



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΩΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

Φοιτητής: Νικολός Άγγελος Α.Μ. : 15909

Επιβλέπων: Ελευθέριος Μπόνος DVM, PhD
Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΡΤΑ ΜΑΙΟΣ 2022

**THE PROBLEM OF MYCOTOXINS IN THE NUTRITION OF
PRODUCTIVE ANIMALS**

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

ΑΡΤΑ, ΜΑΪΟΣ 2022

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπων καθηγητής

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ ΜΠΟΝΟΣ

2. Μέλος επιτροπής

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΓΚΟΥΒΑ,

3. Μέλος επιτροπής

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΜΑΓΚΛΑΡΑΣ

© Νικόλος, Άγγελος, 2022.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Δήλωση μη λογοκλοπής

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του Ν. 2121/1993 περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι η παρούσα εργασία είναι εξ ολοκλήρου αποτέλεσμα δικής μου ερευνητικής εργασίας, δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) για τη συγγραφή της περιλαμβάνονται στη βιβλιογραφία.

Νικολός Άγγελος

Υπογραφή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Από το σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ελευθέριο Μπόνο για την πολύτιμη βοήθειά του τόσο κατά τη συλλογή των δεδομένων της πτυχιακής μελέτης, όσο και κατά τη βιβλιογραφική εκπόνησή της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μυκοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων που αναπτύσσονται στα τρόφιμα και εμφανίζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των τοξικών ιδιοτήτων τους. Η αφλατοξίνη Β1 (AFB1) και η ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ) έχουν καρκινογόνες, τερατογόνες, ανοσοτοξικές και ενδεχομένως νευροτοξικές ιδιότητες. Η AFB1 χαρακτηρίζεται ως η πιο επικίνδυνη φυσικώς παραγόμενη χημική ένωση, ενώ η ΩΤΑ έχει συνδεθεί με την εμφάνιση νεφροπάθειας στους ανθρώπους.

Σε ευρωπαϊκό αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν οριστεί ανώτατα όρια και κανονισμοί για την επιτρεπόμενη ποσότητα τους. Ωστόσο παραμένει ένα θέμα που ανησυχεί την δημόσια υγεία έχοντας επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων. Στην παρούσα εργασία γίνεται εκτενής αναφορά στις επιπτώσεις, στους τρόπους αντιμετώπισης καθώς και στους τρόπους ανίχνευσης αφλατοξινών.

Η εργασία αυτή ασχολείται με το πρόβλημα της παρουσίας των αφλατοξινών και την ισχύουσα νομοθεσία.

Στο πρώτο μέρος, γίνεται αναφορά στον τρόπο παραγωγής των αφλατοξινών, τους μύκητες που τις παράγουν, τις συνθήκες κάτω από τις οποίες ευνοείται η ανάπτυξή τους, τις χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών και την τοξικότητά τους στους ανθρώπους και στα ζώα. Επίσης αναφέρονται τρόποι αντιμετώπισης και αποτοξίνωσης από τις αφλατοξίνες.

Το δεύτερο μέρος, ασχολείται με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Παρουσιάζονται οι νόμοι που έχει θεσπίσει η Ε.Ε. μέχρι σήμερα για την ασφάλεια των τροφίμων και κατά συνέπεια για την προστασία των καταναλωτών.

Παρουσιάζονται επίσης πίνακες με τα μέγιστα επιτρεπτά όρια παρουσίας της αφλατοξίνης σε διάφορα αγαθά, ανά κράτος παγκοσμίως.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi that grow in food and are of great research interest due to their toxic properties. Aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) have carcinogenic, teratogenic, immunotoxic and potentially neurotoxic properties. AFB1 is characterized as the most dangerous naturally occurring chemical compound, while OTA has been linked to the development of kidney disease in humans.

At European and global level, ceilings and regulations have been set for their allowed quantity. However, it remains an issue of public health concern with detrimental effects on animal and human health. In the present work, extensive reference is made to the effects, the ways of treatment as well as the ways of detecting aflatoxins.

This work deals with the problem of the presence of aflatoxins and current legislation.

In the first part, reference is made to the production of aflatoxins, the fungi that produce them, the conditions under which their growth is favored, the chemical properties of aflatoxins and their toxicity to humans and animals. Ways of treatment and detoxification from aflatoxins are also mentioned.

The second part deals with European legislation. The laws adopted by the EU are presented. to date for food safety and therefore for consumer protection.

There are also tables with the maximum permissible levels of aflatoxin in various goods, per country worldwide.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ/ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	13
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	13
1.2 Ορολογία.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	17
2.1 Φυτικά προϊόντα επιμολυσμένα με φυτοτοξίνες.....	17
2.2 Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών.....	17
2.3 Κυριότερα γένη μυκήτων.....	19
2.4 Κυριότερες κατηγορίες μυκοτοξινών.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ.....	34
3.1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΚΩΣΗ.....	35
3.2 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ.....	37
3.3 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1	39
3.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΩΣΗ.....	40
3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ.....	41
3.5.1 Επιδράσεις των αφλατοξινών στο αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού ζώου.....	42
3.5.2 Επιδράσεις των αφλατοξινών στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού ζώου.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	44
4.1 Φυσικοί.....	44

4.2 Βιολογικοί.....	45
4.3 Χημικοί.....	48
4.4 Ζεόλιθος.....	49
4.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΛΑ.....	50
4.5.1 Μπεντονίτης.....	50
4.5.2 Προβιοτικά.....	50
4.5.3 Ενεργός άνθρακας.....	51
4.5.4 Φυτικά εκχυλίσματα.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	52
5.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	52
5.1.1 Άμεση ELISA.....	52
5.1.2 Έμμεση ELISA.....	53
5.1.3 Sandwich ELISA.....	54
5.1.4 Ανταγωνιστική ELISA	55
5.1.5 Έμμεση ανταγωνιστική ELISA.....	56
5.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ELISA.....	56
5.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC).....	58
5.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC).	58
5.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ LC-MS / MS.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....	60
6.1. : Ευρωπαϊκή νομοθεσία	60
6.2 Παγκόσμια νομοθεσία.....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1. Παραγόμενες μυκοτοξίνες από διάφορα είδη μυκήτων αρ. σελίδας 20

Πίνακας 2.2. Ουσίες μυκήτων που προκαλούν .αρ. σελίδας 21 .

Πίνακας 2.3. Αναφορά ορισμένων σημαντικών μυκοτοξινών και μυκήτων όπου παράγονται. αρ. σελίδας 32 .

Πίνακας 3.1. Τοξικότητα ορισμένων μυκοτοξινών σε διάφορα βιολογικά συστήματα αρ. σελίδας 38 .

Πίνακας 6.1. Επιτρεπόμενα όρια αφλατοξινών σε διάφορες χώρες . αρ. σελίδας 60 .

Πίνακας 6.2. Όρια μυκοτοξινών αρ. σελίδας 61 .

Πίνακας 6.3. Ποσοτικά όρια μυκοτοξινών αρ. σελίδας 62.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ/ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Μύκητες αρ. σελίδας 13 .

Εικόνα 1.2. Μυκήλιο αρ. σελίδας 13 .

Εικόνα 1.3. Σπόριο. αρ. σελίδας 14 .

Εικόνα 2.1 Προσβολή πορτοκαλιού από τους μύκητες *Penicillium italicum* και *P. Digitatum* αρ. σελίδας 17 .

Εικόνα 2.2. Φυτό σίκαλης προσβεβλημένο από μυκοτοξίνες αρ. σελίδας 17 .

Σχήμα 2.1. Ο στερεοχημικός τύπος των αφλατοξινών B1, B2, g1, G2 και M1 αρ. σελίδας 22 .

Σχήμα 2.2. Ο στερεοχημικός τύπος ωχρατοξίνης A (OTA) αρ. σελίδας 23 .

Εικόνα 2.3. Ωχρατοξίνες αρ. σελίδας 24 .

Σχήμα 2.3. Στερεοχημικός τύπος των τριχοθηκενίων αρ. σελίδας 25 .

Εικόνα 2.4. Τριχοθυκένια αρ. σελίδας 26 .

Σχήμα 2.4. Στερεοχημικός τύπος της δεοξυनिβαλενόνης αρ. σελίδας 27 .

Σχήμα 2.5. Ο στερεοχημικός τύπος της ζεαραλενόνης. αρ. σελίδας 27 .

Σχήμα 2.6. Ο στερεοχημικός τύπος στεριγματοκυστίνης αρ. σελίδας 28 .

Σχήμα 2.7. Οι στερεοχημικοί τύποι των φουμιτρεμογόνη A, πασπαλιτρέμη A, πενιτρέμης A και θρυπτοκουβαλίνη A. αρ. σελίδας 29 .

Σχήμα 2.8. Ο στερεοχημικός τύπος ρουμπρατοξίνης B. αρ. σελίδας 29 .

Σχήμα 2.9. Ο στερεοχημικός τύπος της πατουλίνης. αρ. σελίδας 30 .

Σχήμα 2.10. Ο στερεοχημικός τύπος μυκοφαινολικού οξέος. αρ. σελίδας 30 .

Σχήμα 2.11. Ο στερεοχημικός τύπος της κιτρινίνης. αρ. σελίδας 31 .

Εικόνα 3.1. Πάσχων από εργοτισμός. αρ. σελίδας 33 .

Εικόνα 3.2. Αγέλαδα προσβεβλημένη από μυκοτοξίνες αρ. σελίδας 34 .

Σχήμα 3.1. Αναπαράσταση αφλατοξινών αρ. σελίδας 36 .

Εικόνα 5.1. Άμεση ELISA αρ. σελίδας 50 .

Εικόνα 5.2. Έμμεση ELISA αρ. σελίδας 51 .

Εικόνα 5.3. Sandwich ELISA αρ. σελίδας 52 .

Εικόνα 5.4.: Ανταγωνιστική ELISA αρ. σελίδας 52.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.1 Ιστορική αναδρομή.

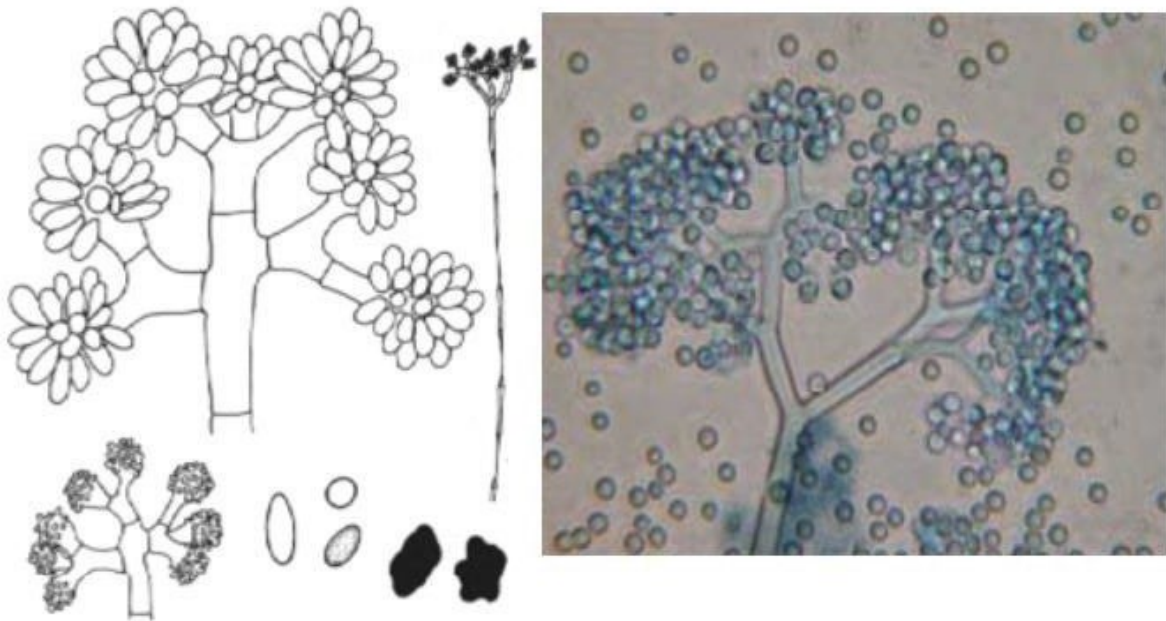
Η παθογόνος ικανότητα ορισμένων μυκήτων στα φυτά αλλά και στα προϊόντα τους έχει παρατηρηθεί από την αρχή της γεωργίας. Αναφέρεται, ότι πολλές από τις μύκητες της κεντρικής Ευρώπης έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση ψημένου ψωμιού από μουχλιασμένα σιτηρά. Η πρώτη αναφορά τους στη βιβλιογραφία γίνεται στη δεκαετία του 1960, όπου στη Μεγάλη Βρετανία πέθαναν πάνω από εκατό χιλιάδες γαλοπούλες από άγνωστη, τότε, αιτία και παρέμεινε το περιστατικό στην ιστορία ως «Turkey-X disease» (Miller J.D. & Trenholm H.L., 1994). Μεταγενέστερα, εντοπίστηκε η αιτία της θνησιμότητας των εν λόγω πτηνών, που ήταν η κατανάλωση φιστικιών που εισήχθησαν από την Βόρεια Αμερική και την Αφρική τα οποία περιείχαν δευτερογενείς μεταβολίτες του μύκητα *Aspergillus flavus*. Αυτό το συμβάν έβαλε σε σκέψεις τους επιστήμονες, ότι πιθανόν να υπάρχουν δύσκολα ανιχνεύσιμοι μεταβολίτες οι οποίοι να προέρχονται από κάποιο είδος μούχλας, που τελικά μπορεί να προκαλέσουν ακόμα και θάνατο. Έτσι, οι επιστήμονες επινόησαν τον όρο μυκοτοξίνη, για να περιγράψουν αυτή την τοξική συμπεριφορά που παρατηρήθηκε για αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Σύντομα η κατηγορία των μυκοτοξινών συμπεριέλαβε πλήθος από ήδη γνωστές τοξίνες που προέρχονταν από μύκητες (ερισυβώδη αλκαλοειδή, ergot alkaloids), καθώς και κάποιες ενώσεις που αρχικά είχαν απομονωθεί ως αντιβιοτικά (π.χ. πατουλίνη), καθώς ακόμα και ένα πλήθος από καινούριους, για εκείνη την εποχή, δευτερογενείς μεταβολίτες (π.χ. ωχρατοξίνη Α). Από την δεκαετία 1960 και 1970, παρατηρήθηκε μία εντατική έρευνα γύρω από τη μελέτη των μυκοτοξινών. Συνολικά έχουν βρεθεί σήμερα 300 έως 400 ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως μυκοτοξίνες, εκ των οποίων οι 20 από αυτές έχει αποδειχθεί ότι απαντώνται στις τροφές σε συχνότητα και σε επίπεδα τέτοια, ώστε να θεωρούνται απειλή για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων (Bennett J.W, & Klich M., 2003).

Οι μύκητες είναι οργανισμοί οι οποίοι δεν έχουν χλωροφύλλη. Εμφανίζονται ως απλοί μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι σχηματίζουν διαφόρων ειδών καρποφορίες. Κατά την ανάπτυξή τους, παράγουν ένα ευρύ φάσμα φυσικών βιοδραστικών προϊόντων, τους μεταβολίτες. Ορισμένοι από τους μεταβολίτες τους, είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο, όπως οι μυκοτοξίνες, ενώ άλλοι είναι επικερδείς όπως τα αντιβιοτικά (Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W. & Keller N.P., 2002).



Εικόνα 1.1. Μύκητες

https://www.google.com/search?q=%CE%BC%CF%85%CE%BA%CE%B7%CF%84%CE%B5%CF%82+%CF%83%CF%84%CE%BF+%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CF%81%CE%BF%CF%83%CE%BA%CE%BF%CF%80%CE%B9%CE%BF&rlz=1C1GCEA_enGR831GR831&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjEl7TX7YTjAhUQZVAKHbw8B_oQ_AUIECgB&biw=1366&bih=608#imgcr=fwyWSMlm3xv-



Εικόνα 1.2. Μυκήλιο

https://www.google.com/search?q=%CE%BC%CF%85%CE%BA%CE%AE%CE%BB%CE%B9%CE%BF&rlz=1C1GCEA_enGR831GR831&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj-0cC9o7PgAhWImLQKHew9Dd0Q_AUIDigB&biw=1366&bih=608#imgcr=T5AzoRhW F0RDM:



Εικόνα 1.3. Σπόριο.

https://eclass.teicrete.gr/modules/document/file.php/GF107/%CE%95RGASTIRIO.2_ATE LEIS.pdf

1.2 Ορολογία.

Η λέξη μυκοτοξίνη είναι σύνθετη που προέρχεται από τον όρο «μυκο» που σημαίνει μια ουσία που παράγεται από τους μύκητες και ο όρος «τοξίνη» που σημαίνει δηλητήριο. Οι μυκοτοξίνες είναι μικρού μοριακού βάρους προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού μυκοτοξικογόνων μυκήτων οι οποίες παράγονται από την ανάπτυξη μυκήτων είτε στο φυτό είτε σε αποθηκευμένους καρπούς τροφές και ζωοτροφές που έχουν ως βάση τα δημητριακά και τους ελαιούχους σπόρους. Οι μυκοτοξίνες ονομάζονται, «δευτερογενείς μεταβολίτες», γιατί δεν είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική, βιοχημική και αναπαραγωγική δραστηριότητα του κυττάρου. Παράγονται κατά τον κυτταρικό κύκλο από πρόδρομες ενώσεις, που προέρχονται από τον πρωτογενή μεταβολισμό. Ωστόσο, είναι αρκετά γνωστός ο τρόπος με τον οποίο παράγονται κατά τη διάρκεια της σταθερής φάσης, της ανάπτυξης του μύκητα ή υπό συνθήκες καταπόνησης (στρες / stress) (Blackwell B.A. & Savard M.E., 2000).

Μεγάλο ρόλο για την ανάπτυξη των μυκοτοξινών παίζει το κλίμα, συνεπώς η συγκέντρωσή τους δεν είναι χρονικά σταθερή. Έχει παρατηρηθεί ότι η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται όταν ο καρπός υφίσταται στρες 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. Όλες αυτές οι συνθήκες προκαλούν αδυναμία στον καρπό και δίνουν την ευκαιρία στους σπόρους του μύκητα να τον προσβάσουν. Κατόπιν έρευνας που έχει γίνει, η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται επίσης όταν η αποθήκευση των καρπών γίνεται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας (Καλογερίας, 2010).

