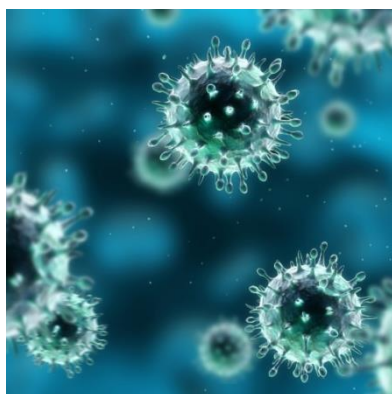




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΤΟΞΙΝΕΣ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ: ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ
ΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ**



ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΛΑΠΟΚΩΝΣΤΑΝΤΑΚΗ

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτρης Κέκος

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των σπουδών μου στη Σχολή των Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δ. Κέκο, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία, σε συνεργασία με το Γενικό Χημείο του Κράτους (Γ.Χ.Κ.). Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Δ. Μάμμα, τον κ. Η. Κακουλίδη και την κα Π. Γιαννικοπούλου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, τις πολύτιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου.

Ευχαριστίες αρμόζουν και σε όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας, και ιδιαίτερα στο υποψήφιο διδάκτορα Θ. Πάσχο, για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αδιάκοπη υποστήριξη που μου παρείχαν καθ'όλη την διάρκεια των σπουδών μου μέχρι σήμερα.

Κ. Λαποκωνσταντάκη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ.....	8
1.1.2. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	8
1.2. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	9
1.2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ	11
1.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	11
1.2.3. ΠΡΟΛΗΨΗ:	12
1.3. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	13
1.4. FUSARIUM: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ, ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ.....	14
1.4.1. ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΤΟΥ FUSARIUM.....	14
1.5. ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1	29
1.6. ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Β1	30
1.7. ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1	33
1.8. ΖΥΜΕΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ..	35
1.9. Η ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΥΜΕΣ	35
1.10. ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ	37
1.11. Η ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ S. cerevisiae ΚΑΙ ΤΟΥ LAB ΣΕ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΟ ΓΑΣΤΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΩΛΗΝΑ.....	39
1.12. ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ.....	40
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
2.1. ΣΚΟΠΟΣ:.....	41
2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	41
2.2.1. ΟΡΓΑΝΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ	41
2.2.2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	50
2.2.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	50

2.2.4.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΞΙΝΩΝ.....	52
2.2.5.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΤΟ ΓΑΛΛΑ	54
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
3.1.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΞΙΝΩΝ	57
3.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΑΠΟ ΓΑΛΛΑ	81
4.	ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	89
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	97
	Παράρτημα 1	97
	Παράρτημα 2	100
	Παράρτημα 3	112

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μυκοτοξίνες είναι φυσικές τοξικές ουσίες που παράγονται από νηματοειδείς μύκητες. Πρόκειται για δευτερογενείς μεταβολίτες καθώς δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των μυκήτων. Ορισμένα γένη μυκήτων είναι σε θέση να συνθέσουν μυκοτοξίνες. Τα πιο σημαντικά είναι τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*. Λόγω της υψηλής τοξικότητας των μυκοτοξινών έχουν θεσπιστεί όρια στα τρόφιμα. Οι μυκοτοξίνες έχουν σοβαρές επιπτώσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα και η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από ηπατικές νόσους. Για αυτό απαιτείται πρόληψη της μόλυνσης της τροφικής αλυσίδας από αφλατοξίνες που είναι δυνατή μέσω της υιοθέτησης βελτιωμένων γεωργικών πρακτικών και του ελέγχου των συνθηκών αποθήκευσης των προϊόντων. Έχουν βρεθεί πάνω από 80 είδη του γένους *Fusarium*, από τα οποία πολλά προκαλούν παθογένεια σε δημητριακά και σε αραβόσιτο. Το γένος *Fusarium* αποτελεί πηγή μιας ευρείας ποικιλίας βιοενεργών δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τριχοθηκίνες, ζεαραλενόνες και φουμονισίνες. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις αφλατοξίνες που έχουν την υψηλότερη τοξικότητα μεταξύ των μυκοτοξινών λόγω των τοξικογόνων, μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους. Οι αφλατοξίνες B1 και M1 έχουν την ικανότητα να προσδένονται τόσο σε ζύμη αρτοποιίας *Saccharomyces cerevisiae*, όσο και στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η διαδικασία της δέσμευσης είναι εξωκυτταρική και μη ομοιοπολική και πραγματοποιείται από συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης και των βακτηρίων.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα παραγωγής τοξινών από το μύκητα *Fusarium oxysporum* F3, όταν το ρύζι, κριθάρι, σιτάρι, καλαμπόκι και κύμινο χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως στους 29 °C, για χρόνο παραμονής 30 ημέρες, απουσία φωτός, ο μύκητας *F. oxysporum* F3 δεν παράγει αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2, ούτε DON, NIV και ZEA. Η μόνη τοξίνη που πιθανώς να έχει παραχθεί είναι το φουσαρικό οξύ στις καλλιέργειες του σιταριού, κριθαριού, καλαμποκιού, και κύμινου, ενώ μικρή ποσότητα εμφανίστηκε και στο κριθάρι και στο κύμινο πριν τον εμβολιασμό με το μύκητα.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την απομάκρυνση της αφλατοξίνης M1 από αγελαδινό μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα με 4 % λιπαρά, με χρήση κυττάρων της ζύμης *Sachharomyces cerevisiae*. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων ($1,6 \times 10^9$, $1,6 \times 10^{10}$, $1,6 \times 10^{11}$ κύτταρα/mL γάλακτος), και τοξίνης (0,25, 0,5, 0,75 $\mu\text{g/L}$). Μελετήθηκε τόσο η χρονική μεταβολή της δέσμευσης όσο και η απομάκρυνση έπειτα από 24 h. Αυξανόμενη της συγκέντρωσης των κυττάρων αυξάνεται το ποσοστό απομάκρυνσης της τοξίνης από το γάλα. Σχετικά με τη συγκέντρωση της τοξίνης για την ίδια ποσότητα κυττάρων, παρουσιάζεται σταδιακή αύξηση της τοξίνης που απομακρύνεται όσο αυξάνεται η

συγκέντρωση της τοξίνης στο γάλα. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με τριπλό τετράπολο (LC-MS/MS) .

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: τοξίνες, *F.oxysporum F3*, *S. cerevisiae*, παραγωγή, πρόσδεση, υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών με τριπλό τετράπολο (LC-MS/MS)

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi, most commonly of the genera *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. Due to the high toxicity of mycotoxins maximum levels have been established in foodstuffs. Mycotoxin consumption has serious effects on both human and animals, especially when people suffer from liver diseases. The best way to prevent aflatoxin contamination in food chain is to improved agricultural practices and the control of storage conditions of products. The anamorph genus *Fusarium* comprises more than 80 recognized species of which several are destructive pathogens of cereals and maize worldwide. *Fusarium* is a rich source of a wide variety of bioactive secondary metabolites, trichothecenes, zearalenones and fumonisins. Particular emphasis is given to aflatoxins which have the highest toxicity among mycotoxins because of their toxigenic, mutagenic and carcinogenic properties. *Saccharomyces cerevisiae* and different strains of lactic acid bacteria strains have the efficiency to bind aflatoxins M1 and B1. Indication that the process of binding is extracellular and noncovalent and is carried out by components of the cell wall of yeast and bacteria.

Experiments were performed for the toxin production conducted by the fungus *Fusarium oxysporum* F3 when rice, barley, wheat, corn and cumin are used as carbon sources. In particular, it was found that the fungus *F. oxysporum* F3 cannot produce aflatoxins B1, B2, G1, G2, or DON, NIV and ZEA, at 29 °C, for a residence time of 30 days, in the absence of light. The only toxin, that may be produced, is fusaric acid in crops of wheat, barley, corn, and cumin and a small amount of it also appears on barley and cumin before the inoculation with the fungus.

In the present study the ability of *S. cerevisiae* to bind aflatoxin M1 was also performed. For this purpose, semi skimmed milk (4 % fat) was tested using three different cells' concentrations ($1,6 \times 10^9$, $1,6 \times 10^{10}$, $1,6 \times 10^{11}$ cells / mL of milk), and three toxin concentrations (0,25, 0,5, 0,75 µg/L). Both the temporal variation and the percentage of binding after 24 h were carefully studied. Here, it has to be noticed that when the concentration of cells increases, the binding rate of toxin from milk becomes greater. The results of toxin concentration for the same amount of cells show that the percentage of binding increases by increasing concentration of the toxin in milk. The sample analysis is carried out by the liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS / MS).

KEYWORDS toxins, *F.oxysporum* F3, *S. cerevisiae*, production, binding, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS / MS).

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Πρόκειται για τοξικές ουσίες που παράγονται από μύκητες. Ο ορισμός συνήθως περιορίζεται σε τοξίνες που παράγονται από μούχλες και αναφέρεται σε ενώσεις με υψηλή τοξικότητα. Συχνά εμφανίζονται στα τρόφιμα, αλλά συνήθως σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παράγονται είτε στις αγροτικές καλλιέργειες είτε κατά την αποθήκευσή τους. Στις αγροτικές καλλιέργειες μπορούν να προκληθούν από παράσιτα και από ασθένειες των φυτών. Στους χώρους αποθήκευσης οι τοξίνες παράγονται λόγω υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας.

1.1.2. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Στην καθημερινή διατροφή είναι συχνές οι μυκοτοξίνες. Στο πρωινό για παράδειγμα στο γάλα εμφανίζεται η αφλατοξίνη M1, στο τοστ η δεοξυνιβαλενόνη, η ζεαραλενόνη και η οχρατοξίνη A, στη βρώμη οι HT 2 και T2, στα αποξηραμένα φρούτα και τα δημητριακά όπως και στον καφέ η ωχρατοξίνη A ενώ σε ξηρούς καρπούς παράγονται αφλατοξίνες. Τέλος στο χυμό μήλου μπορεί να περιέχεται πατουλίνη [1].

Οι μυκοτοξίνες είναι φυσικές ουσίες που παράγονται από νηματοειδείς μύκητες και μπορεί να αυξήσουν την τοξικότητα στα σπονδυλωτά και σε άλλα ζώα, ακόμα και αν καταναλωθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτές οι ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες καθώς δεν είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των μυκήτων. Ορισμένα γένη μυκήτων είναι σε θέση να συνθέσουν μυκοτοξίνες. Τα τρία γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium* αποτελούν το μεγαλύτερο αριθμό των ειδών μηκύτων που παράγουν μυκοτοξίνες. Άλλα τοξινογενή γένη είναι τα *Claviceps* και *Alternaria*. Η ακριβής λειτουργία των μυκοτοξινών για τους μύκητες δεν είναι απολύτως κατανοητή, αλλά η παραγωγή τους συνδέεται με την οικολογία και την επιβίωση του οργανισμού κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Η ανάπτυξη και η παραγωγή τοξινών από μύκητες μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά στάδια της παραγωγής των καλλιεργειών είτε πριν τη συγκομιδή των καλλιεργειών είτε κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά τους, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Ο δευτερογενής μεταβολισμός των μυκήτων ρυθμίζεται από γενετικούς μηχανισμούς που ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα από το περιβάλλον. Η θερμότητα με την ενεργότητα του νερού είναι οι κύριοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή μυκοτοξινών [2].

1.2. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Υπάρχουν περισσότερες από 200 μυκοτοξίνες που παράγονται κάτω από ορισμένες συνθήκες από περίπου 120 μύκητες ή μούχλες. Ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 1) παρουσιάζει στοιχεία για μυκοτοξίνες με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη συντήρηση και την αποθήκευση τροφίμων.

Μολύνσεις της σίκαλης, και σε μικρότερη έκταση άλλων σιτηρών με *Claviceps purpurea* (ergot, σκληρώτιο εργοτιάσεως) είναι υπεύθυνες για την ασθένεια εργοτισμό (συμπτώματα: γάγγραινα και σπασμοί). Η ασθένεια ήταν σημαντική στο παρελθόν όταν καταναλωνόταν ψωμί από μολυσμένους σπόρους σίκαλης. Έχει πάψει πρακτικά να υπάρχει λόγω της κατεργασίας των σπόρων με μυκητοκτόνα και του καθαρισμού των σπόρων πριν την άλεση. Τα περισσότερα για τις μυκοτοξίνες αφορούν τα γένη *Aspergillus* και τις αφλατοξίνες που αυτά παράγουν κατά την ανάπτυξή τους. Αυτές είναι οι πιο κοινές και ιδιαίτερα τοξικές μυκοτοξίνες, π.χ. η αφλατοξίνη B₁, είναι η ισχυρότερη καρκινογόνος ουσία που είναι γνωστή. Σε ζωικά πειράματα σίτισης με αρουραίους, η καρκινογόνος επίδρασή της εμφανίστηκε σε ημερήσια δόση μόνο 10 pg/kg σωματικού βάρους. Σε μια συγκριτική μελέτη, η καρκινογόνος ιδιότητα της ιδιαίτερα τοξικής διμεθυλονιτροζαμίνης εμφανίστηκε σε ημερήσια δόση 750 μg/kg σωματικού βάρους. Κυρίως φυτικοί ιστοί (ιδιαίτερα φυστίκια, φυστικοβούτυρο, ρύζι, καλαμπόκι) επιμολύνονται με αφλατοξίνες. Η αφλατοξίνη περνάει από τη μουχλιασμένη ζωοτροφή στα ζωικά προϊόντα, κυρίως στο γάλα. Ο μεταβολισμός της αγελάδας γαλακτοπαραγωγής μετατρέπει τις αφλατοξίνες Β-ομάδας σε εκείνες της Μ-ομάδας (το «Μ» συμβολίζει το μεταβολίτη), οι οποίες είναι επίσης καρκινογόνες. Η νεφροτοξική ωχρατοξίνη Α περνά από τα σιτηρά χορτονοής κυρίως στο αίμα και στο νεφρικό ιστό των χοίρων, αλλά βρίσκεται επίσης στους μυς, στο συκώτι και στο λιπώδη ιστό. Λεπτομερής αναλυτική έρευνα και αυστηρά νομοθετικά μέτρα έχουν μειώσει σημαντικά τη μόλυνση με αφλατοξίνη και την έχουν διατηρήσει υπό έλεγχο. Μόνο ένα φιστίκι στα 10000 είναι μολυσμένο με αφλατοξίνη. Αφλατοξίνες Μ₁ και Μ₂ που λαμβάνονται από υδροξυλίωση τοξινών Β₁ και Β₂ αντίστοιχα, βρίσκονται σε συγκέντρωση κατά μέσο όρο 3-8 ng/L γάλακτος. Γίνονται επίσης διαθέσιμα όλο και περισσότερα αναλυτικά δεδομένα για την παρουσία άλλων μυκοτοξινών. Μια ποσοτικά σημαντική οικιακή πηγή μυκοτοξινών είναι μολύνσεις μούχλας των φρούτων, του ψωμιού και άλλων αρτοσκευασμάτων, κρέατος και επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος. Σε σύγκριση με τη συνήθη HPLC/UV μέθοδο, έχειδειχθεί ότι χρησιμοποιώντας την τεχνική φασματομετρίας μαζών σε ισοτοπική αραίωση (IDMS, *isotope dilution mass spectrometry*) επιτυγχάνονται έως και 100 φορές χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, όταν πραγματοποιείται με εσωτερικό πρότυπο [¹³C₂]-πατουλίνη. Εφαρμόζοντας ως τεχνική αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (GC/MS), κατέστη δυνατή η ποσοτικοποίηση πατουλίνης σε χυμούς μήλων σε επίπεδα συγκέντρωσης 5,7-26,0 μg/L [3].

Πίνακας 1: Μυκοτοξίνες [3]

Μύκητας/μούχλα	Τοξίνη	Τοξικότητα (οξεία τοξικότητα LD50)	Αποτέλεσμα	Παρουσία
<i>Claviceps purpurea</i>	Εργοτοαλκαλοειδή		Εργοτισμός (γαγγραινώδεις σπασμοί)	Κυρίως σίκαλη, σε λιγότερο βαθμί σιτάρι
<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Αφλατοξίνες	7,2 mg/kg	Κίρρωση ήπατος, καρκίνος ήπατος	Φιστίκια αρχίδες και άλλοι ξηροί καρποί (αμύγδαλα, Brazil), καλαμπόκι και άλλα δημητριακά, ζωοτροφή, γάλα
<i>Aspergillus versicolor</i> <i>A. nidulans</i>	Στεριγματοκυστίνη	120 mg/kg	Καρκίνος ήπατος	Καλαμπόκι, σιτάρι, ζωοτροφή
<i>Penicillium expansum</i> <i>P. urticae</i>	Πατουλίνη	35 mg/kg	Δηλητήριο των κυττάρων	Σαπισμένα φρούτα, φρουτοχυμοί
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>A. melleus</i>	Ωχρατοξίνη Α	20 mg/kg	Καταταστροφή λιπώδους ήπατος και νεφρών	Κριθάρι, καλαμπόκι
<i>Fusarium graminearum</i>	Ζεαραλενόνη (Φουζαριοτοξίνη F2)	0,1 mg/kg για πάνω από 5 ημέρες	Οιστρογόνα, μη γονιμότητα	Καλαμπόκι και άλλα δημητριακά , ζωοτροφή
<i>Fusarium oxysporum</i> <i>F. tricinctum</i>	Φουζαριοτοξίνη T2	3,8 mg/kg	Τοξική αλευκία, αιμορραγικό σύνδρομο	Δημητριακά, ζωοτροφή
<i>Fusarium roseum</i> <i>F. graminearum</i>	Βομιτοξίνη	70 mg/kg	Εμετός	Δημητριακά, ζωοτροφή
<i>Fusarium moniliforme</i>	Φουμοσίνη FB1 και FB2		Καρκίνος ήπατος	Καλαμπόκι

Λόγω της υψηλής τοξικότητας των μυκοτοξινών έχουν θεσπιστεί όρια στα τρόφιμα. Η νομοθεσία αναφέρεται αναλυτικά στο Παράρτημα 1.

1.2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Σε μελέτες που έγιναν σε ζώα, πολλές μυκοτοξίνες διαπιστώθηκαν καρκινογόνες. Προφανώς τα προβλήματα που προκαλούν στους ανθρώπους είναι πολυπλοκότερα. Το απλούστερο μοντέλο για την περιγραφή της διαδικασίας ενεργοποίησης των καρκινικών κυττάρων προσδιορίζει τρία βασικά στάδια. Αυτά είναι:

- Η έναρξη που οδηγεί σε ένα τροποποιημένο κύτταρο
 - Η προώθηση που εμπεριέχει κλωνική προέκταση
 - Εξέλιξη σε κακοήθεια με:
- ❖ Αύξηση γενομικής αστάθειας
 - ❖ Ικανότητα εισβολής σε γύρω ιστούς
 - ❖ Μετάσταση σε κοντινά σημεία

Έχει γίνει η υπόθεση πως η έναρξη και η εξέλιξη περιέχει γεγονότα στα οποία πραγματοποιείται αντίδραση του DNA, ενώ η προώθηση περιέχει διάφορα γεγονότα που το DNA δεν παίρνει μέρος στις αντιδράσεις, που συχνά περιγράφονται ως επιγενετικά γεγονότα. Γίνεται φανερό πως τα επιγενετικά γεγονότα μπορεί να διαδραματίζουν πιο σημαντικό ρόλο από ό,τι αρχικά είχε υποθεθεί, αφού η γενετική έκφραση επηρεάζεται και από τα τρία στάδια. Η ικανότητα να εισβάλουν στους γύρω ιστούς και να πραγματοποιείται μετάσταση σε κοντινά σημεία είναι πολύ μεγάλης σημασίας για τον ανθρώπινο καρκίνο, και καθένα από αυτά τα βήματα συμμετέχει σε περαιτέρω γενετικές αλλαγές. Η γενομική αστάθεια, είτε επηρεάζεται από γενετικούς είτε από επιγενετικούς μηχανισμούς, και θεωρείται ότι παίζει ρόλο κλειδί στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Οι επιστήμονες εξακολουθούν να μην έχουν μια πλήρη κατανόηση της διαδικασίας και των παραγόντων που επηρεάζουν τις δυνητικές μεταστάσεις της καρκινογένεσης.

Πολλές «ολοκληρωμένες» καρκινογόνες αντιδράσεις DNA είναι ικανές να συμβούν ταυτόχρονα, συμπεριλαμβανομένων τόσο της έναρξης όσο και της προώθησης, μολονότι γίνονται σε διαφορετικά βήματα και με διαφορετικές διεργασίες [4].

1.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από ηπατικές νόσους. Επιστημονικές έρευνες έχουν δείξει ότι κατά τη μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV), η έκθεση σε αφλατοξίνες αυξάνει τον κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνο (*hepatocellular carcinoma*, HCC). Ο ιός HBV

καθιστά δύσκολο το μεταβολισμό των αφλατοξινών από τα ηπατοκύτταρα κι έτσι η ένωση προσθήκης αφλατοξίνης M1-DNA παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ήπαρ, αυξάνοντας την πιθανότητα βλάβης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Θεωρείται ότι ο εμβολιασμός κατά της ηπατίτιδας Β των κατοίκων περιοχών της Ασίας και της Αφρικής, όπου ενδημεί ο ιός HBV, θα μειώσει σημαντικά τις ηπατικές βλάβες σε πληθυσμούς που συχνά τρέφονται με μουχλιασμένα τρόφιμα [5]. Η κιτρινίνη έχει συσχετιστεί τόσο με την ασθένεια του «κίτρινου ρυζιού» στην Ιαπωνία, όσο και με τη χρόνια νεφροπάθεια των χοίρων [6]. Δρα ως νευροτοξίνη σε όλα τα ζώα, μολονότι η οξεία τοξικότητά της διαφοροποιείται από είδος σε είδος [7]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η LD50 της (50% *Lethal Dose*) για τις πάπιες είναι 57 mg/kg, για τα κοτόπουλα 95 mg/kg, ενώ για τα κουνέλια 134 mg/kg [8]. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η κιτρινίνη δρα συνεργιστικά με την ωχρατοξίνη Α, με τελικό αποτέλεσμα την καταστολή της σύνθεσης του RNA στους νεφρούς ποντικών [9,10]. Όσον αφορά στα ζώα, οι φουμονισίνες τα προσβάλλουν με διαφορετικούς τρόπους, κυρίως μέσω του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων [11, 12, 13, 14]. Πιο συγκεκριμένα, προκαλούν λευκο-εγκεφαλομαλακία στους ίππους και στα κουνέλια [15, 16], πνευμονικό οίδημα και υδροθώρακα στους χοίρους [17], καθώς και ηπατοκαρκίνωμα στα ποντίκια [18]. Στους ανθρώπους, η φουμονισίνη Β1 έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του οισοφάγου [19, 20]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα οξεία έκθεσης στη φουμονισίνη Β1 παρατηρήθηκε σε κατοίκους 27 χωριών της Ινδίας, όπου η κατανάλωση άζυμου ψωμιού από καλαμπόκι προκάλεσε έντονους πόνους, και διάρροια [21]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Έρευνας του Καρκίνου (*International Agency for Research on Cancer*) κατέταξε τις φουμονισίνες στην ομάδα 2B, τις πιθανές καρκινογόνες ουσίες [22]. Ωχρατοξίνη Α έχει ανιχνευθεί στο αίμα, στον ορό και στο γάλα ζώων και ανθρώπων [23], ενώ συχνά υπάρχει στο χοιρινό κρέας που πρόκειται να καταναλωθεί [24]. Θεωρείται υπεύθυνη για τη νεφροπάθεια των χοίρων, ασθένεια η οποία κυρίως ενδημεί στη Δανία και στις Σκανδιναβικές χώρες [25]. Επιπρόσθετα, έχει συσχετιστεί τόσο με το θάνατο των πουλερικών, όσο και στην ανθρώπινη νεφροπάθεια [26, 27]. Με βάση την έκθεση ενός ατόμου στην ωχρατοξίνη και την πληθώρα των τοξικολογικών δεδομένων σε πειραματόζωα, η Ευρωπαϊκή Ένωση των Επιστημονικών Επιτροπών καθόρισε ως ανώτατο όριο της ωχρατοξίνης Α για τον ανθρώπινο οργανισμό τα 5 ng/kg/d [28]. Πολλές επίσης χώρες έχουν καθιερώσει δικά τους όρια, τα οποία διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους [29, 30]. Τέλος, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Έρευνας του Καρκίνου κατέταξε τις ωχρατοξίνες στις πιθανά καρκινογόνες ουσίες [31].

1.2.3. ΠΡΟΛΗΨΗ

Στην ιδανική περίπτωση, ο καλύτερος τρόπος για την πρόληψη της μόλυνσης της τροφικής αλυσίδας από αφλατοξίνες είναι η υιοθέτηση βελτιωμένων γεωργικών πρακτικών και ο έλεγχος των συνθηκών αποθήκευσης των προϊόντων. Ωστόσο, οι πρακτικές δυσκολίες για την αποτελεσματική πρόληψη της μόλυνσης, μαζί με τη σταθερότητα αφλατοξινών υπό κανονικές συνθήκες επεξεργασίας τροφίμων, έχουν

οδηγήσει σε έρευνα σχετικά με τις μεθόδους απολύμανσης για προϊόντα διατροφής, που θα μπορούσαν να είναι ασφαλείς, αποτελεσματικές, φιλικές προς το περιβάλλον. Επίσης, παρουσιάζεται και το κόστος-όφελος των μεθόδων [32, 33].

1.3. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν πιο αναλυτικά οι μικροοργανισμοί που μπορούν να παράξουν μυκοτοξίνες στα τρόφιμα.

Τα είδη του γένους *Fusarium* είναι ένας σημαντικός παράγοντας μόλυνσης των σιτηρών στις τροπικές και εύκρατες περιοχές του κόσμου. Η ασθένεια, που προκαλούν τα γένη *Fusarium*, μπορεί να αποικίσει σε όλα τα τμήματα των προσβεβλημένων φυτών, αλλά οι λοιμώξεις, συχνά είναι ασυμπτωματικές και έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Αυτό συμβαίνει λόγω των ιδανικών μικρο-κλιματικών και φυσιολογικών συνθηκών που παρέχονται από τις σύγχρονες, υψηλής απόδοσης ποικιλίες, με μεγαλύτερη πυκνότητα φυτών ανά μονάδα επιφάνειας με αποτέλεσμα οι καλλιέργειες να συνοδεύονται από τα βαρύτερα αζωτούχα λιπάσματα.

Η μόλυνση με *Fusarium* αναφέρθηκε ότι συμβαίνει συστηματικά σε όλα τα μέρη του φυτού του αραβοσίτου. Εκτός από το ότι είναι επιζήμια στους φυτικούς ιστούς, ορισμένα είδη *Fusarium* παράγουν φουμοσίνες (FBS), μια ομάδα των μυκοτοξινών που λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες [34]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε όλο τον κόσμο ότι το *F.oxysporum* προσβάλλει διάφορες καλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένων των μπανανών, ντοματών, φασολιών, πατατών, ζαχαροκάλαμου και φρούτων του πάθους. Το είδος αυτό έχει ανιχνευθεί σε είδη δασών οι οποίοι το συσχετίζουν με συμπτώματα μαρασμού και ξήρανσης σε σπορόφυτα του *Pinus elliottii* var. *elliottii*, και *Pinus taeda* [35].

Το *Fusarium oxysporum* είναι ένα αναμορφικό είδος που προσδιορίζεται από τα μορφολογικά κριτήρια που μοιράζονται παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη. Τα στελέχη του *Fusarium oxysporum* παράγουν αραιά αερόβια μυκήλια με διαφορετικούς χρωματισμούς στο πίσω μέρος της αποικίας τους. Στη μελέτη της μεταβλητότητας της μορφολογίας του *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* έχουν περιγραφεί τέσσερις μορφολογικοί τύποι.

Το *Fusarium oxysporum* παράγει τρεις τύπους αφυλετικών σπορίων: μικροκονίδια, μακροκονίδια, και χλαμιδοσπόρια. Στελέχη του *fusarium oxysporum* έχουν διαιρεθεί σε ειδικές μορφές με βάση τη μολυσματικότητά τους σε ένα ξενιστή ή μια ομάδα ξενιστών.

Εντός του *Fusarium oxysporum* υπάρχουν πολλοί εξειδικευμένοι ξενιστές, με πάνω από 120 ειδικές μορφές, ικανές να προκαλέσουν αγγειακές παθήσεις σε πολλές γεωργικές καλλιέργειες. Περαιτέρω υποδιαιρέσεις των ειδικών μορφών σε φυλές

γίνονται συχνά και βασίζονται στη λοιμογόνο δύναμη ενός συγκεκριμένου συνόλου διαφορετικών ξενιστών από ποικιλίες που διαφέρουν ως προς την ανθεκτικότητα στις ασθένειες. Το κοινό χαρακτηριστικό των στελεχών *Fusarium oxysporum* είναι η ικανότητα να παρασιτούν σε ρίζες φυτών, συνήθως χωρίς να προκαλούν συμπτώματα. Αυτή η δυνατότητα είναι μη-ειδική και τα παθογόνα στελέχη μπορούν να αποικούν στις ρίζες των φυτών χωρίς να προκαλέσουν ασθένειες [36].

Οι τοξίνες που παράγονται από τον *F.oxysporum* είναι κυρίως οι ακόλουθες:

- Τριχοθηκίνες T-2
- Τοξίνες HT-2
- Διακετοξυσκιρπενίλη³
- ΟΗ T2 (TC-1),[37].

Τα μέλη της οικογένειας *F.graminearum* μπορούν να μολύνουν σιτάρι, κριθάρι, αραβοσίτο, και άλλα δημητριακά σε όλο τον κόσμο, προκαλώντας φουσαρική σήψη κεφαλής (*Fousarium head blight*). Μολυσμένοι σπόροι δημητριακών δείχνουν επίσης μόλυνση με μυκοτοξίνες της ομάδας των τριχοθηκινών, συμπεριλαμβανομένης της δεοξυνιβαλενόλης και της νιβαλενόλης. Αυτό το σύνολο των ειδών είναι πολύ σημαντικό για το δέντρο πεκάν, αλλά επίσης μπορεί να είναι μια πηγή εξάπλωσης μυκητιάσεων για πολλές άλλες καλλιέργειες, όπως το ρύζι και τα σιτηρά [38].

Τα μέλη του είδους *F.proliferatum* είναι παθογόνα για πολλές καλλιέργειες, άκρως τοξινογόνα, και μπορεί να παράγουν μυκοτοξίνες, συμπεριλαμβανομένων φουμοσινών, φουσαρικού οξέος, μποβερικίνης, φουσαπρολιφένης και μονιλοφορμίνης [39].

1.4.FUSARIUM: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ, ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Έχουν βρεθεί πάνω από 80 είδη *Fusarium*, από τα οποία πολλά επιμολύνουν δημητριακά και αραβόσιτο. Το γένος *Fusarium* έχει ταξινομηθεί σε ευρύτερα τμήματα, με βάση τα μορφολογικά και τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των μελών του, όπως η σπορίωση και ο χρωματισμός τους .

1.4.1. ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΤΟΥ FUSARIUM

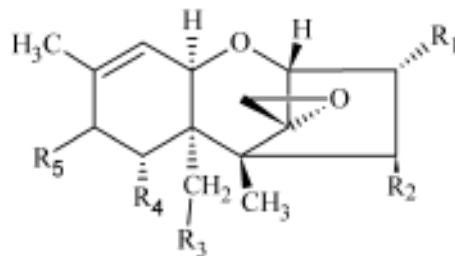
Αν και το γένος *Fusarium* αποτελεί πλούσια πηγή μιας ευρείας ποικιλίας βιοενεργών δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τριχοθηκίνες, ζεαραλενόνες και φουμονισίνες, έχουν εδώ και πολλά χρόνια γίνει το κύριο σημείο εστίασης στον τομέα έρευνας και

στις μελέτες τοξικολογίας. Τα τελευταία χρόνια, άλλοι μεταβολίτες έχουν αναδειχθεί ως πιθανά σημαντικές μυκοτοξίνες, που περιλαμβάνουν μονολιφορμίνη, εννιατίνη, μποβερικίνη και φουσαπρολιφερίνη (*moniliformin*, *enniatins*, *beauvericin*, και *fusaproliferin* αντίστοιχα). Στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικότερα τα είδη των τοξινών που παράγονται και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους [40].

1.4.1.1. ΤΡΙΧΟΘΗΚΙΝΕΣ:

Δυνητικά επικίνδυνες συγκεντρώσεις των μυκοτοξινών τριχοθηκίνης μπορεί να παρουσιαστούν φυσικά σε μουχλιασμένους σπόρους, δημητριακών και γεωργικών προϊόντων. Όλες οι τριχοθηκίνες ανήκουν στις μυκοτοξίνες αλλά δεν ισχύει και το αντίστροφο. Τοξινογόνα είδη *Fusarium* εμφανίζονται σε όλο τον κόσμο, σε εντελώς διαφορετικές περιοχές όπως ερήμους, και αλπικά βουνά και προκαλούν προβλήματα. Για παράδειγμα, μία τροφική νόσος καταγράφηκε στη Ρωσία, από το 19^ο αιώνα. Κατά την περίοδο 1942 έως 1947, περισσότερο από το 10% του πληθυσμού του Όρενμπουργκ, κοντά στη Σιβηρία, είχε προσβληθεί από τη νόσο επειδή κατανάλωνε κεχρί, σιτάρι, και κριθάρι. Το σύνδρομο αυτό ονομάστηκε επίσημα τοξική διατροφική αλευκία (ΑΤΑ: *alimentary toxic aleukia*). Εκτεταμένες έρευνες στη Ρωσία έδειξαν ότι μια τοξίνη από είδη *Fusarium* ήταν ο παράγοντας εμφάνισης της ΑΤΑ. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι η T-2 τοξίνη, μια ισχυρή τριχοθηκίνη, ήταν ο πιο πιθανός παράγοντας [41].

Οι τριχοθηκίνες (Σχήμα 1, Πίνακας 2) αποτελούν ένα σύνολο δομικά συγγενών ενώσεων με κοινό χαρακτηριστικό τον τετρακυκλικό – σεσκιτερπενοειδή 12,13-εποξυτριχοτεκ-9-ένιο δακτύλιο. Εντοπίστηκαν περίπου 170 τριχοθηκίνες και μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις τύπους (ΑΔ) σύμφωνα με τις διακυμάνσεις της λειτουργικότητας του υδροξυλίου και των ακετόξυ πλευρικών ομάδων.



Σχήμα 1: Δομές των σημαντικών τριχοθηκίνων τύπου Α και Β [38].

Πίνακας 2: Δομές των σημαντικών τριχοθηκινών τύπου A και B [38].

	R1	R2	R3	R4	R5
SCR	OH	OH	OH	H	H
15-MAS	OH	OH	OAc	H	H
4,15-DAS	OH	OAc	OAc	H	H
T-2	OH	OAc	OAc	H	OMe ₂ CHCH ₂ C(O)
HT-2	OH	OH	OAc	H	OMe ₂ CHCH ₂ C(O)
DON	OH	H	OH	OH	O
3-AcDON	OAc	H	OH	OH	O
15-AcDON	OH	H	OAc	OH	O
NIV	OH	OH	OH	OH	O
4-AcNIV	OH	OAc	OH	OH	O

Οι τριχοθηκίνες τύπου A διαθέτουν στη θέση C-8 οξυγονούχα ομάδα, ενώ ο τύπος B έχει μία καρβονυλική ομάδα στη θέση αυτή. Οι τριχοθηκίνες τύπου C διαθέτουν μια δεύτερη ομάδα εποξειδίου, ενώ οι τύπου D συνδέονται με ένα μακροκυκλικό δακτύλιο, μεταξύ των C-4 και C-15 ατόμων άνθρακα, με δύο εστερικούς δεσμούς.

Οι τριχοθηκίνες τύπου A και B μπορούν να παραχθούν τόσο από τα διάφορα είδη *Fusarium*, όσο και από κάποια είδη *Trichoderma*, ενώ οι μακροκυκλικές τριχοθηκίνες μπορούν να παραχθούν από κάποια είδη των *Myrothecium* και *Stachybotrys*. Από τις τριχοθηκίνες τύπου A οι πιο σημαντικές είναι η τοξίνη T-2 και η τοξίνη σκιρπενόλη (SCR), από τις οποίες η τοξίνη T-2 εμφανίζεται σε μια απο-ακετυλιωμένη μορφή (τοξίνη HT-2), ενώ η SCR εμφανίζεται επίσης σε μονο-ακετυλιωμένες (MAS) και διακετυλιωμένες (DAS) μορφές. Οι πιο σημαντικές τριχοθηκίνες τύπου B είναι η δεοξυνιβαλενόλη (DON *syn. vomitoxin*) και η νιβαλενόλη (NIV) εκ των οποίων η DON εμφανίζεται επίσης σε δύο μονο-ακετυλιωμένες μορφές (3-AcDON και 15 AcDON), ενώ η NIV εμφανίζεται σε μονο-ακετυλιωμένες μορφές εκ των οποίων η 4-AcNIV (Φουσαρενόνη-X) είναι πιο ενδιαφέρουσα προς μελέτη.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο τοξικός τρόπος δράσης των τριχοθηκινών οφείλεται στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης των ευκαρυωτικών οργανισμών, λόγω σύνδεσης με τη ριβοσωμική υπομονάδα 60S και της αλληλεπίδρασης με το ένζυμο πεπτιδυλοτρανσφεράση. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε ποικίλους βαθμούς αναστολής του σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού, ανάλογα με τη χημική δομή της συγκεκριμένης τριχοθηκίνης.

Οι πιο σοβαρές συνέπειες των τριχοθηκινών, που υπάρχουν σε αποθέματα μολυσμένων ζωοτροφών, έχουν αναφερθεί σε χοίρους και περιλαμβάνουν τη μείωση πρόσληψης ζωοτροφών, την άρνηση τροφής, τον ερεθισμό του δέρματος, έμετο, διάρροια, και πολλαπλές αιμορραγίες. Από την άλλη πλευρά, τα βοοειδή φαίνεται να

είναι πιο ανεκτικά σε τριχοθηκίνες, πιθανώς λόγω της δυνατότητας αποτοξίνωσης των μικροβίων αφού μπορούν για παράδειγμα, να μεταβολίσουν την DON στη λιγότερο τοξική αφ-έποξυ-DON (DOM-1).

Οι κύριοι παραγωγοί τοξινών DON και NIV είναι οι *F.graminearum*, *F.culmorum* και *F.cerealis* και δεδομένου ότι βρίσκονται συχνά σε καλλιέργειες σιτηρών και αραβοσίτων, αυτές οι μυκοτοξίνες εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα. Σε μια μεγάλη ευρωπαϊκή έρευνα των μυκοτοξινών που παράγονται από τα είδη *Fusarium* στα δημητριακά και σε σπόρους αραβοσίτου, η DON ανιχνεύθηκε στο 89% των δειγμάτων, από τα 520 δείγματα αραβόσιτου που αναλύθηκαν και βρέθηκε σε συγκέντρωση έως 8850 µg/L, ενώ η NIV ανιχνεύθηκε στο 34% των δειγμάτων σε επίπεδα μέχρι και 340 µg/L. Οι τοξίνες T-2 και HT-2 παράγονται από τα δύο μέλη *F.sporotrichioides* και *F.langsethiae* και από μερικά στελέχη *F.poaie*. Οι τοξίνες SCR, MAS και η DAS επίσης παράγονται από αυτά τα τρία είδη, αλλά και από στελέχη *F.equiseti* και από τους *F.sambucinum* και *F.venenatum*.

Δεδομένου ότι οι παραγωγοί τριχοθηκίνων τύπου A προέρχονται κυρίως από περιοχές με εύκρατο κλίμα, οι μυκοτοξίνες τους θα βρίσκονται επίσης σε αυτές τις περιοχές. Οι τοξίνες T-2 και HT-2 έχουν βρεθεί σε υψηλά επίπεδα σε δημητριακά στη Νορβηγία, όπου η βρώμη ήταν μολυσμένη με μέγιστα επίπεδα συγκέντρωσης των T-2 και HT-2 στα 330 µg/L και 880 µg/L, αντίστοιχα. Σε μεγάλη ευρωπαϊκή έρευνα των μυκοτοξινών του *Fusarium* η τοξίνη T-2 βρέθηκε στο 28% των δειγμάτων αραβοσίτου που αναλύθηκαν, με το υψηλότερο επίπεδο (255 µg/L) στην Αυστρία. Η τοξίνη HT-2 βρέθηκε στο 24% των δειγμάτων αραβοσίτου που αναλύθηκαν και πάλι τα μέγιστα επίπεδα συγκέντρωσης εντοπίστηκαν στην Αυστρία (120 µg/L) [40].

1.4.1.1.1. ΦΥΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι τριχοθηκίνες συνθέτουν μια οικογένεια που συνδέεται στενά με χημικές ενώσεις που ονομάζονται σεσκι-τερπενοειδή. Υπάρχουν κοντά στις 150 παράγωγες δομές των τριχοθηκινών που περιγράφονται στην επιστημονική βιβλιογραφία. Στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 2) έχουν συγκεντρωθεί οι πιο βασικές δομές. Λόγω της διαθεσιμότητας και της σχετικά υψηλής τοξικότητας της, η τοξίνη T-2 αποτελεί πλέον την πιο εκτεταμένα μελετημένη τριχοθηκίνη. Οι τριχοθηκίνες είναι μη πτητικές, χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις (MB 250-550). Αυτή η ομάδα των μυκοτοξινών είναι σχετικά αδιάλυτη στο νερό αλλά εξαιρετικά διαλυτή σε ακετόνη, οξικό αιθυλεστέρα, χλωροφόρμιο, διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), αιθανόλη, μεθανόλη και προπυλενογλυκόλη. Οι καθαρισμένες τριχοθηκίνες γενικά έχουν χαμηλή τάση ατμών, αλλά δεν εξατμίζονται όταν θερμαίνονται σε οργανικούς διαλύτες. Όταν διατηρούνται είτε ως κρυσταλλικές σκόνες είτε ως υγρά διαλύματα, οι ενώσεις τριχοθηκινών είναι σταθερές όταν εκτίθενται στον αέρα, στο φως, ή και στα

δύο. Επιπλέον, αυτές οι μυκοτοξίνες δεν απενεργοποιούνται σε αυτόκλειστο, αλλά απαιτούν θέρμανση στους 482,6° C για 10 min ή 260,2 ° C για 30 min για πλήρη απενεργοποίηση. Ένα διάλυμα 3% έως 5% υποχλωριώδους νατρίου είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την αδρανοποίησή τους. Η αποτελεσματικότητα αυτού του διαλύματος μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων αλκαλίου [41].

