



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ
ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ*

Καλογερίας Αναστάσιος Άλκης
Επιβλέπον: Δρ. Φαρμάκης Λάμπρος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ



Κεφάλαιο 1

1. Γενικά περί μυκοτοξινών.....	6
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	6
1.2 Ορολογία	7
1.3 Κυριότερα γένη μυκιτών	8
1.4 Κατηγορίες μυκοτοξινών.....	10
1.5 Τοξικότητα των μυκοτοξικών	18
1.6 Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα τρόφιμα	26

Κεφάλαιο 2

2. Προσδιορισμός της επίδρασης οικολογικών παραμέτρων στην ανάπτυξη και στην παραγωγή Αφλατοξινών και Ωχρατοξίνης Α από τους μύκητες <i>A. flavus</i> και <i>A. carbonarius</i> σε σιτάρι και ρύζι εμπορίου.....	29
2.1 Υλικά και μέθοδοι	29
2.1.1 Προετοιμασία υποστρώματος	29
2.1.2 Ρύθμιση της ενεργότητας ύδατος	29
2.1.3 Προετοιμασία εμβολίου	30
2.1.4 Εμβολιασμός και επώαση	31
2.1.5 Μέτρηση ανάπτυξης.....	31

Κεφάλαιο 3

3. Προσδιορισμός των επιπέδων των μυκοτοξινών στα εμβολιασμένα υποστρώματα	
3.1 Προσδιορισμός Ωχρατοξίνης Α.....	35
3.1.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης Ωχρατοξίνης Α (OTA) σε δημητριακά (CEREALS) με στηλάκια ανοσοπροσρόφισης.....	35
3.1.2 Προσδιορισμός Ωχρατοξίνης Α (OTA) σε επιμολυσμένα δείγματα σίτου σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.....	38
3.2 Προσδιορισμός Αφλατοξινών	39

3.2.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης αφλατοξινών σε δημητριακά (cereals) με στιλάκια ανοσοπροσρόφησης aflaprep	39
3.2.2 Μελέτη της ακρίβειας και της αξιοπιστίας της μεθόδου.	40

Κεφάλαιο 4

4. Προσδιορισμός της επίδρασης οικολογικών παραμέτρων στην ανάπτυξη και στην παραγωγή Ωχρατοξίνης Α σε συνθετικό υπόστρωμα σταφυλιού από τον μύκητα <i>A. carbonarius</i>	43
4.1 Υλικά και μέθοδοι	43
4.1.1 Προετοιμασία υποστρώματος	43
4.1.2 Προετοιμασία εμβολίου και εμβολιασμός	43
4.1.3 Επώαση.....	44
4.1.4 Μέτρηση ανάπτυξης και ωχρατοξίνης Α	44
4.1.5 Παραγωγή Ωχρατοξίνης Α.....	44

Κεφάλαιο 5

5. Προσδιορισμός επιπέδων μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα με φυσική παρουσία του μύκητα	49
---	----

Κεφάλαιο 6

6. Συμπεράσματα	53
-----------------------	----

Εισαγωγή

Οι μυκοτοξίνες, όπως λέει και το όνομά τους, είναι τοξικά προϊόντα μυκητών (μούχλας) που αναπτύσσονται στα τρόφιμα. Από αυτές οι πιο γνωστές είναι οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες κ.ά. Η αφλατοξίνη, Β 1(ΑΦΒ 1) είναι από τα πιο ισχυρά καρκινογόνα που υπάρχουν στη φύση. Η ΑΦΒ 1 μεταβολίζεται μέσα στον οργανισμό των ζώων και του ανθρώπου σε αφλατοξίνη Μ 1 (ΑΦΜ 1), η οποία απομακρύνεται με το γάλα. Τόσο η Αφβ 1 όσο και Αφμ 1 είναι γονιδιοτοξικές. Η ωχρατοξίνη έχει συσχετιστεί με νεφροπάθειες.

Για να γίνει βιοσύνθεση στο αρχικό προϊόν, όπως π.χ. καλλιέργειες δημητριακών θα πρέπει να ισχύουν πολλοί παράγοντες ταυτόχρονα:

1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία).
2. Η φύση του υποστρώματος του τροφίμου.
3. Ο μύκητας, να είναι ικανός να βιοσυνθέσει μυκοτοξίνες.
4. Σημαντικοί είναι και οι μηχανισμοί αντίστασης που εμφανίζουν τα φυτά

ύστερα από μία προσβολή από μύκητες.

Επομένως μόνο κάτω από ένα συνδυασμό των πλέον ευνοϊκών συνθηκών είναι δυνατόν να γίνει βιοσύνθεση μυκοτοξινών και αυτό σημαίνει ότι το φαινόμενο μπορεί να ποικίλει από χώρα σε χώρα. Επίσης ποικίλει ανάλογα με την εποχή και τις κλιματολογικές συνθήκες μιας χώρας.

Ο σκοπός αυτή της εργασίας είναι να μελετίσουμε την ανάπτυξη και την παραγωγή Αφλατοξινών και Ωχρατοξίνης Α από τους μύκητες *A. flavus* και *A. carbonarius* σε σιτάρι και ρύζι εμπορίου, καθώς και την ανάπτυξη και την παραγωγή Ωχρατοξίνης Α σε συνθετικό υπόστρωμα σταφυλιού από τον μύκητα *A. Carbonarius*.

Κεφάλαιο 1

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η παθογόνος φύση μυκήτων στα φυτά έχει παρατηρηθεί από την αρχή της γεωργίας. Οι Ρωμαίοι τον δέκατο όγδοο και δέκατο έβδομο αιώνα π.Χ. τιμούσαν την θεότητα Ρόμπιγκους, για να κατευνάσουν την οργή του προκειμένου να προστατευτούν οι καρποί και τα δέντρα. Εορταζόταν στις 25 του Απρίλη, περίοδος όπου είναι περισσότερο πιθανό για τα σπαρτά να δεχτούν επίθεση από σκόρο ή να προσβληθούν από μύκητες¹. Ακόμα και στα πρώτα στάδια της γεωργίας, οι αγρότες είχαν παρατηρήσει ότι η κατανάλωση μουχλιασμένων δημητριακών ή καρπών είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών. Αναφέρεται ότι, πολλές από τις μάζστιγες της κεντρικής Ευρώπης έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση ψημένου ψωμιού από μουχλιασμένα σιτηρά. Η πρώτη αναφορά τους στην βιβλιογραφία γίνεται την δεκαετία του 1960, όπου στη Μεγάλη Βρετανία πέθαναν πάνω από εκατό χιλιάδες γαλοπούλες². Αιτία αυτής της κρίσης ήταν η κατανάλωση ζωοτροφών που περιείχαν δευτερογενείς μεταβολίτες του μύκητα *Aspergillus flavus*. Αυτό έκανε τους επιστήμονες να σκεφτούν ότι, πιθανόν να υπάρχουν δύσκολα ανιχνεύσιμοι μεταβολίτες που προέρχονται από μούχλα, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν ακόμα και θάνατο. Έτσι οι επιστήμονες επινόησαν τον όρο *μυκοτοξίνη* για να περιγράψουν αυτήν την τοξική συμπεριφορά που παρατηρήθηκε για αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Σύντομα η κατηγορία των μυκοτοξινών συμπεριέλαβε πλήθος απο ήδη γνώστες τοξίνες που προέρχονταν απο μύκητες (ερισυβώση αλκαλοειδή, ergot alkaloids), κάποιες ενώσεις που αρχικά είχαν απομονωθεί ως αντιβιοτικά (Πατουλίνη) καθώς και ακόμα ενα πλήθος απο καινούριους δευτερογενείς μεταβολίτες (Οχρατοξίνη Α). Στις δεκαετίες 1960 και 1970 παρατηρήθηκε μια εντατική έρευνα γύρω από την μελέτη των μυκοτοξινών. Συνολικά έχουν βρεθεί περίπου 300 με 400 ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως μυκοτοξίνες εκ των οποίων περίπου οι είκοσι από αυτές έχει αποδειχτεί ότι απαντώνται στις τροφές σε συχνότητα και σε επίπεδα τέτοια, ώστε να θεωρούνται απειλή για την υγεία και των ανθρώπων³.

Οι μύκητες είναι οργανισμοί που δεν έχουν χλωροφύλλη. Εμφανίζονται ως απλοί μονοκύτταροι ή και πολυκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι παράγουν μούχλες, μανιτάρια και μαγιά. Οι μύκητες για να αναπτυχθούν τρέφονται με τα θρεπτικά συστατικά του ξενιστή που προσβάλλουν. Κατα την περίοδο της ανάπτυξής τους παράγουν ενα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων, τους μεταβολίτες⁴. Ορισμένοι από τους μεταβολίτες είναι

επιβλαβείς για τον άνθρωπο, όπως οι μυκοτοξίνες ενώ άλλοι είναι επικερδείς όπως τα αντιβιοτικά⁵.

1.2 Ορολογία

Η λέξη μυκοτοξίνη είναι σύνθετη και χωρίζεται στον όρο *μύκο-* που προέρχεται από τη λέξη μύκητας και *-τοξίνη* που σημαίνει τοξικό σε βιολογικά συστήματα. Οι μυκοτοξίνες είναι οι μεταβολίτες (υποπροϊόντα) οι οποίες παράγονται καθώς ο μύκητας αναπτύσσεται παρασιτικά στον ξενιστή που έχει προσβάλει. Οι μυκοτοξίνες ονομάζονται «δευτερογενείς μεταβολίτες» διότι δεν φαίνεται να είναι απαραίτητες για την φυσιολογική, βιομηχανική και αναπαραγωγική δραστηριότητα του κυττάρου. Παράγονται κατά τον κυτταρικό κύκλο από πρόδρομες ενώσεις που προέρχονται από τον πρωτογενή μεταβολισμό. Αν και έχουν αναπτυχθεί αρκετές θεωρίες για την παραγωγή των μυκοτοξινών (ανταγωνιστική αναστολή, μολυσματικοί παράγοντες) ο μηχανισμός παραγωγής αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών είναι μάλλον άγνωστος. Ωστόσο είναι αρκετά γνωστός ο τρόπος με τον οποίο παράγονται κατά την διάρκεια της σταθερής φάσης της ανάπτυξης του μύκητα ή υπό συνθήκες στρές⁶.

Μεγάλο ρόλο για την ανάπτυξη των μυκοτοξινών παίζει το κλίμα, συνεπώς, η συγκέντρωση δεν είναι χρονικά σταθερή. Έχει παρατηρηθεί ότι, η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται όταν ο καρπός υφίσταται στρές από καιρικά φαινόμενα, π.χ. μακρά διάρκεια ξηρασίας ακολουθούμενη από ισχυρή βροχόπτωση, ή όταν υποστεί βλάβη από πουλιά, έντομα, ή ακόμα όταν υπάρχει ανταγωνισμός με άλλα βότανα (παράσιτα). Όλες αυτές οι συνθήκες προκαλούν αδυναμία στον καρπό και δίνουν την ευκαιρία στους σπόρους του μύκητα να τον προσβάλλουν. Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται επίσης όταν η αποθήκευση των καρπών γίνεται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας⁴.

Αξίζει να αναφερθεί ότι, η παρουσία μυκήτων δεν είναι πάντα στοιχείο ύπαρξης μυκοτοξινών. Με άλλα λόγια ο μύκητας μπορεί να υπάρχει αλλά να μην παράγει μυκοτοξίνες. Επιπλέον, η απουσία του μύκητα δεν αποκλείει την ύπαρξη μυκοτοξίνης αφού ο μύκητας μπορεί να προϋπήρχε και να έχει παράγει την τοξίνη σε προηγούμενο στάδιο παραγωγής ή επεξεργασίας της τροφής. Η μυκοτοξίνη μπορεί να παραμείνει στην τροφή πολύ μετά τον θάνατο του μύκητα χωρίς καταστραφεί ή να υποστεί οποιαδήποτε αλλοίωση υπό κανονικές συνθήκες³.

Οι μυκοτοξίνες είναι δύσκολο να ταξινομηθούν εξαιτίας των ποικίλων χημικών δομών που τις χαρακτηρίζουν, των διαφορετικών βιοσυνθετικών μηχανισμών που ακολουθούν, των μυριάδων βιολογικών αποτελεσμάτων που παρουσιάζουν καθώς και

από το ευρύ φάσμα των μυκήτων απο τους οποίους προέρχονται. Οι γιατροί τις κατατάσσουν με γνώμονα το όργανο, το οποίο προσβάλλουν. Έτσι, οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ηπατοτοξικές, νεφροτοξικές, νευροτοξικές ανοσοτοξίνες κ.τ.λ. Οι βιολόγοι τις κατατάσσουν σε γενικότερες ομάδες, ικανές να προκαλέσουν τερατογένεση, μετάλλαξη, καρκινογένεση και αλλεργία. Οι χημικοί τις ταξινομούν με βάση τη χημική δομή τους (λακτόνες κουμαρίνες), οι βιοχημικοί με βάση τη βιοσυνθετική προέλευσή τους (πολυκετίδια, polyketides, παράγωγα αμινοξέων) και οι μυκητολόγοι με βάση τους μύκητες απο τους οποίους προέρχονται. Η Αφλατοξίνη για παράδειγμα, είναι ηπατοτοξική, ικανή να προκαλέσει μετάλλαξη και καρκινογένεση. Περιέχει δύο φουράνια, προέρχεται απο πολυκετίδιο, και παράγεται απο τον μύκητα *Aspergillus*. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, η περιγραφή μιας και μόνο μυκοτοξίνης περιλαμβάνει εκτεταμένη ορολογία δεδομένου ότι πολλοί ερευνητές απο διαφορετικές ειδικότητες παρατηρούν και εμπλουτίζουν την γνώση πάνω σε αυτές τις φυσικά απαντώμενες τοξίνες³.

Η ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τις μυκοτοξίνες περιλαμβάνει τρεις κύριες κατευθύνσεις: την μυκητολογία, την χημεία των μυκοτοξινών και την τοξικολογία. Η μυκητολογία περιλαμβάνει την ταξινόμηση των μυκήτων, τις διεργασίες και τους παράγοντες που απαιτούνται για τον αποικισμό του μύκητα (βλάστηση του σπόρου και ανάπτυξη του μύκητα) καθώς και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που ακολουθούνται για την δημιουργία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα και στα πρωτογενή αγροτικά προϊόντα. Η χημεία των μυκοτοξινών είναι ουσιαστικά οι μέθοδοι και οι διαθέσιμες τεχνικές που υπάρχουν για την ταυτοποίησή τους, τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και την μελέτη των χημικών ιδιοτήτων τους. Τέλος η τοξικολογία αναφέρεται στις επιπτώσεις που έχει η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων στις μυκοτοξίνες, εφόσον οι ενώσεις αυτές, μπορεί να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα απο παθολογικά συμπτώματα (οξεία τοξίκωση ή χρόνιες ασθένειες)⁷.

1.3 Κυριότερα γένη μυκήτων⁴

Τοξίνες του γένους *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* βρίσκεται σε πολλές περιοχές του κόσμου, ιδιαίτερα σε περιοχές με τροπικά κλίματα. Το γένος περιέχει πολλά είδη μυκήτων ικανά να αναπτυχθούν σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας. Περιλαμβάνει περισσότερα απο εκατό γνωστά είδη μυκήτων, πολλοί απο τους οποίους είναι υπαίτιοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες αυτού του γένους με την μεγαλύτερη σημασία είναι η

Αφλατοξίνη B1 (Aflatoxin B1), η Οχρατοξίνη A (Ochratoxin A), η Στεριγματοκυστίνη (Sterigmatocystin), το Κυκλοπιαζονικό οξύ (Cyclopiazonic acid), η Κιτρινίνη (Citrinin), η Πατουλίνη (Patoulin) και οι Τρεμογόνες μυκοτοξίνες (Tremogen Group). Αν και έχει αποδειχθεί η καρκινογόνος δράση της Αφλατοξίνης B1, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μερικά από τα είδη του γένους *Aspergillus*, έχουν και ωφέλιμες εφαρμογές, όπως η παραγωγή αφεψημάτων.

Τοξίνες του γένους *Penicillium*

Το γένος *Penicillium* περιλαμβάνει περίπου εκατόν πενήντα γνωστά είδη μυκήτων. Η ανακάλυψη της Πενικιλίνης το 1929 ήταν η αρχή για την ανακάλυψη και άλλων μεταβολιτών του γένους αυτού με αντιβιοτικές ιδιότητες. Τουλάχιστον εκατό είδη μυκήτων από το γένος *Penicillium* έχουν χαρακτηρίσει ως υπεύθυνοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι πιο γνωστές μυκοτοξίνες του γένους *Penicillium* είναι: οι Οχρατοξίνες A, B, C, η Κιτροεβιριδίνη (Citreoviridin), η Κιτρινίνη, το Κυκλοπιαζονικό οξύ, η Πατουλίνη, οι Ρουμπρατοξίνες A, B (Rubratoxins A, B) και το Πενικιλικό οξύ (Penicillic acid).

