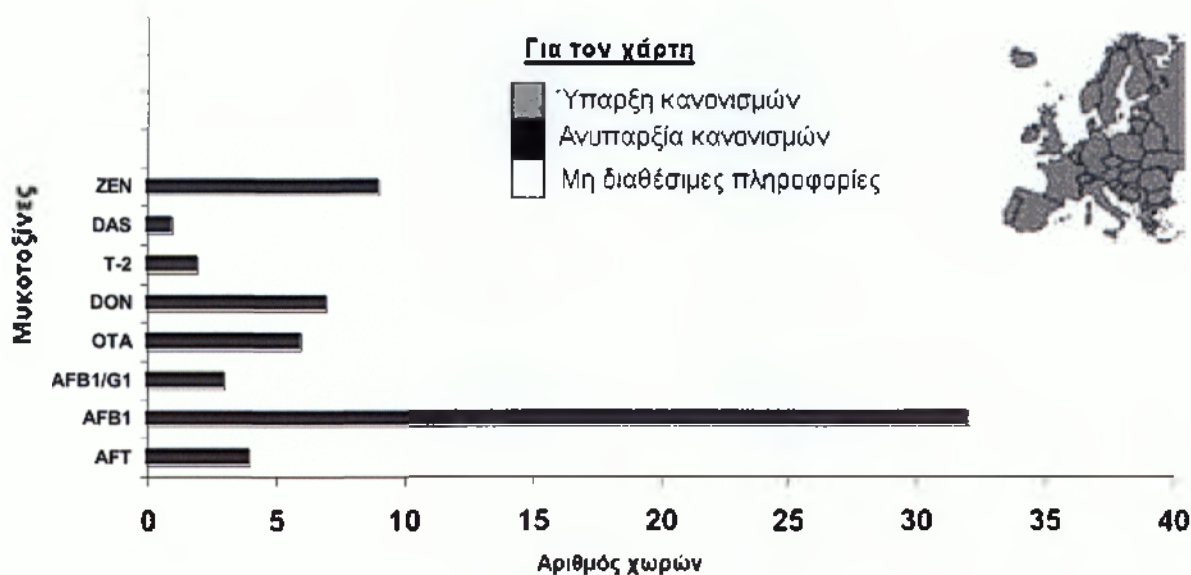
Στην Ασία και την Ωκεανία, η Κίνα και η Ισλαμική Δημοκρατία του Ιράν έχουν μακράν τις πιο εκτενείς και λεπτομερείς ρυθμίσεις.

Στην Ευρώπη, μέχρι το 2003, 39 χώρες, αποτελούμενες από το 99% του πληθυσμού της ηπείρου, είχαν νομοθετικές ρυθμίσεις για τις μυκοτοξίνες.



Εικόνα 7: Μυκοτοξίνες νομοθετικά ρυθμιζόμενες στα τρόφιμα στην Ευρώπη [7].

Σε σύγκριση με άλλες περιοχές του κόσμου, η Ευρώπη έχει τις πιο εκτενείς και λεπτομερείς νομοθεσίες για τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα. Εντός της Ε.Ε. υπάρχουν εναρμονισμένοι κανονισμοί για τις αφλατοξίνες σε διάφορα τρόφιμα, για την αφλατοξίνη M_1 στο γάλα, για την OTA στα δημητριακά, στ' αποξηραμένα φρούτα (και προσφάτως στον οίνο, τον καφέ τον χυμό σταφυλιού και άλλα προϊόντα) και για την πατουλίνη στον χυμό μήλου και στα προϊόντα μήλων. Καθοδηγητικά όρια υπάρχουν για την DON στα δημητριακά και στα προϊόντα δημητριακών. Προσφάτως τέθηκαν όρια και για τις παιδικές τροφές. Πολλά από τα κράτη μέλη της Ε.Ε. έχουν κανονισμούς για τις μυκοτοξίνες οι οποίοι συχνά είναι πιο λεπτομερείς απ' αυτούς που ισχύουν στην Ε.Ε.



Εικόνα 8: Μυκοτοξίνες νομοθετικά ρυθμιζόμενες στις ζωοτροφές στην Ευρώπη [7].

Όσον αφορά την **ΟΤΑ**, τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση των χωρών που έθεσαν νομοθετικά όρια γι' αυτήν και φαίνεται να υπάρχει συμφωνία για το ποια θα πρέπει να είναι αυτά τα όρια (βλ. Εικ. 9). Τα δημητριακά θεωρούνται η κύρια πηγή ανθρώπινης έκθεσης στην ΟΤΑ. Στην Ε.Ε. υπάρχει το όριο των $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ για τα ακατέργαστα δημητριακά και για τα επεξεργασμένα το όριο των $3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Σε εξέλιξη βρίσκονται διεθνείς έρευνες σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους η ΟΤΑ επάγει την καρκινογένεση [8]. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών ίσως οδηγήσουν σε αλλαγή των υπαρχόντων ορίων. Αν γονιδιοτοξικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην ογκογένεση από ΟΤΑ στα νεφρά και τεθούν standards βασισμένα στην γονιδιοτοξικότητα της ΟΤΑ, τότε αυτά πιθανώς να είναι χαμηλότερα από τα ήδη ισχύοντα και θα έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη προστασία. Ωστόσο, αν η ΟΤΑ δεν δρα καρκινογόνα μέσω γονιδιοτοξικών μηχανισμών, τότε, πιθανώς υψηλότερα επίπεδα μίανσεως θα μπορούν να επιτραπούν και τα αυστηρά όρια δεν θα έχουν ως αποτέλεσμα την υψηλή προστασία της ανθρώπινης υγείας, αλλά την αύξηση του κόστους παραγωγής προϊόντων.



Εικόνα 9: Όρια για την ΟΤΑ σε δημητριακά και σε προϊόντα δημητριακών ανά τον κόσμο.

4.1. Νομοθεσία στην Ε.Ε.

Υπάρχει ένα σύνολο κανονισμών, οδηγιών και συστάσεων που αφορούν τις μυκοτοξίνες κυρίως στα τρόφιμα αλλά και στις ζωοτροφές. Στην συνέχεια παρέχεται μια λίστα απ' αυτές και έπειτα το περιεχόμενο των πιο σημαντικών και σχετικών με το θέμα της παρούσας εργασίας. Όσες υπήρχαν μέχρι το τέλος του 2003 έχουν συγκεντρωθεί από μια πρόσφατη έκθεση του FAO [7].

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 472/2002 της Επιτροπής της 12ης Μαρτίου 2002 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 για τον καθορισμό μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα. (Καθορίζονται τα ανώτερα επιτρεπτά όρια αφλατοξινών σε μπαχαρικά και ωχρατοξίνης Α σε δημητριακά, προϊόντα δημητριακών και σταφίδες)

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 683/2004 της Επιτροπής της 13ης Απριλίου 2004, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 όσον αφορά τις αφλατοξίνες και την ωχρατοξίνη Α σε τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και μικρά παιδιά.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 123/2005 της Επιτροπής, της 26ης Ιανουαρίου 2005, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 466/2001 όσον αφορά την ωχρατοξίνη Α. *Επίσημη Εφημερίδα αριθ. L 025 της 28/01/2005 σ. 0003 – 0005.*

Οδηγία 98/53/ΕΚ της Επιτροπής της 16ης Ιουλίου 1998 για την καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων για ορισμένες προσμειξίες στα τρόφιμα. *Επίσημη Εφημερίδα αριθ. L 201 της 17/07/1998 σ. 0093 – 0101.*

Οδηγία 2002/26/ΕΚ της Επιτροπής, της 13ης Μαρτίου 2002, για τη καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα. *Επίσημη Εφημερίδα αριθ. L 075 της 16/03/2002 σ. 0038 – 0043.*

Οδηγία 2002/27/ΕΚ της επιτροπής την 13η Μαρτίου 2002 για την τροποποίηση της οδηγίας 98/53/ΕΚ για την καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των περιεκτικοτήτων για ορισμένες προσμειξίες στα τρόφιμα.

Οδηγία 2004/43/ΕΚ της Επιτροπής, της 13ης Απριλίου 2004, για τροποποίηση της οδηγίας 98/53/ΕΚ και της οδηγίας 2002/26/ΕΚ όσον αφορά τους τρόπους δειγματοληψίας και τις μεθόδους ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων αφλατοξίνης και ωχρατοξίνης Α στα τρόφιμα για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας. *Επίσημη Εφημερίδα αριθ. L 113 της 20/04/2004 σ. 0014 – 0016.*

Καν. 472/2002 (τροποποίηση του 466/2001).

Σημαντικά σημεία:

Εκτιμήσεις:

7: “Η ωχρατοξίνη εμφανίζεται σε μια ποικιλία φυτικών προϊόντων όπως είναι τα δημητριακά, οι κόκκοι καφέ, το κακάο και οι ξηροί καρποί, σε ολόκληρο τον κόσμο. Η ωχρατοξίνη έχει επίσης ανιχνευθεί σε προϊόντα όπως τα προϊόντα σίτου, ο καφές, ο οίνος, η μύρα και ο χυμός σταφυλιών αλλά και σε προϊόντα ζωικής προέλευσης όπως τα χοιρινά νεφρά. Η παρουσία της στα τρόφιμα είναι συχνή.”

8: “Η ΟΤΑ έχει καρκινογόνες, νεφροτοξικές, τερατογόνες, ανοσοτοξικές και ενδεχομένως νευροτοξικές ιδιότητες. Μπορεί να έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής στον άνθρωπο.”

9: “Η έκθεση στην ΟΤΑ δεν πρέπει να υπερβαίνει το κατώτατο όριο των τιμών ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης 1.2-14 ng/kg ΣΒ/ ημέρα που έχουν υπολογιστεί από οργανισμούς, δηλαδή 5 ng/ kg ΣΒ/ ημέρα. (1998).”

12: “Στις σταφίδες (κορινθιακή, στην ξανθή σταφίδα και στην σουλτανίνα) έχει παρατηρηθεί υψηλός βαθμός περιεκτικότητας. Οι σταφίδες αποτελούν σημαντική διατροφική πηγή ΟΤΑ για τα άτομα που τις καταναλώνουν σε μεγάλο βαθμό και κυρίως για τα παιδιά.”

Πίνακας 3: Ανώτατα επιτρεπτά όρια ΟΤΑ για διάφορα προϊόντα (Καν. 472/2002).

Προϊόντα	Μέγιστες αποδεκτές περιεκτικότητες (μg/kg ή ppb)	Μέθοδος δειγματοληψίας	Αναλυτική μέθοδος αναφοράς
Σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή σταφίδα και σουλτανίνα)	10	Οδηγία 2002/27/ΕΚ	Οδηγία 2002/27/ΕΚ

Στις 18 Οκτωβρίου του 2004 συμφωνήθηκαν από την Ε.Ε. [1] τα εξής ανώτερα όρια για την ΟΤΑ, τα οποία προωθήθηκαν προς υιοθέτηση από την Επιτροπή:

- Καβουρδισμένος καφές και ground coffee $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.
- Διαλυτός καφές $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.
- Οίνος και άλλα ποτά βασισμένα στον οίνο και/ ή στον μούστο $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.
- Χυμός σταφυλιού και συστατικά χυμού σταφυλιού σε άλλα ποτά $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Πριν καθιερωθεί το όριο των 2 ppb για την Ε.Ε., είχε προταθεί το όριο των 0.5 ppb [71, 72] ενώ κάποιoi ανέμεναν να θεσπιστεί το όριο του 1ppb [33] αλλά τελικά υιοθετήθηκε το όριο που προτάθηκε από τον ΟΙV (2 ppb) για τους οίνους [28] μέχρι να γίνει μια εκτενής αξιολόγηση διακινδύνευσης και ν’ αναζητηθούν προφυλακτικές και θεραπευτικές μέθοδοι [14]. Οι τεχνολογικές και τοξικολογικές έρευνες που αναμένονται στο άμεσο μέλλον είναι πολύ πιθανό να οδηγήσουν στην μείωση του ισχύοντος ανώτερου ορίου, γεγονός που απαιτεί την εγρήγορση των οινοποιείων και κάθε άλλο παρά εφησυχασμό ακόμα κι αν οι συγκεντρώσεις στα προϊόντα τους βρίσκονται κάτω από το ισχύον ανώτερο όριο.

Η υποψία παρουσίας ΟΤΑ σε χυμούς φρούτων και η ενδεχόμενη κατανάλωση των τελευταίων από παιδιά έχει οδηγήσει ερευνητές στο να αναλύουν και αυτά τα τρόφιμα με τα αποτελέσματά τους να δικαιολογούν αυτήν τους την ενέργεια.

Οι επίσημες μέθοδοι δειγματοληψίας και ανάλυσης δημητριακών και αποξηραμένων σταφυλιών παρέχονται από την οδηγία **2002/26/EC**.

5. ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α.

Η ΟΤΑ είναι μια μυκοτοξίνη με καρκινογόνες, νεφροτοξικές, τερατογόνες, ανοσοτοξικές, ηπατοτοξικές και νευροτοξικές **ιδιότητες**. Έχει συνδεθεί με νεφροπάθεια στους ανθρώπους, έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής στον ανθρώπινο οργανισμό²⁰ και είναι καρκινογόνος για τα τρωκτικά. Η επί μακρόν εμμονή της ΟΤΑ στο αίμα των χοίρων και των ανθρώπων σχετίζεται μερικώς, αλλά άμεσα, με την ικανότητα των πρωτεϊνών του πλάσματος να δεσμεύουν ωχρατοξίνες και να αποδεσμεύουν ΟΤΑ στο νεφρό [63]. Η ΟΤΑ είναι αρνητική στα συμβατικά tests μεταλλαξιογένεσης, ωστόσο, με την χρήση λιγότερο συμβατικών μεθόδων παρέχονται αποδείξεις για το γονιδιοτοξικό της δυναμικό.

Η πρόσληψη ΟΤΑ φαίνεται να έχει μερίδιο ευθύνης στην μείωση της ποσότητας και της ποιότητας των σπερματοζωαρίων στους χοίρους [59, 60]. Ο πιο κοινός καρκίνος για τους νέους άνδρες είναι ο καρκίνος των όρχεων. Αυτός έχει υψηλή συχνότητα στις χώρες της βόρειου Ευρώπης, η συχνότητά του αυξάνεται με τον χρόνο και συνδέεται με την φτωχή ποιότητα σπέρματος. Όλα αυτά τα επιδημιολογικά στοιχεία του καρκίνου των όρχεων συνδέονται με την έκθεση σε ΟΤΑ γεγονός που εγείρει την υπόθεση ότι η έκθεση σε ΟΤΑ μπορεί να σχετίζεται στενά με τον καρκίνο των όρχεων [61].

Έχει προταθεί ότι η ενίσχυση της διατροφής με αντιοξειδωτικά, ιδιαίτερα βιταμίνη Ε, πιθανώς και με άλλους παράγοντες όπως καρροτενοειδή και φλαβονοειδή, μπορούν να ελέγξουν μερικώς μερικές από τις τοξικές επιδράσεις της ΟΤΑ [27]. Οι βιταμίνες Α, C και Ε, οι οποίες είναι «σαρωτές» υπεροξειδικών ανιόντων, μπορούν να μειώσουν σε μεγάλο ποσοστό τα επίπεδα συμπλεγμάτων του DNA στα νεφρά²¹ [61]. Παρόμοια, η τεχνητή γλυκαντική ουσία ασπαρτάμη, όντας ισχυρός ανταγωνιστής της ΟΤΑ, βρέθηκε ικανή ν' αποτρέψει τα περισσότερα από τα νεφροτοξικά συμπτώματα που επάγονται από την ΟΤΑ [62]. Η ηπατική και νεφρική βλάβη που προκαλείται σε πειραματόζωα έπειτα από την χορήγηση ΟΤΑ μειώνεται σημαντικά αν ταυτόχρονα χορηγηθεί χυμός από ράγες και φύλλα αμπέλου [58] γεγονός που ίσως οφείλεται στα στιλβένια. Επιπλέον είναι πιθανό και η αιθανόλη να ασκεί προστατευτική δράση έναντι της νεφροτοξικότητας από ΟΤΑ περιορίζοντας την οξειδωτική καταστροφή [47].

²⁰ Περίπου 36 ημέρες [61].

²¹ Τέτοια συμπλέγματα δημιουργούνται από την πρόσληψη ΟΤΑ.

Τα στιλβένια είναι μικρού μοριακού βάρους φαινολικά συστατικά που βρίσκονται σ' έναν αριθμό φυτών, μεταξύ των οποίων και η άμπελος. Στα στιλβένια της αμπέλου εντάσσεται και η ρεσβερατρόλη και οι γλυκοζίτες της. Στους μαλακούς ιστούς, όπως είναι τα φύλλα και οι καρποί, μπορούν να παραχθούν επαγωγικά και τότε δρουν ως φυτοαλεξίνες και σχετίζονται με την αντίσταση της αμπέλου έναντι παθογόνων όπως είναι ο *Botrytis cinerea*, ο *Plasmopara viticola*, ο *Uncinula necator* και ο *Rhizopus stolonifer*. Η παραγωγή των στιλβενίων μπορεί επίσης να προκληθεί από βακτήρια και αβιοτικούς παράγοντες όπως η ακτινοβολία UV, το χλωρίδιο αλουμινίου, το όζον κι άλλα χημικά.

Η σύνθεση των στιλβενίων είναι ένα γενετικό χαρακτηριστικό των φυτών και είναι υψηλή σε γονιδιώτυπους που είναι ανθεκτικοί στις ασθένειες και χαμηλή σε γονιδιώτυπους που είναι επιδεκτικοί στις ασθένειες. Ωστόσο η σύνθεση μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς και καλλιεργητικούς παράγοντες [58] όπως είναι η παροχή λιπασμάτων.

Τελικά βρέθηκε [58] ότι η παραγωγή στιλβενίων διεγείρεται και από είδη του γένους *Aspergillus* (π.χ. *A. carbonarius*). Έπειτα, τα στιλβένια, επηρεάζουν την ανάπτυξη αυτών των ειδών. Έχει βρεθεί [58] ότι η παρουσία αυτών των φυτοαλεξινών, σε συγκεντρώσεις που βρίσκονται συνήθως σε σταφύλια, διεγείρουν την παραγωγή ΟΤΑ. Ωστόσο μεγαλύτερες δόσεις στιλβενίων (10 φορές μεγαλύτερες από τις συνήθως υπάρχουσες στα σταφύλια) μπορούν να παρεμποδίσουν πλήρως την ανάπτυξη των μυκήτων άρα και την παραγωγή ΟΤΑ.

Η ΟΤΑ έχει βρεθεί σ' ένα ευρύ φάσμα **προϊόντων** όπως είναι τα δημητριακά, ο οίνος, τ' αποξηραμένα φρούτα, τα φιστίκια, το κρέας (χοιρινό, πουλερικών, ψαριών κλπ)(λόγο μiasmμένων ζωοτροφών), ο χυμός σταφυλιού, η μπύρα, το γάλα, ο καφές, το κακάο, τα φασόλια, τα όσπρια και τα μπαχαρικά.

Η ανθρώπινη **έκθεση σε ΟΤΑ** φαίνεται ότι προέρχεται από χαμηλού επιπέδου μίανση ενός μεγάλου φάσματος διαφορετικών τροφίμων. Σ' όσες χώρες διερευνήθηκε το περιεχόμενο της ΟΤΑ στο ανθρώπινο αίμα τα αποτελέσματα ήταν θετικά, συχνά με υψηλή συχνότητα αλλά γενικώς, στους υγιείς ανθρώπους, τα επίπεδα ήταν χαμηλά [12]. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της ΟΤΑ στο ανθρώπινο αίμα και γάλα σε αρκετές χώρες υποδεικνύει την ευρεία έκθεση των ανθρώπων στην ΟΤΑ [70]. Η παρουσία της σε αρκετά φυτικά και ζωικά προϊόντα δείχνει διακυμάνσεις από χρονιά σε χρονιά. Ωστόσο η παρακολούθηση ανθρώπινων πληθυσμών έδειξε εμμονή στα αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ταυτόχρονα ότι στην Βόρεια Ευρώπη μέχρι και το 76% του πληθυσμού είναι εκτεθειμένο σε ΟΤΑ. Η μίανση της ανθρώπινης διατροφής έχει ως αποτέλεσμα και την μίανση του **μητρικού γάλακτος**. ΟΤΑ βρέθηκε σε δείγματα μητρικού γάλακτος που συλλέχθηκαν στην Ιταλία κατά την περίοδο 1989-1990, στα οποία το επίπεδο

μίανσης δεν ήταν διαφορετικό από το επίπεδο που βρέθηκε στα σωματικά υγρά ανθρώπων άλλων ευρωπαϊκών χωρών²².

Η ΟΤΑ, η οποία είναι μια ισχυρή νεφροτοξίνη, απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον *Aspergillus ochraceus* στην Νότιο Αφρική το 1965 και έχει μελετηθεί εκτενέστερα ως μαντής δημητριακών που προσβλήθηκαν από τον *Penicillium verrucosum* σε συγκεκριμένες χώρες, όπως αυτές της Βορείου Ευρώπης και τον Καναδά. Μόλις προσφάτως διαπιστώθηκε ότι υπό τις συνθήκες αγρού παράγεται στα δημητριακά, συνθήκες που είναι οριακές για την ανάπτυξη του μύκητα, γεγονός ζωτικής σημασίας για την κατανόηση της αποφυγής του σχηματισμού της.

Σήμερα εκτιμάται ότι είναι αρκετά διαδεδομένη στα τρόφιμα σε χαμηλά επίπεδα. Μόλις προσφάτως προστέθηκαν στην λίστα αυτή ο οίνος, η μύρα, ο χυμός σταφυλιού και τ' αποξηραμένα φρούτα²³.

Τοξικολογικές αξιολογήσεις της ΟΤΑ υποδεικνύουν ότι δεν είναι μόνο οξέως νεφροτοξική αλλά μπορεί επίσης να προκαλέσει καρκίνο των νεφρών ενώ έχει τερατογόνες²⁴ και ανοσοτοξικές επιπτώσεις και είναι πολύ πιθανό να δρα γονιδιοτοξικά. Το 1993 η International Agency for Research on Cancer (IARC) την κατηγοριοποίησε ως ενδεχόμενο καρκινογόνο για τον άνθρωπο (group 2B), βάση επαρκών αποδείξεων καρκινογένεσης από μελέτες σε ζώα και ανεπαρκών αποδείξεων για τους ανθρώπους [2]. Έπειτα από επαναξιολόγησή της το 1997 δεν άλλαξε ο χαρακτηρισμός αφού τα επιδημιολογικά στοιχεία παρέμεναν ανεπαρκή.

Στους αρουραίους η ΟΤΑ επάγει την δημιουργία όγκων στα νεφρά με δόσεις πολύ χαμηλές (70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ΣΒ) ενώ στα ποντίκια η ΟΤΑ προκαλεί όγκους στο ήπαρ. Η ΟΤΑ είναι αρνητική στα standard tests μεταλλαξιογένεσης (π.χ. Ames test), όμως έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προκαλέσει ρήξη του DNA και να προκαλέσει μεταλλάξεις σε τροποποιημένα Ames tests. Έχει βρεθεί ότι προκαλεί συμπλέγματα στο DNA, μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ DNA και κάποιας χημικής ουσίας, γεγονός μάλλον σημαντικό για την εκκίνηση καρκινογένεσης από γονιδιοτοξικούς παράγοντες.

Η ημιζωή της ΟΤΑ στους ανθρώπους και στις μαϊμούδες είναι δέκα φορές μεγαλύτερη²⁵ απ' αυτή που παρατηρείται στους αρουραίους. Έκθεση αρουραίων σε ΟΤΑ μέσω της τροφής για μια περίοδο 6 μηνών (μέση ΟΤΑ στον ορό του αίματος $7\text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) είχε ως αποτέλεσμα μικρή βλάβη γενετικού υλικού σε μερικούς ιστούς και όργανα. Έπειτα από 15 μήνες παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της ρήξης του DNA στα νεφρά. Σε πειράματα κυτταροτοξικότητας, τα

²² Ο προσδιορισμός των επιπέδων ΟΤΑ στο αίμα είναι ένας τρόπος προσδιορισμού της προσληφθείσας από τα ζώα ή τον άνθρωπο ΟΤΑ.

²³ Στην ευρωπαϊκή νομοθεσία άρχισαν να προστίθενται από 2002 και έπειτα (βλ. Καν. 472/2002).

²⁴ Στα ποντίκια, τους αρουραίους, τα hamsters και τα κοτόπουλα αλλά όχι στους χοίρους

²⁵ Διάρκεια ημιζωής της ΟΤΑ στο ανθρώπινο αίμα 35 ημέρες [32].

ανθρώπινα κύτταρα ήταν πιο ευαίσθητα από τα κύτταρα των τρωκτικών και μεταξύ των κυττάρων των τρωκτικών τα πιο ανθεκτικά ήταν τα επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος [8].

Ως προς την οξεία τοξικότητά της, οι τιμές LD₅₀ διαφέρουν πολύ από είδος σε είδος με τον σκύλο να είναι ιδιαίτερος επιδεκτικός. Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες υπέδειξαν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης ΟΤΑ σε δημητριακά και ψωμί, χοίρεια νεφροπάθεια (porcine nephropathy) και περιστατικά χρόνιων δυσλειτουργιών του εγγύς σωληναρίου (urinary tract) στους ανθρώπους. Ενώ και άλλα πειράματα επιβεβαιώνουν τις οξείες αλλά και τις χρόνιες επιπτώσεις στη λειτουργία των νεφρών που προκαλούνται από παρατεταμένη έκθεση.

Πίνακας 4: LOEL's και NOEL's για νεφροτοξικότητα / καρκινογένεση από ΟΤΑ [24].

Είδη	Επίπτωση	Διάρκεια μελέτης	LOEL (µg/kg ΣΒ/ ημέρα)	NOEL (µg/kg ΣΒ/ ημέρα)
Ποντίκι (αρσενικό)	Όγκοι στα νεφρά	2 έτη	4,400	130
Αρουραίος (αρσενικός)	Κaryomegaly των κυττάρων του εγγύς σωληναρίου.	90 ημέρες	15	Δεν επιδείχτηκε
	Όγκοι στα νεφρά	2 έτη	70	21
Χοίρος	Εξασθετισμένη νεφρική λειτουργία	90 ημέρες	8	Δεν επιδείχτηκε
	Προοδευτική (εκτενής) νεφροπάθεια	2 έτη	40	8

Το 1991 είχε εδραιωθεί από την JECFA μια PTWI των 112 ng/kg ΣΒ με βάση την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας που παρατηρήθηκε στους χοίρους (το ποιο ευαίσθητο ζώο στην νεφροπάθεια από ΟΤΑ), για την οποία το NOEL ήταν 0.008 mg/kg Σ.Β./ ημέρα (βλ. πιν. 14) και ως συντελεστής ασφάλειας λήφθηκε το 500. Τότε η JECFA συνέστησε την διεξαγωγή περαιτέρω μελετών για την διευκρίνιση του ρόλου της ΟΤΑ, αλλά και άλλων μυκοτοξινών, στην νεφροπάθεια χοίρων αλλά και ανθρώπων, των μηχανισμών επαγωγής όγκων και τον ρόλο της φαινυλαλανίνης στον ανταγωνισμό των νεφροτοξικών συμπτωμάτων της ΟΤΑ. Η JECFA επαναξιολόγησε την ΟΤΑ το 1995 λαμβάνοντας υπόψη τα νέα τοξικολογικά δεδομένα που προέκυψαν από επιδημιολογικές, γονιδιοτοξικές και νεφροτοξικές μελέτες και αναπροσδιόρισε

την PTWI στα **100 ng/kg ΣΒ²⁶**, ενώ ξαναζήτησε επιπλέον μελέτες για την ΟΤΑ. Ωστόσο το 2002 σε έκθεσή της [5] δηλώνει ότι το PTWI των 100 ng/kg ΣΒ προκύπτει από το NOEL για καρκινογένεση σε αρσενικούς αρουραίους, το πιο ευαίσθητο από μεριάς είδους και φύλου στην καρκινογένεση από ΟΤΑ (βλ. πιν. 14), κάνοντας χρήση συντελεστού ασφαλείας ίσο με 1500. Η υιοθέτηση της PTWI προσέγγισης προτιμήθηκε έναντι της TDI, εξαιτίας της μακράς ημιζωής της ΟΤΑ στους ιστούς.