1.4.1.1.2. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

Οι τριχοθηκίνες είναι τοξικές για τους ανθρώπους, για άλλα θηλαστικά, πτηνά, ψάρια, για μια ποικιλία των ασπόνδυλων, για τα φυτά και γενικά για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η οξεία τοξικότητα των τριχοθηκινών ποικίλει για τα ζωικά είδη που μελετήθηκαν. Οι διαφορές που παρατηρούνται ως προς την ευαισθησία προς τις τριχοθηκίνες, μεταξύ των διαφόρων ειδών, είναι μικρές στις διάφορες οδούς χορήγησης των τοξινών. Μόλις οι τριχοθηκίνες εισέλθουν στο κυκλοφορικό σύστημα, ανεξάρτητα από την οδό έκθεσης, επηρεάζουν τους ιστούς. Ο μηχανισμός δράσης των τριχοθηκινών είναι κυτταροτοξικός για τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ένας αριθμός προσδιορισμών κυτταροτοξικότητας έχουν αναπτυχθεί και περιλαμβάνουν προσδιορισμούς κλωνοποίησης, μέτρηση πρωτεϊνών και σύνθεση δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA) με διαδικασία ραδιοσήμανσης και μια ουδέτερη δοκι-μασία βιωσιμότητας των ερυθρών κυττάρων. Απαιτούνται τουλάχιστον 24 με 48 ώρες για τη μέτρηση των επιπτώσεων των τριχοθηκινών στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αυτές οι μυκο-τοξίνες αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση σε μια ποικιλία ευκαρυωτικών κυττάρων. Ερευνητές έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι τριχοθηκίνες δρουν αναστέλλοντας είτε την έναρξη είτε τη διαδικασία επιμήκυνσης της μετάφρασης, παρεμβαίνοντας στη δραστηριότητα της πεπτιδυλτρανσφεράσης. Ουσιαστική αναστολή της σύνθεσης ριβο-νουκλεϊκού οξέος (RNA) (αναστολή 86%) από τριχοθηκίνες παρατηρήθηκε σε ανθρώπινα κύτταρα, αν και σε 47 κύτταρα η τοξίνη T-2 είχε μικρότερες επιδράσεις (παρεμπόδιση 15%) επί της σύνθεσης RNA στα κύτταρα.

Η αναστολή της σύνθεσης του RNA από τριχοθηκίνες πιθανώς να αποτελεί ένα δευτερεύον αποτέλεσμα της αναστολής της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Σε ορισμένους τύπους κυττάρων, η προγραμματισμένη σύνθεση του DNA αναστέλλεται έντονα όταν εκθέτονται σε τριχοθηκίνες. Σε ποντίκια ή αρουραίους που εμβολιάστηκαν με τριχοθηκίνες, η σύνθεση του DNA κατεστάλη σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν, όμως σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την πρωτεϊνική σύνθεση. Μελέτες με ραδιοσημασμένες τριχοθηκίνες σε κύτταρα ποντικών υποδεικνύουν, πως η αλληλεπίδραση της τοξίνης με τα κύτταρα είναι πιο ορατή όταν παραγματοποιείται είτε με πρόσδεση της στα ριβοζώματα είτε με ελεύθερη μετακίνηση αυτής κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης του πλάσματος.

Έτσι, περαιτέρω στοιχεία δείχνουν ότι οι πρωτογενείς τοξικές επιδράσεις των τριχοθηκινών, ως ισχυρών αναστολέων της πρωτεϊνοσύνθεσης, προκαλούνται από τις ιδιότητές τους. Δεδομένου ότι οι τριχοθηκίνες είναι αμφιφιλικά μόρια, μια έρευνα που επικεντρώνεται σε διάφορα είδη αλληλεπιδράσεων με κυτταρικές μεμβράνες κατέληξε στο συμπέρασμα πως η τοξίνη T-2 επιδρά στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων των πονικών/αρουραίων. Η υπεροξειδωση λιπιδίων αυξάνεται στο ήπαρ, στο σπλήνα, στα νεφρά, στο θύμο αδένες και στο μυελό των οστών, όταν οι αρουραίοι δέχονται μία μόνο δόση της τοξίνης T-2. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι τριχοθηκίνες θα μπορούσαν να προκαλέσουν κάποιες αλλαγές στη δομή της μεμβράνης, η οποία με τη σειρά της διεγείρει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Μόλις οι τριχοθηκίνες διασχίζουν το φράγμα της μεμβράνης του πλάσματος, εισέρχονται στο κύτταρο, όπου μπορούν να αλληλεπιδρούν με μια σειρά από στόχους, συμπεριλαμβανομένων των ριβοσωμάτων και των μιτοχονδρίων. Αυτές οι τοξίνες αναστέλλουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου τη δραστηριότητα της αφυδρογονάσης και τη μιτοχονδριακή σύνθεση πρωτεϊνών. Η τοξίνη που διεγείρει τη μεταβολή των μιτοχονδριακών μεμβρανών συμβάλλει στην κυτταρική ενεργότητα και στην κυτταρική κυτταροτοξικότητα. Παρά το γεγονός ότι οι αρχικές έρευνες σχετικά με το μηχανισμό δράσης των τριχοθηκινών προτείνουν την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, ως ο κύριος μηχανισμός δράσης, οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η επίδραση αυτών των τοξινών είναι ποικιλόμορφη. Ο μεταβολισμός τους σε σύγκριση με άλλες μυκοτοξίνες, όπως οι αφλατοξίνες, δεν φαίνεται να απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση για να ασκήσουν τη βιολογική τους δραστηριότητα. Έπειτα από άμεση δερματική εφαρμογή ή από κατάποση, οι τριχοθηκίνες μπορεί να προκαλέσουν ταχύ ερεθισμό στο δέρμα ή στο βλεννογόνο του εντέρου. Σε συστήματα χωρίς κύτταρα ή σε απομονωμένα κύτταρα σε καλλιέργειες, αυτές οι μυκοτοξίνες προκαλούν ταχεία αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και της αποσυσσωμάτωσης των πολυσωμάτων (*polysomes*). Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι τριχοθηκίνες έχουν μοριακή ικανότητα άμεσης αντίδρασης με τα κυτταρικά συστατικά. Παρά το άμεσο αυτό αποτέλεσμα, είναι δυνατόν να μετρηθούν η τοξικοκινητική και ο μεταβολισμός των τριχοθηκινών. Η λιπόφιλη φύση αυτών των τοξινών υποδηλώνει ότι απορροφώνται εύκολα μέσω του δέρματος, του εντέρου και του βλεννογόνου των πνευμόνων. Η απορρόφηση της τοξίνης T-2 είναι ταχεία όταν λαμβάνεται από το στόμα, ενώ η συγκέντρωση της επισημασμένης τοξίνης κορυφώνεται στο αίμα εντός 1 h. Αυτό δείχνει ότι οι τριχοθηκίνες απορροφούνται ταχέως μέσω του βλεννογόνου του εντέρου. Ποντίκια, αρουραίοι, και ινδικά χοιρίδια πεθαίνουν εντός 12 h μετά από έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις αερολύματος μυκοτοξίνης, χωρίς εμφανείς βλάβες στους πνεύμονες ή πνευμονικό οίδημα. Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που αφορούν στη δόση της τοξίνης T-2 μέσω της στοματικής κοιλότητας, που προκαλεί άμεσες βλάβες στο βλεννογόνο του εντέρου. Από αυτά τα δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι τριχοθηκίνες απορροφούνται γρήγορα το βλεννογόνο των πνευμόνων και του εντέρου και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος για να προκαλέσουν τοξικότητες που σχετίζονται με αυτές τις τοξίνες. Αντίθετα, απορροφώνται αργά από το δέρμα, ειδικά

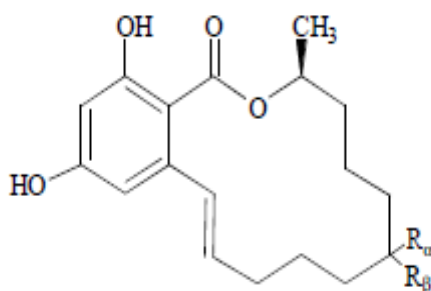
όταν εφαρμόζονται ως σκόνη ή πούδρα. Ωστόσο, η δερματική έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της τοξίνης T-2 προκαλούν συστηματική τοξικότητα, ακόμη και θάνατο, ειδικά αν η μυκοτοξίνη βρίσκεται διαλυμένη σε μέσα όπως το DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο). Ορισμένες γραμμές καλλιέργειας κυττάρων και στομαχικών βακτηρίων μεταβολίζουν την τοξίνη T-2 με απα-κυλίωση «*specific deepoxidation*» (δηλαδή, η απομάκρυνση του οξυγόνου από το δακτύλιο εποξειδίου στις θέσεις C-12', 13' για να δώσει ένα διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα) και οξειδωση των θέσεων C-3' και C-4' στις ισοβαλερυλ-πλευρικές αλυσίδες των τοξινών T-2 και HT-2 ενός μεταβολίτη. Ένας αριθμός διαφορετικών τύπων κυττάρων που περιέχουν τις μεταβολικές διαδικασίες είναι απαραίτητος για το μεταβολισμό των τριχοθηκινών. Φαρμακοκινητικές μελέτες στις οποίες η μυκοτοξίνη T-2 χορηγήθηκε τόσο ενδοαγγειακά όσο και με αεροζόλ, κατέδειξαν πως καθώς μειώνεται η συγκέντρωση της μητρικής μυκοτοξίνης τριχοθηκίνης του πλάσματος, οι απακυλιωμένοι και υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες και τα γλυκουρονιδικά προϊόντα σύζευξης γρήγορα εμφανίζονται και εξαφανίζονται από την κυκλοφορία. Από αυτές τις διάφορες παρατηρήσεις, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η φαρμακοκινητική των τριχοθηκινών είναι συνάρτηση του ποσοστού απορρόφησης μέσα στη γενική κυκλοφορία, στο μεταβολισμό, στην κατανομή ιστού, και στην απέκκριση.

Μελέτες που αφορούν τους ιστούς έχουν δείξει πως το ήπαρ είναι το κύριο όργανο για το μεταβολισμό των τριχοθηκινών. Η χολή και ο γαστρεντερικός σωλήνας βρέθηκαν να περιέχουν μεγάλες ποσότητες ραδιενέργειας μετά την ενδοαγγειακή, ενδομυϊκή, στοματική, ή διαδερμική χορήγηση της ραδιοσημασμένης τοξίνης T-2. Μετά από μια ενδοφλέβια δόση της τοξίνης T-2, το 95% της συνολικής ραδιενέργειας απομακρύνεται από τον οργανισμό μέσω των ούρων και των κοπράνων, σε αναλογία 3 προς 1. Η πλειονότητα των προϊόντων που αποβάλλονται είναι είτε μεταβολίτες είτε γλυκουρονιδικό σύζευγμα των μεταβολιτών. Ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης των μυκοτοξινών ή των ειδών των ζώων που ελέγχθηκαν, οι τριχοθηκίνες μεταβολίζονται ταχέως και απεκκρίνονται από τα ούρα και τα κόπρανα. Η οδός έκθεσης των τοξινών στα ζώα και το είδος των ζώων μπορούν να επηρεάσουν την εξέλιξη του μοτίβου των μεταβολιτών που εκκρίνονται στα ούρα. Οι αποακετυλιωμένοι και υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες εμφανίζονται στα περισσότερα από τα είδη που έχουν αξιολογηθεί μέχρι σήμερα. Μια μικροσωμική, μη ειδική καρβοξυλεστεράση, που προέρχεται από το ήπαρ, υδρολύει επιλεκτικά τη C-4' ακετυλο ομάδα της τοξίνης T-2 για να αποδώσει την τοξίνη HT-2. Εκτός από τα ηπατικά μικροσώματα, η δραστηριότητα της καρβοξυλεστεράσης που είναι ειδική στις τριχοθηκίνες έχει ανιχνευθεί στον εγκέφαλο, στα νεφρά, στο σπλήνα, στο έντερο, στα λευκά αιμοσφαίρια, και στα ερυθροκύτταρα. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία της καρβοξυλεστεράσης στην αποτοξίνωση των τριχοθηκινών. Το ηπατικό κυτόχρωμα P-450 είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της υδροξυλίωσης των θέσεων C-3' και C-4' της ισοβαλερυλ-πλευρικής αλυσίδας των τοξινών T-2 και HT-2. Όταν το οξυγόνο απομακρύνεται από την εποξειδική ομάδα μιας τριχοθηκίνης για να δώσει το δεσμό

άνθρακα-άνθρακα σχηματίζονται οι αφ-έποξυ-μεταβολίτες, που ουσιαστικά είναι μη τοξικοί.

1.4.1.2. ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΕΣ (ZEA)

Η ZEA είναι ένας οιστρογόνος μεταβολίτης της οικογένειας των ζεαραλενονών που παράγεται κυρίως από τα είδη *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* και *F. equiseti*. Αυτά τα είδη μπορούν επίσης να παράγουν ένα μικρό ποσοστό συγγενών μεταβολιτών που περιέχουν α-ζεαραλενόνη και β-ζεαραλενόνη (α- και β-ZOL) και είναι τα πιο σημαντικά παράγωγα (Σχήμα 2 - Πίνακας 3). Όλες οι ζεαραλενόνες είναι οιστρογόνες ενώσεις, αν και η α-ζεαραλενόνη έχει υψηλότερο οιστρογόνο δυναμικό σε σχέση με τη ZEA και με τη β-ζεαραλενόνη, πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας δέσμευσης από τους υποδοχείς οιστρογόνων.



Σχήμα 2: Χημική δομή Ζεαραλενόνης, α- Ζεαραλενόλης και β- Ζεαραλενόλης [40]

Πίνακας 3: Χημική δομή Ζεαραλενόνης, α- Ζεαραλενόλης και β- Ζεαραλενόλης [40]

	R
Ζεαραλενόλη	O
α- Ζεαραλενόλη	OH(α)
β- Ζεαραλενόλη	OH(β)

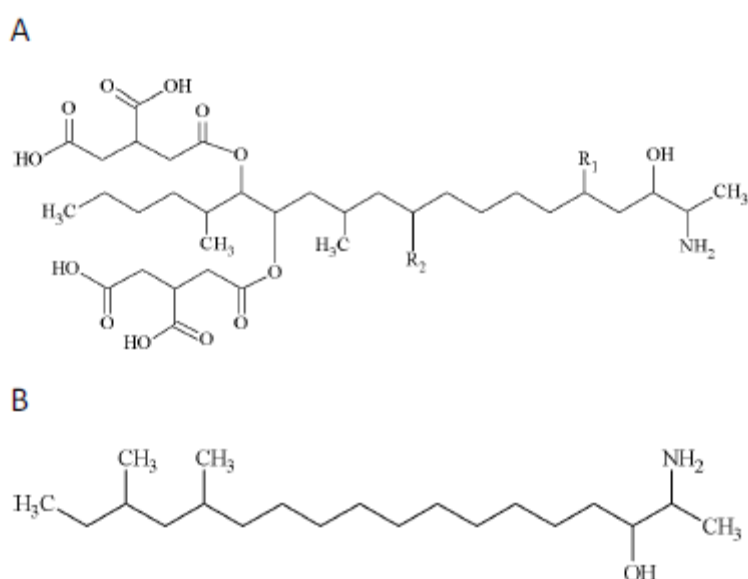
Η δέσμευση της ζεαραλενόνης από τους υποδοχείς οιστρογόνων έχει ως αποτέλεσμα διάφορα υπεροιστρογόνα ζώα να αποκτήσουν σύνδρομο. Όταν προσλαμβάνεται η ZEA, υφίσταται βιομετατροπή, κυρίως στο ήπαρ, σε α- και β-ZOL σε αναλογίες που παρουσιάζουν διακυμάνσεις μεταξύ των ζωικών ειδών. Αυτό οδηγεί σε

διαφοροποιήσεις της ευαισθησίας των ζωικών ειδών στη ZEA και διαπιστώθηκε πως οι χοίροι είναι πιο ευαίσθητοι από άλλα ζώα σ' αυτή, επειδή μετατρέπουν κυρίως τη ZEA στην πιο ισχυρή α-ZOL.

Στο ήπαρ των βοοειδών η ZEA κυρίως μετασχηματίζεται σε β-ZOL, ενώ σε μια μελέτη όπου οι αγελάδες τρέφονταν με μολυσμένη βρώμη η αναλογία των ZEA, α- και β-ZOL ήταν (1: 1: 5). Οι μικροοργανισμοί του προστομάχου μπορούν να μετατρέψουν τη ZEA, και η αναλογία να διαφοροποιηθεί σε (30:40:30), αντίστοιχα. Σε ευρύ ευρωπαϊκό έλεγχο, η μυκοτοξίνη ZEA του *Fusarium* βρέθηκε στο 32% των 5.000 δειγμάτων κόκκων δημητριακών και προϊόντων δημητριακών που μελετήθηκαν [40].

1.4.1.3. ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ

Πρόκειται για μια ομάδα μυκοτοξινών που εμφανίζει καρκινογόνες ιδιότητες καθώς διαθέτουν σημαντική δομική ομοιότητα με την σφιγγανίνη που αποτελεί πρόδρομο των σφιγγολιπιδίων. Τα σφιγγολιπίδια πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος και την αναγνώριση των κυττάρων, αλλά η βιοσύνθεση σφιγγανίνης μπορεί να ανασταλεί από τις φουμονισίνες λόγω της στενής δομικής ομοιότητάς τους. Οι φουμονισίνες περιέχουν ένα σκελετό 18 ατόμων άνθρακα με διαφορετικές πλευρικές ομάδες που έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις σειρές A, B, C και P, αν και μια νέα σειρά, PHFB(4)OSA, έχει πρόσφατα αναγνωριστεί. Η σειρά φουμονισίνη B (FB), η οποία περιλαμβάνει τις τοξικολογικά σημαντικές FB1, FB2 και FB3, (Σχήμα 3 - Πίνακας 4) βρίσκεται σε αφθονία με την FB1 ως το κυρίαρχο ανάλογο σε αυτή τη σειρά.



Σχήμα 3: Χημική δομή των FB1, B2 ΚΑΙ B3 (A) ΚΑΙ 2-AOD-3-ol (B) [40].

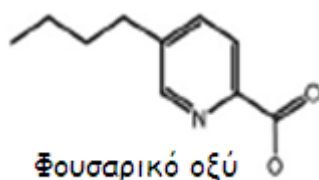
Πίνακας 4: Χημική δομή των FB1, B2 ΚΑΙ B3 (A) ΚΑΙ 2-AOD-3-ol (B) [40].

	R1	R2
FB1	OH	OH
FB2	OH	H
FB3	H	OH

Οι φουμονισίνες παράγονται κυρίως από ορισμένα μέλη του *Gibberella fujikuroi* ως συνδυασμός των *F.proliferatum* και *F.verticillioides*. Τα είδη αυτά απαντώνται κυρίως στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, και οι μολύνσεις των καλλιεργειών από φουμονισίνες είναι πιο συχνές σε αυτές τις περιοχές. Η FB1 ανιχνεύθηκε στο 66% των 801 δειγμάτων αραβοσίτου που αναλύθηκαν σε επίπεδα μέχρι 10,2 mg/L. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο *Aspergillus niger* που έχει πρόσφατα αναγνωριστεί ως παραγωγός των δύο αναλόγων φουμονισίνης FB2 και FB4. Μια φουμονισίνη όπως η ένωση, 2-AOD-3-όλης (Σχήμα 3 - Πίνακας 4), που απομονώθηκε από *F. avenaceum*, μπορεί να παραχθεί και από άλλα είδη όπως *F. tricinctum*, *F. roae* και *F. Langsethiae*. Η ένωση όμως αυτή δεν έχει ανιχνευθεί σε φυσικώς μολυσμένα σιτηρά ακόμα, και είναι επίσης απροσδιόριστο αν έχει το ίδιο τοξικό δυναμικό με τις άλλες φουμονισίνες [40].

1.4.1.4. ΦΟΥΣΑΡΙΚΟ ΟΞΥ (5-butylpicolinic acid)

Τα τελευταία χρόνια, αποδείχθηκε ότι τα είδη *Fusarium* μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες όπως φουσαρίνη C, φουσαρικό οξύ και φουμονισίνες. Το φουσαρικό οξύ έχει ένα ευρύ φάσμα και θεωρείται ότι σχετίζεται άμεσα με τα φαινόμενα της ριζοκτονίας, του μαρασμού των αγγείων και το σάπισμα ριζών πολλών λαχανικών στις καλλιέργειές τους. Εκτός από τον κρίσιμο ρόλο του φουσαρικού οξέος στα φυτά, μπορεί να είναι τοξικό έναντι ορισμένων ζώων, όπως στους αρουραίους. Επίσης, το φουσαρικό οξύ μπορεί να αυξήσει τη συνολική τοξικότητα άλλων μυκοτοξινών με τις οποίες συνυπάρχει λειτουργώντας συνεργιστικά. Είναι αξιοσημείωτο πως ορισμένοι κίνδυνοι για την υγεία θα μπορούσαν να έχουν εξαιρεθεί δεδομένου ότι το φουσαρικό οξύ, η φουσαρίνη C και η φουμονισίνη FB3 μπορούν να συνυπάρχουν και να αλληλεπιδρούν με τις FB1 και FB2 [42]. Παρακάτω παρατίθεται η σχηματική αναπαράσταση της δομής του φουσαρικού οξέος (Σχήμα 4)



Σχήμα 4: Δομή φουσαρικού οξέος [43].

Το φουσαρικό οξύ (5-n-βουτυλ-2-πυριδινοκαρβοξυλικό οξύ), θεωρείται κυρίως ως φυτοτοξίνη, αλλά είναι επίσης και μυκοτοξίνη. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από *Gibberella fujikuroi*, παράγεται από διάφορα είδη *Fusarium*. Το φουσαρικό οξύ προκάλεσε έμετο όταν χορηγήθηκε από το στόμα σε χοίρους (200 mg/kg σωματικού βάρους), και προκάλεσε επίσης νευροχημικές μεταβολές. Το φουσαρικό οξύ μπορεί να προκαλέσει περιορισμό στην αύξηση του σωματικού βάρους των ανώριμων χοίρων όταν τροφοδοτούνται με 12-16 mg/kg στη διατροφή τους με μια σχετικά σταθερή συγκέντρωση της δεσοξυνιβαλενόλης (βομιτοξίνη) (2,2 έως 2,5 mg/kg). Αρουραίοι που χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα, έπεσαν σε λήθαργο όταν τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά δόση 100 mg/kg φουσαρικού οξέος, λόγω αλλαγών σε νευροδιαβιβαστές στον εγκέφαλο και στην επίφυση, Σημαντικές συγκεντρώσεις φουσαρικού οξέος βρέθηκαν σε 41 από 48 δείγματα των ζωοτροφών χοίρων, με ξηρό αραβόσιτο και υψηλής υγρασίας αραβόσιτο, σιτάρι και κριθάρι (μέση συγκέντρωση εμπορεύματος 12-36 mg/kg) και διαπιστώθηκε ότι οι αναλύσεις για φουσαρικό οξύ θα πρέπει να συνδέονται με προσδιορισμούς των τριχοθικινών, όπως βομιτοξίνη σε τροφές χοίρων.

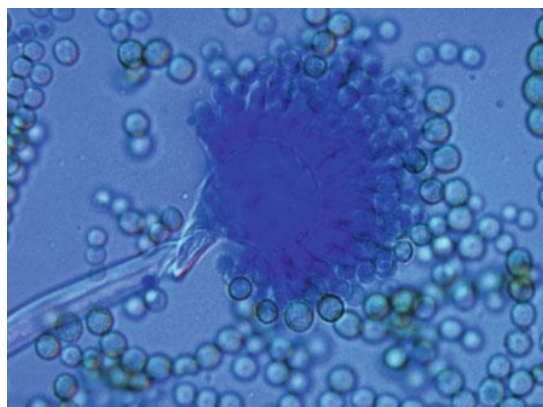
Το 9,10-διυδροφουσαρικό οξύ και οι μεθυλ-εστέρες των δύο μεταβολιτών έχουν μελετηθεί με ανάστροφης φάσης ανάλυση LC καλλιιεργειών του *Fusarium*. Άλλοι σχετικοί μεταβολίτες (από *Fusarium moniliforme*) είναι το 10,11-διυδροξυφουσαρικό οξύ και το 5-(3'-καρβοξυπροπυλ)-2-πυριδινο-καρβοξυλικό οξύ, στο οποίο η ομάδα του μεθυλίου του φουσαρικού οξέος οξειδώνεται προς μία ομάδα καρβοξυλίου [44, 45]. Η μέθοδος LC-MS/MS [42, 43] όπως και η μέθοδος TLC [46] έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του φουσαρικού οξέος σε καλλιέργειες.

1.4.1.5. ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

Οι αφλατοξίνες (AFS) είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται κυρίως από διάφορα είδη μυκήτων του γένους *Aspergillus*, και έχουν την υψηλότερη τοξικότητα μεταξύ των μυκοτοξινών λόγω των τοξικογόνων, μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους. Ο μύκητας *Aspergillus flavus* φαίνεται στην παρακάτω στο Σχήμα 5.

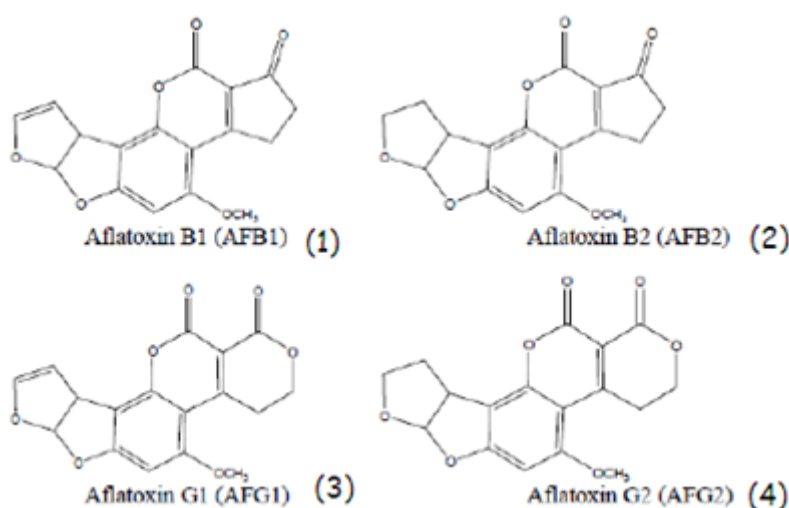
Ο μύκητας βρέθηκε σε αραχίδες, που είχαν χρησιμοποιηθεί ως ζωοτροφή σε διαφορετικά ζώα. Λόγω αυτής της μόλυνσης, 100.000 γαλοπούλες πέθαναν το 1960 στη Μεγάλη Βρετανία από τη λεγόμενη «νόσος Turkey-X». Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι οι αφλατοξίνες παράγονται τόσο από διάφορα είδη *Aspergillus* όσο και από ορισμένα είδη *Penicillium*. Το όνομα «αφλατοξίνες» είναι μια συντομογραφία του ονόματος «τοξίνες του *Aspergillus flavus*». Σήμερα, οι αφλατοξίνες συγκαταλέγονται ανάμεσα στις πιο τοξικές και καρκινογόνες ενώσεις. Παρόλο που στις περισσότερες χώρες του κόσμου έχουν θεσπιστεί περιορισμοί για τα μέγιστα ανεκτά επίπεδα αφλατοξινών στα τρόφιμα, η μόλυνση από αυτές τις ενώσεις αποτελεί πρόβλημα. Οι

αφλατοξίνες βρίσκονται τακτικά σε διάφορα τρόφιμα, και ιδιαίτερα στο γάλα των αγελάδων που τις προσλαμβάνουν από μολυσμένες ζωοτροφές [40].



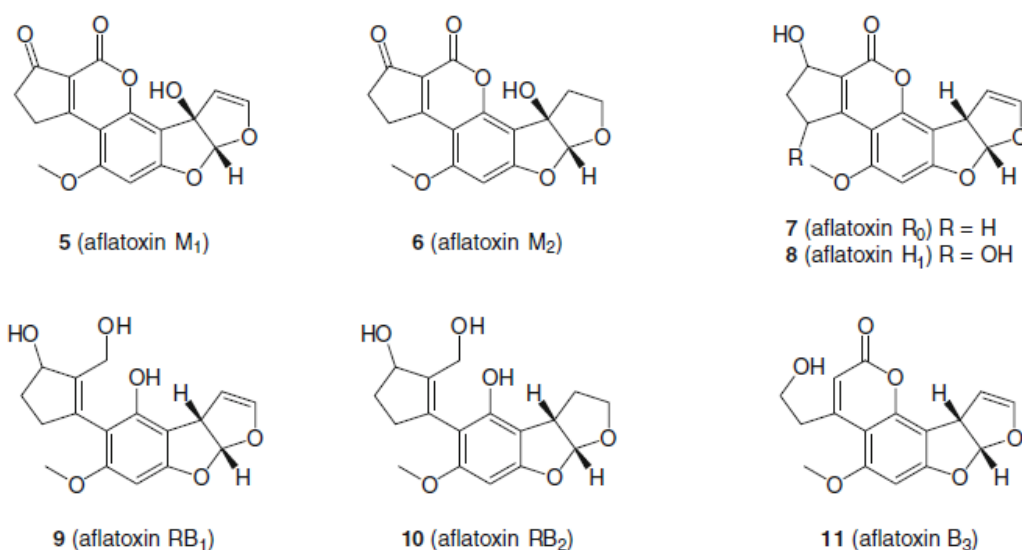
Σχήμα 5: Σπόρια *Aspergillus flavus* όπως φαίνονται κάτω από το μικροσκόπιο φωτός σε 600× μεγέθυνση [47].

Από χημικής άποψης, οι τοξίνες αυτές είναι παράγωγα της διφουρανοκουμαρίνης, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 6), και παράγονται κυρίως από δύο είδη του μύκητα *Aspergillus*, που βρίσκονται ειδικά σε περιοχές με ζεστά και υγρά κλίματα. Ο *A. flavus* είναι πανταχού παρόν και προτιμώντας τα υπέργεια μέρη των φυτών (φύλλα, άνθη), παράγει μόνο τις αφλατοξίνες Β (αφλατοξίνη Β1 και Β2). Ο *A. parasiticus* παράγει τόσο Β και όσο και G αφλατοξίνες (AFB1, AFB2, AFG1 και AFG2). Προσαρμόζεται καλύτερα στο έδαφος και έχει περιορισμένη εξάπλωση. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος της μόλυνσης από αφλατοξίνες είναι λόγω της ευρείας διάδοσης του *A. flavus*. Άλλα είδη *Aspergillus* όπως *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. tamari*, *A. foetidus* και *A. oryzae* είναι γνωστό ότι παράγουν αφλατοξίνες, αλλά παρουσιάζουν μικρή τοξικολογική σημασία. [47].



Σχήμα 6: Χημικές δομές των αφλατοξινών Β, G [48]

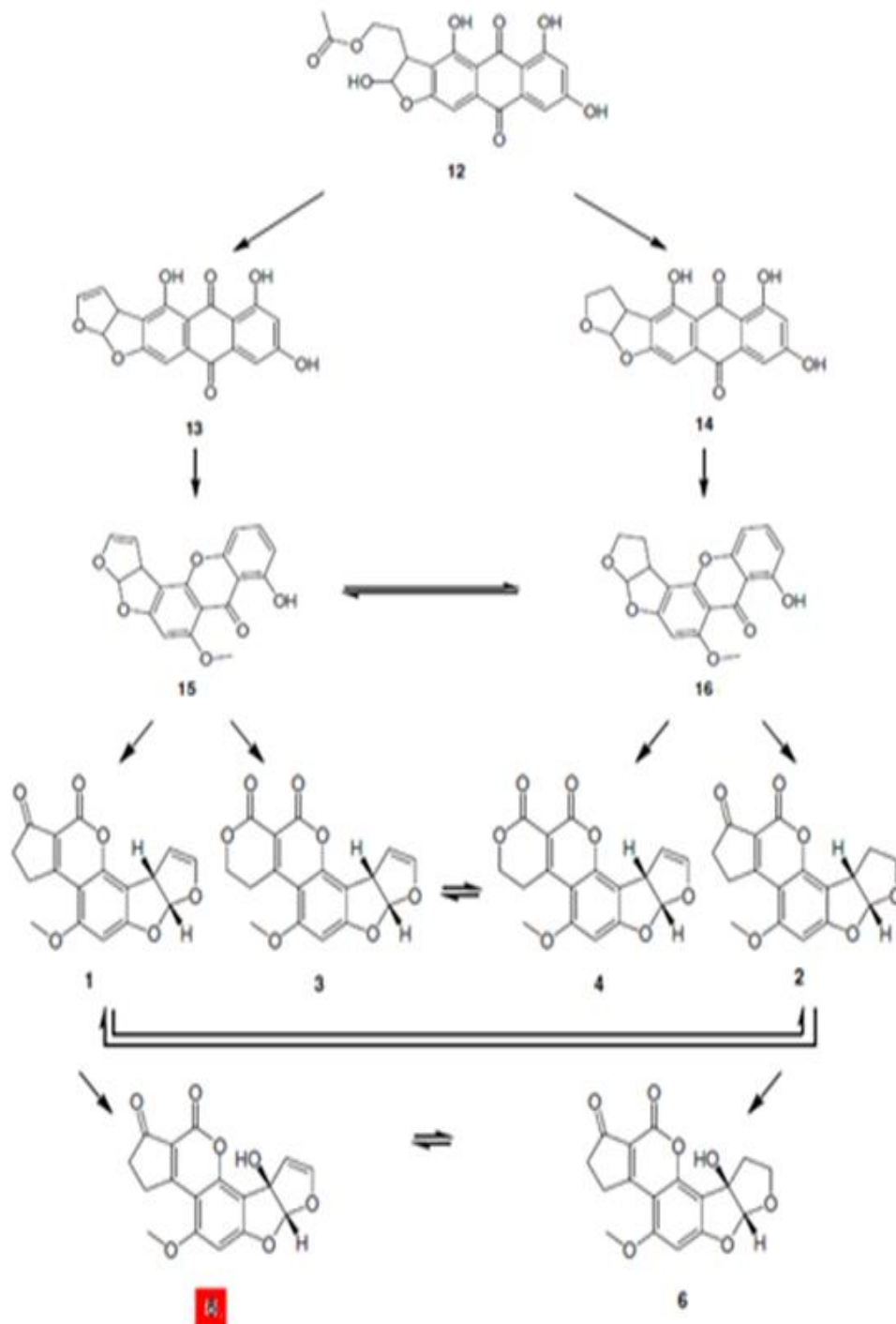
Ενώ οι αφλατοξίνες B και G αποτελούν σημαντικές ενώσεις του μύκητα *Aspergillus flavus*, παράγονται επίσης και δευτερεύοντα συστατικά αφλατοξινών από αυτόν τον οργανισμό, όπως υδροξυλιωμένα παράγωγα της αφλατοξίνης B₁ (1) και B₂ (2) (Σχήμα 6), οι λεγόμενες «τοξίνες γάλακτος», M₁ (5) και M₂ (6) (Σχήμα 7), οι οποίες φέρουν μια υδροξυ ομάδα στην ένωση των δύο φουρανικών δακτυλίων. Καλούνται «τοξίνες γάλακτος», επειδή είναι μεταβολίτες των αφλατοξινών B₁ (1) και B₂ (2). Σχηματίζονται όταν οι αγελάδες τρέφονται με μολυσμένες ζωοτροφές και στη συνέχεια εκλύονται στο γάλα τους. Άλλες αφλατοξίνες έχουν μία υδροξυ ομάδα αντί της καρβονυλικής ομάδας στον E δακτύλιο (R₀) (7), RB₁ (9), RB₂ (10), και H₁ (8)) (Σχήμα 7). Μπορούν να σχηματίζονται με μικροβιακή μετατροπή ή με χημική αναγωγή με βοροϋδρίδιο του νατρίου. Σε ορισμένες αφλατοξίνες, ο D-δακτύλιος (RB₁ (9), RB₂ (10)) (Σχήμα 7) ή ο E-δακτύλιος (B₃) (11) ανοίγει. Η αφλατοξίνη B₃ (11) (Σχήμα 7) ονομάζεται επίσης παρασιτική (*parasiticol*), επειδή ήταν η πρώτη αφλατοξίνη που απομονώθηκε από τον *Aspergillus parasiticus*. Όλες οι αφλατοξίνες φαίνονται στο ακόλουθο σχήμα και είναι μεταβολικά προϊόντα μετατροπής από τις αφλατοξίνες B [47].



Σχήμα 7: Επιλεγμένες αφλατοξίνες [47]

Όλες οι αφλατοξίνες σχηματίζονται βιοσυνθετικά από το ίδιο πρόδρομο μόριο, την *versiconal hemiacetal acetate* (12), ένα ανθραφουράνιο που είναι η 2,3-διυδροανθρα [2,3-b] φουραν-5,10-διόνη υποκατεστημένη στις θέσεις 2, 4, 6 και 8 με υδροξυ ομάδες και στη θέση 3 με μία ομάδα 2-ακετοξυαιθυλο. Πρόκειται για ένα ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης (Σχήμα 8). Η ένωση 12 σχηματίζεται από οξικό άλας, τα μέρη του οποίου μετατρέπονται σε πολυκετίδιο. Το πολυκετίδιο στη συνέχεια μεταβολίζεται σε ξανθόνη 12 (Σχήμα 8). Και η ενδιάμεση ένωση 12 μπορεί στη συνέχεια να μετασχηματιστεί είτε σε *versicolorin A* (13) (μία οργανική ένωση η οποία είναι ετεροπεντακυκλική: 3α, 12α-διυδροανθρα [2,3-b] φουρο [3,2-d] φουραν-5,10-διόνη φέρει τρεις υδροξυ υποκαταστάτες στις θέσεις 4, 6 και 8) είτε σε *versicolorin B* (14) (η οργανική ένωση η οποία είναι ετεροπεντακυκλική 2,3,3α, 12α-

τετραυδροανθρα [2,3-b] φουρο [3,2-d] φουραν-5,10-διόνη φέρει τρεις υδροξυ υποκαταστάτες στις θέσεις 4, 6 και 8) σε διάφορα στάδια.



Σχήμα 8: Βιοσύνθεση των αφλατοξινών Β (1, 2), G (3, 4), και Μ (5, 6) (ένα βέλος μπορεί να αντιπροσωπεύει περισσότερες από μία βαθμίδες) [47].

Η πρώτη (13) μπορεί να μετατραπεί σε στεριγματοκυστίνη (15), ενώ η δεύτερη (14) μπορεί να οδηγήσει σε διυδροστεριγματοκυστίνη (16). Η στεριγματοκυστίνη (15)

μπορεί να μεταβολιστεί σε αφλατοξίνες G1 (3) ή B1 (1) και η τελευταία ενδέχεται στη συνέχεια να μετατραπεί σε αφλατοξίνη M1 (5). Οι αφλατοξίνες B2 (2) και G2 (4) σχηματίζονται από την διυδροστεριγματοκυστίνη (16) και η αφλατοξίνη M2 (6) σχηματίζεται από τη μετατροπή της B2 (2). Μονοπάτια υπάρχουν επίσης που μετατρέπουν την αφλατοξίνη B1 (1) σε B2 (2), τη M1 (5) σε M2 (6), και τη G1 (3) έως G2 (4), και το αντίστροφο. Στο ακόλουθο σχήμα 8 φαίνονται τα σημαντικά βιοσυνθετικά στάδια [47].

Αυτές οι μυκοτοξίνες εμφανίζονται στα τρόφιμα λόγω της μόλυνσης από μύκητες τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή. Ο ρυθμός και ο βαθμός της μόλυνσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία (και ενεργότητα νερού), το υπόστρωμα και οι συνθήκες αποθήκευσης. Αφλατοξίνες έχουν βρεθεί σε ποικιλία γεωργικών εμπορευμάτων, αλλά η πιο έντονη μόλυνση έχει παρουσιαστεί σε δημητριακά (π.χ. καλαμπόκι και κριθάρι), στους ελαιούχους σπόρους (π.χ. φυστίκια) και στα αποξηραμένα φρούτα (π.χ. ξηρά σύκα), καθώς και στα μπαχαρικά. Οι κύριες πηγές αφλατοξινών στις ζωοτροφές είναι το φυστικέλαιο, το καλαμπόκι και το βαμβακέλαιο.

Στις ευρωπαϊκές χώρες θεωρείται πως οι αφλατοξίνες εμφανίζονται κυρίως σε εισαγόμενα τρόφιμα, αλλά αυτή τη στιγμή είναι αβέβαιο αν οι μελλοντικές αλλαγές στο κλίμα θα οδηγήσουν σε αύξηση της μόλυνσης της εγχώριας τροφικής αλυσίδας με αφλατοξίνες [49].