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 από τους οποίους προέρχονται. Οι γιατροί τις κατατάσσουν με γνώμονα το όργανο το οποίο προσβάλλουν (Καλογερίας, 2010). Έτσι, οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ηπατοτοξικές νεφροτοξικές νευροτοξικές, ανοσοτοξικές 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, οι βιοχημικοί με βάση τη αποσυνθετική προέλευση τους και οι μυκητολόγοι με βάση τους μύκητες από τους οποίους προέρχονται. Η αφλατοξίνη για παράδειγμα είναι ηπατοτοξική ικανή να προκαλέσει μετάλλαξη και καρκινογένεση. Περιέχει δυο φουράνια προέρχεται από πολυκετίδιο, και παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus*. (Καλογερίας, 2010).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, η περιγραφή μιας και μόνο μυκοτοξίνης περιλαμβάνει εκτεταμένη ορολογία δεδομένου ότι, πολλοί ερευνητές από διαφορετικές ειδικότητες παρατηρούν και εμπλουτίζουν την γνώση πάνω σε αυτές τις φυσικά απαντώμενες τοξίνες. Η ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τις μυκοτοξίνες περιλαμβάνει τρεις κύριες κατευθύνσεις: την μυκητολογία, τη χημεία των μυκοτοξινών και την τοξικολογία. Η μυκητολογία περιλαμβάνει την ταξινόμηση των μυκήτων, καθώς και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που ακολουθούνται για την δημιουργία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Η χημεία των μυκοτοξινών είναι ουσιαστικά οι μέθοδοι και οι διαθέσιμες τεχνικές που υπάρχουν για την ταυτοποίηση 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 από παθολογικά συμπτώματα (Καλογερίας, 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

2.1 Φυτικά προϊόντα επιμολυσμένα με φυτοτοξίνες.

Πάνω από το 20% των τροφίμων είναι δυνατόν να επιμολυνθούν με μυκοτοξίνες, με κυριότερα είδη τα δημητριακά, τους ξηρούς καρπούς, τα αποξηραμένα φρούτα, τον καφέ, τα μπαχαρικά, τα σπορέλαια, τον αρακά, τα φασόλια, και τα φρούτα. Μυκοτοξίνες μπορούν να υπάρξουν στο κρασί και στην μύρα, ακόμη και σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως το γάλα, το τυρί, το αυγό και οφείλονται στην κατανάλωση από τα ζώα επιμολυσμένων ζωοτροφών. Εμφανίζονται επίσης σε ζωοτροφές που έχουν σα βάση τα δημητριακά και τους ελαιούχους σπόρους. Οι μυκοτοξίνες μπορούν να εμφανιστούν στα τρόφιμα ως αποτέλεσμα της μυκητολογικής μόλυνσής τους κατά τη συγκομιδή, παραδείγματος χάριν ασθένειες που οφείλονται στους μύκητες του γένους *Fusarium* στα δημητριακά, ή να μολυνθούν κατά την αποθήκευση των αγροτικών προϊόντων. (Πετρωτός, 2010).

2.2 Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών.

Η ανάπτυξη και παραγωγή των μυκοτοξινών μπορεί να πραγματοποιηθεί στη διάρκεια της καλλιέργειας του φυτού και συνήθως σχετίζεται με τη μη τάχιστα αποξηήρανση του φυτικού οργάνου ή αποθήκευσης σε συνθήκες, που ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων (Εικόνα 2.1). Ειδικότερα αυτοί οι παράγοντες είναι οι εξής:

- θερμοκρασία (7,5-40°C)
- υγρασία (>80% σχετική υγρασία)
- φως (μεγαλύτερη παραγωγή σε συνθήκες σκότους)
- pH (ιδανικό: 4-4,6)
- υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα 'φυτικής προέλευσης)
- παρουσία μυκοστατικών ουσιών (NaCl, σορβικό οξύ, καφεΐνη, θεοφυλλίνη, κ.ά.).

(Πετρωτός, 2010).



Εικόνα 2.1 Προσβολή πορτοκαλιού από τους μύκητες *Penicillium italicum* και *P. Digitatum* (http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_penicillin.htm)



Εικόνα 2.2. Φυτό σίκαλης προσβεβλημένο από μυκοτοξίνες

https://www.google.com/search?q=%CE%BC%CF%8C%CE%BB%CF%85%CE%BD%CF%83%CE%B7+%CF%84%CE%B7%CF%82+%CF%83%CE%AF%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%B7%CF%82+%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%AC+%CE%BA%CE%B1%CE%B9+%CE%AC%CE%BB%CE%BB%CF%89%CE%BD+%CF%83%CE%B9%CF%84%CE%B7%CF%81%CF%8E%CE%BD+%CE%BC%CE%B5+Claviceps+purpurea&rlz=1C1GCEA_enGR831GR831&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiEm9PI6eviAhWFfFAKHVhUCxUQ_AUIECgB&biw=1366&bih=657#imgre=Dz0-CzNcJuolgm

2.3 Κυριότερα γένη μυκήτων.

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί, μη φωτοσυνθετικοί οργανισμοί και ανήκουν σε ξεχωριστό Βασίλειο, το Βασίλειο των μυκήτων. Βρίσκονται παντού στη φύση. Υπάρχουν πολλές χιλιάδες είδη, ενώ πάνω από 500 έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις. Χωρίζονται σε παρασιτικούς (λοιμογόνους) και σαπροφυτικούς (μη παθογόνους). Οι μύκητες μπορεί να παράγουν αντιβιοτικά. Υπάρχουν τέλος μύκητες τοξινογόνοι των οποίων οι τοξίνες προκαλούν μεγάλες ζημιές στα ζώα αλλά ίσως και στον άνθρωπο όταν καταναλώνονται μέσω της τροφής (Γεωργακάς 2013).

Τοξίνες του γένους *Fusarium*

Τα είδη που παράγονται από τις τοξίνες του γένους αυτού, είναι παθογόνα των φυτών και η ανάπτυξη τους πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Μολύνουν καρπούς δημητριακών, ελαιούχους σπόρους και μπιζέλια. Το γένος *Fusarium* παράγει τις περισσότερες μυκοτοξίνες σε σχέση με τα άλλα γένη μυκήτων. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες αυτού του γένους είναι: οι φουμονισίνες, τα τριχοθεκένια, η ζεαρελενόνη, κ.α. (Γεωργακάς 2013).

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 χαρακτηριστεί ως υπεύθυνοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι πιο γνωστές από τις μυκοτοξίνες του γένους *Penicillium* είναι: οι ωχρατοξίνες A, B, C, η κιτρεοβριδίνη, η κιτρινίνη, το κυκλοπιαζονικό οξύ, η πατουλίνη, οι ρουμπρατοξίνες A, B και το πενικιλλικό οξύ (Γεωργακάς 2013).

Τοξίνες του γένους *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* βρίσκεται σε πολλές περιοχές του κόσμου, ιδιαίτερα σε περιοχές με τροπικό κλίμα. Περιλαμβάνει περισσότερα από εκατό γνωστά είδη μυκήτων, πολλοί από τους οποίους είναι υπαίτιοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες αυτού του γένους με τη μεγαλύτερη σημασία είναι: η αφλατοξίνη B1, η ωχρατοξίνη A, η κιτρινίνη και η πατουλίνη. Αν και έχει αποδειχτεί 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. ωφέλιμες εφαρμογές, όπως η παραγωγή αφεψημάτων. (Γεωργακάς 2013).

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 γένος περιλαμβάνει πολλά αλκαλοειδή παράγωγα του λυσεργικού οξέος, καθώς και την εργοκριπτίνη, εργοταμίνη, εργοσίνη και εργονοβίνη (Γεωργακάς 2013).

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 αποθήκευση τους σε ψυγεία. Περιλαμβάνουν τις τοξίνες: αλτερναριόλη, αλτενουένιο, τενουαζονικό οξύ και τις αλτερτοξίνες I, II. (Γεωργακάς 2013).

2.4 Κυριότερες κατηγορίες μυκοτοξινών.

Οι μυκοτοξίνες είναι οργανικές χημικές ουσίες, αλειφατικές ή κυκλικές, απλής σχετικά δομής με σχετικά απλό αριθμό ατόμων άνθρακα και χαμηλού μοριακού βάρους με παρόμοιες μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Είναι εξαιρετικά επικίνδυνες ενώσεις, που παραμένουν δραστικές για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, επειδή πολλές από αυτές είναι θερμοανθεκτικές, δεν καταστρέφονται σε συνήθεις συνθήκες θερμικής κατεργασίας τροφίμων. Οι συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών οι οποίες είναι σημαντικές για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων, μετριοούνται συνήθως σε mg/Kg τροφής (ppb). Οι μυκοτοξίνες, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναπτύξεως ορισμένων μυκήτων, είτε απεκκρίνονται μέσα στο υλικό που αναπτύσσεται ο μύκητας, είτε κατακρατούνται στο εσωτερικό του κυττάρου των μυκήτων και ελευθερώνονται μετά τη θραύση του μυκηλίου (Πετρωτός, 2010).

Οι μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές αφενός επιφέρουν σημαντικές οικονομικές απώλειες στις γεωργοκτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις και αφετέρου προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία επειδή τα ζώα που καταναλώνουν μολυσμένες με μυκοτοξίνες τροφές αφήνουν κατάλοιπα αυτών των τοξινών στα παραγόμενα ζωικά προϊόντα. Οι μύκητες προσβάλλουν το φυτικό υπόστρωμα (ζωοτροφή). Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μύκητα, φυτικού υποστρώματος και περιβαλλοντικών συνθηκών. Η παρουσία μύκητα σε μια ζωοτροφή δεν συνεπάγεται

αυτομάτως και την παρουσία μυκοτοξινών, καθώς η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή μυκοτοξινών είναι δυο διαφορετικές διεργασίες που ευνοούνται από διαφορετικές συνθήκες. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αφλατοξινών (είδος μυκοτοξίνης) ανευρίσκονται σε ζωοτροφές που δεν έχουν συντηρηθεί σωστά.

Οι κυριότερες μυκοτοξίνες περιλαμβάνουν τις αφλατοξίνες (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, AFM2), τις φουμονισίνες (FB1, FB2), τα τριχοθηκένια, τις ωχρατοξίνες και τη Ζεαραλενόνη. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει προτείνει επιτρεπτά όρια για μερικές από τις μυκοτοξίνες. Στον Πίνακα 2.1 δίνονται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα μυκοτοξινών και των ειδών των μυκήτων που τις παράγουν (Πετρωτός, 2010).

<u>Μυκοτοξίνη</u>	<u>Μύκητες</u>
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penecillium sp.</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>
Στεριγματοκυστίνη	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>
Ωχρατοξίνες	<i>Penecillium viridicatum</i> , <i>Penecillium ochraceus</i> , <i>Penecillium verrucosum</i>
Πατουλίνη	<i>Penecillium patulum</i> , <i>Penecillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>
Κιτρινίνη	<i>Penecillium citrinum</i> , <i>Penecillium viridicatum</i>
Πενικιλλικό οξύ	<i>Penecillium martensii</i> , <i>Penecillium viridicatum</i> , <i>Penecillium cyclopium</i>
Ρουμπατοξίνη	<i>Penecillium rubrum</i>
Αλκαλοειδή του ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
T-Z τοξίνη	<i>Fusarium tricinctum</i>
Τριχοθισίνες	<i>Fusarium graminearium</i> , <i>Fusarium roseum</i>

Πίνακας 2.1. Παραγόμενες μυκοτοξίνες από διάφορα είδη μυκήτων

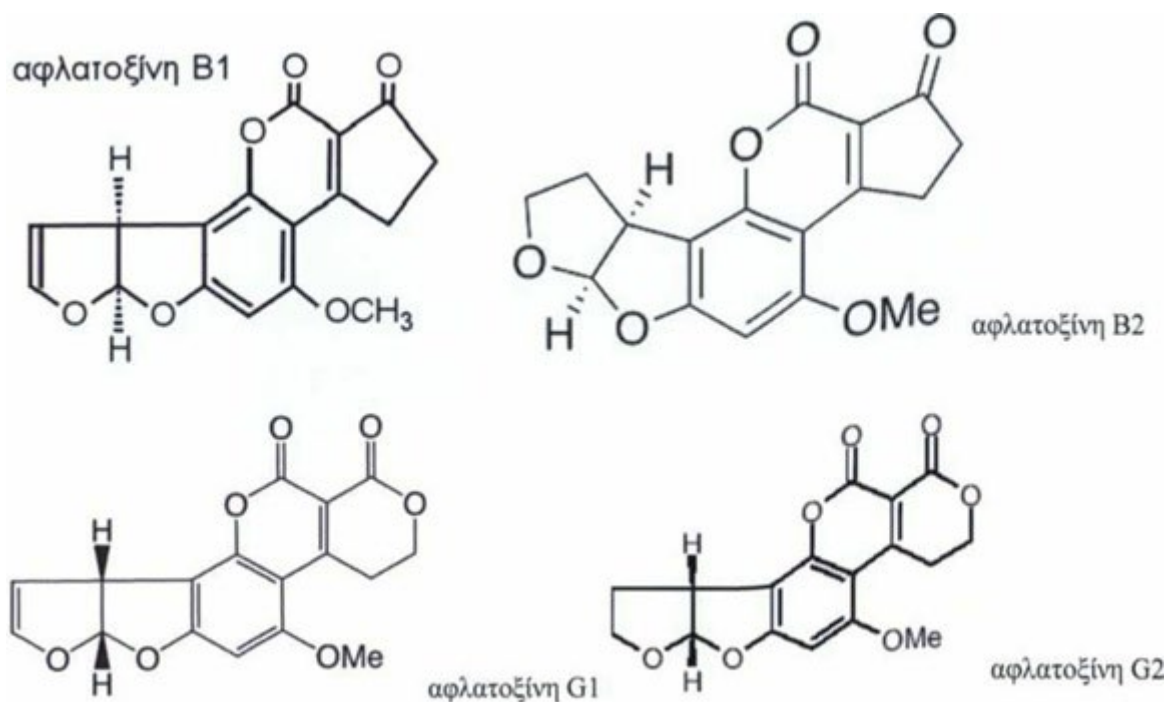
Μυκοτοξίνες	Πιθανές επιδράσεις στα ζώα και στους ανθρώπους	Τρόφιμα τα οποία προσβάλλουν
Αφλατοξίνες	Τοξικότητα, καρκίνο του ήπατος, καρκινογένεσις, εγκεφαλοπάθειες, νεκρώσεις οργάνων, τοξαιμία	Σιτηρά, καλαμπόκι, δημητριακά, γαλακτοκομικά, ξηρούς καρπούς, μπαχαρικά
Ωχρατοξίνες	Νεφροτοξικότητα, Ηπατοτοξικότητα, καρκινογόνος δράση, ανοσοκαταστολή	Κρασί, σταφίδες, κάφες, δημητριακά (σιτάρι, καλαμπόκι, βρώμη)
Φουμονισίνες	Εκφυλισμός νευρικών κυττάρων, τερατογένεσις, πνευμονικό οίδημα, ανοσοκαταστολή	Καλαμπόκι, σόργος, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι
Τριχοθισίνες	Ανοσοκαταστολή στον άνθρωπο και τα ζώα, διαταραχές λεπτικού συστήματος, οιστρογονική δράση, πρόκληση νευρικών διαταραχών	Καλαμπόκι, σόργος, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι

Πίνακας 2.2. Ουσίες μυκήτων που προκαλούν ασθένειες (Σαρδίνη Μ. 2012).

Αφλατοξίνες (aflatoxins)

Μία διαδεδομένη ομάδα μυκοτοξινών είναι αυτή των αφλατοξινών. Το όνομα *aflatoxins*, προκύπτει από το A (*Aspergillus*) + FLA (*Flavus*) + Toxin. Στις αφλατοξίνες αποδόθηκε ο θάνατος εκατό χιλιάδων γαλοπουλών στις αρχές του 1960 στη Βρετανία. Όταν ο υπό εξέταση καρπός μελετήθηκε με υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV) παρατηρήθηκε μπλε (μεταβολίτης B) και πράσινος (μεταβολίτης G) φθορισμός. Ο διαχωρισμός αυτών των δύο διαφορετικών ενώσεων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin layer chromatography, TLC) έδωσε δύο διαφορετικές ενώσεις για τους B και G μεταβολίτες. Η έρευνα απέδειξε ότι υπάρχουν τέσσερις φυσικά απαντώμενες αφλατοξίνες, οι B1, B2, G1, G2. Ο δείκτης υποδηλώνει τον τρόπο διαχωρισμό τους με τη TLC. Από τις τέσσερις αυτές μυκοτοξίνες, η αφλατοξίνη B1 βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία και είναι περισσότερο τοξική. Άλλα μέλη της ομάδας, παράγωγα των πρώτων, είναι οι αφλατοξίνες M1, M2 και η αφλατοξιτόλη, οι οποίες είναι προϊόντα μεταβολισμού βιολογικών συστημάτων ή προϊόντα χημικών αντιδράσεων όπως οι B2a, G2a και D1. Οι αφλατοξίνες M1, M2 είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον άνθρωπο καθώς αυτές έχουν βρεθεί στο γάλα. Παράγονται από τα θηλαστικά κατά την κατανάλωση τροφής επιμολυσμένης με αφλατοξίνες, όπου μέσω του μεταβολισμού βιομετασχηματίζονται. (Καλογερίας, 2010)

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι της ομάδας παρουσιάζονται στο σχήμα 2.1



Σχήμα 2.1. Ο στερεοχημικός τύπος των αφλατοξινών B1, B2, g1, G2 και M1

Οι αφλατοξίνες μολύνουν τα μέρη του φυτού πριν την συγκομιδή, αλλά και κατά την αποθήκευσή του. Αυτές βρίσκονται σε μία πληθώρα από γεωργικά προϊόντα, όπως δημητριακά, σύκα, ελαιούχους σπόρους, καρύδια, καπνά κ.ά.. Περαιτέρω, οι *Aspergillus* spp. μπορούν να μολύνουν πολλά είδη καλλιεργειών συμπεριλαμβανομένων των φιστικιών, του καλαμποκιού, του βαμβακόσπορου, των καρυδιών της Βραζιλίας, των καρυκευμάτων, της copras (ξηρά καρύδα), και των σύκων. Η μόλυνση ευνοείται στις ζεστές και υγρές περιοχές του κόσμου, όπως η Αφρική και μερικά μέρη της Κίνας. (European Mycotoxins Awareness Network)

Ωχρατοξίνες (Ochratoxins)

Μια ακόμη ομάδα μυκοτοξινών που έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημών είναι αυτή των ωχρατοξινών. Οι ωχρατοξίνες ανακαλύφθηκαν στη νότιο Αφρική, μετά από εργαστηριακή έρευνα. Η παραγωγή τους προκύπτει από τους μύκητες *Aspergillus* spp. και *Penicillium* spp. Απαντώνται κυρίως στα δημητριακά, στο καλαμπόκι, στον καφέ, στην μύρα, στα αποξηραμένα φρούτα, στο κρασί, στο κακάο και στους ξηρούς καρπούς.