Απ' αυτό το χρονικό βγαίνουν κάποια συμπεράσματα αλλά και μερικά ερωτήματα. Είναι λογικό, κατά τις πρώτες προσεγγίσεις της JECFA στην ΟΤΑ, να υπολογίζεται το PTWI με βάση το NOEL του πιο ευαίσθητου έναντι της νεφροτοξικότητας ζώου (χοίρος) (αν και ήταν ήδη γνωστή η καρκινογόνος δράση της) και να χρησιμοποιείται ως συντελεστής ασφαλείας το 500. Ωστόσο η «στρογγυλοποίηση» (όπως η ίδια την αναφέρει) που έκανε έπειτα από 4 χρόνια (1995) δικαιολογείται έπειτα από άλλα 7 χρόνια (2002) κάνοντας χρήση πιο αυστηρού συντελεστή ασφαλείας (1500) αλλά χρησιμοποιώντας αυτήν την φορά το NOEL για την καρκινογένεση στους αρσενικούς αρουραίους, που είναι περίπου τριπλάσιο από το NOEL νεφροτοξικότητας στους χοίρους. Επιπλέον η τιμή 1500 για τον συντελεστή ασφαλείας αρχικά μοιάζει ικανοποιητικά υψηλή, ικανή να μας οδηγήσει στην παράβλεψη της αλλαγής του χρησιμοποιούμενου NOEL, αλλά διαπιστώνοντας τον σχεδόν δπλάσιο χρόνο ημιζωής που έχει η ΟΤΑ στον ανθρώπινο οργανισμό σε σχέση με τον χρόνο ημιζωής που έχει στα τρωκτικά και την μεγαλύτερη ευπάθεια των ανθρώπινων κυττάρων στην ΟΤΑ σε σχέση με τα κύτταρα των τρωκτικών, ο αριθμός αυτός αρχίζει να «φαίνεται μικρότερος». Τελικά το μόνο που έμεινε, σχεδόν, σταθερό μέσα σ' αυτά τα 11 χρόνια, τουλάχιστον για την JECFA, ήταν η τιμή του PTWI.

Το 1991 μια ομάδα ειδικών σε θέματα τοξικολογίας από την Σκανδιναβία πρότεινε, με βάση τις καρκινογόνες ιδιότητες της ΟΤΑ, μια μέγιστη ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (TDI) ΟΤΑ στο επίπεδο των **5 ng/kg ΣΒ/ ημέρα**. Οι канаδικές αρχές πρότειναν ένα PTDI **1.2-5.7 ng/kg ΣΒ/ ημέρα** με βάση τις καρκινογόνες ιδιότητές της [3]. **Απ' αυτό το μεγάλο εύρος ανεκτών ημερήσιων προσλήψεων (TDI)(1.2-14 ng/kg ΣΒ/ ημέρα), η Ευρωπαϊκή Επιτροπή θεώρησε σωστό να προτείνει μια μέγιστη τιμή κοντά στο κάτω άκρο αυτού του εύρους (5 ng/kg ΣΒ/ ημέρα).**

Μέχρι το 1995 ελάχιστες χώρες ανά τον κόσμο είχαν κάποια νομοθεσία που αφορούσε την ΟΤΑ. Οι εκτιμήσεις ημερήσιας πρόσληψης που προκύπτουν από αναλύσεις τροφίμων

²⁶ Το όριο αυτό τέθηκε με βάση την νεφροτοξικότητά της.

κυμαίνονται από 0.7 μέχρι 4.7 ng/kg ΣΒ, ενώ αυτές που προκύπτουν από δείγματα αίματος κυμαίνονται από 0.2 έως 2.4 ng/kg ΣΒ/ ημέρα [3]²⁷.

Ένας προβλεπτικός υπολογισμός της συνεισφοράς μεμονωμένων τροφίμων στην συνολική πρόσληψη της ΟΤΑ απέδωσε το 15% αυτής στον ερυθρό οίνο. Έτσι ο ερυθρός οίνος βρίσκεται στην δεύτερη θέση μετά τα δημητριακά τα οποία ευθύνονταν για το 50% της πρόσληψης ΟΤΑ²⁸. Αυτός ο υπολογισμός βασίζεται στην λανθασμένη υπόθεση ότι η μέση πρόσληψη αντιπροσωπεύεται από τον αριθμητικό μέσο όρο. Οι συγκεντρώσεις ΟΤΑ που διαπιστώνονται στους οίνους βρίσκονται εντός ενός μεγάλου εύρους τιμών το οποίο περιέχει και ακραίες τιμές. Το γεγονός αυτό επηρεάζει τον μέσο όρο δυσανάλογα γι' αυτό και αυτός δεν εκφράζει την μέση πρόσληψη. Η μέση πρόσληψη αντιπροσωπεύεται καλύτερα από τον διάμεσο (median value). Από τα δεδομένα μιας εργασίας [31] ο διάμεσος για την ΟΤΑ στον ερυθρό οίνο ήταν 0.02 ppb. Αυτή η τιμή, η οποία πιθανότατα αντιπροσωπεύει την ρεαλιστική «μέση» πρόσληψη ΟΤΑ, χρησιμοποιήθηκε στην εθνική μελέτη μίανσης με ΟΤΑ που εκτελέστηκε από το Γερμανικό Υπουργείο Υγείας (1999). Το αποτέλεσμα ήταν ότι η κατανάλωση οίνου συνεισφέρει μόνο 2% στην συνολική πρόσληψη ΟΤΑ [31].

Η ΟΤΑ παράγεται από τον *Penicillium verrucosum*, από τον *Aspergillus ochraceus* και αρκετά άλλα συγγενικά του είδη καθώς και από τον *Aspergillus carbonarius* και ένα μικρό ποσοστό των απομονώσεων του συγγενικού του *A. niger*²⁹. Αυτές οι τρεις ομάδες ειδών διαφέρουν ως προς τις οικοθέσεις τους, τα προϊόντα που προσβάλλουν και την συχνότητα παρουσίας τους σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Ο *Aspergillus carbonarius* αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες και σχετίζεται με φρούτα κατά την ωρίμανσή τους, ιδιαίτερα με τα σταφύλια. Εξαιτίας των μαύρων του σπορίων, είναι πολύ ανθεκτικός στο ηλιακό φως και επιβιώνει της ηλιοαποξηράνσεως. Αποτελεί την πηγή της ΟΤΑ στα φρέσκα σταφύλια, στα αποξηραμένα σταφύλια και τον οίνο. Επίσης αποτελεί μια πηγή της ΟΤΑ για τον καφέ.

²⁷ Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από πιο πρόσφατη έκθεση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2002) [4].

²⁸ Γεγονός ανησυχητικό αν λάβει κανείς υπόψη ότι τα παιδιά καταναλώνουν σχετικά υψηλές ποσότητες δημητριακών στα πρωινά τους γεύματα.

²⁹ Για πρώτη φορά το 1994 βρέθηκε ότι στελέχη του *A. niger* ήταν ικανά να παράγουν ΟΤΑ.

Πίνακας 5: Σταθερότητα ΟΤΑ [30].

ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΟΤΑ		
Διαλύτης-διάλυμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Μεθανόλη	-20 °C	Μερικά χρόνια
Μεθανόλη	4 °C	> 3 εβδομάδες
Μεθανόλη	Δωματίου	> 5 ώρες
Οίνος	-	> 1 έτος

5.1. Συμπεράσματα JECFA 2002.

Το 2002 και λαμβάνοντας υπόψη τις νέες, σχετικές με την ΟΤΑ, μελέτες η JECFA συμπέρανε τα εξής [5]:

Απορρόφηση, διανομή, μεταβολισμός, έκκριση.

Η ΟΤΑ απορροφάται αργά από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Διανέμεται μέσω του αίματος, κυρίως στα νεφρά, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις να βρίσκονται στο ήπαρ, τους μύες και το λίπος. **Η μεταφορά της στο γάλα έχει αποδειχθεί στους αρουραίους, τα κουνέλια και τους ανθρώπους αλλά είναι ελάχιστη στα μηρυκαστικά εξαιτίας του μεταβολισμού της ΟΤΑ από την μικροχλωρίδα του προστομάχου.** Σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν ο κύριος μεταβολίτης της ΟΤΑ είναι η ωχρατοξίνη α. Η ωχρατοξίνη α και οι άλλοι μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί, έχουν όλοι βρεθεί λιγότερο τοξικοί από την ΟΤΑ. ΟΤΑ εκκρίνεται με τα ούρα και τα κόπρανα. Προσδένεται σε μακρομόρια του ορού του αίματος και ο χρόνος ημιζωής της στον ορό ποικίλει, ανάλογα με το είδος: Στο ποντίκι είναι 24-39 ώρες, **στους αρουραίους 55-120 ώρες, στους χοίρους 72-120 ώρες, 510 ώρες σ' έναν πίθηκο και 840 ώρες σ' έναν άνθρωπο (εθελοντής).**

Τοξικολογικές μελέτες.

Έχει δειχθεί ότι η ΟΤΑ είναι νεφροτοξική σ' όλα τα θηλαστικά που εξετάστηκαν. Ο κύριος στόχος της είναι το renal proximal tubule, όπου ασκεί κυτταροτοξικές και καρκινογόνες επιδράσεις. Σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται ανάλογα με το φύλο και το είδος του ζώου ως προς την νεφροτοξικότητα, με τους χοίρους να είναι οι πιο ευαίσθητοι και με τους αρουραίους και τους ποντικούς να έπονται. Οι δόσεις στις οποίες παρατηρήθηκε καρκινογένεση στα τρωκτικά ήταν υψηλότερες απ' αυτές που προκάλεσαν νεφροτοξικότητα (στα ίδια).

Η ΟΤΑ είναι γονιδιοτοξική τόσο in vitro όσο και in vivo αλλά ο μηχανισμός της γονιδιοτοξικότητάς της είναι ασαφής και δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι προκαλείται από άμεση αλληλεπίδραση με το DNA.

Η ΟΤΑ μπορεί να διαπεράσει τον πλακούντα και είναι εμβρυοτοξική και τερατογόνος στους αρουραίους και στα ποντίκια. Έχει ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις σε ένα σύνολο ζώων. Ωστόσο οι ανοσολογικές και τερατογόνες επιδράσεις έχουν παρατηρηθεί μόνο υπό δόσεις κατά πολύ μεγαλύτερες αυτών που προκαλούν νεφροτοξικότητα.

Παρατηρήσεις στους ανθρώπους.

ΟΤΑ έχει βρεθεί σε ανθρώπινα δείγματα αίματος, κυρίως σε χώρες με ήπια ψυχρό κλίμα του βορείου ημισφαιρίου, ωστόσο δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης σε ανθρώπους. Η JECFA διαπίστωσε ότι η ΟΤΑ βρίσκεται συχνά σε υψηλές μέσες συγκεντρώσεις σε δείγματα αίματος που λαμβάνονταν από ανθρώπους που ζούσαν σε περιοχές όπου συμβαίνει μια θανατηφόρος ασθένεια των νεφρών (γνωστή ως BEN), η οποία σχετίζεται με υψηλή συχνότητα όγκων του εγγυούς νεφρικού σωληναρίου (upper urinary tract). Ωστόσο, παρόμοιες μέσες συγκεντρώσεις έχουν αναφερθεί και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες όπου δεν παρατηρείται αυτή η ασθένεια. Η JECFA συμπέρανε ότι τα επιδημιολογικά και τα κλινικά δεδομένα δεν παρέχουν μια βάση για τον υπολογισμό της καρκινογόνου δυναμικότητας της ΟΤΑ στους ανθρώπους και ότι η αιτιολόγηση της BEN μπορεί να αφορά άλλους νεφροτοξικούς παράγοντες.

Αναλυτικές μέθοδοι.

Αξιόπιστες και έγκυρες μέθοδοι έχουν δημιουργηθεί για την ανάλυση της ΟΤΑ στον αραβόσιτο, το κριθάρι, σίκαλη, το σιτάρι, τον καβουρδισμένο καφέ, τον οίνο και την μύρα οι οποίες βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία με ανίχνευση φθορισμού. Το όριο ποσοτικοποίησης ήταν $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ για τον οίνο και τον ζύθο και $0.3-0.6 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ για άλλα προϊόντα. Αυτές οι μέθοδοι έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανάλυση της ΟΤΑ και σε άλλα δημητριακά, προϊόντα δημητριακών και αποξηραμένα φρούτα. Δεν υπάρχουν επισήμως έγκυρες μέθοδοι για την ανάλυση της ΟΤΑ στο ανθρώπινο αίμα.

Πρωτόκολλα δειγματοληψίας.

Δεν έχουν δημοσιοποιηθεί πρωτόκολλα δειγματοληψίας για τον προσδιορισμό της ΟΤΑ σε τρόφιμα και δεν έχουν αναφερθεί λεπτομέρειες της μεταβλητότητας στην δειγματοληψία.

Κατά τις μελλοντικές έρευνες για την ΟΤΑ στα δημητριακά και στα προϊόντα τους θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες διαδικασίες δειγματοληψίας.

Κατανάλωση τροφίμων και αποτίμηση διατροφικής πρόσληψης.

Αποτιμώντας την πρόσληψη της ΟΤΑ με βάση τα δεδομένα της μέσης κατανάλωσης, συνδυαζόμενα με το μέσο επίπεδο μίανσης για το κάθε τρόφιμο και λαμβάνοντας υπόψη μια διατροφή ευρωπαϊκού τύπου, η μέση συνολική **πρόσληψη ΟΤΑ εκτιμήθηκε στα 45 ng/kg σωματικού βάρους ανά βδομάδα**, για ένα ενήλικο άτομο.

(Από μετέπειτα αποτιμήσεις διατροφικής πρόσληψης ΟΤΑ στην Ε.Ε. [4] βρέθηκε ότι η συνολική εβδομαδιαία πρόσληψη ΟΤΑ για τις χώρες της Ε.Ε. κυμαίνονταν από **6.16 μέχρι 46.48 ng/kg ΣΒ/ εβδομάδα** ανάλογα με την χώρα και την ομάδα πληθυσμού που αναλογίζονταν.).

Τα **δημητριακά** και ο **οίνος** συνεισφέρουν στην μέση πρόσληψη γύρω στα **25 και 10 ng/kg Σ.Β. ανά βδομάδα αντίστοιχα**, ενώ ο χυμός σταφυλιού και ο καφές συνεισφέρουν το καθένα από 2-3 ng/kg σωματικού βάρους ανά βδομάδα. Από τα άλλα προϊόντα τροφίμων (αποξηραμένα φρούτα, μπίρα, τσάι, γάλα, κακάο, πουλερικά, όσπρια), το καθένα συνεισφέρει λιγότερο από 1 ng/kg σωματικού βάρους ανά βδομάδα.

Πρόληψη και έλεγχος.

Καθώς ο σχηματισμός της ΟΤΑ εξαρτάται από την μυκητιακή πηγή, τον τύπο της καλλιέργειας και την γεωγραφική του προέλευση, ο έλεγχος της παραγωγής ΟΤΑ από κάθε είδος μυκήτων αναλογίστηκε ξεχωριστά.

Τα διαθέσιμα στοιχεία υποδεικνύουν ότι ο *A. carbonarius* και ο *A. niger* δεν είναι παθογόνα σε **φρούτα**, όπως είναι τα σταφύλια, και ως εκ τούτου, δεν μπορούν να εισέλθουν σε ακέραια φρούτα. Ωστόσο, η μηχανική ή χημική βλάβη του φρούτου ή η βλάβη που προκαλείται από έντομα ή μικροοργανισμούς μπορεί να επιτρέψει την μυκητιακή προσβολή των ιστών του φρούτου. Γι' αυτό ο **έλεγχος της ανάπτυξης του *A. carbonarius* και του *A. niger* στα σταφύλια βασίζεται στον έλεγχο των παθογόνων μυκήτων, των μηχανικών βλαβών και της διάρρηξης εξαιτίας της βροχής πριν την συγκομιδή.**

Αξιολόγηση-εκτίμηση.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η ΟΤΑ προκαλεί καρκινογένεση είναι άγνωστος, αν και έχουν προταθεί τόσο γονιδιοτοξικοί όσο και μη γονιδιοτοξικοί τρόποι δράσης. Διατηρήθηκε το **PTWI στην τιμή των 100 ng/kg** και θα υπάρξει επιπρόσθετη επανεξέταση το 2004. Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη τιμή του συντελεστή ασφάλειας που εφαρμόζεται (1500) στην

NOEL, , ώστε να υπολογιστεί το PTWI για την νεφροτοξικότητα. Η NOEL που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή για **καρκινογένεση σε αρσενικούς αρουραίους**, οι οποίοι είναι οι πιο ευαίσθητοι, τόσο από μεριάς είδους όσο και από μεριάς φύλου.

Πριν να εκφράσει την άποψη αυτή η JECFA, εκφράζονταν διάφορες διαφωνίες, όπως: “Δεν είναι σαφές γιατί το όριο των 5 ppb είναι καταλληλότερο από άλλα, όπως για παράδειγμα των 2 ppb, των 10 ppb ή των 20 ppb. Γι’ αυτό είναι σημαντικό για την JECFA να εξετάσει την αποτίμηση κινδύνου διότι το όριο των 5 ppb μπορεί να προκαλέσει μεγάλα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο. Χρειάζεται να κατανοήσουμε ποια είναι τα οφέλη της δημόσιας υγείας σε σύγκριση με την δυνατότητα καθιέρωσης των διάφορων ορίων”[6]. Τέτοιες απόψεις ενισχύονται από το μεγάλο εύρος που παρουσιάζουν οι τιμές της ανώτατης ανεκτής εβδομαδιαίας πρόσληψης που παρουσιάζονται από διάφορες ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο.

Η παρουσία της OTA είναι σαφώς ανεπιθύμητη στις τροφές και η Ε.Ε. έθεσε μέγιστα όρια³⁰ για την OTA της τάξεως των:

- 5 μg/kg για τους ακατέργαστους σπόρους δημητριακών συμπεριλαμβανομένων του ρυζιού και του buckwheat
- 3 μg/kg για προϊόντα που προκύπτουν από τα δημητριακά και προορίζονται για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση, και
- 10μg/kg για σταφίδες.

Η κατανόηση των παραγόντων που οδηγούν στον σχηματισμό της OTA θα επιτρέψει την εύρεση και εφαρμογή στρατηγικών που θα περιορίσουν τον σχηματισμό της, γεγονός που σε συνδυασμό με την νομοθεσία, θα διασφαλίσει την επαρκή προστασία του καταναλωτή.

³⁰ Καν. 472/2002

6. ΜΥΚΗΤΟΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ.

Από τα σταφύλια, όσον αφορά το γένος των *Aspergilli*, οι οποίοι συχνά αναφέρονται ως η κυρίαρχη μυκητοχλωρίδα των σταφυλιών (ιδιαίτερα οι μαύροι *Aspergilli*) [23], πιο συχνά απομονώνονται τα είδη: *A. niger*, *A. flavus* (παραγωγός αφλατοξινών), *A. carbonarius*, *A. japonicus*, και *A. terreus*. Από το γένος *Penicillium* πιο συχνά απομονώνονται οι: *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*³¹, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. purpurogenum*, *P. tomii* και *P. simplicissimum*, ενώ συχνά απομονώνονται είδη του γένους *Alternaria* (κυρίως ο *Alternaria alterata*) (πολλές φορές αποτελεί την κυρίαρχη μυκητοχλωρίδα [13,16]). Είδη του *Alternaria* είναι σημαντικοί μαντές λαχανικών, φρούτων και προϊόντων δημητριακών. Σε ποικίλα τρόφιμα έχουν αναφερθεί τοξίνες που παράγονται απ' αυτά τα είδη (*alternariol*, *alternariol monomethyl ether*, *tenuazonic acid*, *altertoxin I, II* και *III*) [16]. Ο *Botrytis cinerea* θεωρείται η πιο σοβαρή αιτία αλλοίωσης των σταφυλιών.

Οι *Aspergilli* θεωρούνται δευτερεύοντες παρά πρωτεύοντες παράγοντες αλλοίωσης επειδή στερούνται μηχανισμών εισβολής και προσβολής των φυτικών ιστών και εδραιώνονται μόνο έπειτα από την προσβολή των ραγών από έναν παθογόνο οργανισμό ή την βλάβη τους από κάποιο φυσικό ή φυσιολογικό αίτιο. Ωστόσο είναι παρόντες και απομονώνονται και από ράγες που δεν παρουσιάζουν ορατά συμπτώματα. Παρόλα αυτά, σε μια εργασία [51] διαπιστώθηκε ότι ο *A. carbonarius* μπορεί να αποικεί και να διεισδύει στις μη διερρηγμένες ράγες, σε αντίθεση με άλλους μύκητες του ίδιου είδους. Ωστόσο μόνο όταν αυτές είναι διερρηγμένες ξεδιπλώνεται πλήρως η επιθετικότητά του η οποία, σε συνδυασμό με το υψηλό ΟΤΑ-παραγωγικό δυναμικό του, οδηγεί σε αξιόλογες συγκεντρώσεις ΟΤΑ. Η ικανότητά του να αποικεί και να διεισδύει σε μη διερρηγμένες ράγες θα έπρεπε να ήταν αναμενόμενη αναλογιζόμενοι τις εργασίες που εμφανίζονται κατά καιρούς και αφορούν την παραγωγή ενζύμων (β -D-ξυλοζιδάση [65], πηκτινάσες [67, 68]) από στελέχη του.

Είναι δυνατό να βρεθεί ΟΤΑ ακόμα και σε σταφύλια που δεν παρουσιάζουν ορατά συμπτώματα μυκητιακής προσβολής αλλά σε συγκεντρώσεις που δεν προκαλούν ανησυχία [49].

³¹ Παράγει ένα ευρύ φάσμα τοξικών ενώσεων όπως: Roquefortine C, meleagrins και penicillin.

Πίνακας 6: Γένη που απομονώνονται από σταφύλια.

<i>Alternaria</i>	<i>Ulocladium</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Phytophthora</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Geotrichum</i>
<i>Botrytis</i>	<i>Moniliella</i>
<i>Fusarium</i>	

Πίνακας 7: Είδη των *Aspergillus* και *Penicillium* που απομονώνονται από σταφύλια.

Aspergillus	Penicillium	
<i>A. alliaceus</i> +++	<i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. implicatum</i>
<i>A. carbonarius</i> +++	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. janczewskii</i>
<i>A. clavatus</i>	<i>P. canescens</i>	<i>P. lividum</i>
<i>A. foetidus</i> +	<i>P. citrinum</i>	<i>P. minioluteum</i>
<i>A. flavus</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. minioluteum</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>P. corylophilum</i>	<i>P. oxalicum</i>
<i>A. japonicus aculeatus</i>	<i>P. crustosum</i>	<i>P. pinophilum</i>
<i>A. melleus</i>	<i>P. decumbens</i>	<i>P. purpurogenum</i>
<i>A. niger</i> +	<i>P. expansum</i>	<i>P. restrictum</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>P. echinulatum</i>	<i>P. roquefortii</i>
<i>A. ochraceus</i> +++	<i>P. fellutanum</i>	<i>P. simplicissimum</i>
<i>A. parasiticus</i>	<i>P. funiculosum</i>	<i>P. spinulosum</i>
<i>A. ustus</i>	<i>P. glabrum</i>	<i>P. sclerotiorum</i>
<i>A. terreus</i>	<i>P. griseofulvum</i>	<i>P. tomii</i>
<i>A. tamari</i>	<i>P. italicum</i>	<i>P. verruculosum</i>
<i>A. versicolor</i>		<i>P. variabile</i>
<i>E. varicolor</i>		
<i>A. wenti</i>		

Με έντονη γραμματοσειρά (bold) αναγράφονται τα είδη που απομονώνονται συχνότερα από σταφύλια.

Το «+» υπάρχει στους εν δυνάμει παραγωγούς ΟΤΑ.

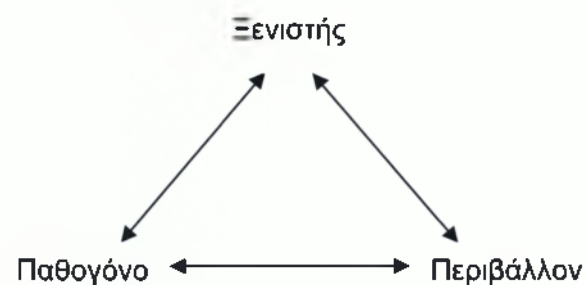
Το *P. verrucosum* είναι το μόνο του γένους *Penicillium* που μπορεί να παράγει ΟΤΑ (πέρα από το *P. nordicum*) αλλά δεν έχει απομονωθεί ποτέ από σταφύλια. Αναπτύσσεται καλά υπό ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (4-31°C) ενώ οι *Aspergilli* που παράγουν ΟΤΑ απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες (12-39°C) [15].

Το *P. chrysogenum* αναφέρεται από μια εργασία [15] ως ικανό να παράγει ΟΤΑ αλλά κανένα από τα στελέχη που απομονώθηκαν δεν την παρήγαγε ενώ και μια άλλη εργασία που εξέτασε 230 στελέχη αυτού του είδους δεν ανίχνευσε ΟΤΑ. Δεν θεωρείται πλέον ΟΤΑ-παραγωγικό είδος.

7. ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ, ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΚΑΙ ΟΙΝΟΣ.

Η ΟΤΑ αναφέρθηκε για πρώτη φορά στον οίνο και τον χυμό σταφυλιών το 1996 (Zimmerli and Dick) και σήμερα θεωρείται ότι ο οίνος είναι η δεύτερη κύρια πηγή έκθεσης του ανθρώπου στην ΟΤΑ έπειτα από τα δημητριακά και πριν τον καφέ και την μύρα [15]. Μόλις το 1999 απομονώθηκαν ΟΤΑ-παραγωγικοί *A. carbonarius* και *A. niger* από αποξηραμένες ράγες σταφυλιού. Μέχρι τότε πιστευόταν ότι οι γνωστοί παραγωγοί ΟΤΑ, *A. ochraceus* και *P. verrucosum*, ήταν υπεύθυνοι για την ΟΤΑ και στα σταφύλια. Η παρουσία ΟΤΑ-παραγωγικών μυκήτων στο σταφύλι μπορεί να οδηγήσει σε μίανση του με ΟΤΑ πριν την συγκομιδή. Είναι πλέον αποδεκτό ότι το μόνο ΟΤΑ παραγωγικό είδος από το γένος *Penicillium* είναι ο *Penicillium verrucosum*, ο οποίος πολύ σπάνια απομονώνεται από τα σταφύλια.

Για την συνολική θεώρηση του θέματος της ΟΤΑ στα σταφύλια απαιτείται η χρήση της επιδημιολογίας. Επιδημιολογία είναι η μελέτη των αλλαγών της έντασης μιας ασθένειας σ' έναν πληθυσμό οικοδεσποτών (ξενιστές), μέσα στον χρόνο, που εξετάζει πώς μια ασθένεια, που προκύπτει από την αλληλεπίδραση ξενιστή-



Εικόνα 10: Τρίγωνο ασθένειας.

παθογόνου, μπορεί να επηρεαστεί από το περιβάλλον. Αυτό απεικονίζεται στην εικ. 10, από την οποία όμως λείπει η τρίτη διάσταση, ο χρόνος. Στην περίπτωση όμως της ΟΤΑ στα σταφύλια η «ασθένεια» δεν είναι μια εμφανής διαφοροποίηση του οικοδεσπότη αλλά ο σχηματισμός ενός μεταβολίτη, της ΟΤΑ.

Δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα η συνεισφορά του οίνου στην μέση ημερήσια πρόσληψη ΟΤΑ. Από μόνος του ο οίνος μπορεί να τροφοδοτήσει την διατροφή ενός μέσου πότη με ένα ποσό ΟΤΑ ίσο ή ακόμα και μεγαλύτερο από την TDI που συνιστάται από την Επιστημονική Επιτροπή για τα Τρόφιμα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

Κατά την διεξαγωγή ερευνών στην Ευρώπη [10] σε σταφύλια, απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν ΟΤΑ-παραγωγικοί μύκητες. Απ' αυτούς οι *Aspergilli* section Nigri κυριαρχούσαν και φαίνεται ότι ο *A. carbonarius* είναι ο κύριος υπεύθυνος, αφού τα περισσότερα από τα στελέχη του βρέθηκαν ικανά να παράγουν μεγάλα ποσά ΟΤΑ. Μερικές φορές απομονώνονται και ισχυροί παραγωγοί ΟΤΑ του *Aspergillus* section Circumdati (π.χ. *A. ochraceus* και *A. alliaceus*), αλλά ο αριθμός των απομονώσεών τους είναι πολύ μικρός (συνήα λιγότερο του 1% των συνολικών απομονώσεων).

