

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ »

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΕΥΓΕΝΙΩΤΗ



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2014

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΕΥΓΕΝΙΩΤΗ

Εξεταστική Επιτροπή:

Καπόλος Ιωάννης (επιβλέπων)

Αγριοπούλου Σοφία (επιβλέπουσα)

Φαρμάκης Λάμπρος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου μελέτης συνέβαλλαν κάποιοι άνθρωποι που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα μπορούσα να την ολοκληρώσω. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές της πτυχιακής μου, τον κ. Καπόλο και την κ. Αγριοπούλου γιατί μου πρότειναν το θέμα της πτυχιακής μου εργασίας, με βοήθησαν τόσο στην εκτέλεσή του πειραματικού της μέρους όσο και στη συγγραφή της. Μέσα από αυτούς τους έξι μήνες όπου διήρκησε η πειραματική διαδικασία έμαθα πολλά ενδιαφέροντα και χρήσιμα πράγματα και πληροφορίες. Μου έμαθαν να λειτουργώ με ομαδικό πνεύμα, πως η εμπιστοσύνη είναι πολύ βασικό και όταν αγαπάς κάτι σε όποιες συνθήκες και να βρίσκεσαι να συνεχίζεις την προσπάθεια και να μην τα παρατάς. Τους ευχαριστώ ακόμα περισσότερο γιατί ήταν το πρώτο και βασικό κίνητρο για να επιλέξω την πειραματική πτυχιακή και με καταβολή προσπάθειας την έφερα εις πέρας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την κατανόηση και τη στήριξη τους όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το περιβάλλον της Πρακτικής μου Άσκησης για την υπομονή και πολύτιμη βοήθειά τους.

Αφιερωμένο
στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φουμονισίνες αποτελούν ένα σύνολο μυκοτοξινών που παράγεται κύρια από τους μύκητες *F. verticilliooides*, *F. proliferatum*, *Gibberella fujikuroi* και *Aspergillus niger* και συχνά μολύνουν τον αραβόσιτο και άλλα δημητριακά, όπως το σόργο και το ρύζι καθώς επίσης και τα σταφύλια και τις σταφίδες, με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται στο μούστο και το κρασί. Οι φουμονισίνες προκαλούν τοξικότητα στο συκώτι και στα νεφρά, ανοσοκαταστολή και νευροτοξικότητα. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 28 φουμονισίνες, ενώ ο Παγκόσμιος Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) έχει ταξινομήσει τη φουμονισίνη B1 ως δυνητικά καρκινογόνο ουσία (κατηγορία 2B).

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των φουμονισινών B1 και B2 (FB1 και FB2) σε εμπορικούς οίνους με τη χρήση δυο διαφορετικών πρωτοκόλλων.

Στο πρώτο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε παραγωγολογία των φουμονισινών με αντιδραστήριο παραγωγολογίας την ορθο-φθαλαλδεύδη (OPA, O-phthaldialdehyde). Το αντιδραστήριο παραγωγολογίας παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και προστέθηκε σε κάθε πρότυπο διάλυμα φουμονισινών χειροκίνητα, για να ακολουθήσει ανάλυση με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (spectrofluorometric detector).

Στο δεύτερο πρωτόκολλο, εφαρμόζοντας το ίδιο αντιδραστήριο παραγωγολογίας αλλά σε αυτοματοποιημένο σύστημα προσθήκης με κάθε πρότυπο διάλυμα φουμονισινών και με την ίδια μέθοδο ανάλυσης, ελήφθησαν καλύτερα αποτελέσματα.

Η απόδοση της χρωματογραφικής μεθόδου προσδιορίστηκε με την εκτίμηση της γραμμικότητας (linearity) και την εκτίμηση της ευαισθησίας (precision), σε μια κλίμακα συγκεντρώσεων από 50-2000 ng/mL.

Για τη μελέτη της γραμμικότητας κατασκευάστηκαν δυο καμπύλες αναφοράς (μια για κάθε φουμονισίνη) 6 σημείων, που εμφάνισαν συντελεστές (R^2) για την FB1 και την FB2, 0,984 και 0,948 στη χειροκίνητη παραγωγολογία και 0,987 και 0,990 στην αυτοματοποιημένη αντίστοιχα. Για τη μελέτη της ευαισθησίας της μεθόδου προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) και για τις δυο φουμονισίνες και με τα δυο πρωτόκολλα. Συγκεκριμένα το LOD και LOQ για την FB1 ήταν 120 και 360 ng/mL και για την FB2 ήταν 63 και 189 ng/mL στη χειροκίνητη παραγωγολογία και 102 και 306 ng/mL και 27 και 81 ng/mL αντίστοιχα στην αυτοματοποιημένη παραγωγολογία.

Η μέθοδος με την αυτοματοποιημένη παραγωγολοίηση ήταν σταθερή και ευαίσθητη και εφαρμόστηκε με επιτυχία για τον προσδιορισμό των φουμονισινών FB1 και FB2 σε 13 δείγματα ερυθρών εμπορικών οίνων, από 8 χώρες, με ανακτήσεις 116 και 96% για τη φουμονισίνη FB1 και FB2 αντίστοιχα.

Λέξεις κλειδιά: Μυκοτοξίνες, Φουμονισίνες, Μύκητες, Ύγρη χρωματογραφία υψηλής επίδοσης

ABSTRACT

Fumonisin constitute a set of mycotoxins mainly produced by the fungi *F. verticilliooides*, *F. proliferatum*, *Gibberella fujikuroi* και *Aspergillus niger* which often infect maize and other cereals like sorghum and rice as well as grapes and raisins and therefore they can be detected in the must and wine. It has been shown that fumonisins may cause liver and kidney toxicity, immunosuppression and neurotoxicity. Up until now at least 28 fumonisins have been isolated, while the World Agency for Research on Cancer (IARC) has classified fumonisin B1 as potentially carcinogenic substance (category 2B).

The purpose of this study was to develop a methodology for the determination of fumonisins B1 and B2 (FB1 and FB2) in commercial wines by the use of two different protocols.

In the first protocol, the derivatization of fumonisins was applied using ortho-phthalaldehyde (OPA, O-phthaldialdehyde) as derivatization reagent which was prepared in the laboratory and added manually to each fumonisins standard solution in order to be analyzed by the method of high performance liquid chromatography, (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) with fluorometric detector (spectrofluorometric detector).

In the second protocol, by applying the same derivatization reagent but with a system of automated addition of reagent to each fumonisins standard solution and by the use of the same analysis method (HPLC), better results were obtained.

The validation of the chromatographic method was determined by estimating/assessing the linearity and the sensitivity (precision) in the concentrations range of 500-2000 ng/mL.

For the linearity study, two calibration curves were constructed (one per each fumonisin) by the use of six calibration points, that showed linear correlation factors (R^2) of 0.984 and 0.948 for FB1 and FB2 respectively, in the manual derivatisation, and of 0.987 and 0.990 respectively in the automated derivatisation. For the sensitivity study of the method, the detection limits (Limit of Detection, LOD) and quantification limits (Limit of Quantification, LOQ) for both fumonisins in both protocols were determined. Particularly, the LOD and LOQ for FB1 were 120 and 360 ng/mL and for FB2 were 63 and 189 ng/mL in the manual derivatisation, as well as 102 and 306 ng/mL and 27 and 81 ng/mL, respectively in the automated derivatisation.

The method of automated derivatization was stable and sensitive and it was

successfully applied for the determination of fumonisins FB1 and FB2 in 13 commercial samples of red wine, from 8 countries, with recoveries of 116 and 96% for fumonisin FB1 and FB2, respectively.