Η ωχρατοξίνη είναι μια μυκοτοξίνη που έρχεται σε τρεις δευτερεύουσες μορφές μεταβολίτη, Α, Β και C. Οι ωχρατοξίνες Α,Β,С έχουν παρόμοιες χημικές δομές, αλλά οι

τοξικές τους επιδράσεις είναι διαφορετικές. Η πιο τοξική είναι η Α, ακολουθεί η Β που είναι κατά 10 με 20 φορές λιγότερο τοξική έναντι της Α και τέλος η C θεωρείται ότι δεν έχει τοξική επίδραση. Ο κύριος εκπρόσωπος αυτής της ομάδας είναι η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ)(σχήμα 2.2), ακολουθούν οι μεθυλικοί και οι αιθυλικοί εστέρες της, η ωχρατοξίνη Β με τους αντίστοιχους εστέρες και η διϋδροξυωχρατοξίνη Α. Η απουσία του χλωρίου στη θέση C5 διαφοροποιεί την ωχρατοξίνη Α από την ωχρατοξίνη Β.

Όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας γίνουν ευνοϊκές, τα τρόφιμα μπορεί να μολυνθούν στο χωράφι ή μετά τη συγκομιδή. Στα ζώα, το κύριο όργανο στόχος των τοξινών είναι το νεφρό και σπάνια το ήπαρ. Η δηλητηρίαση μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία και την παραγωγικότητα των ζώων. Τα πουλιά και οι χοίροι φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα. Αν και τα διαθέσιμα δεδομένα είναι ανεπαρκή, φαίνεται επίσης να έχουν καρκινογόνες επιπτώσεις στον άνθρωπο. (Καλογερίας, 2010).

Η μελέτη τοξικότητας της ωχρατοξίνης περιλαμβάνει τον προσδιορισμό παραγόντων που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Υπάρχει υποψία ότι η ωχρατοξίνη Α είναι μια από τις κύριες αιτίες του καρκίνου του ουροποιητικού συστήματος και σχετίζεται με βλάβη των νεφρών.

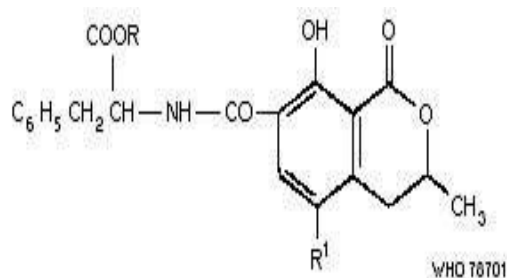
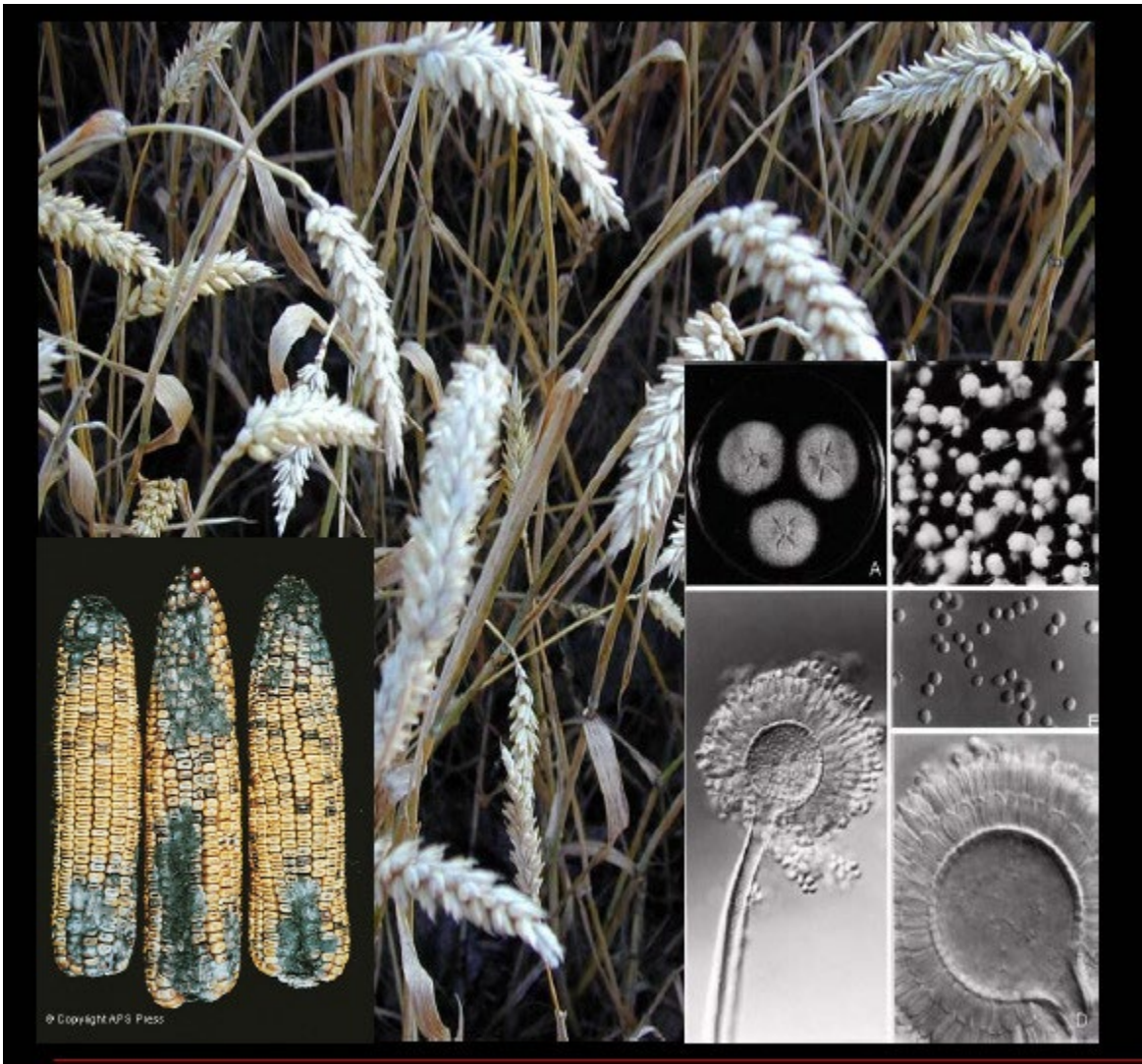


Fig. 6. The chemical structure of ochratoxins: ochratoxin A: R¹ = Cl, R = H; ochratoxin B: R¹ = H, R = H; ochratoxin C: R = Cl, R¹ = C₂H₅; methyl ester of ochratoxin A: R = ²Cl, R = CH₃; methyl or ethyl ester of ochratoxin B: R¹ = H, R = CH₃ or C₂H₅.

Σχήμα 2.2. Ο στερεοχημικός τύπος ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ)



Εικόνα 2.3. Ωχρατοξίνες

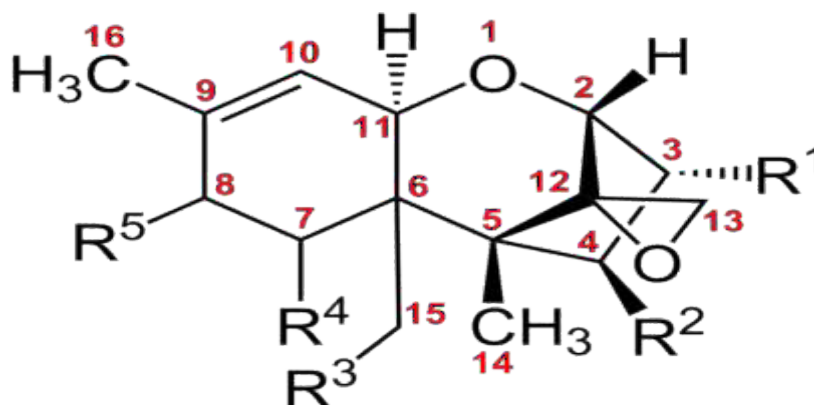
Τριχοθηκένια (Trichothecenes)

Τα τριχοθηκένια είναι μία από τις κύριες κατηγορίες μυκοτοξινών, οι οποίες έχουν σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο στις καλλιέργειες δημητριακών κάθε χρόνο. Είναι οι πιο σημαντικές μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες *Fusarium*, αλλά παράγουν επίσης άλλα γένη μυκήτων, όπως *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, και *Verticimonosporium*.

Είναι μικρά, αμφιπαθητικά μόρια που μπορούν να κινούνται παθητικά στις κυτταρικές μεμβράνες. Απορροφούνται εύκολα μέσω των ολοκληρωτικών και γαστρεντερικών συστημάτων, επιτρέποντας την ταχεία επίδραση των τριχοθηκένων που λαμβάνονται σε ιστούς ταχέως πολλαπλασιασμού. Η έκθεση σε αυτές τις τοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε άρνηση τροφής, ανοσολογικά προβλήματα, έμετο, δερματίτιδα και αιμορραγικές βλάβες. Είναι φυτοτοξικά και μπορούν να προκαλέσουν χλώρωση και νανισμό και δρουν ως παράγοντας μολυσματικότητας στην κεφαλή του σιταριού. Είναι επίσης αδιάλυτα στο νερό,

αλλά έχουν υψηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο, αιθανόλη, μεθανόλη, αιθυλεστέρα και διμεθυλοσουλφοξείδιο. Είναι σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες και είναι δύσκολο να αποσυντεθούν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τροφίμων. Είναι σταθερές υπό συνθήκες ουδέτερου και οξικού οξέος, αλλά ταυτόχρονα δεν θα υδρολυθούν στο στομάχι μετά την κατάποση.

Αποτελούνται από μία ομάδα σεσκιτερπενίων (τρεις ισοπροπενικές ομάδες) και χαρακτηρίζονται από το σκελετό 12,13-επόξυ-τριχοθεκένιο (σχήμα 2.3). Η ομάδα χωρίζεται σε τέσσερις υποκατηγορίες βάση των χημικών χαρακτηριστικών τους. Οι πρώτες δύο διαφέρουν στην ύπαρξη (νιβαλελόλη, δεοξυντβαλενόλη) ή όχι μια ομάδας καρβονυλίου στη θέση C8 (T-2 τοξίνη, διακετοξυσκριπενόλη). Οι άλλες δύο ομάδες είναι οι ροριδίνες (ροριδίνη A) και οι βερρουκαρίνες (βερρουκαρίνη A), όπου περιλαμβάνουν μία μακροκυκλική εστερική γέφυρα ανάμεσα στους άνθρακες στις θέσεις C4 και C15. Οι Ροριδίνες είναι μακροκυκλικοί διεστέρες της βερρουκαρόλης, ενώ οι βερρουκαρίνες είναι μακροκυκλικοί τριεστέρες της βερρουκαρόλης (Cole R.J. & Cox R.H., 1981). Μελέτες έχουν δείξει, ότι τα τριχοθεκένια απαντώνται κυρίως στα δημητριακά, στη μύρα, στις μπανάνες, στους ηλιόσπορους, στις μπανάνες και στα μάνγκο. (Καλογερίας, 2010).



Σχήμα 2.3. Στερεοχημικός τύπος των τριχοθεκένιων



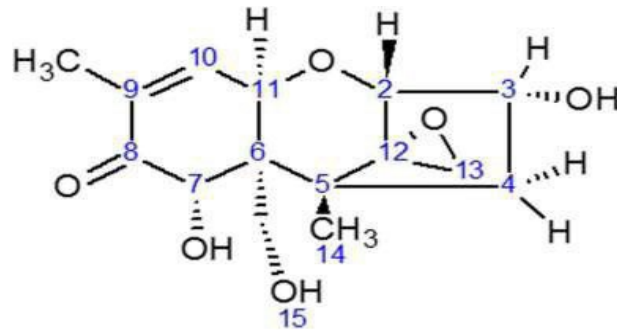
Εικόνα 2.4. Τριχοθυκένια

Δεοξυνιβαλενόνη(DON)

Η δεοξυνιβαλενόλη (DON) είναι η πιο κοινή τοξίνη του μύκητα *Fusarium*. Ονομάζεται, επίσης, και βομιτοξίνη (vomitoxin). Είναι πιθανώς το πιο συνηθισμένο τριχοθυκένιο και η τοξίνη παράγεται κατά κύριο λόγο από το *F. graminearum* και το *F. culmorum*.

Εμφανίζεται κυρίως στα δημητριακά, όπως το σιτάρι, το κριθάρι και το καλαμπόκι, και σπάνια εμφανίζεται σε βρώμη, ρύζι, σίκαλη και σόργο. Μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία μετά από οξεία, βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη ένταση. Μετά από οξεία χορήγηση, η δεοξυνιβαλενόλη παράγει δύο τυπικά τοξικολογικά αποτελέσματα: μείωση της πρόσληψης τροφής (ανορεξία) και έμετος. (Καλογερίας, 2010).

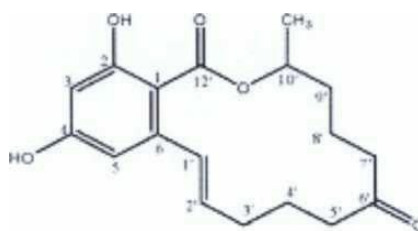
Ο κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας παρουσιάζεται στο σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.4. Στερεοχημικός τύπος της δεοξυनिβαλενόνης

Ζεαραλενόνες (Zearalenones)

Οι ζεαραλενόνες είναι μία κατηγορία φαινολικών ενώσεων με δύο κύρια μέλη, τη ζεαραλενόνη και την πρόδρομο αυτής, τη ζεαραλενόλη. Χημικά χαρακτηρίζονται ως μία φαινολική λακτόνη του ρεσορκυκλικού οξέος (*resorcylic acid*). Το όνομά τους προκύπτει από τον κύριο ξενιστή που προσβάλλει, το καλαμπόκι (*Zea mays*), από τη συντόμηση του ρεσορκυκλικού οξέος -ραλ-, από το διπλό δεσμό στις θέσεις C1 και C2 -εν- και από την ομάδα της κετόνης στη θέση C6 -όνη. Παράγονται κυρίως σε ψυχρά και υγρά κλίματα κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και αποθήκευσης. Το μεγάλο ενδιαφέρον για τη μελέτη τους έγκειται στο γεγονός, ότι είναι φυσικώς απαντώμενα οιστρογόνα. Έχει παρατηρηθεί, ότι προκαλούν ορμονικές διαταραχές στα ζώα, κυρίως στους χοίρους. Στα δημητριακά και στις ζωοτροφές μπορεί να βρεθούν και άλλα παράγωγα της ζεαραλενόνης, μεγαλύτερης οιστρογενικής δράσης, όπου μέσω βιοσυνθετικών αντιδράσεων να βρεθούν και σε άλλα τρόφιμα, όπως στο γάλα. Η πρόδρομος ένωση της ζεαραλενόνης, διαφέρει από αυτήν στην παρουσία υδροξυλίου στη θέση C6. (Καλογερίας, 2010).



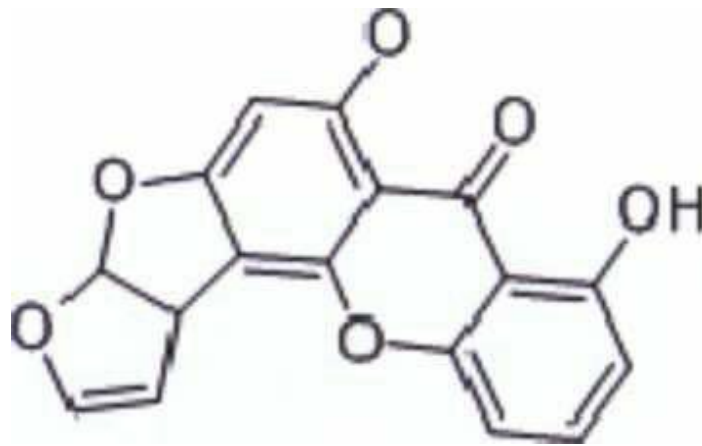
Σχήμα 2.5. Ο στερεοχημικός τύπος της ζεαραλενόνης.

Η ζεαραλενόνη απαντάται (παγκοσμίως) στους δημητριακούς καρπούς (σιτάρι, κριθάρι, σόγια, βρώμη, καλαμπόκι, κ.λπ.), όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας κατά την αποθήκευσή τους ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων. Οι μύκητες του γένους *Fusarium* παράγουν τα υψηλότερα ποσοστά ZON σε σχετική υγρασία 45% και θερμοκρασία 20-25°C.

Ο κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας παρουσιάζεται στο σχήμα 2.5.

Στεριγματοκυστίνες (Sterigmatocystins)

Οι στεριγματοκυστίνες, είναι μία ομάδα μυκοτοξινών με παρόμοια χημικά χαρακτηριστικά με τους μεταβολίτες που παράγονται από τα γένη *Aspergillus* και *Bipolaris*. Χημικώς, χαρακτηρίζονται από μια ομάδα ξανθόνης, ενωμένης με μία 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 υποκατάσταση στις θέσεις C3, C6, C7 και C10. Κύριος εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η στεριγματοκυστίνη (Σχήμα 2.6), η οποία, καθώς και άλλα μέλη της ομάδας αποτελούν πρόδρομες ενώσεις στη βιοσύνθεση των αφλατοξινών. Απαντώνται σε ακατέργαστες τροφές όπως σιτάρι, καρύδια, κριθάρι και ζωοτροφές (European Mycotoxins Awareness Network).