Οι ζωοτροφές μολύνονται από μυκοτοξίνες, όπως αφλατοξίνες (AFS) κατά την ανάπτυξη, τη συγκομιδή και/ή την αποθήκευσή τους με αποτέλεσμα τα ζώα να εκτίθενται σε αυτές. Όταν οι θηλάζουσες αγελάδες καταναλώνουν την αφλατοξίνη B1 (AFB1) από τις μολυσμένες ζωοτροφές, η AFB1 μεταβολίζεται, σχηματίζοντας ένα μονοϋδρόξυ παράγωγο, την αφλατοξίνη M1 (AFM1), η οποία εκφράζεται στο αγελαδινό γάλα. Η AFM1 είναι το κύριο υδροξυλιωμένο παράγωγο της AFB1, σχηματίζεται στο ήπαρ μέσω του P450 ένζυμου του κυτοχρώματος και εκκρίνεται στο γάλα μέσω του μαστικού αδένων των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων. Έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση σημαντικά μεγαλύτερων ποσοτήτων συμπυκνωμένων τροφών από αγελάδες υψηλής απόδοσης οδηγεί σε μεταφορά ποσοστού 6,2 % των τοξινών στα ζώα. Η AFM1 μπορεί να ανιχνευθεί στο γάλα μέσα σε 12-24 ώρες μετά την πρόσληψη της AFB1, ενώ η συγκέντρωσή της μειώνεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά από 72 ώρες.

Το Διεθνές Κέντρο Έρευνας για τον Καρκίνο κατατάσσει την AFM1 στην 1^η Ομάδα τοξινών ως πιθανώς καρκινογόνες για τον άνθρωπο. Η AFM1 δεν καταστρέφεται από την παστερίωση του γάλακτος, συνεπώς μπορεί να μεταφερθεί σε γιαούρτι, σε σκόνη γάλακτος και σε άλλα προϊόντα με βάση το γάλα. Στην πραγματικότητα, η μόλυνση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων με AFM1 μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη γεωγραφία, το περιβάλλον και τις κλιματικές συνθήκες, αλλά και το επίπεδο ανάπτυξης της χώρας. Η παρουσία των αφλατοξινών στις ζωοτροφές που

χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των αγελάδων είναι επίσης ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τα επίπεδα της AFM1 στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Πιο αναλυτικά, το γάλα θεωρείται ότι είναι μια τέλεια φυσική τροφή για τους καταναλωτές για όλες τις ηλικίες, λόγω της υψηλής θρεπτικής του αξίας. Είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και αποτελεί μια πολύτιμη πηγή ασβεστίου, βιταμινών και αντιοξειδωτικών. Ωστόσο, το γάλα αποδεικνύεται ότι έχει το μεγαλύτερο δυναμικό για την εισαγωγή της AFM1 στην ανθρώπινη διατροφή. Η συχνότητα που εμφανίζεται η AFM1 σε εμπορικά διαθέσιμο γάλα και σε γαλακτοκομικά προϊόντα, η υψηλή κατανάλωση των προϊόντων αυτών από τον ανθρώπινο πληθυσμό, ειδικά από βρέφη και μικρά παιδιά και η πιθανή καρκινογένειά της, οδήγησε σε αυξημένη ανησυχία με αποτέλεσμα τη λήψη μέτρων για τον έλεγχο της μόλυνσης από AFM1. Υπό το φως αυτής της ανησυχίας, πολλές χώρες έχουν θεσπίσει κανονιστικά όρια για την AFM1 στο γάλα και τα παράγωγα προϊόντα, με τιμές που ποικίλλουν ανάλογα με την εθνική νομοθεσία. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας, εξήντα χώρες έχουν θεσπίσει κανονιστικά όρια για την AFM1. Ο κανονισμός της Ευρωπαϊκής Επιτροπής 1881/2006 θέτει ένα ανώτατο όριο 0,05 μg/kg για την AFM1 στο νωπό γάλα, στο θερμικά κατεργασμένο γάλα και στο γάλα που προορίζεται για την παρασκευή προϊόντων με βάση αυτό. Το ίδιο όριο ίσχυε και στη Σερβία από το 2011 (Σερβικός κανονισμός, 28/2011) μέχρι το τέλος του Φεβρουαρίου 2013. Ωστόσο, μετά το ξέσπασμα της μόλυνσης του γάλακτος από AFM1 που συνέβη στη Σερβία στο τέλος του Φεβρουαρίου του 2013, η Σερβική Κυβέρνηση θέσπισε νέο ανώτατο όριο 0,5 μg/kg (Σερβικός κανονισμός, 20/2013), που φαινόταν να είναι ένα πρακτικό όριο συμβιβασμού μεταξύ της ανάγκης για τον έλεγχο της ποσότητας της AFM1 και τις οικονομικές συνέπειες από το καθορισμένο όριο. Αυτή η τιμή, αν και θεωρείται ως προσωρινό μέτρο για την αντιμετώπιση της κρίσης, δεν έχει ακόμα αναμορφωθεί [50].

1.5.ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1

Εννέα εργαστήρια συνεργάστηκαν σε μια διεθνή μελέτη της σταθερότητας των πρότυπων διαλυμάτων της αφλατοξίνης Μ1. Η έρευνα επιβεβαίωσε την καταλληλότητα της φασματο-φωτομετρίας απορρόφησης στο υπεριώδες, όπως περιγράφεται για την τυποποίηση των διαλυμάτων των αφλατοξινών Β και G, αλλά και της Μ1. Διαπιστώθηκε ότι τα πρότυπα της αφλατοξίνης Μ1 διαλύονται καλύτερα όταν χρησιμοποιείται διαλύτης χλωροφόρμιο σε σχέση με το διαλύτη βενζόλιο-ακετονιτρίλιο (98+2) και δε διαπιστώνεται καμία μεταβολή έπειτα από διατήρησή τους στους -10 °C. Η ένταση φθορισμού των αφλατοξινών Β1 και Μ1 έπειτα από διαχωρισμό πηκτής βρέθηκε να είναι σχεδόν η ίδια είτε οπτικά είτε με πυκνομετρία.

Σε όλες τις χημικές μεθόδους που περιγράφονται για την ανάλυση της αφλατοξίνης M1 στο γάλα, η ποσότητα της τοξίνης εκτιμάται έπειτα από διαχωρισμό της από χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Η μέθοδος απαιτεί τη σύγκριση της έντασης φθορισμού ενός δείγματος της αφλατοξίνης M1 που έχει εκχυλιστεί από γάλα, με αυτή του διαλύματος της M1 έπειτα από διαχωρισμό με TLC. Η συγκέντρωση και η σταθερότητα των πρότυπων διαλυμάτων της M1 αποτελεί κρίσιμο θέμα για την αξιοπιστία των αναλυτικών μεθόδων. Λόγω της ομοιότητας των δομών των τοξινών B και M, είναι πιθανό να χρησιμοποιούνται παρόμοιες τεχνικές και για τις δύο τοξίνες, κάτι που επιβεβαιώνεται και από εργαστηριακές δοκιμές.

Κάθε εργαστήριο διέλυσε δύο αμπούλες της αφλατοξίνης M1 σε βενζόλιο-ακετονιτρίλιο (98+2), 2 σε χλωροφόρμιο (που περιείχε 0,6-1,0 % μεθανόλη) και μία σε βενζόλιο-ακετονιτρίλιο (98+2), που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό. Η συγκέντρωση της M1 στις αμπούλες ήταν 10 μg/mL. Διαπιστώθηκε πως ήταν πιο διαλυτή στο βενζόλιο-ακετονιτρίλιο. Ένας στόχος της έρευνας ήταν να διαπιστωθεί σε ποιο διαλύτη είναι σταθερότερη η τοξίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ξεκάθαρα πως λαμβάνονται πιο στιβαρές τιμές σε χλωροφόρμιο από ό,τι σε βενζόλιο-ακετονιτρίλιο, και βρέθηκαν συγκρίσιμα με αντίστοιχα αποτελέσματα της IUPAC για τις αφλατοξίνες [51].

Τα πρότυπα διαλύματα είναι συνήθως χλωροφορμικά διαλύματα των τεσσάρων αφλατοξινών σε δεδομένες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, το διάλυμα χλωροφορμίου εξατμίζεται εύκολα, εκτός εάν λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα, όπως να διατηρούνται τα πρότυπα σε παγόλουτρο κατά τη διάρκεια της χρήσης τους και να σφραγίζονται στο τέλος. Στις συνήθεις αναλύσεις, η σταδιακή συμύκνωση του πρότυπου διαλύματος λόγω της απώλειας χλωροφορμίου οδήγησε σε ανακριβή συμπεράσματα κατά τη σύγκρισή του με άγνωστα διαλύματα. Για το λόγο αυτό άρχισαν να χρησιμοποιούνται λιγότερο πτητικοί διαλύτες για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων.

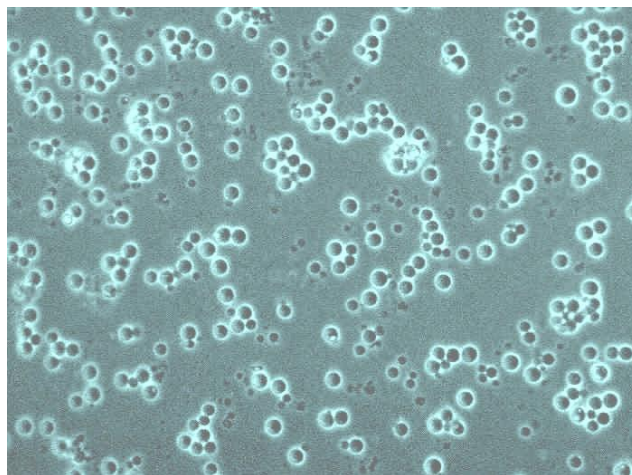
Έπειτα από αναλύσεις διαπιστώθηκε πως μέρος της αφλατοξίνης M1 χάνεται κατά τη μεταφορά της από διάλυμα χλωροφορμίου σε νερό. Δεδομένου ότι η μεταφορά πραγματοποιείται απουσία οξυγόνου, δεν υπάρχει εξήγηση γι' αυτή την απώλεια. Επίσης, βρέθηκε πως η G1 παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση από τη B1, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε μεγαλύτερη αστάθεια της πρώτης [52].

1.6. ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ B1

Η χρήση των μικροοργανισμών, όπως του *Saccharomyces cerevisiae* (SC) (Σχήμα 9), αποτελεί μια ελκυστική εναλλακτική λύση για τον έλεγχο ή την εξάλειψη των αφλατοξινών στα τρόφιμα, καθώς η AFB1 έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε αυτόν. Προϊόντα που έχουν ως βάση τον SC (κυτταρικό τοίχωμα ζύμης από την

αρτοποιία και τη ζυθοποιία, αδραντοποιημένη ζύμη αρτοποιίας, ή ζύμη αλκοόλης) έχουν μελετηθεί, δείχνοντας ότι σε pH 3, στους 37 °C και για διάρκεια επαφής 15 min, η απομάκρυνση της AFB1 κυμαίνεται από 2,5 % έως 49,3 %, ανάλογα με τη συγκέντρωση της τοξίνης στο μέσο και το προϊόν της ζύμης που χρησιμοποιείται.

Λαμβάνοντας υπόψη την τεράστια διαθεσιμότητά τους σε όλο τον κόσμο, ιδιαίτερα στη διαδικασία της ζύμωσης ζαχαροκάλαμου και μύρας, τα προϊόντα που βασίζονται στον SC θεωρούνται ως ενδιαφέρουσες εναλλακτικές λύσεις για την απομάκρυνση της AFB1 από ένα μολυσμένο μέσο [33].



Σχήμα 9: *Saccharomyces cerevisiae* [53].

Οι προσμείξεις των τροφίμων έχουν άμεση επίδραση στη μικροχλωρίδα του εντέρου. Η υγιής εντερική μικροχλωρίδα περιέχει πολλά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB). Ορισμένα από αυτά που ονομάζονται προβιοτικά στελέχη, έχουν διαπιστωθεί πως ωφελούν την υγεία. Έχει αναφερθεί προστατευτική δράση των LAB έναντι μεταλλαξιόνων τροφίμων όπως ετεροκυκλικών αμινών, N-νιτροζο-ενώσεων και αφλατοξινών. Σε πολλές από αυτές τις μελέτες εμπλέκονται στελέχη *Lactobacillus* και η φυσική δέσμευση από αυτά, αποτελεί έναν μηχανισμό απομάκρυνσης μεταλλαξιόνων ενώσεων [54].

Η φύση αυτής της δέσμευσης απασχολεί άμεσα τους επιστήμονες. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι δύο προβιοτικά στελέχη, το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) και το *L. rhamnosus* LC-705 (DSM 7061), απομακρύνουν αποτελεσματικά την αφλατοξίνη B1 (AFB1) από διαλύματα. Οι θεωρητικοί υπολογισμοί που έχουν πραγματοποιηθεί δείχνουν ότι η απομάκρυνση της AFB1 δεν προκύπτει μόνο από την παγίδευση της τοξίνης στο βακτηριακό ίζημα κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης [55]. Επειδή η μεταβολική μετατροπή και η ομοιοπολική πρόσδεση των AFB1 από τα βακτήρια έχουν αποκλειστεί ως μηχανισμοί απομάκρυνσης, έχει προταθεί ότι η πρόσδεση της AFB1 στα βακτήρια πραγματοποιείται μη-ομοιοπολικά. Αυτά τα στελέχη μειώνουν την πρόσληψη της

AFB1 από τους ιστούς του δωδεκαδάκτυλου των νεοσσών και μπορεί να επιτρέπουν την αποτοξίνωση της ανθρώπινης διατροφής, μέσω της μείωσης της απορρόφησης αφλατοξίνης από το γαστρεντερικό σωλήνα. Είναι σημαντικό ότι τα νεκρά βακτήρια παρουσιάζουν επίσης υψηλή ικανότητα πρόσδεσης της τοξίνης, αφού η επιβίωση των ζωντανών βακτηρίων μειώνεται κατά τη διέλευση τους μέσα από το στομάχι που έχει χαμηλό pH. Παρόμοιες δεσμευτικές ικανότητες έχουν αναφερθεί για ζωντανά και νεκρά (που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία ή κατεργασία με οξύ) βακτήρια. Τα νεκρά στελέχη GG και LC-705 προσδένουν την AFB1 τόσο αποτελεσματικά όσο και τα ζωντανά βακτήρια.

Είναι σημαντική η κατανόηση της φύσης της δέσμησης, για παράδειγμα, αν η πρόσδεση είναι ενδοκυτταρική ή εξωκυτταρική, αναστρέψιμη ή μη αναστρέψιμη, ώστε να διαμορφωθεί μια άποψη για το μηχανισμό απομάκρυνσης της αφλατοξίνης. Εάν η αφλατοξίνη προσδένεται μη ομοιοπολικά και εξωκυτταρικά, τότε μπορεί να απελευθερωθεί από τη συνεχή πλύση της βακτηριακής επιφάνειας στο γαστρεντερικό σωλήνα, εάν η σύνδεση δεν είναι ισχυρή. Πιθανές μελλοντικές εφαρμογές αυτής της μεθόδου για τη μείωση της αφλατοξίνης σε ζώα ή ανθρώπους βασίζονται στη σχετική σταθερότητα του συμπλόκου που σχηματίζεται.

Η αναστρεψιμότητα της πρόσδεσης αποδεικνύεται από το αποτέλεσμα της βακτηριακής πλύσης. Αυτό υποδηλώνει ότι η AFB1 προσδένεται στα βακτήρια με ασθενείς μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, αφού συνδέεται με υδρόφοβες κοιλότητες (*hydrophobic pockets*) στη βακτηριακή επιφάνεια. Αποτελέσματα από ELISA, οπτική μικροσκοπία και εκχυλίσεων με διαλύτη δείχνουν πως η πρόσδεση της AFB1 πραγματοποιείται κυρίως στην εξωκυτταρική βακτηριακή επιφάνεια τόσο του GG όσο και του LC-705, είτε τα κύτταρα είναι ζωντανά είτε έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία. Η ανίχνευση της AFB1 με ELISA δείχνει ότι το μεγαλύτερο μέρος της AFB1 προσδένεται στη βακτηριακή επιφάνεια. Ωστόσο, στην περίπτωση των κατεργασμένων βακτηρίων με οξύ μπορεί να πρόκειται για την ενδοκυτταρική επιφάνεια αντί της εξωκυτταρικής. Η ανάκτηση του συνόλου σχεδόν της AFB1 που έχει προσδεθεί στα βακτήρια μπορεί να γίνει με έκπλυση με χλωροφόρμιο, γεγονός που αποτελεί περαιτέρω απόδειξη της πρόσδεσης στην επιφάνεια. Οι γνώσεις σχετικά με τις χαρακτηριστικές επιφάνειες των στελεχών *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) και *L. rhamnosus* LC-705 (DSM 7061), που αναφέρθηκαν προηγουμένως, είναι πολύ περιορισμένες. Αυτά τα στελέχη δε διαθέτουν S-στοιβάδα αλλά μάλλον περικλείονται σε ένα περίβλημα πολυσακχαρίτη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους και έχουν μια επιφάνεια η οποία είναι υδρόφιλη. Δεδομένου ότι η επιφάνεια του βακτηρίου αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, έρευνες σχετικά με την επίδραση της φάσης ανάπτυξης σε βακτήρια που προσδένουν την AFB1 βρίσκονται σε εξέλιξη.

Αυτή η μελέτη δείχνει ότι μόνο μικρές ποσότητες της προσδεμένης AFB1 απελευθερώνονται από τη βακτηριακή επιφάνεια σε υδατικό διάλυμα με pH από 2 έως 10 στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος. Ωστόσο, απαιτούνται *in vivo*

μελέτες για την εκτίμηση των επιπτώσεων αυτών των βακτηρίων στη βιοδιαθεσιμότητα και μεταλλαξιογόνο δράση τους, όταν καταναλώνονται αφλατοξίνες. Μια πιο αποτελεσματική μέθοδος απολύμανσης των τροφίμων και των ζωοτροφών είναι η βακτηριακή απομάκρυνση των αφλατοξινών από αυτά πριν από την κατανάλωσή τους, αλλά μια τέτοια προσέγγιση απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο επεξεργασίας [54].

1.7. ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ M1

Αν και η αφλατοξίνη M1 (AFM1) είναι περίπου 10 φορές λιγότερο τοξική από την αφλατοξίνη B1 (AFB1), οι κυτταροτοξικές, γενετοξικές και καρκινογόνες επιδράσεις της έχουν αποδειχθεί σε διάφορα είδη. Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (2002) έχει κατατάξει την AFM1 στην ομάδα 1, καρκινογόνων ουσιών για τον άνθρωπο.

Εκτός από την πρόληψη της μόλυνσης, η χρήση των μικροοργανισμών προσφέρει μια ελκυστική εναλλακτική λύση για τον έλεγχο ή την εξάλειψη των αφλατοξινών στα τρόφιμα. Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* είναι η πιο αποτελεσματική για την απομάκρυνση της AFB1, αν και αρκετά στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) έχουν δείξει δυνατότητες πρόσδεσης της AFM1 όταν βρίσκονται σε φωσφορικά ρυθμιστικά διαλύματα και στο γάλα.

Επειδή δεν είχε μελετηθεί η απομάκρυνση της AFM1 από το γάλα, πραγματοποιήθηκε έρευνα, για να αξιολογηθεί η ικανότητα ενός στελέχους *S. cerevisiae*, μόνο του ή σε συνδυασμό με τρία εμπορικά διαθέσιμα στελέχη LAB, να δεσμεύσουν την AFM1 σε UHT (υπερ-υψηλής παστερίωσης) αποβουτυρωμένο γάλα ενισχυμένο με 0,5 μg/L AFM1, σε περιόδους επαφής 30 min και 60 min. Διαπιστώθηκε πως όταν στα δείγματα προστίθενται μόνο βακτήρια, πραγματοποιείται απομάκρυνση 11% περίπου τόσο στα 30 min όσο και στα 60 min. Όταν προστίθεται μόνο ο *S. cerevisiae* διαπιστώνεται απομάκρυνση 90% στα 30 min και 92,7 % στα 60 min. Τέλος, όταν συνδυάζονται και οι δύο παράγοντες, στα 30 min η απομάκρυνση ανέρχεται στα 91,7 % και στα 60 min διαπιστώνεται πλήρης απομάκρυνση της τοξίνης. Η αύξηση του ποσοστού πρόσδεσης μπορεί να εξηγηθεί από την αθροιστική επίδραση των κυττάρων *S. cerevisiae* και LAB, λόγω της παρουσίας ενός μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων που είναι διαθέσιμα για την πρόσδεση της AFM1 [56].

Τα ποσοστά πρόσδεσης της AFM1 από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που διαπιστώθηκαν από τη μελέτη συνάδουν με προηγούμενα αποτελέσματα [57] καθώς παρατηρήθηκε ότι νεκρά κύτταρα *L. rhamnosus* προσδένουν σε ποσοστό 18,8 % την AFM1, σε ανασυσταμένο αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη και σε ποσοστό 26,0% της τοξίνης στο ανασυσταμένο πλήρες γάλα σε σκόνη μετά από 16 ώρες επαφής. Σε

άλλες έρευνες βρέθηκαν [58] παρόμοια ποσοστά πρόσδεσης (5,6 - 25,7 %), όταν χρησιμοποιούνται οξυγαλακτικά βακτήρια για την απομάκρυνση της AFB1 από φωσφορικά ρυθμιστικά διαλύματά της. Επίσης, παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά πρόσδεσης της AFM1 στα ζωντανά (7.85-25.94%) και στα νεκρά κύτταρα (12.85- 27.31%) των στελεχών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* όταν καταγράφηκαν αποτελέσματα για 4 ώρες [59].

Με τα πορίσματα της μελέτης αυτής, είναι προφανές ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων δεν αποτελεί προϋπόθεση για την απομάκρυνση της AFB1 όταν χρησιμοποιούνται οξυγαλακτικά βακτήρια. Αν και ο μηχανισμός δράσης αυτών των μικροοργανισμών επί της αφλατοξίνης δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα, έχει υποτεθεί η ύπαρξη μιας φυσικής ένωσης με συστατικά βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, που αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες και πεπτιδογλυκάνες, αντί μιας ομοιοπολικής σύνδεσης ή αποικοδόμησης από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Ωστόσο, και οι πολυσακχαρίτες και οι πεπτιδογλυκάνες του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος αναμένεται να επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμική επεξεργασία, που οδηγεί σε μετουσίωση των πρωτεϊνών, αυξάνοντας την υδρόφοβη φύση της επιφανείας του. Θεωρείται ότι αυτές οι διαταραχές εξακολουθούν να επιτρέπουν στην αφλατοξίνη να προσδένεται στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, και επίσης στα συστατικά της πλασματικής μεμβράνης που δεν είναι διαθέσιμα όσο το κυτταρικό τοίχωμα παραμένει άθικτο [56].

Εύλογα, η ακεραιότητα των συστατικών του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος είναι σημαντική για τη διαδικασία απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1. Διαπιστώθηκε ότι τόσο το βακτηριακό κύτταρο τοίχωμα όσο και τα θραύσματά του είναι σε θέση να απομακρύνουν την AFB1 από το μέσο, αλλά όταν παρατηρήθηκε απώλεια ή καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος (ολική ή μερική), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ικανότητα απομάκρυνσης [60].

Ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην ικανότητα του *S. cerevisiae* να απομακρύνει αφλατοξίνες παραμένει ασαφής. Είναι επί του παρόντος αποδεκτό ότι το κυτταρικό τοίχωμα του ζυμομύκητα έχει την ικανότητα να προσδένει την τοξίνη. Τα ζωντανά και τα νεκρά κύτταρα του *S. cerevisiae* έχουν την ίδια ικανότητα να προσδένουν την AFB1, όπως και την AFM1 στο γάλα [61].

Παρά το γεγονός ότι τα χαμηλά επίπεδα της AFM1 στο γάλα μπορεί να επιτευχθούν με την πρόληψη μέσω του ελέγχου της μόλυνσης των ζωοτροφών από AFB1, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα νεκρά κύτταρα του *S. cerevisiae* και των LAB μπορεί να είναι χρήσιμα για την πλήρη απομάκρυνση της AFM1 από το γάλα που περιέχει έως 0,5 pg/L, χωρίς αλλαγές στη γεύση ή την οξύτητα του γάλακτος κατά τη ζύμωση.

Ωστόσο, δεν είναι μόνο τα στελέχη, ο χρόνος επαφής και η βιωσιμότητα των κυττάρων που μπορούν να επηρεάσουν σχετικά το σχηματισμό και τη σταθερότητα του *S.cerevisiae* και/ή των LAB ως προς την αφλατοξίνη. Άλλοι παράγοντες, όπως η

συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο γάλα, τα επίπεδα συγκέντρωσης της AFM1, το pH και η θερμοκρασία επώασης μπορεί να επηρεάζουν την απόδοση των μικροοργανισμών στην απομάκρυνση των αφλατοξινών από τα προϊόντα διατροφής. Έτσι, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη διερεύνηση της επιρροής αυτών των μεταβλητών στην ικανότητα του *S. cerevisiae* ή των βακτηριακών κυττάρων LAB να δεσμεύουν την AFM1 στο γάλα [56].

1.8.ΖΥΜΕΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΖΥΜΩΣΗ

Η ζύμωση των τροφίμων είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται τόσο για την επεξεργασία τους όσο και για την συντήρησή τους. Είναι μια διαδικασία χαμηλού κόστους, με την οποία μπορούν να βελτιωθούν ή τα μεταβληθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Πραγματοποιείται είτε από μικροοργανισμούς που ήδη υπάρχουν στα τρόφιμα είτε προστίθενται άλλοι μικροοργανισμοί σε αυτά.

Οι μικροοργανισμοί που παίρνουν μέρος στη ζύμωση των σιτηρών είναι στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) και ζυμομύκητες, ιδίως *S. cerevisiae* και *Candida krusei*. Πολλά στελέχη των LAB, όπως και ορισμένα στελέχη του *S. cerevisiae var. bourardii* έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προβιοτική δράση. Πρόσφατα, ένα στέλεχος του *S.cerevisiae* που απομονώθηκε από τρόφιμα στην Αφρική, που είχαν υποστεί ζύμωση, αποδείχθηκε ότι αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο προβιοτικό. Επιπλέον, ζύμες έχουν χορηγηθεί στα ζώα για περισσότερο από έναν αιώνα, και εμπορικά προϊόντα ζύμης παράγονται ειδικά για τη διατροφή των ζώων, που αναλύεται εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα.. Ως εκ τούτου, οι ζύμες και τα LAB έχουν τεράστιες δυνατότητες ως εργαλεία αντιμετώπισης του προβλήματος των μυκοτοξινών στα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά, αλλά και στις ζωοτροφές [62]. Ένα κοινό εργαστήριο του FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/ World Health Organization*) που μελετά τη διαδικασία της ζύμωσης για τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων τονίζει την ανάγκη για επιστημονικά δεδομένα που αφορούν τις διάφορες πτυχές της ζύμωσης των τροφίμων συμπεριλαμβανόμενης της δέσμευσης των τοξινών [63].

1.9.Η ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΥΜΕΣ

Υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με την τύχη των μυκοτοξινών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της μύρας και του κρασιού, που υποστηρίζουν ότι η προστιθέμενη τοξίνη παραμένει στους σπόρους που περιέχουν κύτταρα ζυμομυκήτων,

υποδεικνύοντας τη δυνατότητα πρόσδεσης της στα κύτταρα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τα επίπεδα των διάφορων μυκοτοξινών σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση.

Απομονώσεις από καλλιέργειες των ζυμομυκήτων που ανήκουν σε διαφορετικά είδη συμπεριλαμβανομένων των *S. cerevisiae* και *Candida krusei* ελέγχθηκαν για την ικανότητα πρόσδεσης αφλατοξίνης. Διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένα προϊόντα αραβοσίτου της Δυτικής Αφρικής απομακρύνεται περισσότερο από το 60% (w/w) της προστιθέμενης ποσότητας τοξίνης σε PBS (*phosphate-buffered saline*). Τα περισσότερα από τα στελέχη ζυμομυκήτων προσδένουν περισσότερο από 15% (w/w) της αφλατοξίνης B1. Στη βιομηχανία των πουλερικών, ο *S. cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε τροφές πουλερικών και έχει αποδειχθεί ότι έχει ευεργετικά αποτελέσματα εναντίον της αφλατοξίνης B1 [62].

Όταν ξηρή ζύμη και κυτταρικά τοιχώματα ζυμομυκήτων δόθηκαν ως τροφή σε αρουραίους που είχαν προσβληθεί από αφλατοξίνη B1, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της τοξικότητας. Σε *in vitro* μελέτη του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης που είχε δοθεί στους αρουραίους, διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα πρόσδεσης της τοξίνης, που ανερχόταν το πολύ σε 77% (w/w), εξαρτάται από το ποσό της ζύμης που είχε τους είχε δοθεί. Σε αυτούς που δόθηκαν τροποποιημένοι ολιγοσακχαρίτες μαννάνης που προέρχονταν από κύτταρα *S. cerevisiae*, το ποσοστό πρόσδεσης έφτασε στο 95% (w/w) [65]. Μια μεταγενέστερη μελέτη, επιβεβαιώνει την προστατευτική δράση της γλυκομαννάνης στο κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης, έναντι των αφλατοξινών στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής [66]. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις σε μελέτες που έγιναν σε αρουραίους που τρέφονται με ξηρή μαγιά και ολιγοσακχαρίτη-μαννάνη, διαπιστώθηκε πως η δεύτερη δεν καταστέλλει τη δράση της αφλατοξίνης [67].

Σε μια *in vitro* μελέτη, φάνηκε πως ένα μίγμα υπολειμμάτων ζυμωμένης μύρας και αποστειρωμένης ζύμης σε αναλογία 60:40 (w/w) απομακρύνει αποτελεσματικά την ωχρατοξίνη A. Η διαδικασία της πρόσδεσης εξαρτάται από το pH και διαπιστώνεται πως υψηλότερη δέσμευση εμφανίζεται σε pH 3, υποδεικνύοντας ότι η φυσική σύνδεση με το κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση της ωχρατοξίνης. Προτείνεται ότι οινολογικά στελέχη της ζύμης *Saccharomyces* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση της ωχρατοξίνης A από συνθετικό και φυσικό χυμό σταφυλιών. Τα θερμικά επεξεργασμένα κύτταρα δείχνουν υψηλότερη απομάκρυνση (90 % w/w), σε σύγκριση με ζώντα κύτταρα (35% w/w), υποδεικνύοντας τη φυσική προέλευση της πρόσδεσης, ενώ η κυτταρική πυκνότητα παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση της. Η πρόσδεση ήταν μια πολύ γρήγορη διαδικασία αφού ολοκληρωνόταν σε 5 min με ποσοστό απομάκρυνσης 90% (w/w) της τοξίνης. Αυτή η εργασία έδειξε ότι η μαγιά θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός παράγοντας απολύμανσης για την ωχρατοξίνη A σε χυμό σταφυλιών. Επιπλέον, τα νεκρά κύτταρα ζύμης μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για την αφαίρεση

ωχρατοξίνης Α από χυμό σταφυλιών, καθώς η νεκρή ζύμη δεν δημιουργεί προβλήματα στην ποιότητα ή την ασφάλεια των τροφίμων .

Το κυτταρικό τοίχωμα του *S. cerevisiae* έχει επίσηςδειχθεί ότι δεσμεύει σημαντική ποσότητα ζεαραλενόνης και β D-γλυκάνης που είναι τα κύρια συστατικά που εμπλέκονται στο σχηματισμό συμπλόκου. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι γλυκομαννάνες, εκτός από αφλατοξίνες, δεσμεύουν επίσης σημαντικές ποσότητες ωχρατοξινών [62].

1.10. ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ

Οι ζυμομύκητες και τα LAB έχουν την ικανότητα πρόσδεσης τοξινών αλλά και ιόντων μετάλλων σε σύμπλοκα στην επιφάνεια του κυτταρικού τους τοιχώματος. Επίσης, το κυτταρικό τοίχωμα ζύμης, έχει ικανότητα πρόσδεσης με στερόλες του μέσου και η μαννάνη του τοιχώματος αναγνωρίζεται ως δεσμευτικό μόριο. Με βάση ορισμένες από τις μελέτες που αναφέρονται, επιβεβαιώνεται ότι η απομάκρυνση των μυκοτοξινών πραγματοποιείται με πρόσδεση σε συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και όχι με ομοιοπολική σύνδεση ή από το μεταβολισμό, αφού τα νεκρά κύτταρα δεν χάνουν την ικανότητα πρόσδεσης. Με βάση τη βιβλιογραφία, η μαννάνη του κυτταρικού τοιχώματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση της αφλατοξίνης από τον *S.cerevisiae* [62]. Διαπιστώθηκε ότι οι μαννάνες μπορούν επίσης να δεσμεύουν και άλλες μυκοτοξίνες, όπως ωχρατοξίνη Α και τοξίνη Τ-2 [68]. Επιπλέον, μελέτη έχει καταδείξει ότι πραγματοποιείται σύνδεση της ζεαραλενόνης με β D-γλυκάνες [69,70], ενώ μια άλλη μελέτη δείχνει ότι η τροποποιημένη ζύμη β-1,3-γλυκάνη δεσμεύει εξαιρετικά την τοξίνη Τ-2 εκτός από τη μυκοτοξίνη ζεαραλενόνη [71]. Το γεγονός ότι η δέσμευση της ωχρατοξίνης ενισχύθηκε όταν τα κύτταρα ζύμης αντικαταστάθηκαν από φυσικά εκχυλίσματα του κυτταρικού τοιχώματος ή από θερμικά επεξεργασμένα κύτταρα, δείχνει ότι είναι πολύ γρήγορη η απομάκρυνση της τοξίνης από το υγρό μέσο και φαίνεται η ικανότητα πρόσδεσης της ωχρατοξίνης [62].

Έχουν διαπιστωθεί οι βασικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζεαραλενόνης και β D γλυκάνης, χρησιμοποιώντας τεχνικές NMR (*Nuclear magnetic resonance*) και XRD (*X-ray diffraction*). Είναι ενδιαφέρον ότι οι αλυσίδες β-1,3- D-γλυκάνης ευνοούν το σχηματισμό ενός πολύ σταθερού ενδο-ελικοειδή δεσμού με τη ζεαραλενόνη, στον οποίο παίρνουν μέρος και οι πλευρικές αλυσίδες της β-1,6- D γλυκάνης. Μεταξύ των μορίων εντοπίστηκαν τόσο δεσμοί υδρογόνου όσο και αλληλεπιδράσεις van der Waals. Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται πως τα υδατανθρακικά συστατικά αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για τις διάφορες τοξίνες, οι οποίες συνδέονται σε διαφορετικά σημεία [69,70].

Οι διαφορές μεταξύ των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε σχέση με την αφλατοξίνη που δεσμεύεται δείχνουν ότι για να επιτευχθεί η δέσμευση απαιτείται βακτηριακό στέλεχος ειδικό στο μεταλλαξιογόνο παράγοντα. Σε μερικές από τις μελέτες, διαπιστώθηκε πως τα LAB ήταν αναποτελεσματικά στη δέσμευση της αφλατοξίνης B₁. Αυτό μπορεί να οφείλεται στα στελέχη που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις μελέτες όπου έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν χαμηλές συγκεντρώσεις αφλατοξινών. Η δέσμευση της αφλατοξίνης B₁ από ζωντανά ή νεκρά βακτήρια εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της τοξίνης [62]. Σε μελέτη που αφορά το μηχανισμό πρόσδεσης αφλατοξίνης σε *L. rhamnosus* χρησιμοποιώντας επεξεργασμένο ενζύμο διαπιστώθηκε ότι η δέσμευση κατά κύριο λόγο πραγματοποιείται από τους υδατάνθρακες και από ορισμένα πρωτεϊνικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Η κατεργασία με ουρία μειώνει σημαντικά τη δέσμευση και καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη διαδικασία. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις φαίνεται να παίζουν μόνο δευτερεύοντα ρόλο, σύμφωνα με δοκιμές που έγιναν με NaCl και CaCl₂. Η πρόσδεση της αφλατοξίνης B₁ δεν επηρεάζεται από το pH, αλλά έχει σημαντική επίδραση στη δέσμευση της αφλατοξίνης B₂, υποδεικνύοντας ότι διαφορετικοί μεταβολίτες των ίδιων μυκοτοξινών με μικρές διαφορές μπορεί να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους δεσμευτικούς μηχανισμούς [72]. Έχει δειχθεί ότι η πεπτιδογλυκάνη ή οι δομές που συνδέονται στενά με αυτή θα μπορούσαν να είναι οι πιο πιθανοί υδατάνθρακες που σχετίζονται με την απομάκρυνση της αφλατοξίνης B₁. Μια άλλη μηχανιστική μελέτη που διεξάχθηκε, έδειξε ότι η πρόσδεση των αφλατοξινών στην κυτταρική επιφάνεια είναι πολύ ισχυρή. Ζωντανά κύτταρα των στελεχών *L. Rhamnosus* LGG και LC105 συγκρατούν το 38 και 50% (w/w) αντίστοιχα της τοξίνης μετά από επανειλημμένες πλύσεις με νερό. Ωστόσο, νεκρά (θερμικά επεξεργασμένα και επεξεργασμένα με οξύ) κύτταρα συγκρατούν το 66-71% (w/w) της τοξίνης, υποδεικνύοντας μία υψηλότερη σταθερότητα του συμπλόκου. Αυτή η υψηλότερη πρόσδεση των θερμικά επεξεργασμένων και των επεξεργασμένων με οξύ κυττάρων αποδόθηκε στην καλύτερη πρόσβαση των ομάδων στα επεξεργασμένα κύτταρα. Επιπλέον, είναι πολύ ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η επεξεργασία σε αυτόκλειστο και η κατεργασία με υπερήχους δεν απελευθερώνει τη δεσμευμένη τοξίνη από προ-πλυμένα κύτταρα υποδεικνύοντας την υψηλή σταθερότητα του συμπλόκου. Η πρόσδεση της αφλατοξίνης B₁ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το pH (2,5 έως 8,5), υποδεικνύοντας την απουσία του μηχανισμού ανταλλαγής ιόντων. Όταν το κύτταρο είναι επεξεργασμένο με οργανικούς διαλύτες, η τοξίνη δεσμεύεται γρήγορα, που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη διαδικασία της δέσμευσης. Η πρόσδεση της προσδεμένης αφλατοξίνης σε ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα υποδεικνύει την επιφανειακή φύση της σύνδεσης [54].

1.11. Η ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ *S. cerevisiae* ΚΑΙ ΤΟΥ LAB ΣΕ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΩΛΗΝΑ

Η πιθανή εφαρμογή του *S. cerevisiae* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) ως προσδετικών μυκοτοξίνης σε τρόφιμα και ζωοτροφές εξαρτάται από τη σταθερότητα του συμπλόκου όταν αυτό διέρχεται από το γαστρεντερικό σωλήνα, καθώς και από το χρόνο παραμονής του εκεί. Γενικά, ο *S. cerevisiae* δείχνει πολύ χαμηλή πρόσφυση στο έντερο, ενώ τα LAB παρουσιάζουν σημαντική πρόσφυση στα κύτταρα του εντέρου. Ωστόσο, ο βαθμός πρόσφυσης φαίνεται να είναι ειδικός, τόσο για το *S. cerevisiae* όσο και για τα LAB. Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* είναι ικανά να αντέχουν το σκληρό περιβάλλον του γαστρεντερικού σωλήνα, μολονότι ορισμένα στελέχη απομακρύνονται από το σύστημα γρήγορα. Πειράματα διατροφής ζώων έδειξαν πως η προσθήκη του *S. cerevisiae* στη δίαιτα τους οδήγησε σε μειωμένη τοξικότητα μυκοτοξίνης, υποδεικνύοντας ισχυρή σταθερότητα του συμπλόκου ζυμομύκητα-μυκοτοξίνης στο περιβάλλον της γαστρεντερικής οδού. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η προ-έκθεση των κυττάρων του *L. rhamnosus* του στελέχους GG μειώνει τη δέσμευση της αφλατοξίνης B1 παρουσία εντερικής βλέννας, με αποτέλεσμα την ταχύτερη απομάκρυσή της. Η μελέτη αποκαλύπτει επίσης ότι η προ-επώαση των βακτηρίων σε εντερική βλέννα οδηγεί στη διακύβευση της πρόσδεσης της αφλατοξίνης.

Αν και υπάρχουν πολλές εναλλακτικές προσεγγίσεις για την απολύμανση των μυκοτοξινών, οι περισσότερες δεν έχουν γίνει δημοφιλείς λόγω του υψηλού κόστους ή εξαιτίας πρακτικών δυσκολιών που εμπλέκονται στη διαδικασία αποτοξίνωσης. Πολλά φυσικά προσροφητικά υλικά έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και είναι πλέον διαθέσιμα ως εμπορικά παρασκευάσματα, ως πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές που θα μελετηθούν σε επόμενη ενότητα. Ωστόσο, πολλά από αυτά τα προσροφητικά υλικά μπορούν να προσδένουν μόνο μία μικρή ομάδα τοξινών, ενώ προσδένονται λίγο ή καθόλου με άλλες τοξίνες.

Έχει δειχθεί ότι πολλά είδη βακτηριδίων και μυκήτων (όπως *Flavobacterium aurantiacum*, *Corynebacterium rubrum*, *Candida lipolitica*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Armillariella tabescens*, *Nurospora spp.*, *Rhizopus spp.*, *Mucor spp.*, κλπ) αποικοδομούν τις μυκοτοξίνες ενζυματικά. Ωστόσο, το ερώτημα παραμένει σχετικά με την τοξικότητα των προϊόντων της ενζυματικής αποδόμησης και τις ανεπιθύμητες επιδράσεις της ζύμωσης στην ποιότητα της τροφής, με μικροοργανισμούς που έχουν προστεθεί στα τρόφιμα [62].