Keywords: Mycotoxins, Fumonisins, Fungi, high performance liquid chromatography

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	4
Abstract.....	6
A ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Καταγωγή και Ιστορία του κρασιού.....	12
1.1.1 Στάδια κατεργασίας των σταφυλιών για την παραγωγή ερυθρού οίνου.....	13
1.2 Μύκητες.....	15
1.2.1 Προσβολή από τους μύκητες του γένους <i>Aspergillus</i>	16
1.2.2 Προσβολή από τους μύκητες του γένους <i>Fusarium</i>	17
1.3 Μυκοτοξίνες.....	19
1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των μυκοτοξινών.....	20
1.4.1 Φυσικοί παράγοντες.....	20
1.4.2 Χημικοί παράγοντες.....	20
1.5 Η παρουσία των φουμονισινών στα τρόφιμα και οι επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία.....	20
1.6 Η παρουσία των φουμονισινών στα ζώα και σχετικές μελέτες.....	21
1.7 Τρόπος δράσης των φουμονισινών.....	22
1.8 Μελέτες φουμονισινών.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	
2. ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ	
ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	25

2.1 Χημικές δομές.....	25
2.2 Φυσικές και χημικές ιδιότητες των φουμονισινών.....	25
2.3 Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού των φουμονισινών.....	28
2.4 Μέθοδοι διαχωρισμού φουμονισινών σε τάξεις.....	31
2.5 Νομοθετικά όρια των φουμονισινών.....	36
2.5.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία.....	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	40
--------------------------------	-----------

Β ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
---------------------------------	-----------

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	42
--	-----------

3.1 Δείγματα κρασιών.....	42
---------------------------	----

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
-------------------------------	-----------

3.1.1 Διαλύτες.....	43
---------------------	----

3.1.2 Αντιδραστήρια.....	43
--------------------------	----

3.1.3 Συσκευές και Όργανα.....	44
--------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΠΟΡΕΙΑ.....	45
-----------------------------------	-----------

4.1 Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε.....	45
---------------------------------------	----

4.1.1 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων μίγματος φουμονισινών.....	45
---	----

4.1.2 Δημιουργία κινητής φάσης.....	45
-------------------------------------	----

4.1.3 Παρασκευή Αντιδραστηρίου Παραγωγοποίησης Φουμονισινών ορθο- φθαλαλδεΐδη (OPA, O- phthaldialdehyde.....	46
--	----

4.1.4 Ανίχνευση φουμονισινών σε δείγματα κόκκινου κρασιού.....	48
--	----

4.1.5 Καμπύλη βαθμονόμησης.....	53
4.1.6 Ανάπτυξη μεθοδολογίας για προσδιορισμό φουμονισινών σε εμπορικούς οίνους, με χρωματογραφία στήλης υψηλής επίδοσης (HPLC).....	56
Γ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	58
5.1 Αποτελέσματα του LOD (Όριο ανίχνευσης) και LOQ (Όριο ποσοτικοποίησης).....	60
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταγωγή και Ιστορία του κρασιού

Η ανάπτυξη της αμπελουργίας συνδέεται άρρηκτα με τον πολιτισμό των χωρών της Μεσογείου. Κατά πάσα πιθανότητα, πριν από 6.000-7.000 χρόνια, οι νομαδικοί λαοί της Μεσογείου έφτιαχναν κρασί από τη ζύμωση του χυμού των άγριων σταφυλιών ή των μούρων. Εν συνεχεία, όταν εγκατέλειψαν τη νομαδική ζωή, άρχισαν να καλλιεργούν τα αμπέλια μαζί με τις ελιές και τις συκίες. Αμπελοκαλλιεργητικές εκτάσεις υπήρχαν από την 4^η χιλιετία π.Χ. Τα παλαιότερα γνωστά εργαλεία και δοχεία που ίσως χρησιμοποιήθηκαν στην παραγωγή του κρασιού, κατασκευάστηκαν κατά την 5^η και την 6^η χιλιετία π.Χ. βόρεια του Καύκασου (στην περιοχή που καταλαμβάνουν σήμερα η Γεωργία και η Αρμενία) και κατά την 4^η χιλιετία π.Χ. στην Περσία.

Δεν είναι απολύτως σαφές από πού προέρχεται η λέξη «οίνος». Πιθανόν από τη λατινική λέξη *vinum*, η οποία προέρχεται από την ελληνική λέξη οίνος. Είναι σίγουρο όμως ότι το λίκνο της αμπελουργίας ήταν η ανατολική Μεσόγειος ή ο Καύκασος και ότι άρχισε να ακμάζει στην Αίγυπτο. Οι Αιγύπτιοι, χρησιμοποιώντας μεθόδους συμπίεσης που παρέμειναν ίδιες και अपαράλλακτες για χιλιάδες χρόνια, έβγαζαν τον πολυτιμο χυμό των σταφυλιών.

Στο Δέλτα του Νείλου άνθισε για πρώτη φορά το οινικό εμπόριο. Ατελείωτα караβάνια και ταχύπλοα καράβια μετέφεραν το υγρό φορτίο τους στα σημαντικότερα εμπορικά κέντρα της Μεσογείου. Κάποιοι ιστορικοί, που έχουν μελετήσει επισταμένα την εποχή στην οποία αναφερόμαστε, επισημαίνουν ότι οι βασικές αρχές της σύγχρονης οικονομίας, δηλαδή το χρήμα, οι συμβάσεις, τα συστήματα πληρωμής, τα δικαστήρια, η λογιστική, τα εμπορικά επαγγέλματα και ο τρόπος μέτρησης και εκτίμησης του χρόνου αναπτύχθηκαν λόγω του οινικού εμπορίου στην Αίγυπτο.

Η αρχαία Ελλάδα ήταν ο επόμενος σταθμός στη φάση της επέκτασης της αμπελουργίας. Οι Μινωίτες στην Κρήτη διατηρούσαν στενούς πολιτιστικούς και οικονομικούς δεσμούς με τους Αιγύπτιους. Είναι επίσης πιθανόν η γνώση της αμπελουργικής τέχνης να έφτασε στην Ελλάδα μέσω της Μικράς Ασίας ή της Θράκης. Ό,τι και αν συνέβη, πάντως, γνωρίζουμε ότι το κρασί ήταν σημαντικό κομμάτι του ελληνικού πολιτισμού κατά το δεύτερο ήμισυ της δεύτερης χιλιετίας π.Χ.

Αμπέλια φυτεύτηκαν σε όλη την αρχαία Ελλάδα, μάλιστα ορισμένα νησιά του Αιγαίου ήταν γνωστά για την παραγωγή τους τόσο εντός όσο και εκτός συνόρων. Η Χίος, η οποία θεωρούνταν το Μπορντώ του αρχαίου κόσμου, έκανε εξαγωγές στην Αίγυπτο και

τη Ρωσία. Επίσης τα κρασιά της Θάσου, της Λέσβου και της Ρόδου είχαν αποκτήσει καλή φήμη (Χατζηνικολάου Δ, 2004).

1.1.1 Στάδια Κατεργασίας των σταφυλιών για την παραγωγή ερυθρού Οίνου

Μεταφορά & υποδοχή των σταφυλιών

Οι συνθήκες μεταφοράς και υποδοχής των σταφυλιών στη σταφυλοδόχο έχουν μεγάλη σημασία. Είναι απαραίτητο να αποφεύγεται κάθε πρόωρη ανάπτυξη μικροοργανισμών, για το λόγο αυτό η μεταφορά θα πρέπει να αφήνει ανέπαφα τα σταφύλια και να είναι γρήγορη. Είναι η κυριότερη αιτία για την οποία το οινοποιείο πρέπει να βρίσκεται όσο το δυνατό πιο κοντά στον αμπελώνα. Τα μεταφορικά μέσα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να προκαλούν μεγάλες πιέσεις στο σταφύλι. Η χρήση πλαστικών καφασιών στη μεταφορά των σταφυλιών είναι ιδανική λύση. Όλα τα δοχεία μεταφοράς πρέπει να πλένονται και να απολυμαίνονται καθημερινά.