Σχήμα 2.6. Ο στερεοχημικός τύπος στεριγματοκυστίνης

Τρεμογόνες μυκοτοξίνες (tremorgen group mycotoxins)

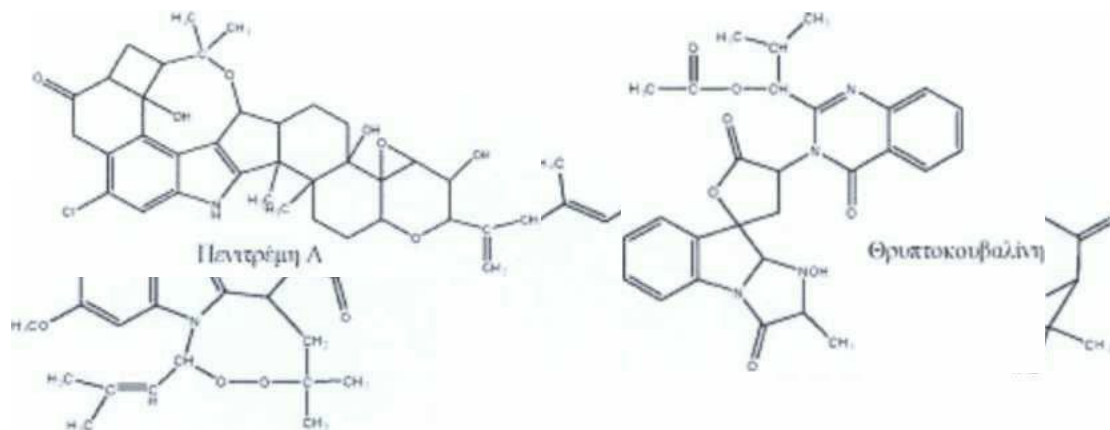
Η ολοένα και αυξανόμενη έρευνα για τις μυκοτοξίνες οδήγησε στην ανακάλυψη δευτερογενών μεταβολιτών. Η ασθένεια αυτή εμφανίζεται κυρίως σε πρόβατα και βοοειδή, τα οποία βόσκουν σε μόνιμα βοσκοτόπια, όπου τρέφονται με πολυετές χορτάρι λόλιο (*Lolium perenne*) από το οποίο παράγονται οι τρεμογόνες τοξίνες. Οι μυκοτοξίνες αυτής της κατηγορίας χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες με βάση τη χημική τους συγγένεια:

- ομάδα της πενιτρίνης (penitrem),
- της φουμιτρεμογίνης- βερρουκουλογίνης (fumitremorgin-verruculogen),
- της ομάδα πασπαλιτρίνης (paspalitrem)
- και της θρυπτοκυβαλίνης (tryptoquivaline).

Κοινό χαρακτηριστικό των παραπάνω ομάδων είναι η παρουσία του ινδολικού δακτυλίου το οποίο προέρχεται από τη θρυπτοφάνη (Cole R.J. & Cox R.H., 1981). Στο σχήμα

απεικονίζονται ορισμένοι στερεοχημικοί τύποι ορισμένων αντιπροσωπευτικών μελών αυτής της οικογένειας των μυκοτοξινών.

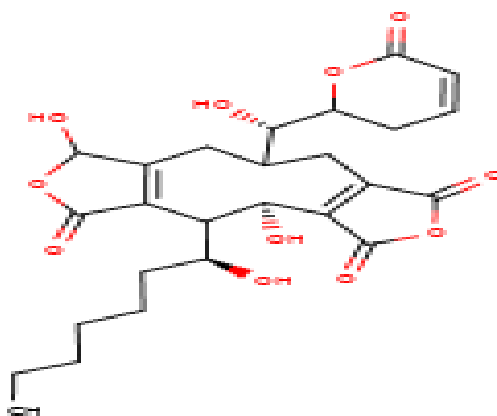
Οι κυριότεροι εκπρόσωποι της ομάδας παρουσιάζονται στο σχήμα 2.7.



Σχήμα 2.7. Οι στερεοχημικοί τύποι των φουμιτρεμογόνη Α, πασπαλιτρέμη Α, πενιτρέμης Α και θρυπτοκουβαλίνη Α.

Ρουμπρατοξίνες (Rubratoxins)

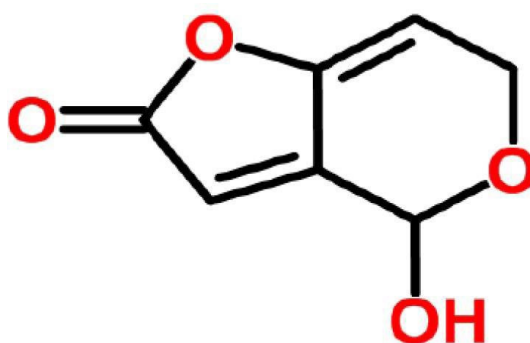
Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει δύο μέλη τη ρουμπρατοξίνη Α και ρουμπρατοξίνη Β, με χημικό χαρακτηριστικό ένα ακόρεστο λακτονικό δακτύλιο και μία ομάδα (ρουμπρατοξίνη Α) ή δύο ομάδες (ρουμπρατοξίνη Β) ανυδριτών. Μελέτες έχουν δείξει, ότι η παρουσία ρουμπρατοξίνης Β, στα τρόφιμα είναι πιο συχνή σε σχέση με τη ρουμπρατοξίνη Α και ότι είναι πιο τοξική από αυτήν (Cole R.J. & CR.H., 1981). Βρίσκεται στο έδαφος και προσβάλλει τις τροφές των ζώων, αλλά και πολλά γεωργικά προϊόντα, όπως όσπρια, δημητριακά, ξηρούς καρπούς, πίτουρο και ηλιόσπορους. Η ρουμπρατοξίνη Α διαφέρει από τη ρουμπρατοξίνη Β στην παρουσία υδροξυλίου στη θέση C25, εν αντιθέσει του καρβονυλίου που φέρει ρουμπρατοξίνη Β.(σχήμα 2.8)



Σχήμα 2.8. Ο στερεοχημικός τύπος ρουμπρατοξίνης Β.

Οι Τοξικές Λακτόνες (Toxic Lactones)

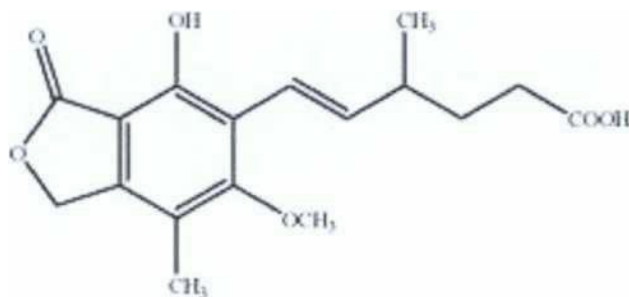
Χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας είναι ο πενταμελής λακτονικός δακτύλιος της α-β- ακόρεστης γ- βουτυρολακτόνης. Η ομάδα περιλαμβάνει τα μέλη πατουλίνη, πενικιλλικό οξύ και ασκλαδιόλη (ascladiol) (Cole R.J. & Cox R.H., 1981). Η πατουλίνη βρίσκεται κυρίως στα φρούτα όπως μήλα, αχλάδια, σταφύλια, καθώς και στους χυμούς αυτών. Το πενικιλλικό οξύ είναι ένα τοξικό αντιβιοτικό και βρίσκεται κυρίως στο καλαμπόκι, στα αποξηραμένα φασόλια και στον καπνό. (European Mycotoxins Awareness Network). Στο σχήμα 2.9. εμφανίζεται ο στερεοχημικός τύπος της πατουλίνης.



Σχήμα 2.9. Ο στερεοχημικός τύπος της πατουλίνης.

Μυκοφαινολικό οξύ (Mycophenolic acid)

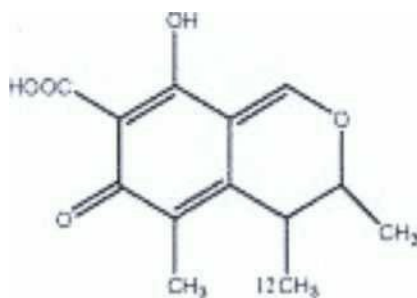
Το μυκοφαινολικό οξύ παράγεται κυρίως από μύκητες του γένους *Penicillium*. Από χημικής άποψης αποτελείται από δύο συμπυκνωμένους δακτυλίους, μία βουτυρολακτόνη και μία τριϋποκατεστημένη βενζοφαινόλη. Η παρουσία του μυκοφαινολικού οξέος σε αποθηκευμένες ζωοτροφές αγγίζει το ποσοστό του 32 %. Το μυκοφαινολικό οξύ παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και αναστέλλει το σχηματισμό αντισώματος και την παραγωγή κυτοτοξινών T-κυττάρων. (Allison A.C., Eugui E.M.,2000) Για αυτό το λόγο, το μυκοφαινολικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί ως ανοσοκατασταλτικό έπειτα από μεταμόσχευση οργάνων. Δεδομένου ότι η παρουσία του μυκοφαινολικού οξέος σε βιολογικά συστήματα συνδυάζεται με υψηλή 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 2.10 απεικονίζεται ο στερεοχημικός του μυκοφαινολικού οξέος.



Σχήμα 2.10. Ο στερεοχημικός τύπος μυκοφαινολικού οξέος.

Κιτρινίνη (Citrinin)

Η Κιτρινίνη αρχικά απομονώθηκε από τον μύκητα *Penicillium citrinum*, το 1931 από όπου πήρε και το όνομά της. Είναι μία μέθυλοκινόνη, της οποίας οι κρύσταλλοι έχουν χρώμα κίτρινο λεμονί. Η κιτρινίνη βρίσκεται κυρίως στο ρύζι. Σε αυτήν είχε αποδοθεί η ασθένεια του «κίτρινου ρυζιού», που μάστιζε τις ασιατικές χώρες. Οι μύκητες που παράγουν την κιτρινίνη παράγουν αντίστοιχα και την ωχρατοξίνη Α (European Mycotoxins Awareness Network). Στο σχήμα 2.11 απεικονίζεται ο στερεοχημικός τύπος της κιτρινίνης.



Σχήμα 2.11. Ο στερεοχημικός τύπος της κιτρινίνης.

Μυκοτοξίνη	Μύκητας
Ακέτοξυσκιπενεδιόλη	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. oxysporum</i> ,
η Αλτρναριόλη	<i>F. culmorum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. roseum</i>
Φαφλατοξίνες	<i>Alternaria alternate</i>
Βιριδιτοξίνη	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Γλιοτοξίνη	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Διακετοξυσκιπενόλη	<i>Alternaria spp.</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium spp.</i>
Δεοξυνιβαλενόλη	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>P. poae</i> , <i>F. moniliforme</i>
Εργοτοξίνες	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Clavipers purpurea</i>

	Fusarium culmorum, F. graminearum, F. oxysporum, F. roseum, F. moniliforme, F. avenaceum
Κυκλοπιαζονικό οξύ	Aspergillus flavus, A. versicolor, Penicillium cyclopium
Κιτρινή	Aspergillus carneus, Penicillium citrinum, P. expansum
Κιτρεοβιριδίνη	Aspergillus terreus
Μονιλοφορμίνη	Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. avenaceum, F. roseum, και F. nivale
Νιβαλενόλη	F. avenaceum, F. culmorum, F. equiseti, F. nivale, F. poae, F. moniliforme
Ξανθοκιλλίνη	Eurotium chevalieri
Πατουλίνη	Aspergillus clavatus,, A. terreus, Botrytis cinerea, Penicillium roquefortii, P. claviforme κ.ά.
Σατρατοξίνες	Stachybotrys chartarum, Trichoderma viridi
Σκιρπεντριόλη	Fusarium moniliforme, F. equiseti, F. oxysporum, F. culmorum, F. solani, F. avenaceum, F. roseum
Στεριγματοκυστίνη	Aspergillus flavus, A. nidulans, A. versicolor, Penicillium rugulosum
Τοξίνη T-1, Τοξίνη T- 2	Fusarium avenaceum, F. equiseti, F. culmorum, F. moniliforme, F. nivale F. roseum, F. solani
Τοξίνη HT-2	Fusarium moniliforme, F. culmorum, F. avenaceum
Τριχοδερμίνη	Trichoderma viride
Τριχοθεσίνη	Trichothecium roseum
Τριχοβερρίνη	Stachybotrys chartarum
Φουμονισίνη B1	Fusarium moniliforme, F. culmorum, F. avenaceum,
Φουσαρικο,Φουσαρίνη	Fusarium moniliforme
Ωχρατοξίνες	Aspergillus ochraceus, A. carbonarius, Penicillium viridictum, P. verrucosum

Πίνακας 2.3. Αναφορά ορισμένων σημαντικών μυκοτοξινών και μυκήτων όπου παράγονται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) στο 25% των δημητριακών καρπών που παράγονται ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο, καταγράφεται μόλυνση από μυκοτοξίνες . Οι δημητριακοί καρποί αποτελούν σημαντικό μέρος τόσο του ανθρώπινου διατροφολογίου, όσο και εκείνου των αγροτικών ζώων και χρησιμοποιούνται συστηματικά από τη βιομηχανία ζωοτροφών. Ο άνθρωπος μολύνεται άμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων φυτικής προέλευσης ή έμμεσα από την κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων ζωικής προέλευσης. Η παγκόσμια εξάπλωση του προβλήματος των μυκοτοξικώνώσεων, η επικινδυνότητα για τη υγεία του ανθρώπου και των ζώων και οι οικονομικές απώλειες της κτηνοτροφικής παραγωγής καθιστούν την έρευνα για τις μυκοτοξίνες επίκαιρη και αναγκαία.(Blout W.P., 1961)



Εικόνα 3.1. Πάσχων από εργοτισμός. http://2.bp.blogspot.com/-3F_jZQRv3RE/UAcilmH273I/AAAAAAAAAGos/exsp3jI2KZc/s1600/DSC04299.JPG



Εικόνα 3.2. Αγελάδα προσβεβλημένη από μυκοτοξίνες

file:///C:/Users/user/Downloads/%CE%9C%CF%85%CE%BA%CE%BF%CF%84%CE%BF%CE%BE%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CF%82%20%CE%BA%CE%B1%CE%B9%20%CE%9C%CF%85%CE%BA%CE%BF%CF%84%CE%BF%CE%BE%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20(7).pdf

3.1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΚΩΣΗ

Η τοξική επίδραση των μυκοτοξινών στους ανθρώπους και στα ζώα ονομάζεται δηλητηρίαση από μυκοτοξίνες (μυκοτοξίκωση). 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. Ο κίνδυνος εξαρτάται από την τοξικότητα,

- την έκθεση
- την ηλικία
- το φύλο
- και άλλους παράγοντες.

Οι μυκοτοξίνες είναι ζωικές ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες. Τα συμπτώματα μιας μυκοτοξίκωσης εξαρτώνται από τον τύπο των μυκοτοξινών

- τον χρόνο της έκθεσης
- την ηλικία
- την υγεία

- και το φύλο
- τη γενετική
- τη διατροφική κατάσταση και
- την αλληλεπίδραση με άλλες τοξικές λοιμώξεις.

Η μυκοτοξίκωση μπορεί να εμφανιστεί σε βιομηχανικές και αναπτυσσόμενες χώρες. Δεδομένου ότι το εμπόριο πραγματοποιείται σε παγκόσμια κλίμακα, το πρόβλημα των γεωργικών προϊόντων που έχουν μολυνθεί από μυκοτοξίνες συνδυάζει πολλές διαφορετικές συνθήκες, όπως το περιβάλλον, η κοινωνία και η οικονομία. Επιπλέον, μπορούν επίσης να εισαχθούν στο ανθρώπινο σώμα με πολλούς τρόπους:

- μέσω του δέρματος
- μέσω του αναπνευστικού συστήματος
- μέσω τροφής και των διαφόρων συστατικών του.

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 καταστάσεις, όπως καρκινογένεση, τερατογένεση, μετάλλαξη και άλλα. (Blackwell B.A. & Savard M.E., 2000). Γενικά, οι παθολογικές αυτές καταστάσεις:

- Δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με αντιβιοτικά και άλλα φάρμακα
- Τα συμπτώματά τους συνδέονται με την τροφή και με πρωτογενή αγροτικά προϊόντα
- Δεν είναι μεταδοτικές
- Είναι περισσότερο εποχιακές (λόγω καιρικών συνθηκών)
- Η δράση τους στα ζώα και στον άνθρωπο είναι συναρτήσεως 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 σύστημα. (D'Mello J.P.F. & Macdonald A.M.C., 1997)

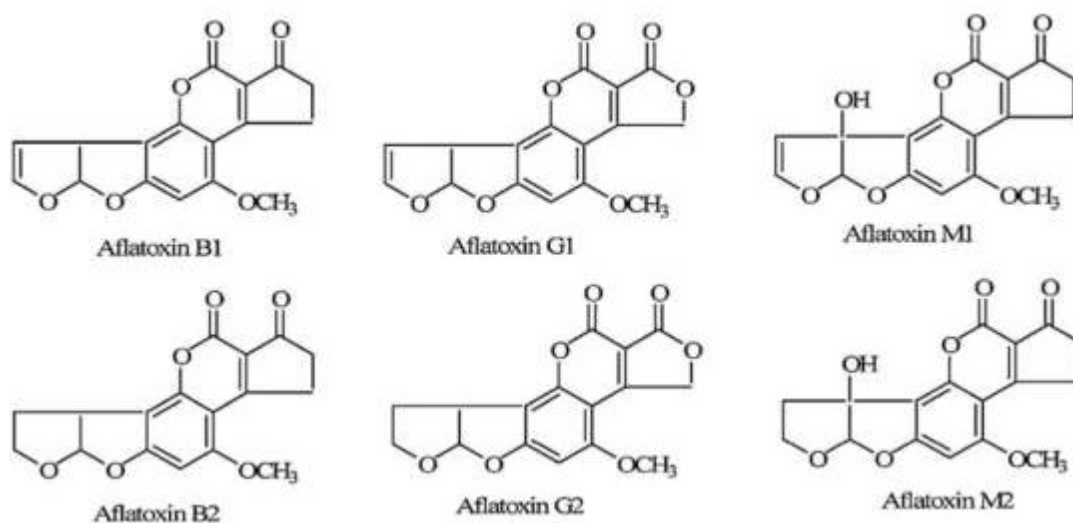
Η επίσημη μέθοδος για την αξιολόγηση της άμεσης χημικής (οξείας) τοξικότητας μιας ένωσης καθορίζεται μέσω του προσδιορισμού της τιμής LD50 (Lethal Dose). Η τιμή LD50

αντιστοιχεί στην ποσότητα μιας μυκοτοξίνης ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους, η οποία είναι θανατηφόρα για το 50% των πειραματόζωων.

3.2 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

ΓΕΝΙΚΑ

Οι αφλατοξίνες είναι διφουρανοκουμαρινικά παράγωγα. Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά τοξικές και καρκινογόνες μυκοτοξίνες προκαλούνται από διάφορα είδη μυκήτων, κυρίως το *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Δεκαοκτώ αφλατοξίνες έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα. Ο *Aspergillus flavus* παράγει μόνο αφλατοξίνες B1 και B2 και του κυκλοπιαζονικού οξέος, αν και μόνο ένα ποσοστό των στελεχών του είναι τοξικό. Ο *Aspergillus parasiticus* παράγει τις αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2 αλλά δεν παράγει ταυτόχρονα κυκλοπιαζονικού οξέος. Τα γράμματα B και G αναφέρονται στα φθορίζοντα χρώματα (μπλε και πράσινο) που παρατηρούνται υπό υπεριώδες φως μεγάλου μήκους κύματος. Οι αφλατοξίνες M1 και M2 παράγονται από τις αντίστοιχες αφλατοξίνες B μέσω υδροξυλίωσης στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα κι εκκρίνονται στο γάλα σε ποσοστό 1,5% των αφλατοξινών B που έχουν προσληφθεί.