Οι έρευνες σχετικά με τον σχηματισμό ΟΤΑ στα σταφύλια ξεκίνησαν πρόσφατα και τα διαθέσιμα στοιχεία είναι λίγα αλλά αυξάνονται γρήγορα.

Σύμφωνα με μελέτες [11, 23, 45, 64], ο *A. carbonarius* είναι ικανός να αναπτυχθεί σ' ένα εύρος ενεργοτήτων νερού 0.88 μέχρι 0.99 και θερμοκρασίας από τους 25 έως τους 35 °C (Σε θερμοκρασίες μικρότερες των 15 °C δεν παρατηρείται ανάπτυξη). Σε συνθήκες 25-35 °C και a_w 0.985-0.95 η φάση προσαρμογής διαρκεί λιγότερο από 24 ώρες. Γενικά η **μέγιστη ανάπτυξη παρατηρείται σε υψηλές θερμοκρασίες 30-35 °C** και η ιδανική a_w για ανάπτυξη ποικίλει, ανάλογα με το στέλεχος από 0.93 μέχρι 0.987. Οι ιδανικές συνθήκες παραγωγής ΟΤΑ φαίνεται ότι εξαρτώνται από το εκάστοτε στέλεχος. Μερικά παράγουν την **μέγιστη ποσότητα στους 15-20 °C** και υπό a_w 0.95-0.98 έπειτα από 10 ημέρες.

Το υπόστρωμα καλλιέργειας φαίνεται να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ΟΤΑ με την εξής σειρά εύνοιας:

CYA>YES>>> SGM³²

Συγκεκριμένα, στους 20 °C και έπειτα από 10 ημέρες επώασης στελέχη των *A. carbonarius* δίνουν 10 μέχρι 400 φορές περισσότερη ΟΤΑ σε CYA απ' ότι σε SGM [11, 23], ενώ σε YES δίνουν 4 φορές λιγότερη ΟΤΑ απ' ότι στο CYA [23]. Όσον αφορά τους *A. niger* αυτοί δίνουν περίπου 2.5 φορές μεγαλύτερη ποσότητα ΟΤΑ στο YES απ' ότι στο CYA (στους 25 °C) [23].

Από εργασίες που έγιναν σε αμπελώνες της βορείου και νοτίου Ιταλία το 1999 και το 2000 [22], όπου βρέθηκε ότι στην νότιο Ιταλία οι απομονώσεις των ΟΤΑ-παραγωγικών μυκήτων ήταν πολύ περισσότερες απ' αυτές της βορείου Ιταλίας, η μόνη αξιοσημείωτη διαφορά ήταν η μέση ημερήσια θερμοκρασία. Στην βόρειο Ιταλία κυμαίνονταν στους 13-23 °C (άθροισμα degree-days 3650 από 1^η Απριλίου μέχρι 30 Σεπτεμβρίου) και για τα δύο έτη, ενώ στην νότιο Ιταλία στους 15-30°C για το 1999 (άθροισμα degree-days 4500) και στους 19-30°C για το 2000 (άθροισμα degree-days 4800). Αναλογιζόμενοι μόνο τους αμπελώνες της νοτίου Ιταλίας, το περιεχόμενο της ΟΤΑ ήταν πολύ μεγαλύτερο κατά το έτος 1999 απ' ότι κατά το έτος 2000. Η σημαντικότερη διαφορά αυτών των δυο ετών ήταν η βροχόπτωση, όπου το 1999 ήταν 305 mm (Απρίλιος- Σεπτέμβριος) και το 2000 ήταν 62mm (για την ίδια χρονική περίοδο και με 0 mm για τον μήνα Αύγουστο). **Ωστόσο** οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης ΟΤΑ από αμπελώνα σε αμπελώνα για το έτος 1999 (μιλώντας πάντα για την νότιο Ιταλία) ήταν πολύ μεγάλες (0.03, 0.15, 1.51, 1.78 και 13.08 ppb ΟΤΑ σε χυμούς σταφυλιών από σταφύλια κατά την ωρίμανση). Τα αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων και το περιεχόμενο της ΟΤΑ

³² Synthetic grape juice medium.

πολύ πριν την συγκομιδή (early varaison) συχνά ανατρέπονταν ριζικά μέχρι την συγκομιδή και δεν μπορούσαν να προεξοφλήσουν την τελική έκβαση της κατάστασης, γεγονός που παρατηρείται και από τα αποτελέσματα άλλων εργασιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ψεκασμοί στον νότο ήταν γύρω στους 10 ανά έτος ενώ στον βορά γύρω στους 15 ανά έτος, χωρίς να γνωρίζουμε πια είναι η επίδρασή τους στον πληθυσμό των *A. niger*.

Σημαντική πρέπει να είναι και η επίδραση του σχήματος μόρφωσης. Δύο αμπελώνες της νοτίου Ιταλίας βρισκόμενοι στην ίδια τοποθεσία, υπό τον ίδιο ιδιοκτήτη, ίδιας ποικιλίας (Negroamaro), εφαρμόζοντας τις ίδιες καλλιεργητικές πρακτικές και με μόνη διαφορά το σχήμα μόρφωσης³³, έδωσαν πολύ διαφορετικές συγκεντρώσεις ΟΤΑ κατά το ίδιο έτος (1999). Τα πρέμνα με μόρφωση διπλό κορδόνι και κλάδεμα κατά κεφαλές έδωσαν 1.51 grb και αυτά με μόρφωση κύπελλο και κλάδεμα κατά κεφαλές 13.08 grb σε χυμό σταφυλιών κατά το στάδιο της ωρίμανσης.

Από τα παραπάνω και ριψοκινδυνεύοντας μια διαβάθμιση των παραγόντων, ως προς την συμβολή τους στην δημιουργία ΟΤΑ, μπορούμε να καταλήξουμε στην εξής σειρά:

Θερμοκρασία > βροχόπτωση > άλλοι παράγοντες

Όπου στους άλλους παράγοντες περιλαμβάνονται το μικροκλίμα του κάθε αμπελώνα (terroir), οι καλλιεργητικές τεχνικές (σχήμα μόρφωσης, αποστάσεις πρέμνων, αντιμετώπιση λοιπών παθογόνων), η κατάσταση των πρέμνων (τροφοπενίες, νηματώδεις, ιώσεις, ηλικία πρέμνων) κ.α.

Τα αποτελέσματα αναλύσεων υποδεικνύουν υψηλότερες συγκεντρώσεις στους ερυθρούς απ' ότι στους λευκούς και τους ροζέ οίνους. Παρουσιάζεται επίσης ένας συσχετισμός με το γεωγραφικό πλάτος της περιοχής παραγωγής: Όσο νοτιότερα βρίσκεται η περιοχή προέλευσης, τόσο μεγαλύτερη είναι και η συγκέντρωση ΟΤΑ. Παρατηρείται ότι οι ερυθροί οίνοι που προέρχονται από περιοχές με Μεσογειακό κλίμα (Νότια Ευρώπη, Βόρεια Αφρική) είναι περισσότερο μiasμένοι απ' αυτούς της κεντρικής Ευρώπης. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μαύροι *Aspergilli* είναι ανθεκτικοί στην ηλιακή έκθεση και στα ζεστά και ξηρά κλίματα.

Ο ερυθρός οίνος είναι ο πιο δύσκολος οίνος στην ανάλυση της ΟΤΑ εξαιτίας της παρουσίας διάφορων ενώσεων, όπως είναι οι ανθοκυάνες και άλλες χρωστικές που μπορούν να παρέμβουν στην δέσμευση της ΟΤΑ από το αντίσωμα [26].

³³ Χωρίς όμως να δίνονται στοιχεία για διαφορές σχετικά με την ηλικία των πρέμνων και την υγεία τους (ιώσεις, ίσκα κλπ.).

8. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΤΑ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ.

Με την μορφή λίστας συνοψίζονται τα αποτελέσματα εργασιών που διερευνούν τις συγκεντρώσεις ΟΤΑ στους οίνους:

1. Κατά την αποτίμηση διατροφικής πρόσληψης ΟΤΑ από τον πληθυσμό της Ε.Ε. [4] (2002), συγκεντρώθηκαν, μεταξύ των άλλων, και δεδομένα για την περιεκτικότητα ΟΤΑ στους οίνους από 10 κράτη-μέλη. Από τα 1470 δείγματα που εξετάστηκαν (οίνοι γλυκοί, αφρώδη, ερυθροί, λευκοί, ροζέ, εισαγόμενοι κλπ.) το 59% βρέθηκε θετικό σε ΟΤΑ³⁴ με τα επίπεδα μίανσης να κυμαίνονται από 0.003 ppb (Ισπανία) μέχρι 15.60 ppb (Ιταλία). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των χωρών δεν ήταν εφικτή λόγω των διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης και των διαφορετικών ορίων ανίχνευσης των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο ο ερυθρός και ο γλυκός οίνος εμφανίζουν την μεγαλύτερη συχνότητα αλλά και τα υψηλότερα επίπεδα μίανσης σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους οίνων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν μόνο τα δείγματα που περιείχαν ΟΤΑ σε επίπεδα μεγαλύτερα από τα όρια ανίχνευσης³⁵, η μέση περιεκτικότητα των οίνων σε ΟΤΑ αποτυπώνεται στον πίνακα 19.

Πίνακας 8: Μέσες συγκεντρώσεις ΟΤΑ οίνων μισμένων σε επίπεδα άνω του ανιχνεύσιμου, στην Ε.Ε.

Βόρεια Ευρώπη	Νότια Ευρώπη	Ευρώπη στο σύνολό της
0.338ppb	1.664 ppb	0.591 ppb

2. Πίνακας 9: [25]. Έτος 2001.

Προέλευση	Ευρώπη, Αμερική, Νέα Ζηλανδία, Νότιο Αφρική, Αυστραλία.		
Όριο ανίχνευσης	0.05 ppb		
Όριο ποσοτικοποίησης	0.10 ppb		
Οίνοι	362 Λευκοί	14 (3.9%) > 0.05 ppb	362 < 0.100 ppb
	580 Ερυθροί	96 (16.6%) > 0.05 ppb	2 > 0.100 ppb
			1 Αυστραλία
			1 Ισπανία

³⁴ Το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 72% αναλογιζόμενοι μόνο την νότια Ευρώπη.

³⁵ Τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονταν από 0.003 ppb μέχρι 1 ppb.

Κατάταξη χωρών ως προς την παρουσία ΟΤΑ στους ερυθρούς οίνους τους:

Ισπανία (33%) > Αργεντινή (29%) > Πορτογαλία (22%) > Κεντρική Ευρώπη (22%) > Ελλάδα (17%) > Ιταλία (16%) > Η.Π.Α. (11%).

3. [25]. (Έτος 2004).

Όριο ανίχνευσης	0.01 ppb
Όριο ποσοτικοποίησης	0.05 ppb
Οίνοι	116 (Ονομασίας Προέλευσης από την περιοχή της Valencia).

Κατάταξη οίνων σύμφωνα με την περιεκτικότητά τους σε ΟΤΑ:

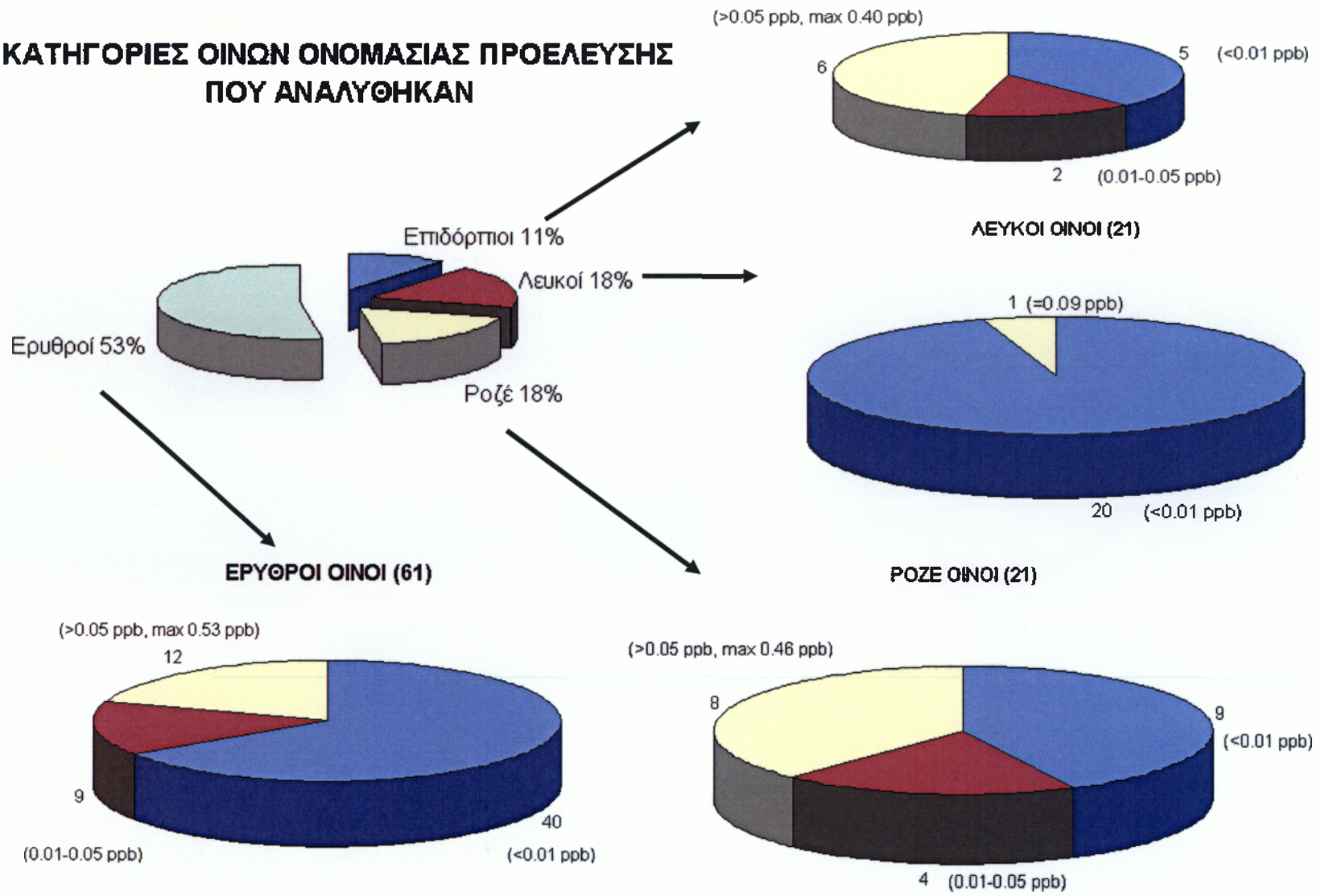
Ερυθροί>Ροζέ> Επιδόρπιοι> Λευκοί.



Εικόνα 1: (a) Utiel-Requena, (b) Valencia και (c) Alicante από την Valencia Community.

Αναλυτικότερα για τους 116 οίνους που αναλύθηκαν:
 Πίνακας 10: Αποτελέσματα ανάλυσης 116 οίνων Ονομασίας Προέλευσης από
 Valencia, Έτος 2004 [25].

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΟΙΝΩΝ ΟΝΟΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ

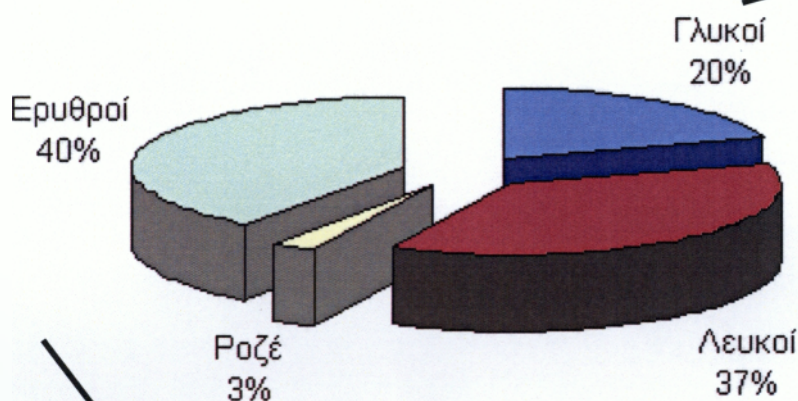


4. [27] (Έτος 2003). Οι περισσότεροι από τους οίνους που αναλύθηκαν περιείχαν σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις ΟΤΑ (0.02-0.5 ppb). Οι γλυκοί οίνοι είχαν υψηλότερα επίπεδα από τους ξηρούς. Αναλυτικά:

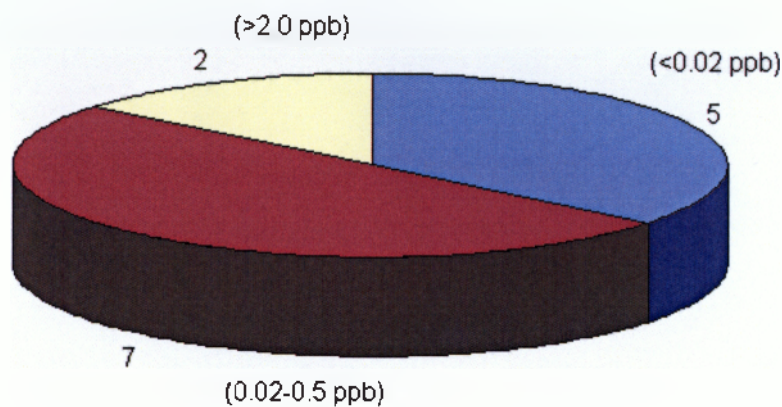
Πίνακας 11: Αποτελέσματα ανάλυσης 35 οίνων Ελληνικής προέλευσης. 2003, [27].

Προέλευση	Ελλάδα			
Έτη παραγωγής	1997-1999			
Οίνοι (35)	Ερυθροί (14)			
	Λευκοί (13)			
	Γλυκοί (7)			
	Ροζέ (1)			
Όριο ανίχνευσης	0.02 ppb			
Αριθμός θετικών δειγμάτων	22			
Μέγιστη συγκέντρωση	3.20 ppb			
Δείγματα με συγκεντρώσεις >2ppb	Έτος παραγωγής	1999		
	Περιοχή	Νησιά Αιγαίου		
	Είδος	Γλυκός	Ερυθρός	Ερυθρός
	Συγκέντρωση ΟΤΑ (σε ppb)	3.20	2.51	2.47

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΟΙΝΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ

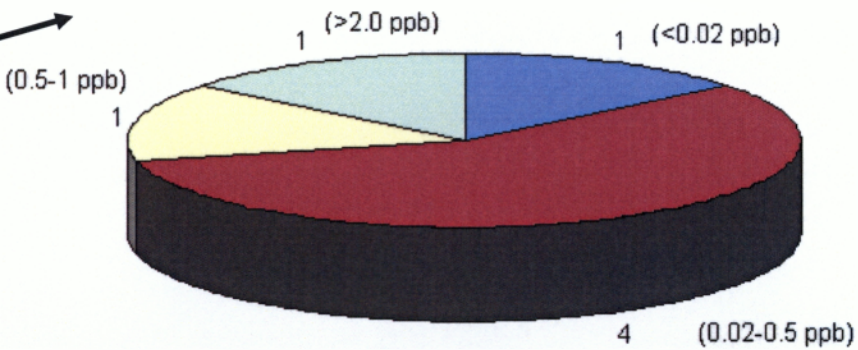


ΕΡΥΘΡΟΙ (14)

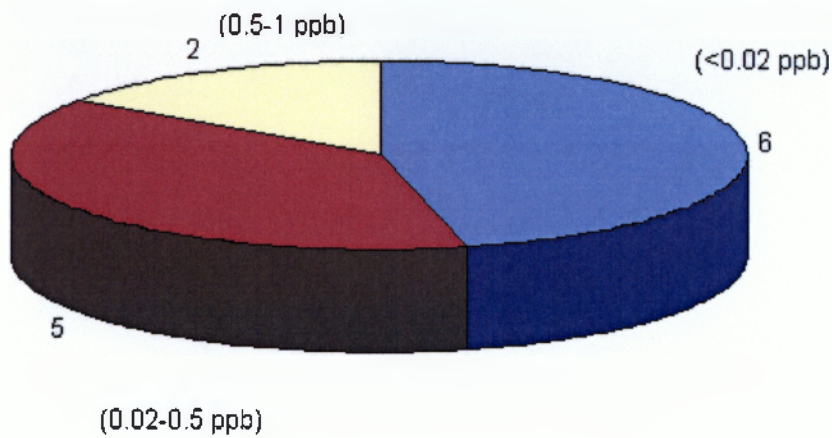


Πίνακας 12: Αποτελέσματα ανάλυσης 35 οίνων Ελληνικής προέλευσης. Γραφήματα. 2003, [27].

ΓΛΥΚΟΙ (7)



ΛΕΥΚΟΙ (13)



Πίνακας 13: Αποτελέσματα άλλων εργασιών ανάλυσης οίνων [27].

Πηγή	Προέλευση οίνων	Αριθμός δειγμάτων	Επίπεδα μίανσης (σε ppb)		
				Λευκοί ³⁶	
Zimmerli and Dick, 1996	Ελβετική αγορά	133	Max. 0.338	Λευκοί ³⁶	0.011
				Ερυθροί	0.079
Majerus and Otteneder, 1996	Γαλλία	20	0.13-0.78	Λευκοί	0.007
				Ερυθροί	0.2
MAFF, UK, 1997	Αγορά U.K.	20	Οι 4 από τους 20 είχαν 0.2-4.0 ppb		
Visconti <i>et al.</i> 1999	Ιταλία	56	75% λευκών θετικό 95% ερυθρών θετικό Max. 7.6 ppb	Λευκοί ³⁷	0.29
				Ερυθροί	1.24
Tateo <i>et al.</i> 2000	Αγορά (οίνοι σε ασκούς)	-	97% των δειγμάτων ήταν μiasμένα με επίπεδα 0.05-3.8 ppb.		
Ospital <i>et al.</i> 1998			Μiasμένο το 50% των δειγμάτων	Λευκοί ³⁸	0.01-0.02
				Ερυθροί	0.01-0.27

Πίνακας 14: Γλυκοί οίνοι [27].

Πηγή	Προέλευση οίνων	Αριθμός δειγμάτων	Επίπεδα μίανσης
Zimmerli and Dick, 1996	Ιταλία και Ισπανία	5	Μέσο επίπεδο μίανσης 0.337 ppb. Εύρος 0.044-0.451 ppb.
Pietri <i>et al.</i> 2001	Ιταλία	15	Μέσο επίπεδο μίανσης 0.736 ppb.

³⁶ Μέσες συγκεντρώσεις ΟΤΑ.

³⁷ Μέση τιμή μiasμένων οίνων.

³⁸ Για τους μiasμένους οίνους.

4. [28] (Έτος 2004).

Πίνακας 15: Αποτελέσματα αναλύσεων [28].

Είδος		Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός μιασμένων δειγμάτων	Επίπεδα μίανσης (σε ppb)
Οίνοι Ονομασίας προέλευσης	Λευκοί	40	4	Εύρος τιμών = 0.05-1.13 Μέση τιμή μιασμένων = 0.18
	Ερυθροί	120	22	Εύρος τιμών = 0.05 - 3.19 Μέση τιμή μιασμένων = 0.30
Γλεύκη		20	2	0.08, 0.18
Χυμοί σταφυλιών		10	0	-
Κοινοί οίνοι	Λευκοί	10	0	-
	Ερυθροί	10	2	0.68, 4.24
Ειδικοί οίνοι ³⁹		20	9	Max. = 15.25 (δείγμα muscatel). Μέση τιμή μιασμένων = 4.47
Αφρώδεις οίνοι		10	4	Εύρος τιμών = 0.14 - 0.71. Μέση τιμή μιασμένων = 0.44
Όριο ανίχνευσης		0.05 ppb		
Προέλευση δειγμάτων		Ισπανία		

Συνολικά 6 δείγματα υπερέβησαν το όριο των 2 ppb: 2 ερυθρών και 4 ειδικών οίνων (τρία εκ των οποίων ήταν επιδόρπιοι οίνοι).

³⁹ Malaga, muscatel, sherry, vermouth κλπ.

5. [29] (Έτος 2004).

Πίνακας 16: Αποτελέσματα αναλύσεων [29].

Χώρα προέλευσης δειγμάτων		Πορτογαλία		
Τεχνική ανάλυσης		Καθαρισμός με στήλες ανοσοσυγγένειας και HPLC-FD.		
Δείγματα	Περιγραφή δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός μιασμένων	Επίπεδα μίανσης
Port Wine	Υψηλό περιεχόμενο σακχάρων και 20% αιθανόλη.	189	69	67 δείγματα < 0.5 ppb 2 δείγματα = 2.1 ppb
Vinho Verde	Ξηρά, 12% αιθανόλη.	85		
Άλλοι οίνοι	-	66		
Ποσοστά αβεβαιότητας				
Τιμή (σε ppb)	> 0.05	Γύρω από το όριο ανίχνευσης (0.01)		
% αβεβαιότητας	37 % ⁴⁰	70 % ⁴¹		

Από τα παραπάνω (βλ. ποσοστά αβεβαιότητας) είναι σαφές το εμπόδιο που προκύπτει κατά την καθιέρωση των ανώτερων επιτρεπτών συγκεντρώσεων.

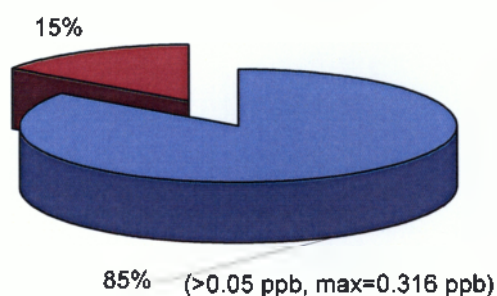
Η αιθανόλη και τα σάκχαρα δεν φαίνεται να παρεμβαίνουν στην διαδικασία καθαρισμού της ΟΤΑ με τις στήλες ανοσοσυγγένειας.

⁴⁰ Επομένως τα δυο προαναφερθέντα δείγματα μπορεί και να μην υπερβαίνουν το ανώτατο επιτρεπτό όριο.

⁴¹ Για παράδειγμα για μια μετρούμενη συγκέντρωση της τάξης των 0.20 ppb η σχετική αβεβαιότητα είναι $\pm 0.14 \text{ ppb}$.

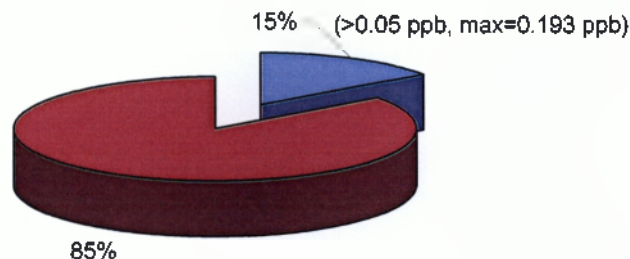
6. [30] (Έτος 2002). Αναλύθηκαν οίνοι από αμπελουργικό πειραματικό σταθμό από τρεις περιοχές της βορείου Ισπανία (Navarra). 28 ερυθροί και 12 λευκοί. Τα έτη συγκομιδής ήταν 1997 (14 ερυθρά + 6 λευκά) και 1998 (14 ερυθρά + 6 λευκά). Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης 0.05 και 0.07 ppb αντίστοιχα.

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (20) ΕΤΟΥΣ 1997 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΤΑ.



ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ 1997	
Λευκοί (6)	Ερυθροί (11)
0.185 ppb	0.160 ppb

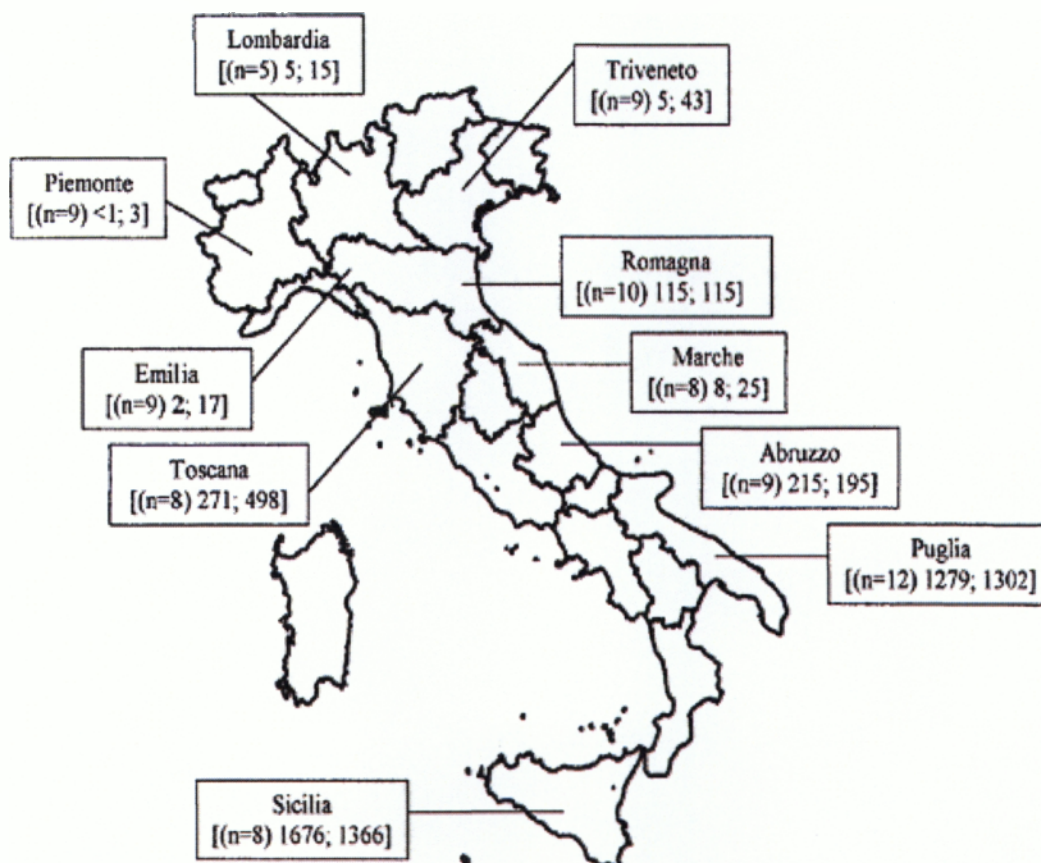
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (20) ΕΤΟΥΣ 1998 ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΟΤΑ.



ΤΙΜΕΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ 1998 (3)	
Λευκοί	Ερυθροί
0.192	0.074, 0.193

Οι διαφορές των συγκεντρώσεων ΟΤΑ και των ποσοστών των θετικών δειγμάτων μεταξύ των δυο ετών αποδόθηκαν στις άσχημες καιρικές συνθήκες του 1997. Τον Ιούλιο και τον Αύγουστο του 1997 αναφέρθηκαν χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή συχνότητα καταιγίδων και σοβαρά μυκητολογικά προβλήματα (ωίδιο και βοτρύτης).

7. [32] (Έτος 2001). Αναλύθηκαν 96 ερυθροί οίνοι (VQPRD) και 15 λευκοί επιδόρπιοι οίνοι που παρήχθησαν κυρίως κατά τις χρονιές 1995-1997 σε 19 περιοχές της Ιταλίας. Τα επίπεδα της ΟΤΑ έφτασαν τα 3.856 ppb. Οι οίνοι που παρήχθησαν στην νότιο Ιταλία ήταν περισσότερο μιασμένοι.



Εικόνα 11: Συγκεντρώσεις ΟΤΑ (συνολικός διάμεσος; αριθμητικός μέσος όρος, σε ng/l) σε ερυθρούς οίνους από διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας (εντός παρενθέσεως ο αριθμός των αναλυμένων δειγμάτων).

Πίνακας 17: Μέσες τιμές και διαμέσοι των συγκεντρώσεων ΟΤΑ για το σύνολο των δειγμάτων (σε ppb) [32].

Ερυθροί οίνοι		Λευκοί επιδόρπιοι οίνοι	
Μέση τιμή	Διάμεσος (median)	Μέση τιμή	Διάμεσος
0.419 ppb	0.090 ppb	0.736 ppb	0.008 ppb

Πίνακας 18: Μέσες τιμές και διάμεσοι των συγκεντρώσεων ΟΤΑ ερυθρών οίνων για διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας (σε ppb) [32].

Βορειοδυτική		Βορειοανατολική		Κεντρική		Νότια	
Μέση τιμή	Διάμεσος	Μέση τιμή	Διάμεσος	Μέση τιμή	Διάμεσος	Μέση τιμή	Διάμεσος
0.011	0.002	0.081	0.090	0.295	0.134	1.233	1.264

Τέσσερα από τα πέντε δείγματα λευκών επιδόρπιων οίνων την νότιας Ιταλίας είχαν συγκεντρώσεις ΟΤΑ που ξεπερνούσαν το 1 ppb (1.185, 2.454, 3.477 ppb).

8. [33] (Έτος 2003). Εξετάστηκαν 268 τοπικοί ελληνικοί οίνοι που παρήχθησαν κατά τα έτη 1995-1999. Από τα δεδομένα που λήφθηκαν παρατηρήθηκε ότι υπάρχει τάση αύξησης της μίανσης από ΟΤΑ στους ερυθρούς οίνους όσο νοτιότερα είναι η περιοχή παραγωγής, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή υγρασία και θερμοκρασία των νότιων περιοχών, συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των ΟΤΑ-παραγωγικών μυκήτων. Οι τάση αυτή δεν παρατηρήθηκε στους λευκούς και ροζέ ξηρούς οίνους. Όριο ανίχνευσης 0.05 ppb.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα εξέτασης 268 ελληνικών τοπικών οίνων που παρήχθησαν το διάστημα 1995-1999 [27].

	Ερυθροί ξηροί (104)	Λευκοί ξηροί (118)	Ροζέ ξηροί (20)	Επιδόρπιοι (γλυκοί και ημίγλυκοι) (18)	Ρετσίνα (8)
Διάμεσοι (ppb)	0.09	0.06	0.08	0.33	0.27
Αριθμός θετικών δειγμάτων (ποσοστό θετικών δειγμάτων)	71 (68.3%)	63 (53.4%)	13 (65%)	15 (83.3%)	6 (75%)
Μέσος όρος⁴² (ppb)	0.28			0.58	0.59
Μέγιστες τιμές (ppb)	2.69	1.72	1.16	2.82	1.75

⁴² Για τα δείγματα που δεν έφεραν ανιχνεύσιμα επίπεδα ΟΤΑ χρησιμοποιήθηκε η τιμή του ορίου ανίχνευσης διαιρεμένη με το δύο (0.025 ppb).

Παρατηρήθηκε ότι η μίανση με ΟΤΑ των ερυθρών οίνων μειώνονταν σταδιακά από το 1999 μέχρι το 1997 ενώ και οι λευκοί και οι ροζέ που παρήχθησαν το 1999 ήταν περισσότερο μiasmμένοι απ' αυτούς που παρήχθησαν το 1998 (αυτό το συμπέρασμα έγινε με την σύγκριση των τιμών που παρουσίασαν οι διάμεσοι).

Από το σύνολο των ξηρών οίνων το 40% έδειξε μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις ΟΤΑ.

Μόνο το 11.5% του συνόλου των οίνων που αναλύθηκαν (κυρίως γλυκοί οίνοι και ρετσίνα) περιείχαν ΟΤΑ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1.00 ppb.

9. [35] (Έτος 2005). Αναλύθηκαν 267 δείγματα οίνων (186 ερυθροί, 11 ροζέ, 51 λευκοί και 19 επιδόρπιοι οίνοι) που παρήχθησαν κυρίως κατά τα έτη 1997-2002 σε Ιταλικές και Ουγγρικές περιοχές. Κανένα από τα ουγγρικά δείγματα δεν ήταν μiasmμένο.

Το 3.6 % των δειγμάτων υπερέβησαν το 1 ppb.

Το 0.01% των δειγμάτων υπερέβησαν τα 2 ppb.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα Ιταλικών δειγμάτων [35].

ΙΤΑΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ				
	Ερυθροί	Λευκοί	Ροζέ	Επιδόρπιοι
Εύρος συγκεντρώσεων ΟΤΑ (ppb)	0.01-4.00	0.01-0.21	0.01-1.04	0.01-1.64
Ποσοστά θετικών δειγμάτων	84%	19%	56%	63%

9. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ, ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΒΛΕΨΕΙΣ.

9.1. Συμπεράσματα.

1. Όσο νοτιότερα στην Ευρώπη παράγονται οι οίνοι τόσο αυξάνει η συχνότητα εύρεσης μiasμένων δειγμάτων, η μέση συγκέντρωση ΟΤΑ και οι μέγιστες τιμές μίανσης. Το γεγονός αυτό δεν είναι τόσο σαφές για τους λευκούς όσο για τους ερυθρούς οίνους. Το ποσοστό των ερυθρών οίνων που προέρχονται από τις νότιες περιοχές της Ευρώπης και την Βόριο Αφρική, που είναι μiasμένοι με ΟΤΑ φτάνει το 92 % [27]. Επιπλέον οι νότιοι αμπελώνες της Γαλλίας και της Ιταλίας [20, 22, 32] εμφανίζονται πιο επιδεκτικοί στην μίανση με ΟΤΑ απ' ότι οι αντίστοιχοι βόρειοι.

2. Η συχνότητα εμφάνισης, το ποσοστό των ΟΤΑ-παραγωγικών στελεχών και το δυναμικό παραγωγής ΟΤΑ που εμφανίζουν στελέχη του *A. carbonarius* που απομονώνονται από δείγματα σταφυλιών που είναι μiasμένα από ΟΤΑ, συντελούν στο να θεωρείται ο κύριος υπεύθυνος για την παρουσία ΟΤΑ στα σταφύλια, τις σταφίδες, τους μούστους και τους οίνους. Αν και η συχνότητα των απομονώσεων *A. niger* είναι συχνά υψηλή, ωστόσο, το ποσοστό των ΟΤΑ-παραγωγικών στελεχών αυτού του είδους είναι σχετικά μικρό και τα παραγωγικά στελέχη έχουν μικρή δυναμικότητα. Είδη με πολύ μεγάλη δυναμικότητα παραγωγής ΟΤΑ (π.χ. *A. ochraceus*, *A. alliaceus*) σπάνια απομονώνονται από σταφύλια και όταν αυτό συμβεί τότε συμμετέχουν στην συνολική μυκητοχλωρίδα με πολύ μικρό ποσοστό.

3. Ο πληθυσμός των *A. section Nigri* (μαύροι *Aspergilli*) αυξάνεται κατά την ανάπτυξη των ραγών και φτάνει την μέγιστη τιμή του κατά την συγκομιδή. Επιπλέον όσο περισσότερο μένει το σταφύλι στο πρέμνο τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των ΟΤΑ-παραγωγικών απομονώσεων επί της συνολικής μυκητοχλωρίδας.

4. Παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να διαδραματίζουν ένα ρόλο στον πληθυσμό των μαύρων *Aspergilli* και στην περιεκτικότητα ΟΤΑ είναι η ποικιλία, οι καλλιεργητική τεχνική, οι κλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, βροχόπτωση ανά περιοχή αλλά και οι διακυμάνσεις που παρουσιάζονται στην ίδια περιοχή από έτος σε έτος), η προσβολή των ραγών από μύκητες και ο βαθμός ωριμότητας των ραγών. Ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί η σημαντικότητα του καθενός στο περιεχόμενο της ΟΤΑ. Αυτό πρόκειται να είναι και το μελλοντικό πεδίο των σχετικών με το θέμα ερευνών, ώστε να γίνει δυνατή η κατανόηση του προβλήματος και η θέσπιση ενός σχεδίου αντιμετώπισης τύπου HACCP.

5. Ενώ πολλοί είναι αυτοί που κρίνουν αναγκαία την διερεύνηση των περιβαλλοντικών συνθηκών που ευνοούν τον σχηματισμό της ΟΤΑ πριν την συγκομιδή, μόλις τα τελευταία χρόνια παρατίθενται μετεωρολογικά στοιχεία και στοιχεία για τις καλλιεργητικές τεχνικές (αποστάσεις πρέμνων, μόρφωση, ψεκασμοί, κλπ). Ωστόσο δεν στάθηκε δυνατός ο

συσχετισμός των μετεωρολογικών δεδομένων με τους πληθυσμούς των ειδών που παράγουν ΟΤΑ, αν και από χρονιά σε χρονιά παρουσιάζονται μεγάλες διαφορές ΟΤΑ στους ίδιους αμπελώνες. Πολλοί συγγραφείς αναφέρουν ότι οι οίνοι που παράγονται γύρω από την Μεσόγειο περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΟΤΑ εξαιτίας του κλίματος το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή σχετική υγρασία και υψηλή θερμοκρασία με πιο επικίνδυνες χρονιές αυτές με βροχοπτώσεις κατά το καλοκαίρι.

6. Η συσχέτιση δεικτών (ηλιοθεμικοί, υδροθεμικοί κ.α.) κάθε περιοχής με τον πληθυσμό των ΟΤΑ-παραγωγικών μυκήτων ή την συγκέντρωση ΟΤΑ, ίσως δώσει κάποιο συμπέρασμα και καταφέρει να θέσει «ζώνες υψηλού κινδύνου». Αλλά και δείκτες φωτισμού και αερισμού που αφορούν την κάθε ποικιλία ξεχωριστά, ανάλογα με τις καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόζονται, οι οποίοι συνοψίζουν την πυκνότητα φυλλώματος, το σχήμα μόρφωσης, τις αποστάσεις πρέμων, τα χαρακτηριστικά τσαμπού και ραγών⁴³, ίσως μπορέσουν να συσχετιστούν με τις απομονώσεις ΟΤΑ-παραγωγικών στελεχών και την παραγωγή ΟΤΑ. Ένα εύρημα [22] που υποδεικνύει την πιθανή σχέση των δεικτών φωτισμού και αερισμού με την παραγωγή ΟΤΑ είναι ότι ενώ 2 αμπελώνες, ίδιας ποικιλίας (Negroamaro) στην νότιο Ιταλία, στην ίδια τοποθεσία, υπό τις ίδιες καλλιεργητικές τεχνικές, υπό τον ίδιο ιδιοκτήτη και με μόνη διαφορά το σύστημα μόρφωσης έδωσαν πολύ διαφορετικές τιμές ΟΤΑ για την ίδια χρονιά (1999): 1.51μg/kg για διπλό κορδόνι και 13. 08μg/kg για κύπελλο (και τα δύο κλάδεμα κατά κεφαλή). Ωστόσο δεν γίνεται αναφορά ή σύγκριση των δύο αμπελώνων ως προς την συνολική κατάσταση υγείας των πρέμων (χρόνιες ασθένειες) και για την ηλικία τους.

7. Το ύψος των τσαμπιών από το επίπεδο του εδάφους διαπιστώνεται ανεξάρτητο με τους μύκητες που εμφανίζονταν [22]. Εξάλλου τα πρέμνα ποικιλιών επιτραπέζιων και σταφιδοποιίας μορφώνονται πάντα με μεγάλο ύψος κορμού (μέχρι και 1.80 m ύψος), ωστόσο και αυτά τα σταφύλια παρουσιάζουν πρόβλημα με ΟΤΑ.

8. Κατά τις περισσότερες εργασίες μυκητολογικής διερεύνησης αναλύονται ράγες και όχι βόστρυχοι. Σε μια εργασία όπου αναλύονται και ράγες και βόστρυχοι βρέθηκε ότι το ποσοστό των βοστρύχων που ήταν αποικισμένο ήταν μικρότερο απ' αυτό των ραγών [22]. Ωστόσο οι ράγες αποτελούν την οικοθέση των ζυμών, γεγονός που εμπλέκει το φαινόμενο του ανταγωνισμού, ο οποίος δεν υπάρχει στους βοστρύχους.

9. Προσβολές από παθογόνα (ευδεμίδα, ωίδιο, βοτρυτής) αλλά και γενικά η κατάσταση υγείας των πρέμων (τροφοπενίες, ιώσεις, ίσκα, νηματώδεις) και η ηλικία τους σίγουρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, αλλά παρόμοια στοιχεία σε εργασίες που έχουν

⁴³ Σε μερικές εργασίες έγιναν προσπάθειες συσχετισμού της πυκνότητας ραγών με την επιδεκτικότητα της ποικιλίας αλλά χωρίς αποτέλεσμα.

παρουσιαστεί μέχρι τώρα, απουσιάζουν. Σε αρκετά μέρη της Ελλάδας παρακολουθείται ο πληθυσμός της ευδεμίδας με παγίδες, με σκοπό την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή της. Θα ήταν λοιπόν δυνατό, και σχετικά εύκολο, να χρησιμοποιηθεί η πορεία του πληθυσμού αυτού του εντόμου ως ένα βιολογικό μοντέλο που ενσωματώνει τις κλιματικές συνθήκες⁴⁴ που επικρατούν σε μια περιοχή και επιπλέον αποτελεί και έναν δείκτη διάρρηξης των ραγών, και να συσχετιστεί με τα επίπεδα ΟΤΑ σε μούστους από σταφύλια σε διάφορα στάδια ωριμότητας. Η ορθότητα αυτής της πρότασης επιβεβαιώνεται από τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα εργασιών που οδεύουν προς αυτήν την κατεύθυνση [50].

10. Δεν είναι γνωστό πόσο συμβάλλουν στην τελική συγκέντρωση ΟΤΑ οι συνθήκες μεταφοράς (καφάσια, ψύξη, ώρα κοπής (πρωί – μεσημέρι - απόγευμα), χρονικό διάστημα από κοπή μέχρι επεξεργασία), ο εμβολιασμός⁴⁵ των δεξαμενών και το κάθε στάδιο οινοποίησης. Ίσως, πρακτικά εύκολα πραγματοποιήσιμες παρεμβάσεις να οδηγήσουν σε αποτροπή της υπέρβασης του ορίου των 2 ppb, σε ορισμένες περιπτώσεις, που ισχύει πλέον για την Ε.Ε.

11. Κατά την διεξαγωγή εργαστηριακών πειραμάτων [36] διαπιστώθηκε ότι η ανάπτυξη του *A. carbonarius* πάνω σε ράγες διαφορετικών ποικιλιών επηρεάζεται κυρίως από την κατάσταση των ραγών (διερρηγμένες ή όχι) και από την ποικιλία ενώ η θερμοκρασία επώασης εμφανίστηκε λιγότερο σχετική με την μυκητιακή ανάπτυξη. Ακόμη σημαντικότερο είναι ότι η παραγωγή ΟΤΑ επέδειξε σχέση κυρίως με την ποικιλία σταφυλιού και έπειτα με την κατάσταση των ραγών και την θερμοκρασία. Συγκεκριμένα υπήρχαν ποικιλίες που εμφάνισαν 30 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση ΟΤΑ απ' ότι άλλες υπό τις ίδιες συνθήκες επώασης⁴⁶. Αυτή η διαφορά από ποικιλία σε ποικιλία δεν στάθηκε ικανό να εξηγηθεί από τα χαρακτηριστικά της κάθε μίας (χρώμα, δομή τσαμπιών, πυκνότητα ραγών, πάχος φλοιού κλπ.), ωστόσο όλες οι ποικιλίες με χαμηλή επιδεκτικότητα τόσο στην ανάπτυξη του μύκητα όσο και στην παραγωγή ΟΤΑ απ' αυτόν καλλιεργούνταν μόνο τοπικά⁴⁷.

12. Η ΟΤΑ ανιχνεύεται κατά πολύ μεγαλύτερη συχνότητα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους ερυθρούς οίνους απ' ότι στους ροζέ και τους λευκούς. Αν και συχνά οι επιδόρπιοι οίνοι παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις ΟΤΑ, ωστόσο, καθώς η κατανάλωσή τους είναι περιστασιακή και οι ποσότητες που καταναλώνονται είναι γενικώς περιορισμένες, η συνεισφορά τους στην ημερήσια πρόσληψη της ΟΤΑ μπορεί να θεωρηθεί μάλλον μικρή [28].

⁴⁴ Οι κλιματικές συνθήκες θα ενσωματώνονται μόνο αν δεν γίνεται καταπολέμηση αυτού του εντόμου.

⁴⁵ Μπορεί οι ζύμες να μην μπορούν να αποδομήσουν την ΟΤΑ αλλά μπορούν και την δεσμεύουν στα τοιχώματά τους χωρίς να γνωρίζουμε αν αποδεσμεύεται κατά τις αναλυτικές διαδικασίες που ακολουθούνται για τον προσδιορισμό της.

⁴⁶ Οι πιο επιδεκτικές στην αποίκηση και την παραγωγή ΟΤΑ ήταν οι Cabernet sauvignon, η Trebbiano και η Verdeca σε αντίθεση με τις Bianco d' Alessano, την Pampanuto και η Uva di Troia από τις 12 συνολικά ποικιλίες που εξετάστηκαν.

⁴⁷ Στην Puglia της νοτιού Ιταλίας.

Επιπλέον όλοι αναφέρουν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ΟΤΑ που παρουσιάζουν οι ερυθροί οίνοι έναντι των λευκών οφείλονται στην διαφορετική διαδικασία οινοποίησης που ακολουθείται στην ερυθρά σε σύγκριση με την λευκή. Ωστόσο αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί. Θα μπορούσε μέρος ερυθρών σταφυλιών να οινοποιηθεί ακολουθώντας τα στάδια της λευκής και μέρος ακολουθώντας τα στάδια της ερυθρής και μόνο όταν οι συγκέντρωση ΟΤΑ παρουσίαζαν αξιοσημείωτες διαφορές θα μπορούσε να αποδοθεί στα στάδια και όχι στις ερυθρές ποικιλίες. Το ίδιο θα μπορούσε αν γίνει και με λευκές ποικιλίες. Δηλαδή μέρος σταφυλιών να οινοποιηθεί σύμφωνα με τα στάδια ερυθράς οινοποίησης και μέρος σύμφωνα με αυτά της λευκής ώστε να διαπιστωθεί ο ρόλος της ποικιλίας και των σταδίων.

13. Μέχρι τώρα δεν υπάρχει επίσημη μέθοδος προσδιορισμού της ΟΤΑ στον οίνο και η μέχρι τώρα πιο δημοφιλής μέθοδος που χρησιμοποιείται γι' αυτό το σκοπό είναι HPLC με ανιχνευτή φθορισμού αφού προηγηθεί καθαρισμός του δείγματος με στήλη ανοσοσυγγένειας. [34]. Ωστόσο η μέθοδο αυτή είναι αργή και ακριβή για μεγάλο αριθμό δειγμάτων και σε μερικές περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι έχει ανεπαρκή ανάκτηση και επαναληψιμότητα [34, 29]. Ωστόσο η μέθοδος αυτή έχει περάσει από διεργαστηριακούς ελέγχους, έχει γίνει αποδεκτή από τον AOAC International (Visconti et al 2001) και από την CEN (EN 14133, 2003b).

14. Κατά την ανάλυση ΟΤΑ σε οίνους, εργασίες κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται τεχνικές ανάλυσης με χαμηλότερο όριο ανίχνευσης από τα 0.05 ppb δίνουν μεγαλύτερα ποσοστά μiasmμένων δειγμάτων, γεγονός αναμενόμενο, αλλά συχνά η αιτία παραβλέπεται.

15. Αν και η ΟΤΑ έχει ανιχνευθεί σε οίνο και σε σταφίδες σε επίπεδα που φτάνουν τα $15.60 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ και $53.6 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [4] αντίστοιχα, ωστόσο η πλειοψηφία των μέχρι τώρα διαθέσιμων δεδομένων για την περιεκτικότητα των οίνων σε ΟΤΑ δίνουν τιμές μικρότερες του 1 ppb [29]. Τιμές μεγαλύτερες των 2 ppb αποτελούν, θα λέγαμε, εξαιρέσεις στον κανόνα και πιθανώς η εξαίρεσή τους με την λήψη του διαμέσου των μετρήσεων να αποτελεί έναν πιο αντικειμενικό τρόπο προσδιορισμού της συνεισφοράς του οίνου στην πρόσληψη ΟΤΑ.

16. Το γεγονός ότι το ΟΤΑ-παραγωγικό δυναμικό των απομονώσεων επηρεάζεται σημαντικά από το συνθετικό υπόστρωμα καλλιέργειας που χρησιμοποιείται κάθε φορά [25, 23] προδίδει την απόσταση μεταξύ των εργαστηριακών ευρημάτων και της πραγματικότητας. Το γεγονός αυτό έχει διαπιστωθεί γι' αυτό το λόγο παρατηρείται μια συνεχής αυξητική τάση στην χρήση υλικών⁴⁸ και τεχνικών που προσομοιάζουν με τις πραγματικές συνθήκες.

17. Τα ΟΤΑ παραγωγικά στελέχη των *Aspergilli* Section *Nigri* είναι ικανά να παράγουν ΟΤΑ σ' ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών με την βέλτιστη θερμοκρασία συνήθως να

⁴⁸ Χρήση SGM έναντι CYA ή YES, χρήση ραγών (ακέραιων ή μη) αλλά δεν έχει βρεθεί εργασία που να χρησιμοποιεί φυσικό χυμό σταφυλιού.

είναι χαμηλότερη απ' αυτήν της ανάπτυξης [23, 11]. Άρα θερμοκρασίες ευνοϊκές για την ανάπτυξη του μύκητα (25-30°C) ακολουθούμενες από χαμηλότερες θερμοκρασίες (15-20°C), οι οποίες ευνοούν την παραγωγή της τοξίνης, προβλέπεται να οδηγούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΟΤΑ.

18. Υπάρχει μεγάλη διακύμανση του ΟΤΑ-παραγωγικού δυναμικού μεταξύ των απομονώσεων *A. carbonarius* και από το ίδιο δείγμα σταφυλιών μπορούν να απομονωθούν περισσότερα από ένα στελέχη⁴⁹ του.

19. Η παρουσία ΟΤΑ-παραγωγικών στελεχών, λογικά, δεν συνεπάγεται ύπαρξη ΟΤΑ στο δείγμα, αφού μπορεί να υπάρχουν, να έχουν αναπτυχθεί αλλά να μην έχουν φτάσει στο στάδιο παραγωγής ΟΤΑ. Επίσης η ύπαρξη ΟΤΑ δεν συνεπάγεται απαραίτητα απομόνωση ΟΤΑ-παραγωγικών στελεχών. Αφενός, λόγω της σποραδικής τους εμφάνισης, τα δειγματοληπτικά σχέδια αδυνατούν μερικές φορές να τους εντοπίσουν και αφετέρου, μπορεί να υπήρξαν, ν' αναπτύχθηκαν, να παρήγαγαν ΟΤΑ και έπειτα να καταστράφηκαν, αφήνοντας πίσω τους την ανθεκτική τοξίνη.

20. Ελάχιστα είναι τα δεδομένα για την επίδραση μυκητοκτόνων στον πληθυσμό των μαύρων *aspergilli* και ειδικότερα στον *A. carbonarius*. Μια μελέτη [17] ασχολήθηκε με την επίδραση μυκητοκτόνων στους μαύρους *Aspergilli* διαπιστώνοντας την δραστικότητα ενός⁵⁰ έναντι του *A. carbonarius*, αλλά δεν αναφέρεται η δυναμικότητα παραγωγής ΟΤΑ των στελεχών *A. carbonarius* που επιβίωσαν.

21. Παρατίθεται πίνακας που υποδεικνύει πρόσληψη ΟΤΑ ανάλογα με την καταναλισκόμενη ποσότητα οίνου που φέρει ενδεικτικές συγκεντρώσεις ΟΤΑ.

Πίνακας 21: Υποθέσεις για ενήλικα καταναλωτή οίνου βάρους 70 kg.

Ποσότητα οίνου που καταναλώνεται ανά ημέρα.	Επίπεδο μίανσης του οίνου (σε ppb)	Πρόσληψη ΟΤΑ από οίνο (σε ng ΟΤΑ/ kg Σ.Β./ ημέρα)
159 ml ⁵¹	0.5	1.15
	1.0	2.27
	2.0	4.54

⁴⁹ Το ότι είναι διαφορετικά υποδεικνύεται από το διαφορετικό ΟΤΑ-παραγωγικό δυναμικό που επιδεικνύουν.