Για λόγους ευκολίας, παλαιότερα, η υποδοχή των σταφυλιών γινόταν στη σταφυλοδόχο. Σήμερα, στην ιδανική περίπτωση, το περιεχόμενο των καφασιών πρέπει να αδειάζει σταφύλι-σταφύλι σε μια τράπεζα διαλογής. Πρόκειται για μια οριζόντια μεταφορική ταινία εκατέρωθεν της οποίας εργάτες ελέγχουν την καταλληλότητα των σταφυλιών. Σκοπός είναι να απομακρυνθούν τα σταφύλια ή οι ρόγες που δεν έχουν την επιθυμητή ποιότητα, αλλά και τα φύλλα που πιθανόν έχουν κοπεί μαζί με τα σταφύλια. Η παραλαβή αγορασμένων σταφυλιών γίνεται με ζύγιση του μεταφορικού μέσου κατά την άφιξή του και μετά το ξεφόρτωμα των σταφυλιών.

Απορραγισμός (αποβοστρύγωση)

Έχει το πλεονέκτημα να μειώνει κατά 30% περίπου τον όγκο του υπό κατεργασία σταφυλοπολτού, με αποτέλεσμα τη μείωση του αναγκαίου όγκου δεξαμενών και τη μείωση των στέμφυλων που πρέπει να πιέσουμε.

Η μη αφαίρεση των τσάμπουρων μεταβάλλει τη χημική σύσταση του κρασιού που θα παραχθεί, μειώνοντας την ολική οξύτητα και τον αλκοολικό τίτλο. Αυτό συμβαίνει γιατί τα τσάμπουρα είναι πλουσιότερα σε νερό απ'ότι η ρόγα, περιέχουν λίγα σάκχαρα, έχουν χαμηλή οξύτητα και είναι πλούσια σε κάλιο. Η παρουσία τους όμως είναι ευνοϊκή για την εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης, γιατί παρέχουν τον αέρα που περικλείουν, ο οποίος είναι ένα πολύτιμο συστατικό για την αύξηση των ζυμών και την πλήρη ζύμωση των σακχάρων. Τέλος, ευνοούν τη ζύμωση απορροφώντας μέρος της εκλυόμενης

θερμότητας. Τα τσάμπουρα, επειδή περιέχουν μικρότερο ποσοστό τανινών απ'ότι η φλούδα της ρόγας, ενεργούν με έμμεσο τρόπο, ευνοώντας τη διάλυση των τανινών της φλούδας και των κουκουτσιών. Ακόμη μειώνουν το χρώμα δεσμεύοντας τις ανθοκυάνες. Οι τανίνες που περιέχουν είναι συνήθως κακής ποιότητας, δηλαδή είναι πολύ στυφές και δίνουν οσμή χόρτου. Τα τσάμπουρα προστατεύουν το κρασί από τα θολώματα που οφείλονται στα οξειδωτικά ένζυμα προσροφώντας και δεσμεύοντας τη λακάση. Ακόμη, παρεμποδίζουν τη δράση της τυροσινάσης χάρη στις τανίνες που περιέχουν.

Συστήματα απορραγισμού

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι μηχανικού απορραγισμού. Ένα τέτοιο σύστημα δεν πρέπει να αφήνει ρόγες πάνω στα τσάμπουρα, να διαβρέχει με γλεύκος καθώς το απομακρύνει, ούτε να επιτρέπει να περνούν τσάμπουρα στο σταφυλοπολτό.

Το απορραγιστήριο, όπως άλλωστε και ο σπαστήρας, πρέπει να «σέβεται» κατά το δυνατόν τη ρόγα και να μην την πολτοποιεί με βίαιο τρόπο. Τέλος, με κάθε τρόπο πρέπει να αποφεύγουμε τη βίαιη μεταχείριση των τσάμπουρων γιατί είναι δυνατό να παραλάβουμε το χυμό που περιέχουν τα κύτταρά τους και ο οποίος είναι εξαιρετικά πλούσιος σε συστατικά πικρά και στυφά. Στην περίπτωση που θέλουμε όσο το δυνατό πιο ανέπαφες ρόγες, θα πρέπει ο κεντρικός άξονας με πτερύγια να περιστρέφεται στην ίδια φορά με το κόσκινο. Σε ανάπτυξη υπάρχουν συστήματα που απομακρύνουν με αυτόματο τρόπο τις σάπιες ρόγες.

Έκθλιψη

Η έκθλιψη (σπάσιμο) της ρόγας του σταφυλιού έχει σκοπό να ελευθερώσει το χυμό ο οποίος ταυτόχρονα αερίζεται ελαφρά και αναμειγνύεται με τις ζύμες που βρίσκονται στην επιφάνεια του σταφυλιού. Ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται στη δεξαμενή ζύμωσης με τη βοήθεια αντλίας. Ταυτόχρονα μπορεί να γίνει προσθήκη θειώδη ανυδρίτη κατά ομοιογενή τρόπο. Η έκθλιψη πρέπει να γίνεται χωρίς βιαιότητα. Η σάρκα, ανάλογα με τη βιαιότητα της έκθλιψης, μπορεί να μείνει σχεδόν ανέπαφη ή να ελευθερώσει το μεγαλύτερο μέρος του χυμού που περικλείει. Μια βίαιη έκθλιψη μπορεί να προκαλέσει την απότομη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, αποτέλεσμα της πλήρους ανάμειξης των ζυμών με το γλεύκος και τον ταυτόχρονο αερισμό τους. Σε θερμά κλίματα, μια τέτοια απότομη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα έντονη εκχύλιση. Όταν υπάρχει ανάγκη αυξημένης εκχύλισης, είναι προτιμότερο να γίνεται με επιμήκυνση

του χρόνου εκχύλισης σε χαμηλότερη θερμοκρασία.

Υπάρχουν σε χρήση διάφορα είδη εκθλιπτηρίων (σπαστήρων): α) εκθλιπτήρια με δυο κυλίνδρους που περιστρέφονται κατά την αντίθετη φορά με ρυθμιζόμενη ταχύτητα και ρυθμιζόμενη απόσταση, β) εκθλιπτήρια με δυο κυλίνδρους σε σχήμα σταυρού, γ) εκθλιπτήρια φυγοκεντρικά, τα οποία πραγματοποιούν ταυτόχρονο απορραγισμό. Αυτά έχουν το μειονέκτημα της βίαιης έκθλιψης (Τσακίρης, 2008).

1.2 Μύκητες

Οι μύκητες παράγουν ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών, πολλοί από τους οποίους συνδέονται με την καταβύθιση των δυσμενών επιπτώσεων σε ζώα και ανθρώπους. Οι ενώσεις ορίζονται ως μυκοτοξίνες. Απαντώνται στο μυκήλιο των νηματοειδών μυκήτων, αλλά μπορεί επίσης να είναι παρόντες στα σπόρια των οργανισμών αυτών. Τα επιβλαβή αποτελέσματα αναφέρονται ως μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι μια ομάδα ενώσεων που παράγονται από ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μυκήτων, συνήθως μετά από μια φάση της ισορροπημένης ανάπτυξης. Ωστόσο, η παραγωγή μιας συγκεκριμένης μυκοτοξίνης γενικά περιορίζεται σε ένα σχετικά μικρό αριθμό ειδών μυκήτων και μπορεί να είναι είδη ή ακόμη και να αφορούν συγκεκριμένα στελέχη. Οι εκδηλώσεις της τοξικότητας σε ζώα είναι τόσο διαφορετικές, όσο τα είδη των μυκήτων που συνθέτουν αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες (Mello et al., 1997).