Σχήμα 3.1. Αναπαράσταση αφλατοξινών

Αφλατοξίνες

Στις αφλατοξίνες έχει αποδοθεί οξεία τοξικότητα και καρκινογένεση σε ανθρώπους και ζώα. Οι ασθένειες προκαλούνται από αυτήν την ομάδα μυκοτοξινών έχουν τη γενικότερη ονομασία αφλατοξίνωση. Η οξεία αφλατοξίνωση οδηγεί στο θάνατο, ενώ ή χρόνια προκαλεί καρκίνο, ανοσολογική ανεπάρκεια κ.ά. Η αξιολόγηση επιδημιολογικών και ερευνητικών

αποτελεσμάτων που πραγματοποιήθηκε από το διεθνή οργανισμό για την έρευνα του καρκίνου (International Agency for Research on Cancer, IARC) 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 ποικίλλουν από χώρα σε χώρα με υψηλότερα ποσοστά στα μέρη, όπου οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων στις τροφές και κατά συνέπεια την παραγωγή αφλατοξινών. 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 αρρένα είναι περισσότερο ευπαθή στην προσβολή από μυκοτοξίνες. Η LD50 κυμαίνεται από 0.5-10 mg/Kg, ανάλογα το βάρος του σώματος (Bennett J.W. & Klich M., 2003).

Η αφλατοξίνη B1 είναι ένα ισχυρό μεταλλαξιογόνο, μεταλλάσσει τα χρωμοσώματα φυτών, ζώων και ανθρώπων. Η βιολογική δράση της αφλατοξίνης B1 προαπαιτεί τη μεταβολική ενεργοποίησή της στο C15-C16 εποξειδίου της, το οποίο είναι πολύ ισχυρό παράγωγο. Έχει βρεθεί ότι σχηματίζεται ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα στο N-7 άτομο της γουανίνης με το ενεργό παράγωγο της αφλατοξίνης B1. Αυτό το προϊόν προσθήκης που σχηματίζεται, αναστέλλει τη σύνθεση του DNA (European Mycotoxins Awareness Network).

Στον Πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι τις LD₅₀ τιμές για τις κυριότερες μυκοτοξίνες που αναφέρθηκαν ανώτερω.

Είδος	Μυκοτοξίνη	LD ₅₀ (mg ανά kg σώματος)
Κόνιλες	Αφλατοξίνη B1	0,30
Χοιροειδή	Αφλατοξίνη Βί	0,62
Μαϊμού	Αφλατοξίνη B1	2,2
Επίμυες	Ωχρατοξίνη A	21,4-30,3
Κοτόπουλα	Ωχρατοξίνη B	24
Μαϊμού	Στεριγματοκυστίνη	32
Επίμυες	Δεοξυνιβαλενόλη	70
Επίμυες	Διακετοξυσκριπενόλη	23
Επίμυες	Νεοσολανιόλη	14.5
Επίμυες	HT-2 τοξίνη	9,0

Επίμυες	Τα-2 τοξίνη	5,2
Επίμυες	Νιβαλενόλη	4,1
Επίμυες	Βερρουκαρίνη Α	0,5
Επίμυες	Ρουμπρατοξίνη Β	83
Επίμυες	Τενουαζονικό οξύ	81-225
Κοτόπουλα	Τενουαζονικό οξύ	37,5
Σκύλοι	Τενουαζονικό οξύ	2,5-10
Χοιροειδή	Τρεμογόνες τοξίνες	0,005
Κοτόπουλα	Πατουλίνη	170
Επίμυες	Πενικιλλικό οξύ	250
Επίμυες	Ζεαραλανόνη	10000
Χοιροειδή	Ζεαραλανόνη	5000
Επίμυες	Κιτρινίνη	70

Πίνακας 3.1. Τοξικότητα ορισμένων μυκοτοξινών σε διάφορα βιολογικά συστήματα

3.3 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1

Η αφλατοξίνη Β1 στις ζωοτροφές είναι μια μυκοτοξίνη που παράγεται από *Aspergillus* που αναπτύσσονται σε σπόρους, ειδικά καλαμπόκι, βαμβάκι και μερικές φορές φιστίκια. Θεωρείται μία από τις πιο τοξικές ενώσεις. Οι τοξικές επιδράσεις του AFB1 μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης και τη διάρκεια της έκθεσης σε τοξίνες. Μεταδίδεται άμεσα στον άνθρωπο τρώγοντας μολυσμένα τρόφιμα ή έμμεσα χρησιμοποιώντας ζωικής προέλευσης τροφή που τρώει μολυσμένα τρόφιμα.

Η μυκητιακή απειλή από το AFB1 θα μπορούσε να μειώσει την παγκόσμια προμήθεια τροφίμων κατά 39%. Λόγω της υψηλής καρκινογένεσης, της τερατογένεσης και της μεταλλαξιογένεσης, το AFB1 είναι μία από τις πιο διάσημες μυκοτοξίνες. Η αφλατοξίνη Β1 μπορεί να περάσει από το δέρμα. Η επαφή με το δέρμα με αυτήν την αφλατοξίνη υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να προκαλέσει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία. Το ήπαρ είναι το πιο ευάλωτο όργανο. Σε μελέτες σε ζώα, οι παθολογικές αλλαγές που σχετίζονται με τη δηλητηρίαση από αφλατοξίνη Β1 περιλαμβάνουν απώλεια βάρους ήπατος και καρκίνο του ήπατος Άλλες ηπατικές βλάβες περιλαμβάνουν ηπατοκυτταρική διόγκωση, λιπαρή διήθηση, νέκρωση, αιμορραγία και ίνωση.

3.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΩΣΗ

Η αφλατοξίκωση είναι η ασθένεια που προκαλείται από τη κατανάλωση αφλατοξινών. Για τους περισσότερους παραγωγούς, δεν έχουν παρατηρηθεί οπτικά συμπτώματα δηλητηρίασης από αφλατοξίνη σε ζώα. Ωστόσο, οι υψηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης και / ή παρατεταμένου χρόνου μπορεί να προκαλέσουν οπτικά συμπτώματα σε βοοειδή, ειδικά σε νεαρά μοσχάρια. Το βόειο κρέας και τα γαλακτοπαραγωγικά βοοειδή είναι πιο ευαίσθητα σε αφλατοξίκωση από ό,τι πρόβατα και άλογα, παρόλο που συμβαίνουν και άλλες μυκοτοξικώσεις σε αυτά τα είδη. Τα νεαρά ζώα είναι πιο ευαίσθητα από τα ενήλικα ζώα. Η διάγνωση της νόσου της αφλατοξίνης είναι συχνά δύσκολη λόγω αλλαγών στα κλινικά συμπτώματα, των συνολικών παθολογικών καταστάσεων και της παρουσίας μολυσματικών ασθενειών λόγω της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η ωχρατοξίνη Α θεωρείται ηπατοτοξική, τερατογόνος και καρκινογόνος, αλλά τα κύρια όργανα που προσβάλλει είναι οι νεφροί. Η ευρεία χρήση του *Aspergillus niger* για την παρασκευή κιτρικού οξέος και ένζυμων για ανθρώπινη κατανάλωση καθιστά πολύ σημαντικό τον έλεγχο για πιθανή παραγωγή ωχρατοξίνης Α.

Από είδη του μύκητα *Claviceps* παράγεται η μυκοτοξίνη εργοτίνη, που έχει συσχετιστεί με τη γάγγραινα και την προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος στον άνθρωπο και στα ζώα. (Teren J. *Et al*, 1996).

Οι φουμονισίνες αποτελούν μια οικογένεια μυκοτοξινών που παράγονται από μύκητες των γενών *Fusarium* και *Alternaria*, με κυριότερο μέλος τη φουμονισίνη B1. Η τοξικότητα των φουμονισινών οφείλεται στο ότι επηρεάζουν το μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων. Έχουν ηπατοτοξική και καρκινογόνο δράση και στον άνθρωπο σχετίζονται με την εκδήλωση καρκίνου του οισοφάγου. Μύκητες των γενών *Fusarium*, *Mycothecium*, *Phomopsis*, *Trichoderma*, *Trichothecium* και άλλων, παράγουν μια ομάδα μυκοτοξινών που αριθμεί περισσότερα από 60 είδη και καλούνται τριχοθεσίνες. Από αυτά η δεοξυνιβαλενόλη (DON), η διακετοξυσκιρπενόλη (DAS) και η T-2, οι οποίες έχουν μελετηθεί περισσότερο, παράγονται από το γένος *Fusarium* και προκαλούν αιμορραγία, διάρροια, εμετό, ανορεξία, καθυστέρηση της ανάπτυξης, νευρομυϊκή διεγερσιμότητα και δερματίτιδες μετά τη μόλυνση. (Gelderblom W.C. *et al*, 1988).

Η ζεαραλενόνη (ZON) είναι μια μη στεροειδής μυκοτοξίνη με οιστρογονική δράση. Παράγεται από ορισμένα είδη μυκήτων του γένους *Fusarium*, ανιχνεύεται συχνά στις μολυσμένες από μύκητες ζωοτροφές και έχει παγκόσμια εξάπλωση. Έχει την ιδιότητα να

συνδέεται με τους υποδοχείς οιστρογόνων στους διάφορους ιστούς και να προκαλεί διαταραχές της αναπαραγωγικής δραστηριότητας στα παραγωγικά ζώα και κυρίως στις σύες. Στον άνθρωπο η παρουσία της ZON συνδέθηκε σε αδενοκαρκίνωμα και υπερπλασία του ενδομήτριου. Επίσης, ανιχνεύθηκε στο πλάσμα του αίματος νεαρών κοριτσιών με πρόωμη ψευδο-ενήβωση (pseudopuberty). Η ZON μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ, είναι ηπατοτοξική και προκαλεί καρκίνο του ήπατος (Diekman M.A. & Green M.L., 1992).

3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

Γενικά, τα μηρυκαστικά είναι πιο ανθεκτικά στις αφλατοξίνες από άλλα μονογαστρικά ζώα. Ο αντίκτυπός τους στην υγεία των ζώων εκδηλώνεται ως μια σειρά συμπτωμάτων, αυτά τα συμπτώματα εξαρτώνται κυρίως :

- από την πρόσληψη
- τον χρόνο επαφής
- τον τύπο
- την ηλικία των ζώων
- το φύλο
- τη διατροφική κατάσταση και
- τη διατροφή.

Η απόρριψη τροφής, ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης και η μειωμένη απόδοση των ζωοτροφών είναι τα κύρια σημάδια της χρόνιας δηλητηρίασης από αφλατοξίνη. Επιπλέον, απώλεια βάρους, τραχύ τρίχωμα και ήπια διάρροια, εμφάνιση αναιμίας μαζί με μώλωπες και υποδόρια αιμορραγία είναι επίσης συμπτώματα αφλατοξίκωσης. Η ασθένεια μπορεί επίσης να επηρεάσει την αναπαραγωγική αποτελεσματικότητα, συμπεριλαμβανομένων των μη φυσιολογικών οιστρικών κύκλων και των αμβλώσεων.

Για πολλά είδη, τα αρσενικά είναι πιο ευάλωτα από τα θηλυκά, και γενικά, τα νεαρά είναι πολύ πιο ευαίσθητα από τα ενήλικα. Οι αφλατοξίνες επηρεάζουν επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα. Μεταξύ των αποτελεσμάτων ανοσοκαταστολής που παρουσιάζεται σε πουλερικά και σε άλλα μοντέλα ζώων είναι απλασία του θύμου τον μειωμένο αριθμό και τη δραστηριότητα των T κυττάρων, τη μειωμένη απόκριση αντισωμάτων, την καταστολή της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας και μείωση των χημικών συστατικών, όπως συμπλήρωμα (C4), ιντερφερόνη, IgG και IgA. Όλες αυτές

οι αλλαγές συμβάλλουν στην εμφάνιση ταυτόχρονων λοιμώξεων, ειδικά για ιούς και βακτηριακούς παράγοντες, που σχετίζονται με την έκθεση σε μολυσμένες ζωοτροφές με αφλατοξίνες.

3.5.1 Επιδράσεις των αφλατοξινών στο αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού ζώου.

Όσον αφορά το αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα των ζώων, οι περισσότερες αναφορές αφορούν τις πιθανές επιδράσεις της αφλατοξίνης στο μέγεθος και το βάρος των γεννητικών οργάνων, την παραγωγή σπέρματος, τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα και τη μορφολογία και τη συγκέντρωση ορμονών.

Πιο συγκεκριμένα, έρευνα για την αναπαραγωγή πειραματόζων μετά από έκθεση σε αφλατοξίνη έδειξε ότι η χορήγηση αφλατοξίνης σε αρουραίους είχε ως αποτέλεσμα μείωση του μεγέθους και του βάρους των όρχεων και σημαντική μείωση της συγκέντρωσης οιστρογόνων στο αίμα. Οι ερευνητές εικάζουν ότι η χορήγηση σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει διακοπή της παραγωγής σπέρματος. Στους μύες, η εφαρμογή της αφλατοξίνης οδήγησε σε μείωση της ικανότητας γονιμοποίησης του σπέρματος, ενώ το ποσοστό του σπέρματος με ανώμαλη μορφολογία αυξήθηκε σημαντικά.

Στα πουλερικά, μετά από 4 εβδομάδες κατάποσης 20 μg αφλατοξίνης/g τροφής, το βάρος των όρχεων και ο όγκος της εκσπερμάτωσης μειώθηκαν, αλλά η ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος δεν επηρεάστηκε. Σε αλέκτορες, που χορηγήθηκε αφλατοξίνη B1, σημειώθηκαν ατροφία των όρχεων, αύξηση του ποσοστού των σπερματοζωαρίων με μορφολογικές ανωμαλίες και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε σπερματογένεση. Επίσης, σε αρσενικούς βούβαλους, στους οποίους χορηγήθηκαν αφλατοξίνες B και G, παρατηρήθηκαν μορφολογικές ανωμαλίες των σπερματοζωαρίων σε ποσοστό 54%, καθώς και μείωση του αριθμού των ζωντανών σπερματοζωαρίων κατά 10,31%.

3.5.2 Επιδράσεις των αφλατοξινών στο αναπαραγωγικό σύστημα του θηλυκού ζώου.

Η επίδραση της αφλατοξίνης στο αναπαραγωγικό σύστημα θηλυκών ζώων σχετίζεται με αλλαγές στη σεξουαλική ωριμότητα, την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων, τη συγκέντρωση ορμονών, την εγκυμοσύνη και στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Οι ερευνητές χορήγησαν αφλατοξίνη Β1 στους μυς των εγκύων γυναικών και διαπίστωσαν τη συγκέντρωσή της σε διάφορα όργανα του εμβρύου. Διαπίστωσαν ότι τα μάτια και ο ρινικός βλεννογόνος είναι οι ιστοί με την υψηλότερη συγκέντρωση αφλατοξίνης και η συγκέντρωσή του στο ήπαρ του εμβρύου είναι χαμηλότερη από εκείνη στο ήπαρ της μητέρας. Η κατανάλωση αφλατοξινών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσει καθυστερήσεις στην ανάπτυξη του μεγέθους του εμβρύου. Επιπλέον, τα έμβρυα των μυών που έλαβαν αφλατοξίνη έδειξαν διάφορες μορφολογικές ανωμαλίες.

Δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τη σχέση μεταξύ της αφλατοξίνης και της αποβολής. Όταν σε μικρό αριθμό αγελάδων, παρατηρήθηκαν αποβολές στο τελευταίο τρίτο της κυοφορίας, ο μόνος ενοχοποιητικός παράγοντας που εντοπίστηκε ήταν η παρουσία της αφλατοξίνης Β1 στην τροφή. Η χορήγηση αφλατοξινών στις όρνιθες, σε ποσότητα 5 ή 10 pg/g τροφής, μπορεί να μειώσει την παραγωγή και την εκκόλαψη των αυγών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Οι καλές πρακτικές παρασκευής και οι καλές πρακτικές αποθήκευσης μπορούν να μειώσουν τη συγκέντρωση του AFB1 στις ζωοτροφές. Στην περίπτωση σοβαρών λοιμώξεων για μεγάλο χρονικό διάστημα, ορισμένα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα ζώα μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία που μπορεί να επηρεάσουν την τρέχουσα και μακροπρόθεσμη απόδοση.

Ορισμένες πρακτικές δυσκολίες στη λήψη προληπτικών μέτρων κατά της μόλυνσης από αφλατοξίνες στην άγρια φύση έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων απολύμανσης, υπό την προϋπόθεση ότι είναι ασφαλείς, αποτελεσματικές, φιλικές προς το περιβάλλον και έχουν ευνοϊκή σχέση κόστους-οφέλους. Η εφαρμογή ενός προγράμματος πρόληψης μπορεί να περιλαμβάνει όχι μόνο την πρόληψη του σχηματισμού αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα, αλλά και την απομάκρυνσή τους μέσω μεθόδων απολύμανσης ή αποτοξίνωσης.

Είναι σημαντικό ότι το σχέδιο απαιτεί τακτική ανάλυση και εκπαίδευση τροφίμων, ενημέρωση και επικοινωνία με τις αρχές ασφάλειας τροφίμων. Συμφωνείται ότι η μόλυνση των τροφίμων από την αφλατοξίνη είναι αναπόφευκτη. Ως εκ τούτου, έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι θεραπείας, όπως φυσικές, χημικές και βιολογικές μέθοδοι.

4.1 Φυσικοί

Η φυσική αντιμετώπιση περιλαμβάνει :

- μηχανικό διαχωρισμό πυκνότητας
- απενεργοποίηση θερμότητας
- υπεριώδες φως
- ιονίζουσα ακτινοβολία ή εκχύλιση με διαλύτη.
- προσθήκη ουσιών μέσα στην τροφή των ζώων που δεσμεύουν ή/και απενεργοποιούν τις μυκοτοξίνες.

Μία φυσική μέθοδος μείωσης αφλατοξινών είναι ο κλινοπτιλόλιθος ο οποίος έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός έναντι της αφλατοξίνης, όταν χρησιμοποιείται σε ορτύκια με ποσοστό 0,5%, που λαμβάνουν 2 mg αφλατοξίνης την ημέρα, και σε ποσοστά 1,25% και 2,5% στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων που λαμβάνουν χρησιμοποιούνται 2,5 mg αφλατοξίνης ανά ημέρα. Η παρουσία του κλινοπτιλόλιθου βρέθηκε ότι αύξησε την κατανάλωση τροφής, μείωσε τον βαθμό ιστοπαθολογικής βλάβης και βελτίωσε τις βιοχημικές και αιτιολογικές παραμέτρους μολυσμένων πτηνών. Όμως δεν φαίνεται να είναι τόσο αποτελεσματικός όταν η παραπάνω ποσότητα κλινοπτιλόλιθου προστίθεται σε

σιτηρέσια ορνιθίων με μικρότερη περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες, της τάξης των 50 και 100 ppb ή όταν συμμετέχει σε μικρή αναλογία (0,5%) στα σιτηρέσια. Σε in vitro πειραματισμούς έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύει τις αφλατοξίνες B1 και G2 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% και σε χρόνο μικρότερο από μια ώρα.