Τοξίνες του Γένους *Fusarium*

Τα είδη που παράγονται από τις τοξίνες του γένους αυτού, είναι παθογόνα των φυτών και η ανάπτυξή τους πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Μολύνουν καρπούς δημητριακών ελαιούχους σπόρους και μπιζέλια. Το γένος *Fusarium* παράγει τις περισσότερες μυκοτοξίνες σε σχέση με άλλα γένη μυκήτων. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες αυτού του γένους είναι: οι Φουμινισίνες (Foumonisins), τα Τριχοθεκένια (Trichothecenes), η Ζεαραλενόνη (Zearalenone), κ.α.

Τοξίνες του γένους *Alternaria*

Το γένος αυτό βρίσκεται σε αφθονία, στην ατμόσφαιρα, στο έδαφος και στα πρωτογενή γεωργικά προϊόντα. Τα είδη του γένους αυτού προσβάλλουν τα φυτά στις καλλιέργειες (σιτάρι, ζαχαροκάλαμο, κριθάρι), παράλληλα μπορούν να βρεθούν σε φρούτα και λαχανικά κατά την αποθήκευσή τους σε ψυγεία. Περιλαμβάνουν τις τοξίνες Αλτερναριόλη (Alternariol), Αλτενουένιο (Altenuene), Τενουαζονικό οξύ (Tenuazonic acid) και τις Αλτερτοξίνες (Alttoxins).

Τοξίνες του γένους *Claviceps*

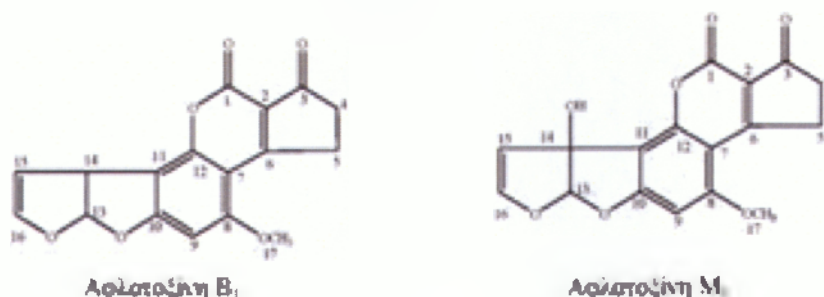
Οι τοξίνες του γένους *Claviceps* προσβάλλουν τους καρπούς των δημητριακών, σίκαλη, σιτάρι. Τα είδη του μύκητα αυτού, αντικαθιστούν τα αναπαραγωγικά όργανα, του ξενιστή με σκληρώτιο, το οποίο περιέχει τοξικά αλκαλοειδή. Η μόλυνση γίνεται κατά την περίοδο άνθησης των φυτών προσβάλλοντας κυρίως τις ωοθήκες τους αποτρέποντας έτσι την αναπαραγωγή τους. Το γεγονός περιλαμβάνει πολλά αλκαλοειδή παράγωγα του Λυσαργικού οξέος (Lysergic acid), καθώς και την Εργοκριπτίνη (Ergocryptine), Εργοταμίνη (Ergotamine), Εργοσίνη (Ergosine) και Εργονοβίνη (Ergonovine)⁸.

1.4 Κατηγορίες μυκοτοξινών

Αφλατοξίνες (Aflatoxins)

Μια από τις πιο εντατικά μελετημένες ομάδες μυκοτοξινών είναι αυτή των Αφλατοξινών. Το όνομα *Aflatoxin* προκύπτει από A (*Aspergillus*) + FLA (*Flavus*) + Toxin. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στις Αφλατοξίνες αποδόθηκε ο θάνατος εκατό χιλιάδων γαλόπουλων στις αρχές του 1960 στην Βρετανία. Όταν ο υπό εξέταση καρπός μελετήθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) παρατηρήθηκε μπλέ (B μεταβολίτης) και πράσινος (G μεταβολίτης) φθορισμός. Ο διαχωρισμός αυτών των δύο διαφορετικών ενώσεων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας έδωσε δύο διαφορετικές ενώσεις για τους B μεταβολίτες και G μεταβολίτες. Η έρευνα απέδειξε ότι τελικά υπάρχουν τέσσερις φυσικά απαντώμενες Αφλατοξίνες οι: B₁, B₂, G₁, G₂, ο δείκτης υποδηλώνει τον τρόπο του διαχωρισμού τους με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Από τις τέσσερις αυτές μυκοτοξίνες η Αφλατιξίνη B₁ βρίσκεται σε αφθονία και είναι η περισσότερο τοξική. Άλλα μέλη της ομάδας παράγωγα των πρώτων, είναι οι Αφλατοξίνες M₁, M₂, P₁, Q₁ και η Αφλατοξιτόλη, οι οποίες είναι τα προϊόντα μεταβολισμού βιολογικών συστημάτων ή προϊόντα χημικών αντιδράσεων όπως B_{2a}, G_{2a} και D₁. Οι Αφλατοξίνες M₁, M₂, είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον άνθρωπο καθώς έχουν βρεθεί στο γάλα. Παράγονται από τα θηλαστικά κατά την κατανάλωση τροφής μολυσμένη με Αφλατοξίνες, όπου μέσω του μεταβολισμού τους βιομετασχηματίζονται. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι της ομάδας παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.1.

Οι Αφλατοξίνες μολύνουν τον καρπό πριν την συγκομιδή του, αλλά και κατά την αποθήκευσή του. Αυτές βρίσκονται σε μία πληθώρα από γεωργικά αγαθά όπως δημητριακά, σύκα, ελαιούχους σπόρους καρύδια, καπνά, κ.α.⁹

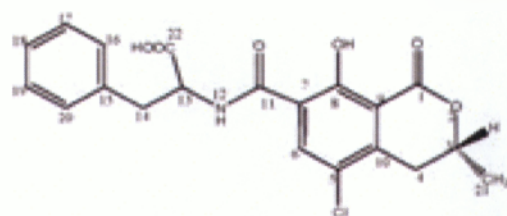


Σχημα 1.1 Χημικός τύπος και αρίθμηση των Αφλατοξινών B₁ και M₁

Οχρατοξίνες (*Ochratixins*)

Μια ακόμα ομάδα μυκοτοξινών όπου έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημών είναι αυτή των Οχρατοξινών. Σε αντίθεση με τις Αφλατοξίνες των οποίων η μελέτη κατέστη απαραίτητη έπειτα από την επιδημία που ξέσπασε στο Λονδίνο, οι Οχρατοξίνες ανακαλύφθηκαν στη νότιο Αφρική, έπειτα απο εργαστηριακή έρευνα. Οι μύκητες που παράγουν τις Οχρατοξίνες βρίσκονται κυρίως σε τροπικά κλίματα. Από χημικής άποψης, οι Οχρατιξίνες αποτελούνται από μία κουμαρινική ομάδα, η οποία ενώνεται μέσω μιας καρβοξυλικής ομάδας με την 1-β-φαινυλαλανίνη¹⁰.

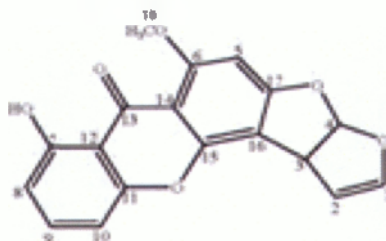
Ο κύριος εκπρόσωπος αυτής της ομάδας είναι η Οχρατοξίνη A (OTA), ακολουθούν οι μεθυλικοί και αιθυλικοί εστέρες της, η Οχρατοξίνη B με τους αντίστοιχους εστέρες και η 4-διϋδροξυοχρατοξίνη A. Απαντώνται κυρίως στα δημητριακά, στο καλαμπόκι, στον καφέ, την μύρα, στα αποξηραμένα φρούτα, στο κρασι, στο κακάο και στους ξηρούς καρπούς. Στο Σχημα 1.2, που ακολουθεί εμφανίζεται ο χημικός τύπος και αρίθμηση της Οχρατοξίνης A. Η απουσία του χλωρίου στη θέση C5 (Σχήμα 1.2) διαφοροποιεί την Οχρατοξίνη B από την Οχρατοξίνη A.



Σχημα 1.2 Χημικός τύπος και αρίθμηση της Οχρατοξίνης A (OTA)

Στεριγματοκυστίνες (Sterigmatocystins)

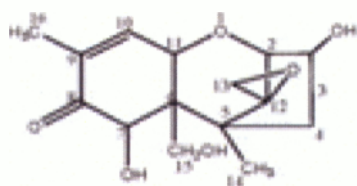
Οι Στεριγματοκυστίνες είναι μια ομάδα μυκοτοξινών με παρόμοια χημικά χαρακτηριστικά με τους μεταβολίτες που παράγονται από τα γένη *Aspergillus* και *Bipolaris*. Χημικά, χαρακτηρίζονται από μία ομάδα ξανθόνης ενωμένης με μια ομάδα διϋδροδιφουρανίου ή τετραϋδροδιφουρανίου. Οι χημικές διαφορές ανάμεσα στα μέλη της ομάδας εντοπίζονται στην παρουσία ή όχι του διπλού δεσμού στις θέσεις C1 και C2 καθώς και στην υποκατασταση στις θέσεις C3, C6, C7 και C10. Κυρίως αντιπρόσωπος είναι η Στεριγματοκυστίνη (Σχήμα 1.3), η οποία, καθώς και άλλα μέλη της ομάδας, είναι πρόδρομοι στην βιοσύνθεση των Αφλατοξινών. Απαντώνται σε ακατέργαστες τροφές όπως σιτάρι, κριθάρι, καρύδια και ζωοτροφές⁹.



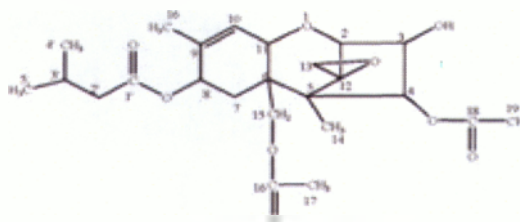
Σχήμα 1.3 Χημικός τύπος και αρίθωση της Στεριγματοκυστίνης

Τριχοθεκένια (Trichothecenes)

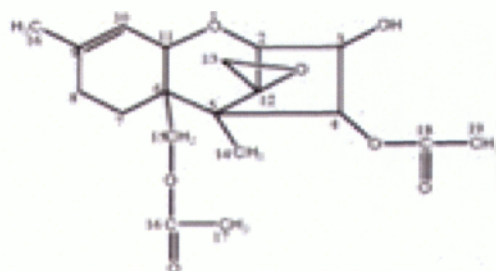
Τα τριχοθεκένια παράγονται από ένα μεγάλο εύρος μυκήτων, αποτελούνται από μία ομάδα σεσκιτερπενίων (τρεις ισοπρενικές ομάδες) και χαρακτηρίζονται από το σκελετό 12, 13-εποξυ-τριχοθεκένιο. Η ομάδα χωρίζεται σε τέσσερις υποκατηγορίες βάση των χημικών χαρακτηριστικών τους. Οι πρώτες δύο διαφέρουν στην ύπαρξη (Νιβαλενόλη, Δεοξυνιβαλενόλη) ή όχι μια ομάδα α καρβονυλίου στη θέση C8 (T-2 τοξίνη, Διακετοξυσκριπενόλη). Οι άλλες δύο ομάδες είναι οι Ποριδίνες (Ποριδίνη Α) και οι Βερρουκαρίνες (Βερρουκαρίνη Α) όπου περιλαμβάνουν μια μακροκυκλική εστερική γέφυρα ανάμεσα στους άνθρακες στις θέσεις C4 και C5. Οι Ποριδίνες είναι μακροκυκλικοί διεστέρες της βερρουκαρόλης ενώ οι Βερρουκαρίνες είναι μακροκυκλικοί τριεστέρες της βερρουκαρόλης¹⁰. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα τριχοθεκένια απαντώνται κυρίως στα δημητριακά, μύρα, πατάτες, μπανάνες, μάνγκο, και στους καρπούς της μουστάρδα και του ηλιόσπορου⁹. Στο σχήμα 1.4 εμφανίζονται οι χημικοί τύποι των κυριότερων μυκοτοξινών αυτής της κατηγορίας.



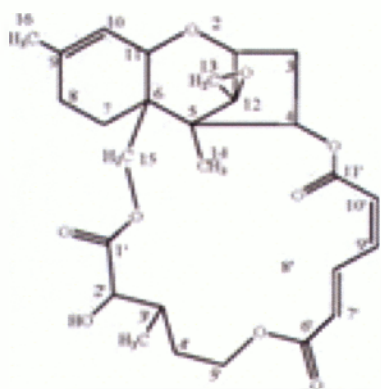
Δεοξυνιβαλενόλη (DON)



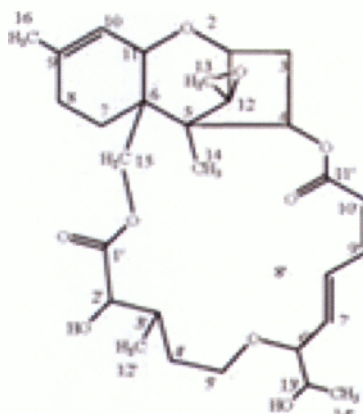
T-2 Τοξίνη



Διακετοξυσκριπενόλη (DAS)



Βερρουκαρίνη Α



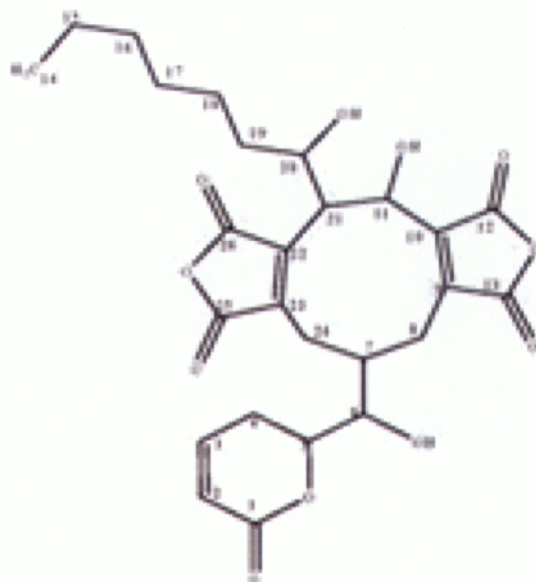
Ποριδίνη Α

Σχήμα 1.4 Χημικός τύπος και αρίθμηση των τριχοθεκενίων. Δεοξυνιβαλενόλη (DON), T-2 τοξίνη, Διακετοξυσκριπενόλη (DAS), Βερρουκαρίνη Α και Ποριδίνη Α.

Ρουμπρατοξίνες (*Rubratoxins*)

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει δύο μέλη την Ρουμπρατοξίνη Α και την Ρουμπρατοξίνη Β, με χημικό χαρακτηριστικό ένα ακόρεστο λακτονικό δάκτυλο και μία ομάδα (Ρουμπρατοξίνη Α) ή δύο ομάδες (Ρουμπρατοξίνη Β) ανυδριτών. Μελέτες έχουν δείξει ότι, η παρουσία της Ρουμπρατοξίνης Β, στα τρόφιμα είναι πιο συχνή σε σχέση με την Ρουμπρατοξίνη Α και ότι είναι πιο τοξική από αυτήν. Βρίσκεται στο έδαφος και

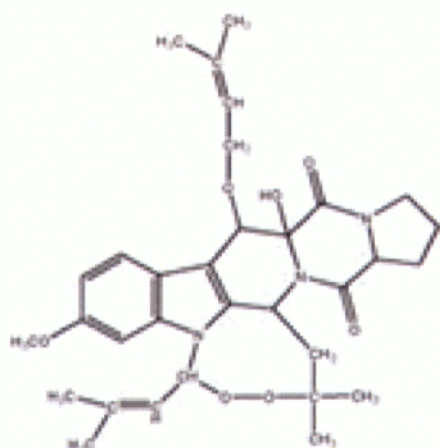
προσβάλει την τροφή των ζώων, αλλά και πολλά γεωργικά προϊόντα, όπως όσπρια, δημητριακά, ξηρούς καρπούς, πίτουρο και ηλιόσπορους. Η Ρουμπρατοξίνη Α διαφέρει, από την Ρουμπρατοξίνη Β στην παρουσία υδροξυλίου στη θέση C25 (Σχήμα 1.5), εν αντιθέσει του καρβονυλίου που φέρει η Ρουμπρατοξίνη Β.