Οι μυκοτοξίνες παράγονται από ένα ποικίλο αριθμό ειδών μυκήτων. Αυτοί που συναντώνται συνήθως είναι οι *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium*. Σε γενικές γραμμές αυτοί οι μύκητες δεν είναι επιθετικά παθογόνοι αλλά μερικά είδη τους μπορούν να εισβάλλουν και να αποικίσουν στους φυτικούς ιστούς πριν τη συγκομιδή και αποθήκευση. Οι δυο βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την παραγωγή των μυκοτοξινών τόσο πριν τη συγκομιδή όσο και μετά τη συγκομιδή, είναι η θερμοκρασία και η υγρασία. Οι δύο αυτοί παράγοντες έχουν άμεση συνέπεια για την οικολογία και την παθογένεια του μύκητα και συχνά προδιαθέτουν το φυτό για λοίμωξη. Δεν είναι δυνατόν να περιγραφεί ένα ενιαίο σύνολο συνθηκών που είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη και την παραγωγή μυκοτοξινών από μύκητες. Μυκοτοξίνες παράγονται από μια διαφορετική ομάδα μυκήτων που διαφέρουν μορφολογικά στον τομέα της βιοχημείας και της οικολογίας. Οι μύκητες των τοξινών δεν είναι επιθετικά παθογόνοι αλλά συχνά είναι καλά προσαρμοσμένοι για την καλλιέργεια υποστρωμάτων με χαμηλή υγρασία και μπορούν εύκολα να αποικίσουν σωστά τα αποθηκευμένα σιτηρά (Richard et al., 2003). Οι τοξικοί μύκητες διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να λειτουργούν κάτω από διαφορετικές

οικολογικές συνθήκες. “Διαχωρίζονται σε μήκητες πεδίου”, αν είναι επιθετικοί, όπως παθογόνα των φυτών που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες στα φυτά και “μύκητες αποθήκευσης” που μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να προκαλούν λοιμώξεις κατά τη διάρκεια της διατήρησης των σιτηρών (Reyneri, 2006). Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί παρατίθενται τα κυριότερα τοξικά είδη των μυκήτων και οι βασικές μυκοτοξίνες τους (Mello et al., 1997) .

Πίνακας 1. Κυριότερα γένη μυκήτων και βασικές μυκοτοξίνες.

Κυριότερα Γένη Μυκήτων	Βασικές Μυκοτοξίνες
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. Parasiticus</i>	Aflatoxins
<i>A. flavus</i>	Cyclopiazonic acid
<i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. cyclospium</i>	Ochratoxin A
<i>P. expansum</i>	Patulin
<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. gramineatum</i> , <i>F. sporomchioides</i>	Deoxynivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>	T-2 toxin
<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i>	Diacetoxyscirpenol
<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Zearalenone
<i>F. moniliforme</i>	Fumonisin
<i>Acremonium coenophialum</i>	Ergopeptine alkaloids
<i>A. lolii</i>	Lolitrems alkaloids
<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Phomopsins
<i>Pithomyces chartarum</i>	Sporidesmins

Πηγή: Mello et al., 1997

1.2.1 Προσβολή από τους μύκητες του γένους *Aspergillus*

Το γένος *Aspergillus* ανήκει σε μια μεγάλη, διαφορετική οικογένεια μυκήτων που είναι σε όλο τον κόσμο στον τομέα της διανομής αλλά κυρίως καταλαμβάνουν υποτροπικά και εύκρατα θερμά κλίματα. Θεωρούνται ως σαπρόφυτα που είναι σημαντικά στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων. Αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλή ενεργότητα ύδατος (τάσης ατμών του προϊόντος προς εκείνη του καθαρού ύδατος) που επιτρέπει τη συμμετοχή τους στον αποικισμό από μια ποικιλία καλλιεργειών, μερικές φορές με περιορισμένο παρασιτισμό ειδικά κάτω από ευνοϊκές συνθήκες (Richard et al., 2003).

Πρόσφατα ορισμένα σημαντικά βιομηχανικά στελέχη του *Aspergillums niger* αναφέρθηκαν για την παραγωγή τους, σε αντίθεση με την ωχρατοξίνη Α, στη φουμονισίνη Β2 (Frisvad et al., 2007). Έρευνες έδειξαν πρόσφατα την παραγωγή των φουμονισινών από τα στελέχη του *Aspergillums niger*, όπου απομονώθηκαν από σταφίδες και είναι ικανά

να παράγουν τις φουμονισίνες B2 και B4 όταν καλλιεργούνται σε σταφύλια ή σε σταφίδες (Noonim et al., 2009, Mogensen et al., 2009). Οι Mogensen et al., (2009) ανακάλυψαν ότι οι σταφίδες μπορεί να περιέχουν στελέχη φουμονισινών που πηγάζουν από την επίμονη εμφάνιση των σποριών του *Aspergillus niger* καθώς επίσης η πρόσφατη ανακάλυψη της παραγωγής των φουμονισινών από τον *Aspergillus niger* στα σταφύλια, οδηγεί σε εκτεταμένη εμφάνιση της φουμονισίνης B2 στο κρασί (Knudsen et al., 2011). Ο *Aspergillus niger* συναντάται μακράν στα σταφύλια. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε αποδείχθηκε ότι εμφανίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80% των δειγμάτων σε κατεστραμμένα σταφύλια που μπορούν να μολυνθούν ιδιαίτερα από τον *Black aspergilli* κατά τη διάρκεια της περιόδου γιατί οι μύκητες αυτοί εμφανίζονται στα σταφύλια αλλά και στα τελικά προϊόντα της σταφίδας (Knudsen et al., 2011).

1.2.2 Προσβολή από τους μύκητες του γένους *Fusarium*

Πρόκειται για μια μεγάλη κατηγορία του γένους με είδη προσαρμοσμένα σε ένα ευρύ φάσμα οικοτόπων. Είναι ευρέως διαδεδομένοι στον τομέα της διανομής και πολλοί θεωρούνται σημαντικά παθογόνα των φυτών. Ωστόσο, πολλά είδη έχουν επιβαρύνει το έδαφος και υπάρχουν ως σαπρόφυτα, τα οποία είναι σημαντικά στη διάσπαση των φυτικών υπολειμμάτων. Μερικά είδη είναι σημαντικά παράγωγα μυκοτοξινών, τα οποία είναι παρόντα στη συγκομιδή μολυσμένων σπόρων και άλλων φυτών (Richard et al., 2003). Η φυσική εμφάνιση των μυκοτοξινών από είδη *Fusarium*, συνήθως, συνδέεται με τα σιτηρά σε χώρες με εύκρατο κλίμα, δεδομένου ότι οι μύκητες αυτοί απαιτούν κάπως χαμηλότερες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη και την παραγωγή των μυκοτοξινών από το είδος *Aspergillus*. Τα σημαντικότερα είδη τοξικών περιλαμβάνουν *F.spороtrichioides*, *F.culmorum*, *F. Graminearum*, *F.poue.*, *F.oxysporum* και *F. moniliforme*. Τα είδη αυτά συνθέτουν ένα ευρύ φάσμα των μυκοτοξινών, εκ των οποίων το πιο σημαντικό από την άποψη της υγείας των ζώων και της παραγωγικότητας είναι των τριχοθικινών, ζεαραλενόνη, μονιλιφορμίνης και η φουμονισίνη (Mello et al., 1997).