4.2 Βιολογικοί

Ο βιολογικός έλεγχος περιλαμβάνει την εφαρμογή διαφόρων μικροοργανισμών, όπως βακτηρίων, σαπροφυτικών ζυμομυκήτων ή μη τοξικών στελεχών του *Aspergillus flavus*, για τη μείωση των τοξικών στελεχών που προκαλούνται από τον ανταγωνισμό. Επιπλέον, έχουν αποδειχθεί ότι διάφορα βακτήρια και διάφοροι μύκητες συμβάλλουν στην αποτοξίνωση ή την αποικοδόμηση της B1 αφλατοξίνης. Αν η βιολογική καταπολέμηση εντοπιστεί στη χρήση μη-τοξικογόνων στελεχών, αυτά θα πρέπει να είναι ανταγωνιστικά ως προς τα τοξικογόνα για να επικρατήσουν. Πρέπει να ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες βλαστικής συμβατότητας έτσι ώστε να μην αναστομώνονται και μετατραπούν σε τοξικογόνα.

Αρκετές χώρες έχουν αναπτύξει επιτυχώς ένα εγχώριο προϊόν βιολογικής ανάλυσης αφλατοξίνης που συνήθως αναφέρεται ως Aflasafe. Τα γεγονότα έχουν αποδείξει ότι τα προϊόντα Aflasafe μπορούν να μειώσουν συνεχώς τη ρύπανση της αφλατοξίνης στο καλαμπόκι και τα φιστίκια κατά 80-99% κατά την ανάπτυξη των καλλιεργειών και την αποθήκευση μετά τη συγκομιδή σε πολλές χώρες της Αφρικής. Τα προϊόντα Aflasafe έχουν καταχωριστεί για εμπορική χρήση στην Κένυα, τη Νιγηρία, τη Σενεγάλη και τη Γκάμπια και αναπτύσσονται σε επτά άλλες αφρικάνικες χώρες. Το [Mycofix[®] 5.0](#) δρα έναντι ενός ευρύτερου φάσματος τοξινών συγκριτικά με οποιοδήποτε άλλο προϊόν. Περιέχει τα τρία πιστοποιημένα από την ΕΕ πρόσθετα ζωοτροφών που έχουν αποδειχθεί ότι εξουδετερώνουν τις μυκοτοξίνες. Προσφέρει αυξημένη βιοπροστασία που ενισχύει το συκώτι, το ανοσοποιητικό σύστημα και την λειτουργία του εντερικού φραγμού. Επίσης, το [Mycofix[®]](#) απορροφά επιτυχώς τις βλαβερές ενδοτοξίνες ακόμη και με παρουσία αφλατοξινών.

Οι μέθοδοι απολύμανσης για αφλατοξίνες πρέπει:

- Να απενεργοποιούν, να καταστρέφουν ή να αφαιρούν τις αφλατοξίνες.
- Να μην οδηγούν σε εναπόθεση τοξικών ουσιών, μεταβολιτών ή υποπροϊόντων σε τρόφιμα ή ζωοτροφές.
- Να διατηρούν την αξία των θρεπτικών συστατικών και την δυνατότητα αποδοχής των ζωοτροφών του προϊόντος ή του εμπορεύματος.
- Να μην οδηγεί σε σημαντικές αλλοιώσεις των τεχνολογικών ιδιοτήτων του προϊόντος.

- Να καταστρέφουν τα μυκητιακά σπόρια, εάν είναι δυνατόν.
- Να είναι άμεσα διαθέσιμοι, εύκολα χρησιμοποιούμενοι και φθινοί, εάν είναι δυνατόν.

Η βιολογική καταπολέμηση περιλαμβάνει την εφαρμογή διαφόρων μικροοργανισμών όπως βακτήρια, σαπροφυτικές ζύμες ή μη-τοξικογόνα στελέχη του *A.flavus* (Zanon et al., 2013) με στόχο τη μείωση των τοξικογόνων στελεχών λόγω ανταγωνισμού. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι διάφορα είδη βακτηρίων όπως τα *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Flavobacterium* και διάφορα είδη μυκήτων όπως *Trichoderma*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Sporotrichum* είτε συμβάλλουν στην αποτοξικοποίηση, είτε στην αποικοδόμηση της B1 αφλατοξίνης (Tsitsigiannis et al., 2012). Αν η βιολογική καταπολέμηση εντοπιστεί στη χρήση μη-τοξικογόνων στελεχών, αυτά θα πρέπει να είναι ανταγωνιστικά ως προς τα τοξικογόνα για να επικρατήσουν. Θα πρέπει να ανήκουν σε διαφορετική ομάδα βλαστικής συμβατότητας έτσι ώστε να μην αναστομώνονται και μετατραπούν σε τοξικογόνα. Η εφαρμογή των μη-τοξικογόνων στελεχών στην Αμερική είναι μια αναγνωρισμένη και πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική με θεαματικά αποτελέσματα. Ήδη έχουν πάρει παγκοσμίως έγκριση για την καλλιέργεια του καλαμποκιού 3 σκευάσματα μη- τοξικογόνων στελεχών (*Afla-guard®*, *Afla-safe®*, *AF36®*). Αντίστοιχες προσπάθειες έχουν γίνει και σε άλλες περιοχές συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας (Tsitsigiannis et al., 2012). Επίσης, τα τελευταία χρόνια γίνεται αρκετή προσπάθεια, τόσο από κρατικά και πανεπιστημιακά εργαστήρια όσο και από μεγάλες εταιρείες παραγωγής φυτοφαρμάκων, για την αξιολόγηση και έγκριση μυκητοκτόνων και βιολογικών παραγόντων (βιο-αντιπαθογονικά) αποτελεσματικών στην αντιμετώπιση μυκοτοξικογόνων μυκήτων και την ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών φυτοπροστασίας με σκοπό την πρόληψη της προσβολής γεωργικών προϊόντων και την προστασία των καλλιεργειών στον αγρό.

Βιολογικά σκευάσματα

Το TOXFİN™ είναι μια βελτιστοποιημένη και αποκλειστική φόρμουλα καθαρισμένων και ενεργοποιημένων προσροφητικών που προστατεύει από ένα ευρύ φάσμα μυκοτοξινών. Δεσμεύοντας τις μυκοτοξίνες στο γαστρεντερικό σωλήνα, μειώνει την απορρόφησή τους και προωθεί την απέκκρισή τους από το σώμα των ζώων.

Η σειρά TOXFIN της εταιρείας KEMIN περιλαμβάνει τρία κύρια προϊόντα:

1. TOXFIN Dry και TOXFIN Green Dry (για βιολογική παραγωγή)
2. TOXFIN XL
3. TOXFIN CARE

1. TOXFIN Dry.

Το TOXFIN Dry είναι ένα προσεκτικά επιλεγμένο μείγμα μοναδικών ενεργοποιημένων προσροφητικών ουσιών (π.χ. μπεντονίτης (1m558) που πληρεί τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1060/2013 ως συνδετικό αφλατοξίνης B1) που δεσμεύει τις σχετικές μυκοτοξίνες κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, μειώνοντας τη μυκοτοξίνη από το σώμα των ζώων. Το TOXFIN™ Dry έχει αποδειχθεί ότι προάγει την απέκκριση διαφορετικών μυκοτοξινών όπως η αφλατοξίνη B1, η ωχρατοξίνη A, τα τριχοθηκένια και η κιτρίνη.

Τα οφέλη του TOXFIN Dry:

- Προστατεύει το ζώο από απειλές μυκοτοξινών.
- Μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα των μυκοτοξινών των ζωοτροφών στο γαστρεντερικό σωλήνα και προάγει την απέκκριση μυκοτοξινών μέσω των κοπράνων.
- Διατηρεί τη διαθεσιμότητα των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών στο ζώο.
- Μειώνει τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη μυκοτοξίκωση.
- Αποτρέπει τη μείωση της απόδοσης που προκαλείται από μυκοτοξίκωση.

2. TOXFIN XL.

Το TOXFIN XL είναι ένα προσεκτικά επιλεγμένο μείγμα μοναδικών ενεργοποιημένων προσροφητικών ουσιών (π.χ. μπεντονίτης (1m558) που πληρεί τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1060/2013 ως συνδετικό αφλατοξίνης B1) ενισχυμένο με ένα ειδικά ενεργοποιημένο αργιλώδες ορυκτό που δεσμεύει τις σχετικές μυκοτοξίνες κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και προωθώντας την απέκκρισή τους από το σώμα του ζώου.

Τα οφέλη του TOXFIN XL:

- Προστατεύει το ζώο από απειλές μυκοτοξινών.
- Μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα των μυκοτοξινών των ζωοτροφών στο γαστρεντερικό σωλήνα και προάγει την απέκκριση μυκοτοξινών μέσω των κοπράνων.
- Διατηρεί τη διαθεσιμότητα των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών στο ζώο.
- Μειώνει τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη μυκοτοξίκωση.
- Αποτρέπει τη μείωση της απόδοσης που προκαλείται από μυκοτοξίκωση.

3. TOXFIN CARE.

Μια λύση όλα σε ένα για την αντιμετώπιση των δυσμενών επιπτώσεων των μυκοτοξινών στα ζώα συνδυάζοντας διαφορετικές στρατηγικές: Από την εξάλειψη των μυκοτοξινών στην προστασία των οργάνων και την υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος: Η προστασία του ζώου από τις αρνητικές επιπτώσεις των μυκοτοξινών είναι προτεραιότητα.

- Μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα.
- Αποτρέπει το οξειδωτικό στρες με φυτικά εκχυλίσματα.
- Υποστηρίζει και προστατεύει το συκώτι με φυτικά εκχυλίσματα.
- Ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα με μοναδική βήτα-γλυκάνη που προέρχεται από φύκια.

4.3 Χημικοί

Οι χημικές ενώσεις έχουν κυρίαρχο ρόλο στη χημική φυτοπροστασία και χωρίς καμία αμφιβολία θα συνεχίσουν να είναι άκρως σημαντικές στην προσπάθεια του ανθρώπου να καταπολεμήσει διάφορα παθογόνα με τόσο σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία όπως είναι οι αφλατοξίνες. Η περαιτέρω ανάπτυξη και ορθή χρήση των χημικών σκευασμάτων για τη προστασία των καλλιεργειών θα είναι σίγουρα μία από τις κύριες παραμέτρους για την εξασφάλιση της υγιούς διατροφής του ανθρώπου, απαλλαγμένη από τοξίνες που οφείλονται σε μόλυνση από μύκητες του γένους *Aspergillus*, διότι σε κάθε περίπτωση οι καλλιέργειες που δεν προστατεύονται, κινδυνεύουν πολύ περισσότερο από προσβολή μυκοτοξικογόνων μυκήτων.

Η χημική αντιμετώπιση τέτοιων μυκήτων όπως ο *A. flavus* περιλαμβάνει τη χρήση δραστικών ουσιών όπως cyprodinil, fludioxonil, azoxystrobin κ.α. σε μορφή σκευασμάτων (Dimakoroulou et al., 2002). Οι τρόποι δράσης των σκευασμάτων αυτών βασίζονται στην παρεμπόδιση βλάστησης σπορίων, παρεμπόδιση ανάπτυξης βλαστικού σωλήνα και μυκηλίου, στην εξειδικευμένη παρεμπόδιση ροής των ηλεκτρονίων στο επίπεδο του συμπλόκου των κυτοχρωμάτων (σύμπλοκο III) της αναπνευστικής αλυσίδας, την παρεμπόδιση ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDC) της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων κ.α. Για την καλλιέργεια του καλαμποκιού δεν υπάρχουν εγκεκριμένα σκευάσματα για την αντιμετώπιση των μυκήτων του γένους *Aspergillus* στη χώρα μας, όμως οι ανωτέρω δραστικές ουσίες έχουν πάρει έγκριση υπό τη μορφή των σκευασμάτων Switch (25% w/w fludioxonil, 37,5% w/w cyprodinil), Chorus (50% β/β cyprodinil) και Geoxe (50% β/β fludioxonil) για την αντιμετώπιση του *A.*

carbonarius σε καλλιέργεια αμπελιού. Γίνονται συνεχώς δοκιμές για εύρεση νέων δραστικών ουσιών, αλλά και αξιολόγηση των ήδη υπαρχόντων για την αντιμετώπιση του *A. flavus* και των μυκοτοξινών που παράγει στην καλλιέργεια καλαμποκιού (Lagogianni C., 2015).

4.4 Ζεόλιθος

Ο Ζεόλιθος είναι ένα φυσικό πορώδες ορυκτό με τεράστια ιοντοανταλλακτική ικανότητα και χάρη σ' αυτήν, μπορεί να φιλτράρει το νερό δεσμεύοντας μέταλλα και οργανικές ενώσεις. Σε αντίθεση με τα περισσότερα τεκτοφυριτικά ορυκτά η δομή των ζεόλιθων είναι αξιοσημείωτα ανοικτή, με όγκους κενών που φθάνουν το 50% του αφυδατωμένου μέλους.

Επιτρέπουν χώρο στα μεγάλα κατιόντα όπως το νάτριο, το κάλιο, το βάριο και το ασβέστιο, ακόμη και στα σχετικά μεγάλα μόρια και στις ομάδες κατιόντων όπως το ύδωρ, η αμμωνία, τα ιόντα ανθρακικού άλατος και τα ιόντα νιτρικών αλάτων. Μερικοί το ονομάζουν «πέτρα της ζωής» ή «μαγική πέτρα». Το όνομα του προέρχεται από τις λέξεις ζέω = βράζω και λίθος = πέτρα γιατί όταν θερμανθεί αποβάλλει, με τη μορφή φυσαλίδων, το νερό που έχει συγκρατήσει, δίνοντας την εντύπωση ότι βράζει. Στη φύση απαντώνται πάνω από 30 είδη φυσικού ζεόλιθου ενώ παρασκευάζονται και πολλά είδη βιομηχανικού ζεόλιθου. Ο καλύτερης ποιότητας φυσικός ζεόλιθος είναι αυτός που περιέχει Κλινοπτιλόλιθο σε ποσοστό άνω του 90%. Κοιτάσματα ζεόλιθου υπάρχουν και στη χώρα μας σε αρκετές περιοχές της Βόρειας Ελλάδας (Πετρωτές Έβρου) με πολύ μεγάλη καθαρότητα (95%) αλλά δυστυχώς δεν έχει δοθεί ακόμη άδεια εκμετάλλευσης του κοιτάσματος και στις Κυκλάδες.

Η χρήση του ζεόλιθου όμως, γενικότερα είναι περιορισμένη και πρέπει να αυξηθεί γιατί έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει πολύτιμα πλεονεκτήματα στη φυτοπροστασία καθώς μειώνει τα ποσοστά ασθένειας εδαφογενών παθογόνων (Lagogianni et al., 2015). Αξίζει να αναφερθεί και η δράση του ζεολίθου ως συμπλήρωμα διατροφής καθώς δεσμεύει και αποβάλλει τις βλαβερές ουσίες που εισχωρούν στον οργανισμό. Πολλά από τα οφέλη του είναι τα παρακάτω: βελτίωση λειτουργίας ζωτικών οργάνων, απορρόφηση θρεπτικών ουσιών από τον πεπτικό σωλήνα, δημιουργεί αίσθηση ευεξίας και τέλος λειτουργεί και σαν φυσικό ισοτονικό (Λαγογιάννη, X. (2015).

4.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

4.5.1 Μπεντονίτης.

Ο αργιλώδης μπεντονίτης μπορεί να δρα ως ένας μαγνήτης και δεσμεύει τις τοξίνες. Ο μπεντονίτης νατρίου και ο μπεντονίτης ασβεστίου είναι σημαντικοί τύποι μπεντονίτη αργύρου. Όταν ενεργοποιείται με νερό, ο μπεντονίτης νατρίου έχει ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες και το μέγεθός του μπορεί να επεκταθεί έξι φορές. Αυτό το καθιστά πολύ απορροφήσιμο και χρήσιμο για την κατάποση τοξινών. Το μέγεθος του ασβεστίου μπεντονίτη είναι μικρότερο από το νάτριο μπεντονίτη. Αυτά τα μικροσκοπικά σωματίδια μπορούν να περάσουν από το τοίχωμα του παχέος εντέρου και να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος, όπου απελευθερώνουν τοξίνες και αφήνουν πίσω μέταλλα. Το αρνητικό φορτίο του μορίου ενισχύει την απόδοση προσρόφησής του. Τα απορροφητικά μπορούν να περάσουν από τα έντερα και να προσελκύσουν θετικά φορτισμένες τοξίνες.

Αυτό το μόριο συνδέεται με τις τοξίνες μέσω ανταλλαγής ιόντων, έτσι ώστε τα τοξικά μόρια να συνδυάζονται και να απορροφώνται σε μόρια αργίλου. Ο μπεντονίτης είναι ικανός για μέγιστη αποτοξίνωση και έχει χαμηλό αντίκτυπο στις θρεπτικές ιδιότητες του γάλακτος. Στην παραγωγή ζωοτροφών με σβόλους, ο πηλός χρησιμοποιείται για τη δέσμευση και την έκπλυση του AFM1, και καθιστά το περιεχόμενο AFM1 χαμηλότερο από τα ευρωπαϊκά πρότυπα τοξινών. Ο εμπλουτισμός της τροφής με μπεντονίτη νατρίου και ο ενεργός άνθρακας μπορεί να μειώσουν την περιεκτικότητα AFM1 στα γαλακτοκομικά προϊόντα πρώιμων γαλακτοπαραγωγών αιγών.

4.5.2 Προβιοτικά.

Η έννοια των προβιοτικών είναι «για τη ζωή», αλλά στη βιολογία, ο όρος χρησιμοποιείται για να ονομάσει μικροοργανισμούς που είναι οικονομικά αποδοτικοί για τον άνθρωπο και τα ζώα. Τα προβιοτικά έχουν πολλά πλεονεκτήματα. Μπορούν δυνητικά να μειώσουν τον αριθμό των γαστρεντερικών παθογόνων, να ανακουφίσουν τον γαστρεντερικό πόνο, να ενισχύσουν το ανοσοποιητικό σύστημα, να επηρεάσουν και να βελτιώσουν τη λειτουργία του δέρματος, να ρυθμίσουν το γαστρεντερικό σωλήνα και να μειώσουν το φούσκωμα και να προκαλέσουν αντίσταση στη χοληδόχο κύστη, προστατεύοντας έτσι τις πρωτεΐνες του DNA και τα λιπίδια από την οξείδωση χλωρίδα, ενώ λαμβάνουν αντιβιοτική θεραπεία. Τα προβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση ή την αποτοξίνωση των τοξινών στο γάλα, στα γαλακτοκομικά προϊόντα και σε άλλες τροφές. Τέτοιοι χρήσιμοι

μικροοργανισμοί μπορεί να προστεθούν στη διατροφή των βοοειδών ή μπορεί να χρησιμοποιηθούν στα διαφορετικά στάδια επεξεργασίας γάλακτος.