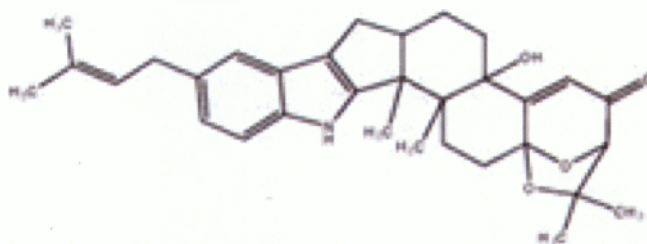
Σχήμα 1.5 Χημικός τύπος και αρίθμηση της Ρουμπρατοξίνης Β

Τρεμογόνες μυκοτοξίνες (tremogen group)

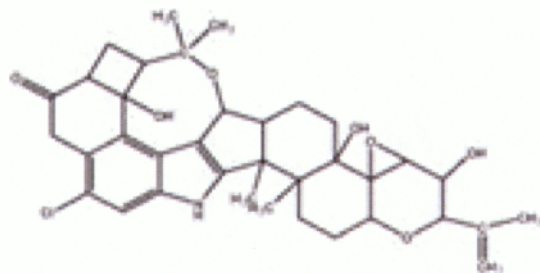
Η ολοένα και αυξανόμενη έρευνα για τις μυκοτοξίνες οδήγησε στην ανακάλυψη δευτερογενών μεταβολιτών ικανών να προκαλέσουν παρατεταμένα, ή διακοπτόμενα ρίγη στα σπονδυλωτά. Ακόμα και πριν την ανακάλυψη της ομάδας αυτών των μυκοτοξινών ήταν γνωστό ότι, κάποιες χημικές ενώσεις προκαλούσαν ρίγη στα ζώα. Η ασθένεια αυτή εμφανίζεται κυρίως σε πρόβατα και βοοειδή, τα οποία βόσκουν σε μόνιμα βοσκοτόπια όπου τρέφονται με το πολυετές χορτάρι λόλιο (*Lolium perenne*), από το οποίο παράγονται οι τρεμογόνες τοξίνες⁷. Οι μυκοτοξίνες αυτής της κατηγορίας χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες με βάση τη χημική τους συγγένεια. Η ομάδα της πενιτρίνης (*penitrem*), η ομάδα φουμιτρεμογίνη-βερρουκουλογίνη (*fumitremorgin-verruculogen*), η ομάδα πασπαλιτρίνη (*paspalitrem*) και η ομάδα θρυπτοκιβαλίνης (*tryptoquivaline*). Κοινό χαρακτηριστικό των παραπάνω ομάδων είναι η παρουσία του ινδολικού δακτυλίου η οποία προέρχεται από την θρυπτοφάνη¹⁰. Το Σχήμα 1.6 απεικονίζει ορισμένα αντιπροσωπευτικά μέλη αυτής της οικογένειας των μυκοτοξινών.



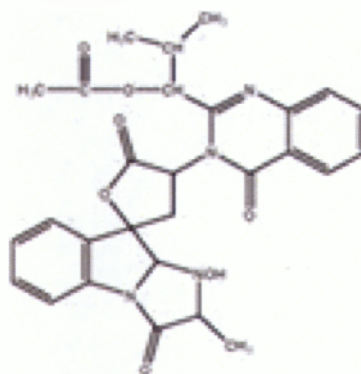
Φουμιτρεμογόνη Α



Πασπαλιτρέμη



Πενιτρέμη Α



Θρεπτοκουβαλίνη

Σχήμα 1.6 Χημικοί τύποι των Πασπαλιτρέμη Α, Φουμιτρεμογόνη Α, Θρεπτοκουβαλίνης Α και Πενιτρέμη

Τοξικές λακτόνες (Toxic Lactones)

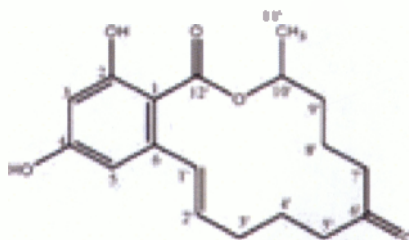
Χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας είναι ο πενταμελής λακτονικός δακτύλιος της α , β , ακόρεστης γ -βουτυρολακτόνης. Η ομάδα περιλαμβάνει τα μέλη Πατουλίνη, Πενικιλλικό οξύ και Ασλαδιόλη (Asladiol)¹⁰. Η Πατουλίνη βρίσκεται κυρίως στα φρούτα όπως μήλα, αχλάδια, σταφύλια, καθώς και στους χυμούς αυτών. Το Πενικιλλικό οξύ είναι ένα τοξικό αντιβιοτικό και βρίσκεται κυρίως στο καλαμπόκι, στα αποξηραμένα φρούτα και στον καπνό⁹. Στο Σχήμα 1.7, εμφανίζεται ο χημικός τύπος του Πενικιλλικού οξέος και της Πατουλίνης.



Σχήμα 1.7 Χημικός τύπος του Πενικιλλικού οξέος και της Πατουλινής

Ζεαραλενόνες (Zearalenones)⁷

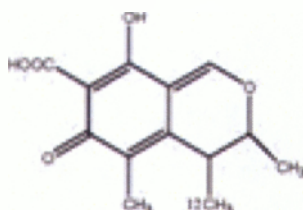
Οι ζεαραλενόνες είναι μια κατηγορία φαινολικών ενώσεων, με δύο κύρια μέλη, την Ζεαραλερόνη και τον πρόδρομο αυτής, την Ζεαραλερόνη. Χημικά χαρακτηρίζονται ως μια φαινολική λακτόνη του ρεσορκυκλικού οξέος (resorcyclic acid). Το ονομά τους προκύπτει από τον κύριο ξενιστή που προσβάλλει το καλαμπόκι -ζεα- (Zeamays) από τη συντόμευση του ρεσορκυκλικού οξέως -ραλ-, από τον διπλό δεσμό στις θέσεις C1 και C2 -εν- και από την ομάδα της κετόνης στη θέση C6 -ονη (Σχήμα 1.8). Παράγονται κυρίως σε ψυχρά και υγρά κλίματα κατά την διάρκεια της συγκομιδής και της αποθήκευσης. Το μεγάλο ενδιαφέρον για τη μελέτη τους έγκειται στο γεγονός ότι, είναι φυσικά απαντώμενα οιστρογόνα και έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν ορμονικές διαταραχές στα ζώα ιδιαίτερα στα χοιριοειδή. Βρίσκονται στα δημητριακά, σε πολλά πρωτογενή γεωργικά προϊόντα. Στα δημητριακά και στις ζωοτροφές, μπορεί να βρεθούν και άλλα παράγωγα της ζεαραλερόνης, μεγαλύτερης οιστρογονικής δράσης όπου μέσω βιασυνθετικών αντιδράσεων να βρεθούν και σε άλλα τρόφιμα όπως γάλα. Ο πρόδρομος της Ζεαραλερόνης, Ζεαραλερόνη, διαφέρει από αυτήν στην παρουσία υδροξυλίου στη θέση C6 (Σχήμα 1.8).



Σχήμα 1.8 Χημικός τύπος και αρίθμηση Ζεαραλερόνης

Κιτρινίνη (Citrinin)

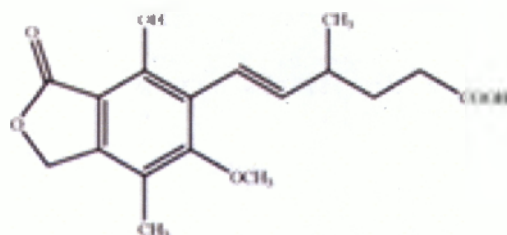
Η Κιτρινίνη αρχικά απομονώθηκε από τον μύκητα *Penicillium citrinin*, το 1931 από όπου πήρε και το όνομά της. Είναι ένα μέθυλο κινόνη, της οποίας οι κρύσταλλοι έχουν χρώμα κίτρινο λεμόνι. Η Κιτρινίνη βρίσκεται κυρίως στο ρύζι. Σε αυτή είχε αποδοθεί η ασθένεια του «κίτρινου ρυζιού» που μάστιζε τις ασιατικές χώρες. Οι μύκητες που παράγουν την Κιτρινίνη παράγουν αντίστοιχα την Οχρατοξίνη Α. Για τον λόγο η παρουσία και των δύο στα δημητριακά είναι σύνηθες και η δράση τους συνεργεστική⁹. Στο Σχήμα 1.9 απεικονίζεται ο χημικός τύπος της Κιτρινίνης.



Σχήμα 1.9 Χημικός τύπος της Κιτρίνης

Μυκοφαινολικό οξύ (Mycophenolic acid)

Το Μυκοφαινολικό οξύ παράγεται κυρίως από το γένος *Penicillium*. Από χημικής άποψης αποτελείται από δύο συμπληρωματικούς δακτυλίους, μια βουτυρολακτόνη και μια τριωποκατεστημένη βενζοφαινόλη. Η παρουσία του Μυκοφαινολικού οξέος σε αποθηκευμένες ζωοτροφές αγγίζει το ποσοστό του 32%¹¹. Το Μυκοφαινολικό οξύ παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και αναστέλλει το σχηματισμό αντισώματος και την παραγωγή κυτοτοξικών Τ-κυτάρων¹². Για αυτό το λόγο το μυκοφαινολικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί ως ανοσοκατασταλτικό έπειτα από μεταμόσχευση οργάνων¹³. Δεδομένου ότι, η παρουσία του Μυκοφαινολικού οξέος σε βιολογικά συστήματα συνδυάζεται με μεγάλη τοξικότητα ο έλεγχος για την πιθανή παρουσία του στα τρόφιμα πρέπει να είναι εντατικός. Εντούτοις σε καμία χώρα δεν έχει θεσπιστεί νομοθεσία για τα κατώτερα όρια ανίχνευσής του. Στο Σχήμα 1.10 απεικονίζεται ο χημικός τύπος του Μυκοφαινολικού οξέος.



Σχήμα 1.10 Χημικός τύπος του Μυκοφαινολικού οξέος

1.5 Τοξικότητα των μυκοτοξικών

Ο άνθρωπος μπορεί να επιβαρυνθεί με μυκοτοξίνες από μολυσμένη με μύκητες τροφή ή μέσω της τροφικής αλυσίδας, δηλαδή από προϊόντα που παράγονται από ζώα (αυγά, κρέας, γάλα), τα οποία έχουν εκτραφεί από μουχλιασμένες ζωοτροφές. Η τροφική επίδραση των μικροτοξινών στον άνθρωπο και στα ζώα είναι γνωστή ως μυκοτοξίκωση και η σφοδρότητά της εξαρτάται από την τοξικότητα της μυκοτοξίνης, το βαθμό της έκθεσης, την ηλικία, το φύλο και άλλους συνεργαστικούς παράγοντες. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η έκθεση του ανθρώπου σε τροφές μολυσμένες με μυκοτοξίνες έχει παρατηρηθεί από τα αρχαία χρόνια. Για παράδειγμα στον μεσαιώνα, υπήρξαν μαζικές εκδηλώσεις εργοτισμού από ερισυβώδη αλκαλοειδή, που παράγονταν από το μύκητα *Claviceps purpurea*. Ο εργοτισμός έφτασε στα ποσοστά της επιδημίας και οδήγησε πολλούς ανθρώπους της Κεντρικής Ευρώπης στον ακρωτηριασμό και το θάνατο. Η ασθένεια είναι γνωστή σαν «η φωτιά του Αγίου Αντωνίου», διότι εκείνη την περίοδο πιστεύονται πως, το προσκύνημα στον τάφο του Αγίου Αντωνίου θα έφερνε ανακούφιση από την έντονη αίσθηση καψίματος. Τα θύματα είχαν εκτεθεί σε ένα παραισθησιογόνο το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), το οποίο παραγόταν κατά το ψήσιμο ψωμιού, από κριθάρι μολυσμένο με ερισυβώδη αλκαλοειδή (ergot alkaloids) και άλλα παραισθησιογόνα. Ωστόσο, ο εργοτισμός δεν θεωρείται πλέον απειλή για την υγεία των ανθρώπων. Πολλές μυκοτοξίνες έχουν απομακρυνθεί από τη διατροφή του ανθρώπου εξαιτίας των αυστηρών ελέγχων υγιεινής και των νέων μεθόδων επεξεργασίας των πρώτων υλών. Για παράδειγμα, έχει να αναφερθεί δεκαετίες, νέο κρούσμα από την ασθένεια του κίτρινου ρυζιού, καθώς οι έλεγχοι για τη διακίνηση του ρυζιού είναι πλέον αυστηροί. Ακόμα, μία ασθένεια που ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένη κατά τις δεκαετίες 1930 και 1940 στην τότε Σοβιετική Ένωση είναι η τοξική διατροφική αλεύκτα (alimentary toxic aleukia), από σπόρους προσβεβλημένους με τριχοθεκέντα¹. Αναφέρουμε ακόμα, την

ασθένεια που έδωσε την ώθηση για την μελέτη των μυκοτοξινών, την οξεία αφλατοξίνωση που εμφανίστηκε στις γαλοπούλες την δεκαετία του 1960 στη Μεγάλη Βρετανία, καθώς και την αστάθεια στο βάδισμα που έχει παρατηρηθεί σε πρόβατα και χοίρσιδα από τις τρεμογόνες τοξίνες στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία.

Η μυκοτοξίκωση μπορεί να εμφανιστεί τόσο σε βιομηχανοποιημένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες. Επειδή το εμπόριο πραγματοποιείται σε παγκόσμια κλίμακα το πρόβλημα με τα αγροτικά προϊόντα μολυσμένα με μυκοτοξίνες συνδυάζει πολλές διαφορετικές προϋποθέσεις όπως περιβαλλοντικές κοινωνίες και οικονομίες. Η ανάπτυξη των μυκητών στις τροφές μπορεί να γίνει κατά το στάδιο της παραγωγής, της επεξεργασίας, της μεταφοράς ή της αποθήκευσης της τροφής. Οι παράγοντες που επιρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα αλλά και την παραγωγή μυκοτοξινών είναι κυρίως η υγρασία, η θερμοκρασία, το pH της τροφής κ.α.

Οι μυκοτοξίνες θεωρείται ότι είναι υπαίτιες για την εμφάνιση ασθενειών, σε περιπτώσεις όπου τα συμπτώματα εμφανίζονται σε πολλά άτομα χωρίς καμία εμφανή σύνδεση μεταξύ τους. Τα συμπτώματα της μυκοτοξίκωσης είναι περίπου όμοια για όλες τις μυκοτοξίνες. Συχνά, παρουσιάζονται δυσκολίες στη διάγνωση λόγω των όμοιων συμπτωμάτων που έχουν με άλλες παθολογικές καταστάσεις⁶, π.χ. καρκινογένεση, τετρατογένεση, μετάλλαξη κ.α. Γενικά, οι παθολογικές αυτές καταστάσεις: α) δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με αντιβιοτικά και άλλα φάρμακα, β) τα συμπτώματά τους συνδέονται με την τροφή και με πρωτογενή αγροτικά προϊόντα, γ) δεν είναι μεταδοτικές, δ) είναι περισσότερο εποχιακές (λόγω καιρικών συνθηκών) και ε) η δράση τους στον άνθρωπο και στα ζώα είναι συνάρτηση του φύλου, της ηλικίας και της βιολογικής κατάστασης του οργανισμού. Επιπλέον, οι μυκοτοξίνες δεν είναι αντιγονικές και έτσι τα ζώα και ο άνθρωπος δεν εμφανίζουν ανοσία εναντίον τους. Η παρουσία των μυκοτοξινών έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις στα ζώα, δυσλειτουργίες στο νευρικό σύστημα, καρκινώματα στο ήπαρ, νεφρά πνεύμονες, καθώς και στο ουρικό και πεπτικό σύστημα⁴.

Η επίσημη μέθοδος για την αξιολόγηση της άμεσης χημικής τοξικότητας μιας ένωσης, καθορίζεται μέσω του προσδιορισμού της τιμής LD₅₀ (Lethal Dose). Η τιμή LD₅₀ αντιστοιχεί στην ποσότητα μιας μυκοτοξίνης ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους, η οποία είναι θανατηφόρα για το 50% των πειραματόζωων. Στο τέλος της παραγράφου συνοψίζονται σε συγκεκριμένο πίνακα (Πίνακα 1.1) οι τιμές LD₅₀ για ορισμένες μυκοτοξίνες σε διαφορετικά βιολογικά συστήματα. Για τις μυκοτοξίνες οι τιμές LD₅₀ ποικίλουν, διότι εξαρτιούνται από διαφορετικούς μεταξύ τους παράγοντες¹⁴ όπως η

ηλικία, το φύλο, το βάρος κ.α. Τα όργανα που συνήθως προσβάλλουν είναι το ήπαρ και τα νεφρά. Πολλές μυκοτοξίνες έχουν βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν στην πρωτεϊν σύνθεση δημιουργώντας παρενέργειες που εμφανίζονται από άλλες δερματικές ευαισθησίες μέχρι έντονες ανοσολογικές ανεπάρκειες¹⁵.

Αφλατοξίνες

Στις Αφλατοξίνες έχει αποδοθεί οξεία τοξικότητα και καρκινογένεση σε ανθρώπους και σε ζώα. Οι ασθενείς που προκαλούνται από αυτήν την ομάδα μυκοτοξινών έχουν την γενικότερη ονομασία αφλατοξίνης. Η οξεία αφλατοξίνωση οδηγεί στο θάνατο, ενώ η χρόνια προκαλεί καρκίνο, ανοσολογική ανεπάρκεια κ.α. με το ήπαρ ως το σύνηθες όργανο που καταστρέφεται. Η αξιολόγηση επιδημιολογικών και ερευνητικών αποτελεσμάτων που πραγματοποιήθηκε από τον διεθνή οργανισμό για την έρευνα του καρκίνου (International Agency for Research on Cancer, IARC)¹⁶ το 1987 απέδειξε ότι η έκθεση του ανθρώπου στις Αφλατοξίνες συσχετίζεται με καρκινογένεσεις, ταξινομώντας έτσι την ομάδα των Αφλατοξινών στην πρώτη ομάδα των καρκινογόνων ουσιών. Τα ποσοστά του καρκίνου του ήπατος στον ανθρώπινο πληθυσμό ποικίλουν από χώρα σε χώρα με υψηλότερα ποσοστά στα μέρη όπου οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων στις τροφές και κατά συνέπεια την παραγωγή Αφλατοξινών¹. Η οξεία τοξικότητα των Αφλατοξινών έχει εμφανιστεί και σε πολλά άλλα είδη, θηλαστικά, ψάρια, κουνέλια, πουλικά και σκύλους. Έχει βρεθεί ότι τα νεαρά ζώα και κυρίως τα αρσενικά είναι περισσότερο ευπαθή στην προσβολή από μυκοτοξίνες. Η LD₅₀ κυμαίνεται από 0,5-10 mg/Kg, ανάλογα το βάρος του σώματος⁹.