F. verticillioides και *F. proliferatum* είναι σημαντικά παθογόνα αραβοσίτου. Παράγουν μια σειρά από μυκοτοξίνες, μεταξύ των οποίων οι φουμονισίνες θεωρούνται οι πιο σχετικές. Και τα δύο είδη παρουσιάζουν διαφορές στο φάσμα των ξενιστών. Ο μύκητας *F.verticillioides* παράγει φουμονισίνες ο οποίος ουσιαστικά περιορίζεται στον αραβόσιτο και προκαλεί το «αυτί» και το στέλεχος σήψης. Αντίθετα ο *F. proliferatum* αποικίζει ένα ευρύ φάσμα των ξενιστών εκτός από τον αραβόσιτο, τόσο διαφορετικό, όπως τα πεύκα, τα σπαράγγια ή οι φοίνικες και τις διατροφικές καλλιέργειες, όπως το

σιτάρι και το κριθάρι (Conner et al., 1996, Desjardins et al., 2007). Και τα δύο είδη έχουν ευρεία κλίμακα στις εύκρατες περιοχές της Ευρώπης (Desjardins et al., 2000, Souza and Formento, 2004, Aliakbari et al., 2007, Cavaglieri et al., 2009) και ιδιαίτερα σχετικά με αυτές της Νότιας Ευρώπης (Logrieco et al., 2002, Soldevilla et al., 2005, Jurado et al., 2006, Medina et al., 2006).

Η ανάπτυξη του μύκητα και η παραγωγή των φουμονισινών προέκυψε από τη σύνθετη αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων. Η πίεση του ύδατος και η θερμοκρασία είναι οι πιο σχετικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων και της παραγωγής μυκοτοξινών, και ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να γίνει κατανοητή η συνολική διαδικασία στην πρόβλεψη και πρόληψη των ασθενειών των φυτών και στην παραγωγή μυκοτοξινών (Charmley et al., 1994).

Το γένος του μύκητα *F. Moniliforme* που παράγει τη φουμονισίνη B₁ έχει ένα βέλτιστο εύρος ανάπτυξης μεταξύ 22,5 °C έως 27,58 °C, ελάχιστο εύρος από 32 °C έως 37,8 °C (Pitt and Hocking, 1997). Έχει ελάχιστη τιμή a_w 0.87 για ανάπτυξη και έχει αναφερθεί ότι παράγει την τοξίνη σε τιμή a_w 0.92 (Margin et al., 1995). Σε ένα κατώτατο όριο a_w από 0,85 έως 0,86, δεν υπάρχει παραγωγή τοξινών από το μύκητα *F.moniliforme* (Cahagnier et al., 1995). Ο μύκητας *F.proliferatum* είναι ένας σημαντικός παραγωγός των φουμονισινών B₁, B₂ και B₃ και έχει ένα παρόμοιο προφίλ ανάπτυξης με το μύκητα *F. moniliforme*. Η παραγωγή τοξινών είναι υψηλότερη στους 25 °C από τους 30 °C και μπορεί να παραχθεί σε εύρος από a_w 0,97 έως 0,92. Επιπλέον ο μύκητας *F.subglutinans* είναι ένα ψυχρότροφο στέλεχος που παράγει τη φουμονισίνη B₁ (Visconti and Doko, 1994) και η μονιλιφορμίνη μπορεί να αναπτυχθεί στους 5 °C αλλά όχι στους 37 °C. Η παραγωγή φουμονισίνης σε είδη *Fusarium* φαίνεται να ενισχύεται υπό αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης (Musser and Plattner, 1997). Στον πίνακα 2 που ακολουθεί παρατίθεται η ελάχιστη, μέγιστη και βέλτιστη θερμοκρασία και ενεργότητα του νερού των κύριων τοξικογόνων μυκήτων (Reyneri et al., 2006).

Πίνακας 2. Εύρος Θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού των κύριων τοξικογόνων μυκήτων.

Κυριότερα Γένη Τοξικογόνων Μυκήτων	Ελάχιστη Θερμοκρασία	Μεγιστη Θερμοκρασία	Βέλτιστη Θερμοκρασία	Χαμηλή Ενεργότητα Ύδατος	Υψηλή Ενεργότητα Ύδατος
<i>Aspergillus flavus</i>	6	46	36-38	0.78	0.95
<i>Aspergillus parasiticus</i>	6	46	36-38	0.78	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12	37	36-38	0.77	
<i>Penicillium verrucosum</i>	-2	36	23	0.81	
<i>Fusarium culmorum</i>	2	37	25	0.78	0.99
<i>Fusarium graminearum</i>	2	40	24-26	0.89	0.98-0.99
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	-2	35	12-15	0.89	
<i>Fusarium moniliforme</i>	5	42	25	0.87	
<i>Fusarium proliferatum</i>	5	42	25		

Πηγή: Lacey and Margan,1991, Bottalico,1999

1.3 Μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους τοξικοί δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι παράγονται από μύκητες, συμπεριλαμβανομένων πολλών σημαντικών παθογόνων και τα είδη *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* που αλλοιώνουν τις τροφές. Αυτές οι τοξίνες έχουν θεωρηθεί ως αιτία για την πρόκληση ασθενειών και το θάνατο σε ανθρώπους και σε ζώα. Η τοξικότητα των χημικών και των συναφών ασθενειών συλλογικά ονομάζονται μυκοτοξίνες, εμμέσως από την ικανότητα των μυκήτων να μολύνουν τις καλλιέργειες των ειδών, μολύνοντας έτσι την τροφή που προσλαμβάνεται τόσο από τα ζώα όσο και από τον άνθρωπο. Πέντε κατηγορίες των μυκοτοξινών είναι οι πιο σημαντικές στον τομέα της γεωργίας και της βιομηχανίας τροφίμων. Αυτές είναι οι αφλατοξίνες, φουμονισίνες, ωχρατοξίνες, ζεαραλενόνη και τέλος η δεοξυνιβαλενόλη (Huffman et al., 2010).

Οι εκδηλώσεις της τοξικότητας σε ζώα είναι τόσο διαφορετικές όσο και τα είδη των μυκήτων που παράγουν αυτές τις ενώσεις. Πέραν του ότι είναι έντονα τοξικές, μερικές μυκοτοξίνες συνδέονται με τη συχνότητα ορισμένων μορφών καρκίνου και αυτή η πλευρά

έχει προκαλέσει παγκόσμια ανησυχία για την ασφάλεια των ζωοτροφών και των τροφίμων (Mello et al., 1997).

1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των μυκοτοξινών

Ο σχηματισμός επηρεάζεται από ένα ευρύ φάσμα παραγόντων. Σε γενικές γραμμές διαίρεείται σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες (Mello et al., 1997).

1.4.1 Φυσικοί παράγοντες

Μια ευρεία ποικιλία της αλληλεπίδρασης των φυσικών παραγόντων μπορεί να επηρεάσει τον τομέα της παραγωγής των μυκοτοξινών και στο στάδιο της αποθήκευσης. Περιλαμβάνουν το χρόνο, τη θερμοκρασία, την υγρασία και την έκταση των εντόμων. Ιδιαίτερη σημασία στις τροπικές περιοχές έχει η επίδραση των εντόμων στην εισβολή των σπόρων στο χωράφι και κατά την αποθήκευση. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η μόλυνση από τα έντομα μπορεί να προδιαθέτει τη μόλυνση των σιτηρών από τους μύκητες και επομένως την παραγωγή των μυκοτοξινών (Farrar and Davis, 1991).

1.4.2 Χημικοί παράγοντες

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μυκητοκτόνα, δεδομένου ότι αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο των μυκητιακών ασθενειών σε καλλιέργειες. Τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται με επιτυχία για το σκοπό αυτό, με αποτέλεσμα ο κίνδυνος να ελαχιστοποιείται. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι σε σχεδόν θανατηφόρες συγκεντρώσεις, η παραγωγή μυκοτοξινών μπορεί να ενισχυθεί (Mello et al., 1997).