1.12. ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΖΥΜΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

Αρχικά, μελέτες με ζυμοκύτταρα οδήγησαν στον εντοπισμό ενός ειδικού μέρους του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης, το οποίο αντιδρά με τις μυκοτοξίνες. Η βελτίωση των τεχνικών επέτρεψε την παραγωγή ειδικών τροποποιημένων κυτταρικών τοιχωμάτων της ζύμης, τα οποία έχουν την ιδιότητα να προσδένουν διάφορες μυκοτοξίνες στην επιφάνειά τους. Το προϊόν αυτό είναι εμπορικά διαθέσιμο ως *Mycosorb (Alltech Inc)*. Η απορροφητική ικανότητα του συμπλέγματος των υδατανθράκων των κυτταρικών τοιχωμάτων της ζύμης προσφέρει μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση στα ανόργανα προσροφητικά. Ο μπετονίτης και ο ενεργός άνθρακας χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες (>1,0% του σιτηρεσίου) στις ζωοτροφές. Όμως σε ζώα, όπως τα κοτόπουλα και τα νεαρά χοιρίδια, όπου η πρόσληψη της τροφής μπορεί να περιορίσει την οικονομική αποδοτικότητά τους, είναι σημαντικό τα μη θρεπτικά πρόσθετα των ζωοτροφών να συνιστούν το μικρότερο δυνατό ποσοστό τους. Εκτός αυτού, υψηλά επίπεδα συμμετοχής μπορεί να αυξήσουν την εξουδετερωτική τους δράση κι έτσι να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα άλλων σημαντικών θρεπτικών ουσιών. Αντίθετα, η υψηλή σχέση μεταξύ τοξίνης και προσροφητικότητας των παραγώγων του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης, επιτρέπει τη χρήση τους στη μικρότερη δυνατή ποσότητα (<0,1% του σιτηρεσίου) [62].

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΣΚΟΠΟΣ:

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι διττός. Αφενός μελετάται η δυνατότητα παραγωγής τοξινών από το μύκητα *Fusarium oxysporum* F3, που έχει απομονωθεί από κύμινο, σε καλλιέργειες σιτηρών (ρύζι, κριθάρι, σιτάρι, καλαμπόκι) και καρκευμάτων (κύμινο). Έτσι είναι δυνατό να διαπιστωθεί κατά πόσο αυτό το στέλεχος του μύκητα παράγει τοξίνες στις καλλιέργειες όταν βρεθεί σε αντίστοιχες συνθήκες. Αφετέρου, λόγω των προβλημάτων που προκαλούν οι τοξίνες στην υγεία του ανθρώπου αλλά και των ζώων, μελετάται η διαδικασία απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1 από αγελαδινό μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα με 4 % λιπαρά, με προσθήκη θερμικά επεξεργασμένων κυττάρων ξηρής εμπορικής μαγιάς αρτοποιίας *Saccharomyces cerevisiae*. Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στον προσδιορισμό τόσο της χρονικής μεταβολής της πρόσδεσης της αφλατοξίνης στα κύτταρα, όσο και της επίδρασης της συγκέντρωσης των κυττάρων και της τοξίνης στο ποσοστό απομάκρυνσης.

2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

2.2.1. ΟΡΓΑΝΑ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Για την ανίχνευση των τοξινών χρησιμοποιείται η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (Σχήμα 10).

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε αναλυτική διάταξη της Thermo Finnigan αποτελούμενη από τα ακόλουθα μέρη:

1. Φασματόμετρο μαζών τριπλού τετράπολου (triple stage quadrupole analyzer), TSQ Quantum Ultra AM.
2. Αντλία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης Surveyor MS Pump Plus δύο εμβόλων, με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης τεσσάρων διαλυτών.
3. Αυτόματο δειγματολήπτη Surveyor Autosampler Plus με ενσωματωμένο θερμοστάτη στηλών.
4. Ανιχνευτή φωτοδίοδων DAD Surveyor PDA Plus
5. Ανιχνευτής MS-MS TSQ Quantum Ultra AM
6. Γεννήτρια αζώτου Peak NM30LA-MS
7. Οβίδα αργού.
8. UPS τύπου GXT2 με ισχύ 6 KVA.

9. Ηλεκτρονικός υπολογιστής Dell και λογισμικό διαχείρισης δεδομένων Xcalibur Data System (2.0 SR2, TSQ14, SUR1, LCQuan 2.5, XReport 1.0).

Ο προσδιορισμός των τοξινών στα υποστρώματα και η μελέτη της μείωσης της αφλατοξίνης M1 στο γάλα πραγματοποιήθηκε με αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης Thermo Hypersil Gold C18, διαμέτρου 2,1 mm, μήκους 150 mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 3 μm .



Σχήμα 10: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας διαδοχικής φασματομετρίας μαζών Thermo Quantum Ultra AM.

Η μέθοδος LC-MS/MS που εφαρμόστηκε για την ανάλυση των δειγμάτων έχει επικυρωθεί από το εργαστήριο της Χημικής Υπηρεσίας Μετρολογίας του Γενικού Χημείου του Κράτους και έχει ενταχθεί στο πεδίο διαπίστευσής του για αναλύσεις επιμολυντών σε τρόφιμα.

Το προς ανάλυση δείγμα διαχωρίζεται σε διάταξη χρωματογραφίας (κατανομής) ανάστροφης φάσης (*reversed phase liquid chromatography*, RP-LC) και στη συνέχεια, στο φασματόμετρο μαζών ανιχνεύονται τα επιθυμητά ιόντα με την τεχνική παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (*multiple reaction monitoring*). Τα προς ανάλυση μόρια εισέρχονται στη διάταξη ηλεκτροψεκασμού, ιοντίζονται και εισέρχονται στο πρώτο τετράπολο του αναλυτή μαζών. Τα επιθυμητά ιόντα οδηγούνται στο δεύτερο τετράπολο, όπου βομβαρδίζονται με Ar υπό τάση και τα παραγόμενα θραύσματα οδηγούνται στο τρίτο τετράπολο όπου διαχωρίζονται και ανιχνεύονται.

Η τεχνική ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό επιτυγχάνεται με εφαρμογή υψηλής τάσης κατάλληλης πολικότητας (αρνητική ή θετική) σε τριχοειδή σωλήνα μέσα από τον οποίο διέρχεται το διάλυμα της υπό ανάλυση ένωσης. Με τον τρόπο αυτό παράγονται ιόντα των προς ανάλυση ενώσεων στην υγρή φάση, τα οποία στη συνέχεια, με τη

βοήθεια αέριου αζώτου, εκνεφώνονται σε σταγονίδια τα οποία απογυμνώνονται από το διαλύτη και μετατρέπονται σε ιόντα στην αέρια φάση (*heated electrospray ionisation*, HESI) (Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Παράσταση του συστήματος H-ESI (*heated electrospray ionization*) και της πηγής ιόντων.

Ανάλογα με τη μέθοδο που εφαρμόζεται απαιτείται θετικός ή αρνητικός ιονισμός. Για τη μέθοδο ανίχνευσης των τοξινών DON/NIV, επειδή οι ενώσεις αυτές έχουν ασθενώς όξινο χαρακτήρα, όπως οι αλκόολες, είναι ευκολότερο να ιονιστούν αποβάλλοντας ένα H^+ και να σχηματίσουν έτσι το μοριακό ιόν $[M-H]^-$, οπότε ανιχνεύονται σε αρνητικό ιονισμό. Ωστόσο, οι άλλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό τόσο των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2, όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικές πηγές άνθρακα καθώς και των DON/ZEA και του φουσαρικού οξέος απαιτούν θετικό ιονισμό καθώς τα μόρια ιονίζονται προσλαμβάνοντας ένα H^+ σχηματίζοντας το μοριακό ιόν $[M-H]^+$. Για τον ίδιο λόγο, επιλέγεται θετικός ιονισμός για τη μελέτη της απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1.

Αρχικά, ορίζονται οι υπόλοιπες παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών στις τιμές που προτείνει ο κατασκευαστής για την κάθε μέθοδο ιονισμού των ουσιών (Πίνακας 5).

Για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας για κάθε αναλύτη, στο φασματό-μετρο μαζών, πραγματοποιείται απευθείας έγχυση (*infusion*) προτύπου διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης της κάθε ένωσης με ροή $\sim 20 \mu\text{L}/\text{min}$ στο φασματόμετρο μάζας, ώστε να προσδιοριστούν τα μητρικά και τα θυγατρικά ιόντα της κάθε πρότυπης ένωσης, η ενέργεια κρούσης (*collision energy*) και το δυναμικό εστίασης (*tube lens offset*) για κάθε αναλύτη.

Το δυναμικό εκνέφωσης στον κώνο (*spray voltage*) μεταβάλλεται στην περιοχή των τιμών 1 - 5 kV ώστε να προσδιοριστεί η τιμή στην οποία μεγιστοποιείται η αφθονία του μοριακού ιόντος. Η θερμοκρασία στον κώνο μεταβάλλεται στην περιοχή τιμών 0

– 300 °C. Ακολούθως, με τη βοήθεια του λογισμικού *Xcalibur*, λαμβάνεται από το Συνολικό Χρωματογράφημα Ιόντων (*Total Ion Current, TIC*) και το φάσμα μαζών του κάθε πρότυπου διαλύματος. Αρχικά, στο στάδιο της παραγωγής των μητρικών ιόντων, καθώς και αργότερα στο στάδιο παραγωγής των θυγατρικών ιόντων, σημαντική επίδραση έχουν οι παράμετροι που επηρεάζουν τη διακριτική ικανότητα του φασματόμετρου μαζών και ιδιαίτερα, το πλάτος του σήματος στο μισό του μέγιστου (*Full Width at Half Maximum, FWHM*) το οποίο αποτελεί μέτρο του βαθμού διαχωρισμού ουσιών με κοντινές ονομαστικές μάζες στα τετράπολα Q₁ και Q₃.

Πίνακας 5: Τιμές παραμέτρων λειτουργίας φασματόμετρου μαζών για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών.

	Αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2, φουσαρικό οξύ και τοξίνη ZEA	Αφλατοξίνη M1	Μυκοτοξίνες DON/NIV
Δυναμικό εκνέφωσης (V)	4000	4000	5000
Θερμοκρασία εκνέφωσης (°C)	350	300	250
Παροχή αερίου εκνέφωσης	40	40	20
Παροχή αερίου εστίασης	0	0	0
Παροχή βοηθητικού αερίου	10	10	5
Θερμοκρασία τριχοειδούς (°C)	270	300	350
πίεση κρούσης (mTorr)	1,5	1,5	1,5

Αφού επιλεγούν οι συνθήκες λειτουργίας του φασματόμετρου, παρακολουθείται η αντίδραση θραυσματοποίηση του αναλύτη (MRM). Αρχικά, προσδιορίζεται η τιμή του δυναμικού εστίασης που επιβάλλεται κατά την είσοδο των ιόντων στο πρώτο τετράπολο του αναλύτη, η οποία μεγιστοποιεί την αφθονία του. Στη συνέχεια, εντοπίζεται η ενέργεια κρούσης που επιβαλλόμενη στο δεύτερο τετράπολο, θραυσματοποιεί το μοριακό ιόν μεγιστοποιώντας την αφθονία των ιόντων που καταγράφονται στο τρίτο τετράπολο. Με τον τρόπο αυτό επιλέγονται τα δύο ιόντα που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση και την ταυτοποίηση του αναλύτη και ταυτόχρονα μεγιστοποιούν την ευαισθησία του αναλυτικού προσδιορισμού. Η διαδικασία πραγματοποιείται με το λογισμικό *Excibur* και καταγράφεται στα διαγράμματα θραυσματοποίησης.

Ενδεικτικά παρατίθενται τα διαγράμματα για τη βελτιστοποίηση και τον προσδιορισμό των ιόντων της αφλατοξίνης B1 (Σχήμα 12). Κατά τη βελτιστοποίηση

του δυναμικού εστίασης (*Tube lens offset*) λαμβάνονται γραφήματα σχετικής έντασης του ιόντος προς το εφαρμοζόμενο δυναμικό, οι καμπύλες θραυσματοποίησης αλλά και το φάσμα μάζας σε ESI(+), καθώς εφαρμόζεται θετικός ιονισμός για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης B1.

Ακολουθούν οι πίνακες με τα βασικά χαρακτηριστικά της κάθε μεθόδου (Πίνακες 6, 7 και 8).

Τα προγράμματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2, των μυκοτοξινών DON, ZEA και του φουσαρικού οξέος καθώς και για την αφλατοξίνη M1 είναι βαθμιδωτά και παρουσιάζονται στους Πίνακες 9 και 10.

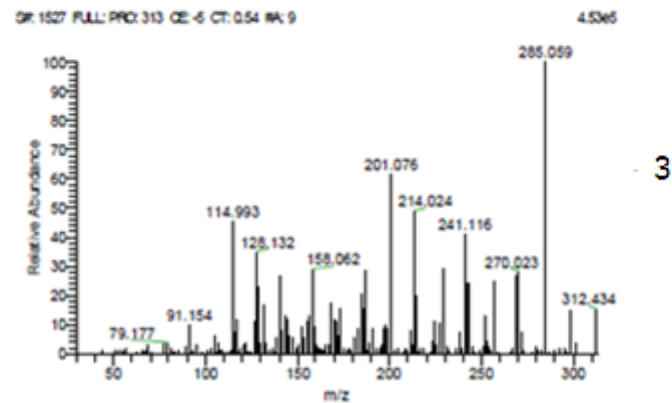
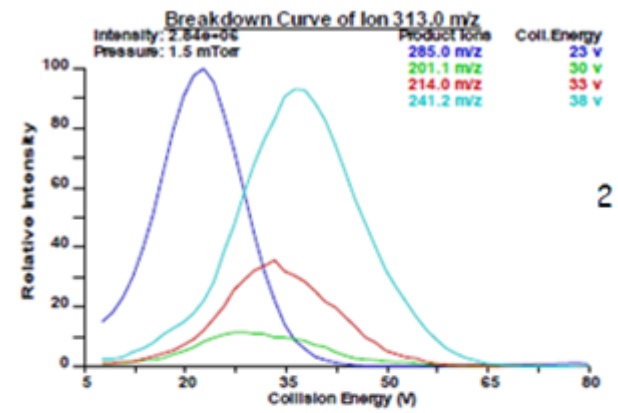
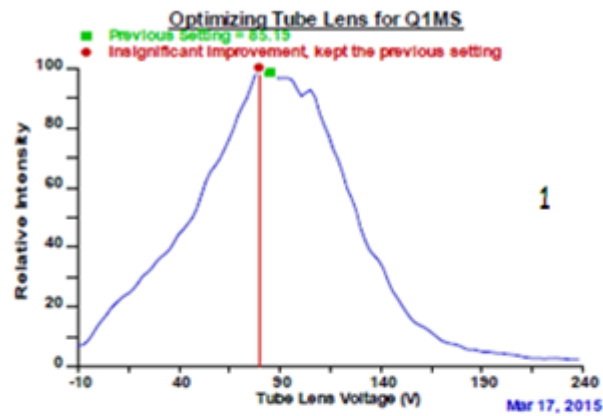
Πίνακας 9: Πρόγραμμα έκλουσης για την αφλατοξίνη M1

Χρόνος (min)	0,1% HCOOH	CH ₃ OH + 0,1% HCOOH	Ροή (μL/min)
0	90	10	200
2	90	10	200
7	10	90	200
12	10	90	200
12,5	90	10	200
15	90	10	200

Πίνακας 10: Πρόγραμμα έκλουσης για αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2, τις μυκοτοξίνες DON, ZEA και το φουσαρικό οξύ

Χρόνος (min)	0,1% HCOOH	CH ₃ OH	Ροή (μL/min)
0	90	10	200
4	10	90	200
10	10	90	200
11	90	10	200
15	90	10	200

Ακολουθούν τα όρια ανίχνευσης καθώς και τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου ανάλυσης (Πίνακας 11).



Σχήμα 12: 1) Γραφήματα σχετικής έντασης του ιόντος προς το εφαρμοζόμενο δυναμικό για τη βελτιστοποίηση τιμής του δυναμικού εστίασης για την αφλατοξίνη B1, 2) Καμπύλες θραυσματοποίησης για την αφλατοξίνη B1, 3) Φάσμα μάζας σε ESI(+) για την αφλατοξίνη B1 για το μοριακό ιόν της αφλατοξίνης B1 στο τετράπολο Q₃.

Πίνακας 6: Μέθοδος προσδιορισμού αφλατοξίνης M1 (θετικός ιονισμός)

Τοξίνες ανάλυσης	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μητρικό ιόν (m/z)	Θυγατρικό ιόν- -ιόν επιβεβαίωσης (m/z)	Θυγατρικό ιόν (m/z)	Δυναμικό εστίασης (V)	Δυναμικό κρούσης (V)	Κινητή φάση
AFM1	8,5	329	259	273	140	30/40	CH ₃ OH + 0,1% HCOOH - CH ₂ O ₂ 0,1 %

Πίνακας 7: Μέθοδος DON/NIV (αρνητικός ιονισμός)

Τοξίνες ανάλυσης	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μητρικό ιόν (m/z)	Θυγατρικό ιόν- -ιόν επιβεβαίωσης (m/z)	Θυγατρικό ιόν (m/z)	Δυναμικό εστίασης (V)	Δυναμικό κρούσης (V)	Κινητή φάση
DON	6,0	355	265	295	-44,3	18/13	CH ₃ CN 10 %- CH ₃ COONH ₄ 5 mM 90 %
NIV	3,7	371	311	281	-89,6	16/14	

Πίνακας 8: Μέθοδοι DON/ZEA, φουσαρικού οξέος και αφλατοξινών (θετικός ιονισμός)

Τοξίνες ανάλυσης	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μητρικό ιόν (m/z)	Θυγατρικό ιόν- -ιόν επιβεβαίωσης (m/z)	Θυγατρικό ιόν (m/z)	Δυναμικό εστίασης (V)	Δυναμικό κρούσης (V)	Κινητή φάση
DON	5,0	297	249	231	80	15/17	CH ₃ OH/HCOOH 0,1 %
ZEA	10,1	319	187	185	70	21/27	CH ₃ OH/HCOOH 0,1 %
AFB1	5,2	313	285	241	140	36/22	CH ₃ OH/HCOOH 0,1 %
AFB2	5,1	315	259	287	120	25/28	CH ₃ OH/HCOOH 0,1 %
AFG1	4,9	329	311	243	85	27	CH ₃ OH/HCOOH 0,1 %
AFG2	4,8	331	217	313	90	22/33	CH ₃ OH/HCOOH 0,1 %
Φουσαρικό οξύ	4,8	180	92	65 136 138	70	30/24	CH ₃ OH/HCOOH 0,1 %

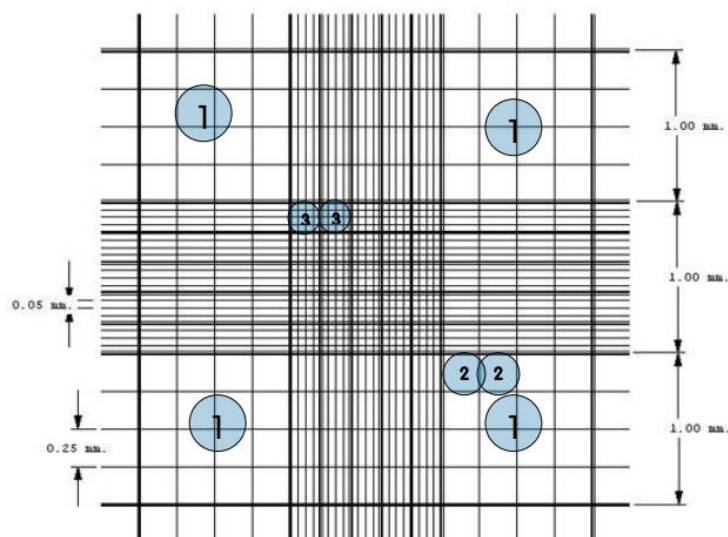
Πίνακας 11: Όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικού προσδιορισμού των μεθόδων.

	AFM1	AFB1	AFG1	AFB2	AFG2	DON	NIV	ZEA
Όριο ανίχνευσης (μg/kg)	0,004	0,4	0,4	0,2	1	10	10	5
Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (μg/kg)	0,012	1	1	0,6	2	30	30	15

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικοί ζυγοί διακριτικής ικανότητας 0,1 μg (*Mettler Toledo UMX 5 Comparator*) και 0,01 mg (*Mettler-Toledo MS105*), ψυχόμενη φυγόκεντρος (*Thermo Scientific SL16R*), και ψυχόμενη υπερφυγόκεντρος (*Sorvall® RC 28S*), πεχάμετρο (*WTW Microprocessor pHMeter pH537*), περιστροφικός επωαστήρας (*Zhicheng ZHWY-211C*), στατικός επωαστήρας (*Gallenkamp*), τάρακτο (*GFL Shaker 3006*), ομογενοποιητής *Ultra Turrax*, αυτόματες μηχανικές πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-100 μL, 100-1000 μL και 1-10 mL, λύχνος *Bunsen*, πτυχωτό διηθητικό χαρτί, στήλες ανοσοσυγγένειας (*IAC-DON-NIV, WB, VICAM*), δειγματοφιαλίδια 1-2 mL κατάλληλα για τον αυτόματο δειγματολήπτη της αναλυτικής διάταξης, *Vortex*, αυτόκλειστο αποστείρωσης (*SANYO Labo Autoclave model MLS-3020U*) και μικροσκόπιο. Τέλος, έγινε χρήση διάταξης παραγωγής υπερκαθαρού νερού *Millipore Elix-5 (UV)* σε σειρά με το *Millipore Milli-Q Element* και συνήθους εργαστηριακού εξοπλισμού, όπως ογκομετρικές φιάλες, κωνικές φιάλες των 250 mL και των 100 mL και φιάλες φυγοκέντρωσης των 15 mL και των 50 mL.

Μέτρηση κυττάρων με τη μέθοδο *Neubauer*

Για την εκτέλεση της παρούσας μελέτης απαιτείται μέτρηση των κυττάρων της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* με αιμοκυτταρόμετρο *Neubauer* (Σχήμα 13). Τα κύτταρα καταμετρώνται στο κεντρικό τετράγωνο το οποίο αποτελείται από μικρότερα τετράγωνα που κατανέμονται σε 5 γραμμές και 5 στήλες. Η μέτρηση πραγματοποιείται ξεκινώντας από πάνω αριστερά και καταλήγοντας κάτω δεξιά.



Σχήμα 13: Neubauer - αναλυτικό δίκτυο μέτρησης [73].

2.2.2. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος είναι ο μύκητας *Fusarium oxysporum* F3 που απομονώθηκε από κύμινο καθώς και η εμπορική ξηρή μαγιά αρτοποιίας *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ- ΜΕΣΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

2.2.3.1. ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΞΙΝΩΝ

Για την παρασκευή του μέσου ανάπτυξης του *F.oxysporum* F3 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια, οι ποσότητες των οποίων καταγράφονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 12: Αντιδραστήρια μέσου ανάπτυξης *F.oxysporum* F3

	g/L
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	9,52
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	6,94
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,30
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,30
(NH ₄) ₂ HPO ₄	10,00
KHPO ₄	1,00

Για την ανάπτυξη του μύκητα *F.oxysporum F3* χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη 20 g/L ως πηγή άνθρακα. Η προκαλλιέργεια ρυθμίστηκε σε pH = 6 και αφέθηκε για 48 h, στους 30 °C να ανακινείται με ρυθμό 250 rpm σε επωαστήρα [74].

Για τη διαδικασία της παραγωγής τοξινών χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι και κύμινο. Τα υποστρώματα ήταν βιολογικά προϊόντα καθόλου ή ελάχιστα επεξεργασμένα (κύμινο).

Η εκχύλιση των τοξινών έγινε με χρήση ακετονιτρίλιου ενώ πραγματοποιήθηκε και εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης με υπερκάθαρο νερό. Επίσης, για τη μέθοδο DON/NIV που πραγματοποιείται με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC), απαιτούνται μεθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα PBS (*phosphate-buffered saline*) και ως κινητή φάση υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 5 mM 90% - ακετονιτρίλιο 10%.

2.2.3.2. ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΑΠΟ ΓΑΛΑ

Για το μέσο ανάπτυξης της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια, οι ποσότητες των οποίων καταγράφονται αναλυτικά στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 13: Αντιδραστήρια μέσου ανάπτυξης *Saccharomyces cerevisiae*

	g/L
Εκχύλισμα ζύμης	10,00
πεπτόνη	5,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,20
NaCl	0,30
CaCl	0,10
MgCl ₂ ·7H ₂ O	0,70
KH ₂ PO ₄	1,00
FeCl ₃	0,003

Για την ανάπτυξη της ξηρής μαγιάς *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη 10 g/L ως πηγή άνθρακα. Η προκαλλιέργεια ρυθμίστηκε σε pH = 5 και αφέθηκε για 24 h στους 30 °C να ανακινείται με ρυθμό 450 rpm σε επωαστήρα. Πριν την προκαλλιέργεια τα υλικά αποστειρώθηκαν για 30 min στους 121 °C.

Το γάλα που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1 είναι αγελαδινό μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα με 4 % λιπαρά. Για την εκχύλιση της αφλατοξίνης M1 απαιτείται ακετονιτρίλιο και θειικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.2.3.3. ΠΡΟΤΥΠΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

- Πρότυπο διάλυμα αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (5 µg/L και 20 µg/L)
- Πρότυπο διάλυμα τοξινών DON/NIV (100 µg/L)
- Πρότυπο διάλυμα τοξινών DON/ZEA (1000 µg/L)
- Πρότυπο διάλυμα ZEA (100 µg/L)
- Πρότυπο διάλυμα αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L και 100 µg/L)

2.2.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΞΙΝΩΝ

2.2.4.1. ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *F.oxysporum*

Το μέσο που χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη του μικροοργανισμού *F.oxysporum* είναι ένα διάλυμα που περιέχει ως πηγή άνθρακα γλυκόζη. Σε δύο φιάλες των 250 mL ογκομετρήθηκαν 100 mL του μέσου και αφού προστέθηκαν 2 g γλυκόζης σε κάθε φιάλη, αποστειρώθηκαν για 20 min στους 121 °C. Έπειτα, η προκαλλιέργεια εμβολιάστηκε με 1 mL του μικροοργανισμού και το διάλυμα αφέθηκε για 48 h στους 30 °C να ανακινείται με ρυθμό 250 rpm σε επωαστήρα [74].

2.2.4.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

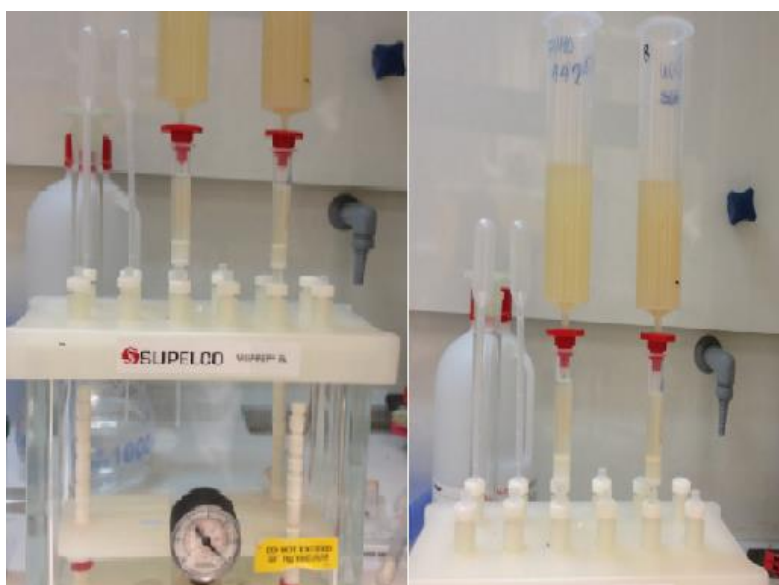
Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας στο εργαστήριο, σε κωνικές φιάλες των 250 mL ζυγίστηκαν 20 g από κάθε μέσο (ρύζι, καλαμπόκι, κριθάρι, σιτάρι, κύμινο), προστέθηκαν 7 mL νερού και 1 mL της προκαλλιέργειας *F.oxysporum* F3 (που απομονώθηκε από κύμινο). Η καλλιέργεια αφέθηκε για ένα μήνα στους 29 °C σε σκοτεινό μέρος [75].

2.2.4.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΞΙΝΩΝ

Μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου, πραγματοποιήθηκε λειοτριβήση της καλλιιεργειών (ρύζι, κριθάρι, καλαμπόκι, σιτάρι), με εξαίρεση το κύμινο που δεν απαιτεί αυτή τη διαδικασία, και ακολούθησε η εκχύλιση τους. Ειδικότερα, για τη διαδικασία της εκχύλισης ζυγίστηκαν 5 g από κάθε υπόστρωμα και προστέθηκαν 20 mL διαλύματος ακετονιτρίλιο/νερό (85:15), ακολούθησε 3 min ανάδευση στον ομογενοποιητή *Ultra Turax* και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για 10 min στους 0 °C και στις 4500 rpm. Στη συνέχεια, μέρος του υπερκείμενου διηθήθηκε από φίλτρο 0,45μm σε δειγματοφιαλίδιο και αναλύθηκε με LC-MS/MS

Επίσης πραγματοποιήθηκε και εναλλακτικός τρόπος εκχύλισης με υπερκάθαρο νερό. Η μέθοδος αυτή διαφέρει από την προηγούμενη στο ότι έπειτα από την ομογενοποίηση γίνεται και επιπλέον ανάδευση σε τάρρακτρο για μία ώρα.

Μέρος των δειγμάτων κριθαριού, σιταριού και ρυζιού που εκχυλίστηκαν με νερό και ακολούθησε η μέθοδος DON/NIV (Σχήμα 14) που έχει επικυρωθεί από το εργαστήριο της Χημικής Υπηρεσίας Μετρολογίας του Γενικού Χημείου του Κράτους.



Σχήμα 14: Εκχύλιση των τοξινών DON/NIV με στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC).

Το διήθημα των δειγμάτων, έπειτα από τη διήθηση με πτυχωτό διηθητικό χαρτί, εκχυλίστηκε σε στερεή φάση στη στήλη ανοσοσυγγένειας. Αρχικά, το διάλυμα συντήρησης της στήλης απομακρύνθηκε με τη βοήθεια της βαρύτητας, προσέχοντας ώστε να μη στεγνώσει η στήλη. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας, 1 mL διηθήματος και 4 mL διαλύματος PBS φορτίστηκαν στη στήλη και το μίγμα διήλθε από αυτή με ρυθμό 1 mL/min. Η στήλη εκπλύθηκε διαδοχικά με 10 mL διαλύματος PBS και 10 mL νερού, στεγνώθηκε με αέρα και οι μυκοτοξίνες εκκλούνται με τη διαδοχική διοχέτευση 0,5 mL μεθανόλης και 1,5 mL ακετονιτρίλιου

σε γυάλινο φιαλίδιο 10 mL. Το διάλυμα που παραλήφθηκε, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού, και το υπόλειμμα ανασυστάθηκε με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος κινητής φάσης. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε δειγματοφιαλίδιο και αναλύθηκε με LC-MS/MS. Η ανάλυση δεν απαιτεί ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Για τον έλεγχο του αρχικού ποσοστού τοξινών που διαθέτουν τα υποστρώματα, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε επαναληψη της διαδικασίας για κάθε υπόστρωμα (*blank*).

2.2.5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΤΟ ΓΑΛΛΑ

2.2.5.1. ΠΡΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *S. cerevisiae*

Σε τρεις κωνικές φιάλες των 1000 mL παρασκευάστηκε μέσο πλούσιο σε γλυκόζη (10 g/L). Η σύσταση του μέσου ανάπτυξης της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* καταγράφεται στον αντίστοιχο πίνακα (Πίνακα 13). Σε 50 mL αποστειρωμένου νερού διαλύθηκαν 8 g ζύμης και από το διάλυμα προστέθηκαν 10 mL σε κάθε κωνική φιάλη των 250 mL που περιείχε 1 L μέσου. Μετά το πέρας των 24 h, ενοποιήθηκε η καλλιέργεια σε μία φιάλη και λήφθηκε δείγμα 5 mL, ώστε να αραιωθεί στα 1:150 με σκοπό τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο *Neubauer*. Τέλος, η υπόλοιπη καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε, και έπειτα από την απομάκρυνση του υπερκείμενου, υπέστησε έκπλυση δύο φορές με απιονισμένο νερό.

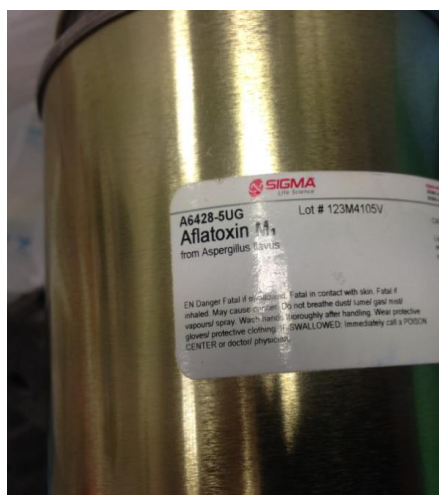
2.2.5.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μετά τη μέτρηση των κυττάρων, η καλλιέργεια μοιράστηκε σε φιάλες ώστε να περιέχονται σε ορισμένες φιάλες $1,6 \times 10^9$ κύτταρα ανά mL γάλακτος, σε άλλες $1,6 \times 10^{10}$ κύτταρα ανά mL γάλακτος και στις υπόλοιπες $1,6 \times 10^{11}$ κύτταρα ανά mL γάλακτος. Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10 mL. Τα δείγματα θερμάνθηκαν για 1 h στους 100 °C, στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου και έπειτα από την απόρριψη του υπερκείμενου, συλλέχθηκε το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα.

2.2.5.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ M1

Η στερεή τοξίνη ποσότητας 5,4 μg διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα, έπειτα από ανάδευση 5 min, φυλάχθηκε στην κατάψυξη (-20 °C) σε σκοτεινό μέρος για να μην αλλοιωθεί. Ακόμη, η φιάλη που χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευσή της πρέπει να έχει υποστεί επεξεργασία σιλιανοποίησης, ώστε τα μόρια της τοξίνης να μην προσροφώνται στην επιφάνειά της.

Αναλυτικότερα, το φιαλίδιο της τοξίνης ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας 0,1 μg. Προστέθηκαν 0,7 g ακετονιτρίλιου και το φιαλίδιο ξαναζυγίστηκε. Από τη διαφορά των ζυγίσεων υπολογίστηκε η μάζα του διαλύματος και από το πιστοποιητικό του προϊόντος η συγκέντρωση της τοξίνης (μg/kg). Το πυκνό αυτό διάλυμα (7,6 mg/kg) ζυγίστηκε και την επόμενη μέρα για επαλήθευση. Για την παρασκευή διαλύματος 100 μg/L, συγκεκριμένη ποσότητα από το αρχικό πυκνό διάλυμα αραιώθηκε σε ακετονιτρίλιο σε τελικό όγκο 2 mL.



Σχήμα 15: Στερεή αφλατοξίνη M1 από *Aspergillus flavus*

2.2.5.4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Κατά την πειραματική διαδικασία ελέγχθηκε σε σταθερή συγκέντρωση τοξίνης 0,5 μg/L και σταθερή συγκέντρωση κυττάρων $1,6 \times 10^{10}$ κύτταρα /mL γάλακτος, η χρονική μεταβολή της απομάκρυνσης της τοξίνης M1 από το γάλα. Ειδικότερα, σε κωνικές φιάλες των 100 mL, προστέθηκαν γάλα και τοξίνη σε τελικό όγκο 10 mL και παρέμειναν για 15 min σε επωαστήρα στους 37 °C υπό ανάδευση στις 100 rpm. Τα δείγματα συλλέχθηκαν ανά 12 h, έως το πέρας των 36 h, ενώ στο χρονικό αυτό διάστημα τα παρασκευάσματα παρέμειναν σε επωαστήρα στους 37 °C υπό ανάδευση στις 100 rpm. Στους ίδιους χρόνους λαμβάνονται δείγματα και χωρίς κύτταρα. Για κάθε περίπτωση γίνονται δύο επαναλήψεις [56].

Επίσης, μελετάται και η απομάκρυνση της τοξίνης από το γάλα για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης M1 (0,25 µg/L, 0,5 µg/L, 0,75 µg/L) και κυττάρων ($1,6 \times 10^9$ κύτταρα /mL, $1,6 \times 10^{10}$ κύτταρα /mL και $1,6 \times 10^{11}$ κύτταρα /mL). Πιο αναλυτικά, σε κωνικές φιάλες των 100 mL, προστέθηκε γάλα και τοξίνη σε τελικό όγκο 10 mL ώστε να επιτευχθούν οι συνδυασμοί που αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 14: Σχεδιασμός του πειράματος

Συγκέντρωση κυττάρων (κύτταρα /mL)	Συγκέντρωση τοξίνης (µg/L)
$1,6 \times 10^9$	0,25
$1,6 \times 10^9$	0,5
$1,6 \times 10^9$	0,75
$1,6 \times 10^{10}$	0,25
$1,6 \times 10^{10}$	0,5
$1,6 \times 10^{10}$	0,75
$1,6 \times 10^{11}$	0,25
$1,6 \times 10^{11}$	0,5
$1,6 \times 10^{11}$	0,75

Επιπλέον, για κάθε δείγμα ελέγχθηκαν και τα δείγματα χωρίς κύτταρα καθώς και η απομάκρυνση που επιτυγχάνεται σε χρόνο $t_0 = 0$ min για όλους τους συνδυασμούς.

2.2.5.5. ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Έπειτα το πέρας του χρόνου αυτού τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα και να αποφευχθεί η συνέχιση της διαδικασίας και η πιθανή επαναδιάλυση της τοξίνης στο ακετονιτρίλιο κατά την εκχύλιση.

Η τοξίνη εκχυλίστηκε με μέθοδο επικυρωμένη από το εργαστήριο της Χημικής Υπηρεσίας Μετρολογίας του Γενικού Χημείου του Κράτους. Σε ποσότητα δείγματος 10 mL σε κωνικό πλαστικό περιέκτη φυγοκέντρισης προστέθηκαν 10 mL ακετονιτρίλιου και ακολούθησε ανάδευση σε διάταξη *Vortex* για 1 min. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 5000 rpm για 10 min, στους 0 °C. Η οργανική φάση συλλέχθηκε σε κωνικό πλαστικό περιέκτη φυγοκέντρισης, προστέθηκε 1 g θειικό αμμώνιο και το μίγμα αναδεύτηκε μέχρι πλήρους διάλυσης του του άλατος. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Μέρος της υπερκείμενης οργανικής φάσης συλλέχθηκε σε φιαλίδιο και αναλύθηκε με LC-MS/MS. Η ανάλυση δεν απαιτεί ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΞΙΝΩΝ

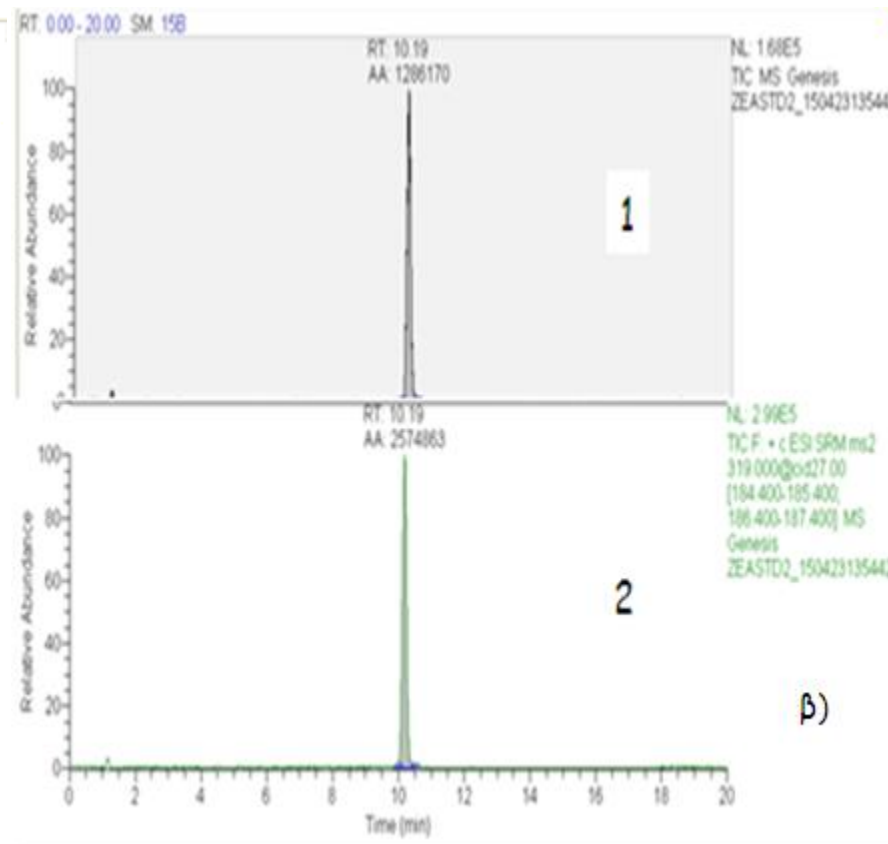
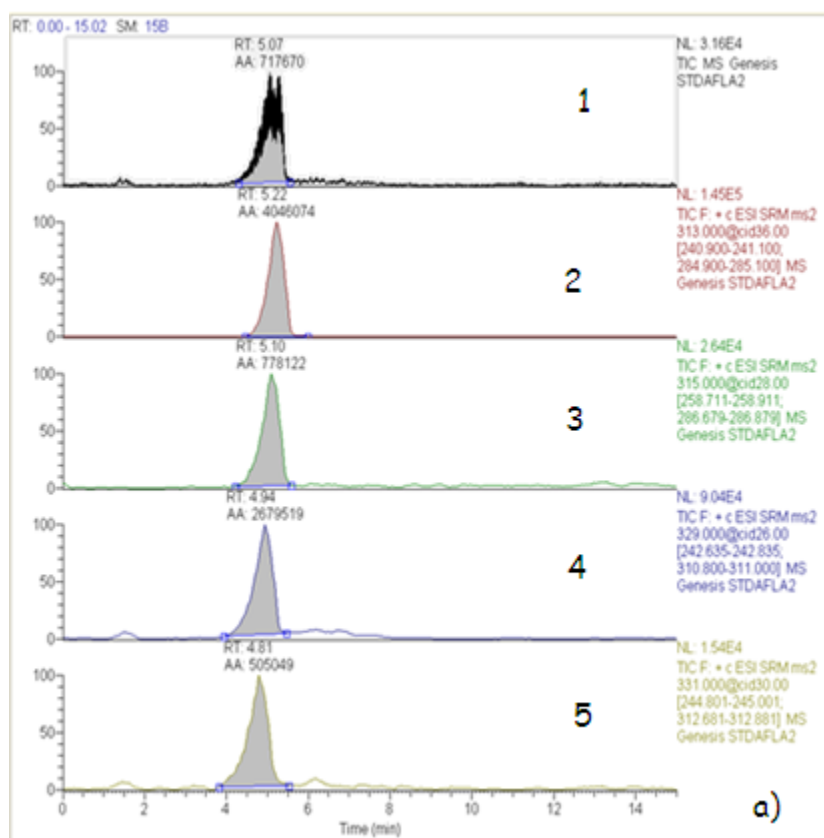
Αρχικά παρατίθενται τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων των τοξινών που μελετώνται κατά τη διαδικασία παραγωγής τοξινών από μύκητα *F.oxysporum F3* (Σχήμα 16, 17).