Η Αφλατοξίνη B₁ είναι ένα ισχυρό μεταλλαξογόνο, μεταλλάσσει τα χρωμοσώματα των φυτών, ζώων και ανθρώπων. Η βιολογική δράση της Αφλατοξίνης B₁ προαπαιτεί την μεταβολική ενεργοποίησή της στο C15-C16 εποξειδίου της (Σχήμα 1.1), το οποίο είναι πολύ δραστικό παράγωγο. Έχει βρεθεί ότι, σχηματίζεται ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα στο N-7άτομο της γουανίνης με το ενεργό παράγωγο της Αφλατοξίνης B₁. Αυτό το προϊόν, το προϊόν της προσθήκης που σχηματίζεται, αναστέλλει την σύνθεση του DNA⁹.

Οχρατοξίνη Α

Η Οχρατοξίνη Α είναι κυρίως νεφροτοξική, ηπατοτοξική, ανοσοτοξική. Επίσης, προκαλεί τερατογένεση και καρκινογένεση. Ο διεθνής οργανισμός για την έρευνα του

καρκίνου (International Agency for Research on Cancer IARC)¹⁶, έχει ταξινομήσει την Οχρατοξίνη Α στην δεύτερη ομάδα των καρκινογόνων ουσιών. Η Οχρατοξίνη Α διαταράσσει την κυτταρική λειτουργία με πολλούς τρόπους. Η δράση της εστιάζεται κυρίως στα ένζυμα που επιδρούν στο μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης, αναστέλλοντας την δράση του ενζύμου που ευθύνεται για την σύνθεση του συμπλόκου φαινυλαλανίνη-tRNA. Έχει ανιχνευτεί στο αίμα και στο γάλα των ζώων και των ανθρώπων. Θεωρείται υπεύθυνη για την νεφροπάθεια που παρουσιάζουν τα χοιριοειδή στις Σκανδιναβικές χώρες. Η ασθένεια έχει ενδημικό χαρακτήρα στην Δανία όπου, τα ποσοστά στην νεφρική ανεπάρκεια των χοιριοειδών και η μόλυνση των ζωοτροφών με Οχρατοξίνη Α συσχετίζονται.

Αρκετές τοξοκολογικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την Οχρατοξίνη Α, το όριο το οποίο θεσπίζεται είναι κάτω του 5 mg/Kg ανάλογα με το βάρος του σώματος. Δεδομένου ότι τα συμπτώματα από την έκθεση σε Οχρατοξίνη Α μοιάζουν με αυτά της νεφρικής ανεπάρκειας χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή και την διάγνωση³.

Στεριγματοκυστίνη

Οι τοξικές επιπτώσεις της Στεριγματοκυστίνης είναι περίπου όμοιες με αυτές της Αφλατοξίνης Β₁. Η Στεριγματοκυστίνη μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση, μετάλλαξη και τερατογένεση. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η χρόνια έκθεση σε Στεριγματοκυστίνη προκαλεί ηπατώματα, καρκίνο στους πνεύμονες νεφρικές και ηπατικές αλλοιώσεις. Στα βοοειδή έχει παρατηρηθεί διάρροια αίματος, μειωμένη παραγωγή γάλατος ακόμα και θάνατος σε περιπτώσεις όπου τα όρια της Στεριγματοκυστίνης ήταν περίπου 8 mg/Kg ανά βάρος σώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, καμία χώρα δεν έχει νομοθεσία που να θεσπίζει τα όρια ανίχνευσης της Στεριγματοκυστίνης για την προστασία των καταναλωτών⁹.

Τριχοθεκένια

Τα Τριχοθεκένια προκαλούν ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων λόγω της ποικιλομορφίας που χαρακτηρίζει αυτήν την ομάδα των μυκοτοξινών. Χαρακτηρίζεται κυρίως ως νευροτοξικές και κυττοτοξικές. Η ανοσολογική τοξικότητα που εμφανίζουν οφείλεται κυρίως στην υποκατάσταση που φέρουν στη θέση C8 του μορίου, στον οξιρανικό δακτύλιο στις θέσεις C12, C13 καθώς και στην παρουσία διπλού δεσμού στις θέσεις C9=C10 (Σχήμα 1.4). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι, τα μέλη της ομάδας των τριχοθεκενίων, είναι πολύ ισχυροί αναστολείς στην πρωτεϊνοσύνθεση

ευκαρυωτικών κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν τη δράση της πεπτιδοτρανσφεράσης, απαραίτητο ένζυμο σε όλες τις διαδικασίες της μεταγραφής (tRNA) και ότι προκαλούν απόπτωση των πολυριβωσωμάτων⁷⁻¹⁷.

Τα τριχοθεκένια επιδρούν σχεδόν σε όλα τα όργανα του ανθρώπου. Η τοξική διατροφική αλευκία είναι μια καλά μελετημένη ασθένεια που έχει αποδοθεί στις τριχοθεκένια. Η ασθένεια προκαλεί μια πληθώρα γαστρονομικών διαταραχών όπως διάρροια, εμετό, φλεγμονές, δερματικούς ερεθισμούς, αναιμία, και νευρολογικές παθήσεις. Στην οξεία της φάση τα συμπτώματα είναι νεύρωση στην στοματική κοιλότητα, αιμορραγία από τη μύτη και τα γεννητικά όργανα καθώς και κλονισμό του νευρικού συστήματος⁷. Μια άλλη ασθένεια που αποδίδεται στις τριοθεκένια είναι η σταχυβοτρυτοξίκωση (*stachybotryotoxicosis*). Σε αυτήν την ασθένεια είχαν αποδοθεί αρχικά, οι αυξανόμενοι θάνατοι αλόγων και είχαν συνδεθεί με μουχλιασμένο άχυρο και σανό. Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι ο άνθρωπος δύσκολα μπορεί να προσβληθεί από αυτή την ασθένεια. Μελέτες όμως απέδειξαν ότι ο μύκητας *Stachybotrys* αναπτύσσει σε όλα τα οικοδομικά υλικά που περιέχουν κυτταρίνη (υλικά μόνωσης, κεραμίδια, κλιματιστικά). Τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι υποθερμία στην μύτη και στο στόμα, ανορεξία, κατάπτωση, αιμοραγίες. Δεδομένου ότι η ομάδα των τριχοθεκενίων περιλαμβάνει πολλά μέλη, αυτά παρουσιάζουν διαφορετική βιολογική δραστηριότητα με αποτέλεσμα οι τιμές LD₅₀ ποικίλουν. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι, για τα ποντίκια έχει βρεθεί ότι οι τιμές LD₅₀ για τη Δεοξυντβαλενόλη είναι 70 mg/Kg ανά βάρος σώματος, για την Βερρουκαρίνη Α 0.5 mg/Kg ανά βάρος σώματος, ενώ για την T-2 τοξίνη 5,2 mg/Kg ανά βάρος σώματος⁹.

Ρουμπρατοξίνες

Μελέτες σε ενδοκυτταρικό επίπεδο έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός δράσης των τοξινών αυτών, είναι η αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής, της παραγωγής ATP και της πρωτεϊνσύνθεσης. Το ήπαρ είναι το όργανο που κυρίως καταστρέφουν οι τοξίνες αυτής της κατηγορίας, καθώς και τα νεφρά, σπλήνα, πνεύμονες και οισοφάγο. Αλλοίωση έχει παρατηρηθεί στην λειτουργία του ήπατος, όπου κύτταρα εμφανίζουν εκφυλισμό και νέκρωση (ίκτερος, θρόμβωση). Άλλα κλινικά συμπτώματα όπου έχουν αποδοθεί στις Ρουμπρατοξίνες είναι η κατάθλιψη, ανορεξία, απώλεια βάρους, θρόμβωση και οι αιμοραγίες. Η τιμή LD₅₀ για τα ποντίκια είναι 83 mg/Kg ανά βάρος σώματος⁷.

Τοξίνες του μύκητα *Altenaria*

Υπάρχουν μελέτες που θεωρούν τις τοξίνες του μύκητα *Altenaria* υπαίτιες για τα αιμορραγικά σύνδρομα που εμφανίζουν τα πουλερικά καθώς και με την μυκητίαση που εμφανίζουν τα βοοειδή. Τοξικολογικές μελέτες στα ποντίκια έδειξαν ότι η ενδοπεριτονιακή χορήγηση τοξινών αυτής της ομάδας επέφερε τον θάνατο ενώ στα άλογα παρατηρήθηκε αλλοίωση των βλεννογόνων αδένων. Γενικά οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση που έχουν οι τοξίνες του γένους *Altenaria*, έδειξαν ότι ενώ εμφανίζουν αντικές, αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές ιδιότητες είναι παράλληλα τοξικές τόσο σε φυτικά όσο και σε βιολογικά συστήματα. Η τιμή LD₅₀ για το Τενουαζικό οξύ (Teniazonic acid) στα ποντίκια βρέθηκε 125-225 mg/Kg ανά βάρος σώματος για τα αρσενικά και 81-115 mg/Kg ανά βάρος σώματος για τα θηλυκά¹⁸.

Τρεμογόνες τοξίνες

Οι τρεμογόνες τοξίνες προκαλούν ρίγη και σπασμούς στα ζώα. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από αστάθεια στην κίνηση η οποία μπορεί να μην είναι εμφανής έως ότου τα ζώα αναγκαστούν να τρέξουν, οπότε και παρατηρείται ασταθές βάδισμα, ρίγος στο κεφάλι, παραπάτημα έως και κατάρρευση ακολουθούμενη από νευρικούς σπασμούς. Η τοξικότητα των τοξινών αυτής της κατηγορίας είναι μεγάλη καθώς και ακόμα και η ποσότητα 0,005 mg/Kg ανά βάρος σώματος, είναι ικανή να προκαλέσει ρίγος και αστάθεια⁷.

Τοξικές λακτόνες

Στην Πατουλίνη αρχικά είχαν αποδοθεί αντιβιοτικές ιδιότητες για την καταπολέμηση της κοινής γρίπης (βήχα, καταρροή). Επίσης, χρησιμοποιούνταν και ως αλοιφή για την απαλλαγή από δερματικές μυκητιάσεις. Ωστόσο, ανάμεσα στις δεκαετίες του 1950 και 1960 μελέτες απέδειξαν ότι η Πατουλίνη εκτός από την αντιβακτηριαδική και αντική δράση, ήταν τοξική για τον άνθρωπο και τα φυτά, κατατάσσοντας την τελικά ως μυκοτοξίνη³. Η Πατουλίνη είναι τοξική σε βακτήρια, πρωτόζωα και μύκητες για αυτό αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως ισχυρό αντιβιοτικό. Αποδείχτηκε ισχυρά τοξική και για τον άνθρωπο, επιδρώντας κυρίως στο στομάχι προκαλώντας συμπτώματα όπως ναυτία και εμετό. Σε πολύ ισχυρές δόσεις η Πατουλίνη έχει βρεθεί ότι προκαλεί γαστεντερική υπεραναιμία, αιμορραγίες και έλκος. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι, η Πατουλίνη προκαλεί πνευμονικό οίδημα, ηπατίδα, νεφρική ανεπάρκεια ενώ σε χρόνιες δόσεις προκαλεί ανοσολογική ανεπάρκεια και

καρκινογένεσεις. Στα νεαρά κοτόπουλα η τιμή LD₅₀ για την Πατουλίνη είναι 170 mg/Kg ανά βάρος σώματος⁷.

Το Πενικιλικό οξύ έχει αποδεχτεί ότι έχει αντιβακτηριαδική αντική και αντικαρκινική βιολογική δραστηριότητα, αλλά ταυτόχρονα και κυττοτοξικές ιδιότητες. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι παρουσιάζει δακτυλωτή (digitalis-like action) δράση στην καρδιά, όταν βρίσκεται στην κυκλική μορφή της λακτόνης (Σχήμα 1.7). Επιδρά σε όλα τα τριχοειδή αγγεία, μειώνει την διαπερατότητα τους και εμφανίζει ανιδιουριτική δράση¹⁹.

Ζεαραλενόνη

Η Ζεαραλενόνη επιδρά κυρίως στο αναπαραγωγικό σύστημα. Η κυριότερη βιολογική δράση που εμφανίζει είναι υπερ-οιστρογενισμός, ο οποίος θεωρείται χρόνια τοξίκωση. Μελέτες σε χοιριοειδή έχουν δείξει ότι η Ζεαραλενόνη απορροφάται γρήγορα μέσω της στοματικής κοιλότητας και μεταβολίζεται στα έντερα στις μορφές α- και β- Ζεαραλενόνη, όπου εν συνεχεία συζευγνύονται με το γλυκουρονικό οξύ⁹. Στα θηλυκά χοιριοειδή το σύνδρομο εμφανίζεται με διόγκωση του αιδοίου και των μαστικών αδένων, υπερπλασία της μήτρας, ατροφία των ωοθηκών, πρωκτική και κοιλική πρόπτωση. Στα αρσενικά χοιριοειδή μπορεί να προκαλέσει εκθηλυσμό, όπου εμφανίζεται με ατροφία στους όρχεις και υπερτροφία των μαστικών αδένων. Επίσης, παρατηρείται μειωμένη αναπαραγωγή, μείωση της ωορρηξίας και αρνητικές επιδράσεις στην εμβρυακή ανάπτυξη. Η Ζεαραλενόνη, Ζεαραλενόνη λόγω της μεγάλης οιστρογενικής δραστηριότητας (increased estrogenic activity), έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της εμμηνοπαύσης και ως αντισυλληπτικά. Αν και η επικινδυνότητα της Ζεαραλενόνης για τον άνθρωπο δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί, είχε θεωρηθεί υπαίτια για τις πρόωρες έμμηνο ρήσεις των εφήβων στο Πόρτο Ρίκο, κάτι το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων. Η συνιστώμενη ημερήσια έκθεση στη Ζεαραλενόνη είναι 0,05 mg/Kg ανά βάρος σώματος. Εντούτοις, τα όρια για την παρουσία της Ζεαραλενόνης στις τροφές, δεν έχουν ακόμα θεσπιστεί νομοθετικά¹.

Κιτρινίνη

Αρχικά στην Κιτρινίνη είχαν αποδοθεί αντιβιοτικές αλλά οι ισχυρές παρενέργειες που παρουσίασε στα νεφρά θηλαστικών, άλλαξε γρήγορα αυτήν την πεποίθηση. Το 1951 στην Ιαπωνία το εισαγόμενο ρύζι από την Ταϊλάνδη με κίτρινο χρώμα εξετάστηκε και περιείχε Κιτρινίνη. Έκτοτε έχουν γίνει πολλές αναφορές για την παρουσία

Κιτρινίνης στο ρύζι και έχει μείνει στην ιστορία σαν την «ασθένεια του κίτρινου ρυζιού», μια θανάσιμη μορφή μπέρι-μπέρι, με συμπτώματα όπως η δύσπνοια, παράλυση και τύφλωση. Η Κιτρινίνη θεωρείται ηπατοτοξική και νεφροτοξική και δρα συνεργατικά με την Οχρατοξίνη Α με την οποία συνήθως συνυπάρχει. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η παρουσία της στις τροφές είναι σπανιότερη και οι συγκεντρώσεις χαμηλότερες σε σχέση με την Οχρατοξίνη Α, θεωρείται ότι συμβάλει περισσότερο στην ηπατοτοξικότητα και παρατηρείται στα ζώα παρα ότι την προκαλεί. Η τιμή LD₅₀ για τα ποντίκια είναι 70 mg/Kg ανά βάρος σώματος⁷.

Ο Πίνακας 1 που ακολουθεί, συγκεντρώνει τις LD₅₀ τιμές για τις κυριότερες μυκοτοξίνες όπου αναφερθήκαμε παραπάνω.

Πίνακας 1: Τοξικότητα ορισμένων μυκοτονοξινών σε διάφορα βιολογικά συστήματα

Είδος	Μυκοτοξίνη	LD ₅₀ (mg ανά Kg σώματος)
Κουνέλι	Αφλατοξίνη B ₁	0,30
Χοιροειδή	Αφλατοξίνη B ₁	0,62
Μαϊμού	Αφλατοξίνη B ₁	2,2
Ποντίκια	Οχρατοξίνη Α	21 4-30,3
Κοτόπουλα	Οχρατοξίνη Β	24
Μαϊμού	Στερυγματοκυστίνη	32
Ποντίκια	Δεοξυνιβαλενόλη	70
Ποντίκια	Διακετοξισκριπενόλη	23
Ποντίκια	Νεοσολανιόλη	14,5
Ποντίκια	HT-2 τοξίνη	9,0
Ποντίκια	T-2 τοξίνη	5,2
Ποντίκια	Νιβαλενόλη	4,1
Ποντίκια	Βερρουκαρίνη Α	0,5
Ποντίκια	Ρουμπρατοξίνη Β	83
Ποντίκια	Τενουαζανικό οξύ	81-225
Κοτόπουλα	Τενουαζανικό οξύ	37,5
Σκύλοι	Τενουαζανικό οξύ	2,5-10
Χοιροειδή	Τρεμογόνες τοξίνες	0,005
Κοτόπουλα	Πατουλίνη	170
Ποντίκια	Πενικιλικό οξύ	250
Ποντίκια	Ζεαραλενόλη	10.000
Χοιροειδή	Ζεαραλενόλη	5.000
Ποντίκια	Κιτρινίνη	70

LD₅₀ είναι η ποσότητα μυκοτοξίνης ανά kg σώματος, ικανή να προκαλέσει το θάνατο στο 50% των πειρατόζων.