1.5 Η παρουσία των φουμονισινών στα τρόφιμα και οι επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία

Οι επιδράσεις των φουμονισινών στην υγεία του ανθρώπου είναι αβέβαιες. Τα προβλήματα που σχετίζονται με τις μυκοτοξίνες αυτές σχεδόν αποκλειστικά σχετίζονται με την κατανάλωση μολυσμένου αραβόσιτου ή προϊόντων που παράγονται από αραβόσιτο. Υπάρχουν υποψίες ότι οι φουμονισίνες είναι παράγοντες κινδύνου για τον οισοφάγο και καρκίνο του ήπατος, τις ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα και των καρδιαγγειακών προβλημάτων σε πληθυσμούς που καταναλώνουν σχετικά μεγάλες ποσότητες τροφίμων που παρασκευάζονται με τη μολυσμένη «μήτρα» (IARC, 2002,

Odhav, Adam and Bhoola, 2008, Wang et al., 2005). Οι Φουμονισίνες ανακαλύφθηκαν το 1988 από το Marasas και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ερευνούσαν την υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του οισοφάγου σε ιθαγενείς των λαών της Transkei, πατρίδα στη Νότια Αφρική. Συσχέτισαν τα κρούσματα του καρκίνου με την κατανάλωση του καλαμποκιού που μολύνθηκε από τον *F. verticillioides*. Κατά τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, σημαντικές αλλαγές έχουν επέλθει στα επιδημιολογικά πρότυπα που σχετίζονται με την ασθένεια αυτή. Τελευταίες εξελίξεις διάγνωσης, ανασυγκρότησης και θεραπείας αυτής της νεοπλασματικής κατάστασης έχουν οδηγήσει σε μικρές αλλά σημαντικές βελτιώσεις στα ποσοστά επιβίωσης (Enzinger and Mayer, 2003).

Είναι σαφές ότι οι φουμονισίνες εμφανίζονται στο καλαμπόκι που καταναλώνεται από ανθρώπους σε περιοχές της Αφρικής, της Ασίας, της Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών, όπου ο κίνδυνος καρκίνου του οισοφάγου είναι υψηλός (Marasas, 2001). Η μεγαλύτερη ανησυχία για την υγεία του ανθρώπου είναι ότι οι φουμονισίνες θα μπορούσαν να παίξουν ρόλο ως προς την αυξημένη συχνότητα του καρκίνου στον άνθρωπο. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι περισσότερες αιτίες είναι περιβαλλοντικές, αλλά σχεδόν είναι γνωστό ότι οι περιβαλλοντικά καρκινογόνες είναι μεταλλαξιογόνες, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως εμπνευστές του καρκίνου. Μολονότι η φουμονισίνη έχει καθοριστεί σε φυσιολογικά δείγματα, ο βαθμός στον οποίο αντανακλά η πρόσληψη της στον άνθρωπο πρέπει ακόμα να διερευνηθεί. Εν κατακλείδι, δεν έχει καταχωρωθεί ακόμα πλήρως βιοδείκτης για την έκθεση φουμονισίνης αν και διάφοροι υποτιθέμενοι βιοδείκτες έχουν προταθεί και έρευνες ως προς τη χρησιμότητά τους θα πρέπει να αποτελούν προτεραιότητα (Shephard et al., 2007).

1.6 Η παρουσία των φουμονισινών στα ζώα και σχετικές μελέτες

Δεδομένου ότι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των φουμονισινών έγινε το 1988, έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για να μελετηθούν οι τοξικολογικές ιδιότητες της απομονωμένης FB1 η οποία είναι η πιο άφθονη και τοξική από τις ομόλογες φουμονισίνες. Η απομόνωση της FB1 παρουσιάστηκε για πρώτη φορά για να προκαλέσει εγκεφαλοπάθεια (ELEM) όταν η τοξίνη χορηγήθηκε ενδοφλεβίως (Marasas et al., 1988) ή από το στόμα (Kellerman et al., 1990) σε άλογα. Πνευμονικό οίδημα (PE) προκλήθηκε σε χοίρους με ενδοφλέβια ένεση FB1 (Harrison et al., 1990, Colvin and Harrison, 1992, Gumprecht et al., 1998, Haschek et al., 2001). Παρουσιάζοντας την τοξίνη με καθετήρα σε χάμστερ Συρίας σε δόσεις μέχρι και 18 mg FB1/ kg βάρους σώματος που παράγεται

τοξικότητα στην ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από προγεννητικούς θανάτους και απορροφήσεις εμβρύων (Floss et al., 1994, Shephard et al., 1996a).

Η προσθήκη της FBI σε κοτόπουλα παραγωγής προκαλεί μειωμένη αύξηση βάρους, θνησιμότητα και αλλοιώσεις σε διάφορα όργανα, όπως το ήπαρ, τα νεφρά, η καρδιά και οι πνεύμονες (Javed et al., 1992a, 1992b). Η τοξίνη προκαλεί επίσης παθολογικές αλλαγές και θάνατο σε έμβρυα όρνιθας (Javed et al., 1992c).

1.7 Τρόπος δράσης των φουμονισινών

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, οι φουμονισίνες προκαλούν μια πληθώρα διαφόρων ασθενειών στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η νευροτοξικότητα, το ήπαρ, η τοξικότητα των νεφρών, η καρκινογένεση, σε χοίρους Πνευμονικό οίδημα, Εγκεφαλοπάθεια, ανοσοκαταστολή και άλλα. Οι περισσότερες από τις τοξικότητες που προκύπτουν από την έκθεση σε φουμονισίνες μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα των τοξινών να τροποποιήσουν το σφιγγολιπίδιο μεταβολισμό αναστέλλοντας το ένζυμο συνθάση κεραμίδιο, ένα ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ακυλίωση σφινγκανίνης και σφινγοςίνης. Δομικά, η φουμονισίνη μοιάζει με σφινγγανίνη και σφινγοςίνη, ελεύθερες σφινγγοειδείς βάσεις, οι οποίες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων και στην μεταγωγή του σήματος (Wang et al., 1996, Desai et al., 2002). Η διατάραξη της σφιγγολιπιδικής βιοσυνθετικής οδού οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα των προδρόμων σφινγκολιπιδίων και σε μειωμένα επίπεδα των σύνθετων σφιγγολιπιδίων. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται επίπεδα ιστού σφινγκανίνης αυξημένα στην έναρξη ενός καταρράκτη κυτταρικών αλλοιώσεων που μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα και καρκινογένεση (Riley et al., 1996, Tsunoda et al., 1998, DeLongchamp and Young, 2001, Seefelder et al., 2001, Merrill et al., 2001, Riley et al., 2001, Desai et al., 2002). Ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό έχει ως αποτέλεσμα καταρράκτη στην καρκινογένεση, δεν είναι γνωστός αλλά έχει υποτεθεί ότι με την επαγόμενη απόπτωση σφινγκανίνης και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που ακολουθεί, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου (DeLongchamp & Young, 2001, Kodell et al., 2001).

Από τη διατάραξη της βιοσύνθεσης των σφινγκολιπιδίων της φουμονισίνης, η προσπίπτουσα αύξηση της σφινγκανίνης/σφινγοςίνης αναλογία σε ορό, πλάσμα, ή ούρα έχει χρησιμοποιηθεί ως ένας βιοδείκτης για την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης των ζώων σε φουμονισίνες (Shephard et al., 1996a,b, Shephard and van der Westhuizen, 1998, Marasas, 2001). Ωστόσο, η χρήση της σχέσης των βιοδεικτών για την ανθρώπινη έκθεση

σε φουμονισίνες δεν είναι επαρκής (Van der Westhuizen et al., 1999). Η έρευνα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ενός βιοδείκτη για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου σε φουμονισίνες.

1.8 Μελέτες φουμονισινών

Από την ανακάλυψη των φουμονισινών το 1988, έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των χημικών ιδιοτήτων των συνθηκών των φουμονισινών, με αυτή την ομάδα των μυκοτοξινών που παράγονται από το *F. verticillioides*, στην έκταση της μόλυνσης του εφοδιασμού των τροφίμων και ζωοτροφών από την τοξίνη, στη βιολογική δραστηριότητα μερικών από τις σημαντικότερες παραγώγους της φουμονισίνης και στα αποτελέσματα της επεξεργασίας σχετικά με τη σταθερότητα της τοξίνης. Ωστόσο, χρειάζεται περισσότερη δουλειά σε όλους τους παραπάνω τομείς.