4.5.3 Ενεργός άνθρακας.

Ο ενεργός άνθρακας παράγεται με επεξεργασία ανθρακούχων υλικών και μπορεί να εφαρμοστεί για τον καθαρισμό υγρών και αερίων. Ο ενεργός άνθρακας έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την περιεκτικότητα του AFM1 στο μολυσμένο γάλα. Σύμφωνα με αναφορές, η προσθήκη μπεντονίτη νατρίου και ενεργού άνθρακα (1%) στην πρώτη παρτίδα γαλακτοκομικών αιγών μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της AFM1 στο γάλα χωρίς να αλλάξει τη σύνθεση του γάλακτος.

4.5.4 Φυτικά εκχυλίσματα.

Μια ενδιαφέρουσα τεχνική για τη μείωση των τοξινών, ειδικά της AFM1 στα τρόφιμα, είναι η χρήση φυτικών εκχυλισμάτων. Ορισμένα φυτά όπως το μπρόκολο, το σκόρδο, το μαύρο κύμινο και η κουρκουμίνη συμβάλλουν στη μείωση των αφλατοξινών. Το εκχύλισμα μπορεί να έχει ανασταλτική επίδραση στις αφλατοξίνες. Τα εκχυλίσματα είναι επίσης γνωστά ως αντιοξειδωτικά, αντιμυκητιασικά και αντιφλεγμονώδη φάρμακα λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν μόλυνση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ

Δεδομένου ότι οι αφλατοξίνες έχουν αποδειχθεί ότι έχουν τοξικές επιδράσεις σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, απαιτούνται ευαίσθητες, αξιόπιστες και ακριβείς αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανίχνευση AFM1 στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ELISA, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), υγρή χρωματογραφία (LC) και η υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μαζών (LC-MS).

5.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Η ELISA αποτελεί έναν βιοχημικό προσδιορισμό που χρησιμοποιεί αντισώματα, στον οποίο, οι χρωματικές αλλαγές που προκαλούνται από ένζυμα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της παρουσίας αντιγόνων (πρωτεΐνες, πεπτίδια, ορμόνες κ.λπ.) ή αντισώματα σε ένα δεδομένο δείγμα. Αποτελεί μια τεχνική, που επιτρέπει την ανίχνευση των αναλυτών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, ακόμη και σε σύνθετα μίγματα αντιγόνων όταν το ειδικό αντίσωμα ανίχνευσης υπάρχει σε σχετικά μικρές ποσότητες, με απλή οργάνολογία χωρίς τη χρήση επικίνδυνων ανιχνευτών και αντιδραστηρίων. Για την ανίχνευση αυτών των μορίων, χρησιμοποιούνται αντισώματα ή αντιγόνα. Το αντιγόνο στην υγρή φάση ακινητοποιείται σε στερεά φάση. Το αντιγόνο στη συνέχεια αντιδρά με ένα ειδικό αντίσωμα, το οποίο ανιχνεύεται από ένα δευτερεύον αντίσωμα με ένζυμο. Η ανάπτυξη χρώματος χρησιμοποιώντας το χρωμογόνο υπόστρωμα αντιστοιχεί στην παρουσία του αντιγόνου.

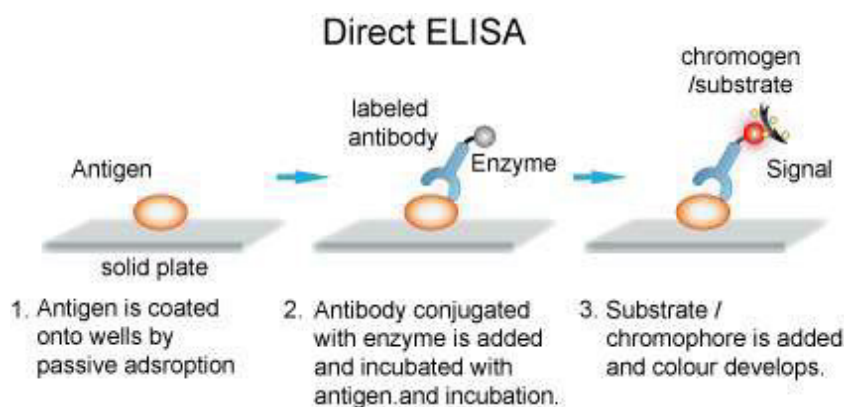
Υπάρχουν διάφορες μορφές της τεχνικής ELISA:

5.1.1 Άμεση ELISA

Αυτή είναι η απλούστερη μορφή της τεχνικής ELISA. Το δείγμα πρώτα προστίθεται στο φρεάτιο μικροπλακιδίων και επωάζεται. Το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο, θα προσροφηθεί στην επιφάνεια του φρεατίου. Έπειτα τα φρεάτια πλένονται αφήνοντας μόνο το προσροφημένο αντιγόνο. Στη συνέχεια ένα αντίσωμα, που έχει ιχνηθετηθεί με ένζυμο και είναι συμπληρωματικό προς το αντιγόνο, προστίθεται στα φρεάτια όπου δεσμεύεται με το αντιγόνο. Το μικροπλακίδιο εκπλένεται ξανά και το δεσμευμένο σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος παραμένει στην επιφάνεια του φρεατίου. Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα, το οποίο θα μετατραπεί σε ανιχνεύσιμο προϊόν από το ένζυμο. Η ανίχνευση

μπορεί να βασίζεται στο χρώμα, το φθορισμό ή τη φωτεινότητα.

Αυτή η μέθοδος είναι ανώτερη από της μεθόδους ELISA επειδή είναι ταχύτερη, επειδή απαιτεί λιγότερα βήματα και απαιτεί μόνο ένα αντίσωμα. Αλλά σε ένα πολύπλοκο δείγμα, επειδή περιέχει της διαφορετικές πρωτεΐνες, θα γίνει προσρόφηση μιας ποικιλίας πρωτεϊνών. Επομένως, εάν η συγκέντρωση του αντιγόνου είναι χαμηλή, η ευαισθησία της δοκιμής μειώνεται. Ένα άλλο πρόβλημα με αυτήν την τεχνική είναι ότι το αντίσωμα πρέπει να συνδέεται με ένα ένζυμο. Πρόκειται για μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία που πρέπει να επαναλαμβάνεται σε οποιαδήποτε δοκιμή ELISA. Της μέθοδοι μπορούν να το αποφύγουν. Παρομοίως, η σύζευξη της αντισώματος με ένα ένζυμο μπορεί να μειώσει τη συγγένεια του αντισώματος με το αντιγόνο, μειώνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου.

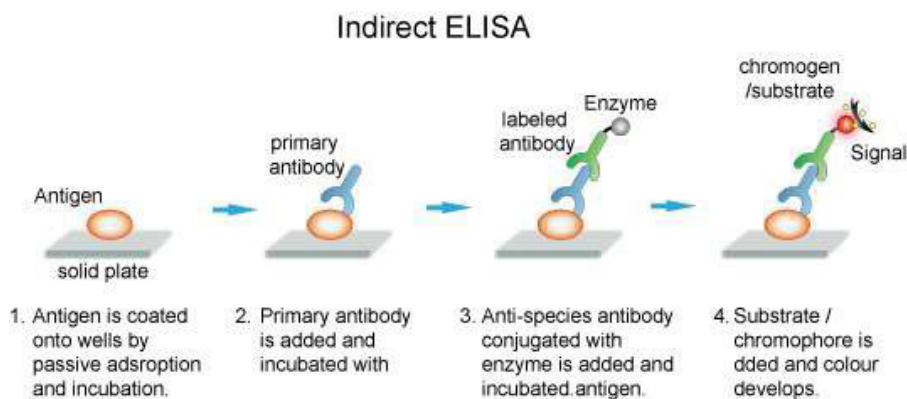


Εικόνα 5.1. Άμεση ELISA

5.1.2 Έμμεση ELISA

Με αυτήν την τεχνική, μπορούν να ανιχνευθούν αντισώματα ή να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους. Σε αυτήν την ανοσοδοκιμασία, ορός ή κάποιο άλλο δείγμα που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα (Ab1) προστίθεται σε μια πλάκα μικροτιτιλοδότησης επικαλυμμένη με το αντίστοιχο αντιγόνο και αφήνεται να αντιδράσει με αυτό. Το ελεύθερο Ab1 πλένεται και απομακρύνεται, και στη συνέχεια ανιχνεύεται προσθέτοντας ένα δευτερεύον αντίσωμα επισημασμένο με ένα ένζυμο που συνδέεται ειδικά με το Ab1 (Ab2). Μετά την απομάκρυνση του ελεύθερου Ab2 με πλύσιμο, προστίθεται το υπόστρωμα ενζύμου. Η ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος, ή προϊόντος φθορισμού ή φωταύγειας που σχηματίζεται μετράται από έναν ειδικό αναλυτή και χρησιμοποιώντας μία πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων Ab1, συγκρίνεται με την ποσότητα του προϊόντος που παράγεται από την ίδια σειρά αντιδράσεων. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνήθως ένα πολυκλωνικό αντίσωμα που προέρχεται από διαφορετικά B κύτταρα, οπότε θα ανταποκρίνεται σε

διαφορετικούς επιτόπους του πρωτογενούς αντισώματος. Αυτό επιτρέπει σε πολλαπλά δευτερεύοντα αντισώματα να συνδέονται με το ίδιο πρωτογενές αντίσωμα, ενισχύοντας έτσι το σήμα και αυξάνοντας την ευαισθησία της ανάλυσης. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι αποφεύγει τη σύζευξη του πρωτογενούς αντισώματος με το ένζυμο, αποφεύγοντας έτσι τα προβλήματα που αναφέρονται στην άμεση ELISA. Το κύριο μειονέκτημα της έμμεσης ELISA είναι ότι η μέθοδος ακινητοποίησης του αντιγόνου δεν είναι ειδική.



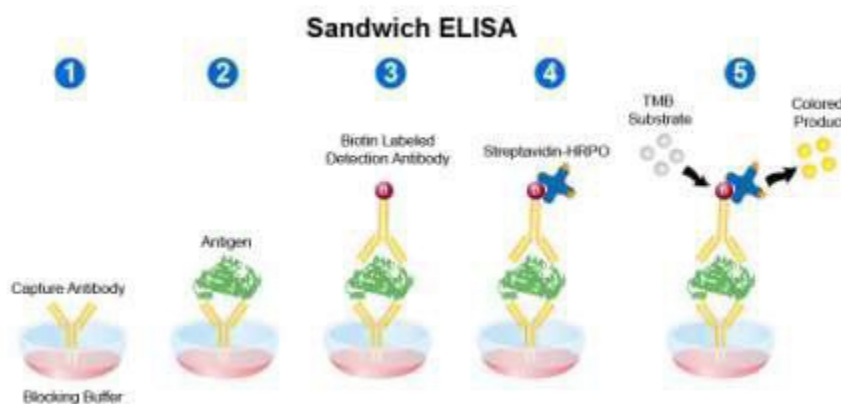
Εικόνα 5.2. Έμμεση ELISA

5.1.3 Sandwich ELISA

Η τεχνική sandwich χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενός ειδικού αντιγόνου στο δείγμα. Μια γνωστή ποσότητα δεσμευμένου αντισώματος ακινητοποιείται στην επιφάνεια του φρεατίου για να συλλάβει το επιθυμητό αντιγόνο. Η μη ειδική θέση δέσμευσης της αλβουμίνης βόειου ορού αναστέλλεται και το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο προστίθεται στο φρεάτιο, το οποίο θα αλληλεπιδρά με το ακινητοποιημένο ένζυμο. Μετά την έκπλυση ένα δεύτερο αντίσωμα που είναι ιχνηθετημένο με ένζυμο προστίθεται, το οποίο αλληλεπιδρά με διαφορετικό επίτοπο για να σχηματίσει ένα σάντουιτς αντιγόνου. Το μη δεσμευμένο συζυγές αντισώματος-ενζύμου απομακρύνεται με έκπλυση. Το υπόστρωμα στη συνέχεια προστίθεται για ενζυματική μετατροπή σε ένα ποσοτικοποιήσιμο έγχρωμο προϊόν.

Η χρήση καθαρά ειδικών αντισωμάτων για τη σύλληψη του αντιγόνου εξαλείφει την ανάγκη καθαρισμού του αντιγόνου από άλλα μίγματα αντιγόνων, απλοποιώντας έτσι τον προσδιορισμό και αυξάνοντας την ειδικότητα και την ευαισθησία της μεθόδου σε αντίθεση με τις άμεσες και έμμεσες μεθόδους που εμφανίζουν μείωση της ευαισθησίας που παρατηρείται σε πολύπλοκα δείγματα λόγω προσρόφησης στο φρεάτιο μιας ποικιλίας πρωτεϊνών. Σε μια κοινή παραλλαγή αυτού του ανοσοπροσδιορισμού, χρησιμοποιείται ένα δεύτερο συζευγμένο με βιοτίνη αντίσωμα, ακολουθούμενο από την προσθήκη της ενζυμικής επισημασμένης αβιδίνης. Κάθε μόριο αντισώματος μπορεί να συζευχθεί με περισσότερα

από ένα μόρια βιοτίνης, έτσι μπορεί να συνδεθεί με περισσότερα από ένα μόρια στρεπταβιδίνης. Επομένως, κάθε μόριο ενζύμου μετατρέπει πολλαπλά υποστρώματα σε προϊόντα, γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία της τεχνολογίας ELISA.

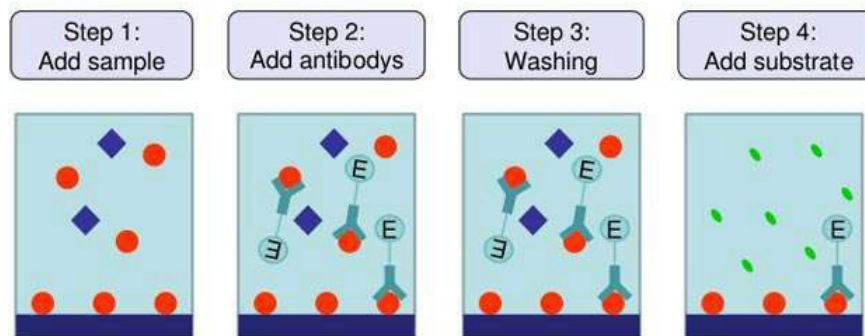


Εικόνα 5.3. Sandwich ELISA

5.1.4 Ανταγωνιστική ELISA

Στην ανταγωνιστική έκδοση του ELISA, το αντίσωμα ή το αντιγόνο απορροφάται στη στερεή φάση, έτσι ώστε να αντιδρά με ένα μείγμα που αποτελείται από μια συγκεκριμένη ποσότητα αντιγόνου ή αντισώματος ιχνηθετημένου με ένζυμο και έναν αναλύτη, αντιγόνο ή αντίσωμα. Μετά την έκπλυση, θα γίνει προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου για να παράγει ένα έγχρωμο προϊόν ή φως. Το αντιγόνο ή το αντίσωμα θα συνδεθεί στη στερεά φάση, και η δραστηριότητα του ενζύμου θα είναι περιορισμένη, δηλαδή, αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του αναλύτη. Το κύριο πλεονέκτημα του ανταγωνιστικού ELISA είναι ότι ακόμη και αν η ποσότητα του ειδικού αντισώματος αντίχενωσης είναι σχετικά μικρή, η ευαισθησία του σε σύνθετα μίγματα αντιγόνων είναι επίσης υψηλή. Ωστόσο, η ευαισθησία του προσδιορισμού εξαρτάται από τη συγγένεια του αντισώματος στο δείγμα, επειδή μπορεί να ποικίλει πολύ. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να εμφανιστούν σε μια ανταγωνιστική δοκιμασία ELISA παρά σε μια ELISA σάντουιτς.

Competitive ELISA



Εικόνα 5.4.: Ανταγωνιστική ELISA

5.1.5: Έμμεση ανταγωνιστική ELISA

Το έμμεσο ανταγωνιστικό ELISA (icELISA) περιλαμβάνει έναν συνδυασμό έμμεσου ELISA και ανταγωνιστικού ELISA. Το αντιγόνο στόχος ακινητοποιείται στην στερεά φάση της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Στη συνέχεια, το ελεύθερο αντιγόνο-στόχος και το αντίσωμα αφήνονται να επωαστούν και υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ του ακινητοποιημένου αντιγόνου και του ελεύθερου αντιγόνου έναντι των αντισωμάτων. Το πρώτο αντίσωμα που συνδέεται με το ακινητοποιημένο αντιγόνο ανιχνεύεται από ένα δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο. Όπως με το ανταγωνιστικό ELISA, στο icELISA, το σήμα μειώνεται καθώς αυξάνεται η ποσότητα του ελεύθερου αντιγόνου. Όταν το απτένιο εκτίθεται στην επιφάνεια της πλάκας μικροτιτλοδότησης, το icELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση μακρομορίων και απτενών.

5.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ELISA

Η ELISA παρουσιάζει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- Απλή διαδικασία.
- Λόγω της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, έχει υψηλό βαθμό εξειδίκευσης και ευαισθησίας.
- Υψηλή απόδοση, επειδή μπορεί να αναλυθεί ταυτόχρονα χωρίς πολύπλοκη προκατεργασία δείγματος.
- Επειδή δεν απαιτεί ραδιενεργά υλικά και μεγάλη ποσότητα οργανικών διαλυτών, είναι συνήθως ασφαλές και φιλικό προς το περιβάλλον.

Ωστόσο, η ELISA εμφανίζει τα ακόλουθα μειονεκτήματα:

- Έντονη εργασία και δαπανηρή παρασκευή αντισώματος επειδή αυτή είναι μια προηγμένη τεχνολογία που απαιτεί ακριβά μέσα κυτταρικής καλλιέργειας για την απόκτηση συγκεκριμένων αντισωμάτων.
- Λόγω ανεπαρκούς αποκλεισμού της επιφάνειας της πλάκας μικροτιτλοδότησης ακινητοποιημένη με αντιγόνο, η πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων είναι υψηλή.