1.6 Αναλυτικές τεχνικές για την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών στα τρόφιμα

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)²⁰ είναι η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μυκοτοξινών. Λόγω της απλότητάς της είναι ευρέως διαδεδομένη και με αυτήν την τεχνική μπορούν να διαχωριστούν σχεδόν όλες οι μυκοτοξίνες. Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι, τα διαφορά παράγωγα των μυκοτοξινών δύσκολα διαχωρίζονται, καθώς και ότι η μέθοδος έχει μικρή επαναληψιμότητα και επομένως χαμηλή ακρίβεια.

Αναλυτικές τεχνικές όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)²¹ καθώς και η αέριος χρωματογραφία (GC)²² δίνουν περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα με πολύ καλή επαναληψιμότητα. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των Αφλατοξινών, Φουμονισινών, Οχρατοξινών καθώς και για τις Πατουλίνη και Κιτρινίνη. Η αέριος χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της Δεοξυνιβαλενόλης, της Πατουλίνης και των Φουμοισινών. Η φασματοσκοπία μάζας (MS)²³ εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών μυκοτοξινών. Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού επίσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των Αφλατοξινών της Δεοξυνιβαλενόλης και της Ζεαραλενόλης. Μια ακόμα πολλά υποσχόμενη τεχνική είναι η ενζυματική ανοσοδιάγνωση (enzyme linked immunoassay, ELIZA)²⁴ που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών μυκοτοξινών. Οι ενζυματικές ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές είναι πολύ χρήσιμες σε μελέτες που αφορούν τον τρόπο με τον οποίο μεταβολίζονται οι μυκοτοξίνες στα ζώα καθώς και την δυσκολία που εμφανίζουν σε διάφορα βιολογικά συστήματα για την απομάκρυνση των μυκοτοξικών από το σύστημα τους¹⁸.

Μέσω της εφαρμογής νέων πρακτικών μεθόδων για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών, οι εγκεκριμένες μέθοδοι που έχουν θεσπιστεί για την ανίχνευσή τους είναι περισσότερο αξιόπιστοι από ποτέ. Εντούτοις, κίνδυνοι ενδημονούν όσο αφορά τη σωστή και αντιπροσωπευτική δειγματοληψία ενός μολυσμένου καρπού. Ένα ακόμα σημαντικό σημείο για την ανάλυση των μυκοτοξινών είναι ότι αυτές, συνήθως βρίσκονται σε συνδυασμούς, δρώντας συνεργαστικά με άλλες γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την τοξίκωση σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με την παρουσία μίας μόνο μυκοτοξίνης²⁵. Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί συνοψίζονται ορισμένα στοιχεία για τις αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται για τον ποσοτικό

προσδιορισμό των κυριότερων μυκοτοξινών στα τρόφιμα, καθώς και τα όρια της εφαρμογής των μεθόδων αυτών^{26,27}.

Πίνακας 2: Όρια εφαρμογής διάφορων αναλυτικών τεχνικών για τον ποσοτικό έλεγχο ορισμένων μυκοτοξινών

Είδος	Μυκοτοξίνη	Μέθοδος ανίχνευσης	LD ₅₀ (mg ανά Kg σώματος)
Αφλατοξίνη B ₁	Παιδικές τροφές	HPLC	0,07-0,18
Αφλατοξίνη B ₁	Φιστίκια	HPLC	3-15
Αφλατοξίνη B ₂	Αμύγδαλα	HPLC	1-3
Αφλατοξίνη B ₂	Σκόνη πάπρικας	HPLC	0,1-1,3
Αφλατοξίνη G ₁	Αμύγδαλα	HPLC	2-9
Αφλατοξίνη G ₁	Φυστικοβούτυρο	HPLC	0,3-3,3
Αφλατοξίνη M ₁	Γάλα σε σκόνη τυρί	TLC	0,3
Αφλατοξίνη M ₁	Γάλα	HPLC	0,08-1,3 mg/ml
Αφλατοξίνη M ₁	Γάλα σε σκόνη	ELISA	0,15-0,4
Δεοξυनिβαλενόλη	Σιτάρι	TLC	50-1000
Φουμονισίνη B ₂	Καλαμπόκι	HPLC	50-2000
Φουμονισίνη B ₂	Καλαμπόκι	HPLC	50-750
Φουμονισίνη B ₂	Καλαμπόκι	HPLC	100-1600
Οχρατοξίνη A	Κριθάρι	TLC	25-100
Οχρατοξίνη A	Μπύρα	HPLC	0,2-1,5 mg/ml
Οχρατοξίνη A	Λευκό κρασί	HPLC	0,1-2 mg/ml
Οχρατοξίνη A	Κόκκινο κρασί	HPLC	0,2-3 mg/ml
Πατουλίνη	Χυμός μήλου	HPLC	20-200 mg/ml
Ζεαραλενόνη	Καλαμπόκι	TLC	100-2000
Ζεαραλενόνη	Καλαμπόκι	HPLC	50-4000
Ζεαραλενόνη	Καλαμπόκι	ELISA	800

Κεφάλαιο 2

2.Προσδιορισμός της επίδρασης οικολογικών παραμέτρων στην ανάπτυξη και στην παραγωγή Αφλατοξινών και Ωχρατοξίνης Α από τους μύκητες *A. flavus* και *A. carbonarius* σε σιτάρι και ρύζι εμπορίου.

Η επίδραση των οικολογικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας (από τη συγκομιδή έως το τελικό προϊόν) μελετάται με εμβολιασμό τρυβλίων που περιέχουν διάφορα υποστρώματα (π.χ. σιτάρι και ρύζι) με συγκεκριμένη ενεργότητα ύδατος a_w και επωάζονται σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μία τέτοια μελέτη, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία.

2.1 Υλικά και μέθοδοι

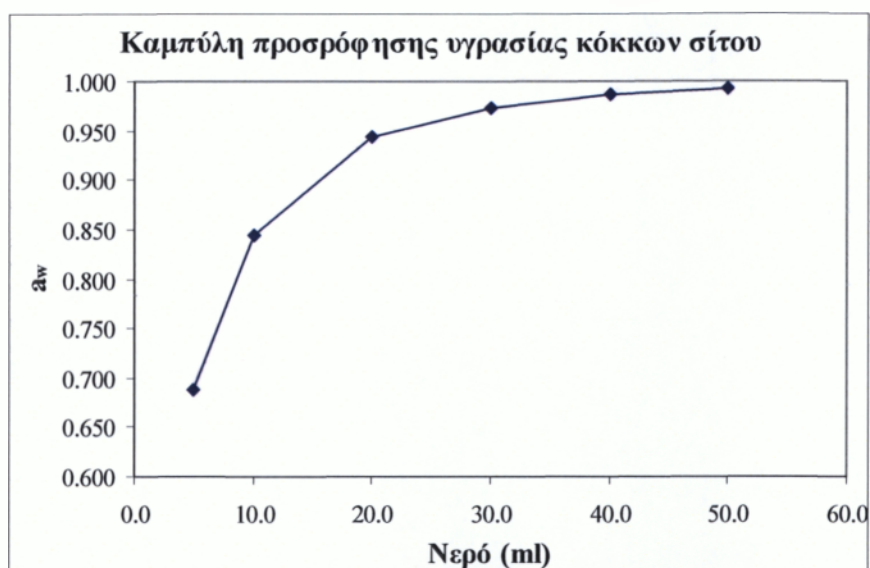
2.1.1 Προετοιμασία υποστρώματος

Οι κόκκοι των σιτηρών απολυμαίνονται με εμβάπτιση κατά σειρά σε διάλυμα 70% αιθανόλης για 2 λεπτά και σε διάλυμα χλωρίνης οικιακής χρήσης (4-5% ενεργή χλωρίνη) το οποίο αραιώνεται περίπου 10 φορές (ώστε το διάλυμα στο οποίο εμβαπτίζονται οι κόκκοι να είναι περιεκτικότητας 0,4%). Τα διαλύματα χρησιμοποιούνται σε ποσότητα 10πλάσια του υποστρώματος που θέλουμε να απολυμάνουμε και παραμένουν σε επαφή για τουλάχιστον 2 λεπτά (το τελευταίο προκαλεί προσρόφηση υγρασίας από τους κόκκους). Στη συνέχεια το υπόστρωμα παραμένει σε θάλαμο νηματώδους ροής υπό ασηπτικές συνθήκες μέχρι επαναφοράς της περιεχόμενης του υγρασίας στα επιθυμητά για τις περαιτέρω ρυθμίσεις επίπεδα. Ακολούθως γίνεται έλεγχος της απολύμανσης με επώαση κόκκων σε DRBC και DG18 στους 25°C για 7 ημέρες²⁸.

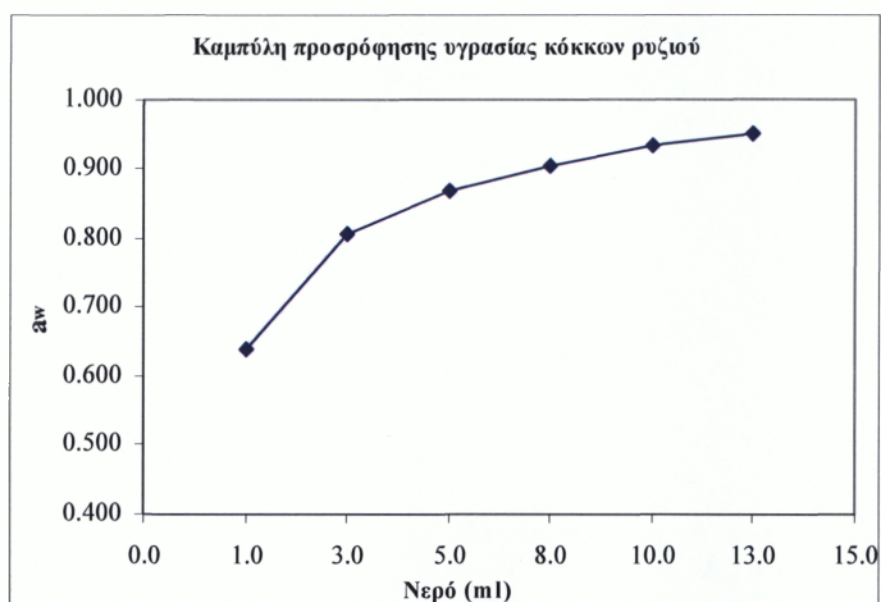
2.1.2 Ρύθμιση της ενεργότητας ύδατος

Οι κόκκοι ζυγίζονταν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες στις οποίες έχουν προστεθεί συγκεκριμένες ποσότητες αποστειρωμένου-απεσταγμένου ύδατος (οι προστιθέμενες ποσότητες νερού προκύπτουν από τη δημιουργία καμπύλων αναφοράς προσρόφησης υγρασίας για τους ίδιους κόκκους σιταριού και ρυζιού). Οι κωνικές φιάλες περιοδικά ανακινούνται σθεναρά, ενώ παραμένουν αποθηκευμένες στους 4°C για 48 ώρες ώστε να εξισορροπηθεί η επιθυμητή a_w (0,800, 0,850, 0,900 & 0,980)^{29,30}. Τέλος ελέγχεται η a_w . Στα **Γραφήματα 1 & 2** δίνονται παραδείγματα της καμπύλης

προσρόφησης υγρασίας για τα δυο δημητριακά βάση της οποίας ρυθμίζεται η ενεργότητα ύδατος των κόκκων.



Γράφημα 1. Καμπύλη προσρόφησης υγρασίας σε κόκκους σιταριού.



Γράφημα 2. Καμπύλη προσρόφησης υγρασίας σε κόκκους ρυζιού.

2.1.3 Προετοιμασία εμβολίου

Καλλιέργειες των στελεχών επωάζονται στους 25°C για 7 ημέρες σε υπόστρωμα σύστασης παρόμοιας του σίτου (MEA). Τα σπόρια συλλέγονται με αποστειρωμένο – απεσταγμένο νερό το οποίο περιείχε 0,005% Tween 80 για τη μείωση της διεπιφανειακής τάσης σπορίων – νερού. Από το πυκνό αυτό διάλυμα σπορίων 1 ml προστίθενται σε 2ml απεσταγμένου νερού του οποίου η ενεργότητα ύδατος είχε

ρυθμίζεται με γλυκερόλη στην τιμή του υποστρώματος στο οποίο πρόκειται να εμβολιαστούν. Η συγκέντρωση ακολούθως ρυθμίζεται με αιμοκυτταρόμετρο σε 10^5 - 10^6 σπόρια ml^{-1} ³¹.

2.1.4 Εμβολιασμός και επώαση

Τα ενυδατωμένα δημητριακά τοποθετούνται ασηπτικά σε τρυβλία Petri σε ποσότητα τέτοια ώστε να δημιουργεί μια συμπαγή στρώση στην επιφάνεια της βάσης του τρυβλίου (20-25g). Ακολούθως εμβολιάζονται με 10μl από τα προετοιμασμένα πυκνά εμβόλια σε κεντρικό σημείο του τρυβλίου (μέγεθος εμβολίου 100-1000 σπόρια). Τα τρυβλία που περιέχουν κόκκους της ίδιας ενεργότητας σφραγίζονται σε πλαστικούς περιέκτες μαζί με ένα ποτηράκι ζέσεως το οποίο περιέχει διάλυμα νερού – γλυκερόλης σε τέτοια αναλογία ώστε να έχει την ίδια ενεργότητα ύδατος με τους κόκκους. Έτσι δημιουργείται στο εσωτερικό του κάθε περιέκτη ατμόσφαιρα με εξισορροπημένη σχετική υγρασία ως προς το υπόστρωμα ^{29,30}. Τέλος τα τρυβλία τοποθετούνται στις επιθυμητές θερμοκρασίες επώασης (20, 25, 30 & 35°C).

2.1.5 Μέτρηση ανάπτυξης

Η μυκηλιακή αύξηση καταγράφεται καθημερινά σε δύο κάθετες μεταξύ τους διαμέτρους της αποικίας. Ακολούθως, η διαμετρική αύξηση χρησιμοποιείται για να εξαχθούν οι ρυθμοί αύξησης (για κάθε περίπτωση εξεταζομένων περιβαλλοντικών παραγόντων) με τη χρήση γραμμικής παλινδρόμησης. Ποσότητες κόκκων από κάθε τρυβλίο καταψύχονται στους -20 °C για μελλοντική εκχύλιση και προσδιορισμό των αφλατοξινών και της ωχρατοξίνης Α που παρήχθησαν κατά την διάρκεια της επώασης ³¹.

Aspergillus flavus

Οι Pitt και Miscalbe (1994) σε μελέτες για την ανάπτυξη του *A. flavus*, καθώς και άλλων συγγενών ειδών που συμπεριλαμβάνονται στην γενικότερη ομάδα *Aspergillus Flavi*, αναφέρουν κατώτερες τιμές ενεργότητας ύδατος λίγο πάνω από το 0,810 για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασίας (25, 30 & 35 °C), σε στέρεο θρεπτικό υπόστρωμα MEA. Είναι επόμενο η ανάπτυξη πάνω στο λιγότερο «φιλικό» σιτάρι με ενεργότητα 0,800 να είναι αντικειμενικά αδύνατη. Η ανάπτυξη στο σιτάρι ξεκινάει στην ενεργότητα ύδατος 0,85 μόνο στις υψηλές θερμοκρασίες των 30 και 35 °C. Στις θερμοκρασίες αυτές η ανάπτυξη είναι πάρα πολύ αργή αλλά η δυνατότητα παραγωγής αφλατοξίνης ακόμα και σε τέτοιες περιπτώσεις μας αναγκάζει να τις αντιμετωπίσουμε

με την ίδια βαρύτητα όπως όταν έχουμε κανονική επιμήκυνση του μυκηλίου. Στις θερμοκρασίες των 25 και 30 °C η ανάπτυξη του μύκητα είναι δυνατή μόνο σε ενεργότητα ύδατος ίση ή μεγαλύτερη της 0,90. Όσον αφορά την άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης, αυτή σημειώνεται στους 35 °C ενώ φαίνεται πως η επίδραση της δεν είναι περιοριστική για την ανάπτυξη. Η επίδραση της a_w είναι μεγαλύτερη από αυτή της θερμοκρασίας και παίζει καθοριστικό ρόλο για την εκβλάστηση ή μη του μύκητα. Τα όρια για την εκβλάστηση θα πρέπει να καθοριστούν μεταξύ 0,80 και 0,85 a_w . Παρά το γεγονός ότι, ο ρυθμός αύξησης του *A. flavus* είναι μεγαλύτερος στους 35 από ότι στους 30 °C, παρατηρείται μια μικρή τάση για μείωσή του, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι πλησιάζουμε στα ανώτερα θερμοκρασιακά όρια του μύκητα. Την ίδια συμπεριφορά έχει ο συγκεκριμένος μύκητας και όταν σαν υπόστρωμα χρησιμοποιηθεί το ρύζι. Παρουσιάζει ελαφρώς χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και στενότερα όρια αφού δεν υπάρχει καθόλου ανάπτυξη στους συνδυασμούς 0,85 a_w - 30°C και 0,90 a_w - 20°C. Στην περιοχή ανάπτυξης όμως όχι μόνο ο ρυθμός είναι ανάλογος, αλλά και ο χρόνος εκβλάστησης είναι ο ίδιος και μάλιστα στην άριστη θερμοκρασία των 35°C ακόμα και μικρότερος. Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσε να θεωρηθεί πως ο *A. flavus* μπορεί να εκβλαστήσει και να αναπτυχθεί εξίσου καλά και στα δύο υποστρώματα, εφόσον αυτά βρεθούν σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες. Ανάλογα όρια και ρυθμούς ανάπτυξης σημειώνουν και οι Pitt και Hockings (1997), Samson και συν. (2000), Giorni και συν. (2007).