Η ανάπτυξη των μυκήτων και μυκοτοξινών είναι αποτέλεσμα της παραγωγής μιας σύνθετης αλληλεπίδρασης πολλών παραγόντων και για να κατανοηθεί κάθε παράγοντας είναι απαραίτητη η κατανόηση της συνολικής διαδικασίας για να προβλέψει και να αποτρέψει την παραγωγή μυκοτοξινών. Για να αναπτυχθούν στρατηγικές για τον έλεγχο των φουμονισινών, υπάρχει ανάγκη να αποκτηθεί μια σαφέστερη κατανόηση της φύσης της ασυμπτωματικής μόλυνσης του καλαμποκιού με το *F. verticillioides*. Επιπλέον, χρειάζεται περισσότερη δουλειά για να προσδιοριστεί το πότε, πώς και πού οι φουμονισίνες παράγονται από το μύκητα στο φυτό καλαμποκιού.

Σήμερα υπάρχουν πολλές στρατηγικές πιθανές για τη μείωση της μόλυνσης φουμονισίνης σε καλαμπόκι μέσω γενετικής τροποποίησης. Στο φυτό του καλαμποκιού φαίνεται να προκαλείται συσσώρευση φουμονισίνης από περιβαλλοντικές πιέσεις, όπως η ξηρασία και οι υψηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν μεγαλύτερες προσπάθειες ως προς την ανάπτυξη και καλλιέργεια υβριδίων καλαμποκιού που είναι λιγότερο ευάλωτες σε αυτές τις πιέσεις. Ωστόσο, η ικανότητα για την επίτευξη της επιθυμητής αντοχής μπορεί να είναι περιορισμένη λόγω των περίπλοκων γενετικής ή της σύνδεσης με ανεπιθύμητα αγρονομικά χαρακτηριστικά (Duvick, 2001).

Διαγονιδιακές προσεγγίσεις για την επίτευξη μειωμένων επιπέδων φουμονισίνης στο καλαμπόκι, συμπεριλαμβανομένων της αυξημένης αντίστασης σε έντομα και των μυκητιακών λοιμώξεων, δεν είναι εφικτές. Υπάρχουν πρόσφατες αναφορές που δείχνουν ότι είναι δυνατή σε γενετικά τροποποιημένο καλαμπόκι, να γίνει έκφραση γονιδίων που παράγουν ένζυμα αποικοδόμησης φουμονισίνης στο φυτό του καλαμποκιού. Επί του

παρόντος, οι διαγονιδιακές προσεγγίσεις για τον έλεγχο φουμονισίνης δεν έχουν φθάσει σε εμπορικό στάδιο (Dunick, 2001).

Τα διαθέσιμα επιδημιολογικά στοιχεία αποδεικνύουν τη σχέση μεταξύ της έκθεσης φουμονισίνης και του καρκίνου του οισοφάγου, του καρκίνου του ήπατος και των βλαβών του νευρικού σωλήνα σε ορισμένες περιοχές του κόσμου. Ωστόσο, χρειάζεται περισσότερη δουλειά για να εξακριβωθεί η σχέση μεταξύ της κατανάλωσης φουμονισίνης και της επίπτωσης του καρκίνου και άλλων χρόνιων ασθενειών. Για να υιοθετηθεί μια ακριβή μέτρηση της ανθρώπινης έκθεσης σε φουμονισίνες, πρέπει να προσδιοριστεί ένας αποτελεσματικός βιοδείκτης γι' αυτή την τοξίνη .

Χρειάζεται περισσότερη δουλειά για τη μελέτη μετά τη συγκομιδή των μεθόδων ελέγχου των φουμονισινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Ειδικότερα, η έρευνα είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων της επεξεργασίας σε αυτά και σε άλλες τοξίνες από μύκητες του γένους *Fusarium*. Μελετώντας τις επιπτώσεις όσον αφορά τη σταθερότητα των φουμονισινών είναι περίπλοκο λόγω της έλλειψης αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων. Οι φουμονισίνες δεν είναι πάντοτε ομοιόμορφες. Εκχυλίζονται και ανακτώνται από διαφορετικές μήτρες, ειδικότερα αυτές που έχουν υποστεί επεξεργασία. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που εξάγουν αποτελεσματικά τις πιο βιολογικά δραστικές φουμονισίνες ανάλογικά από μια ποικιλία τροφίμων, όπου απαιτούνται ακριβείς και εκτεταμένες έρευνες της παγκόσμιας προμήθειας τροφίμων. Τέλος, χρειάζεται περισσότερη δουλειά για να προσδιοριστούν και να καθοριστούν οι τοξικολογικές επιπτώσεις των προϊόντων που προκύπτουν από τη φυσική αποσύνθεση ή τις χημικές τροποποιήσεις των φουμονισινών.

2. ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

2.1 Χημικές δομές

Οι φουμονισίνες είναι μια ομάδα που αποτελείται από δεκαπέντε στενά συνδεδεμένες μυκοτοξίνες που συχνά συναντώνται στον αραβόσιτο και η πιο σημαντική είναι η B1. Προσδιορίστηκαν κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, αν και τα αποτελέσματά τους για τα άλογα είχαν αναγνωριστεί τουλάχιστον πριν από 150 έτη. Είναι πολικοί μεταβολίτες που παράγονται από διάφορα είδη μυκήτων συμπεριλαμβανομένων των *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* και *F. napiforme*. Οι δομές τους βασίζονται σε μια μακρά υδροξυλιωμένη αλυσίδα υδρογονάνθρακα που περιέχει μεθύλιο και αμινομάδες. Δύο ομάδες υδροξυλίου είναι εστεροποιημένες με δύο προπανοδιόλη-1, 2, 3-τρι-καρβοξυλικά οξέα (Fumonisinins, n.d.).

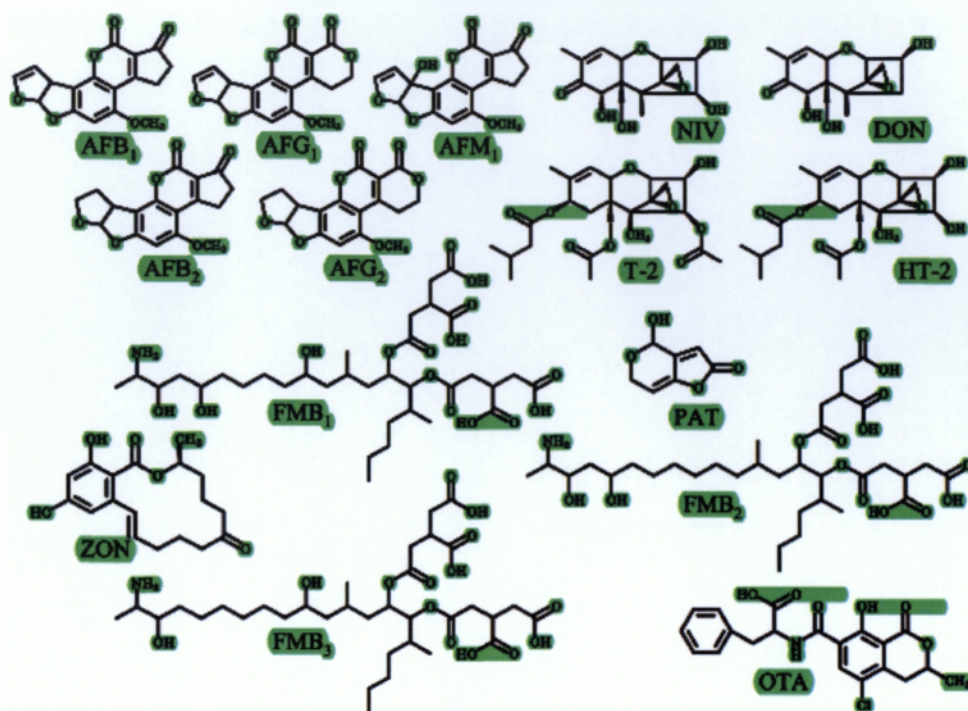
Η Φουμονισίνη B1 διαφέρει από τη φουμονισίνη B2 στο ότι περιέχει μια επιπλέον ομάδα υδροξυλίου στη θέση 10. Οι Φουμονισίνες εμφανίζονται συχνά μαζί με άλλες μυκοτοξίνες, οι οποίες μπορούν να περιλαμβάνουν για παράδειγμα, τις αφλατοξίνες, δεσοξυνιβαλενόλη και την ζεαραλενόνη (Fumonisinins, n.d.). Οι φουμονισίνες B1 και B2 ήταν οι πρώτες που ανακαλύφθηκαν και οι δομές τους έχουν προσδιοριστεί. Επιπλέον οι τέσσερις τύποι φουμονισινών των (B3, B 4, A1 και A2) έχουν διαχωριστεί και οι δομές τους προσδιορίζονται. Μεταξύ αυτών, συχνά προκαλείται φυσική μόλυνση από τις φουμονισίνες B1, B2 και B3 (FAMIC, n.d.).