⁵⁰ Αυτό ήταν το switch (α.ι. fludioxonil και cyprodinil) και η αποδοτικότητά του αποδόθηκε στην δραστική ουσία fludioxonil. Έδρασε έναντι τόσο του *A. niger* όσο και έναντι του *A. carbonarius* αλλά κυρίως έναντι του τελευταίου.

⁵¹ Αποτελεί την ημερήσια κατανάλωση οίνου στην Ιταλία [32, 35].

350 ml ⁵²	0.5	2.5
	1.0	5
	2.0	10
400 ml	0.5	2.9
	1.0	5.8
	2.0	11.6
<p>Η Ανεκτή Ημερήσια Πρόσληψη ΟΤΑ (TDI) που καθιερώθηκε από την Ευρωπαϊκή Επιστημονική Επιτροπή για τα Τρόφιμα (1998) είναι 5 ng/ kg Σ.Β.</p> <p>Η Ανεκτή Ημερήσια Πρόσληψη ΟΤΑ (TDI) που καθιερώθηκε από την Επιτροπή Ειδικών του WHO για τα Πρόσθετα τροφίμων (JECFA (2001) είναι 14.3 ng/kg Σ.Β.</p>		

Επιπλέον στοιχεία για την κατανάλωση οίνου στην Ιταλία [32]: Το 1997 το 59.4% των ενήλικων ατόμων κατανάλωσε οίνο. Επίσης το 46.8 % των ανδρών και 20.7% των γυναικών πίνουν οίνο κάθε μέρα.

9.2. Σύγκριση επιπέδων μίανσης συμβατικών και βιολογικών προϊόντων.

Περιορισμένα είναι τα δεδομένα που αφορούν την σύγκριση των επιπέδων μίανσης συμβατικών και βιολογικών προϊόντων. Τα δεδομένα αυτά προκύπτουν από τυχαία ανάλυση δειγμάτων χωρίς να παρατίθενται στοιχεία για τις περιοχές προέλευσης των δειγμάτων (κλιματικές συνθήκες κλπ.), επομένως γίνεται σύγκριση προϊόντων που μπορεί να έχουν καλλιεργηθεί υπό τελείως διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός άτοπο αν θέλουμε να καταλήξουμε σ' ένα ορθό συμπέρασμα ως προς την επίδραση αυτών των δυο διαφορετικών τρόπων καλλιέργειας (συμβατικός, βιολογικός) στο περιεχόμενο μυκοτοξινών στο τελικό προϊόν.

Επιπλέον το γεγονός ότι ένα προϊόν φέρει την ετικέτα «βιολογικό» δεν σημαίνει ταυτόχρονα ότι αυτό παράχθηκε κάνοντας ορθή χρήση των αρχών και των «όπλων» της βιολογικής γεωργίας, αλλά απλώς ότι τηρεί τις προϋποθέσεις που καθορίζει η νομοθεσία, η οποία συνήθως ορίζει το τι απαγορεύεται κατά την εξάσκηση της.

⁵² Αποτελεί την ποσότητα που καταναλώνει το 1/6 του Ιταλικού πληθυσμού [32].

Επομένως πριν θεωρήσουμε ότι η μια η άλλη μορφή γεωργίας ευνοεί ή όχι την εμφάνιση μυκοτοξινών στα τρόφιμα καλό θα ήταν να γίνει σύγκριση προϊόντων που έχουν καλλιεργηθεί υπό τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες και προέκυψαν από την ορθή εξάσκηση και των δυο μορφών καλλιέργειας.

Σύμφωνα με τις υπάρχουσες εργασίες δεν διαπιστώνεται αξιόλογες διαφορές στο περιεχόμενο μυκοτοξινών μεταξύ των προϊόντων που προέρχονται από συμβατική και βιολογική γεωργία. Άλλοτε δείγματα προϊόντων από συμβατική γεωργία εμφανίζονται με μεγαλύτερο περιεχόμενο μυκοτοξινών από αυτά της βιολογικής κι άλλοτε συμβαίνει το αντίθετο [40, 41, 42, 43, 52, 53].

Κατά την σύγκριση 15 ερυθρών οίνων (επιτραπέζιοι , από σταφύλια βιολογικής γεωργίας και Ελεγχόμενης Ονομασίας Προέλευσης) [44] διαπιστώθηκε ότι οι ολικές φαινόλες, οι ορθο-δифαινόλες, τα φλαβονοειδή και οι ανθοκυάνες ήταν σαφώς λιγότερες στους επιτραπέζιους οίνους απ' ότι στις δύο άλλες κατηγορίες οίνων. Επιπλέον η αντιοξειδωτική δράση των επιτραπέζιων βρέθηκε να είναι η μισή από απ' αυτή των άλλων.

Επιπλέον ο *Bacillus thuringiensis* (Bt), ο οποίος χρησιμοποιείται εκτενώς στην βιολογική αμπελοκαλλιέργεια⁵³, παρεμποδίζει *in vitro* τον *A. carbonarius* γεγονός που μπορεί να συμβαίνει και *in vivo* [54].

⁵³ Αλλά και στην ολοκληρωμένη διαχείριση παρασίτων (Integrated Pest Management (IPM)).

10. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας ανήκει σε ερευνητικό πρόγραμμα του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων με τίτλο «Έλεγχος ύπαρξης ωχρατοξίνης Α σε Ελληνικούς οίνους και διερεύνηση των συνθηκών που επηρεάζουν τη παραγωγή της». **ΟΙΝΩΧΡΑ ΔΣΒΕΠΡΟ-90**.

10.1 Φάσεις εργασίας

Φάση 1^η : Έλεγχος και καταγραφή ύπαρξης και ποσοτικού προσδιορισμού ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ) σε γλεύκος ποικιλίας ροδίτη και ποικιλία αγιαργίτικο.

Στη φάση αυτή θα γίνει μελέτη για παρουσία ΟΤΑ σε δύο συγκεκριμένες ποικιλίες που προέρχονται από το συνεργαζόμενο οινοποιείο με σκοπό αφ' ενός την καταγραφή του προβλήματος και αφ' ετέρου την συσχέτισή του με παράγοντες όπως είδη και ποικιλίες κρασιού, γεωγραφική προέλευση και κλιματολογικές συνθήκες.

Επιστημονική μεθοδολογία:

Από τις μεθόδους ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού ΟΤΑ ευρέως εφαρμόζονται σήμερα αυτές που χρησιμοποιούν ανοσοβιοχημικές στήλες του εμπορίου [(Immunoaffinity Column, IAC), εικόνα 15, παράρτημα II] οι οποίες επιτρέπουν υψηλής εκλεκτικότητας απομόνωση της προσδιοριζόμενης ουσίας από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος και ποσοτικό προσδιορισμό με υγρή χρωματογραφία (High pressure liquid chromatography, HPLC) και ανιχνευτή φθορισμού (Fluorescence detector, FC).

Η αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού της ΟΤΑ στους οίνους που εφαρμόζεται ήδη στο εργαστήριο του συνεργαζόμενου ερευνητικού φορέα έχει αναπτυχθεί πρόσφατα (Visconti κ.ά. 1999)[26], έχει περάσει από διεργαστηριακούς ελέγχους, έχει γίνει αποδεκτή από τον AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International (Visconti κ.ά. 2001) [74] και πρόκειται να εγκριθεί από τον CEN (European Committee for Standardisation) ως πρότυπη μέθοδος προσδιορισμού ΟΤΑ σε οίνο και μύρα. (prEN 14133). Η εφαρμογή της περιλαμβάνει αραιώση των προς ανάλυση δειγμάτων οίνου με υδατικό διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης και όξινου ανθρακικού νατρίου, καθαρισμό από IAC και ανάλυση με σύστημα HPLC-FC. Το όριο για τον ποσοτικό προσδιορισμό (Limit of quantification, LOQ) της ΟΤΑ στο κρασί είναι 0.020 µg/l και η απόδοση της διαδικασίας (recovery) 95-100 %.

Φάση 2^η: Μελέτη της μυκητοχλωρίδας των σταφυλιών, απομόνωση και ταυτοποίηση μυκήτων.

Επιστημονική μεθοδολογία:

Για την παρακολούθηση του *A. carbonarius* χρησιμοποιούμε αρχικά τα DRBC και DG18A με προσθήκη 0,25 gr/lι ακτιδιώνης (για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ζυμομυκήτων στο υπόστρωμα), και τελικά θα επιλεγεί αυτό με την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα.

Για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα χρησιμοποιούμε DRBC. Το τελευταίο τελικά χρησιμοποιήθηκε και για τη αξιολόγηση της παρουσίας του μύκητα διότι τα προαναφερθέντα υποστρώματα δεν επέτρεπαν την ανάπτυξη του ακόμα και με την πάροδο 7-10 ημερών στην επώαση (25°C).

Φάση 3^η: Μελέτη διαφόρων τεχνολογικών χειρισμών για τη μείωση της OTA στο τελικό προϊόν

Επιστημονική μεθοδολογία:

Σε εργαστηριακό επίπεδο μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων προσροφητικών ουσιών για τη μείωση της OTA στο κρασί. Μεταξύ αυτών το καζεϊνικό κάλιο και ο ενεργός άνθρακας έδωσαν καλά αποτελέσματα με πιθανή εφαρμογή στην πράξη.

Από τους ανωτέρω παράγοντες η χρήση του ενεργού άνθρακα (Carbon-H₃PO₄) φαίνεται ότι σήμερα παρουσιάζει μεγαλύτερη προοπτική για εφαρμογή στην πράξη. Δεν έχει όμως μελετηθεί κάτω από βιομηχανικές συνθήκες. Τη βιομηχανία θα ενδιέφερε ιδιαίτερα να μελετηθεί η δράση αυτών των ουσιών σε διαφόρους τύπους κρασιών (λευκά, ροζέ, κόκκινα) σε συνδυασμό και με τις πιθανές αρνητικές επιδράσεις που μπορεί να έχει στα ποιοτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

10.2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

10.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΠΡΟΤΥΠΑ

Κατά τη διάρκεια της πιλοτικής οινοποίησης αλλά και της μεθόδου προσδιορισμού Visconti *et al.* (2001) [74] που επιλέχθηκε χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: Υδατικό διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης και όξινου ανθρακικού νατρίου (1% PEG + 5% NaHCO₃), διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού με χλωριούχο νάτριο (phosphate buffer saline PBS), καυστικό νάτριο, δισ-απεσταγμένο νερό. Η πρότυπη ουσία ωχρατοξίνη Α προμηθεύθηκε από την εταιρία Sigma Co. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,50-10ppb OTA και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μίγμα οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη: νερό (1:1).

Οι ανοσοβιοχημικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση της OTA, παρελήφθησαν από την εταιρία "VICAM".

Όσον αφορά την διάρκεια της πειραματικής οινοποίησης τα δείγματα που παραλήφθηκαν αμέσως μετά την έκθλιψη των σταφυλιών χωρίστηκαν σε υποδείγματα στα οποία έγιναν

εμβολιασμοί με διάφορα υλικά που πιθανόν επιδρούν στην ανάπτυξη των μυκήτων και στην παραγωγή ΟΤΑ στην διάρκεια της οينوποίησης, δηλαδή SO₂, Starter: ζύμες για την υποβοήθηση έναρξης της ζύμωσης (οινολογικές ζύμες εμπορίου *Saccharomyces bayanus*), Ο.Τ.Α: για να μελετηθεί η μεταβολή τους κατά την διάρκεια της ζύμωσης, *Aspergillus carbonarius* (εμβόλιο εναιωρήματος κονιδίων).

Για τις μικροβιολογικές απομονώσεις χρησιμοποιήθηκαν: ακτιδιώνη και τα εξής υποστρώματα: DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenol) agar, CDA (Chapek Dox Agar), MEA (Malt Extract Agar), CCA (Coconut Cream Agar).

Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: Μπεντονίτης, καζεΐνη, ενεργός άνθρακας.

10.2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Δείγματα γλεύκους ποικιλίας ροδίτη και αγιωργίτικου αναλύθηκαν για παρουσία ΟΤΑ στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από τρία διαφορετικά οινοποιεία της Πελοποννήσου.

Επίσης σε δύο δείγματα ποικιλίας Αγιωργίτικου και Ροδίτη που παρελήφθησαν αμέσως μετά την έκθλιψη των σταφυλιών σε μεγάλη ποσότητα (~100L) έγινε πειραματική οينوποίηση στο εργαστήριο, αφού χωρίστηκαν σε 8 υποδείγματα το καθένα και πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω χειρισμοί:

Οι χειρισμοί που έγιναν στα υποδείγματα και στις δύο ποικιλίες Αγιωργίτικου και Ροδίτη είναι οι εξής:

1^ο Μάρτυρας, - starter, - SO₂

2^ο Μάρτυρας, - starter, + SO₂

3^ο Παρουσία starter, + Asp.carb, - SO₂, - ΟΤ.Α

4^ο Παρουσία starter, + Asp.carb, + SO₂, - ΟΤ.Α

5^ο Παρουσία starter, - Asp.carb, - SO₂, + ΟΤ.Α

6^ο Απουσία starter, + Asp.carb, - SO₂, - ΟΤ.Α

7^ο Απουσία starter, + Asp.carb, + SO₂, - ΟΤ.Α

8^ο Απουσία starter, - Asp.carb, - SO₂, + ΟΤ.Α,

(-): απουσία, (+): παρουσία.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τέτοιες που οι τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών που προστέθηκαν στα δείγματα οίνου ήταν:

SO₂: 25 ppm, Starter: 20g/hl (1.6 g/ 8lt), ΟΤ.Α: 5ppb, *Aspergillus carbonarius*: 5*10⁴/8lt.

10.2.3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Ο τύπος του υγρού χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε στις ποσοτικές αναλύσεις ΟΤΑ είναι: **HPLC Agilent 1100 Series**, με **φθορισμόμετρο G 1321A**.

Συνθήκες χρωματογραφίας:

Στήλη υγρής χρωματογραφίας Waters Spherisorb ODS-2 5um
250mm X 4,5mm Serial No: 01120616

Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο: νερό: οξεϊκό οξύ (51:47:2 v/v/v)

Ρυθμός ροής: 1ml/min

Θερμοκρασία λειτουργίας: 40°C

Όγκος ένεσης: 100μl

10.2.4. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι αναλυτικές μέθοδοι που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό ΟΤΑ ήταν:

Για τα δείγματα γλεύκους η μέθοδος των Visconti *et al.* (2001). Για τα δείγματα σταφυλιών και οινολάσπης χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος με τροποποιήσεις(Serra *et al.* 2004) [74].

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΤ.Α ΓΙΑ ΚΡΑΣΙΑ ΚΑΙ ΜΟΥΣΤΟ

Μέθοδος Visconti με PEG 10.000 + NaHCO₃

Σε 10 ml κρασί προστίθενται 10 ml διάλυμα 1% PEG + 5% NaHCO₃. Ακολουθεί ανάδευση του μείγματος για 10 min. Στη συνέχεια φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί και τα 10 ml διηθήματος εφαρμόζονται σε στήλες IAC (1 σταγόνα/sec). Ακολουθεί ξέπλυμα με 5ml διάλυμα (NaCl 2.5% + NaHCO₃ 0.5%) από το στηλάκι με ρυθμό 1-2 σταγόνα/sec. Στη συνέχεια 5 ml διασπασμένο H₂O (1-2 σταγόνες/sec). Ακολουθεί έκλυση της ΟΤΑ με 2ml διαλύματος Μεθανόλης : Οξεϊκό (98:2). Τέλος προστίθενται στο παραληφθέν διάλυμα 2 ml H₂O και χρησιμοποιώντας την ένεση των 100 μL εμβολιάζουμε στην HPLC.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για πρότυπα διαλύματα ΟΤΑ όπως και για δείγματα οίνου που εμβολιάστηκαν με ΟΤΑ.

Για τα δείγματα σταφυλιών και οινολάσπης χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος με τροποποιήσεις(Serra *et al.* 2004) [74]. Η εφαρμογή της μεθόδου περιλαμβάνει ομογενοποίηση των υπό ανάλυση δειγμάτων, αραίωση μέρους αυτών με υδατικό διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης και όξινου ανθρακικού νατρίου, ανακίνηση για 30 min, φυγοκέντρηση (8500 rpm, 20 min, 4°C), διήθηση, καθαρισμό με ανοσοβιοχημικές στήλες (Immunoaffinity Column, IAC) και ποσοτικό προσδιορισμό με υγρή χρωματογραφία (High pressure liquid

chromatography, HPLC) και ανιχνευτή φθορισμού (Fluorescence detector, FC), όπως αναφέρονται παραπάνω.

10.2.5. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ

Από το δείγμα λαμβάνεται 1ml από το οποίο δημιουργούνται διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} έως 10^{-6} σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Από εκεί λαμβάνονται 0,1 ml με πιπέτα ακριβείας (100μl) και επιστρώνεται στα τρυβλία με τα παραπάνω υποστρώματα. Τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση στους 25°C .

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ

Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υποστρώματα: DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenol) agar για την ολική μυκητιακή μικροχλωρίδα σε αραιώσεις -1 έως -6 του οίνου, από εκεί όσες μυκηλιακές υφές αναγνωρίστηκαν ως *Aspergillus section Nigri* σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε CDA (Chapek Dox Agar), MEA (Malt Extract Agar) μέχρι απομονώσεως και ταυτοποίησης των πιθανών *Aspergillus carbonarius* και σε CCA (Coconut Cream Agar) για έλεγχο παραγωγής OTA κάτω από υπεριώδη φωτισμό (UV LIGHT) (ανεστραμμένο τρυβλίο με την απομόνωση, μετά από 7-10 ημέρες επώαση στους 25°C). Οι καταμετρήσεις των γενών των *Aspergillus* και των *Penicillium* έγινε στο DRBC [28, 30] (εικόνες 1-14, παράρτημα II).

ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Η διατήρηση των αποικιών θα γίνεται με ανάμιξη των σπορίων τους σε διάλυμα γλυκερόλης 10% σε θερμοκρασία -80°C .

10.3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Οι χειρίσμοι των δειγμάτων στον ροδίτη και στον αγιωργίτικο ήταν οι εξής:

1^η Μάρτυρας, απουσία starter, χωρίς προσθήκη SO₂

2^η Μάρτυρας, απουσία starter, με προσθήκη SO₂

3^η Παρουσία starter, παρουσία *A. carbonarius*, απουσία SO₂, απουσία ΟΤ.Α

4^η Παρουσία starter, παρουσία *A. carbonarius*, παρουσία SO₂, απουσία ΟΤ.Α

5^η Παρουσία starter, απουσία *A. carbonarius*, απουσία SO₂, παρουσία ΟΤ.Α

6^η Απουσία starter, παρουσία *A. carbonarius*, απουσία SO₂, απουσία ΟΤ.Α

7^η Απουσία starter, παρουσία *A. carbonarius*, παρουσία SO₂, απουσία ΟΤ.Α

8^η Απουσία starter, απουσία *A. carbonarius*, απουσία SO₂, παρουσία ΟΤ.Α

ΣΧΟΛΙΑ:

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του συνεργαζόμενου με το Ι.ΤΕ.ΓΕ.Π. οινοποιείου έγιναν οι εξής εργασίες:

- Προσθήκη θειώδους στις περιπτώσεις χρήσης STARTER (*Saccharomyces bayanus*)
- Τόσο στη περίπτωση ερυθρής οινοποίησης (ποικιλία Αγιωργίτικο), όσο και στην λευκή (ποικιλία Ροδίτης) θα ζυμωθούν 8lt γλεύκους σε δοχεία ζυμώσεως ελιάς των 10lt.
- Επίσης λάβαμε 10lt επιπλέον από κάθε ποικιλία για επαναλήψεις.

ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ (ποικιλία Ροδίτης)

- Παραλήφθηκε γλεύκος, μετά τις επεξεργασίες έκθλιψης και πίεσης.
- Ακολούθησε θείωση, έως 80ppm ή 6-8g/hl.
- Δεν έγινε διόρθωση οξύτητας.
- Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης προστέθηκαν έως 30ppm θειώδους ανυδρίτη πριν το πέρας της ζύμωσης.
- Απολάσπωση: 24h σε θερμοκρασία ψύξης(4°C). Δεν αφαιρέθηκε οινολάσπη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.
- Δεν έγινε αερισμός για την ανανέωση των ζυμομυκήτων.

ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ (ποικιλία Αγιωργίτικο)

Ισχύουν τα παραπάνω και επιπλέον:

- Ερυθρός χυμός 8 lt μετά από έκθλιψη και πίεση προστέθηκε σε κάθε δοχείο ζύμωσης.
- Προσθήκη στέμφυλων μέσα σε τουρμπάνι βυθισμένο στον χυμό.
- Για αποφυγή υψηλών επιπέδων φαινολικών ενώσεων, απομακρύνθηκαν πλήρως οι βόστρυχες.

- Εκχύλιση: τα στέμφυλα παρέμειναν βυθισμένα στο γλεύκος σε ανοιχτές δεξαμενές.
- Διαχωρισμός οίνου και στέμφυλων: πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Τέλος στον Αγιωργίτικο προστέθηκε και ο οίνος πίεσης.

Ακολούθως τα δοχεία (με 8lt χυμό έκαστο) αποθηκεύονται στους 23 °C. Από κάθε περίπτωση θα λαμβάνονται καθημερινά δείγματα για παρακολούθηση της πορείας του πληθυσμού του *A.carbonarius* και των ζυμομυκήτων (αυτοχθόνων ή starter, *Saccharomyces bayanus*) καθώς και για την μέτρηση θερμοκρασίας, Baume, ΟΤ.Α.

10.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΧΟΛΙΑ

10.4.1. Μελέτη μεταβολής ΟΤΑ στα στάδια οινοποίησης

Όσον αφορά τα δείγματα σταφυλιών έμφαση δόθηκε στην ποικιλία του ροδίτη που κατά την προηγούμενη οινολογική περίοδο είχε δώσει αυξημένα επίπεδα ΟΤΑ κατά την διάρκεια της οινοποίησης. Τα δείγματα που εξετάστηκαν φαίνονται στον Πίνακα 1(παράρτημα Ι) και σε κανένα δεν βρέθηκε ΟΤΑ σε ανιχνεύσιμες τιμές (>0.05 ppb). Πρέπει να σημειωθεί ότι και στην βιβλιογραφία δεν έχουν παρουσιασθεί αποτελέσματα με παρουσία ΟΤΑ στα σταφύλια παρά μόνο παρουσία μύκητα.

Τα αποτελέσματα για τα δείγματα γλεύκους που αναλύθηκαν σε διάφορες φάσεις της ζύμωσης αλλά και στο τελικό προϊόν φαίνονται στον Πίνακα 1. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα παραγωγής ΟΤΑ στα δείγματα γλεύκους που προέρχονταν από Ροδίτη.

Ο ροδίτης Α και Β πίεση που αναφέρεται στον Πίνακα 1(παράρτημα Ι) πρόκειται για κατεργασία που έγινε στο συνεργαζόμενο οινοποιείο και αφορά στις διαφορετικές πιέσεις που ασκούνται στα στέμφυλα κατά την έκθλιψη. Η Α πίεση είναι μικρότερη της Β και ουσιαστικά η κατεργασία αυτή δίνει διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν.

Στα δύο δείγματα γλεύκους που αναλύθηκε η οινολάσπη παρατηρήθηκε μεγάλη συσσώρευση ΟΤΑ στην οινολάσπη με αντίστοιχη μείωση ΟΤΑ στο υπερκείμενο γλεύκος που αποτελεί και κύριο τρόπο απομάκρυνσης της ΟΤΑ από το τελικό προϊόν.

Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκε ωχρατοξίνη στα σταφύλια συμφωνεί με την άποψη ότι ο μύκητας υπάρχει πάνω στον καρπό αλλά δεν παράγει ωχρατοξίνη παρά μόνο όταν δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες (κυρίως θερμοκρασίας – υγρασίας). Γι' αυτό πολύ σημαντικό ρόλο παίζει ο χρόνος παραμονής των καρπών πριν την επεξεργασία. Φαίνεται [16] ότι κατά την διάρκεια της εκχύλισης (maceration) αυξάνει η ΟΤΑ στο γλεύκος ενώ παρατηρείται μια μείωση έπειτα από μηλογαλακτική ζύμωση.

Σγόλια - Προβλήματα κατά την διάρκεια της Φάσης 1

Το γεγονός ότι μπορεί να εμφανισθεί παρουσία ωχρατοξίνης Α σε μούστο, χωρίς να έχει προηγουμένως ανιχνευθεί στα σταφύλια της ίδιας ποικιλίας πιθανόν οφείλεται και στη μη πλήρη αντιστοιχία των δειγμάτων σταφυλιών με αυτά των μούστων, μια που στη βιομηχανία ο μούστος μπορεί προέρχεται από ένα πολύ μεγαλύτερο δείγμα σταφυλιών. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με πιλοτική οινοποίηση στο εργαστήριο συγκεκριμένων δειγμάτων σταφυλιών από τις ποικιλίες που εμφάνισαν ωχρατοξίνη.

10.4.2. Μελέτη της μυκητοχλωρίδας των σταφυλιών και του οίνου σε συνδυασμό με τη παραγωγή και αποικοδόμηση της ωχρατοξίνης Α.

Σε αυτή τη φάση έγινε μια προσπάθεια δικαιολόγησης των παραγόντων που επιδρούν στην μεταβαλλόμενη ποσότητα της ωχρατοξίνης Α κατά τη διάρκεια της πορείας της οινοποίησης.

Η μείωση της ΟΤΑ από είδη του *Aspergillus* όπως αναφέρεται σε μια εργασία (Varga et al. 2000) [55] είναι δυνατή. Σε αυτή την εργασία αναφέρεται ότι σε 70 είδη *Aspergillus* που απομονώθηκαν και εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να αποικοδομούν την ΟΤΑ, μόνο οι απομονώσεις των *A. fumigatus* και οι μαύροι ασπέργιλλοι μπόρεσαν να εξουδετερώσουν την ΟΤΑ από το μέσο καλλιέργειας. Ο *A. japonicus*, ο οποίος μάλιστα βρέθηκε και αναγνωρίστηκε μεταξύ των αυτοχθόνων μυκήτων στον αγρωγίτικο και ροδίτη οίνο του πειράματος μπορεί να αποικοδομήσει μερικώς την ΟΤΑ σε ωχρατοξίνη α (Varga et al. 2000) [55]. Να σημειωθεί ότι η ωχρατοξίνη α έχει μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με την ΟΤΑ (Harwing 1974) [55]. Σε υγρό υπόστρωμα καλλιέργειας η ΟΤΑ αποικοδομήθηκε πλήρως σε ωχρατοξίνη α από συγκεκριμένη υφή του *A. niger* (CBS 120.49) σε 7 μόλις ημέρες. Επιπλέον παλαιότερες εργασίες με τον *A. carbonarius* έδειξαν την ικανότητα του να αποικοδομεί την ΟΤΑ σε παραπροϊόντα όπως ωχρατοξίνη α, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με το ένζυμο καρβοξυπεπτιδάση (Abrunhosa et al. 2002) [76].

Πρέπει επίσης να αναφερθεί η επίδραση των υφών των ζυμών στην ΟΤΑ κατά τη διάρκεια ζύμωσης ερυθρού και λευκού γλεύκους. Σε πείραμα που εξετάστηκε ζυμούμενη μύρα, στην οποία περιεχόταν γνωστή περιεκτικότητα ΟΤΑ, οι Scott et al. (1995) [75] χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές υφές του μύκητα *Sacharomyces* spp., διαπίστωσαν ότι η ΟΤΑ μειώθηκε κατά 13% συνολικά και οι ζύμες είχαν κατακρατήσει το 21%. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι μύκητες του γένους *Aspergillus* υποβαθμίζουν ορισμένες αφλατοξίνες πιθανώς μέσω των μυκηλιακών περοξιδασών. (Lopez- Garcia and Park 1998) [75]. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει

αλληλεπίδραση των παραγόμενων ενζύμων από τους μύκητες με τις παραγόμενες τοξίνες. Σε πιο πρόσφατη έρευνα (Bejaoui et al. 2004) [75] αποδεικνύεται ότι υφές των οινολογικών ζυμών *Sacharomyces* απομακρύνουν την ΟΤΑ από το κόκκινο γλεύκος. Το συμπέρασμα αυτό τεκμηριώνεται και στον Πίνακα 2(παράρτημα Ι) όπου στον αγιωργίτικο οίνο, στις μεταχειρίσεις με starter (*S. bayanus*), το τελικό προϊόν υπάρχουν και οι μικρότερες συγκεντρώσεις ΟΤΑ. Η ικανότητα κατακράτησης ΟΤΑ ήταν μεγαλύτερη στον ερυθρό από ότι στο λευκό οίνο, πάντα λόγω των ζυμών. Οι ζύμες που ευθύνονται γι' αυτό είναι: *S. cerevisiae*, *S. bayanus var. uvarum*, *S. bayanus* και ο *Schiz. pombe* (F. Cecchini et al. 2005) [75]. Επίσης βιβλιογραφικά τεκμηριώνεται και το υψηλό ποσοστό που κατακρατούν οι οινολάσπες του λευκού οίνου (Garsia Moruno et al. 2005) [75].