Aspergillus carbonarius

Ο *A. carbonarius*, σε δημοσιευμένες μελέτες με πολλά θρεπτικά υποστρώματα (SGM, MEA, CYA και YES), δεν παρουσιάζεται να έχει δυνατότητα ανάπτυξης σε ενεργότητα ύδατος μικρότερη ή ίση με 0,850. Επίσης στα αποτελέσματα παρατηρούμε μια ενδιάμεση (30 °C) άριστη θερμοκρασία ^{32,34,36,37}. Τα διακριτά κατώτατα όρια ανάπτυξής του καθορίζονται στα 0,90 a_w για το σιτάρι σε όλες τις θερμοκρασίες με εξαίρεση τους 20°C που παρουσιάζει ανάπτυξη μόνο στην a_w 0,98. Στο ρύζι ο *A. carbonarius* δεν αναπτύσσεται παρά μόνον στην ενεργότητα των 0,98 αλλά σε όλες τις θερμοκρασίες. Οι παρατηρήσεις για την επίδραση των δύο παραγόντων περιορίζονται στην διαπίστωση πως έχουμε άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30°C, η αύξηση έχει πολύ χαμηλότερους ρυθμούς σε σχέση με το σιτάρι αλλά και πάλι με παρόμοιες λανθάνουσες περιόδους. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ανάλυση των παραγόμενων μυκοτοξινών. Είναι γνωστό ότι οι άριστες συνθήκες παραγωγής τους

είναι χαμηλότερες αυτών της ανάπτυξης των μυκήτων, γεγονός που καθιστά τη μελέτη τους επιτακτική διότι μια μικρή παρουσία μυκήτων μπορεί να υποδηλώνει μια ευρεία τοξική μόλυνση του προϊόντος^{32,34,31,37}.

Γενικότερα, θα μπορούσε να θεωρηθεί απαγορευτική η συντήρηση σίτου και ρυζιού με ενεργότητες ύδατος άνω του 0,800 και 0,850 αντίστοιχα ακόμα και για σύντομα χρονικά διαστήματα. Όσον αφορά τις θερμοκρασίες, δεν μπορούν να αξιολογηθούν ως ασφαλείς, πρωτίστως λόγω του προβλήματος «ανάφλεξης» που διατρέχει ο σίτος σε αυτές και δευτερεύοντος διότι υπό την κατάλληλη ενεργότητα η εκβλάστηση είναι δυνατή σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος. Το γεγονός ότι και στα δυο δημητριακά ο κυρίαρχος παράγοντας επίδρασης στους μύκητες είναι η ενεργότητα ύδατος μας υποχρεώνει να καθορίσουμε με βάση αυτόν την στρατηγική πρόληψης.

Κεφάλαιο 3

3. Προσδιορισμός των επιπέδων των μυκοτοξινών στα εμβολιασμένα υποστρώματα

3.1 Προσδιορισμός Ωχρατοξίνης A

Για τον προσδιορισμό της OTA χρησιμοποιείται στήλη ανοσοσυγγένειας (IAC). Οι συνθήκες ανάλυσης είναι οι ακόλουθες:

Στήλη διαχωρισμού: Supelcosil C-18, 250x4.6mm, 5μm

Διαλύτες: CH₃CN/H₂O/CH₃COOH, 49.5/49.5/1 (v/v/v)

Θερμοκρασία στήλης: 22°C

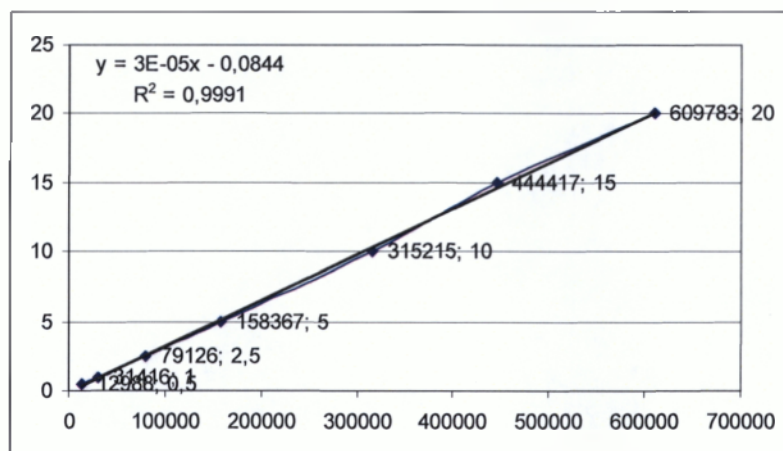
3.1.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης ωχρατοξίνης A (OTA) σε δημητριακά (cereals) με στηλάκια ανοσοπροσρόφησης

1. 10g λειοτριβημένων δημητριακών (στάρι ή ρύζι) ή αλεύρου προστίθενται σε μπλέντερ (μεταλλικός κάδος).
2. 200mL διαλύματος 1% όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃) προστίθενται και το μίγμα ομογενοποιείται σε υψηλή ταχύτητα για 2min.
3. Το ομογενοποίημα διηθείται με χάρτινο ηθμό Whatman No4 ή No113 και το διήθημα συλλέγεται σε κωνική φιάλη. Εναλλακτικά το δείγμα φυγοκεντρείται σε γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες στις 4000rpm (1600g) για 10min.
4. 20mL από το υπερκείμενο διάλυμα (αντιστοιχούν σε 1g δείγματος) διαβιβάζονται από τη στήλη ανοσοπροσρόφησης με ροή 3mL/min χρησιμοποιώντας μία σύριγγα για άσκηση πίεσης ή με τη βαρύτητα.
5. Η στήλη εκπλένεται με 20mL PBS (ροή 5mL/min). Αν το δείγμα είναι έντονα χρωματισμένο, η στήλη εκπλένεται με διάλυμα 20% methanol/PBS (v/v).
6. Η ωχρατοξίνη A εκλούεται με 1,5mL διαλύματος (Μεθανόλης:Οξικού οξέος 98:2 (v/v) με τη βαρύτητα και συλλέγεται σε γυάλινο φιαλίδιο των 5mL. Κατά τη διάρκεια της έκλουσης με το προαναφερθέν μίγμα διαλυτών αναστρέφεται η ροή (backflush) 3 τουλάχιστον φορές με τη βοήθεια σύριγγας. Το έμβολο της σύριγγας πιέζεται για να συλλεχθεί και η τελευταία σταγόνα του υγρού.
7. Η στήλη εκπλένεται με 1,5mL απιονισμένο νερό (dd H₂O) και τα εκπλύματα συλλέγονται στο προαναφερθέν φιαλίδιο των 5mL ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να γίνεται 3mL.
8. 25μL από το ανωτέρω διάλυμα εγχύονται στη συσκευή HPLC-FLD

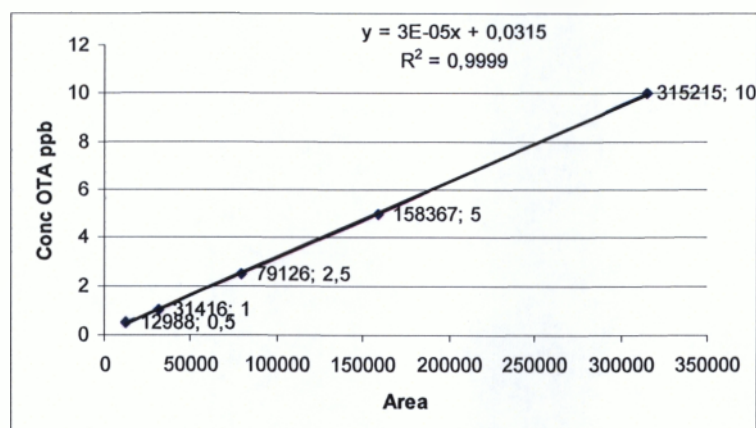
Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού ΟΤΑ οι διεργασίες γίνονται εντός απαγωγού, οι αναλυτές φορούν γάντια, μάσκα και προστατευτικά γυαλιά στο πρόσωπο και χρησιμοποιούν μόνο γυάλινα σκεύη, καθώς η χρήση οποιουδήποτε πλαστικού σκεύους εμπεριέχει τον κίνδυνο η ΟΤΑ να προσρροφηθεί στο σκεύος.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ΟΤΑ σε διάλυμα, απαιτείται η δημιουργία καμπυλών αναφοράς ανάλογα με τη συγκέντρωση του διαλύματος σε ΟΤΑ. Οι καμπύλες αυτές προκύπτουν από την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων ΟΤΑ. Παραδείγματα τέτοιων καμπυλών μαζί με τις αντίστοιχες εξισώσεις τους παρουσιάζονται στα επόμενα γραφήματα.

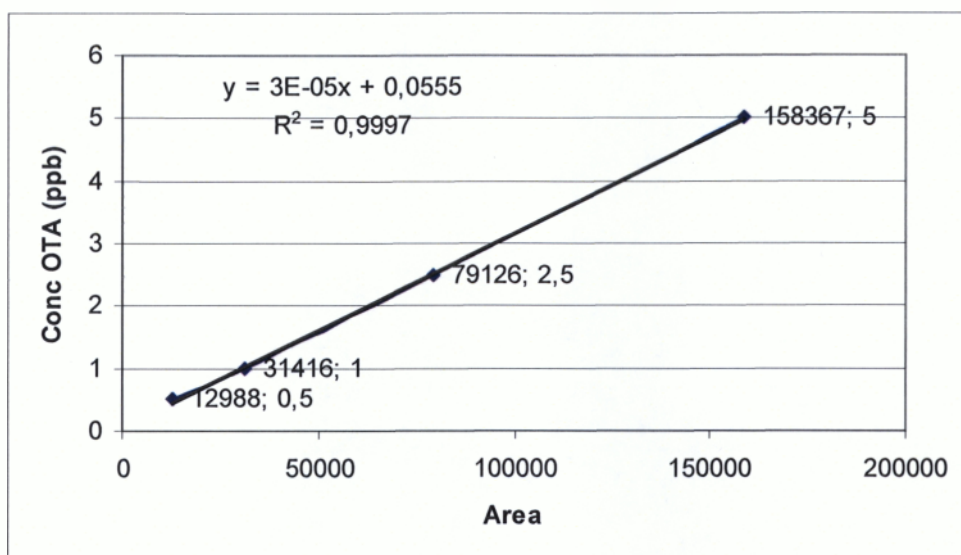
Γράφημα 3: Πρότυπη Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ΟΤΑ σε διάλυμα στην περιοχή 0,5-20ppb.



Γράφημα 4: Πρότυπη Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ΟΤΑ σε διάλυμα στην περιοχή 0,5-10ppb.



Γράφημα 5: Πρότυπη Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης OTA σε διάλυμα στην περιοχή 0,5-5ppb



Όπως παρατηρούμε από τις καμπύλες αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων η μέθοδος εμφανίζει πολύ καλή γραμμικότητα ($R^2 > 0.999$) ενώ εμφανίζει και πολύ καλή επαναληψιμότητα τόσο στους χρόνους συγκράτησης όσο και στον υπολογισμό του εμβαδού.

3.1.2 Προσδιορισμός Ωχρατοξίνης A (OTA) σε επιμολυσμένα δείγματα σίτου σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

Σε δείγματα σίτου και ρυζιού έγιναν επιμολύνσεις με τον μύκητα *Aspergillus Carbonarius* ο οποίος και είναι ο κύριος υπεύθυνος για την παρουσία της OTA στα σιτηρά. Οι φυσικοχημικές παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα είναι η θερμοκρασία και η υγρασία. Έτσι λοιπόν έγινε ανάπτυξη του μύκητα στις θερμοκρασίες 20, 25, 30 και 35 °C, συνήθεις θερμοκρασίες στον ελλαδικό χώρο, σε ενεργότητες σε νερό (a_w) 0,85, 0,90 και 0,98 για διάστημα 10 ημερών. Στην τιμή $a_w = 0,85$ δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη του μύκητα. Για το λόγο αυτό δεν υπήρξε και προσδιορισμός ωχρατοξίνης στην ενεργότητα αυτή.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων, τα οποία έλαβαν χώρα στο εργαστήριο της ΕΛΕΤΟΞ στην Πάτρα, συνοψίζονται στους επόμενους πίνακες.

Πίνακας 3: Επίπεδα ΟΤΑ (ppb) σε δείγματα σίτου επιμολυσμένα με *Aspergillus Carbonarius* σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

θ ($^{\circ}\text{C}$)	aw = 0,90	aw = 0,98
20	nd	270,00
25	5,9	104,00
30	0,92	540,50
35	nd	70,00

Πίνακας 4: Επίπεδα ΟΤΑ (ppb) σε δείγματα ρυζιού επιμολυσμένα με *Aspergillus Carbonarius* σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

θ ($^{\circ}\text{C}$)	aw = 0,90	aw = 0,98
20	nd	27,20
25	nd	13,30
30	nd	7,00
35	nd	0,38

3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

3.2.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης αφλατοξινών σε δημητριακά (cereals) με στιλάκια ανοσοπροσρόφησης aflarprep

1. Ζυγίζουμε 50 g καλά αλεσμένου δείγματος.
2. Προσθέτουμε 4 g χλωριούχου νατρίου σε ένα μπλέντερ χωρητικότητας 1 lt (γυάλινο ή μεταλλικό)
3. Προσθέτουμε 250 ml διαλύματος (HPLC Grade) (μεθανόλη / νερό) (60/40)
4. Καλύπτουμε το μπλέντερ και ανακατεύουμε για 1 λεπτό στη μεγάλη ταχύτητα.
5. Προσθέτουμε 250 ml νερό και αναδεύουμε καλά με μια γυάλινη ράβδο.

6. Αμέσως μετά το ανακάτεμα διηθούμε περίπου 25-50ml από το δείγμα με χαρτί Whatman No4 ή No113 και συλλέγουμε το δείγμα σε ποτήρι ζέσεως.
7. Μεταφέρουμε 10 ml από το διήθημα και το εκλούουμε μέσα από το στηλάκι με ταχύτητα ροής 2-3mL/min ή με την βαρύτητα.
8. Εκπλένεται το στηλάκι με 10 ml PBS (ροή 5mL/min) δύο φορές.
9. Εκλούουμε τις αφλατοξίνες με 1 ml μεθανόλης έχοντας σταθερή ροή 1 σταγόνα ανά δευτερόλεπτο. Κατά τη διάρκεια της έκλουσης ασκούμε πίεση αντίστροφα στη ροή (backflush) 3 τουλάχιστον φορές έτσι ώστε να παραλάβουμε όλη την ποσότητα των αφλατοξινών.
10. Περνούμε 1 ml απιονισμένο νερό και συλλέγουμε το διάλυμα από τις πλύσεις στο φιαλίδιο ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 2mL.
11. Κάνουμε ένεση στο HPLC-FLD.

❖ Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος θα χρησιμοποιούνται ΜΟΝΟ γυάλινα σκεύη.

❖ Όταν αναφέρουμε την χρήση νερού αναφερόμαστε στην χρήση τριπλά απεσταγμένου νερού(3D)

3.2.2 Μελέτη της ακρίβειας και της αξιοπιστίας της μεθόδου.

Προκειμένου να εξεταστεί η αξιοπιστία της μεθόδου που χρησιμοποιείται τόσο για το σύστημα της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (H.P.L.C) όσο και για την διαδικασία της εκχύλισης των αφλατοξινών από τα δείγματα, πρέπει πάντοτε να πραγματοποιείται μεγάλος αριθμός επαναλήψεων με σκοπό να εφαρμοστεί μια στατιστική επεξεργασία των τυχαίων σφαλμάτων των μετρήσεων. Για το σκοπό αυτό προσδιορίζονται πάντοτε η **ακρίβεια (accuracy)** και η **επαναληψιμότητα (precision)** της μεθόδου.

Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα αναφέρονται συνήθως ως αξιοπιστία μιας σειράς μετρήσεων και δεν πρέπει να συγχέονται γιατί εκφράζουν δύο διαφορετικά πράγματα.

Η στατιστική ανάλυση (*t*-test) των μέσων τιμών όλων των παραμέτρων δείχνει κατά πόσο οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ τους, σε όλα τα συστήματα που μελετώνται, είναι στατιστικά σημαντικές σε 0,05 επίπεδο εμπιστοσύνης.