Ουσιαστικά, πρόκειται για τα διαγράμματα σχετικής αφθονίας των καταμετρούμενων ιόντων για συγκεκριμένα m/z συναρτήσει του χρόνου. Στο χρωματογράφημα η θέση των κορυφών ως προς τον άξονα του χρόνου συνεισφέρει στην ταυτοποίηση της ένωσης, ενώ το ύψος ή το εμβαδόν της κορυφής αποτελεί μέτρο ποσοτικοποίησης. Η θέση της κάθε κορυφής στον άξονα του χρόνου ταυτίζεται με το χρόνο έκλουσης της κάθε ένωσης από τη στήλη, ο οποίος εξαρτάται από την αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται ανάμεσα στην ένωση, την κινητή και τη στατική φάση. Από τα χρωματογραφήματα διαπιστώνεται ότι οι τοξίνες δεσμεύονται στους επιθυμητούς χρόνους από την κινητή φάση. Δεξιά σε κάθε χρωματογράφημα αναγράφεται η αντίδραση που παρακολουθείται (συνθήκες, μητρικό και θυγατρικά ιόντα) και το απόλυτο σήμα.

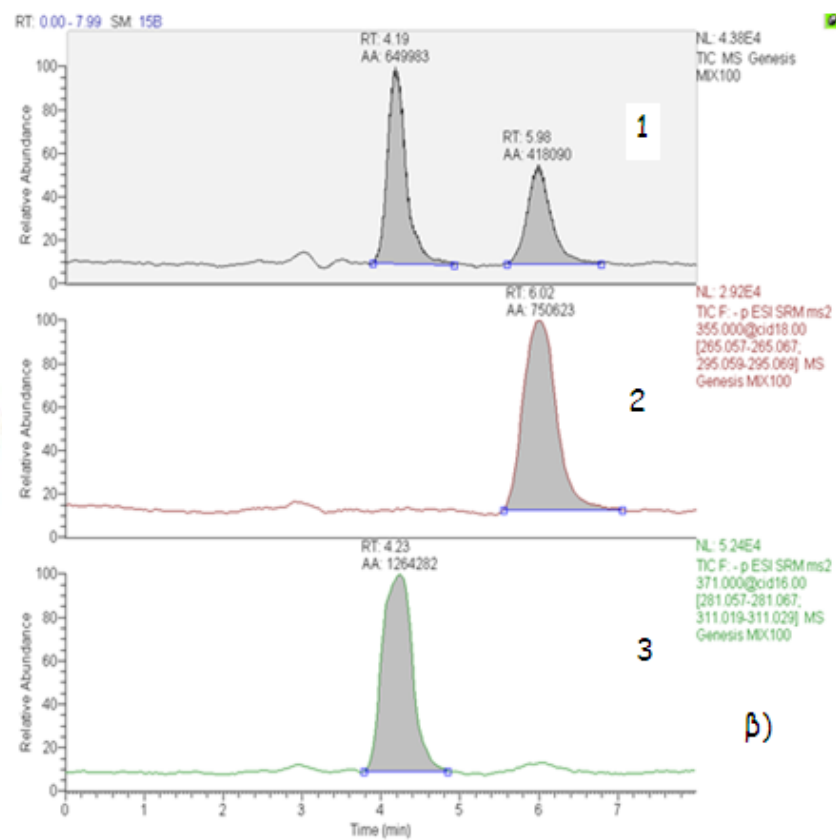
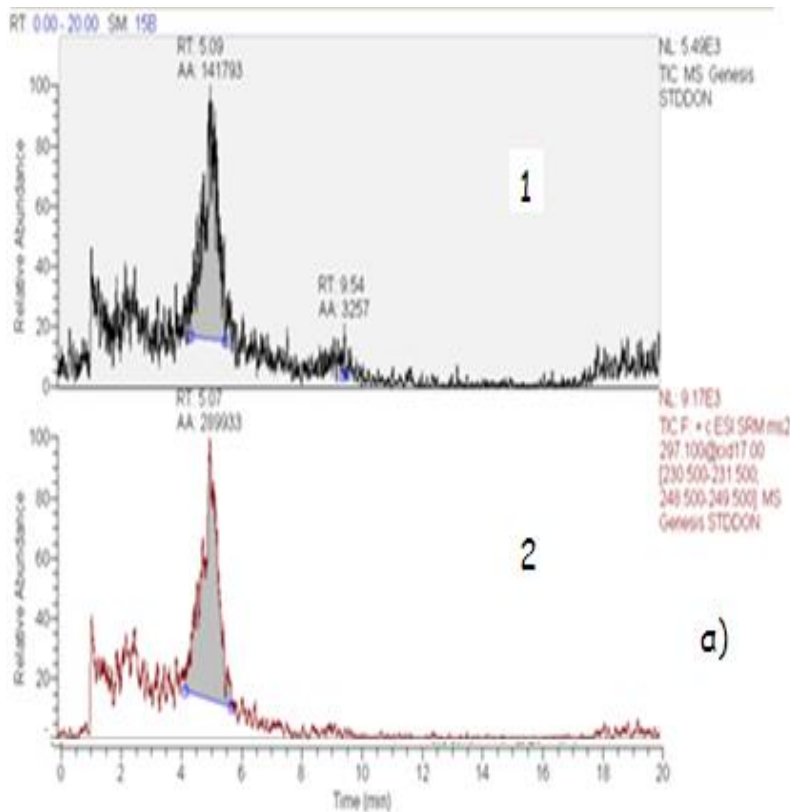
Έλεγχος υποστρωμάτων για παρουσία τοξινών.

➤ ΚΡΙΘΑΡΙ

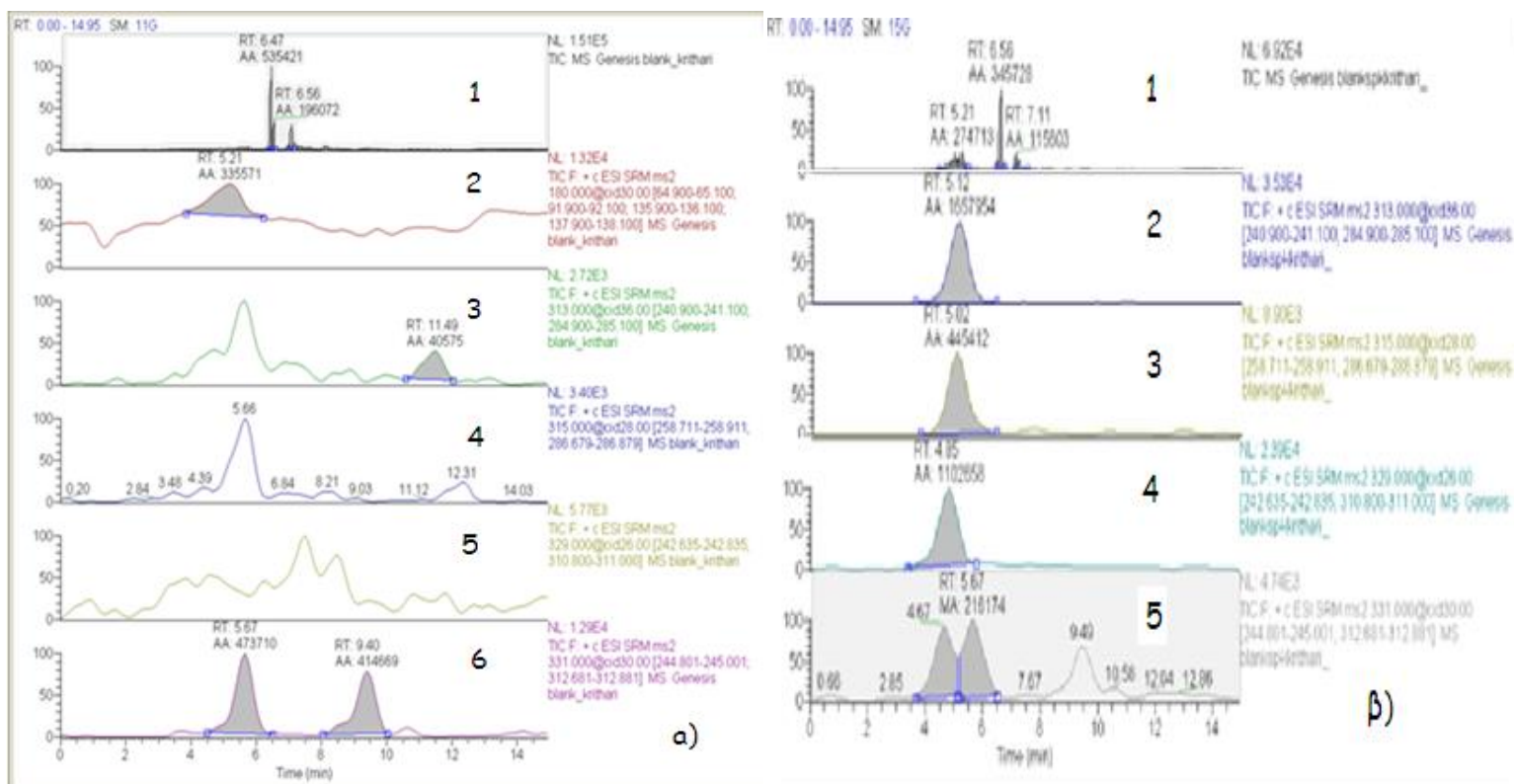
Για τον πιο αξιόπιστο έλεγχο του υποστρώματος, το κριθάρι, πριν τον εμβολιασμό του με το μύκητα *F.oxysporum*, εκχυλίστηκε με οργανικό διάλυτη, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο περιείχε ποσότητα τοξίνης. Εξετάζοντας τα χρωματογραφήματα (Σχήμα 18), διαπιστώνεται πως στο κριθάρι (*blank*), ενδέχεται να εμπεριείχε μικρή ποσότητα φουσαρικού οξέος, καθώς στο χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του εμφανίζεται κορυφή σε χρόνο 5,21 min. Ωστόσο, δε διατίθεται πρότυπο διάλυμα για ταυτοποίηση της τοξίνης. Επίσης, υπάρχει υπόνοια παρουσίας της αφλατοξίνης G₂, η οποία όμως καταρρίπτεται έπειτα από εμβολιασμό του εκχυλίσματος (*matrix match standard*) με πρότυπο διάλυμα αφλατοξινών, καθώς δεν ενισχύθηκε η υπάρχουσα κορυφή στα 5,67 min αλλά δημιουργείται νέα στα 4,67 min (Σχήμα 18β). Ακολούθησε χρωματογραφικός έλεγχος του οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα σε κριθάρι (καλλιέργεια) (Σχήμα 19). Από τα χρωματογραφήματα μεταπτώσεων των μυκοτοξινών διαπιστώνεται πως οι παρατηρούμενες κορυφές εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους από τις αφλατοξίνες και τη ΖΕΑ. Συνεπώς δεν έχουν παραχθεί μυκότοξίνες, με εξαίρεση την πιθανή παρουσία του φουσαρικού οξέος.



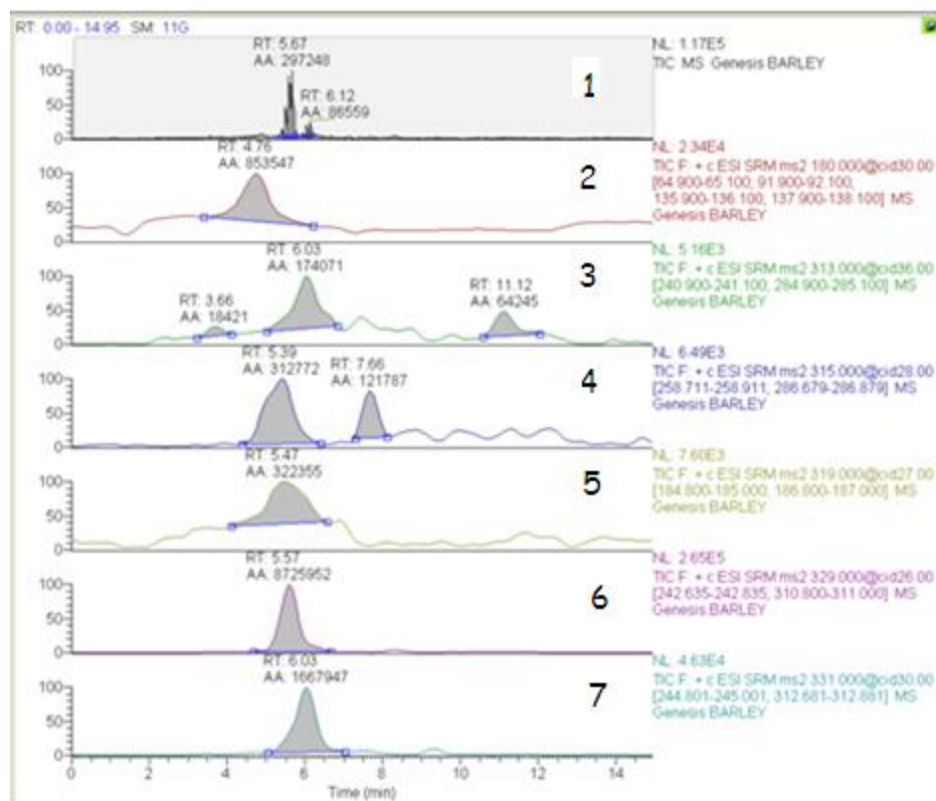
Σχήμα 16: α) Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (5 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2, β) Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος τοξίνης ZEA (100 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων τοξίνης ZEA.



Σχήμα 17: α) Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος DON (100 µg/L) 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, β) Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος DON/NIV (100 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) Χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV.

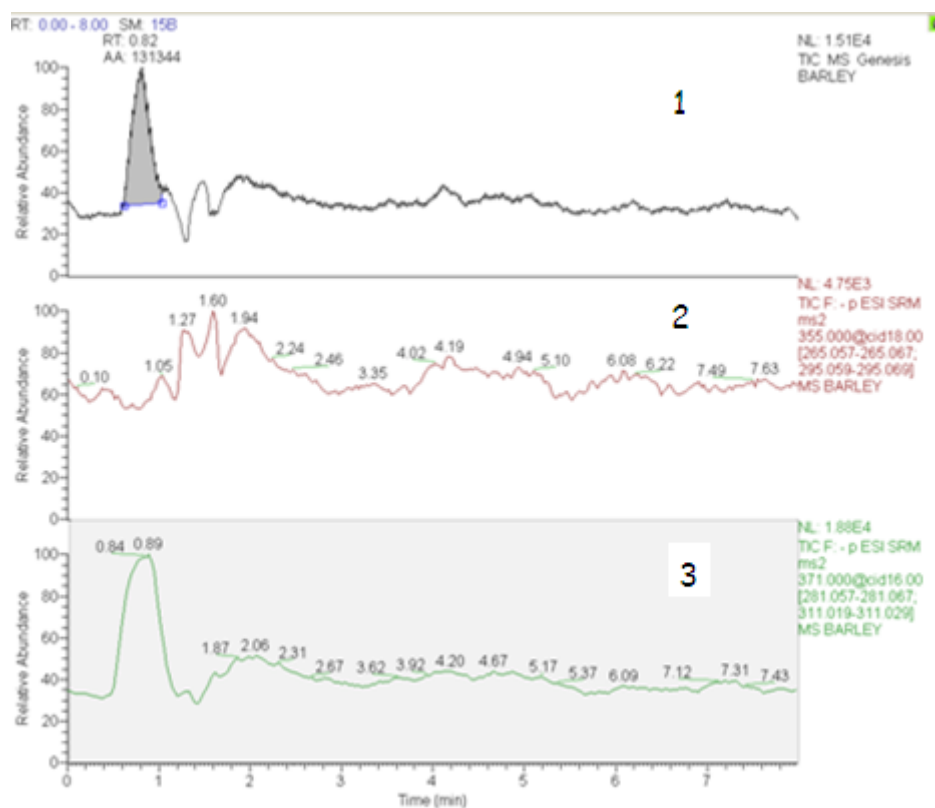


Σχήμα 18: α) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος κριθαριού πριν τον εμβολιασμό (*blank*): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2, β) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος κριθαριού πριν τον εμβολιασμό (*blank*) με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (5 μg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.

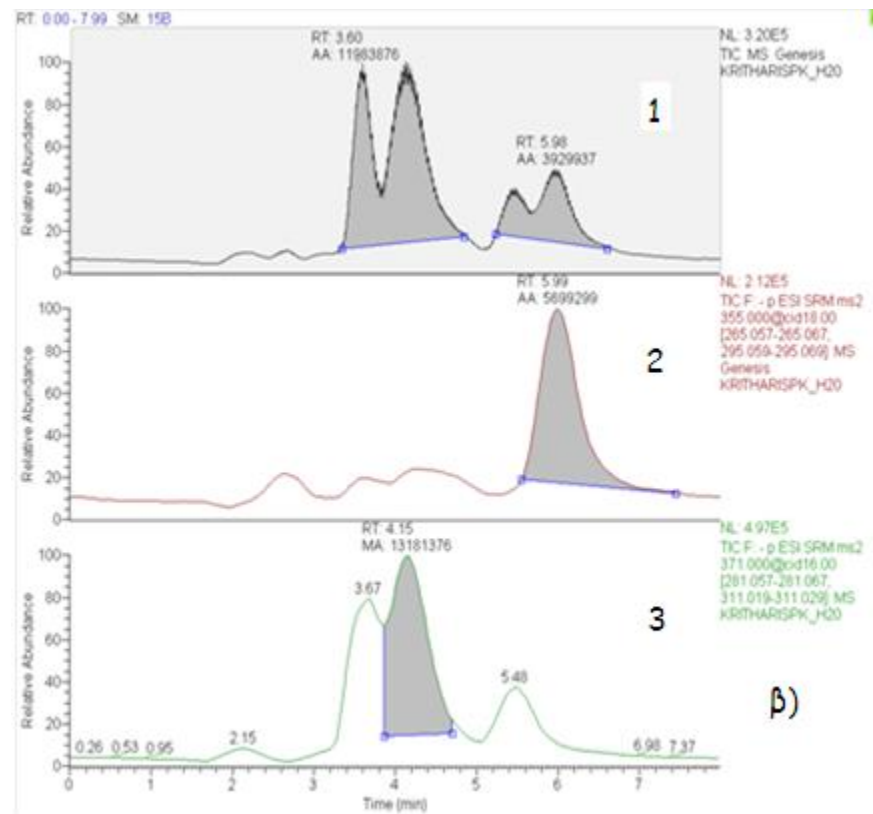
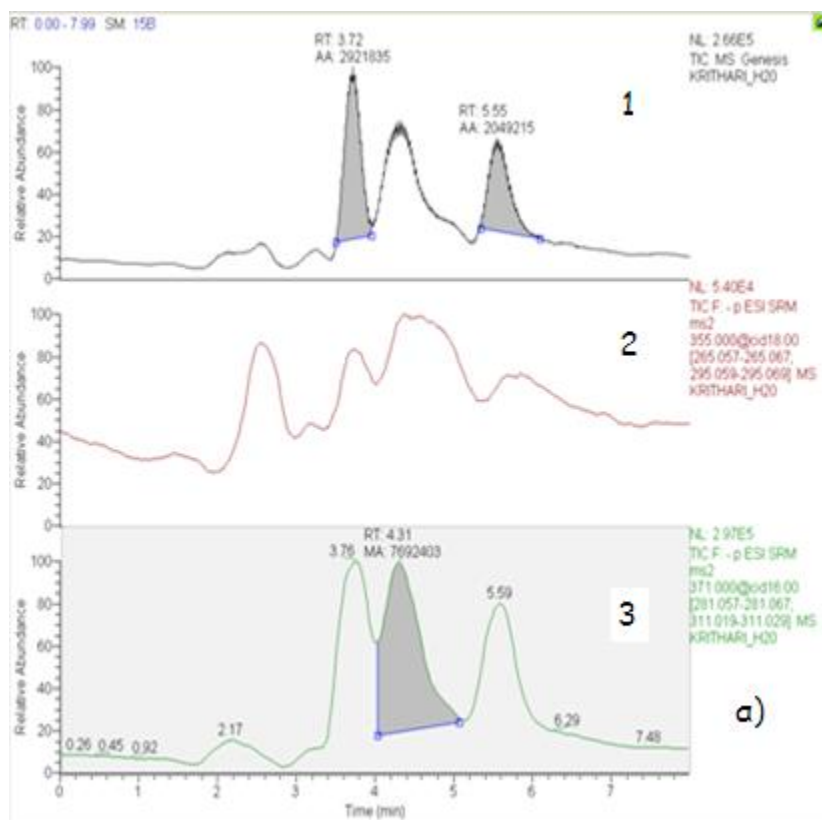


Σχήμα 19: Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα κριθάρι.: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης ZEA, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 7) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.

Ακολούθησε έλεγχος για τις τοξίνες DON/NIV στα υδατικά εκχυλίσματα της καλλιέργειας. Από το χρωματογράφημα (Σχήμα 21α) είναι φανερό πως δεν έχει παραχθεί τοξίνη DON, αλλά ενδεχομένως να έχει παραχθεί τοξίνη NIV. Ωστόσο, η αναλογία των ιόντων της κορυφής δε συμφωνεί με την αναλογία των ιόντων της τοξίνης NIV. Με προσθήκη πρότυπου διαλύματος DON/NIV 100 µg/L (Σχήμα 21β) διαπιστώθηκε πως δεν πρόκειται για την τοξίνη NIV, αφού έπειτα από ολοκλήρωση προέκυψε ότι το εμβασμόν δε συμφωνεί με το αναμενόμενο με βάση τη συγκέντρωση της προστιθέμενης τοξίνης. Για εξάλειψη οποιασδήποτε αμφιβολίας, το υδατικό εκχύλισμα διήλθε από στήλη ανοσοσυγγένειας και διαπιστώθηκε η απουσία των δύο τοξινών σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα επιλεγμένων μεταπτώσεων τους (Σχήμα 20). Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι σε κάθε ακολουθία δειγμάτων που αναλύεται, ενδέχεται να διαφοροποιείται ελαφρά ο χρόνος κατακράτησης της κάθε τοξίνης και για το λόγο αυτό, κάθε φορά έλεγχονται και τα πρότυπα διαλύματα.



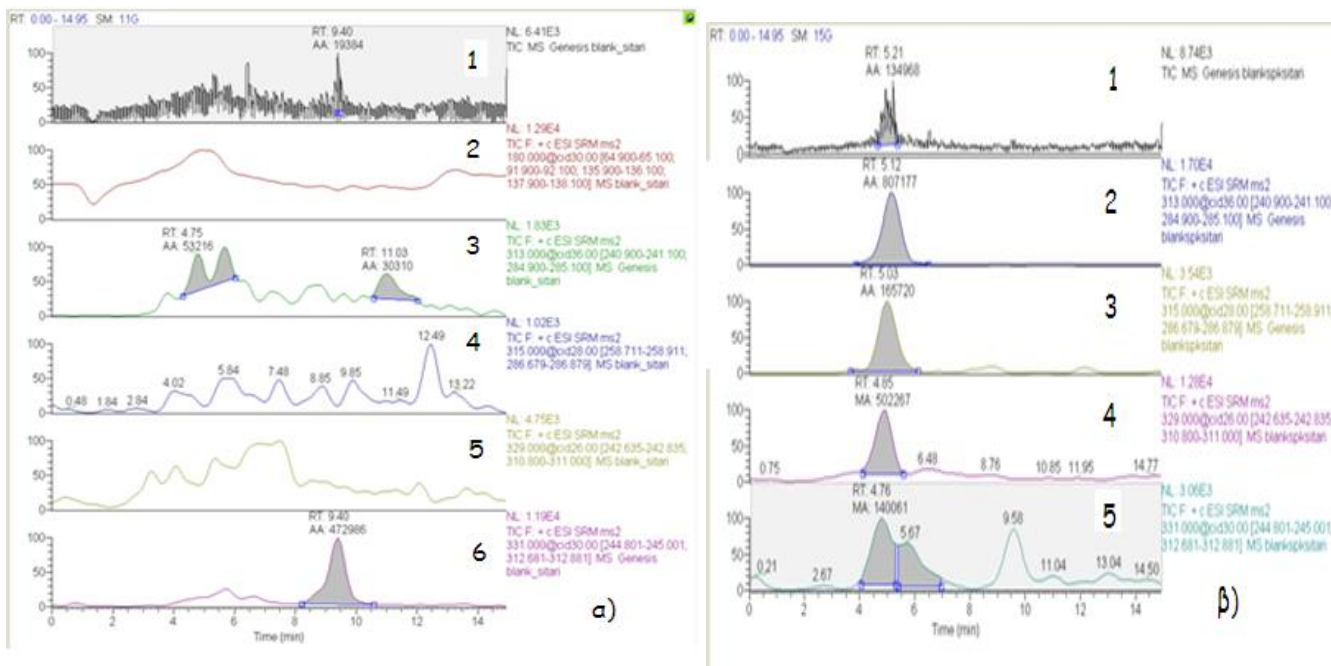
Σχήμα 20: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα κριθάρι με μέθοδο DON/NIV (IAC): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV.



Σχήμα 21: α) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα κριθάρι: συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV, β) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα κριθάρι με προσθήκη πρότυπου διαλύματος DON/NIV (100 µg/L): συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV.

➤ ΣΙΤΑΡΙ

Ομοίως με το κριθάρι, πριν τον εμβολιασμό με το μύκητα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του εκχυλίσματος του σιταριού, με οργανικό διαλύτη.

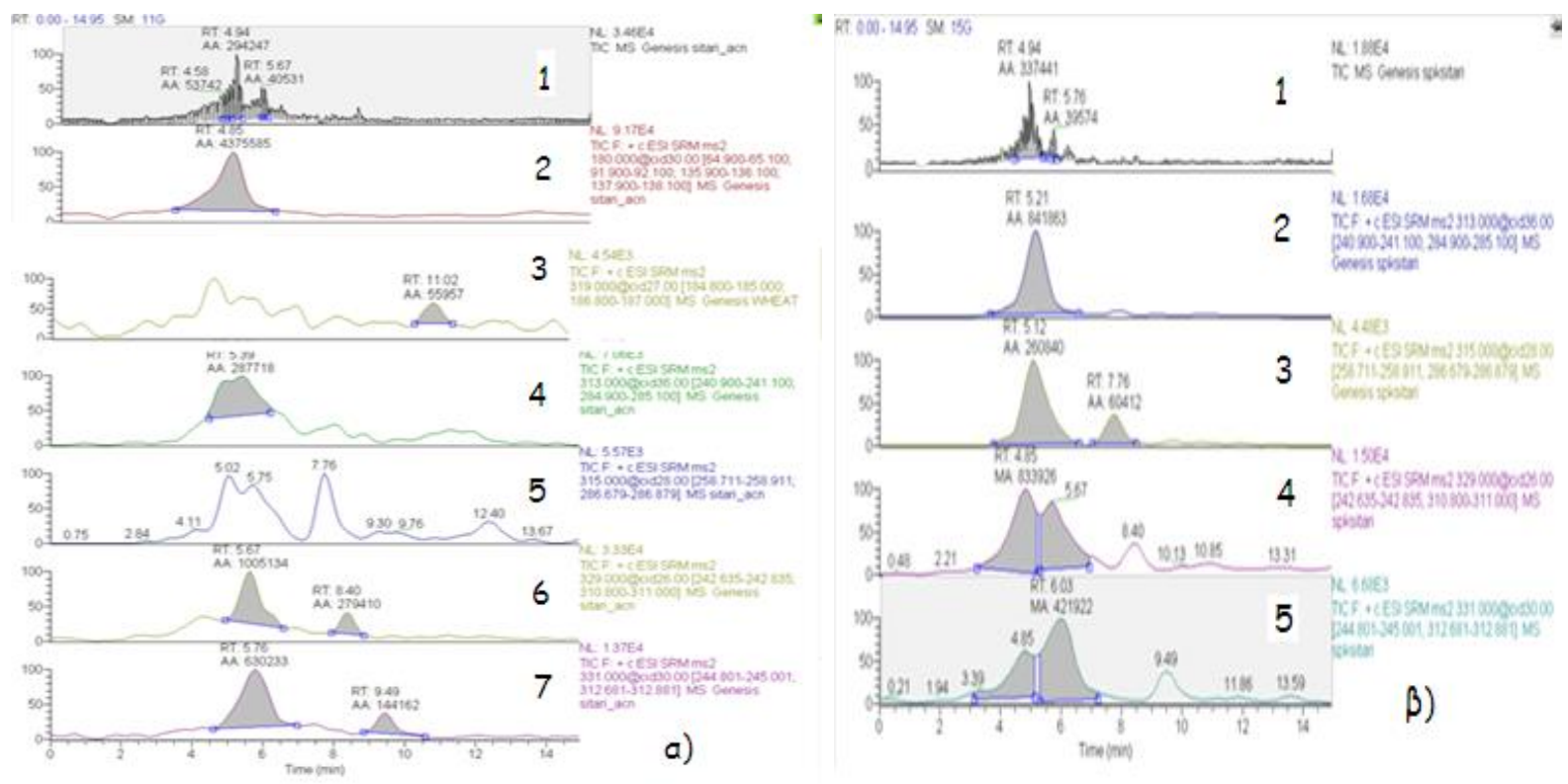


Σχήμα 22: α) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος σιταριού πριν τον εμβολιασμό (*blank*): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2, β) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος σιταριού πριν τον εμβολιασμό (*blank*) με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (5 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.

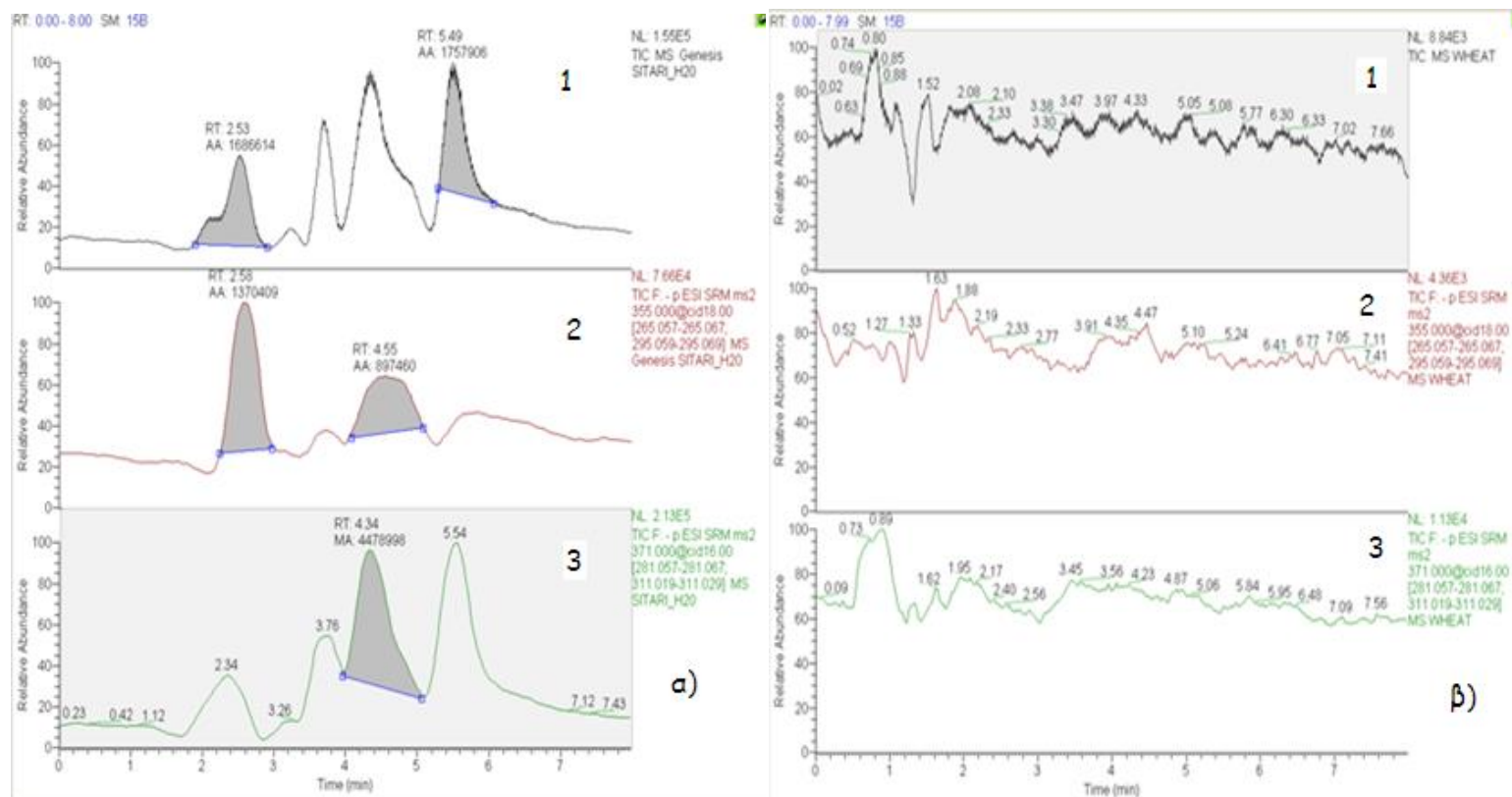
Συγκρίνοντας τα δύο χρωματογραφήματα είναι φανερό πως το εκχύλισμα του σιταριού πριν τον εμβολιασμό (*blank*) είναι καθαρό, καθώς δεν εμφανίζεται καμία από τις αφλατοξίνες (Σχήμα 22). Δεδομένων των αποτελεσμάτων αυτών, η καλλιέργεια του μύκητα *F. oxysporum* στο σιτάρι ελέγχθηκε για την παρουσία τοξινών, έπειτα από ένα μήνα παραμονής της σε δεδομένες συνθήκες.

Αρχικά, ελέγχθηκε το εκχύλισμα της καλλιέργειας του σιταριού για την παρουσία αφλατοξινών, ZEA και φουσαρικού οξέος. Παρατηρώντας τα ακόλουθα χρωματογραφήματα (Σχήμα 23α) και συγκρίνοντάς τα με τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων που έχουν εμβολιασθεί με πρότυπο διάλυμα αφλατοξινών (Σχήμα 23β) διαπιστώνεται η παραγωγή μικρής ποσότητας φουσαρικού οξέος στην καλλιέργεια, καθώς εμφανίζεται κορυφή στα 4,85 min, ενώ απουσιάζουν οι υπόλοιπες τοξίνες. Η πιθανή παραγωγή της τοξίνης ZEA απορρίπτεται λόγω διαφοράς στο χρόνο κατακράτησης της τοξίνης, όπου εμφανίζεται κορυφή (11,02 min αντί για 10 min) και διαφορετικής αναλογίας ιόντων ταυτοποίησης.

Ακολούθησε ο προσδιορισμός των τοξινών DON/NIV στο υδατικό εκχύλισμα του σιταριού. (Σχήμα 24α). Η πιθανή κορυφή της τοξίνης DON εμφανίζονται στα 4,55 min, ενώ για τη NIV εμφανίζεται κορυφή στα 4,34 min. Έπειτα από τη διέλευση του εκχυλίσματος από στήλη ανοσοσυγγένειας, διαπιστώθηκε η απουσία και των δύο τοξινών, όπως φαίνεται στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα (Σχήμα 24β).



Σχήμα 23: Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα σιτάρι.: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης ZEA 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 7) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2. β) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα σιτάρι με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (5 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.

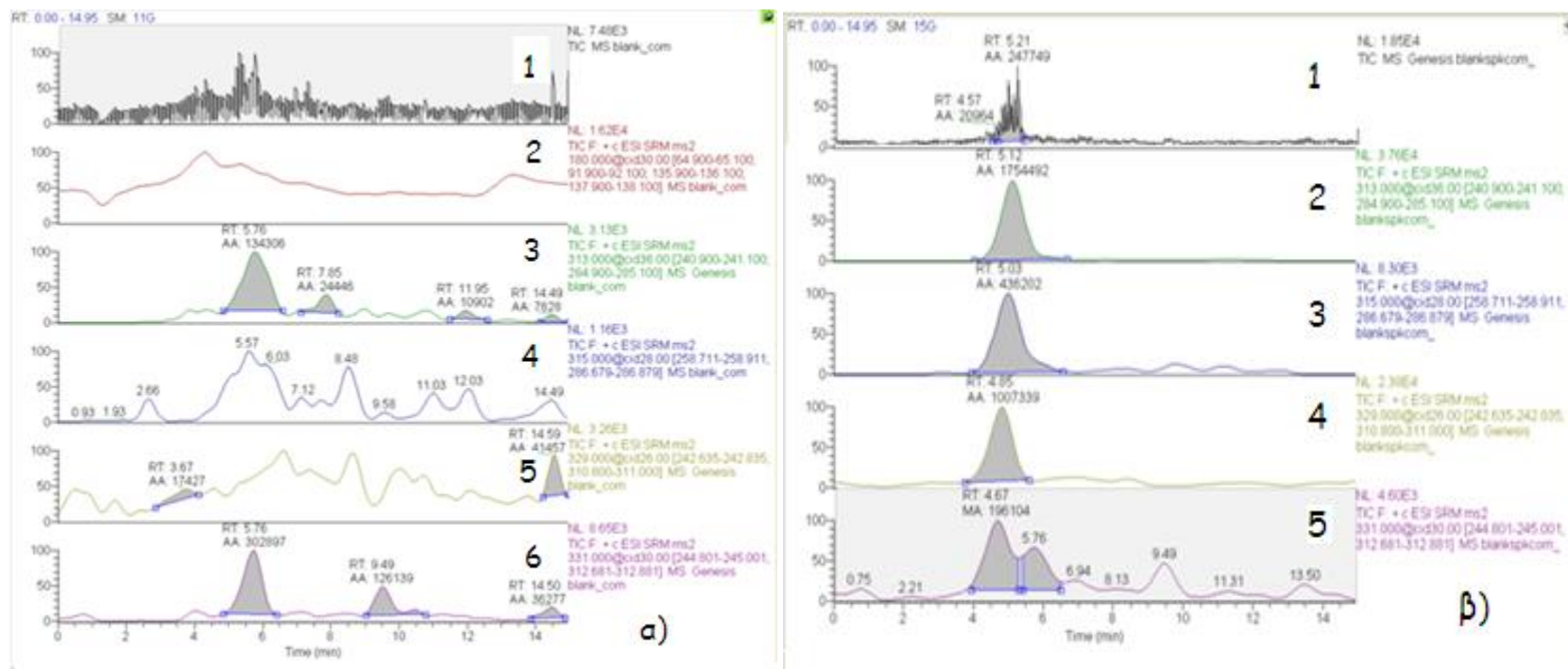


Σχήμα 24: α) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα σιτάρι: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV, β) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα σιτάρι με μέθοδο DON/NIV (IAC): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV.