Στο παράρτημα ΙΙ παρουσιάζονται γραφήματα τα οποία έχουν προκύψει από τις μικροβιολογικές απομονώσεις. Με αυτό τον τρόπο βλέπουμε την ανάπτυξη του *A. carbonarius* ανάλογα με τους χειρισμούς των υποδειγμάτων, αλλά και τη σχέση παρεμπόδισης που αναπτύσσει με τις μυκηλιακές υφές.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί η ευαισθησία που παρουσιάζει η ΟΤΑ σε οικολογικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η a_w . Αναφέρονται ως optimum συνθήκες 0,97 a_w και 20° C (Bellì et al. 2004) [76]. Στην εργασία αυτή αναφέρεται ότι η παραγωγή ΟΤΑ από τον *A. carbonarius* ήταν μέγιστη για a_w 0,93-0,98 στους 25°C την 5^η ημέρα από τη στιγμή του εμβολιασμού. Το γεγονός αυτό τεκμηριώνεται και από το πείραμα όπου ο ροδίτης οίνος εμφανίζει και τη μεγαλύτερη ποσότητα σε ΟΤΑ (Πίνακας 2, παράρτημα Ι). Σε νεότερη εργασία αναφέρεται ότι σε a_w 0,97 η μείωση της ΟΤΑ μετά την 7^η ημέρα ίσως είναι αποτέλεσμα μιας μειωμένης ή τετελεσμένης παραγωγής και η μείωση οφείλεται σε πιθανή αποικοδόμηση από τον ίδιο το μύκητα, ο οποίος για να διατηρήσει ένα υψηλό μεταβολικό ρυθμό ψάχνει για εναλλακτικές πηγές άνθρακα (A.Valero et al. 2006) [76]. Η πληροφορία αυτή επιβεβαιώνεται και στο πείραμα όπου φαίνεται καθαρά η μείωση της ΟΤΑ στο αγιωργίτικο (Πίνακας 2, παράρτημα Ι). Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί το φαινόμενο αστάθειας της τοξίνης καθώς σε a_w 0,97 και 20°C η τοξίνη εμφανίζει φαινόμενα διάχυσης στο μέσο καλλιέργειας, στο χρονικό όριο μάλιστα όπου και η ανάπτυξη του *A. carbonarius* είναι βραδύτερη (A.Valero et al. 2006)[76].

10.4.3. Διερεύνηση διαφόρων τεχνολογικών χειρισμών για την μείωση της ΟΤΑ που δεν επιδρούν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Τα προσροφητικά υλικά και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- I. Μπεντονίτης, 0.4 g/l σε επαφή με το δείγμα 1-2 ώρες.
- II. Καζεΐνη, 0.75 g/l σε επαφή με το δείγμα 1-2 ώρες.
- III. Ενεργός άνθρακας, 0,1 g/l σε επαφή με το δείγμα 1-2 ώρες.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από οδηγίες οινοποίησης [78], και ανταποκρίνονται σε πραγματικές ποσότητες που χρησιμοποιούνται σε διάφορα στάδια της βιομηχανίας του οίνου.

Τα δείγματα οίνου στα οποία εφαρμόστηκε η επεξεργασία με τα παραπάνω υλικά είχαν αρχική συγκέντρωση ΟΤΑ 3-5 $\mu\text{g l}^{-1}$ η οποία είχε προστεθεί. Τα δείγματα μετά την προσθήκη του προσροφητικού και την ανάμιξη φιλτραρίστηκαν και αναλύθηκαν για παρουσία ΟΤΑ με την μέθοδο των Visconti *et al.* (Φάση 1) οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε δύο δείγματα ερυθρού και δυο δείγματα λευκού οίνου (μεταχειρίσεις : 5^η, 8^η και Ε, Η για αγιωργίτικο και ροδίτη οίνο αντίστοιχα).

Οι Castellari *et al* (2001)[77] διαπίστωσαν ότι η καζεΐνη και ο ενεργός άνθρακας έδειξαν υψηλά ποσοστά απορρόφησης ΟΤΑ. Σύμφωνα με αυτή την εργασία τα αποτελεσματικότερα προσροφητικά ήταν: ο ενεργός άνθρακας, το silica gel, η αλβουμίνη του αυγού, η ζελατίνη και η καζεΐνη.

Ο ενεργός άνθρακας είναι ένα αποτελεσματικό προσροφητικό, εμφανίζοντας μεγάλη προσροφητική επιφάνεια ανά μονάδα μάζας. Ο Rotter *et al.* (1989) [77] χρησιμοποιώντας 3 μg ΟΤΑ /mg ενεργού άνθρακα αναφέρει 90% προσροφητική ικανότητα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο ενεργός άνθρακας αφαιρεί τις ανθοκυάνες και άλλες χρωστικές από το κόκκινο κρασί οπότε η χρήση από τις οινοποιητικές μονάδες πρέπει να γίνεται σε τέτοιες ποσότητες που να μην υποβαθμίζουν το τελικό προϊόν.

Στην ίδια εργασία [77] ο μπεντονίτης αν και έδειξε ικανοποιητική επάρκεια ως υλικό προσρόφησης, συγκρινόμενος με τον ενεργό άνθρακα, η ΟΤΑ που απορροφήθηκε συνολικά ήταν σε μικρό ποσοστό (8%), ενώ ο ενεργός άνθρακας έφτασε το 61%. Εκφράζεται μια υπόθεση σύμφωνα με την οποία η ΟΤΑ εγκλωβίζεται μεταξύ διαστρωματικών κενών που εμφανίζει η σύνθεση του μπεντονίτη, μέσω ενός μηχανισμού ανταλλαγής κατιόντων. Καθώς ο μπεντονίτης προσροφά τις πρωτεΐνες του οίνου ίσως εμφανίζεται ένα φαινόμενο παρεμπόδισης απομάκρυνσης της ΟΤΑ από το κρασί [77].

Όπως διακρίνεται και στον πίνακα 3(παράρτημα Ι), η καζεΐνη αποτέλεσε καλό προσροφητικό μόνο για τον ερυθρό οίνο, ενώ ο μπεντονίτης και ο ενεργός άνθρακας έδειξαν καλύτερα αποτελέσματα στο λευκό.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ι.ΤΕ.ΓΕ.Π. ήταν διερευνητική καθώς έγινε με απλή ανάμιξη του οίνου με τα προσροφητικά υλικά, παραμονή για μικρούς χρόνους και φιλτράρισμα ενώ σε βιομηχανική κλίμακα ακολουθούνται άλλες τεχνικές όπως, προσθήκη μπεντονίτη (*bentonitage*), διαύγαση με κολλάρισμα (*collage*) και η διαύγαση με διήθηση (φιλτράρισμα) [78].

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Στον σημερινό, γεμάτο αλλαγές κόσμο, η ασφάλεια και η προστασία έχουν παραμείνει βασικές ανθρώπινες ανάγκες οι οποίες δεν περιορίζονται στον χώρο της διατροφής και των τροφίμων αλλά επεκτείνονται στο περιβάλλον, την κοινωνία, την οικονομία και την πολιτική. Η εγγύηση-διαβεβαίωση της ασφάλειας των τροφίμων έχει συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον σε διεθνές επίπεδο τα τελευταία χρόνια.

Το έδαφος θεωρείται η πιο μεγάλη πηγή θετικών (θρεπτικά στοιχεία, ευεργετικοί μικροοργανισμοί) αλλά και αρνητικών παραγόντων (παθογόνα), όπου τα φαινόμενα ανταγωνισμού εκφράζονται σ' όλο τους το μεγαλείο. Ωστόσο το έδαφος σπάνια αναλογίζεται ως σημείο δράσης για την αντιμετώπιση μικροβιολογικών προβλημάτων που προκύπτουν πολύ αργότερα κατά την τροφική αλυσίδα. Μόλις τα τελευταία χρόνια άρχισε να λαμβάνεται σοβαρά ο ρόλος του στην υγεία και την άμυνα των φυτών και όχι μόνο ως "αποθήκη" θρεπτικών συστατικών. Ίσως ενέργειες (καλλιεργητικές τεχνικές) που θα οδηγούσαν σε αύξηση των μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται τον πληθυσμό των μαύρων *Aspergilli*⁵⁴ να συνεισέφεραν σημαντικά στην αποτροπή της εμφάνισης των τελευταίων στις ράγες και κατά συνέπεια στην παραγωγή ΟΤΑ. Αν και γίνονται νύξεις για την επίδραση του εδάφους [50] ωστόσο δεν έχουν εξεταστεί πιθανές επεμβάσεις σ' αυτό που να έχουν την δυνατότητα να επηρεάσουν το αρχικό μόλυσμα εκεί, στην πηγή του.

Το γεγονός ότι οι ζύμες μπορούν και προσροφούν αποτελεσματικά στα τοιχώματά τους ΟΤΑ είναι ελπιδοφόρο αφού έτσι υποδεικνύεται ένας απλός, αποτελεσματικός, φτηνός και συμβατός τρόπος μείωσης της ΟΤΑ στους οίνους. Ωστόσο η μη απομάκρυνση των ζυμών πριν την εμφιάλωση και η πιθανή αδυναμία της εφαρμόζουσας τεχνικής προσδιορισμού της ΟΤΑ σε δείγματα οίνου να αποδεσμεύσει την ΟΤΑ από τις ζύμες υποδεικνύουν ότι οι πραγματικές συγκεντρώσεις ίσως είναι υψηλότερες από τις φαινομενικές.

Όμως ακόμη και η χρήση των ζυμών για την μείωση των συγκεντρώσεων ΟΤΑ αποτελεί μια αποτελεσματική αντιμετώπιση και όχι ριζική λύση του προβλήματος εν τη γενέσει του. Η σποραδική εμφάνιση του προβλήματος γεννά προβληματισμό ως προς τις συνθήκες που ευνοούν την εμφάνισή του, συνθήκες που θα πρέπει να ερευνηθούν και να διευκρινιστούν για την εξάλειψη κι όχι απλώς την λύση του.

Αναλογιζόμενοι ότι το ΤDΙ είναι 5 ng ΟΤΑ/kg ΣΒ και διαπιστώνοντας ότι τα επίπεδα μίανσης στον οίνο σχετικά σπάνια φτάνουν τα νομοθετικά όρια, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι

⁵⁴ Αν και αναλογίζονται ως σαπροφυτικοί και κατά συνέπεια η παρουσία τους θα είναι έντονη κατά την παρασκευή compost.

τα τελευταία είναι τόσο υψηλά πιθανώς λόγω της αδυναμίας των αναλυτικών τεχνικών να προσδιορίσουν με ακρίβεια το περιεχόμενο της ΟΤΑ σ' ένα τρόφιμο όταν αυτό το περιεχόμενο βρίσκεται σε επίπεδα που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία [72]. Επομένως η καθιέρωση ανώτατων ορίων σε επίπεδα που θα εξασφάλιζαν την ανθρώπινη υγεία θα συνοδεύονταν με υψηλά ποσοστά αβεβαιότητας των αποτελεσμάτων των αναλύσεων με αποτέλεσμα να εγείρονται προβλήματα στο εμπόριο λόγω των αμφιλεγόμενων αποτελεσμάτων.

Ένας επιπλέον λόγος εδραίωσης αυτών των υψηλών ανώτατων ορίων από την Ε.Ε. ίσως αφορά την διευκόλυνση του παγκόσμιου εμπορίου. Ωστόσο δεν είναι λίγοι αυτοί που υποστηρίζουν ότι η Ε.Ε. έχει εδραιώσει αδικαιολόγητα υψηλά νομοθετικά όρια (αν και πριν από λίγο αποδείξαμε το αντίθετο). Παρόλα ταύτα, αυτοί αλλά και άλλοι ερευνητές διαπιστώνουν ότι η έκθεση σε ΟΤΑ είναι μεν παγκόσμια αλλά είναι ιδιαίτερη στην Ευρώπη [70], τόσο εξαιτίας των προϊόντων που παράγει⁵⁵ όσο και του ευρωπαϊκού μοντέλου διατροφής. Η διαπίστωση αυτή μπορεί να αποτελέσει ακόμη ένα όπλο έναντι τις υπεράσπισης αυτών των ορίων από την Ε.Ε., αν όχι και την μείωσή τους, βασιζόμενοι στην αρχή προστασίας των πληθυσμών των κρατών μελών της.

Καλό θα ήταν να αναφερθεί ότι εκφράζεται ανοιχτά η άποψη ότι η εδραίωση των ανώτατων ορίων (τουλάχιστον όσον αφορά την ΟΤΑ) φαίνεται να γίνεται περισσότερο με βάση τα επίπεδα μίανσης των τροφίμων και λιγότερο με βάση την ασφάλεια η οποία θα λάμβανε υπόψη την έκθεση και την ευαισθησία των ανθρώπινων οργανισμών [71].

Μερικοί επιστήμονες έχουν την άποψη ότι αν μπορούσε να γίνει μόνο μια αλλαγή στην ανθρώπινη διατροφή ανά τον κόσμο η πιο αποτελεσματική και ευεργετική που θα μπορούσε να γίνει θα ήταν η εξάλειψη των μυκοτοξινών [70]. Είναι σωστό ότι τα τροφιμογενή βακτήρια αποτελούν ένα σημαντικό λόγο ανησυχίας για την ανθρώπινη υγεία, ωστόσο είναι δύσκολο να ξεφύγει κανείς από το συμπέρασμα ότι οι μυκοτοξίνες στα τρόφιμα ευθύνονται για πολύ υψηλότερους αριθμούς θανάτων ανθρώπων απ' ότι τα τροφιμογενή βακτήρια [72].

Είναι κρίμα που το μόνο που κρατήσαμε από τον Παράκελσο είναι ότι η δόση κάνει το δηλητήριο, όσον αφορά την τοξικολογία, ενώ εξίσου λυπηρό είναι το γεγονός ότι αγνοούμε το επιστημονικό έργο του Γκαίτε το οποίο είναι πολύ πιο σημαντικό (αν και ανολοκλήρωτο) από το λογοτεχνικό του έργο. Ο νικητής γράφει την ιστορία, αυτό συνέβη άλλωστε, ωστόσο ποτέ δεν είναι αργά.

⁵⁵ Είδαμε π.χ. ότι το πρόβλημα της ΟΤΑ στον οίνο εστιάζεται στις μεσογειακές οινοπαραγωγές χώρες.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Ι. ΠΙΝΑΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Πίνακας 1: Ποσότητες ΟΤΑ(ppb) των υποδειγμάτων από HPLC

Ποικιλία	ΟΤΑ(ppb)	ΟΤΑ (ppb)Φάση Ζύμωσης			
	Σταφύλια	Αρχή	Μέση	Τέλος	Οινολάσπη
Ροδίτης 1	ND*				
Ροδίτης 2	ND*				
Ροδίτης 3	ND*				
Ροδίτης 4	ND*				
Ροδίτης 5	ND*				
Ροδίτης 6(A πίεση)		1,46		0,8	8,2
Ροδίτης 6(B πίεση)		3,26		2,1	10,7
Ροδίτης 7(A πίεση)		0,25			
Ροδίτης 7(B πίεση)		0,29		0,13	
Αγιωργίτικο	ND*	ND*			

*ND: non detectable(μη ανιχνεύσιμο)

Πίνακας 2: Ποσότητες ΟΤΑ(ppb) των υποδειγμάτων από HPLC

ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ							
υποδείγμα	κατεργασία	1 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	7 ^η ημέρα	11 ^η ημέρα	Τελικό προϊόν	στέμφυλο
Μάρτυρας	Χωρίς προσθήκη Starter -asp -SO ₂	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
1	με προσθήκη SO ₂ Χωρίς προσθήκη Starter και asp	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2	με προσθήκη Starter και asp Χωρίς προσθήκη SO ₂	0,57	0,42	0,22	0,14	0,17	0,78
3	με προσθήκη Starter, asp και SO ₂	0,50	0,37	0,20	0,17	0,13	1,33
4	με προσθήκη Starter και ΟΤΑ Χωρίς προσθήκη asp και SO ₂	3,51	3,1		2,67	2,23	4,10
5	με προσθήκη asp Χωρίς προσθήκη Starter και SO ₂	0,52	0,30	0,22	0,02	0,13	1,34
6	με προσθήκη asp και SO ₂ Χωρίς προσθήκη Starter	0,59	0,35	0,24	0,18	0,19	
7	Χωρίς προσθήκη Starter -asp -SO ₂ με προσθήκη ΟΤΑ	3,30	2,9		1,98	1,47	

ΡΟΔΙΤΗΣ							
υποδείγμα		1 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα	9 ^η ημέρα	Τελικό προϊόν		
Μάρτυρας	Χωρίς προσθήκη Starter -asp -SO ₂	0,30	0,18	0,01	0,01		
1	με προσθήκη SO ₂ Χωρίς προσθήκη Starter και asp	0,15	0,17				
2	με προσθήκη Starter και asp Χωρίς προσθήκη SO ₂	0,83	0,96	0,77	0,63		
3	με προσθήκη Starter, asp και SO ₂	0,61	0,96	0,87	0,73		
4	με προσθήκη Starter και ΟΤΑ Χωρίς προσθήκη asp και SO ₂	5,09		3,51	2,86		
5	με προσθήκη asp Χωρίς προσθήκη Starter και SO ₂	0,58	0,90	0,78	0,73		
6	με προσθήκη asp και SO ₂ Χωρίς προσθήκη Starter	0,73	0,96	0,93	0,83		
7	Χωρίς προσθήκη Starter -asp -SO ₂ με προσθήκη ΟΤΑ	4,81		4,29	2,87		

Πίνακας 3: Επίδραση των προσροφητικών υλικών για την μείωση του επιπέδου ΟΤΑ στους οίνους

Υλικά	% μείωση ΟΤΑ (ppb)	
	Ερυθροί οίνοι	Λευκοί οίνοι
Μπετονίτης	9-14	19-22
Καζεΐνη	15-20	<5
Ενεργός άνθρακας	10-12	19-21

Πίνακας 4: Μικροβιολογικά αποτελέσματα

1^η αριθμηση μετά από 72h, 2^η μετά από 5 ημέρες εκώασης.

Mycelium colonies (Aspergillus spp.) / Yeasts colonies

ΔΕΙΓΜΑ	3-Οκτ				4-Οκτ				5-Οκτ				6-Οκτ			7-Οκτ				
	-2	-3	-4	-5	-2	-3	-4	-5	-2	-3	-4	-5	-3	-4	-5	-6	-3	-4	-5	
αγωγιτικό																				
1		16(11)/240	0/43		>10(7)/	>10	2	0/14		5(1)/	1/	0/370		0/	0/	0/29,0/21	0/	0/1/	0/29,0/3	
2		7(3)/92	1(1)/14		2(2)/	1(1)/	0/	2(1)/14		9/	0/	0/410		0/	0/	0/51,0/43	0/	0/	0/47,0/7	
3		8(6)/>100	1/28		>10(>10)/	>5(5)/	0/	0/18		10(4)/	0/	0/310		0/	0/	0/26,0/17	(1)/,0/	1/0/	0/54,0/5	
4		11(6)/>100	0/16		>10(>10)/	5(5)/	3/	0/18		9(6)/	0/	0/300		1/	0/	0/44,0/50	0/	0/90,0/40	0/0, 0/1	
5		4/>100	0/37		>10(>10)/	>10(2)/	2/700	~		7/	1/	0/370		0/	0/	0/31,0/25	0/	0/	0/63,1/6	
6		45(35)/>100	0/>100	0/28	>10(>10)/	34(5)/	8/1000	~		10(3)/	1/	0/220		0/	0/	0/22,0/26	0/	0/	0/24,0/2	
7		30(26)/>100	8(5)/116	0/6	>10(>10)/	6(6)/	1/	0/12		6(4)/	0/	(1)/300		0/	0/	0/32,0/47	0/	0/	0/92,0/6	
8		50(36)/>100	8(7)/>100	2(2)/48	2(2)/	25(>10)/	8(5)/	3/40		~	2(1)	0/240		0/	0/	0/38,0/51	0/	0/	0/31,0/4	
ροδίτης																				
A										~	(11)/	0/26		(>10)/	(3)/	(1)/	0/76,0/92	(1)/,0/	1/0/	0/144,0/
B										24(>10)/	(4)/	(1)/13		(>10)/	4(3)/,(5)	0/,(1)/	0/52,0/92	0/	0/	1/172
C										18(7)/	2(1)/	(1)/21		(>10)/	4(3)/,(5)	0/,(1)/	0/52,0/92	0/	0/	0/91,0/5
D										18(15)/	(2)/	0/18		(>10)/	(4)/,5(4)/	0/	0/84,0/88	1/0/	0/1/	0/88,0/7
E										26(>10)/	4(3)/	0/24		(>10)/	3(1)/,(1)/	1/1/	0/50,0/90	0/	0/	0/84
F										22(>10)/	4(3)/	~		(>10)/	(6)/,8(7)/	0/0/	0/64,0/60	0/	0/	0/88,0/8
G										36(>10)/	9(7)/	0/21		(>10)/	(9)/,(2)/	0/,(2)/	0/70,0/90	1/0/	0/	0/64,1/7
H										18(3)/	(1)/	0/18		(>10)/	(2)/,(1)/	~	0/50,0/80	0/	0/	1/176, 0/>100

Πίνακας 5: Φυσικοχημικά αποτελέσματα

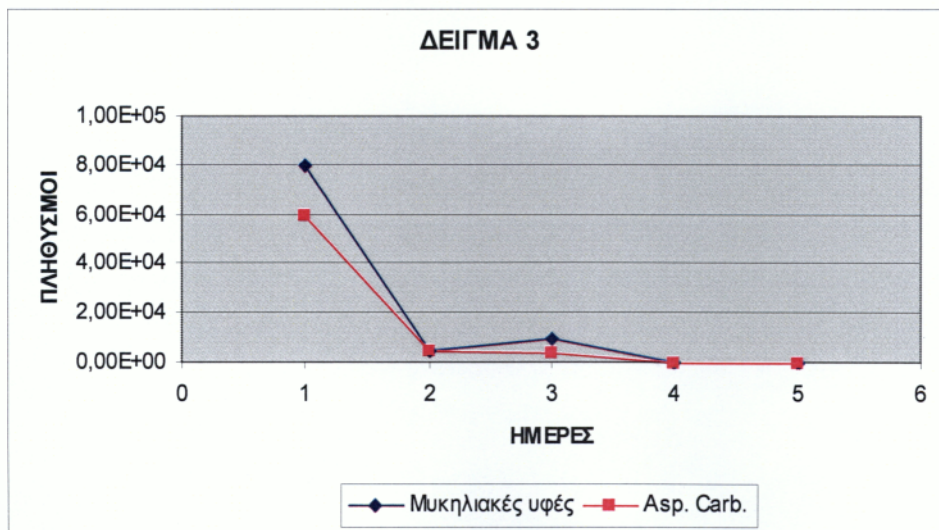
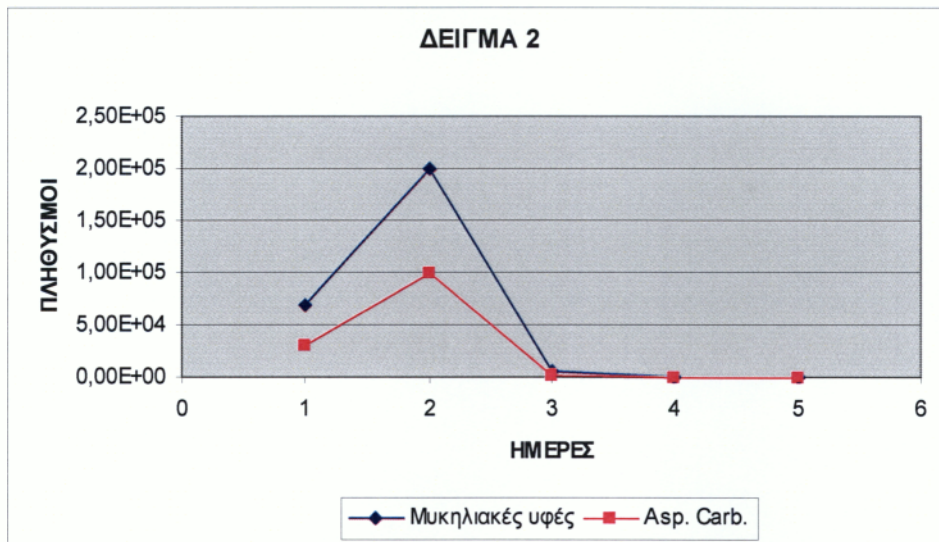
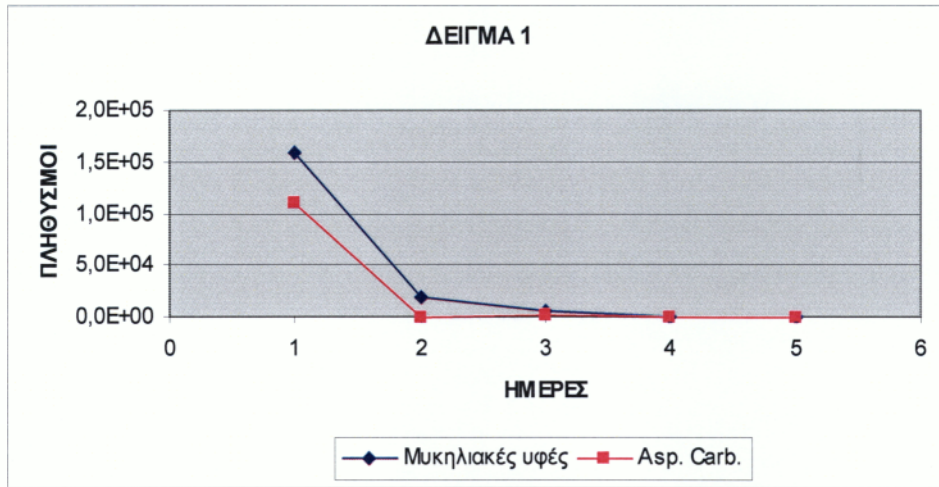
day/temp(°C) →	3- 10/20.0	4-10/22.5- 23.8	morning 5-10/21.8- 24.0
#sample		°Be	
1	11,7	11,4	7,7
2		11,6	8,5
3		11,5	7,2
4		11,7	8
5		11,2	7,5
6		11,2	7,4
7		11,1	8,6
8		11,2	7
μέσος όρος αγωγιμτικού		11,3625	7,7375
A			
B			
C			
D			
E			
F			
G			
H			
μέσος όρος ροδίτη			