5.2.1 HPLC (High- 46 Performance Liquid Chromatography).

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μία από τις πολλές χρωματογραφικές τεχνικές για το διαχωρισμό και την ανάλυση χημικών μιγμάτων. Η HPLC είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό μη πτητικών ή ευαίσθητων στη θερμότητα ουσιών. Η κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση είναι στερεή ή υγρή ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Η τεχνική αυτή τεχνολογία χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μεγάλου αριθμού ουσιών, όπως αμινοξέων, πρωτεϊνών, υδρογονανθράκων, υδατανθράκων, φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών και άλλων τύπων ενώσεων. Αυτή η ανάλυση χρησιμοποιείται για έρευνα συνθετικής χημείας, μεταβολική έρευνα και ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων. Ο διαχωρισμός του μείγματος της ουσίας βασίζεται στις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κάθε συστατικού και της κινητής φάσης και της στατικής φάσης, οπότε απαιτείται διαφορετικός χρόνος για την έκλυση κάθε ουσίας από τη στήλη. Αυτή η αλληλεπίδραση σχετίζεται με το σχήμα, το μέγεθος και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι χρωματογραφίας, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τον τύπο της προς διάσταση ένωσης και τον υπάρχοντα μηχανισμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των ουσιών που θα διαχωριστούν στις δύο φάσεις. Ειδικότερα έχουμε:

- Η χρωματογραφία προσρόφησης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων.
- Η χρωματογραφία κατανομής εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων.
- Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ιοντικών ενώσεων
- Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ενώσεων

με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000.

5.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC).

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι για την ανάλυση μιγμάτων οργανικών ενώσεων και είναι μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος. Μια τυπική πλάκα TLC είναι ένα πλαστικό φύλλο που έχει επικαλυφθεί με ένα λεπτό στρώμα πυριτικής πηκτής, η οποία είναι μια λευκή σκόνη. Μια μικρή σταγόνα του προς ανάλυση διαλύματος τοποθετείται κοντά στον πυθμένα της πλάκας πάνω στο silica gel (στατική φάση) και στη συνέχεια οι οργανικοί διαλύτες (κινητή φάση) αφήνονται να ανέβουν στην πλάκα.

Καθώς η στατική και η κινητή φάση αλληλοεπιδρούν, τα συστατικά του μίγματος θα χωριστούν μεταξύ των δύο φάσεων. Με βάση την πολικότητα, ορισμένα συστατικά θα έχουν ισχυρότερη συγγένεια για το πολύ πολικό πυριτικό πήκτωμα, ενώ άλλα θα μετακινούνται πιο εύκολα στον διαλύτη, οπότε τα συστατικά του μίγματος θα μετακινούνται πάνω στην πλάκα με διαφορετικούς ρυθμούς.

5.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC).

Η υγρή χρωματογραφία (LC) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό ενώσεων από ένα δείγμα πριν από την ανάλυση και συχνά συνδέεται με φασματομετρία μάζας. Με το LC, ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με τις κινητές και στατικές φάσεις, και ο βαθμός του διαχωρισμού των ενώσεων σχετίζεται με τη συγγένεια κάθε ένωσης για την κινητή φάση.

Μετά από χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, οι ενώσεις εκκλύονται από τη στήλη, αποδιαλυτώνονται στην αέρια φάση και ιονίζονται σε πηγή ιονισμού και μετά εισάγονται στο φασματόμετρο μάζας για ανάλυση μάζας.

Το LC είναι η τεχνική διαχωρισμού επιλογής για μεγαλύτερα και μη πτητικά μόρια όπως πρωτεΐνες και σύνθετα πεπτίδια. Όταν συνδυάζεται με MS, το LC-MS προσφέρει ευρεία κάλυψη δείγματος επειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές χημικές στήλες, όπως υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Είναι επίσης μια ιδανική μέθοδος για το διαχωρισμό των ισομερών, τα οποία έχουν την ίδια μάζα και διαφορετικά δεν θα διαφοροποιηθούν από ένα φασματόμετρο μάζας. Τέλος, το LC συμβάλλει στη μείωση της καταστολής των ιόντων, η οποία συμβαίνει όταν τα μόρια αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και εμποδίζουν τη διαδικασία πλήρους ιονισμού.

5.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ LC-MS / MS.

Ο LC-MS/MS είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση υπολειμματικών χημικών ενώσεων, επιβεβαιωτική ταυτοποίηση μικρών οργανικών μορίων, και επιβεβαίωση και ποσοτικός προσδιορισμός μολυσματικών ουσιών σε δείγματα φαρμακευτικών και τροφίμων.

Το LC-MS/MS λειτουργεί με συνδυασμό χρωματογραφίας και φασματομέτρων μάζας πολλαπλών τετραπόλων. Το χρωματογραφικό σύστημα διαχωρίζει πρώτα τα διάφορα συστατικά, συγκεντρώνοντας την ποσότητα κάθε μεμονωμένου συστατικού που φθάνει στο φασματόμετρο μάζας. Το πρώτο τετράπολο της διαμόρφωσης τριπλού τετραπολίου ιονίζει τα μόρια του αναλύτη. Τα επιλεγμένα μοριακά ιόντα στη συνέχεια τεμαχίζονται στη δεύτερη τετραπόλη και απομονώνονται επιλεκτικά από το τρίτο και τελευταίο τετραπόλιο για μέτρηση από έναν ανιχνευτή. Αυτή η σειρά διαχωρισμού, ιονισμού και επιλεκτικού κατακερματισμού παρέχει εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση. Τα επίπεδα ανίχνευσης που χρησιμοποιούν το LC-MS/MS μπορεί να είναι τόσο ευαίσθητα όσο πολλά μέρη ανά δισεκατομμύριο και είναι σταθερά στο τμήμα ανά εκατομμύριο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.

Λόγω του αντίκτυπου του AFM1 στην ανθρώπινη υγεία, πολλές χώρες έχουν θέσει συγκεκριμένα όρια στις αφλατοξίνες στις ζωοτροφές και στα τρόφιμα. Με τις πρόσφατες εξελίξεις στην επιστήμη και την τεχνολογία, νέοι μέθοδοι τώρα μπορούν να ανιχνεύσουν και να εντοπίσουν αφλατοξίνες στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Λόγω πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της διανομής μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεσματικών αναλυτικών μεθόδων και τοξικολογικών δεδομένων και της προθυμίας των κυβερνητικών υπηρεσιών, ο καθορισμός νομικών ορίων για τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές είναι ένα πολύπλοκο έργο. Περισσότερες από 100 χώρες έχουν θέσει όρια για τις μυκοτοξίνες στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Ωστόσο, άλλες χώρες, ιδίως αναπτυσσόμενες χώρες, δεν έχουν σαφείς κανονισμούς. Επιπλέον, το επιτρεπόμενο όριο AFM1 στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα ποικίλλει από χώρα σε χώρα.

6.1. : Ευρωπαϊκή νομοθεσία

Οι αφλατοξίνες έχουν αναγνωριστεί και νομοθετικά ως επιμολυντές των τροφίμων. Στις περισσότερες χώρες της ΕΕ, το ειδικό όριο της AFM1 στο νωπό, θερμικά επεξεργασμένο γάλα και το γάλα για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα είναι 0,050 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ενώ στο γάλα που προορίζεται για βρέφη είναι 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και για τα διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη το ειδικό όριο της AFM1 είναι 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και το ειδικό όριο της AFB1 είναι 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Επιπλέον έχουν θεσπιστεί μέσω των κανονισμών της Ευρωπαϊκής Ένωσης τα κοινά όρια για AFB1 και ολικές αφλατοξίνες σε φιστίκια, ξηρούς καρπούς, αποξηραμένα φρούτα και δημητριακά.

6.2 Παγκόσμια νομοθεσία

Ειδικοί φορείς όπως το MERCOSUR (Mercado Común del Sur), το ASEAN (As- Ένωση των Εθνών της Νοτιοανατολικής Ασίας), το Συμβούλιο Συνεργασίας του Κόλπου (Gulf Cooperation Council-GCC), και ο ΟΗΕ Codex Alimentarius έχουν θέσει όρια περίπου 0,5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ AFM1 για νωπό γάλα. Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) επιβάλλει ένα μέγιστο όριο για AFM1 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb).

Μυκοτοξίνη	Χώρα	Μέγιστο όριο (mg/kg ή mg/l)	Τρόφιμα	
Αφλατοξίνη B1	Φιλανδία	2	Όλα	
	Γερμανία	2	Όλα	
	Ολλανδία	5	Όλα	
	Βέλγιο	5	Όλα	
	Πορτογαλία	25	φιστίκια	
		5	Παιδική τροφή	
		20	Άλλα	
	Αυστρία	1	Όλα	
		2	Δημητριακά, ξηροί καρποί	
	Ελβετία	1	Όλα	
		2	Καλαμπόκι, δημητριακά	
	Ισπανία	5	Όλα	
	Λουξεμβούργο	5	Όλα	
	Ιρλανδία	5	Όλα	
	Δανία	5	Όλα	
	Ελλάδα	5	Όλα	
			Όλα	
	Αφλατοξίνη B1, B2, G1, G2	Σουηδία	5	Όλα
		Νορβηγία	5	Φιστίκια, καρύδια Βραζιλίας
Φιλανδία		5	Όλα	
Γερμανία		4	Όλα	
		0,05	Ένζυμα και συνθέσεις ενζύμων	
Μεγάλη Βρετανία		4	Ξηροί καρποί και ξηρά σύκα κατά την εισαγωγή και πριν την ταξινόμηση	
Γαλλία		10	Όλα	

Αφλατοξίνη M1	Ιταλία	50	Φιστίκια
	Αυστρία	5 (B2 + G1 +G2)	Όλα
		0,02(M1+B1+B2+ G1+G2)	Παιδική τροφή
	Ελβετία	5 (B2 + G1 +G2)	Όλα
		0,01	Παιδική τροφή
	Η.Π.Α	20	Όλα
	Βέλγιο	5	Φιστίκια
	Βοσνία	1 (B1+G1)	Σιτηρά
		5	Φασόλια
	Σουηδία	0,050	Υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα
	Αυστρία	0,050	Γάλα
	Γερμανία	0,050	Γάλα
	Ολλανδία	0,50	Γάλα
		0,020	Βούτυρο
		0,200	Τυρί
	Ρωσία	0,5	
	Ελβετία	0,020	Παιδικές τροφές
		0,050	Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα
		0,250	Τυρί
	Βέλγιο	0,050	Γάλα
	ΗΠΑ	0,50	Γάλα
	Τσεχική Δημοκρατία	0,1	Παιδικό γάλα
		0,5	Γάλα ενηλίκων

Πίνακας 6.1. Επιτρεπόμενα όρια αφλατοξινών σε διάφορες χώρες

Μυκοτοξίνες	Προϊόντα που προορίζονται για ζωοτροφές	Μέγιστη περιεκτικότητα (ppm , mg/kg) με υγρασία 12%
Αφλατοξίνη B1	Πλήρεις ζωοτροφές για βοοειδή, πρόβατα και αίγες, με εξαίρεση:	0,05
	Γαλακτοπαραγωγές αγελάδες	0,005
	Μοσχάρια και αρνιά	0,01
DOV	Σιτηρά και προϊόντα σιτηρών εκτός από τα υποπροϊόντα αραβοσίτου	8
	Υποπροϊόντα αραβοσίτου	12
	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές εκτός από:	5
	γουρούνι	0.9
Ζεαραλενόνη	μοσχάρια (<4 μήνες), αρνιά και παιδιά	2
	Σιτηρά και προϊόντα σιτηρών εκτός από τα υποπροϊόντα αραβοσίτου:	2
	Υποπροϊόντα αραβοσίτου	3
	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για χοιρίδια και χοιρομητέρες	0.1
	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για χοιρομητέρες και χοίρους προς πάχυνση	0.25
Ωχρατοξίνη A	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για μόσχους, γαλακτοπαραγωγικά βοοειδή, πρόβατα (συμπεριλαμβανομένων των αμνών) και αίγες (συμπεριλαμβανομένων των παιδιών)	0.5
	Σιτηρά και προϊόντα σιτηρών	0.25
	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές:	5
	γουρούνι	0.5
	πουλερικά	0.1

Φουμονισίνη B1+B2	Αραβόσιτος και προϊόντα αραβοσίτου	60
	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για:	
	Χοίροι, άλογα, κουνέλια και ζώα συντροφιάς	5
	ψάρια	10
	Πουλερικά, μόσχοι (<4 μήνες), αμνοί και παιδιά	20
	Ενήλικα μηρυκαστικά (>4 μήνες) και μινκ	50

Πίνακας 6.2. Ποσοτικά όρια μυκοτοξινών

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alaniz Zanon M., Chiotta M., G. Giaj-Merlera, G. Barros, S. Chulze, 2013. Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 162(3):220-225
2. Allison A.C., Eugui E.M., 2000. Mycophenolate mofetil and its mechanism of action. *Immunopharmacology* 47, 85-118.
3. Bennett J.W., Klich M., 2003. Mycotoxins, *Clin. Microb. Rev.* 16, 497-516.
4. Blackwell B.A., Savard M.E., 2000. Mycotoxins: Natural products of agriculture importance. *Can. Chern. News* 2000, 15-17
5. Blout W.P., 1961. Turkey "X" Disease. *Turkeys* 9: 55-58.
6. Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.P., 2002. Relationship between Secondary' metabolism and fungan development. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 66, 447-459.
7. Cole R.J., Cox R.H., 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, New York.
8. Dimakopoulou M., Tjamos S.E., Antoniou P.P., Pietri A., Battilani P., Avramidis N., Markakis E.A., Tjamos E.C., 2008. Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biol. Control.* 46:158–165
9. D'Mello, J.P.F., Macdonald A.M.C., 1997. Mycotoxins. *An. Feed. Sc. Tech* 69, 155-166.
10. Diekman M.A., Green M.L., 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci.* 70, 1615-1627
11. Gelderblom W.C., Jaskiewicz K., Marasas W.F., Thiel P.G., Horak R.M., Vlegaar R., Kriek N.P., 1988. Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol.* 54, 1806-1811.
12. Miller J.D., Trenholm H.L., *Mycotoxins in grain, Compounds others than Aflatoxins*, Aegan Press, U.S.A. 1994, p.3.
13. Teren J. *Et al*, 1996. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species
14. Tsitsigiannis D., and Keller N., 2005. Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in Microbiology* 15(3): 109-18
15. Tsitsigiannis D., and Keller N., 2005. Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in Microbiology* 15(3): 109-18

16. Van der Gaag B., Spath S., Dietrich H., Stigter E., Boonzaaijer G., Ton van Osenbruggen, Kees Koopal, 2003. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. Food control 14:251–254.
17. Yu Y. Tang & Hsu Y. Lin & Ying C. Chen & Wei T. Su & Si C. Wang & Lih C. Chiueh & Yang C. Shin, 2013. Development of a Quantitative Multi-Mycotoxin Method in Rice, Maize, Wheat and Peanut Using UPLC-MS/MS. Food Anal. Method, 141(3):1747-1755.
18. Γεωργακάς Ηλίας (2013), Στρατηγικές πρόληψης μόλυνσης από μυκοτοξίνες σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Πτυχιακή μελέτη, Καλαμάτα.
19. Καλογεριάς Α.(2010), Επίδραση παραγωγικής διαδικασίας στα επίπεδα μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα, πτυχιακή μελέτη, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Καλαμάτα.
20. Λαγογιάννη, Χ. (2015). Βιολογική και χημική αντιμετώπιση του αφλατοξικογόνου μύκητα *Aspergillus flavus* στο καλαμπόκι, 2015:34
21. Πετρωτός Κ. (2010), Ανάπτυξη ταχείας μεθόδου ανάλυσης επικίνδυνων μυκοτοξινών σε ξηρούς καρπούς. Πτυχιακή μελέτη, Λάρισα.
22. Χατζηχρήστου Ε. (2016), Προσδιορισμός μυκήτων και μυκοτοξινών σε ιχθυοτροφές και συστατικά ιχθυοτροφών. Πτυχιακή μελέτη.
23. Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες, οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα». (ΚΑΝ. ΕΚ 1881/2006)
24. EMAN (European Mycotoxin Awareness Network), Fact sheets on evaluation and risk issues, fact sheet 1, decontamination, processing effect and risk analysis aspects, 2005
25. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to. Some natural occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1993, p. 489
26. https://www.google.com/search?q=%CE%BC%CF%85%CE%BA%CE%B7%CF%84%CE%B5%CF%82+%CF%83%CF%84%CE%BF+%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CF%81%CE%BF%CF%83%CE%BA%CE%BF%CF%80%CE%B9%CE%BF&rlz=1C1GCEA_enGR831GR831&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjEI7TX7YTjAhUQZVAKHbw8B_oQ_AUIECgB&biw=1366&bih=608#imgref=fwyWSMlm3xv-

27. https://www.google.com/search?q=%CE%BC%CF%85%CE%BA%CE%AE%CE%BB%CE%B9%CE%BF&rlz=1C1GCEA_enGR831GR831&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj0cC9o7PgAhWImLQKHew9Dd0Q_AUIDigB&biw=1366&bih=608#imgrc=T5AzoRhW FORDM
28. https://eclass.teicrete.gr/modules/document/file.php/GF107/%CE%95RGASTIRIO.2_ATE LEIS.pdf
29. Προσβολή πορτοκαλιού από τους μύκητες *Penicillium italicum* και *P. Digitatum* (http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_penicillin.htm).
30. https://www.google.com/search?q=%CE%BC%CF%8C%CE%BB%CF%85%CE%BD%CF%83%CE%B7+%CF%84%CE%B7%CF%82+%CF%83%CE%AF%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%B7%CF%82+%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%AC+%CE%BA%CE%B1%CE%B9+%CE%AC%CE%BB%CE%BB%CF%89%CE%BD+%CF%83%CE%B9%CF%84%CE%B7%CF%81%CF%8E%CE%BD+%CE%BC%CE%B5+Claviceps+purpurea&rlz=1C1GCEA_enGR831GR831&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiEm9PI6eviAhWFfFAKHVhUCxUQ_AUIECgB&biw=1366&bih=657#imgrc=Dz0-CzNcJuolgm
31. http://2.bp.blogspot.com/-3F_jZQRv3RE/UAcilmH273I/AAAAAAAAAGos/exsp3jI2KZc/s1600/DSC04299.JPG
32. [file:///C:/Users/user/Downloads/%CE%9C%CF%85%CE%BA%CE%BF%CF%84%CE%BF%CE%BE%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CF%82%20%CE%BA%CE%B1%CE%B9%20%CE%9C%CF%85%CE%BA%CE%BF%CF%84%CE%BF%CE%BE%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/%CE%9C%CF%85%CE%BA%CE%BF%CF%84%CE%BF%CE%BE%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CF%82%20%CE%BA%CE%B1%CE%B9%20%CE%9C%CF%85%CE%BA%CE%BF%CF%84%CE%BF%CE%BE%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20(7).pdf)