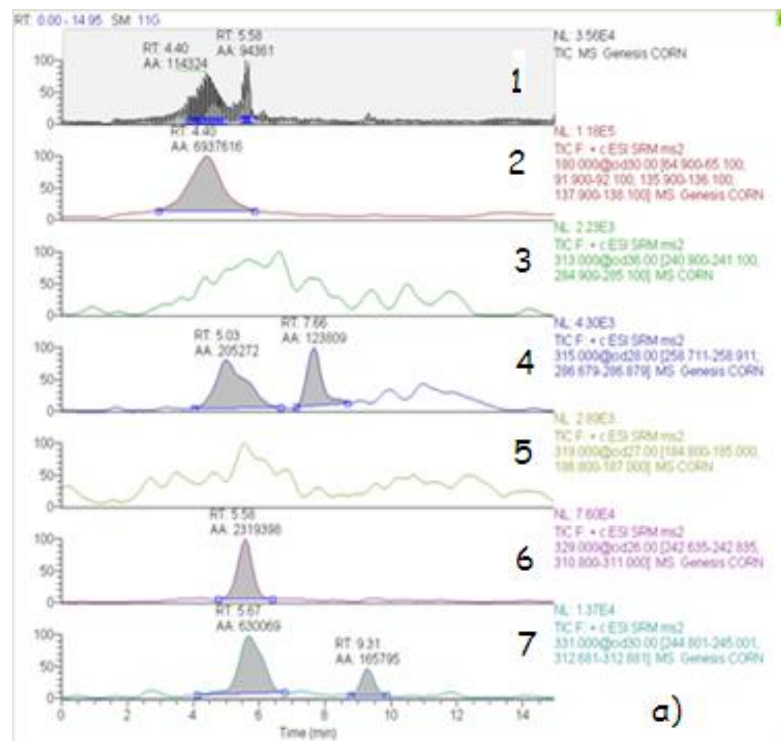
➤ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ

Όπως και στις περιπτώσεις που προαναφέρθηκαν, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του εκχυλίσματος του καλαμποκιού πριν τον εμβολιασμό του με το μύκητα *F. oxysporum*. Παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα (Σχήμα 25) διαπιστώνεται απουσία των αφλατοξινών, της μυκοτοξίνης ZEA και του φουσαρικού οξέος στο καλαμπόκι (*blank*). Ειδικότερα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 25β, δεν ενισχύεται κάποια υφιστάμενη κορυφή, έπειτα από τον εμβολιασμό του οργανικού εκχυλίσματος του καλαμποκιού με διάλυμα αφλατοξινών αλλά δημιουργούνται νέες κορυφές. Επίσης, δεν ήταν απαραίτητη η προσθήκη πρότυπου διαλύματος της τοξίνης ZEA αφού δεν εμφανίζεται κορυφή στο χρόνο κατακράτησης της τοξίνης. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο χρωματογραφικός έλεγχος του οργανικού εκχυλίσματος του καλαμποκιού, μετά από ένα μήνα όπου είχε παραμείνει σε δεδομένες συνθήκες. Από το χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος (Σχήμα 26) υπάρχει ένδειξη της παραγωγής του, σε χρόνο 4,4 min, ενώ δεν παράγονται άλλες τοξίνες, όπως φαίνεται στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Αν και οι κορυφές των χρωματογραφημάτων για τις αφλατοξίνες G1, G2 εμφανίζονται σε χρόνους που δημιουργούν την υπόνοια της παρουσίας τους, ο χρόνος έκλουσης τους και η αναλογία των ιόντων δεν το επιβεβαιώνει. Έτσι αποδεικνύεται ότι οι κορυφές είναι διαφορετικές από αυτές των αφλατοξινών.

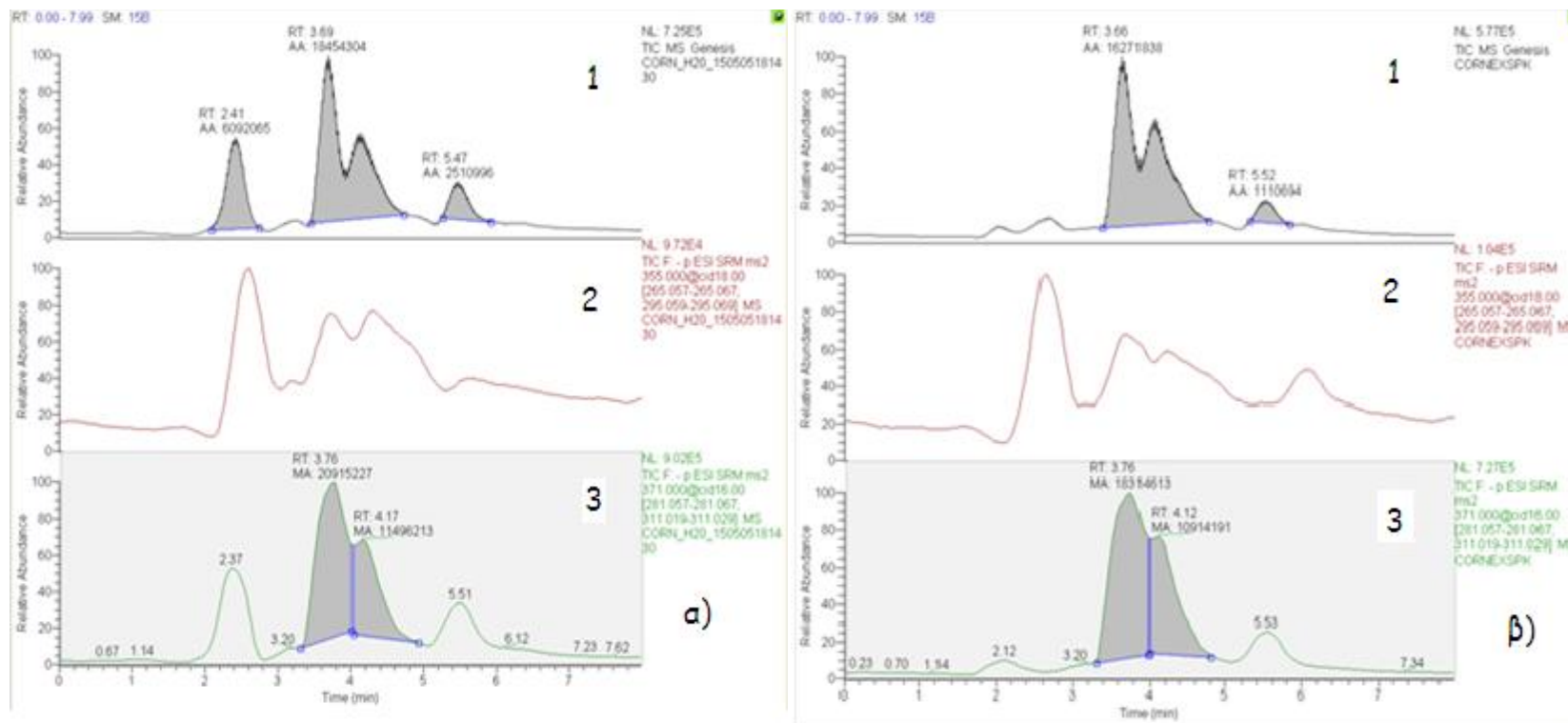
Στη συνέχεια, με χρήση της μεθόδου DON/NIV (Σχήμα 27α) μελετήθηκε το υδατικό εκχύλισμα του καλαμποκιού. Φαίνεται πως δεν παράγεται η τοξίνη DON στο υπόστρωμα του καλαμποκιού, ενώ υπάρχει υποψία για την παραγωγή NIV καθώς εμφανίζεται στο αντίστοιχο χρωματογράφημα κορυφή σε χρόνο 3,7 min. Ωστόσο, με εμβολιασμό του εκχυλίσματος με μικρή ποσότητα πρότυπου διαλύματος των δύο τοξινών, στο χρωματογράφημα (Σχήμα 27β) διαπιστώνεται πως δεν ενισχύεται κάποια υπάρχουσα κορυφή. Ακόμη, η απουσία της τοξίνης επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση της αναλογίας των ιόντων ταυτοποίησης, η οποία δεν επαληθεύεται.



Σχήμα 25: α) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος καλαμποκιού πριν τον εμβολιασμό (*blank*): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2, β) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος σιταριού πριν τον εμβολιασμό (*blank*) με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (5 μg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.



Σχήμα 26: Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα καλαμπόκι: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης ZEA, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 7) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.



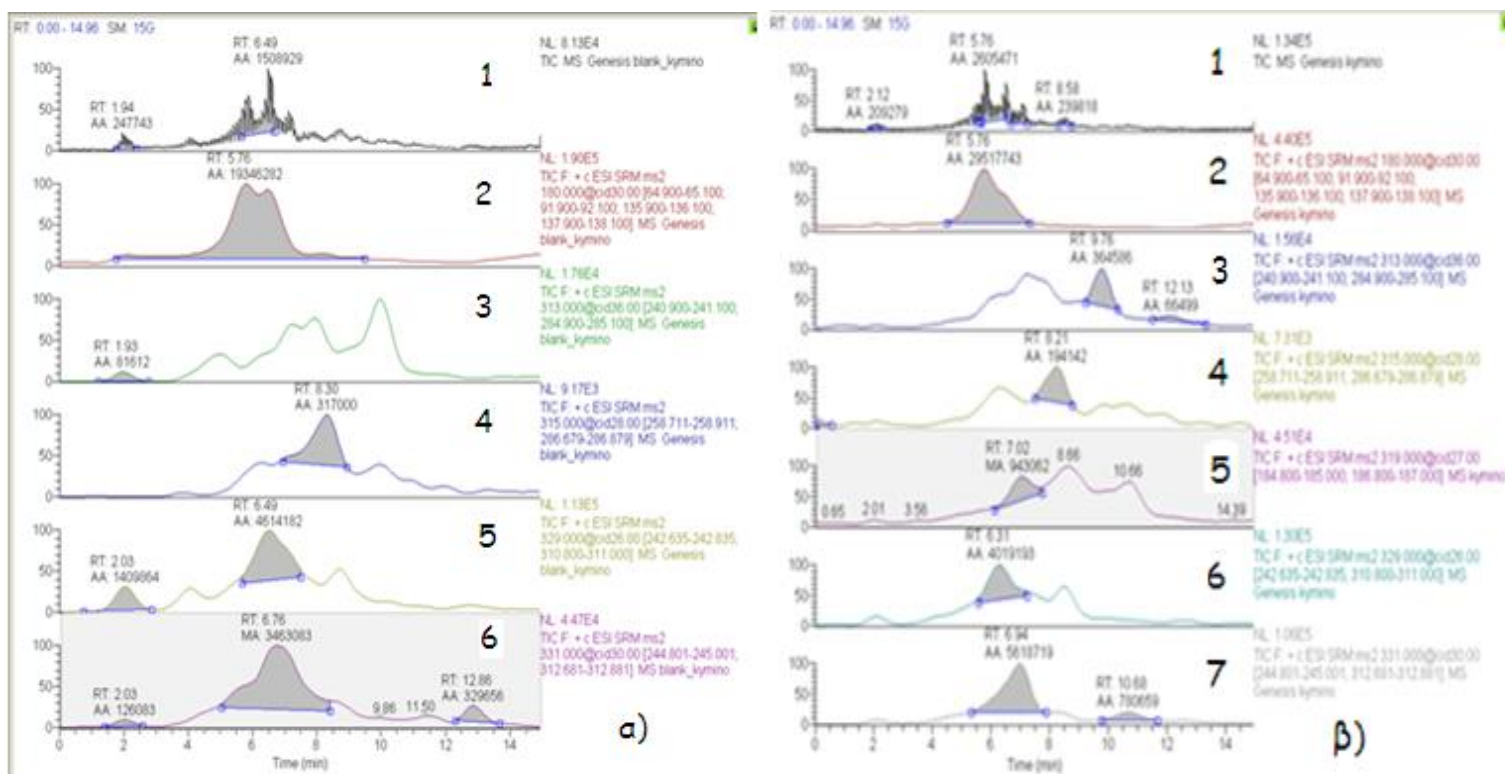
Σχήμα 27: α) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα καλαμπόκι: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV, β) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα καλαμπόκι με προσθήκη πρότυπου διαλύματος DON/NIV (100 µg/L): συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV.

➤ KYMINO

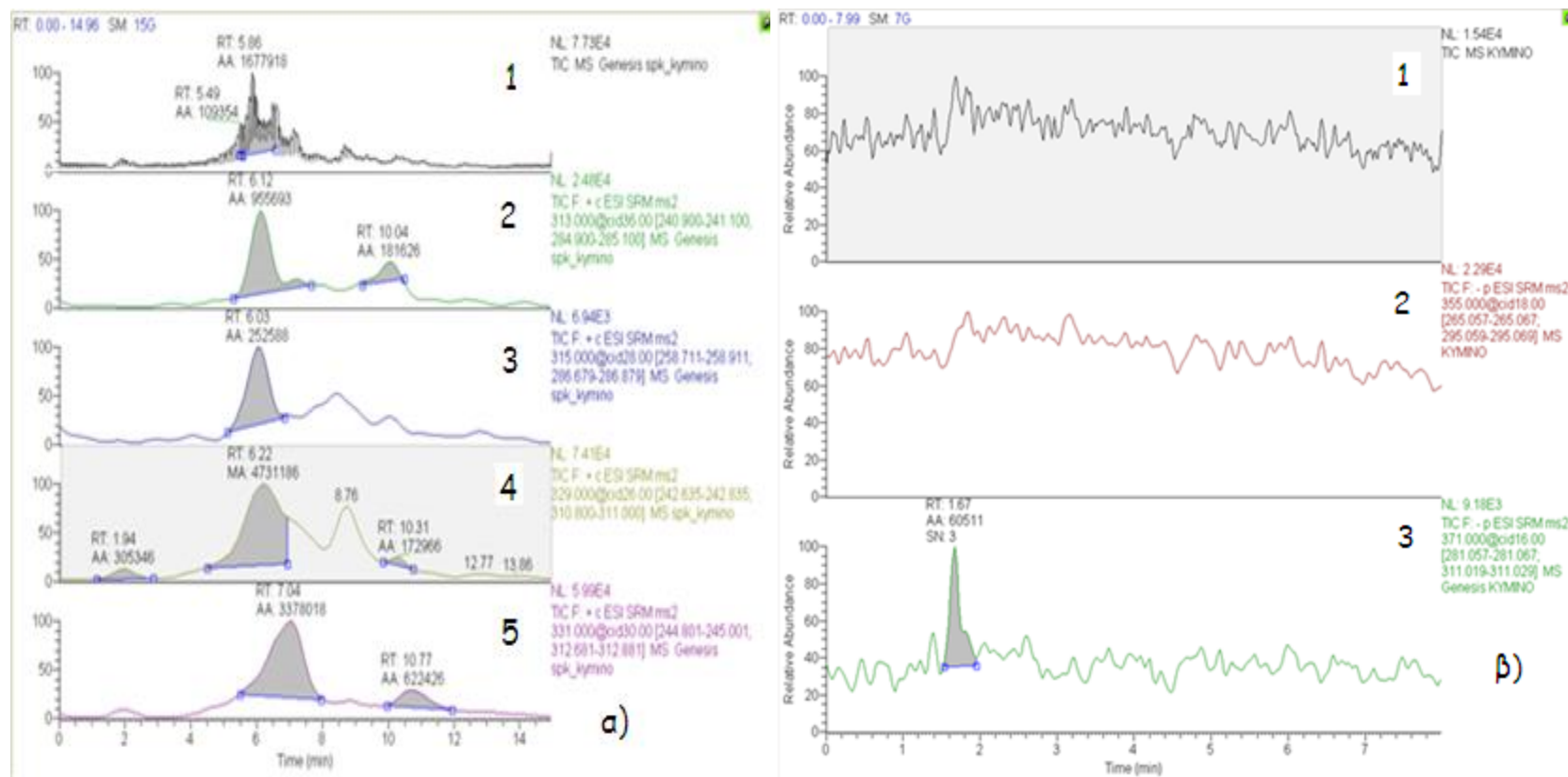
Το κύμινο που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ελέγχθηκε αρχικά για την ενδεχόμενη παρουσία μυκοτοξινών. Έπειτα από εκχύλιση με ακετονιτρίλιο:νερό (85:15), διαπιστώθηκε πως υπάρχει πιθανότητα παρουσίας φουσαρικού οξέος, ενώ απουσιάζουν οι αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2 για τις οποίες ελέγχθηκε, καθώς οι φαινόμενοι χρόνοι κατακράτησης των τοξινών δε συνάδουν με τους χρόνους κατακράτησης των προτύπων διαλυμάτων (Σχήμα 28α).

Ακολούθησε χρωματογραφικός έλεγχος των τοξινών ZEA, φουσαρικού οξέος και των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 στο οργανικό εκχύλισμα της καλλιέργειας του μύκητα σε κύμινο. Αρχικά, διαπιστώνεται πιθανή παρουσία φουσαρικού οξέος, που όμως ανιχνεύεται και στην πρώτη ύλη (*blank*). Η ZEA απουσιάζει καθώς εμφανίζεται κορυφή στα 7,02 min αντί στα 10,1 min. Επίσης, δεν παράγονται αφλατοξίνες από τον μύκητα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 28β. Για τις αφλατοξίνες πραγματοποιήθηκε πρόσθετος έλεγχος με τον εμβολιασμό πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών, για να διαπιστωθεί κατά πόσο υπάρχει ενίσχυση κάποιας κορυφής (Σχήμα 29α). Από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων προκύπτει ότι δεν ενισχύονται οι υπάρχουσες κορυφές. Είναι φανερό πως ανάλογα με το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται και για κάθε ακολουθία δειγμάτων μπορεί να υπάρχει μετατόπιση του χρόνου κατακράτησης.

Τέλος, με έλεγχο του υδατικού εκχυλίσματος (Σχήμα 29β) διαπιστώνεται η απουσία της τοξίνης NIV, καθώς η σχετική κορυφή εμφανίζεται στα 1,67 min και όχι στα 3,7 min περίπου. Επίσης, όπως είναι φανερό από το αντίστοιχο χρωματογράφημα δεν παράγεται η τοξίνη DON.



Σχήμα 28: α) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος κύμινου πριν τον εμβολιασμό (blank): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2, β) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα κύμινο: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων του φουσαρικού οξέος, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης ZEA, 6) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 7) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.



Σχήμα 29: α) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα κύμινο με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών B1, B2, G1 ,G2 (5 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2. β) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα κύμινο: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV.

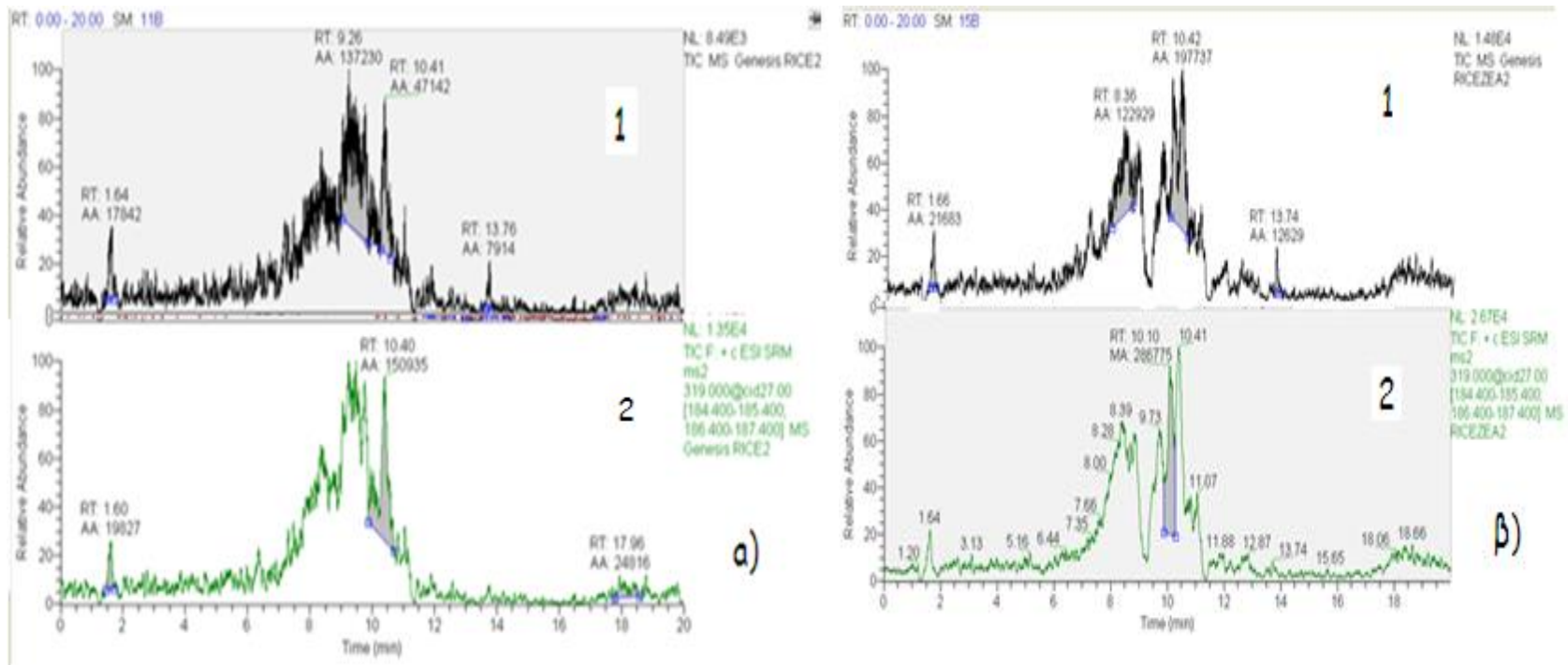
➤ PYZI

Το ρύζι που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα δεν ελέγχθηκε για την ενδεχόμενη παρουσία μυκοτοξινών. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε εκτενής χρωματογραφικός έλεγχος στο οργανικό και υδατικό εκχύλισμα της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* σε ρύζι.

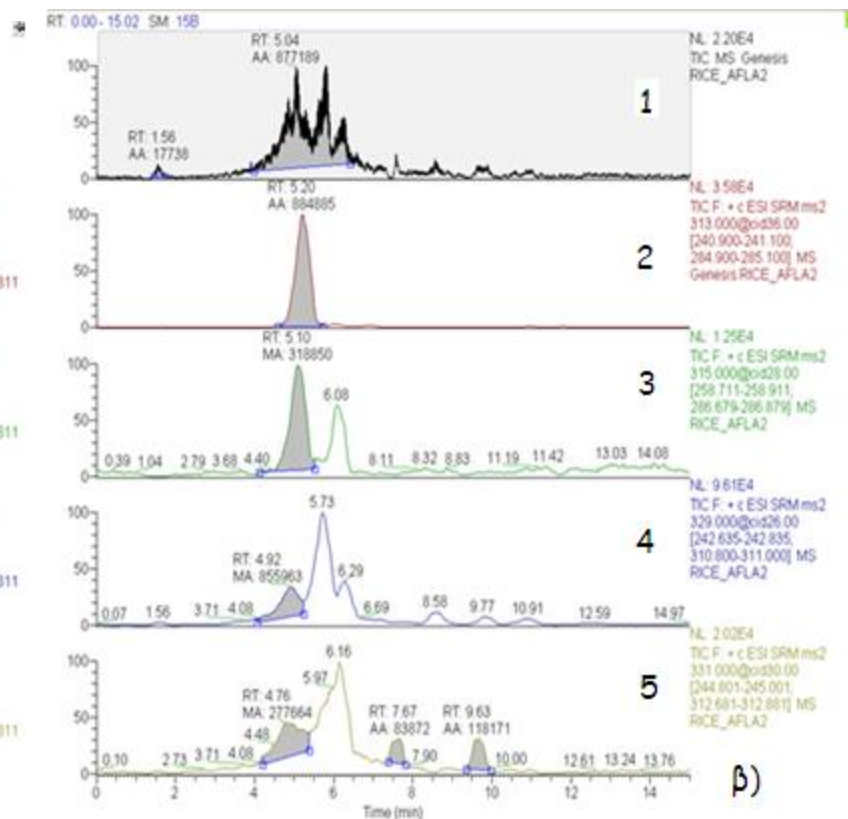
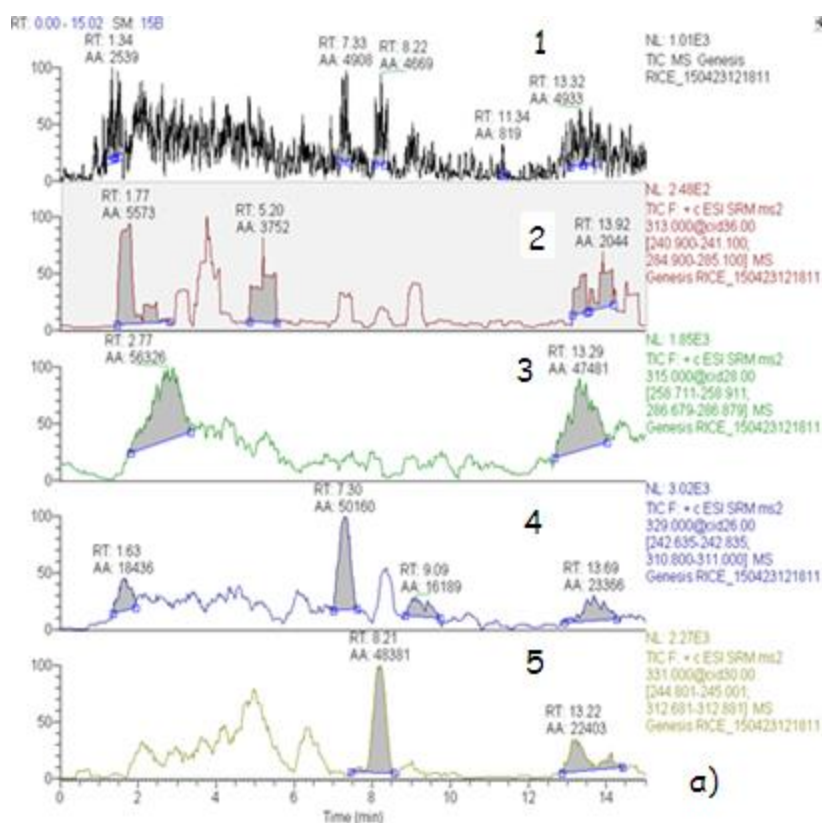
Αρχικά, στο οργανικό εκχύλισμα της καλλιέργειας του μύκητα πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός έλεγχος της τοξίνης ZEA (Σχήμα 30α), η οποία διαπιστώθηκε ότι απουσιάζει από το ρύζι, καθώς με προσθήκη πρότυπου διαλύματος ZEA (100 µg/L) (Σχήμα 30β) δημιουργείται μια νέα κορυφή σε χρόνο 10,10 min. Η απουσία της ZEA επιβεβαιώθηκε από τη σχετική αναλογία των ιόντων.

Ακολούθησε χρωματογραφικός έλεγχος των αφλατοξινών B1, B2, G1, και G2 στο οργανικό εκχύλισμα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 31α, υπάρχει υπόνοια για την παρουσία της αφλατοξίνης B1 που εμφανίζει κορυφή σε χρόνο 5,2 min. Με τη προσθήκη του πρότυπου διαλύματος των τεσσάρων αφλατοξινών στο εκχύλισμα (Σχήμα 31β), διαπιστώθηκε ότι αν και η κορυφή ενισχύεται δε πρόκειται για την τοξίνη αυτή, καθώς διαφέρει η αναλογία των ιόντων σε σχέση με το πρότυπο διάλυμα. Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι οι μη ολοκληρωμένες κορυφές δεν είναι αφλατοξίνες αφού κατά τον έλεγχο των ιόντων δεν υπάρχει σωστή αναλογία αυτών.

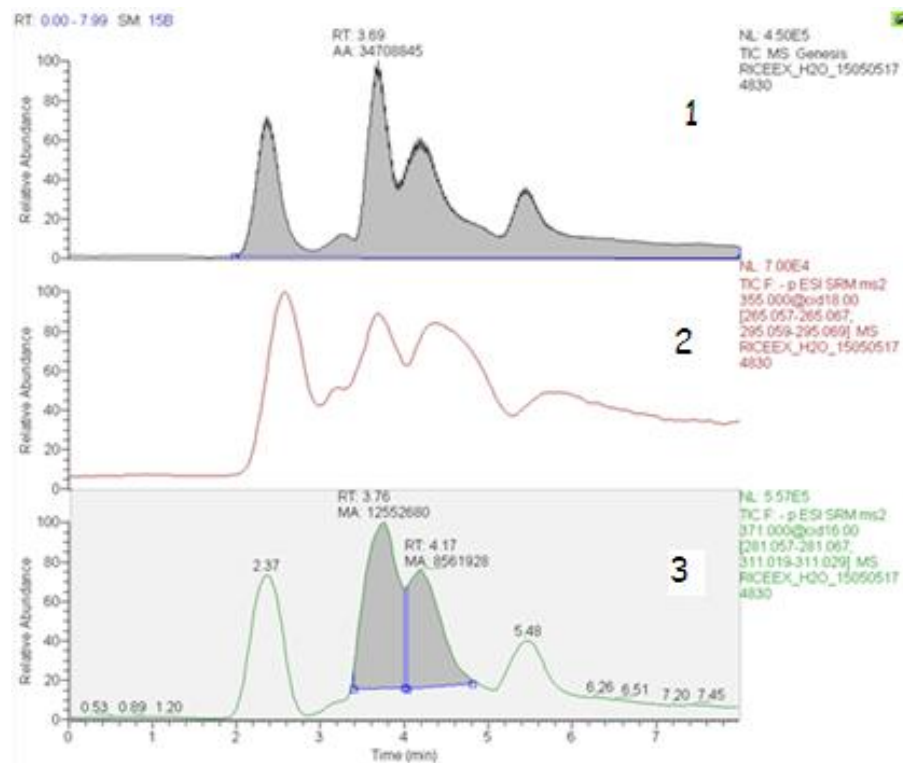
Έπειτα, πραγματοποιήθηκε υδατική εκχύλιση του υποστρώματος ρυζιού καθώς και απομόνωσής της με στήλες ανοσοσυγγένειας για καλύτερα αποτελέσματα. Παρατηρώντας το χρωμα-τογράφημα (Σχήμα 32) υπάρχει υπόνοια για την παρουσία της NIV στα 3,76 ή 4,17 min. Ωστόσο, καθώς το εκχύλισμα με νερό διέρχεται από τη στήλη ανοσοσυγγένειας παρουσιάζεται μικρότερη επίδραση από το υπόστρωμα και οι κορυφές εξαλείφονται (Σχήμα 33α). Με προσθήκη πρότυπου διαλύματος των τοξινών DON/NIV εμφανίζονται οι αντίστοιχες κορυφές στους αναμενόμενους χρόνους (Σχήμα 33β).



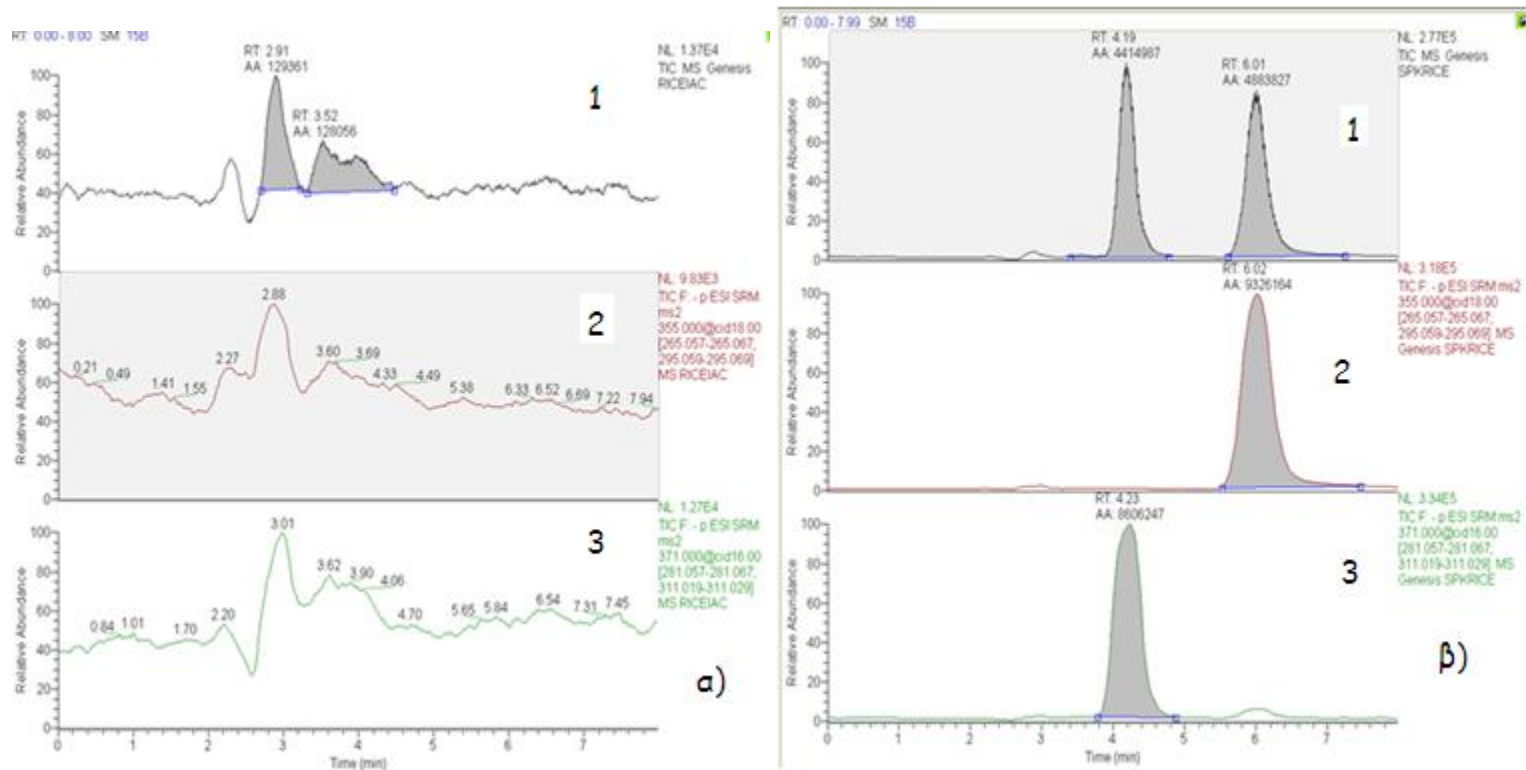
Σχήμα 30: α) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα ρύζι: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης ZEA. β) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα ρύζι με προσθήκη πρότυπου διαλύματος τοξίνης ZEA (100 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης ZEA.



Σχήμα 31: α) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα ρύζι: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2. β) Χρωματογράφημα οργανικού εκχυλίσματος της καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum* F3 με πηγή άνθρακα ρύζι με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 (5 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B1, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης B2, 4) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G1, 5) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης G2.



Σχήμα 32: Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα ρύζι: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV



Σχήμα 33: α) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα ρύζι με μέθοδο DON/NIV (IAC): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV. β) Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος καλλιέργειας του μύκητα *F.oxysporum F3* με πηγή άνθρακα σιτάρι με μέθοδο DON/NIV (IAC) με προσθήκη πρότυπου διαλύματος μίγματος DON/NIV (1000 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης DON, 3) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της τοξίνης NIV

Συμπερασματικά, η μελέτη της παραγωγής τοξινών σε καλλιέργειες του μύκητα *F. oxysporum* F3 που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι και κύμινο οδήγησε σε αρνητικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως στους 29 °C, για χρόνο παραμονής 30 ημέρες, απουσία φωτός, ο μύκητας *F. oxysporum* F3 δεν παράγει αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2, ούτε DON, NIV και ZEA. Η μόνη τοξίνη που πιθανώς να παράγεται είναι το φουσαρικό οξύ στις καλλιέργειες του σιταριού, κριθαριού, καλαμποκιού, και κύμινου, ενώ μικρή ποσότητα εμφανίζεται και στο κριθάρι και στο κύμινο πριν τον εμβολιασμό με το μύκητα. Ωστόσο, λόγω απουσίας πρότυπου διαλύματος φουσαρικού οξέος δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων.

Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι τοξίνες παράγονται ιδιαίτερα από το μύκητα *F. graminearum* υπό αυτές τις συνθήκες. Συγκεκριμένα, σε *in vitro* καλλιέργειες ρυζιού στην Κένυα διαπιστώθηκε πως ορισμένα είδη του *Fusarium* παράγουν μυκοτοξίνες (τριχοθηκίνες: T-2, HT-2, διακετοξυσκιρπενόλη, δεοξυνιβαλενόλη, νιβαλενόλη, και την μυκοτοξίνη ζεαραλενόλη). Ωστόσο, από την έρευνα είναι φανερό πως δεν παράγουν όλα τα είδη μυκοτοξίνες δεδομένου ότι οι *F. roae* και *F. chlamydosporum* υπό αυτές τις συνθήκες δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα. Ο μύκητας *F. graminearum* παράγει δεοξυνι-βαλενόλη (DON) και ζεαραλενόλη (ZEA) ενώ κάποια είδη του *Fusarium* παράγουν μόνο την τοξίνη δεοξυνιβαλενόλη. Άρα δεν παράγουν όλα τα είδη του μύκητα τοξίνες στους 29 °C, για χρόνο παραμονής 30 ημέρες, απουσία φωτός [75]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί πως αφλατοξίνες παράγονται τόσο από διάφορα είδη *Aspergillus* όσο και από ορισμένα είδη *Penicillium*. Ο *A. flavus* είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος μύκητας, δρά στα υπέργεια μέρη των φυτών (φύλλα, άνθη) και παράγει μόνο τις αφλατοξίνες B [40]. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος της μόλυνσης από αφλατοξίνες είναι λόγω της ευρείας διάδοσης του *A. flavus* [47]. Ο *F. oxysporum* δεν έχει κατηγορηθεί για παραγωγή αφλατοξινών στις καλλιέργειες του.

3.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ M1 ΑΠΟ ΓΑΛΑ

Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυττάρωμα Neubauer

Για να είναι εφικτή η μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, μικρή ποσότητα της καλλιέργειας του *S.cerevisiae* αραιώθηκε έως 1:150 με απιονισμένο νερό. Τα αποτελέσματα της μέτρησης παρατίθενται στο Παράρτημα 3.

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να γίνει ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων. Είναι γνωστό πως η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα/mL) είναι η μέτρηση στο ένα από τα κύρια τετράγωνα $\times 10^4$. Συνεπώς τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

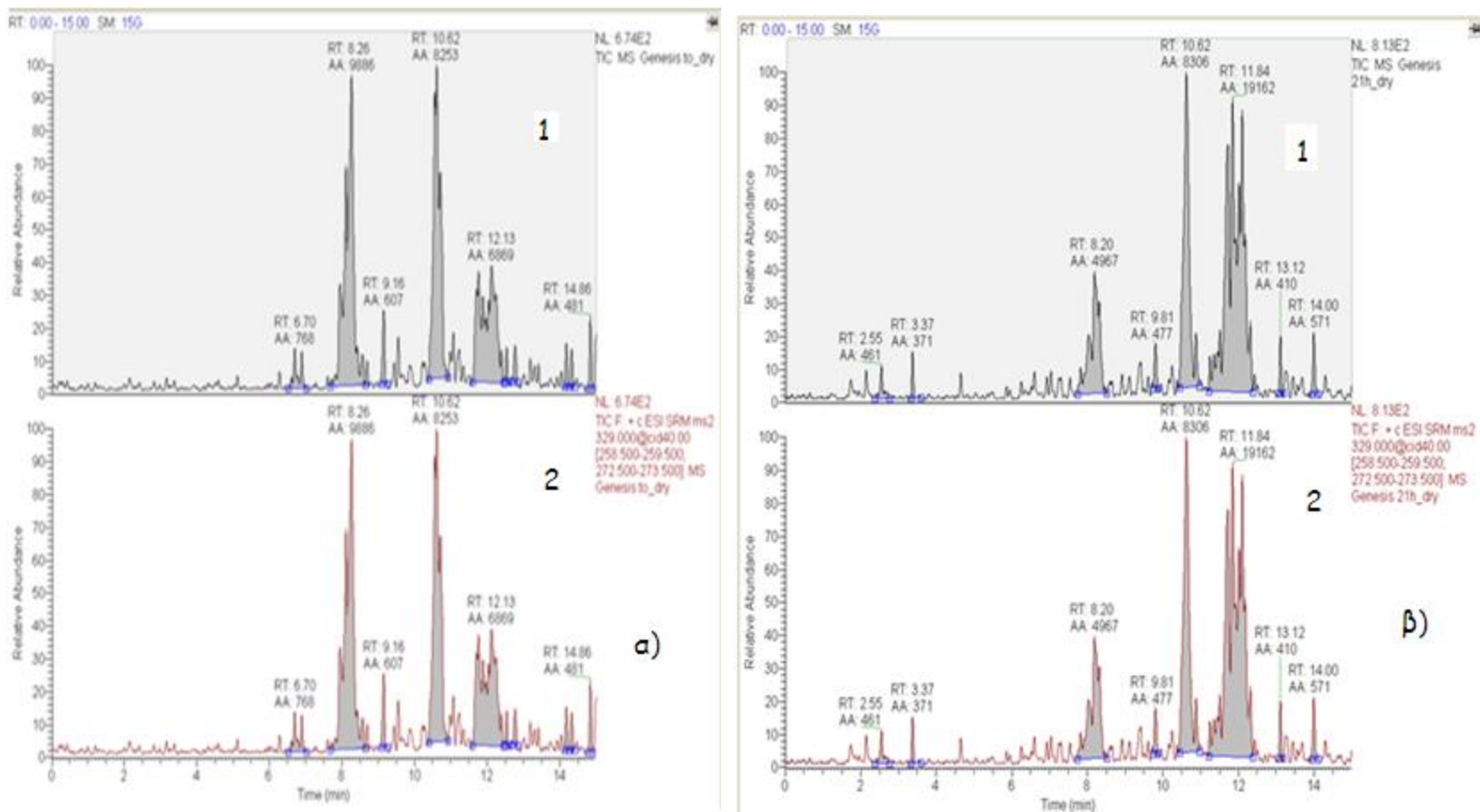
Πίνακας 15: Αποτελέσματα μέτρησης κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Αραίωση	Αριθμός κυττάρων/mL καλλιέργειας
1:150	$1,6 \times 10^{10}$

Αποτελέσματα LC-MS/MS για την απομάκρυνση της αφλατοξίνης M1 από γάλα

Για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1 χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μαζών σε θετικό ιονισμό.

Έγινε δοκιμή απομάκρυνσης της τοξίνης με ξηρή ζύμη (8×10^{10} κύτταρα/ mL) σε 10 mL γάλακτος. Διαπιστώθηκε πως έπειτα από 21 h έχει απομακρυνθεί το 49,75 % της τοξίνης. Άρα επιτυγχάνεται απομάκρυνση της αφάτοξίνης M1 με χρήση ζύμης. Ακολουθούν τα χρωματογραφήματα LC-MS/MS.