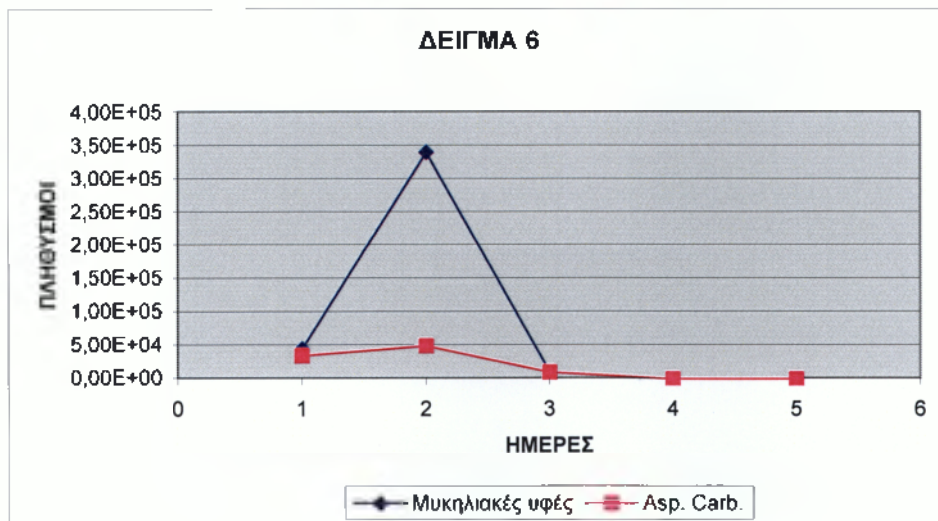
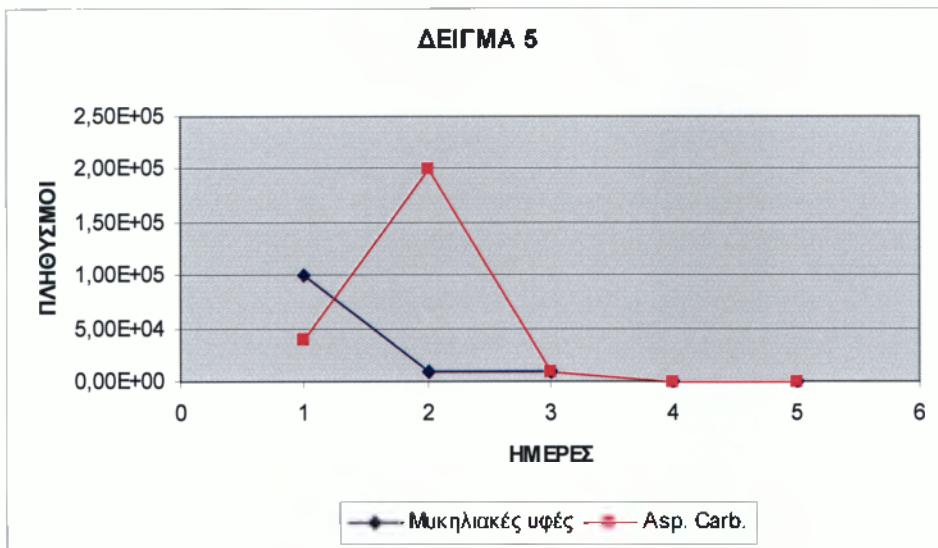
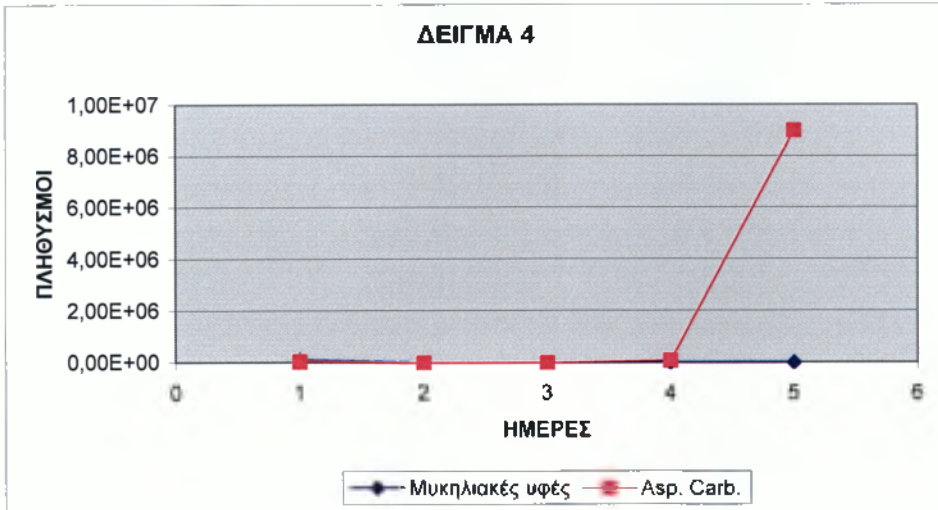
evening			
5-10/23.5- 24.2	6-10/23.5- 24.0	7-10/23.5	8-10/23.5- 24.0
7,4	6,25	3	1,5
8,5	5	3,6	1,5
6,5	6	2,6	1
8	5,5	3,2	1,2
7,5	5,6	3,4	1,7
7	5,3	3	1,5
8,4	6,4	3,6	1,7
7	5,2	2,9	1,5
7,5375	5,65625	3,1625	1,45
11,3	9,2	5	1,8
	9,6	4,8	1,9
	9	4,8	1,4
11,3	9	4,5	1,6
	9	4,2	1,4
	8,7	4,5	1,6
	9	4,5	1,6
	8,7	4,4	1,4
	9,025	4,5875	1,5875

II. Γραφήματα εργαστηριακού μέρους

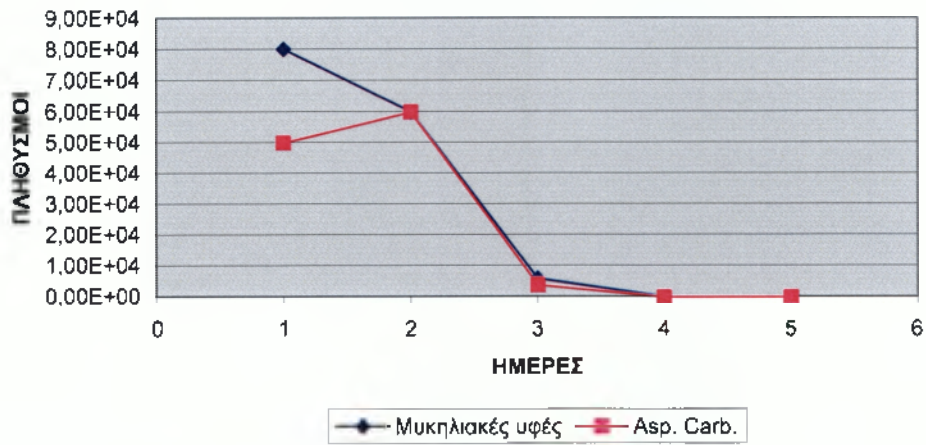
ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΩΝ: Σύγκριση ανάπτυξης μυκηλιακών υφών με *A. carbonarius*.

Ποικιλία Αγωργίτικο

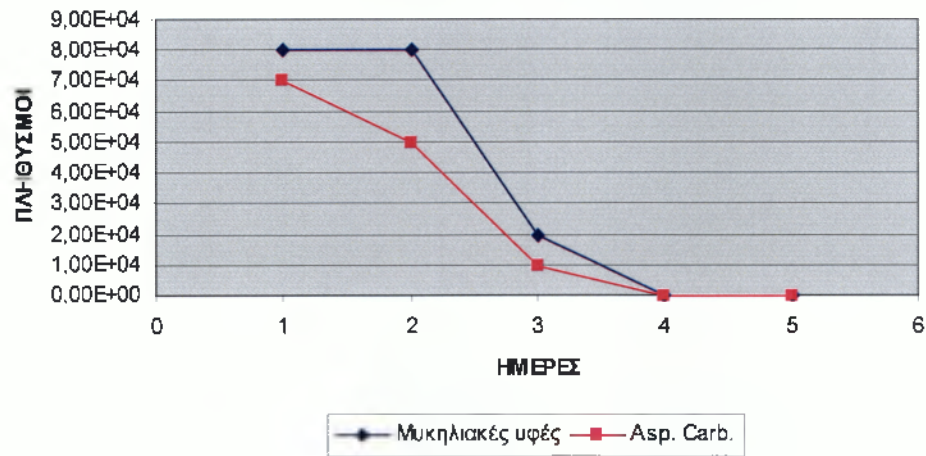




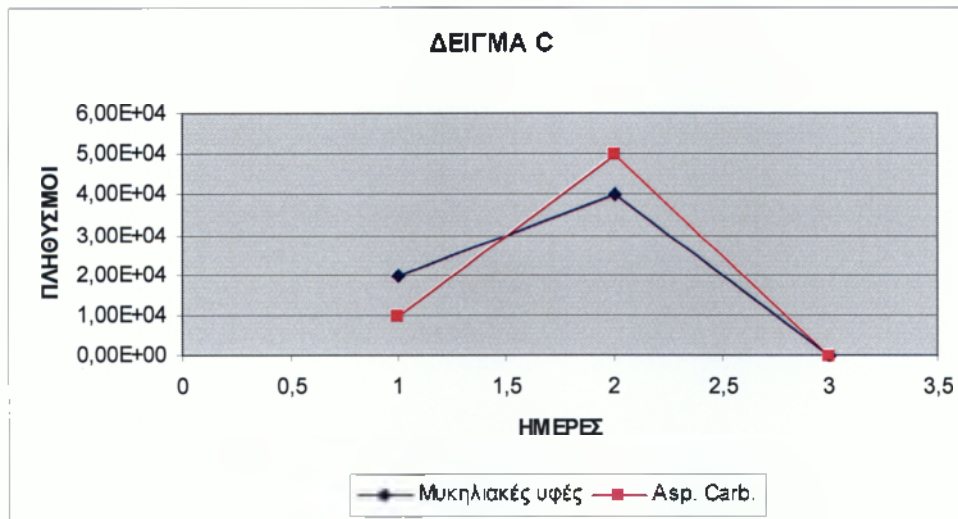
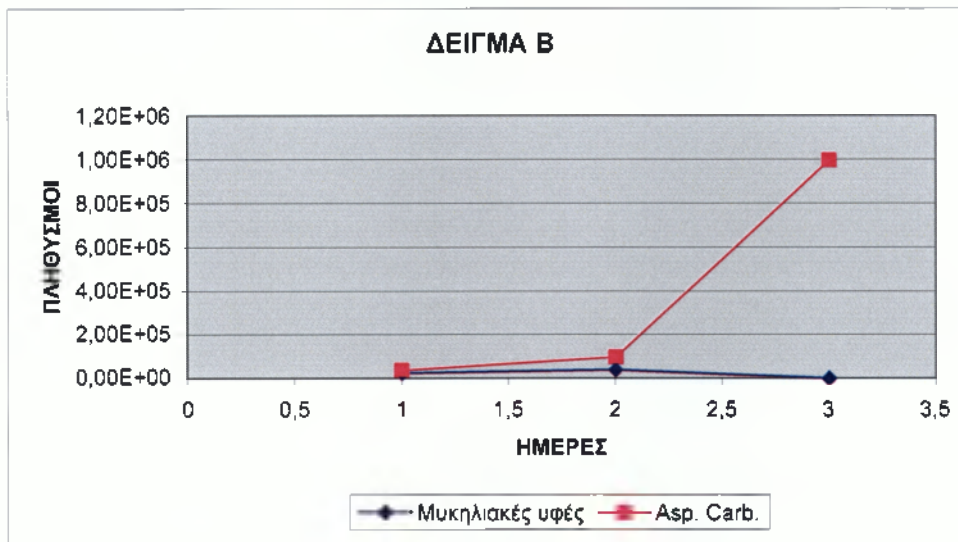
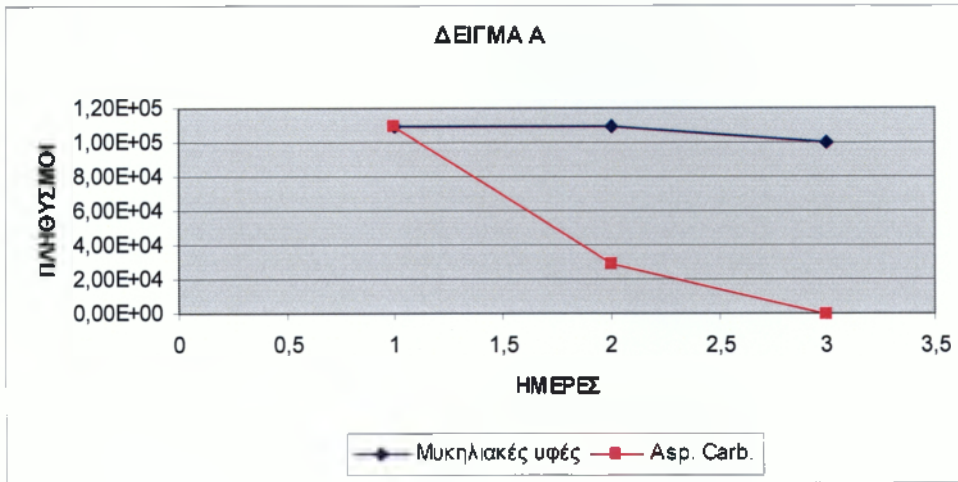
ΔΕΙΓΜΑ 7

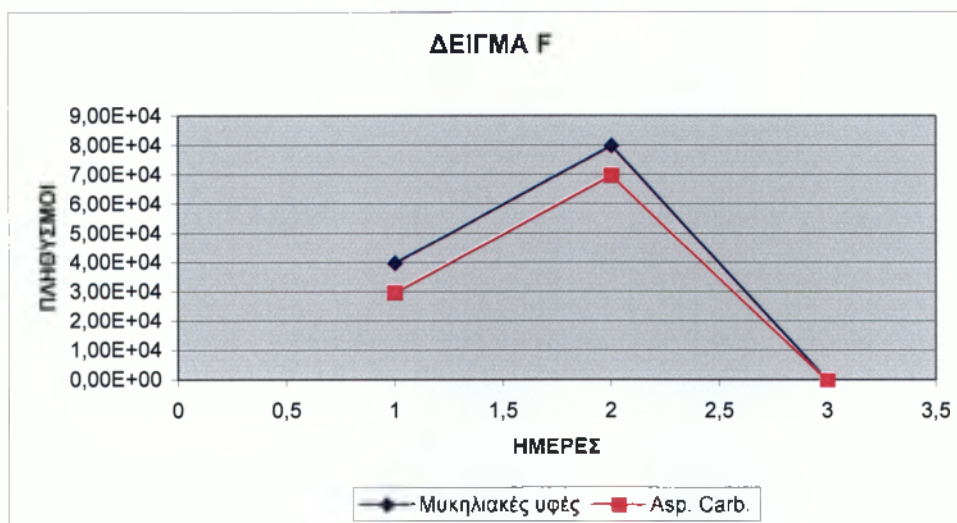
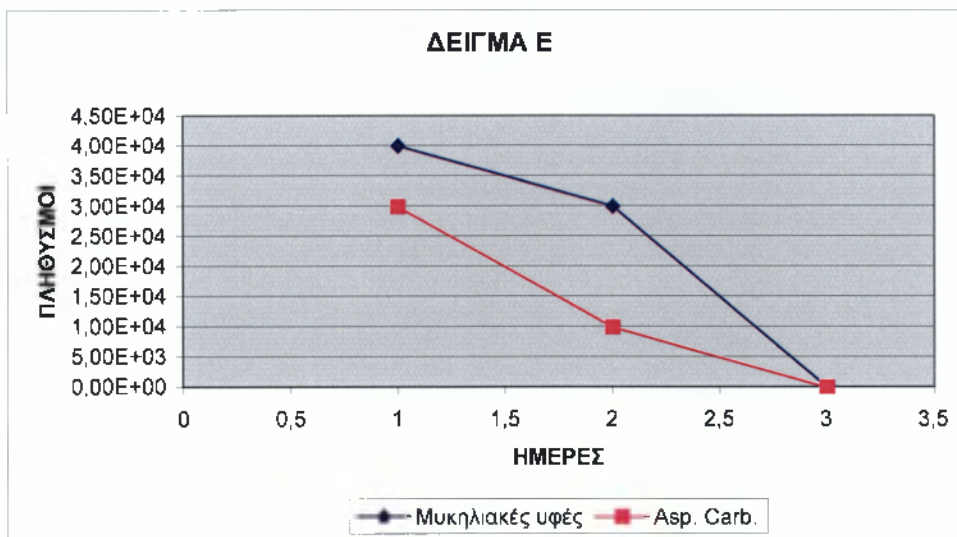
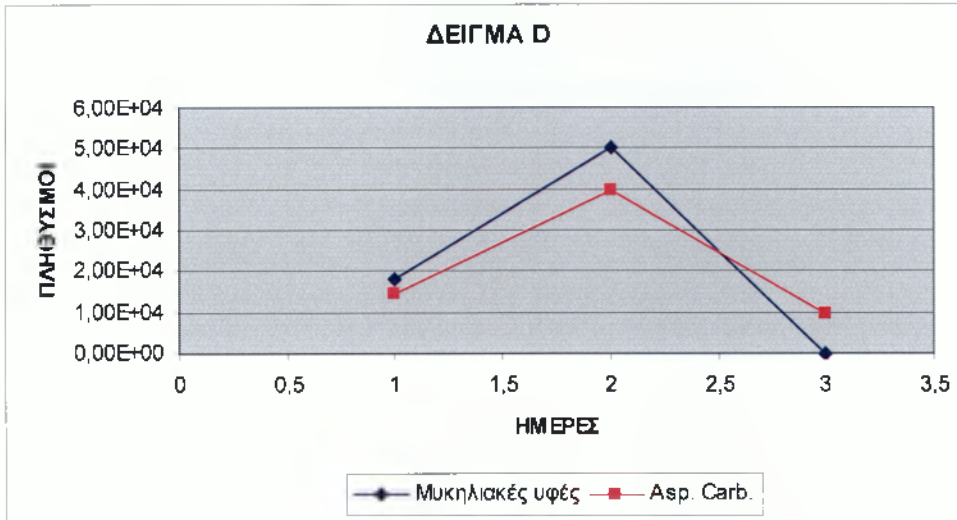


ΔΕΙΓΜΑ 8

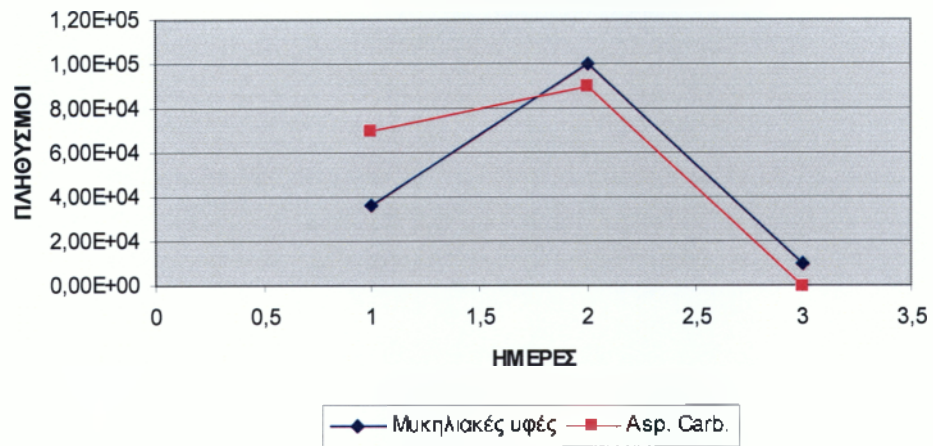


Ποικιλία Ροδίτης

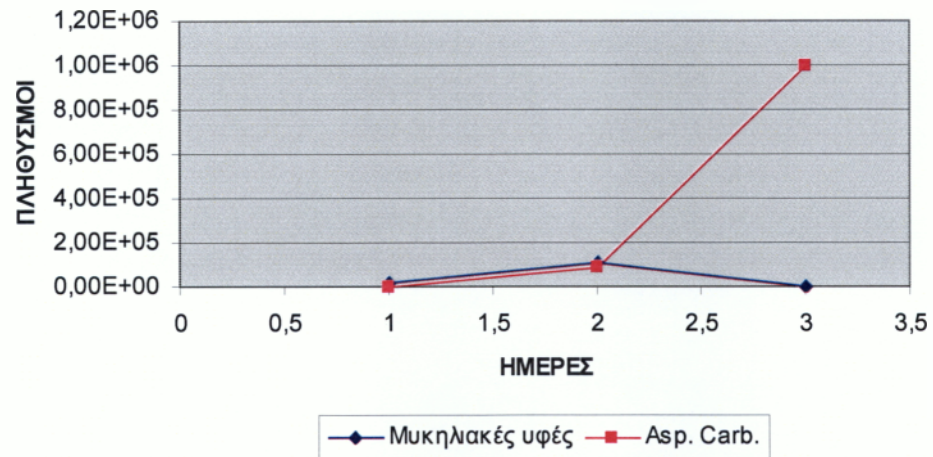




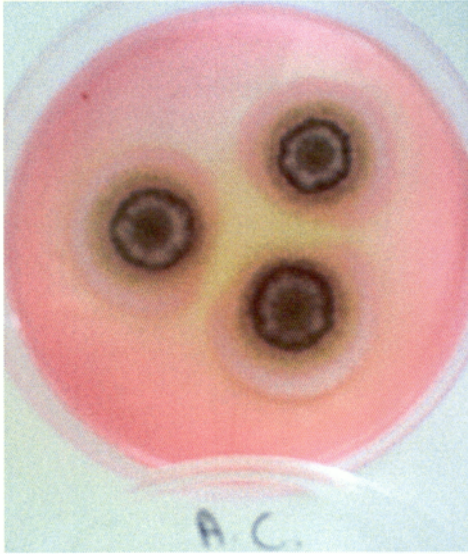
ΔΕΙΓΜΑ G



ΔΕΙΓΜΑ Η



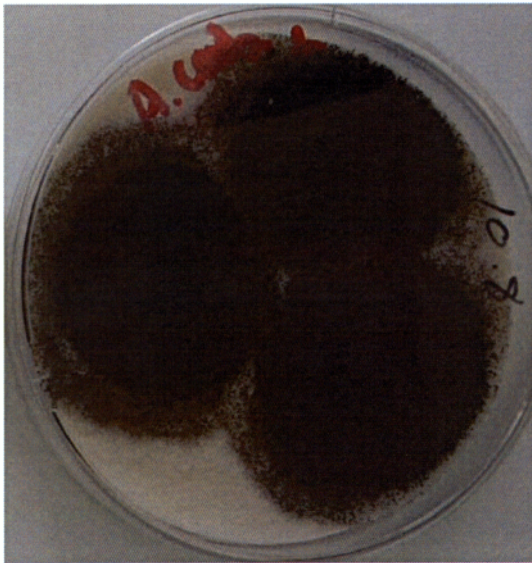
III. ΕΙΚΟΝΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ



Εικόνα 1: *A. carbonarius* σε DRBC



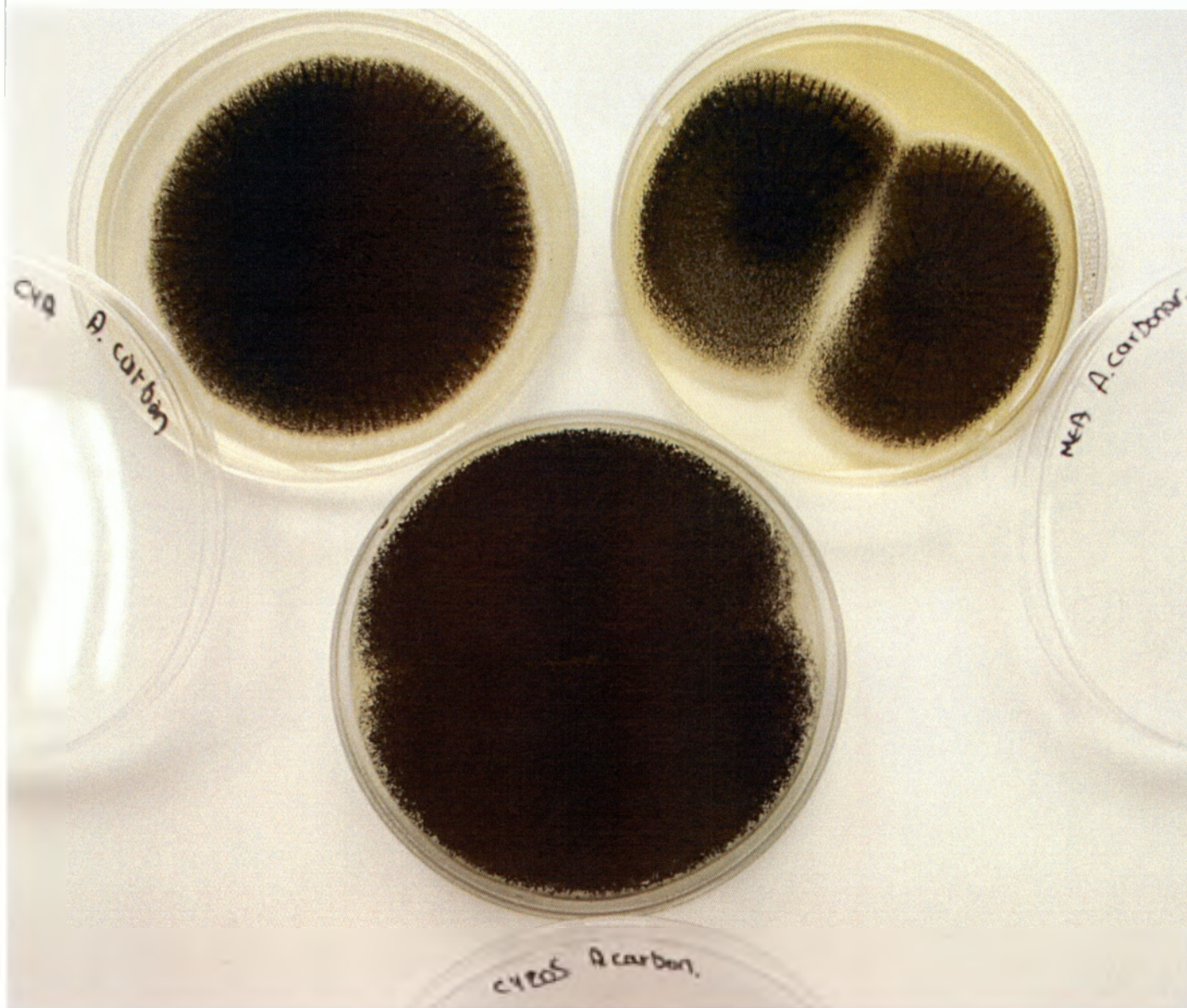
Εικόνα 2: *A. carbonarius* σε DRBC (ανεστραμμένο τρυβλίο)



Εικόνα 3: *A. carbonarius* σε υπόστρωμα καρύδας



Εικόνα 4: Φωτογραφία μικροσκοπικής παρατήρησης (X40) του *A. carbonarius*.