3.2.3 Προσδιορισμός αφλατοξινών σε επιμολυσμένα δείγματα σίτου και ρυζιού σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

Τα αποτελέσματα δίνονται στους Πίνακες 5 & 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Επίπεδα αφλατοξινών σε επιμολυσμένα δείγματα σίτου σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

$\theta / ^\circ\text{C}$	Υγρασία	G2/ppb	G1/ppb	B2/ppb	B1/ppb
25	a=0.90	-	-	-	12.658
30	a=0.90	-	-	10.107	64.964
35	a=0.90	-	-	35.952	309.383
25	a=0.98	-	43.491	249.095	3752.989
25	a=0.98	-	137.988	688.743	8481.147
30	a=0.98	-	428.014	412.452	7015.569
30	a=0.98	-	716.681	937.888	11114.237
35	a=0.98	25.891	-	12.127	135.806
35	a=0.98	23.841	-	8.966	60.776

Πίνακας 6: Επίπεδα αφλατοξινών σε επιμολυσμένα δείγματα ρυζιού σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας

$\theta / ^\circ\text{C}$	Υγρασία	G2/ppb	G1/ppb	B2/ppb	B1/ppb
20	a=0.90	-	-	-	-
25	a=0.90	-	-	-	0,52
30	a=0.90	-	-	-	0,59
35	a=0.90	-	-	-	0,64
20	a=0.98	5,47	29,98	2,85	258,91
25	a=0.98	11,22	29,26	5,81	478,58
30	a=0.98	11,26	46,08	5,55	520,16
35	a=0.98	15,61	49,58	6,46	549,87

Κεφάλαιο 4

4. Προσδιορισμός της επίδρασης οικολογικών παραμέτρων στην ανάπτυξη και στην παραγωγή Ωχρατοξίνης Α σε συνθετικό υπόστρωμα σταφυλιού από τον μύκητα *A. carbonarius*.

4.1 Υλικά και μέθοδοι

4.1.1 Προετοιμασία υποστρώματος

Το υπόστρωμα συνθετικού χυμού σταφυλιού (synthetic grape-juice medium, SGM) έχει την εξής σύνθεση: D(+) γλυκόζη 70g/l, D(-) φρουκτόζη 30g, L(-) τρυγικό οξύ 7g, L(-) μηλικό οξύ 10g, (NH₄)₂HPO₄ 0,67g, KH₂PO₄ 0,67g, MgSO₄•7H₂O 12,5g, NaCl 0,15g, CaCl₂ 0,15g, CuCl₂•2H₂O 0,0019g, FeSO₄•7H₂O 0,021g, ZnSO₄•7H₂O 0,0075g, (+) catechin hydrate 0,05g, agar 25 g/l, σε 1lt απεσταγμένου νερού ³⁷. Το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται στο 3,5 με διάλυμα KOH 2M, ώστε να προσομοιάζει σε αυτό του χυμού σταφυλιών κατά την ωριμότητα. Η δραστηριότητα ύδατος ρυθμίζεται με την προσθήκη ποσότητας γλυκερόλης καθαρότητας 98%. Στην περίπτωση όπου δεν υπήρχε προσθήκη γλυκερόλης η δραστηριότητα ύδατος ήταν 0,980.

4.1.2 Προετοιμασία εμβολίου και εμβολιασμός

Πριν τον εμβολιασμό του στα τρυβλία, το στέλεχος καλλιεργείται σε υπόστρωμα της ανάλογης ενεργότητας νερού. Τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C για 10 ημέρες και ακολούθως τα κονίδια των αποικιών απομακρύνονται με τη βοήθεια διαλύματος απεσταγμένου-αποστειρωμένου νερού με 0,1-0,2% διαβρεχτικό Tween80 (απαραίτητο για την μείωση της διεπιφανειακής τάσης νερού-κονιδίων). Το εναιώρημα κονιδίων, πριν μπει στον συλλέκτη όπου συγκεντρώνεται, περνά από αποστειρωμένη χειρουργική γάζα για την κατακράτηση των συμπαρασυρόντων μυκηλιακών υφών ^{39,32}.

Το εναιώρημα που δημιουργείται με την παραπάνω μέθοδο αραιώνεται με απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό μέχρι δυναμικού 10⁶ σπορίων ml⁻¹. Αμέσως μετά πραγματοποιείται ο εμβολιασμός 5ml εναιωρήματος με μηχανική πιπέτα ακριβείας κεντρικά στο κάθε τρυβλίο. Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε 5000 κονίδια συγκεντρωμένα σε μια διάμετρο 3-4mm στο κέντρο των τρυβλίων ⁴⁰.

4.1.3 Επώαση

Τα υποστρώματα με τις παραπάνω ενεργότητες ύδατος, μετά τον εμβολιασμό τους με το εναιώρημα σπορίων του μύκητα, συσκευάζονται σε ημιδιαπερατούς πλαστικούς περιέκτες και επωάζονται σε επωαστικούς θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας και υγρασίας των 25, 30 και 35°C.

Τα τρυβλία που περιέχουν υποστρώματα της ίδιας ενεργότητας σφραγίζονται σε πλαστικούς περιέκτες μαζί με ένα ποτηράκι ζέσεως το οποίο περιέχει διάλυμα νερού – γλυκερόλης σε τέτοια αναλογία ώστε να έχει την ίδια ενεργότητα ύδατος με το υπόστρωμα. Έτσι επιτυγχάνεται η διατήρηση στο εσωτερικό του κάθε περιέκτη, ατμόσφαιρας με εξισορροπημένη σχετική υγρασία ως προς το υπόστρωμα ^{29,30}.

4.1.4 Μέτρηση ανάπτυξης και ωχρατοξίνης A

Όλες οι περιπτώσεις του πειράματος γίνονται εις τριπλούν. Καθημερινά ελέγχονται δυο κάθετες μεταξύ τους διάμετροι της κάθε αποικίας, από τις οποίες εξάγεται ο μέσος όρος της κατ' ακτίνα αύξησης του μύκητα σε mm, και ανά 5 ημέρες λαμβάνεται δείγμα για την εξαγωγή του δυναμικού παραγωγής OTA ³¹.

Η λήψη του δείγματος για την OTA γίνεται με παραλαβή ενός κυκλικού τεμαχίου (plug) υποστρώματος από το κέντρο της αποικίας, το οποίο αφού ζυγίζεται, τοποθετείται σε φιαλίδιο με 0,5 ml μεθανόλης για 1h. Κατά την παραμονή αυτή εκχειλίζεται η OTA από το τεμάχιο και ακολούθως απομακρύνεται με τη βοήθεια σύριγγας το διάλυμα μεθανόλης-OTA. Το τελευταίο, αφού φιλτραριστεί με φίλτρο Millex®-HV 0,45μm/13mm, ποσότητα 0,1 ml αραιώνεται με 10 ml (εκατοστιαία αραιώση) 50% υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 2% σε μεθανόλη. Από το αραιωμένο δείγμα ποσότητα 100μl εγχέεται στη συσκευή της HPLC ⁴¹.

4.1.5 Παραγωγή Ωχρατοξίνης A

Στην περίπτωση της παραγωγής OTA τα αποτελέσματα δεν είναι αρκετά ξεκάθαρα ώστε να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, κάτι που έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές ^{31,42}. Αρχικά παρατηρήθηκε παραγωγή μόνο στην ενεργότητα ύδατος 0,98 για όλες τις θερμοκρασίες πλην των 35 °C, ενώ μόνο στους 25 °C, όπου η OTA παρουσιάζει μια ξεκάθαρη αύξηση παρατηρήθηκε μικρή παραγωγή για την 0.90 *a_w*. Η μέγιστη τιμή της δεν παρουσιάζεται στην ίδια μέρα επώασης για επαναλήψεις του

ίδιου στελέχους. Τελικά με την πάροδο περισσότερων από 15-20 ημερών επώασης το δυναμικό φαίνεται να μειώνεται για όλες τις περιπτώσεις, γεγονός που συνηγορεί με κάποιες μελέτες που έχουν βγει στην δημοσιότητα και πραγματεύονται την δυνατότητα αποικοδόμησης της OTA από τον ίδιο τον μικροοργανισμό που την παρήγαγε αρχικά ^{47, 43}. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραγωγής OTA κατά την διάρκεια του πειράματος καθώς και μερικά ραβδογράμματα που θα βοηθήσουν στον σχολιασμό και την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Πίνακας 7: Δυναμικό παραγωγής OTA

Ημέρες	θ (°C)	Συγκέντρωση OTA ($\mu\text{g/g}$) ανά a_w		
		0,980	0,900	0,850
5	20	0,03	n.d.	N.G.
15	20	0,65	n.d.	N.G.
25	20	1,20	n.d.	N.G.
30	20	1,11	n.d.	N.G.
5	25	0,04	n.d.	N.G.
10	25	0,39	0,02	N.G.
15	25		0,17	N.G.
5	30	0,17	n.d.	N.G.
10	30	0,02	n.d.	N.G.
5	35	tr.	n.d.	N.G.
10	35	n.d.	n.d.	N.G.

tr. = traces (<0.01 $\mu\text{g/g}$)

n.d. = not detected (LOD 0.005 $\mu\text{g/g}$)

N.G. = Not Growth

Στα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε καθαρά την επίδραση που ασκεί τόσο η θερμοκρασία όσο και η δραστηριότητα ύδατος στην μυκηλιακή αύξηση του *A. carbonarius*. Όπως φαίνεται δεν έχουμε ανάπτυξη στην περίπτωση της a_w 0,85, με εξαίρεση τους 25 °C που στις υψηλές a_w είχαμε μικρή ανάπτυξη. Όταν πλησιάζουμε σε άριστες για την ανάπτυξη a_w ο μύκητας αναπτύσσεται καλά σε όλες τις θερμοκρασίες

ανάπτυξης. Αντίθετα όταν η θερμοκρασία είναι σε άριστα επίπεδα παρατηρούμε ότι ο μύκητας διευρύνει την περιοχή της ανάπτυξης του σε χαμηλότερα επίπεδα a_w . Οι αρχικές αυτές παρατηρήσεις είναι σε συμφωνία με ανάλογες εργασίες για στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού που αναπτύχθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα (SGM). Ενδεικτικά αναφέρεται πως ο Mitchel και συνεργάτες (2004) μελέτησαν την ανάπτυξη και παραγωγή ΟΤΑ σε στελέχη από τον ευρύτερο μεσογειακό χώρο και βρήκαν πως η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην a_w ήταν στις άριστες θερμοκρασίες επώασης ενώ δεν είχαν ανάπτυξη για $\theta < 15^\circ\text{C}$. Σε μια άλλη εργασία του Valero και συνεργατών του (2006) παρατηρούμε πως τα στελέχη του *Asp. carbonarius* που μελετήθηκαν παρουσιάζουν ταχύτερη αύξηση στην περίπτωση a_w - T : $0,92$ – 30°C παρά στην $0,97$ – 20°C ⁴². Φαίνεται καθαρά δηλαδή πως στις άριστες θερμοκρασίες η άριστη a_w μετατοπίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα.

Μπορούμε επίσης με σιγουριά να ορίσουμε ως άριστο συνδυασμό παραγόντων για την ανάπτυξη του μύκητα τους 35°C και δραστηριότητα ύδατος $0,96$ – $0,98$. Οι άριστες τιμές αυτές είναι σε συμφωνία με πολλά δημοσιευμένα δεδομένα από τα οποία αναφέρουμε ενδεικτικά των Parra και Magan (2004). Οι τελευταίοι κατέληξαν σε $a_{w(\text{opt})}$ $0,970$ και $T_{(\text{opt})}$ 33°C για στελέχη *Aspergillus niger*. Ο Mitchel (2004) σε στελέχη *Aspergillus carbonarius* από την ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου βρήκαν $T_{(\text{opt})}$ 30 – 35°C και $a_{w(\text{opt})}$ $0,94$ – $0,98$. Ο A.Valero *et al.* (2006) κατέληξε σε $0,97$ και 30°C αντίστοιχα. Επίσης ανεξάρτητα από την a_w , στις θερμοκρασίες των 25 , 30 & 35°C ο μύκητας έχει σαφώς ταχύτερη ανάπτυξη από ότι στους 20 . Στην a_w των $0,85$ δεν είχαμε ανάπτυξη με ελάχιστες εξαιρέσεις κάποιες επαναλήψεις της περίπτωσης $0,85$ a_w – 25°C .

Φαίνεται επίσης από τα δεδομένα μας ότι οι άριστες συνθήκες παραγωγής ΟΤΑ είναι στους 25°C και στην δραστηριότητα ύδατος $0,980$ αντίστοιχα. Από την βιβλιογραφία βρίσκουμε για διάφορα στελέχη του μικροοργανισμού από τον μεσογειακό χώρο ανάλογες άριστες τιμές. Στελέχη από Ισπανία, Ιταλία, Γαλλία και Πορτογαλία έχουν δώσει άριστες τιμές a_w - T για την παραγωγή ΟΤΑ $0,96$ – 25°C ⁴⁵ και $>0,95$ – 20°C ³⁰ ενώ και οι Mitchel (2004) και Valero και οι ομάδες τους (2006) βρήκαν ο πρώτος $0,95$ – $0,98$ και 15 – 20°C ενώ ο δεύτερος $0,96$ – $0,98$ για επώαση 7 ημερών στους 25°C ^{31,42}. Τέλος, σε μια άλλη εργασία του A. Esteban και συνεργατών του (2006), οι αντίστοιχες άριστες τιμές παραγωγής ΟΤΑ ήταν $0,98$ με το μεγαλύτερο δυναμικό στους 15°C σε σχέση με τους 30°C ⁴⁶. Αξίζει επίσης να γίνει αναφορά ότι οι παραπάνω τιμές σε σχέση με τις άριστες τιμές ανάπτυξης ανήκουν στην υπό-άριστη περιοχή, γεγονός που παρατηρήσαμε και στα δικά μας αποτελέσματα.

Κεφάλαιο 5

5. Προσδιορισμός επιπέδων μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα με φυσική παρουσία του μύκητα

Εμπορικά δείγματα ρυζιού ποικιλιών Grezo και Bianco, στα οποία παρατηρήθηκαν έστω και κάποια ελάχιστα επίπεδα αφλατοξινών, διατηρήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες για διάστημα δέκα (10) ημερών προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην αύξηση των αφλατοξινών. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Επίπεδα αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες με φυσική παρουσία του μύκητα *A. flavus*.

Δείγμα	Θερμοκρασία (°C)	G2 (ppb)	G1 (ppb)	B2 (ppb)	B1 (ppb)
Grezo	20	-	-	0,22	-
	25	-	1,18	0,22	-
	30	-	-	0,23	-
	35	-	-	0,23	-
	20	-	-	-	0,44
	25	-	-	-	0,44
	30	-	-	-	0,46
	35	-	-	-	0,50
Bianco	20	-	-	-	0,26
	25	0,86	-	-	0,26
	30	-	-	-	0,28
	35	-	0,83	-	0,29

Από τα δεδομένα του Πίνακα 8 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας μεταξύ των τιμών από 20 έως 35 °C δεν ήταν ικανή να επιφέρει ουσιαστικές μεταβολές στα επίπεδα των αφλατοξινών. Επιπλέον, δεν παρήχθησαν νέες αφλατοξίνες (π.χ. G1 και G2). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το μεγάλο πρόβλημα της εμφάνισης των μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα προέρχεται κυρίως λόγω της ύπαρξης των αντίστοιχων μυκήτων στην πρώτη ύλη. Τα επίπεδα των

μυκοτοξινών μπορούν να παραμείνουν σταθερά με την αποθήκευση των προϊόντων σε ελεγχόμενες συνθήκες. Το σημείο όπου θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία είναι στον τρόπο καλλιέργειας, έτσι ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη των μυκήτων. Ουσιαστικά, ενισχύεται η άποψη περί αναγκαιότητας εφαρμογής ορθών καλλιεργητικών πρακτικών.

Στη συνέχεια, και εφόσον έχουν πλέον προσδιοριστεί εκείνες οι συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας στις οποίες διαπιστώθηκε ότι αδρανοποιούνται οι μύκητες που παράγουν τις τοξίνες, εφορμάζονται ελεγχόμενες συνθήκες αποθήκευσης της πρώτης ύλης και προσδιορίζονται τα επίπεδα των μυκοτοξινών.