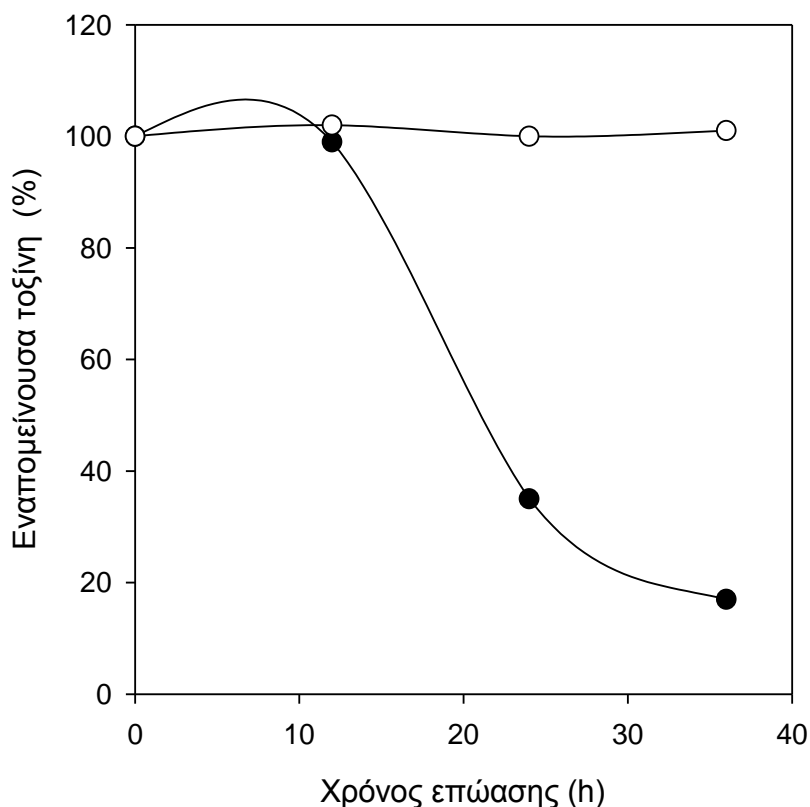
Σχήμα 34: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t₀: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t₂₁: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1.

Σε χρόνο t_0 θεωρούμε πως στο διάλυμα του γάλακτος υπάρχει η αρχική ποσότητα της τοξίνης που προστέθηκε αρχικά στην κωνική φιάλη.

Για τη μελέτη της χρονικής μεταβολής της εναπομείνουσας αφλατοξίνης M1, με ολοκλήρωση της κορυφής σε χρόνο 8,2 min περίπου, υπολογίζεται το εμβαδόν της κορυφής και κατ'επέκταση η συγκέντρωση της τοξίνης με βάση τις κορυφές σε χρόνο 0 min. Η χρονική μεταβολή της τοξίνης μελετάται για συγκέντρωση κυττάρων $1,6 \times 10^{10}$ κύτταρα/mL και για συγκέντρωση τοξίνης 0,5 $\mu\text{g/L}$. Δίνεται ο πίνακας των αποτελεσμάτων αλλά και το αντίστοιχο διάγραμμα.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα χρονικής μεταβολής της εναπομείνουσας αφλατοξίνης M1

t (h)	Μέση τιμή ποσοστού τοξίνης για δείγματα με κύτταρα (%)	Μέση τιμή ποσοστού τοξίνης για δείγματα χωρίς κύτταρα (%)
0	100	100
12	107	102
36	17	101



Διάγραμμα 1: Ποσοστό τοξίνης στο γάλα συναρτήσει του χρόνου επώασης (●) παρουσία κυττάρων ζύμης και (○) απουσία κυττάρων ζύμης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαπιστώνεται πως για σταθερή συγκέντρωση κυττάρων και τοξίνης, η απομάκρυνση είναι σχεδόν μηδενική τις πρώτες 12 h. Άρα, η

διαδικασία παρουσιάζει χρόνο υστέρησης 12 h. Ακολουθεί βαθμιαία μείωση της τοξίνης από 12 h έως 24 h, ενώ από 24 h έως 36 h η κλίση, άρα και η απομάκρυνση μειώνεται. Η καμπύλη απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1 από το γάλα είναι σιγμοειδούς μορφής. Συνεπώς, ταχύτερη απομάκρυνση επιτυγχάνεται από 12 h έως 24 h. Εξετάζοντας το διάγραμμα 1 καθίσταται προφανές ότι απουσία κυττάρων ζύμης η συγκέντρωση της τοξίνης παραμένει σταθερή.

Από τα αποτελέσματα της χρονικής μεταβολής της εναπομείνουσας τοξίνης είναι φανερό ότι έως και το πέρας των 12 h η αντίδραση πραγματοποιείται πολύ αργά.. Ωστόσο, κατά την εκχύλιση ενδέχεται να μην ανακτηθεί ολόκληρη η ποσότητα της τοξίνης, για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται δύο επαναλήψεις της διαδικασίας.

Σε χρόνο t_0 το εμβαδόν της επιφάνειας της κορυφής της αφλατοξίνης M1 είναι σταθερό για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων και εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση της τοξίνης. Οι τιμές αναγράφονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17: Επιφάνεια κορυφής της αφλατοξίνης M1 σε χρόνο t_0

t_0	Επιφάνεια κορυφής
0,25 (μg/L)	7500
0,5 (μg/L)	14000
0,75 (μg/L)	22500

Ακολουθούν τα αποτελέσματα για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων και τοξίνης για όλα τα δείγματα που λαμβάνονται έπειτα από 24 h.

Πίνακας 18: Μέση τιμή επιφάνειας κορυφής για κάθε περίπτωση σε t_{24}

t_{24}	$1,6 \times 10^9$ κύτταρα/ mL γάλακτος	$1,6 \times 10^{10}$ κύτταρα/ mL γάλακτος	$1,6 \times 10^{11}$ κύτταρα/ mL γάλακτος	χωρίς κύτταρα
0,25 (μg/L)	2625	1747	1443	4341
0,5 (μg/L)	4934,5	5443,5	4267	9517
0,75 (μg/L)	5185,5	5340,5	3844,5	16482,5

Από τα παραπάνω υπολογίζεται το ποσοστό της αφλατοξίνης M1 στο γάλα σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{Ποσοστό (\%)} \text{ αφλατοξίνης M1 στο γάλα} = \frac{\text{Επιφάνεια της κορυφής σε χρόνο } t_{24}}{\text{Επιφάνεια της κορυφής σε χρόνο } t_0} \times 100 \%$$

καθώς και το ποσοστό απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1 από γάλα σύμφωνα με τη σχέση:

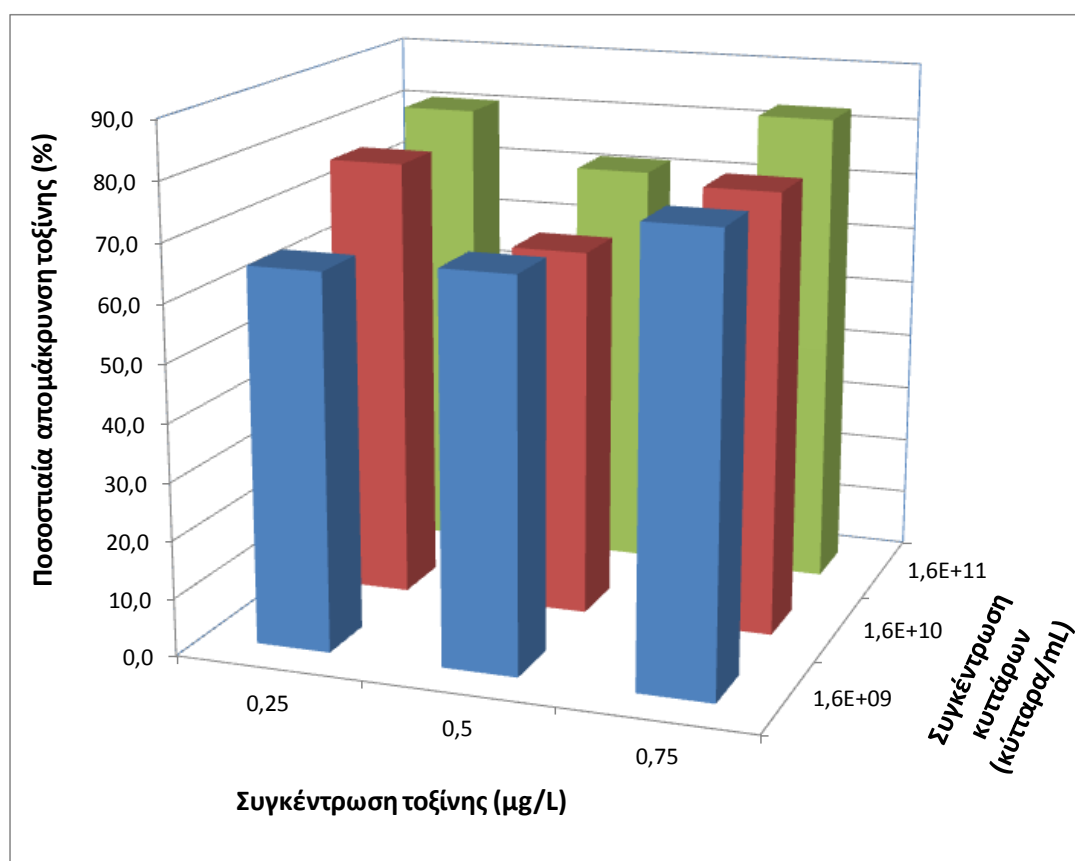
Ποσοστό (%) απομάκρυνσης αφλατοξίνης M1 από γάλα=

$$\left(1 - \frac{\text{Επιφάνεια της κορυφής σε χρόνο } t_{24}}{\text{Επιφάνεια της κορυφής σε χρόνο } t_0}\right) \times 100 \%$$

και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 21 και στο διαγράμμα 2.

Πίνακας 19: Ποσοστό απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1 από το γάλα

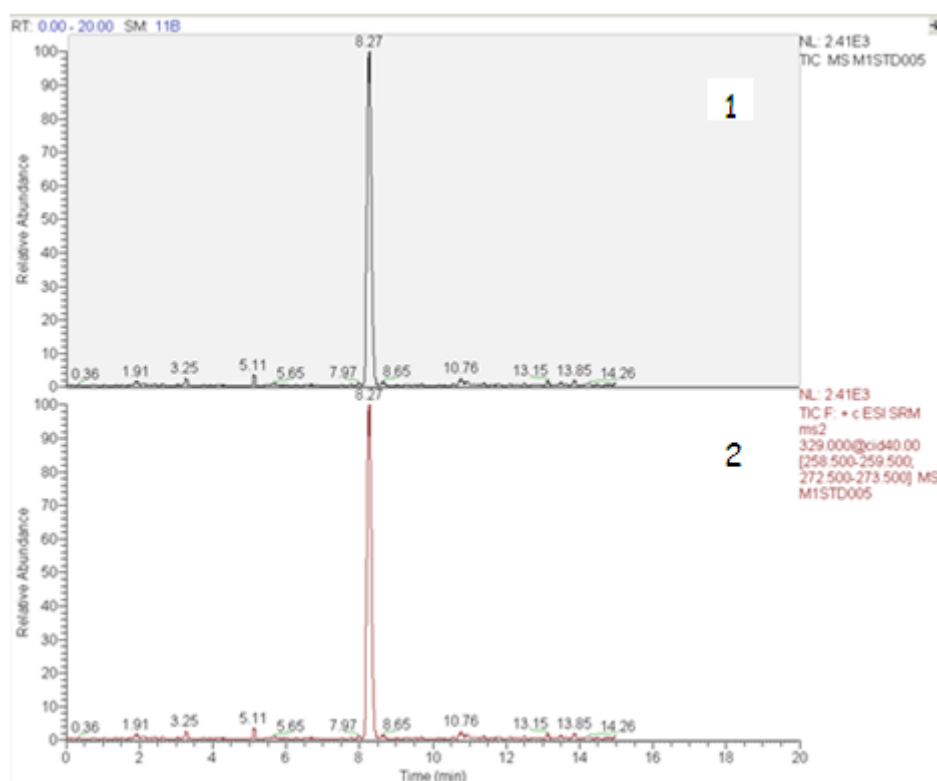
t_{24}	$1,6 \times 10^9$ κύτταρα/ mL γάλακτος	$1,6 \times 10^{10}$ κύτταρα/ mL γάλακτος	$1,6 \times 10^{11}$ κύτταρα/ mL γάλακτος
0,25 (μg/L)	65,00	76,71	80,76
0,5 (μg/L)	67,10	63,71	71,55
0,75 (μg/L)	76,95	76,26	82,91



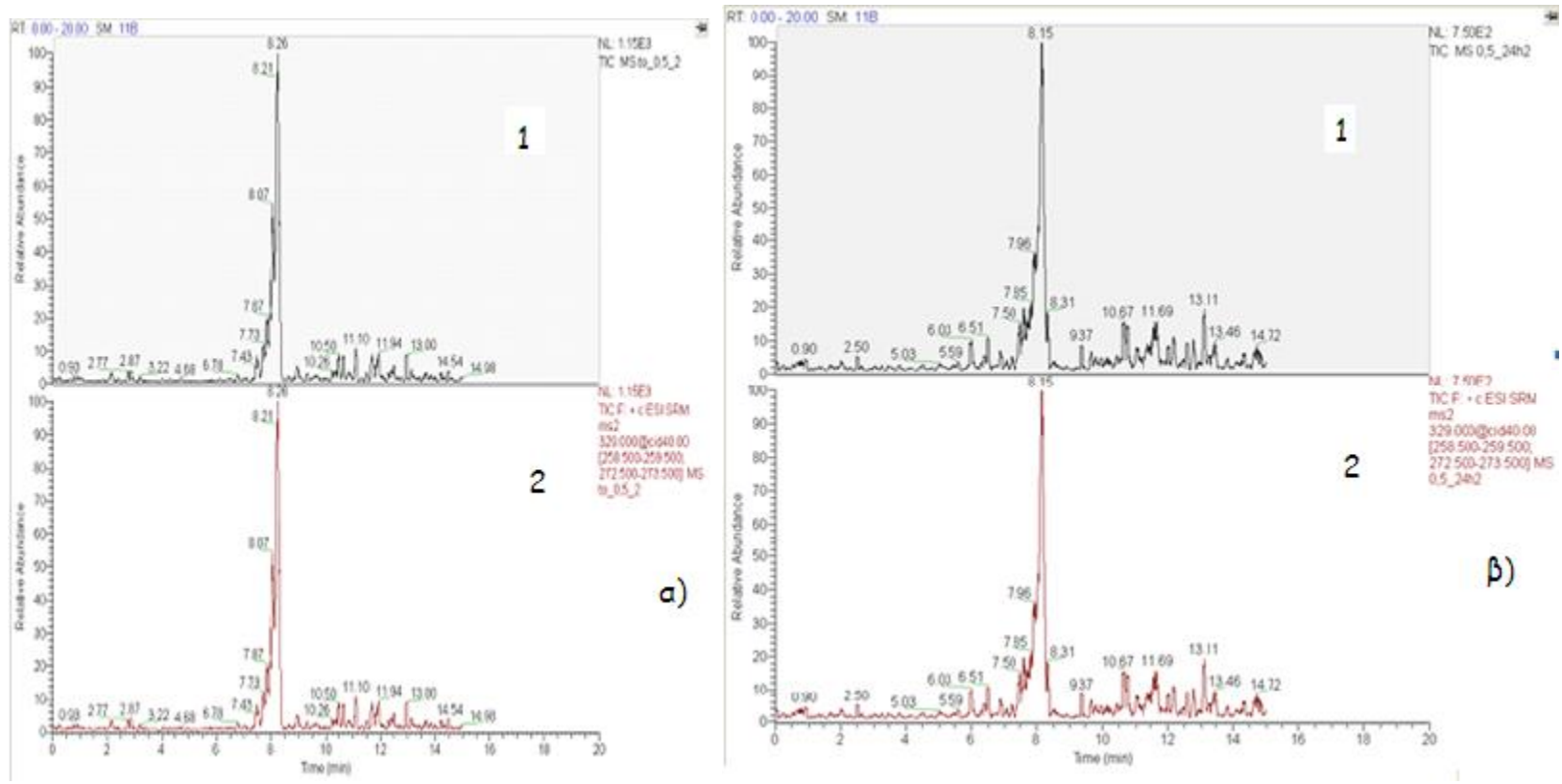
Διάγραμμα 2. Ποσοστιαία απομάκρυνση τοξίνης από το γάλα για διάφορες συγκεντρώσεις κυττάρων και τοξίνης.

Με βάση τα αποτελέσματα, διαπιστώνεται πως όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των κυττάρων, αυξάνεται και το ποσοστό απομάκρυνσης της τοξίνης στο χρόνο αυτό. Επιπλέον, παρατηρείται ότι σε κάθε περίπτωση επιτυγχάνεται απομάκρυνση της αφλατοξίνης από το γάλα σε ποσοστό τουλάχιστον 65 %, ενώ η μεγαλύτερη δυνατή τιμή είναι 82,91 %, που παρουσιάζεται για τις μέγιστες συγκεντρώσεις κυττάρων και τοξίνης.

Πιο κάτω παρατίθενται ενδεικτικά χρωματογραφήματα που περιγράφουν τη διαδικασία απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1, ενώ αναλυτικά τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2.



Σχήμα 35: Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (πρότυπο διάλυμα 0,5 µg/L): 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1.



Σχήμα 36: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t₀: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t₂₄: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1.

Συμπερασματικά, αυξανόμενης της συγκέντρωσης των κυττάρων αυξάνεται το ποσοστό απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1, καθώς είναι διαθέσιμη μεγαλύτερη επιφάνεια κυτταρικού τοιχώματος για την πρόσδεση της τοξίνης. Όσον αφορά τη συγκέντρωση της τοξίνης, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι για την ίδια ποσότητα κυττάρων, παρουσιάζεται σταδιακή αύξηση του ποσοστού απομάκρυνσης της τοξίνης, όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωσή της στο γάλα.

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα νεκρά κύτταρα της ζύμης, όπως και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, έχουν την ικανότητα να προσδένουν στην επιφάνειά τους την αφλατοξίνη M1, λόγω της ανάπτυξης ενός φυσικού δεσμού με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, που αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες και πεπτιδογλυκάνες. Ωστόσο, τα συστατικά αυτά του κυτταρικού τοιχώματος επηρεάζονται από τη θερμική επεξεργασία, που οδηγεί σε μετουσίωση των πρωτεϊνών. Θεωρείται ότι αυτές οι διαταραχές εξακολουθούν να επιτρέπουν στην αφλατοξίνη να συνδέεται με το κυτταρικό τοίχωμα καθώς και με τα συστατικά της πλασματικής μεμβράνης, που δεν ήταν διαθέσιμα όταν το κυτταρικό τοίχωμα παραμένει άθικτο. Έτσι, η ακεραιότητα των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος είναι σημαντική για τη διαδικασία πρόσδεσης της αφλατοξίνης M1 σε αυτό [56].

4. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η μελέτη της παραγωγής τοξινών σε καλλιέργειες του μύκητα *F. oxysporum* F3, που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, καλαμπόκι και κύμινο, οδήγησε στα εξής αποτελέσματα: 1) στους 29 °C, για χρόνο παραμονής 30 ημέρες, απουσία φωτός, ο μύκητας *F. oxysporum* F3 δεν παράγει αφλατοξίνες B1, B2, G1, G2, ούτε DON, NIV και ZEA. 2) Η μόνη τοξίνη που πιθανώς να παράγεται είναι το φουσαρικό οξύ στις καλλιέργειες του σιταριού, κριθαριού, καλαμποκιού, και κύμινου, ενώ μικρή ποσότητα εμφανίζεται και στο κριθάρι και στο κύμινο πριν τον εμβολιασμό με το μύκητα. Ωστόσο, λόγω έλλειψης πρότυπου διαλύματος φουσαρικού οξέος δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων.

Έχει δειχθεί, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, πως μυκοτοξίνες παράγονται ιδιαίτερα από το μύκητα *F. graminearum* υπό αυτές τις συνθήκες. Ειδικότερα, σε *in vitro* καλλιέργειες ρυζιού στην Κένυα διαπιστώθηκε, πως ορισμένα είδη του *Fusarium* παράγουν μυκοτοξίνες (τριχοθηκίνες: T-2, HT-2, διακετοξυσκιρπενόλη, δεοξυνιβαλενόλη, νιβαλενόλη, και την μυκοτοξίνη ζεαραλενόλη). Η έρευνα επίσης έδειξε ότι οι *F. roae* και *F. chlamydosporum* υπό αυτές τις συνθήκες δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα. Άρα δεν παράγουν όλα τα είδη του μύκητα τοξίνες στους 29 °C, για χρόνο παραμονής 30 ημέρες, απουσία φωτός [75]. Επίσης, έχει διαπιστωθεί πως αφλατοξίνες παράγονται τόσο από διάφορα είδη *Aspergillus* όσο και από ορισμένα είδη *Penicillium*. Ο *A. flavus* είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος μύκητας, δρά στα υπέργεια μέρη των φυτών (φύλλα, άνθη) και παράγει μόνο τις αφλατοξίνες B [40]. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος της μόλυνσης από αφλατοξίνες είναι λόγω της ευρείας διάδοσης του *A. flavus* [47]. Ο *F. oxysporum* δεν έχει κατηγορηθεί για παραγωγή αφλατοξινών στις καλλιέργειες του.

Με βάση τα παραπάνω, ο μύκητας *F. oxysporum* F3, που μελετήθηκε, ανήκει στα στελέχη του γένους *Fusarium* τα οποία, στις υπο εξέταση συνθήκες, δεν παράγουν μυκοτοξίνες στα τρόφιμα.

Κατά τη μελέτη της πρόσδεσης της αφλατοξίνης M1 σε κύτταρα *S.cerevisiae* στο γαλά, διαπιστώθηκε πως η συγκέντρωση των κυττάρων και της τοξίνης επηρεάζουν το ποσοστό απομάκρυνσης, που σε κάθε περίπτωση ξεπερνά το 65 %. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης των κυττάρων αυξάνεται το ποσοστό απομάκρυνσης της αφλατοξίνης M1, καθώς είναι διαθέσιμη μεγαλύτερη επιφάνεια κυτταρικού τοιχώματος για την πρόσδεση της τοξίνης. Αναφορικά με την επίδραση της συγκέντρωσης της τοξίνης στη διαδικασία, μεταβολή της συγκέντρωσης της, από την τιμή 0,5 μg/L, επιφέρει αύξηση του ποσοστού απομάκρυνσης, όταν η συγκέντρωση των κυττάρων διατηρείται σταθερή. Αντίθετα, μείωση της συγκέντρωσης των κυττάρων, θα το μειώσει.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, τα νεκρά κύτταρα της ζύμης, έχουν την ικανότητα να προσδένουν στην επιφάνεια τους την αφλατοξίνη M1, λόγω της ανάπτυξης ενός φυσικού δεσμού με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, που αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες και πεπτιδογλυκάνες. Ωστόσο, οι πολυσακχαρίτες και οι πεπτιδογλυκάνες του κυτταρικού τοιχώματος αναμένεται να επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμική επεξεργασία, που οδηγεί σε μετουσίωση των πρωτεϊνών, αυξάνοντας έτσι την υδρόφοβη φύση της επιφάνειάς τους. Θεωρείται ότι αυτές οι διαταραχές εξακολουθούν να επιτρέπουν στην αφλατοξίνη να συνδέεται με το κυτταρικό τοίχωμα καθώς και με τα συστατικά της πλασματικής μεμβράνης, που δεν ήταν διαθέσιμα, όταν το κυτταρικό τοίχωμα παρέμενε άθικτο. Έτσι, η ακεραιότητα των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος είναι σημαντική για τη διαδικασία πρόσδεσης της αφλατοξίνης M1 σε αυτό [56].

Άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάζουν την απομάκρυνση της αφλατοξίνης από το γάλα, εκτός της συγκέντρωσης των κυττάρων και της τοξίνης, είναι το pH και η θερμοκρασία επώασης [56]. Έτσι, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη διερεύνηση της επιρροής αυτών των μεταβλητών στην ικανότητα του *S. cerevisiae* ή των οξυγαλακτικών βακτηρίων LAB να δεσμεύουν την αφλατοξίνη M1 στο γάλα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dr Simon Edwards Harper Adams, Mycotoxins and recent legislation, University College Newport, Shropshire
2. Edwards, S. G., Imathiu, S. M., Ray, R. V., Back, M., & Hare, M. C. (2012). Molecular studies to identify the *Fusarium* species responsible for HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oats. *International journal of food microbiology*, 156(2), 168-175.
3. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, 4^η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, 498-500
4. N. Magan and M. Olsen, Mycotoxins in food Detection and control, T. Kuiper-Goodman, Risk assessment and risk management of mycotoxins in food, Bureau of Chemical Safety, Health Products and Food Branch, Health Canada, 12-15
5. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *Am J Clin Nutr* 80:1106-1122
6. Saito, M., Enomoto, M., Tatsuno, T., & Uruguchi, K. (1971). Yellowed rice toxins: luteoskyrin and related compounds, chlorine-containing compounds, and citrinin. *Ajl, Samuel J. Microb Toxins*, 299–380
7. Carlton, W. W., & Tuite, J. (1977). Metabolites of *Penicillium viridicatum* toxicology [Contaminants in feed, food]. In *Conference on Mycotoxins in Human and Animal Health, College Park, Md.(USA), 4-8 Oct 1976*. Pathotox Publishers, 525–555..
8. Hanika, C., and W. W. Carlton. (1994). Toxicology and pathology of citrinin., *In G. C. Llewellyn, W. V. Dashek, and C. E. O’Rear (ed.), Biodeterioration research, vol. 4. Plenum Press, New York, N.Y., 41–63.*
9. Krogh, P. (1976). Mycotoxic nephropathy. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 20: 147–170.
10. Sansing, G. A., E. B. Lillehoj, and R. W. Detroy. (1976). Synergistic toxic effect of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice. *Toxicon* 14:213–220.
11. Dutton, M. F. (1996). Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol. Ther.* 70:137–161.
12. Marasas, W. F. O. (1995). Fumonisins: their implications for human and animal health. *Nat. Toxins* 3:193–198.
13. Merrill, A. H. Jr, M. C. Sullards, E. Wang, K. A. Voss, and R. T. Riley. (2001). Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* 109(Suppl. 2):283–289.

- 14 Wang, E., W. P. Norred C. W. Bacon, R. T. Riley, and A. H. Merrill, Jr. (1991). «Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonsins». J. Biol. Chem. 266:14486–14490.
- 15 Marasas, W. F. O., T. S. Kellerman, W. C. A. Gelderblom, J. A. W. Coetzer, P. G. Thiel, and J. J. Van Der Lugt. (1988). Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J. Vet. Res. 55:197–203.
- 16 Bucci, T., D. K. Hansen and J. B. LaBorde. (1996). Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B1. Nat. Toxins 4:51–52.
- 17 Harrison, L. R., B. M. Colvin, J. T. Greene, L. E. Newman, and J. R. Cole, Jr. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Investig. 2:217–221.
- 18 Pozzi, C. R., B. Correa, J. G. Xavier, G. M. Direito, R. B. Orsi, and S. V. Matarazzo. (2000). Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. Mycopathologia 151:21–27.
- 19 Sydenham, E. W., G. S. Shephard, P. G. Thiel, W. F. O. Marasas, and S. Stockenstrom. (1991). Fumonsin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. J. Agric. Food Chem. 39:2014–2018.
- 20 Peraica, M., B. Radic, A. Lucic, and M. Pavlovic. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. Bull. W.H.O. 77:754–766.
- 21 Bhat, R. V., P. H. Shetty, R. P. Amruth, and R. V. Sudershan. (1997). A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. J. Clin. Toxicol. 35:249–255.
- 22 Rheeder, J. P., W. F. Marasas, and H. F. Vismer. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol. 68:2102–2105.
- 23 Rahimtula, A. D., J. C. Bereziat, V. Bussacchini-Griot, and H. Bartsch. (1988). «Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity.» Biochem. Pharmacol. 37:4469–4475.
- 24 Fink-Gremmels, J. (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. Vet. Q. 21:115–120.
- 25 Krogh, P. (1987). Ochratoxin in foods., In P. Krogh (ed.), Mycotoxins in food. Academic Press, London, United Kingdom., p. 97–110
- 26 Burns, R. P., and P. Dwivedi. (1986). The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. Part II. Pathology and immunology. World Poultry Sci. 42:48–62.
- 27 Hamilton, P. B., W. E. Huff, J. R. Harris, and R. D. Wyatt. (1982). Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. Poult. Sci. 61:1832–1836.
- 28 Sweeney, M. J., S. White, and A. D. W. Dobson. (2000). Mycotoxins in agriculture and food safety. Irish J. Agric. Food. Res. 39:235–244.

- 29 Jelinek, C. P. A., E. Pohland, and G. E. Wood. (1989). Worldwide occurrence of mycotoxins in food and feeds, an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72:223–247.
- 30 Van Egmond, H. P. (1991). Worldwide regulations for ochratoxin A,. *In* M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, and H. Bartsch (ed.), *Mycotoxins, endemic nephropathy, and urinary tract tumors*. Publication no. 115. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 331–336.
- 31 Beardall, J. M., and J. D. Miller. (1994). Disease in humans with mycotoxins as possible causes,. *In* J. D. Miller and H. L. Trenholm (ed.), *Mycotoxins in grains. Compounds other than aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, Minn., 487–539
- 32 Oatley J T, Rarick M D, Ji G E, Linz J E (2000). Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria *in vitro*. *J Food Prot.*;63:1133–1136
- 33 Bruna Leonel Gonçalves, Roice Eliana Rosim, Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, Carlos Humberto Corassin (2015), The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* Based products to bind aflatoxin B₁ ,*Food control* 47, 298-300
- 34 Heidy Abo El Yazeed; Atef Hassan; Reda E.A. Moghaieb, Mai Hamed and Mohamed Refai, (2011): Molecular Detection of Fumonisin-producing *Fusarium* Species in Animal Feeds Using Polymerase Chain Reaction (PCR), , *Journal of Applied Sciences Research*,7(4): 420-427
- 35 Krugner T L, Carvalho PGT and Galli F (1970). Nota prévia sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. em *Pinus elliottii* Engelm. *O Solo* 62: 45-48.
- 36 H.Benaouali, N. Hamini-Kadar, A. Bouras, S.L. Benichou, M. Kihal, J.-E. Henni ,(2014) Isolation, pathogenicity test and physicochemical studies of *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici*. *Advances in Environmental Biology*, 8(10),. 36-49
- 37 CHESTER J. MIROCHA, HAMED K. ABBAS,' THOR KOMMEDAHL,' AND BRUCE B. JARVIS (1988), *Mycotoxin Production by Fusarium oxysporum and Fusarium sporotrichioides Isolated from Baccharis spp. from Brazilt* , University of Maryland, College Park, Ma,-vlandid 20742, 254-255
- 38 M. Lazarotto, P.M. Milanesi, M.F.B. Muniz, L.R.S. Reiniger, R. Beltrame, R. Harakava and E. Blume (2014). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp pathogenic to pecan tree in Brazil, *Genetics and Molecular Research* 13 (4): 9390-9402
- 39 Bottalico A (1998). *Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe*. *J. Plant Pathol.* 80: 85-103.
- 40 Jens Laurids Sørensen, (2009) Preharvest fungi and their mycotoxins in Danish maize Ph.D. thesis Technical University of Denmark Department of System Biology Center for Microbial Technology .

- 41 Robert W. Wannemacher, JR., PH.D.; and Stanley L. Wiener, M.D. TRICHOTHECENE MYCOTOXINS, ch.34
- 42 Z. Han & E. K. Tangni & B. Huybrechts & F. Munaut & J. Scauflaire & A. Wu & A. Callebaut, (2014): Screening survey of co-production of fusaric acid, fusarin C, and fumonisins B1, B2 and B3 by *Fusarium* strains grown in maize grains, *Mycotoxin Res* 30:231–240
- 43 Jens Laurids Sørensen , Teis Esben Sondergaard (2014): The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*, Department of Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering, Aalborg University, Sohngaardsholmsvej 49, DK-9000 Aalborg, Denmark, *International Journal of Food Microbiology* 170 55–60
- 44 N. Magan and M. Olsen, *Mycotoxins in food Detection and control*, CRC Press Boca Raton Boston New York Washington, DC Cambridge England, p. 416
- 45 Porter J K, Bacon C W, Wray E M and Hagler W M Jr (1995), Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats, *Nat. Toxins*, 3(2), 91–100
- 46 Paterson R R M and Rutherford M A (1991), A simplified technique for fusaric acid detection in *Fusarium* strains, *Mycopathologia*, 113(3), 171–3.
- 47 L. Zechmeister and al., *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* Vienna , S. Gibbons, London , N.H. Oberlies, Greensboro, NC, Y. Ye, Shanghai
- 48 EFSA (European Food Safety Authority) (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal* 446, 1-127.
- 49 Marta Herrera, Antonio Herrera and Agustín Ariño, AFLATOXINS IN FOOD AND FEED: CONTAMINATION EXPOSURE, TOXICOLOGY AND CONTROL, University of Zaragoza, Department of Animal Production and Food Science, Veterinary Faculty, Zaragoza, Spain
- 50 Biljana Skrbic. , Jelena Zivancev , Igor Antic , Michal Godula (2014), Levels of aflatoxin M1 in different types of milk collected in Serbia: Assessment of human and animal exposure., *Food control* 40, 113-119
- 51 Iain F, H Purchase and Brian Altenkirk, (1973), Collaborative study of the stability of aflatoxin M1 standards, National Research Institute for Nutritional Diseases, South Africa Medical Research Council, Private Bag X380, Pretoria, South Africa , p 1115-1118.
- 52 Robert Peterson and A. Ciegler, *Mycotoxins*. (1967), Note on a water-based aflatoxin standard. Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill 61604, 1201-1202.

- 53 *Saccharomyces cerevisiae* images provided by Carsten Kettner Wild type YCC588 protoplasts. [DIC image, 400X]
- 54 Carolyn A. Haskard, Hani S. El-Nezami, Pasi E. Kankaanpää, Seppo Salminen, and Jorma T. Ahokas (2001), Surface Binding of Aflatoxin B₁ by Lactic Acid Bacteria», *Appl Environ Microbiol*; 67(7): 3086–3091.
- 55 Oatley J T, Rarick M D, Ji G E, Linz J E.(2000) «Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria *in vitro*», *J Food Prot*; 63:1133–1136.
- 56 C.H. Corassin, F. Bovo, R.E. Rosim, C.A.F. Oliveira, (2013) Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk, *Food Control* 31 80-83.
- 57 Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonem, K., Salminen, S., & Ahokas, J (2000), Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal of Food Protection*, 63, 645-650.
- 58 Peltonem, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., & Salminen, S. (2001), Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 2152-2156.
- 59 Kabak, B., & Var, I. (2008), Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43, 617-624.
- 60 Hernandez-Mendoza, A., Guzman-de-Peña, D., & Garcia, H. S. (2009). Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 395-403.
- 61 Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salano, M. A., & Olivier, G. (2006) Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *Journal of Food Protection*, 70, 2148-2154.
- 62 Prathapkumar Halady Shetty* and Lene Jespersen (2006), *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology* 17, 48–55
- 63 Nout, M. J. R., & Motarjemi, Y. (1997). Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety, A joint FAO/WHO workshop. *Food Control*, 8, 221–226.
- 64 Scott, P. M. (1996). Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of AOAC International*, 79, 875–882.
- 65 Devegowda, G., Arvind, B. I. R., & Morton, M. G. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. *Proceedings of Australian poultry science symposium Sydney*, 103–106.
- 66 Karaman, M., Basmacioglu, H., Ortatagli, M., & Oguz, H. (2005). Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science*, 46, 394–400.

- 67 Baptista, A. S., Horii, J., Calori-Domingues, M. A., da Gloria, E. M., Salgado, J. M., & Vizioli, M. R. (2004). The capacity of mannoooligosaccharides thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 475–481.
- 68 Raju, M. V. L. N., & Devegowda, G. (2000). Influence of esterifiedglucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, 41, 640–650.
- 69 Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.-G., Bertin, G., Jeminet, G., et al. (2004a). Adsorption of zearalenone by b-Dglucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection*, 67, 1195–1200.
- 70 Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.-G., Bertin, G., Jeminet, G., et al. (2004b). Alkali extraction of b-D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3666–3673.
- 71 Freimund, S., Sauter, M., & Rys, P. (2003). Efficient adsorption of mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *Journal of Environmental Science and Health, Part B—Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, B38, 243–255.
- 72 Haskard, C., Binnion, C., & Ahokas, J. (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, 128, 39–49.
- 73 Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting - Oscar Bastidas , Cell Counting with Neubauer Chamber Basic Hemocytometer Usage
- 74 Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D., 1989. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*, *Enzym Microb Technol*, 11, 236-39
- 75 Kenneth Mbae, Kiiyukia C, GM Kenji, (2012) In vitro production of trichothecenes and zearalenone by fusarium isolates from equatorial barley (*hordeum vulgale* L.) grown in Kenya, *Ajfan Scholarly, peer Reviewed*, volume 12, no 5 ,.6490-6502.
- 76 ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 19ης Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα (Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)
- 77 COMMISSION REGULATION EC No 1881/2006 (Amended by 1126/2007, 105/2010, 165/2010, 594/2012, 1058/2012).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1

Επιτρεπτά όρια τοξινών στα τρόφιμα

Αναφέρονται ενδεικτικά τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα των μυκοτοξινών που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Αναλυτικά τα επίπεδα αυτά για κάθε κατηγορία τροφίμου περιγράφονται στον Κανονισμό 1881/2006 της Επιτροπής, όπως αυτός έχει τροποποιηθεί [76].

Απαγορεύσεις όσον αφορά τη χρήση, την ανάμειξη και την απομάκρυνση
Κάποιοι γενικές κανόνες που διέπουν την εφαρμογή της νομοθεσίας στη διακίνηση των τροφίμων είναι οι παρακάτω:

1. Τα τρόφιμα που δεν συμμορφώνονται προς τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα τα οποία παρατίθενται στο παράρτημα δεν χρησιμοποιούνται ως συστατικά τροφίμων.
2. Τα τρόφιμα που συμμορφώνονται προς τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα τα οποία παρατίθενται στο παράρτημα δεν αναμειγνύονται με τρόφιμα τα οποία υπερβαίνουν τα εν λόγω μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα.
3. Τα τρόφιμα που πρόκειται να υποβληθούν σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία προκειμένου να μειωθούν τα επίπεδα επιμόλυνσης δεν αναμειγνύονται με τρόφιμα που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή με τρόφιμα που προορίζονται για χρήση ως συστατικά τροφίμων.
4. Τα τρόφιμα που περιέχουν ουσίες που τα επιμολύνουν οι οποίες παρατίθενται στο τμήμα 2 του παραρτήματος (Μυκοτοξίνες) δεν υφίστανται χημικές κατεργασίες με σκοπό την απομάκρυνση των ουσιών αυτών.

Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια για ορισμένες μυκοτοξίνες δίνονται στο παρακάτω πίνακα [77]:

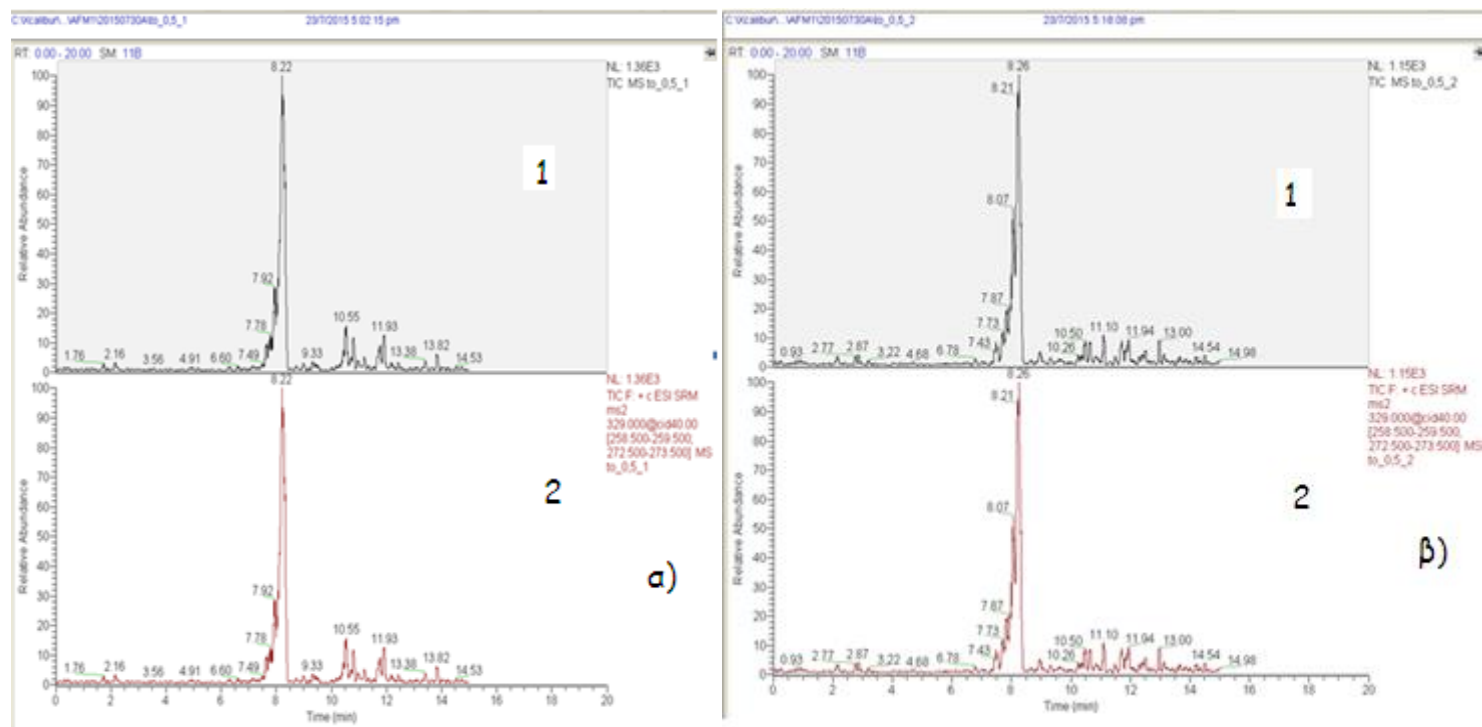
Προσμίξεις στα Τρόφιμα	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	
	B1	Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2
Ξηροί καρποί	5-12	10-15

Δημητριακά και προϊόντα τους	2-8	4-10
Ρύζι		
Για τη διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την ανθρώπινη κατανάλωση ή χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	5	10
Άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	2	4
Δημητριακά και προϊόντα τους	2-8	4-10
Μπαχαρικά <ul style="list-style-type: none"> • Είδη κόκκινου πιπεριού -<i>Capsicum</i> spp (τσίλι, σκόνη τσίλι, πιπέρι καγιέν, πάπρικα) • Είδη πιπεριών-<i>pipere</i> spp (άσπρο και μαύρο πιπέρι) • Μοσχοκάρυδο • Τζιτζερ • κουρκούμη 	5	10
Ελαιούχοι σπόροι μεταποιημένα προϊόντα τους, με εξαίρεση των λαχανικών ελαίων.	2	4
για περαιτέρω επεξεργασία	8	15
Βρεφικές τροφές και επεξεργασμένα δημητριακά για βρέφη και μικρά παιδιά και τα συστατικά που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή (ξηρά ύλη)	0,1	-
Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται για βρέφη	0,1	-
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ M1		
	M1 (µg/L)	
Γάλα και προϊόντα γάλακτος	0,05	
Βρεφικά παρασκευάσματα	0,025	
Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται για	0,025	

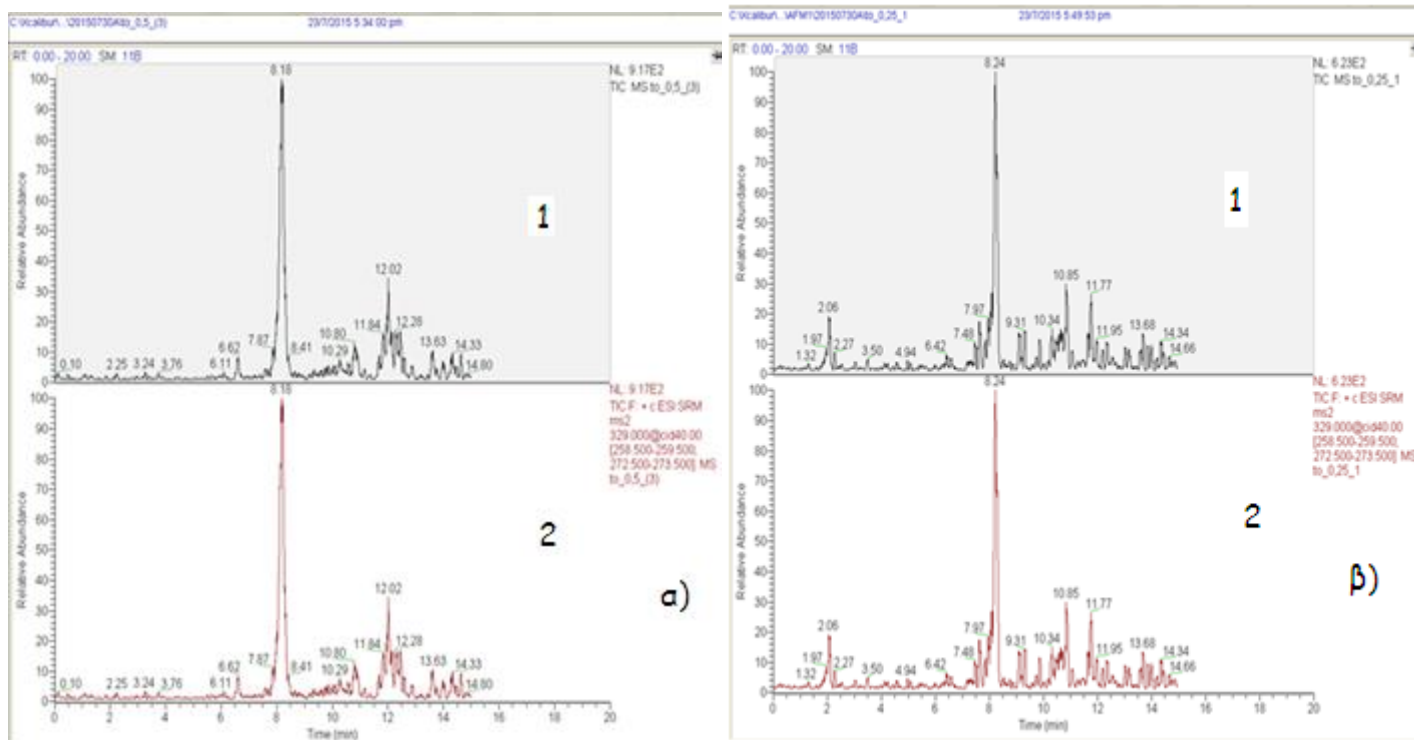
βρέφη		
ΟΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α		
Παιδικές τροφές και μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά για βρέφη και νεαρά παιδιά (ξηρά ύλη)		0,5
Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται για βρέφη (ξηρά ουσία, εκτός από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που πρέπει να ανασυσταθούν)		0,5
μπαχαρικά <ul style="list-style-type: none"> • Είδη πιπεριού-Piper spp (λευκού και μαύρου πιπεριού) • μοσχοκάρυδο • τζίντζερ • κουρκούμη 		15
Είδη κίρκινου πιπεριού-Capsicum spp (τσίλι, σκόνη τσίλι, πιπέρι καγιέν, πάπρικα) μέχρι 12.31.14 (από 01/01/15 θα μειωθεί σε 15 µg / kg).		30
Μείγματα μπαχαρικών που περιέχουν ένα από τα παραπάνω μπαχαρικά		15
ΤΡΙΧΟΘΗΚΙΝΕΣ		
ΔΕΟΞΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗ	Ανεπεξέργαστα δημητριακά	1250-1750
	Δημητριακά και προϊόντα τους που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο	500-750
	παιδικές τροφές	200
ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ (επίσης αναφέρεται ως ZEA,ZON,F2)		
μη επεξεργασμένα δημητριακά		100-350
Αραβόσιτος που προορίζεται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και προϊόντα δημητριακών		50-100
Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο για βρέφη και μικρά παιδιά		20
Άλλα μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά για βρέφη και μικρά παιδιά (με ξηρή βάση)		20

Παράρτημα 2

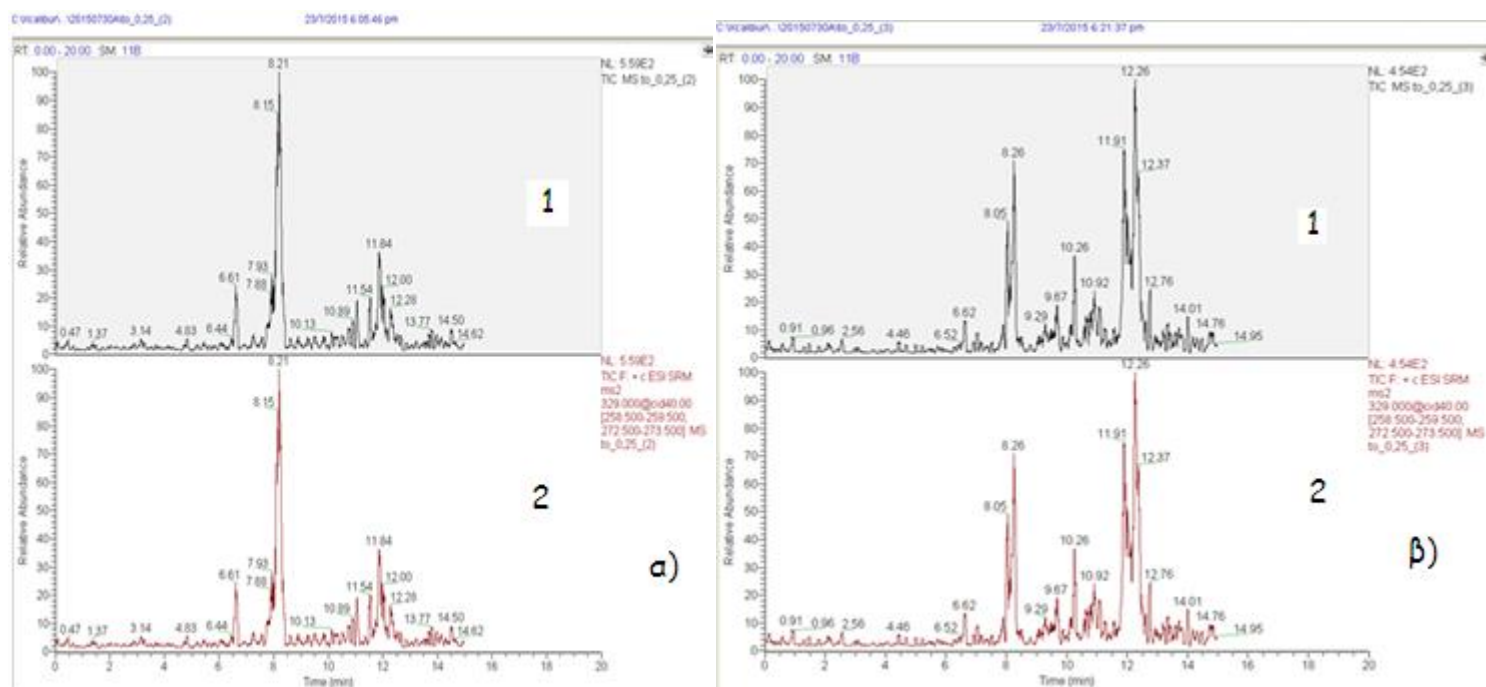
Χρωματογράφημα απομάκρυνσης αφλατοξίνης M1 από γάλα



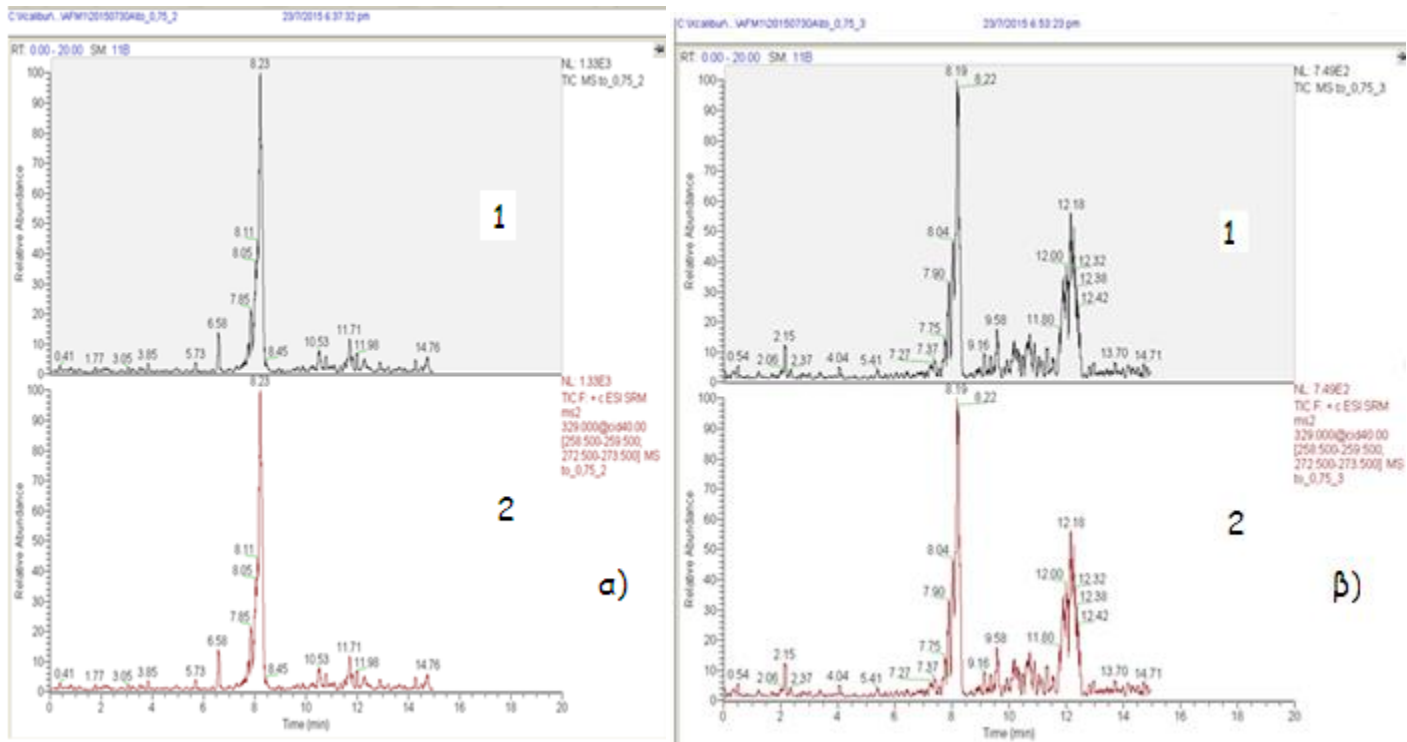
Σχήμα 37: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^9$ κυττάρων/mL γαλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γαλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



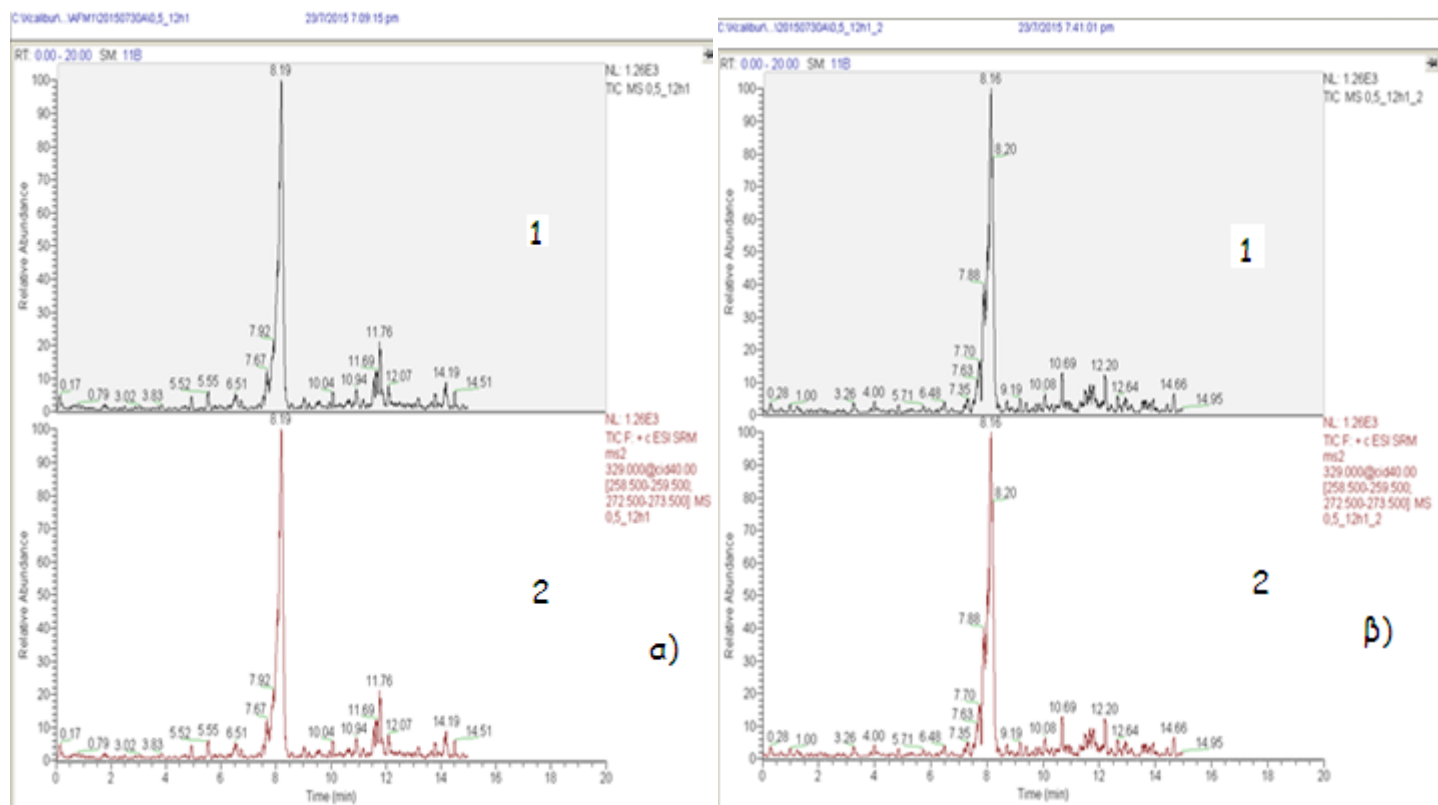
Σχήμα 38: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{11}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,25 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^9$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



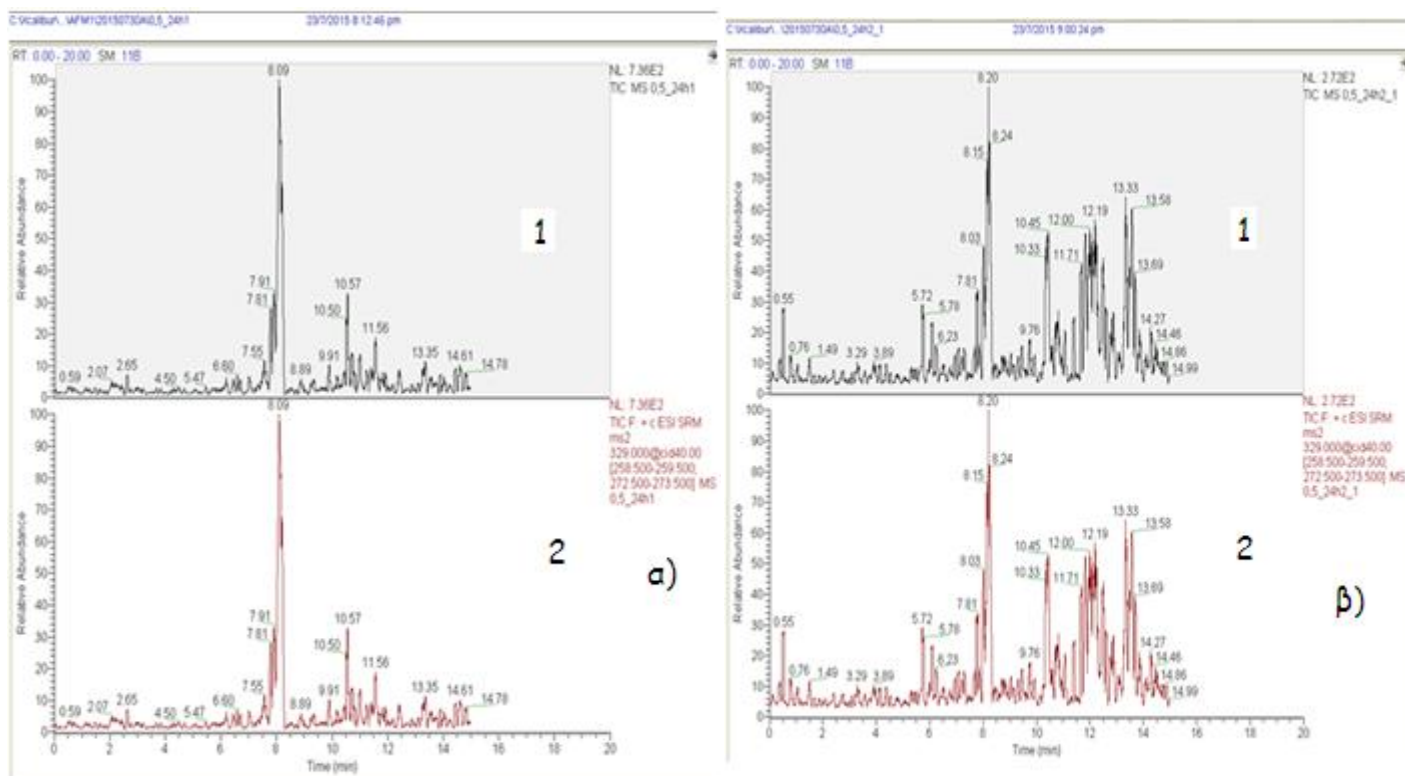
Σχήμα 39: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,25 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,25 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{11}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



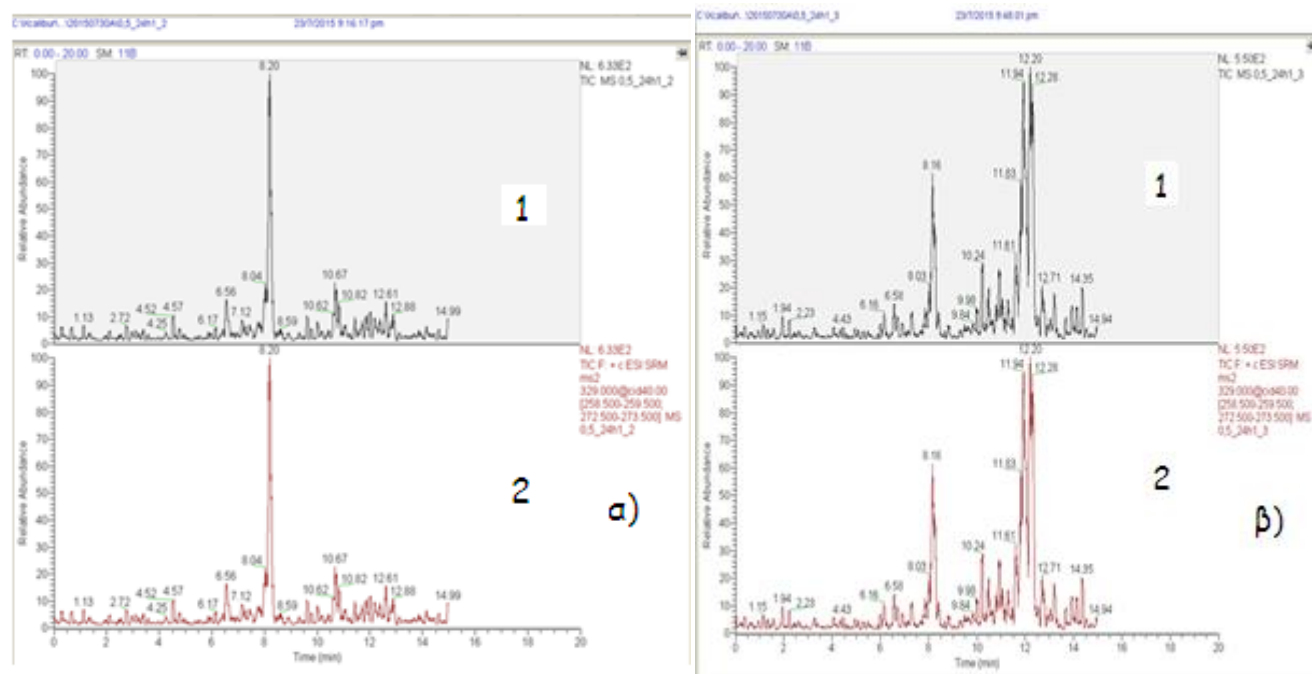
Σχήμα 40: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,75 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,75 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{11}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_0 : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



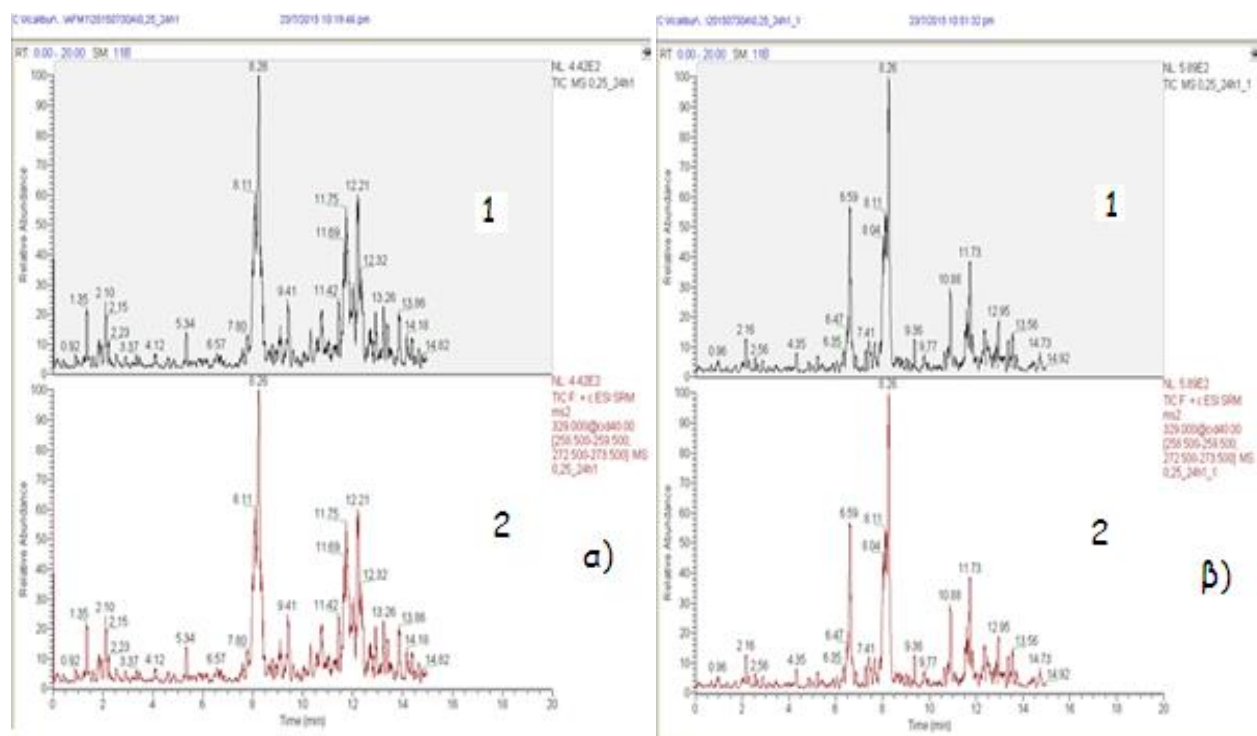
Σχήμα 41: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 μg/L) σε γάλα χρόνο t_{12} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γαλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



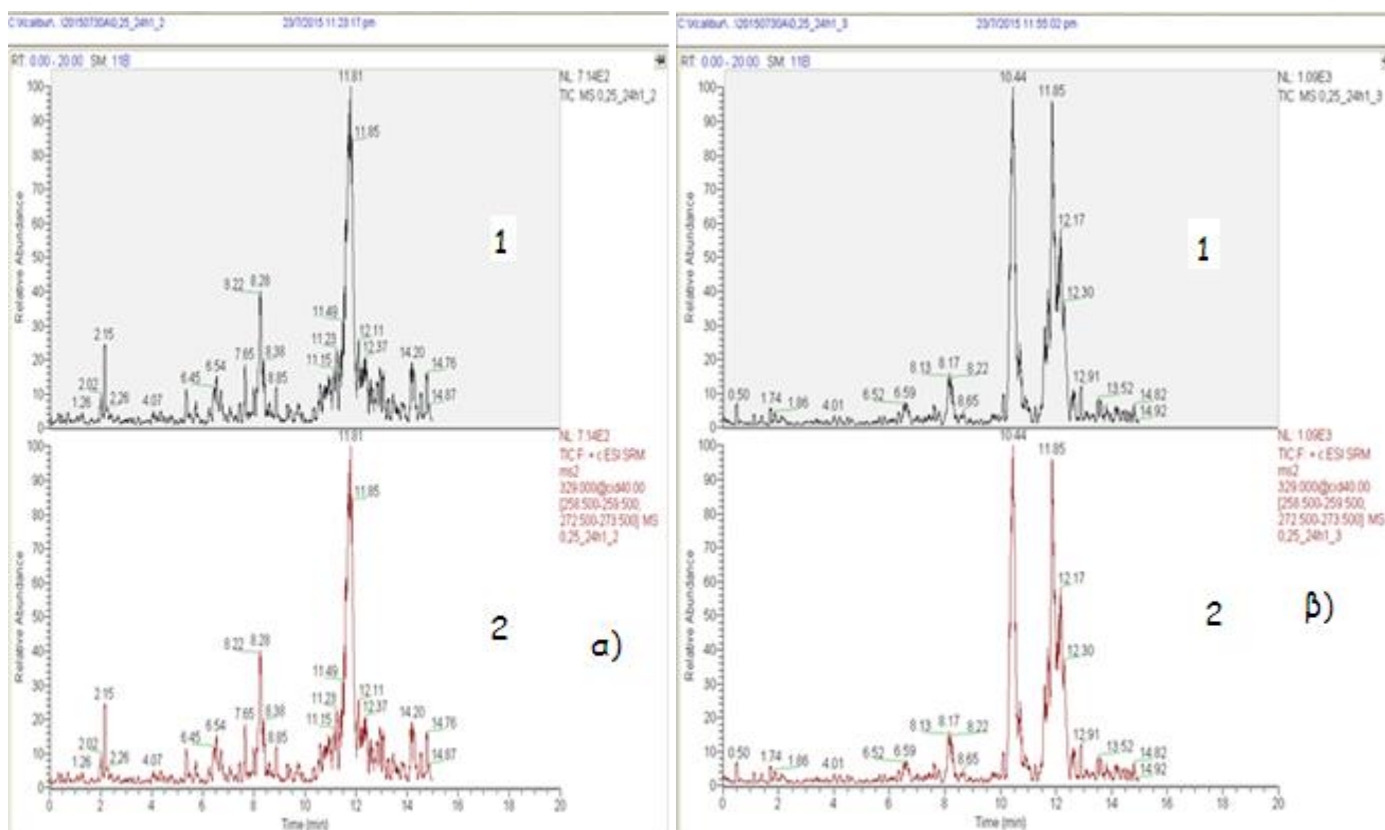
Σχήμα 42: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα σε χρόνο t₂₄: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^9$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t₂₄: 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



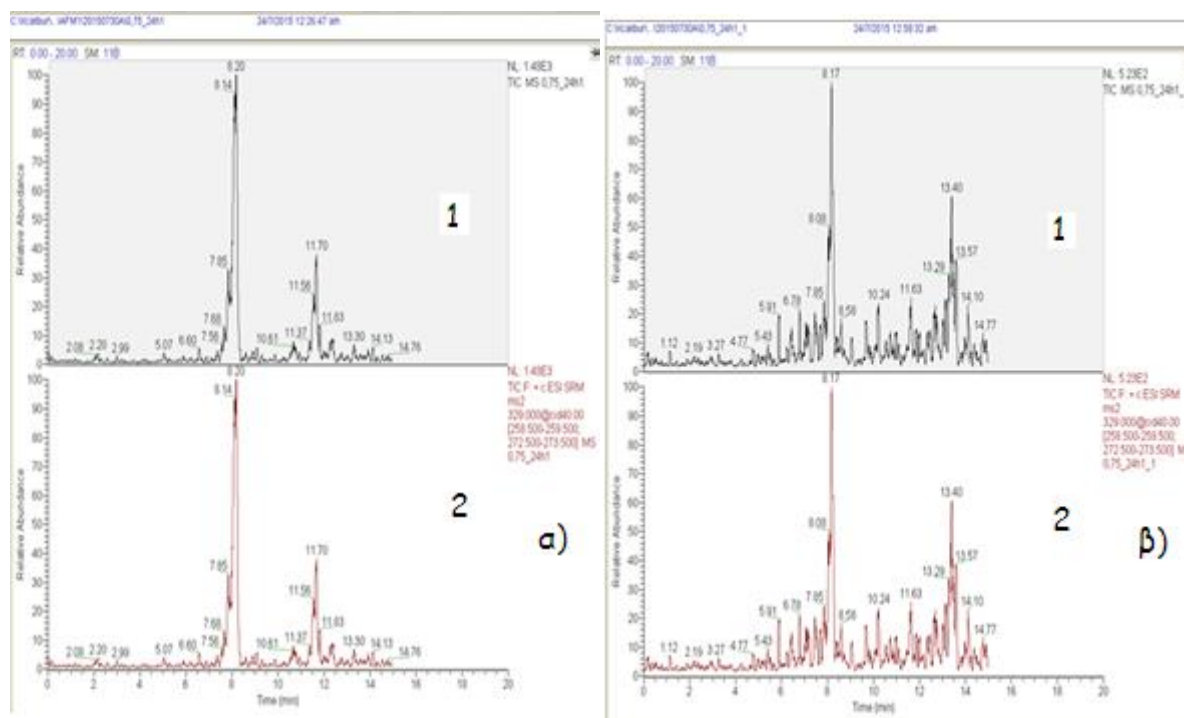
Σχήμα 43: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{11}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



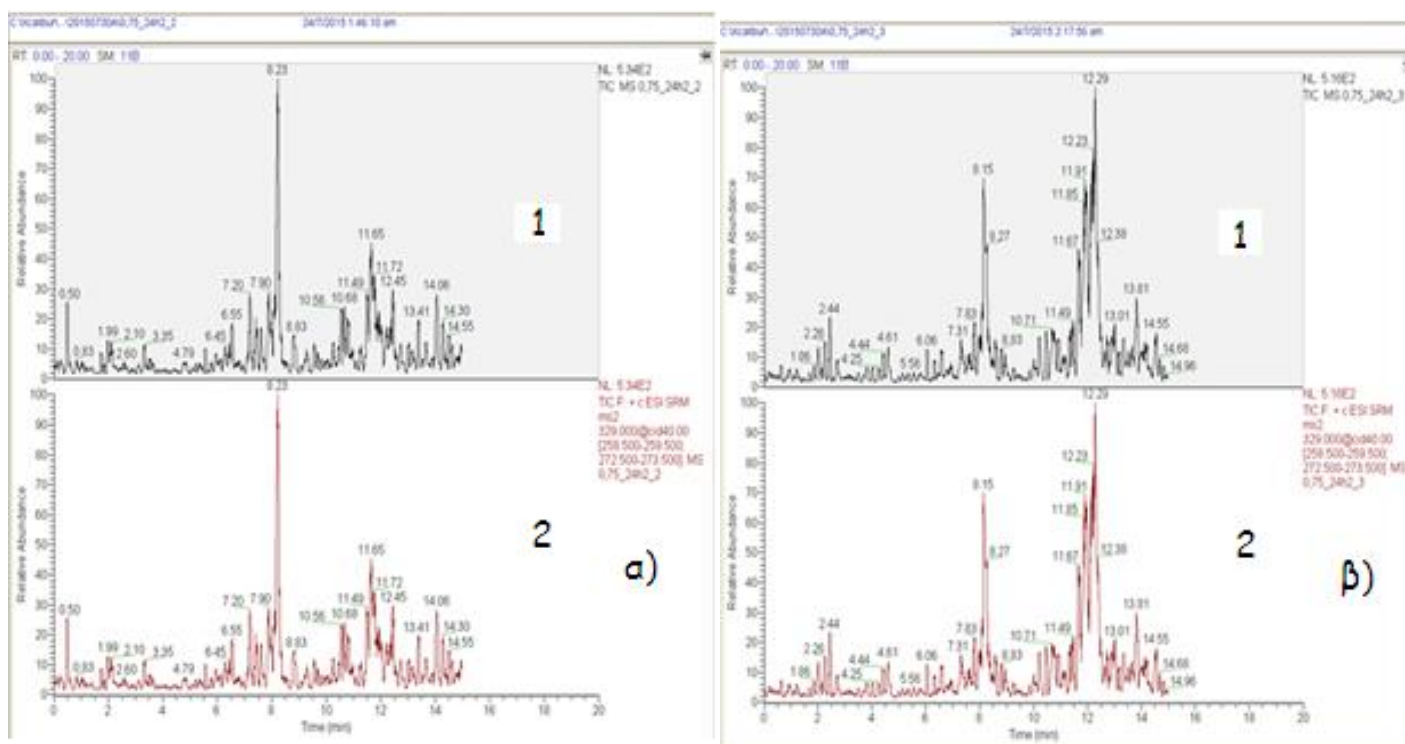
Σχήμα 44: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,25 µg/L) σε γάλα σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,25 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^9$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



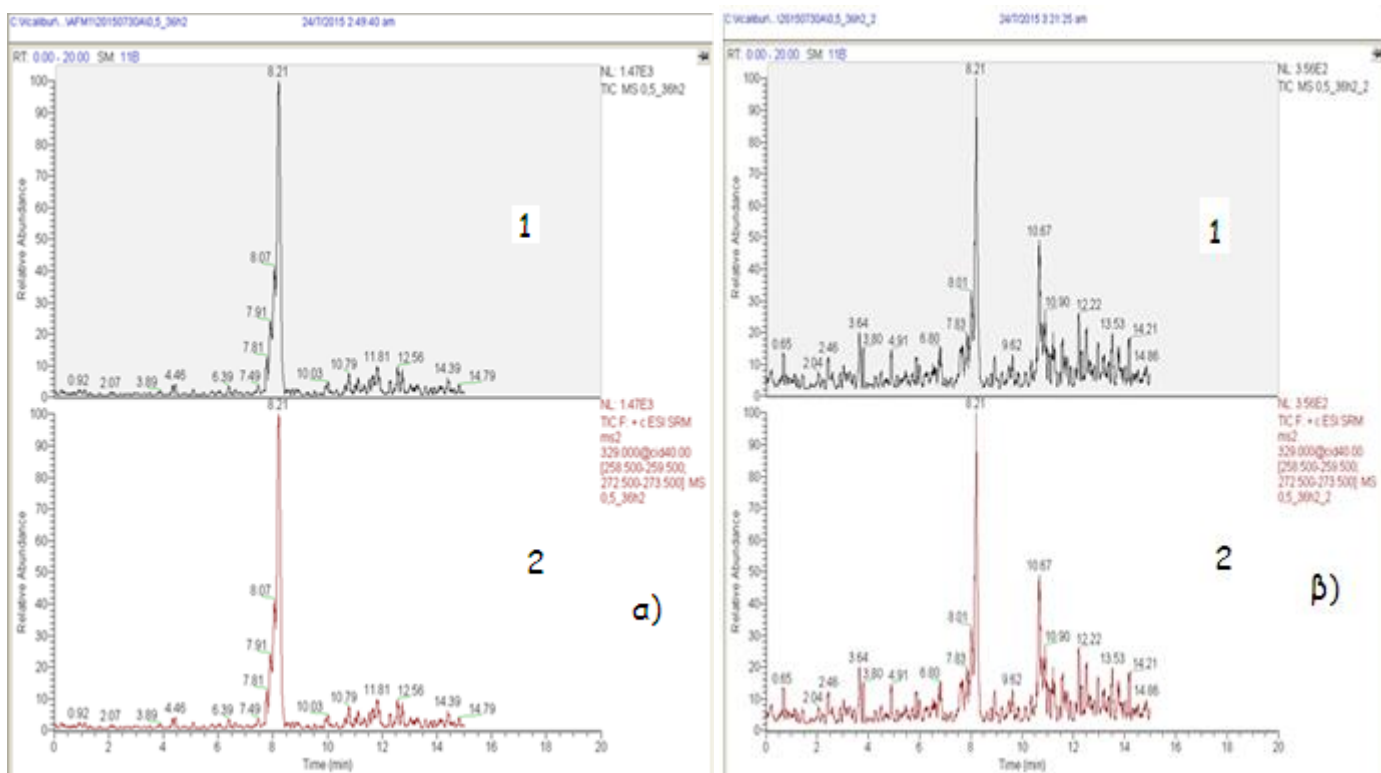
Σχήμα 45: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,25 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,25 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{11}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



Σχήμα 46: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,75 µg/L) σε γάλα σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,75 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^9$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



Σχήμα 47: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,75 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,75 μg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{11}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{24} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1



Σχήμα 48: α) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα σε χρόνο t_{36} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1. β) Χρωματογράφημα προσδιορισμού της αφλατοξίνης M1 (0,5 µg/L) σε γάλα έπειτα από προσθήκη $1,6 \times 10^{10}$ κυττάρων/mL γάλακτος σε χρόνο t_{36} : 1) συνολικό χρωματογράφημα, 2) χρωματογράφημα επιλεγμένων μεταπτώσεων της αφλατοξίνης M1

Παράρτημα 3

Αποτελέσματα μέτρησης κυττάρων της προκαλλιέργειας *Saccharomyces cerevisiae*.

1	0	1	0	1
5	0	0	2	6
4	2	3	0	1
0	0	10	2	0
5	2	0	2	2

2	10	10	6	2
4	8	5	6	14
5	8	7	6	3
10	6	13	5	4
2	6	5	2	6

8	10	7	11	4
8	4	2	4	7
6	11	12	9	4
4	2	6	7	5
7	0	5	6	10

15	12	11	5	1
7	6	9	7	1
2	2	5	0	6
6	12	6	2	14
4	4	6	2	2

3	2	6	0	0
4	0	0	2	5
0	4	2	1	0
0	0	2	0	0
0	4	2	7	0

1	0	4	2	0
0	4	1	4	1
1	9	10	0	2
4	0	3	4	2
8	6	2	0	2

8	9	4	7	6
0	2	4	8	7
4	0	6	12	8
2	4	2	4	4
10	12	3	13	10