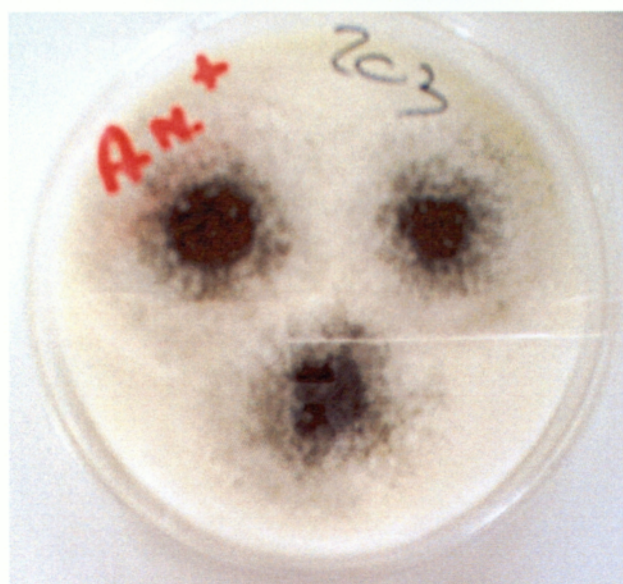
Εικόνα 5: *A. carbonarius* στα τρία υποστρώματα ταυτοποίησης (CYA, MEA, και CY20S)



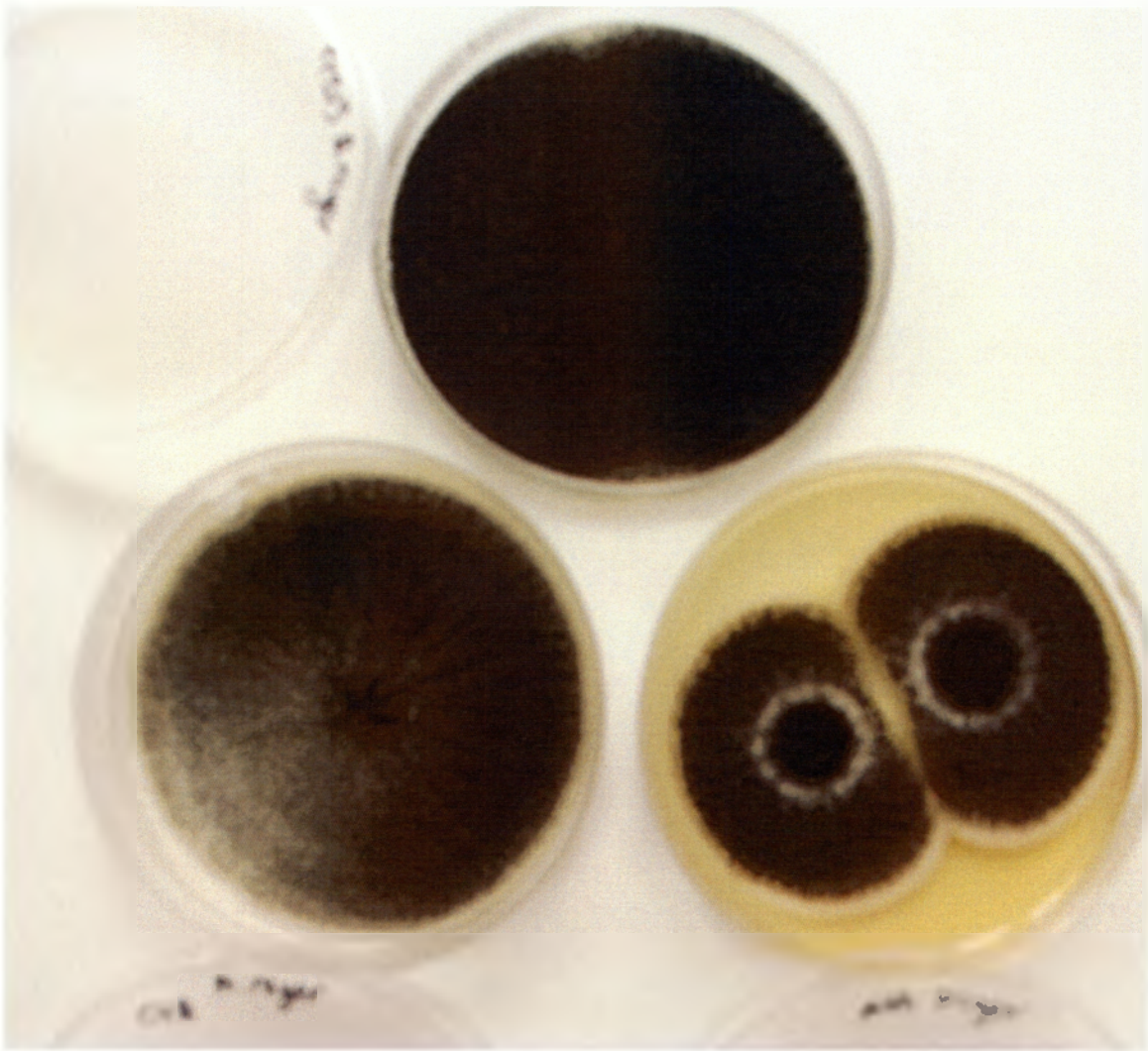
Εικόνα 6: *A. niger* σε DRBC



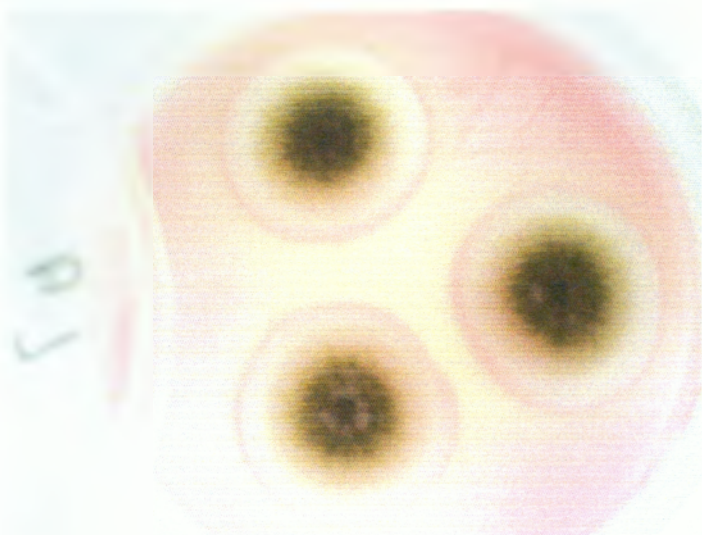
Εικόνα 7: Φωτογραφία μικροσκοπικής παρατήρησης (X 40) του *A. niger*



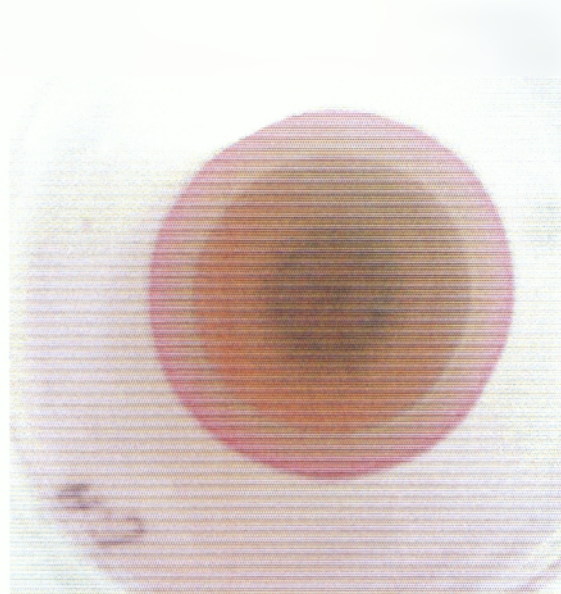
Εικόνα 8: *A. niger* σε υψόστρωμα καρύδας



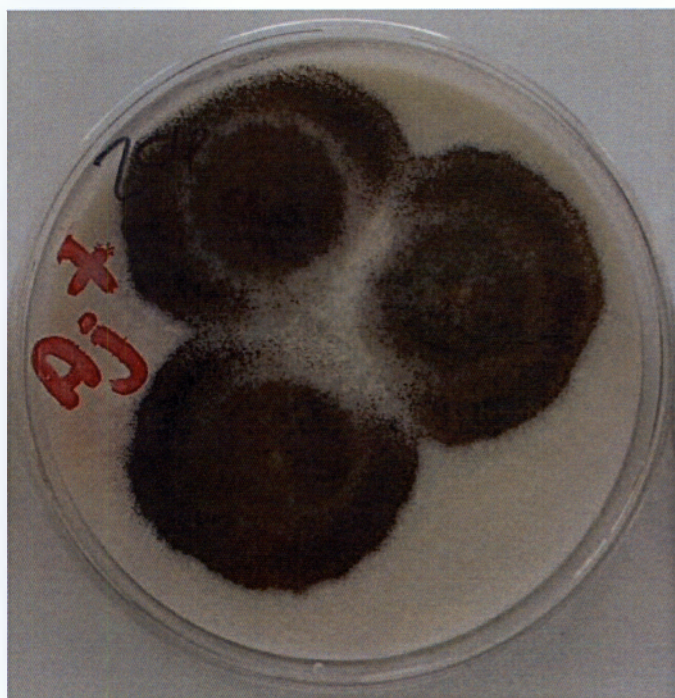
Εικόνα 9: *A. niger* στα τρία υλοστρώματα ταυτοποίησης (CYA, MEA, και CY20S).



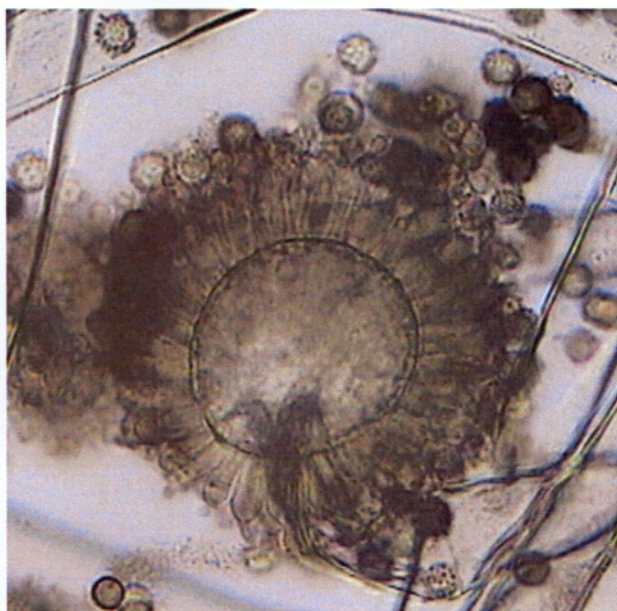
Εικόνα 10: *A. japonicus* σε DRBC



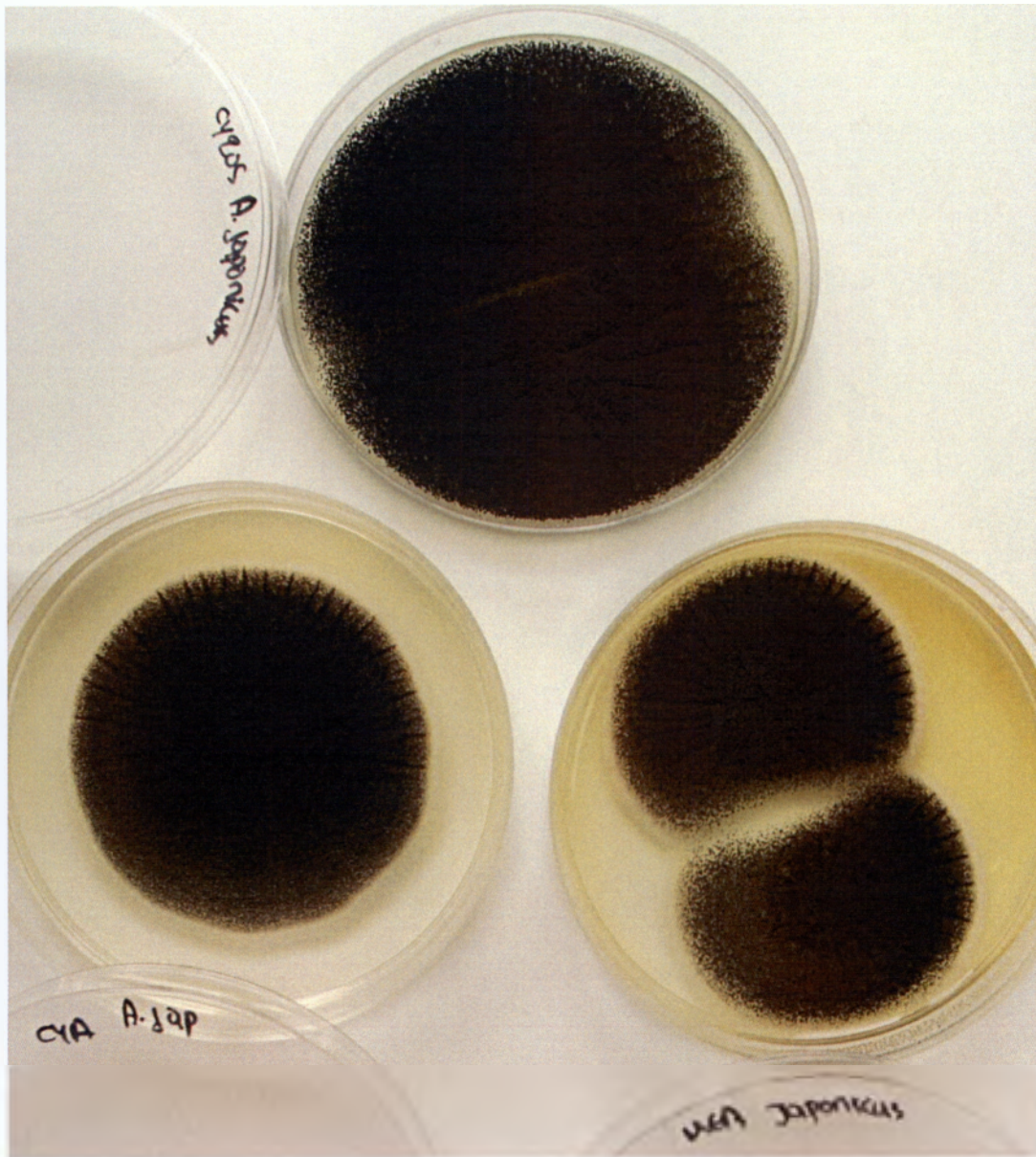
Εικόνα 11: *A. japonicus* σε DRBC (ανεστραμμένο τρυβλίο)



Εικόνα 12: *A. japonicus* σε υπόστρωμα καρύδας



Εικόνα 13: Φωτογραφία μικροσκοπικής παρατήρησης (X 40) του *A. japonicus*



Εικόνα 14: *A. japonicus* στα τρία υποστρώματα ταυτοποίησης (CYA, MEA, και CY20S).



Εικόνα 15: Ανοσοβιοχημικές στήλες εμπορίου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AFG1: Αφλατοξίνη G_1 .

AFM1: Αφλατοξίνη M_1 .

AFB1: Αφλατοξίνη B_1 .

ALARA: As Low As Reasonable Achievable.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

ATA: Alimentary Toxic Aleykia.

BEN: Balkan Endemic Nephropathy. Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια.

CAC: Codex Alimentarius Commission.

CCFAC: Codex Committee on Food Additives and Contaminants.

CEN: European Committee for Standardisation.

CH: Cholestiramine.

CYA: Czapek Yeast Extract Agar.

CY20S: Czapek Yeast Extract Agar με 20% σακχαρόζη.

DON: Deoxynivalenol.

E.E.: Ευρωπαϊκή Ένωση.

FAO: Food and Agricultural Organization.

FDA: Food and Drug Administration.

GRAS: Generally Recognized As Safe.

HSCAS: Hydrated Sodium Calcium Alluminosilicates.

IARC: International Agency for Research in Cancer.

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

LD₅₀: Τα αρχικά LD είναι τα αρχικά των λέξεων Lethal Dose. Αφορά την οξεία τοξικότητα και εκφράζει την μέση δόση που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού.

LOEL: Lower Observed Effect Level. Η ελάχιστη δόση που προκαλεί συγκεκριμένο σύμπτωμα.

MAFF: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (UK).

MEA: Malt Extract Agar.

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level.

NOEL: No Observed Effect Level. Εκφράζει την μέγιστη συγκέντρωση ή ποσό μυκοτοξίνης που δεν προκαλεί ανιχνεύσιμες δυσμενείς επιδράσεις. Μονάδα μέτρησης: mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα.

OTA: Ochratoxin A.

Ο.Π.Α.Π.: Ονομασίας Προέλευσης Ανωτέρας Ποιότητας.

PAT: Πατουλίνη.

PMTDI: Provisional¹ Maximum Tolerable Daily Intake. Προσωρινή μέγιστη ανεκτή ημερήσια πρόσληψη. Σε mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα. Για τους ανθρώπους προκύπτει από την διαίρεση του NOEL ή του LOEL με έναν συντελεστή ασφάλειας που προκύπτει από πειράματα σε ζώα. Π.χ. η PMTDI για την OTA είναι 0.014 mg/kg Σ.Β. υπολογιζόμενη με συντελεστή ασφάλειας το 1500.

PTDI: Provisional Tolerable Daily Intake. Προσωρινή ανεκτή ημερήσια πρόσληψη.

PTWI: Provisional Tolerable Weekly Intake. Προσωρινή ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη.

Σ.Β.: Σωματικό Βάρος.

SGM: Synthetic Grape juice Medium.

TDI: Tolerable Daily Intake. Ανεκτή ημερήσια πρόσληψη.

WHO: World Health Organization.

YES: Yeast Extract Sucrose.

ZEN: Zearalenone. Ζεαραλινόνη.

¹ Ο όρος "provisional" εκφράζει την προσεγγιστική φύση της εκτίμησης λόγω της σπανιότητας των αξιόπιστων στοιχείων όσον αφορά τις συνέπειες της ανθρώπινης έκθεσης σε επίπεδα που προσεγγίζουν αυτά με τα οποία ασχολείται η JECFA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] <http://193.132.193.215/eman2/index.asp> ή <http://www.mycotoxins.org>
European Mycotoxin Awareness Network.

[2] <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol56/13-ochra.htm> International Agency for Research on Cancer (IARC), "Ochratoxin A (Group 2B).

[3] http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out14_en.html , "Opinion of the scientific committee on food on ochratoxin A (expressed on 17/9/1998)".

[4] http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf "Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU", 2002.

[5] "Evaluation of certain mycotoxins in food", WHO Technical Report Series 906, 56^η έκθεση της JECFA, Geneva 2002.

[6] "Emerging international contaminant issues", Terry C. Troxell, PH.D., series editor Catherine "Kitty" Bailey, FDA, 2000.

[7] "Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003", FAO 2004.

[8] <http://www.uni-wuerzburg.de/toxikologie/EU-OTA/OchratoxinA.html> , "Mechanisms of OTA induced carcinogenicity as a basis for an improved risk assessment", Acronym: Ochratoxin A-risk assessment, Project No: QLK1-2001-01614.

[9] Abarca M.L., Accensi F., Cano J. and Cabañes F. J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. Kluwer Academic Publishers. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 33–49, 2004.

[10] <http://www.ochra-wine.com> WINE OCHRA-RISK QLK1-CT-2001-01761.

[11] Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. and Magan N. 2004 Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology* 97, 439-445.

[12] Cabanes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella G., Minguez S., Pons A., 2002 What is the source of ochratoxin in wine?. *International Journal of Food Microbiology* 79, 213–215.

[13] Neus Belli, Ester Pardo, Sonia Marin, Gemma Farre, Antonio J. Ramos and Vicente Sanchis, 2004, Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 541-546.

[14] Sage L., Garon D., Seigle-Murandi F., 2004. Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of agricultural and Food Chemistry*

[15] Sage L., Krivobok S., Delbos E., Seigle-Murandi F., Creppy E.E., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1306-1311.

[16] Magnoli C., Violante M., Combina M., Palacio G., Dalcero A., 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 37, 179–184.

[17] Tjamos S.E., Antoniou P.P., Kazantzidou A., Antonopoulos D.F., Papageorgiou I., Tjamos E.C., 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: Population composition, ochratoxin A production and chemical control. *J. Phytopathology* 152, 250–255.

[18] Abrunhosa L., Paterson R.R.M., Kozakiewicz Z., Lima N., Venancio A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 32, 240-242.

[19] Dyer S. K. and McCammon S., 1994. Detection of toxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and related species on coconut cream agar. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 75-78.

[20] Battilani P., Giorni P., Pietri A., 2001. Role of cultural factors on the content of ochratoxin A in grapes. *Journal of Plant Pathology* 83, 231-246.

[21] Heenan C.N., Shaw K.J., Pitt J.I., 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1, 67-72.

[22] Battilani P., Giorni P., Pietri A., 2003. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology* 109: 715–722.

[23] Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabanes F.J., 2004. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology*

[24] Walker R., 2002. Risk assessment of ochratoxin A: Current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 249-255

[25] Bragulat M.R., Abarca M.L., Cabanes F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71 (2001) 139-144.

[26] Visconti A., Pascale M., Centonze G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and High-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 864, 89-101.

[27] Soufleros E. H., Tricard C., Bouloumpasi E.C., 2003. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83:173–179.

[28] Neus Belly, Sonia Marin, Araceli Duaigues, Antonio J. Ramos and Vicente Sanchis, 2004. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:591–594.

[29] Nuno Ratola, Luis Martins, Arminda Alves, 2004. Ochratoxin A in wines—assessing global uncertainty associated with the results. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 319–324

[30] A. Lopez de Cerain, E. Gonzalez-Penas, A. M. Jimenez and J. Bello, 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants*, 2002, Vol. 19, No. 11, 1058-1064.

[31] Otteneder H., Majerus P., 2000. Occurrence of Ochratoxin A (OTA) in wines: Influence of the type of wine and its geographical origin. *Food additives and Contaminants*, 2000, Vol. 17, No. 9, 793-798.

[32] Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., Piva G., 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*, 2001, Vol. 18, No. 7, 647-654.

[33] Filali A., Ouammi L., Betbeder A. M., Baudrimont I., Soulaymani R., Benayada A. And Creppy E. E., Ochratoxin A in beverages from Morocco: A preliminary survey. *Food Additives and Contaminants*, 2001, Vol. 18, No. 6, 565-568.

[34] Berente Balint, Moricz Agnes, Otta K. H., Zaray G., Leko L., Racz L., 2005. Determination of ochratoxin A in Hungarian wines. *Microchemical Journal* 79 (2005) 103-107.

[35] Brera C., Soriano J. M., Debegnach F., Miraglia M., Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. *Microchemical Journal* 79 (2005) 109-113.

[36] Paola Battilani, Antonio Logrieco, Paola Giorni, Giuseppe Cozzi, Terenzio Bertuzzi and Amedeo Pietri, Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84:1736–1740. August 2004.

[37] Stina Petersson, Marianne Wittrup Hansen, Karin Axberg, Karl Hult and Johan Schnurer. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycol. Res.* 102 (8) : 1003±1008 (1998).

[38] H. Bejaoui, F. Mathieu, P. Taillandier and A. Lebrihi. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 2004.

[39] Francesca Cecchini, Massimo Morassut, Emilia Garcia Moruno, Rocco Di Stefano. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*. August 2005.

[40] L. Malmauret, D. Parent-Massin, J.-L. Hardy and P. Verger. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France (2002). *Food Additives and Contaminants*, 2002, Vol. 19, No. 6, 524±532.

[41] Teresa Cirillo, Alberto Ritieni, Marianna Visone and Renata Amodio Cocchieri. Evaluation of Conventional and Organic Italian Foodstuffs for Deoxynivalenol and Fumonisin B1 and B2. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 8128-8131.

[42] Marika Jestoi, Maria Carmela Somma, Merja Kouva, Pirjo Veijalainen, Aldo Rizzo, Alberto Ritieni and Kimmo Peltonen. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, 48, 299 – 307.

[43] R. Biffi, M. Munari, L. Dioguardi, C. Ballabio, A. Cattaneo, C. L. Galli and P. Restani. Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: A survey of the Italian market, 2001–02. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 21, No. 6 (June 2004), pp. 586–591.

[44] Antonio Miceli, Carmine Negro, Luca Tommasi and Pietro De Leo. Polyphenols, Resveratrol, Antioxidant Activity and Ochratoxin A Contamination in Red Table Wines, Controlled Denomination of Origin (DOC) Wines and Wines Obtained from Organic Farming. *Journal of Wine Research*, 2003, Vol. 14, No. 2–3, pp. 115–120.

[45] N. Belli, A.J. Ramos, I. Coronas, V. Sanchis and S. Marin. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 839–844.

[46] M. L. ABARCA, F. ACCENSI, M. R. BRAGULAT AND F. J. CABANES. Current Importance of Ochratoxin A-Producing *Aspergillus* spp. (Review). *Journal of Food Protection*, Vol. 64, No. 6, 2001, Pages 903–906.

[47] ALBERTO A. E. BERTELLI, MASSIMILIANO MIGLIORI, CRISTINA FILIPPI, NICOLETTA GAGLIANO, ELENA DONETTI, VINCENZO PANICHI, VERA SCALORI, RENZO COLOMBO, CLAUDIO MANNARI, JEAN-PAUL TILLEMENT, AND LUCA GIOVANNINI. Effect of Ethanol and Red Wine on Ochratoxin A-Induced

Experimental Acute Nephrotoxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 6924-6929.

[48] N. Ratola, E. Abade, T. Simoes, A. Venancio, A. Alves. Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. *Anal. Bioanal. Chem* (2005) 382: 405–411.

[49] R. Serra, C. Mendonca and A. Venancio. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Letters in Applied Microbiology* 2005.

[50] Janos Varga and Zofia Kozakiewicz. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology* (2005) 1–10.

[51] Paola Battilani and Amedeo Pietri. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology* 108: 639–643, 2002.

[52] L. Czerwiecki, D. Czajkowska and A. Witkowska-Gwiazdowska. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Additives and Contaminants* 2002, Vol. 19, No. 5, 470±477.

[53] L. Czerwiecki, D. Czajkowska and A. Witkowska-Gwiazdowska. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. *Food Additives and Contaminants* 2002, Vol. 19, No 11, 1051±1057.

[54] Sungsook Bae, Graham H. Fleet, Gillian M. Heard. Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004) 301– 312.

[55] Janos Varga, Krisztina Rigo, Jozsef Teren. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology* 59 (2000) 1–7.

[56] LUIS ABRUNHOSA, RITA SERRA, AND ARMANDO VENANCIO. Biodegradation of Ochratoxin A by Fungi Isolated from Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 7493-7496.

[57] Massimo Castellari, Andrea Versari, Alessandra Fabiani, Giuseppina Paola Parpinello, and Sergio Galassi. Removal of Ochratoxin A in Red Wines by Means of Adsorption Treatments with Commercial Fining Agents. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3917-3921.

[58] LUIGI BAVARESCO, SILVIA VEZZULLI, PAOLA BATTILANI, PAOLA GIORNI, AMEDEO PIETRI, AND TERENCE BERTUZZI. Effect of Ochratoxin A-Producing *Aspergilli* on Stilbenic Phytoalexin Synthesis in Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 6151-6157.

[59] Laszlo Solti, Tamas Pecs, Ildiko Barna-Vetro, Ferenc Szasz Jr., Krisztina Biro, Erzsebet Szabo. Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Animal Reproduction Science* 56 (1999) 123–132.

[60] Krisztina Biro, Ildiko Barna-Vetro, Tamas Pecs, Erzsebet Szabo, Gabor Winkler, Johanna Fink-Gremmels, Laszlo Solti. Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A—challenged boars. *Theriogenology* 60 (2003) 199–207.

[61] Gary G. Schwartz. Hypothesis: Does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes and Control* 13: 91–100, 2002.

[62] Isabelle Baudrimont, Branko Sostaric, Colette Yenot, Anne-Marie Betbeder, Sebastien Dano-Djedje Ambaliou Sanni, Pieter S. Steyn, Edmond E. Creppy. Aspartame prevents the karyomegaly induced by ochratoxin A in rat kidney. *Archives of Toxicology* 2001 vol. 75: 176-183.

[63] RALF BLANK, JAN-PETER ROLFS, KARL-HEINZ SUDEKUM, ANDREW A. FROHLICH, RONALD R. MARQUARDT, AND SIEGFRIED WOLFFRAM. Effects of Chronic Ingestion of Ochratoxin A on Blood Levels and Excretion of the Mycotoxin in Sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 6899-6906.

[64] N. Belli, S. Marin, V. Sanchis, A.J. Ramos. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus section Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology* (2004).

[65] Tunde Kiss, Aniko Erdei, and Laszlo Kiss. Investigation of the Active Site of the Extracellular β -D-Xylosidase from *Aspergillus carbonarius*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 399, No. 2, March 15, pp. 188–194, 2002.

[66] R. P. de Vries. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. (Mini-review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2003) 61:10–20.

[67] R. Kavitha, S. Umesh-Kumar Genetic Improvement of *Aspergillus carbonarius* for Pectinase Overproduction During Solid State Growth. Communication to the editor, 2000 John Wiley & Sons, Inc.

[68] N. Anjana Devi and A. G. Appu Rao. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. *Enzyme and microbial Technology* 18:59-65, 1996.

[69] F. Accensi, M.L.Abarca, J. Cano, L. Figuera & F.J. Cabañes. Distribution of Ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 365–370, 2001. *Kluwer Academic Publishers*.

[70] J. I. PITT, J. C. BASILICO, M. L. ABARCA & C. LOPEZ. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology* 2000, 38, Supplement 1, 41–46.

[71] E. Petzinger and K. Ziegler. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 23, 91-98, 2000.

[72] John Gilbert. Overview of mycotoxin methods, present status and future needs. *Natural Toxins* 7: 347±352 (2000).

[73] Serra, R.; Mendonca, C.; Abrunhosa, L.; Pietri, A.; Venancio, A. *Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation.* *Anal. Chim. Acta*, (2004), 513, 41-47.

[74] Visconti A., Pascale M. Centonze G. (2001) Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection *J.AOAC Int.* 84:1818-1827

[75] <http://www.elsevier.com/locate/fm> Francesca Cecchinia, Massimo Morassuta, Emilia Garcia Morunob, Rocco Di Stefano. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must, (2005).

[76] <http://www.elsevier.com/locate/fm> Ana Valero, Joan R. Farre, Vicente Sanchis, Antonio J. Ramos, Sonia Marin.

Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures, (2006)

[77] Massimo Castellari, Andrea Versari,* Alessandra Fabiani, Giuseppina Paola Parpinello, and Sergio Galassi

Removal of Ochratoxin A in Red Wines by Means of Adsorption Treatments with Commercial Fining Agents, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3917-3921

[78] Ευάγγελος Ηρ. Σουφλερός (1997). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, τόμος 2, Θεσσαλονίκη, σ. 95-100 και 209-212.