Στον Πίνακα 9 παρατίθενται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την εφαρμογή σωστών πρακτικών αποθήκευσης και επεξεργασίας σε εμπορικά δείγματα.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 9 μπορούμε να εξάγουμε τα εξής συμπεράσματα:

1. Κανένα δείγμα δεν εμφάνισε ανιχνεύσιμα επίπεδα ωχρατοξίνης A.
2. Για τα δείγματα Fancy, Bella και Λαΐς ο χρόνος αποθήκευσης (έως 9 μήνες) δεν επέφερε την εμφάνιση μυκοτοξινών.
3. Για το δείγμα Cladio, η μικρή αύξηση της υγρασίας επέφερε την εμφάνιση ελάχιστων επιπέδων αφλατοξίνης B₂, παρά το γεγονός ότι ήταν αποθηκευμένο σε συνθήκες ελεγχόμενου αερισμού και φωτισμού.
4. Για το δείγμα Grezo, μικρή αύξηση της υγρασίας επέφερε εμφάνιση ελάχιστων επιπέδων αφλατοξίνης B₁. Ωστόσο, η παρατεταμένη παραμονή του ίδιου δείγματος σε ελεγχόμενες συνθήκες δεν οδήγησε στην εμφάνιση αφλατοξινών σε χαμηλότερες τιμές υγρασίας.
5. Το δείγμα Tai Bonnet δεν εμφάνισε αφλατοξίνες παρά τη σχετικά υψηλή υγρασία. Επιπλέον, η διαφοροποίηση του δείγματος αναφορικά με την παρουσία του φλοιού ή όχι δεν τροποποίησε το τελικά αποτέλεσμα.
6. Σε κάθε περίπτωση, τα επίπεδα των αφλατοξινών που ανιχνεύτηκαν είναι πολύ κατώτερα από τα επιτρεπόμενα όρια.

Πίνακας 9: Επίπεδα αφλατοξινών και ωχρατοξινών σε γεωργικά προϊόντα υπό ελεγχόμενες συνθήκες αποθήκευσης

Δείγμα	Υγρασία	Χρόνος Αποθήκευσης	Συνθήκες Αποθήκευσης	Ωχρατοξίνες	Αφλατοξίνες (ppb)
Fancy	<14%	7 μήνες	ΚΣ	BLD	BLD
Fancy	<14%	3 μήνες	ΚΣ	BLD	BLD
Bella	<13%	9 μήνες	ΚΣ	BLD	BLD
Bella	<13%	3 μήνες	ΚΣ	BLD	BLD
Λαίς	<14%	6 μήνες	ΚΣ	BLD	BLD
Λαίς	<14%	3 μήνες	ΚΣ	BLD	BLD
Cladio	12,2%	Φρέσκο	Φρέσκο	BLD	BLD
Cladio	14,8%	Φρέσκο	Σιλό, ελεγχόμενες συνθήκες, αερισμός	BLD	0,22 B2
Grezo	12,8%	Φρέσκο	Φρέσκο	BLD	0,44 B1
Grezo (έμφλοιο)	<12 %	11 μήνες	Σιλό, ελεγχόμενες συνθήκες, αερισμός	BLD	BLD
Tai Bonnet (έμφλοιο)	<12%	11 μήνες	Σιλό, ελεγχόμενες συνθήκες, αερισμός	BLD	BLD
Tai Bonnet	18,3%	Φρέσκο	Σιλό, ελεγχόμενες συνθήκες, αερισμός	BLD	BLD
Σιρόκο	16%	Φρέσκο	ΚΣ	BLD	BLD
Ευρώπα	13%	10 μήνες	ΚΣ, big bag	BLD	BLD
Καρολίνα Σερρών	<14 %	6 μήνες	ΚΣ, big bag, χώρος με λίγο παραπάνω σκόνη	BLD	BLD
Bianko	13%	8 μήνες	ΚΣ, big bag	BLD	0,26 B1
Υποπροϊόντα Ηλεκτρονικού	13%	2 μήνες	ΚΣ	BLD	BLD

BLD; Below limit of detection

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών υγρασίας, θερμοκρασίας, αερισμού και φωτισμού ουσιαστικά εκμηδενίζει τη δυνατότητα εμφάνισης μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα, ανεξάρτητα από το χρόνο αποθήκευσής τους. Ωστόσο, κάθε φορά θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποικιλία (είδος) του προϊόντος προκειμένου να εφαρμόζονται οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσής του.

Επιπλέον, ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται στις γενικότερες συνθήκες υγιεινής στους χώρους του εργοστασίου, καθώς μπορούν να αποτελέσουν εστίες ανάπτυξης μυκήτων. Έτσι, θα πρέπει κατά τη διαχείριση της πρώτης ύλης να προσέχουμε:

- Τη σωστή τοποθέτηση παλετών, σακίων, Big-Bag κλπ στους χώρους των αποθηκών.
- Τη σωστή απόσταση μεταξύ των προϊόντων.
- Την τακτή σωστή καθαριότητα του πατώματος.
- Τη σωστή συμπλήρωση των εντύπων Υγιεινής και Συνθηκών Αποθήκευσης των προϊόντων.
- Τον τακτικό ψεκασμό στο χώρο της αποθήκης.
- Τη σωστή καθαριότητα των φορτηγών μεταφοράς πρώτης ύλης και τελικού προϊόντος.
- Την τακτική απεντόμωση.
- Την τήρηση Fifo στα υλικά συσκευασίας.
- Τον τακτικό ψεκασμό στην αποθήκη, στο χώρο του μύλου γύρω από την ταϊστρα, στο χώρο της τυποποίησης, στο υπόγειο, στο χώρο των κιβωτίων (σιλό) και στον περιβάλλοντα χώρο.
- Στο μέσα χώρο να γίνεται επίσης ψεκασμός με μορφή καπνού.
- Καθημερινά να γίνεται σκούπισμα, ιδιαίτερα σε δύσκολα σημεία, όπως οι σωληνώσεις που δεν καθαρίζονται συστηματικά.
- Οι καλλιεργητές – προμηθευτές να δίνουν lot με τα προϊόντα τους.
- Ο χώρος να αερίζεται καθημερινά και να γίνεται έλεγχος με υγρασιόμετρο
- Γύρω από τις αποθήκες να υπάρχει επίστρωση με χαλίκι για να μη μπαίνει λάσπη από τις βροχές.
- Με κάθε ξεφόρτωμα να γίνεται και αερισμός.

Προληπτικές ενέργειες

Θα ήταν πιο ασφαλές να τηρούνταν αυστηρότερα τα επίπεδα υγρασίας και ο κατάλληλος αερισμός στους χώρους αποθήκευσης των δημητριακών, σε συνδυασμό με την επιμελή απολύμανση χώρων και μηχανημάτων. Είναι γνωστό ότι τα δημητριακά μετά τη συγκομιδή τους αποτελούν ευπαθές προϊόν στους μύκητες τόσο λόγω των σπορίων που φέρουν μαζί από το χωράφι, όσο και λόγω των συνθηκών που μπορούν να

αναπτυχθούν στους χώρους αποθήκευσης. Ως προς τον πρώτο παράγοντα μπορεί να βοηθήσει η προσεκτικότερη συγκομιδή, ώστε να έχουμε το μικρότερο δυνατό ποσοστό κατεστραμμένων κόκκων που αποτελούν ευνοϊκότερο υπόστρωμα από τον άθραυστο κόκκο για τους μύκητες. Επίσης φροντίδα μπορεί να ληφθεί και στην μεταφορά στις αποθήκες, ώστε να μην υπάρχουν επιμολύνσεις. Στην αντιμετώπιση των μεταβολών των συνθηκών αποθήκευσης, πέρα από τη σωστή διατήρηση θερμοκρασίας – υγρασίας – αερισμού, ειδική μέριμνα πρέπει να δοθεί και στην αποφυγή παρουσίας εντόμων και τρωκτικών στους χώρους. Πρώτον, διότι αποτελούν φορείς σπορίων μυκήτων και δεύτερον, διότι με τον μεταβολισμό τους μπορούν να δημιουργήσουν «μικρο-χώρους» μέσα στη μάζα του προϊόντος με συνθήκες πολύ διαφορετικές με αυτές του υπόλοιπου αποθηκευτικού χώρου. Σε αυτά τα σημεία μπορούν να εκβλαστήσουν και να αναπτυχθούν μύκητες με επακόλουθο την μόλυνση με μυκοτοξίνες ακόμα και αν στο σύνολο του προϊόντος αυτά τα σημεία καταλαμβάνουν ελάχιστο ποσοστό.

Κεφάλαιο 6

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Θα μπορούσε να θεωρηθεί απαγορευτική η συντήρηση σίτου και ρυζιού με ενεργότητες ύδατος άνω του 0,800 και 0,850 αντίστοιχα, ακόμα και για σύντομα χρονικά διαστήματα. Όσον αφορά τις θερμοκρασίες, δεν μπορούν να αξιολογηθούν ως ασφαλείς, πρωτίστως λόγω του προβλήματος «ανάφλεξης» που διατρέχει ο σίτος σε αυτές και δευτερεύοντος, διότι υπό την κατάλληλη ενεργότητα η εκβλάστηση είναι δυνατή σε όλο το θερμοκρασιακό εύρος. Το γεγονός ότι και στα δυο δημητριακά ο κυρίαρχος παράγοντας επίδρασης στους μύκητες είναι η ενεργότητα ύδατος μας υποχρεώνει να καθορίσουμε με βάση αυτόν την στρατηγική πρόληψης.

2. Όπως φαίνεται δεν έχουμε ανάπτυξη στην περίπτωση της a_w 0,85, με εξαίρεση τους 25 °C που στις υψηλές a_w είχαμε μικρή ανάπτυξη. Όταν πλησιάζουμε σε άριστες για την ανάπτυξη a_w , ο μύκητας αναπτύσσεται καλά σε όλες τις θερμοκρασίες ανάπτυξης. Αντίθετα όταν η θερμοκρασία είναι σε άριστα επίπεδα παρατηρούμε ότι ο μύκητας διευρύνει την περιοχή της ανάπτυξης του σε χαμηλότερα επίπεδα a_w . Οι αρχικές αυτές παρατηρήσεις είναι σε συμφωνία με ανάλογες εργασίες για στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού που αναπτύχθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα.

3. Μπορούμε επίσης με σιγουριά να ορίσουμε ως άριστο συνδυασμό παραγόντων για την ανάπτυξη του μύκητα τους 35°C και δραστηριότητα ύδατος 0,96 – 0,98. Οι άριστες συνθήκες παραγωγής ΟΤΑ είναι στους 25°C και στη δραστηριότητα ύδατος 0,980 αντίστοιχα.

4. Η μεταβολή της θερμοκρασίας αποθήκευσης προϊόντων με φυσική παρουσία του μύκητα μεταξύ των τιμών από 20 έως 35 °C δεν ήταν ικανή να επιφέρει ουσιαστικές μεταβολές στα επίπεδα των αφλατοξινών. Επιπλέον, δεν παρήχθησαν νέες αφλατοξίνες (π.χ. G1 και G2). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το μεγάλο πρόβλημα της εμφάνισης των μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα προέρχεται κυρίως λόγω της ύπαρξης των αντίστοιχων μυκήτων στην πρώτη ύλη. Τα επίπεδα των μυκοτοξινών μπορούν να παραμείνουν σταθερά με την αποθήκευση των προϊόντων σε

ελεγχόμενες συνθήκες. Το σημείο όπου θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία είναι στον τρόπο καλλιέργειας, έτσι ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη των μυκήτων. Ουσιαστικά, ενισχύεται η άποψη περί αναγκαιότητας εφαρμογής ορθών καλλιεργητικών πρακτικών.

5. Η εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών υγρασίας, θερμοκρασίας, αερισμού και φωτισμού ουσιαστικά εκμηδενίζει τη δυνατότητα εμφάνισης μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα, ανεξάρτητα από το χρόνο αποθήκευσής τους. Ωστόσο, κάθε φορά θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ποικιλία (είδος) του προϊόντος προκειμένου να εφαρμόζονται οι κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσής του.

Βιβλιογραφία

1. Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M, Diseases Caused by Molds in Humans. *Buletin of the World Health Organization*, **1999**
2. Miller J.D., Trenholm H.L., Mycotoxins in Grain, Compounds Other Than Aflatoxin, Aegen Press, U.S.A., **1994**, p.3
3. Bennet J.W., Klich M., Mycotoxins Clm, Microb. Rev. **2003**, 16. 497-516
4. "Grain Fungal Diseases & Microtoxins Reference" GIPSA Technical Services Division, Kansas, **1999**
5. Calvo A. M., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.P., Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development, *Microb. Mol. Biol Rev.* **2002**, 66, 447-459
6. Blackwell B.A., Savard M.E., Mycotoxins Natural Products of Agriculture Importance, *Can Chem. News* **2000**, 15-17
7. Kotsonis F.N., Burdock G.A., Flamm W.G., Food toxicology In Casarett & Duoll's toxicology, the basic science of poisons. C.D. Klaassen, New York, **1996**
8. Pazoutova S., The Evolution Strategy of Claviceps, White J.F., Bacon C.W., Hywel-Jones N.L. (Eds) Marcel Dekker, New York, **2002**, pp 329-345
9. European Mycotoxins Awareness Network (EMAN) <http://www.lfra.co.uk/eman2/factsheet.asp>
10. Cole R.J., Cox R.H., Handbook of toxic fungal metabolites Academic Press, New York, **1981**
11. Bauer J., Schneweiss I., Meyer K., Roquefortine C and mycophenolic acid in silages, significance for animal health, *Hungar, Vet. J.* **2001**, 123, 679-685
12. Allison A.C., Eugui E.M., Mycophenolate mofetil and its mechanism of action *Immatopharmacology* **2000**, 47, 85-118
13. Mele T., Halloran P.F., The use of mycophenolate mofelit in transplant recipients, *Immatopharmacology* **2000**, 47, 215-245
14. D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C., Mycotoxins, An. Feed Sc. Tech. **1997**, 69, 155-166
15. Atroshi F., Rizzo A., Westermack T., Ali-Vehmas T., Antioxidant nutrients and mycotoxins, *Toxicology* **2002**, 180, 151-167
16. International Agency for Research on Cancer (IRAC) <http://www.iarc.fr>

17. Eriksen G.S., Pettersson H., Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *An. Feed Sc. Tech.* **2004**, 114, 205-239
18. Sinha K.K., Bhatnagar D., Mycotoxins in agriculture and food safety. Marcel Dekker INC, New York, **1998**, p.90
19. Murnagham M.F., The Pharmacology of penicillic acid *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1946**, 88, 119-132
20. Nesheim S., Analysis of ochratoxin A and B and their esters in barley using partition and thin-layer chromatography II Collaborative study *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1973**, 56, 822-826
21. Pons W.A., Lee L.S., Stoloff L. Revised method for aflatoxins in cottonseed products and comparison of thin layer and high performance liquid chromatography determinative steps Collaborative study *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1980**, 63, 899-906
22. Scott P.M., Lombaert G. A., Pellaers P., Application of capillary gas chromatography to a survey of wheat for five trichothecenes *Food, Add Concur* **1989**, 6, 489-495
23. Cappielli A., Famglini G., Tirillini B., Determination of aflatoxins in peanut meal by LC/MS with particle-beam interface, *Chromatographia* **1995**, 40, 411-416
24. Chu F.S., Immunoassays for mycotoxins current state of art. Commercial and epidemiological applications, *Vet. Hum. Toxicol*, **1990**, 32, 42-50
25. Ratcliff J., The role of mycotoxins in food and feed safety, AFMA symposium on "The role of animal feed in food safety", **2002**
26. Cilbert J., Anklam F., Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs, *Tren. Anal. Chem.* **2002**, 21, 468-486
27. Stefanaki L., Foufa E., Tsatsoup-Dritsa A., Dais P., Ocharoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits *Food, Add Contam* **2003**, 20, 74-83
28. Andrews, S., Pardoel, D., Harun, A. and Treloar, T. (1997). Chlorine inactivation of fungal spores on cereal grains. *Inter. J. Food Micro.* **(35)**, 153-162.
29. Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F. and Debevere, J. M. (2005). Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology* **105**, 35-52.

30. Pardo, E., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology* **95**, 79-88.
31. 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. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 439-445.
32. Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn, London: Blackie Academic and Professional, London, UK.
33. Pitt, J. I. and Mischamble, B.F. (1994). Water Relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Protect.* **58**(1), 86-90.
34. Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. and Filtenborg, O. (2000). *Introduction to food- and airborne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
35. Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. and Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *Inter. J. Food Microbiol.* **113**, 330-338.
36. Magan, N. and Olsen, M. (Eds) (2004). *Mycotoxins in food. Detection and control*, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, U.K.
37. Tassou, C. C., Natskoulis, P. I., Panagou, E. Z., Spiropoulos, A. E. and Magan, N. (2007). Impact of water activity and temperature on growth and Ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. *J. Food Protect.* **70**(12), 2884-2888.
38. Parra, R., and Magan, N., 2004, Modelling the combined effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds, *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 429-438.
39. Parra, R., Aldred, D., Archer, D.B. and Magan, N., 2004, Water activity, solute and temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 232-237.
40. Cairns-Fuller, V., Aldred, D. and Magan N., 2005, Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1215-1221

41. Bragulat, M.R., Abarca, M.L. and Cabanes, F.J., 2001, An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture, *International Journal of Food Microbiology* **71**, 139–144.
42. Valero, A., R. Farré, J., Sanchis, V., Ramos, A.J. and Marín, S., 2006, Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures, *Food Microbiology* **23**, 753–756.
43. Varga, J., Rigo, K. and Teren., J., 2000, Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species, *International Journal of Food Microbiology*, **59**, 1–7.
44. Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. and Marín, S., 2004, Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes, *Letters in Applied Microbiology*, **38**, 72–77.
45. Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V. and Marín, S., 2005, *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors, *Journal of Applied Microbiology*, **98**, 839–844.
46. Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. and Cabanes, F.J., 2006, Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*, *Food Microbiology*, **23**, 634–640.
47. Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrini, A., 2006, Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes : a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts, *FEMS Microbiology Letters*, **255**, 203–208.