2.2 Φυσικές και χημικές ιδιότητες των φουμονισινών

Οι φουμονισίνες είναι μια ομάδα ενώσεων περισσότερες από δέκα μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium verticillioides* και συναφών ειδών σε όλο τον κόσμο σε καλαμπόκι. Είναι πολικές ενώσεις που είναι διαλυτές στο νερό και σε υδατικά διαλύματα μεθανόλης και ακετονιτριλίου αλλά δεν είναι διαλυτές σε μη πολικούς διαλύτες. Λίστες σχετικά με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των φουμονισινών μπορούν να ληφθούν από τον (Scott,1993, Blackwell et al., 1995, 1996, Vesconder et al., 1992, Bezuidenhout et al., 1988, Sydenham et al.,1996a and ApSimon ,2001). Αντίθετα με τις περισσότερες μυκοτοξίνες, οι φουμονισίνες δεν έχουν μια κυκλική δομή. Αρκετές χημικά συναφείς ομάδες ή σειρές (A, B, C και P) των φουμονισινών έχουν απομονωθεί από

καλλιέργειες *F. verticillioides* ή / και από το καλαμπόκι με βάση τα τρόφιμα. Από τις μορφές που έχουν χαρακτηριστεί, η φουμονισίνη B1 (FB1), φουμονισίνη B2 (FB2) και η φουμονισίνη B3 (FB3) (η σειρά B φουμονισίνες) είναι οι κύριες μορφές που βρίσκονται στα τρόφιμα (Bezuidenhout et al., 1988, Cawood et al., 1991, Musser & Plattner, 1997). Η Φουμονισίνη B1, γνωστή ως μακροφουζίνη (macrofusin), είναι η πιο άφθονη της οικογένειας φουμονισίνης και συνήθως περιέχει περίπου 70 - 80% της συνολικής περιεκτικότητας σε φουμονισίνη του *F. verticillioides* και σε φυσικά μολυσμένα τρόφιμα (Ross et al., 1992, Rheeder et al., 2002). Οι Φουμονισίνες B2 και B3 συνήθως απαρτίζουν το 15 - 25% και 3 - 8% αντιστοίχως της φουμονισίνης στο περιεχόμενο των τροφίμων. Η σειρά A των φουμονισινών που απομονώνονται από καλλιέργειες του *F. verticillioides* και από ολόκληρο καλαμπόκι, διαφέρει από τη σειρά B με την παρουσία μιας N-ακετυλομάδας αμιδίου αντί μιας αμινομάδας στη θέση C-2 (Cawood et al., 1991). Η σειρά C των φουμονισινών, η οποία έχει απομονωθεί από μουχλιασμένο καλαμπόκι, είναι χημικά παρόμοια με τη σειρά B, εκτός του ότι η C-1 τερματική ομάδα μεθυλίου λείπει στη σειρά C των φουμονισινών (Seo and Lee, 1999). Οι Musser et al., (1996) απομόνωσαν και χαρακτήρισαν μια νέα σειρά των φουμονισινών, οριζόμενη η σειρά P, από καλλιέργειες *F. proliferatum* που καλλιεργούνται σε καλαμπόκι. Αυτές οι ενώσεις περιέχουν 3-υδροξυπυριδινίου χαρακτηριστική ομάδα στη θέση C-2 θέση στην σπονδυλική στήλη, αντί της αμίνης που βρέθηκε στην B σειρά των φουμονισινών (Musser et al., 1996).

Η Φουμονισίνη B1 (FB1) έχει τον εμπειρικό τύπο $C_{34}H_{59}NO_{15}$ και σχετική μοριακή μάζα: 721. Η καθαρή ουσία είναι μία λευκή υγροσκοπική σκόνη που είναι διαλυτή στο νερό, ακετονιτρίλιο-νερό ή μεθανόλη. Είναι διαλυτές σε πολικούς διαλύτες λόγω του ότι διαθέτουν 4 ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες, τις ομάδες υδροξυλίου και την αμινομάδα. Λόγω του ότι η διαλυτότητά τους είναι ιδανική σε οργανικούς διαλύτες, όπως είναι το χλωροφόρμιο και το εξάνιο, χρησιμοποιούνται συνήθως στην ανάλυση μυκοτοξινών και με βάση αυτό εξηγείται η δυσκολία στην αρχική αναγνώρισή τους. Οι φουμονισίνες B1 και B2 παραμένουν σταθερές σε μεθανόλη, εφόσον φυλάσσεται σε θερμοκρασία $-18^{\circ}C$ σε αντίθεση στους $25^{\circ}C$ και πάνω όπου μπορούν να υποβαθμιστούν. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι μπορούν να παραμείνουν σταθερές πάνω από έξι μήνες στους $25^{\circ}C$ σε ακετονιτρίλιο-νερό (1:1) (Fumonisins, n.d.). Στην εικόνα 1 που ακολουθεί απεικονίζονται οι δομές των βασικών ομάδων μυκοτοξινών (Tamura et al., 2012).



Εικόνα 1. Δομές των μυκοτοξινών (Tamura et al., 2012).

Αρκετές αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των φουμονισινών, όπως χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA), αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας και υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή σκέδασης φωτός, φθορισμομετρική ανίχνευση ή φασματομετρία μάζας. Μεταξύ αυτών των μεθόδων, η χρήση της HPLC είναι ευρέως διαδεδομένη, καθώς αυτό το όργανο έχει την πιο εύκολη λειτουργία αλλά είναι λιγότερο πολύπλοκο σε σχέση με τις άλλες συσκευές ανάλυσης. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης χρωμοφόρων ομάδων στη χημική δομή των φουμονισινών, είναι απαραίτητη η χημική τροποποίηση πριν την ανάλυση με HPLC.

Παρόλο που χρησιμοποιούνται διάφορα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης, όπως η φλουροεσκαμίνη, 4-φθορο7-νιτρο-βενζοφουραζάνης (NBDF), 9φθωροενυλμεθυλ-χλωροφορμικό (FMOC) και ναφθαλινο-2 ,3-δικαρβοξαλδεΐδης (NDA), το αντιδραστήριο ορθο-φθαλαλδεΐδη (OPA) προτείνεται ως το καλύτερο από διάφορες εργαστηριακές μελέτες (Ma et al., 2012).

2.3 Μέθοδοι απομόνωσης και καθαρισμού φουμονισινών

Οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των μυκοτοξινών βασίζονται στην ορθή εκχύλιση και καθαρισμό των ενώσεων αυτών, εξαίρεση πιθανόν να αποτελεί η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) η οποία δεν απαιτεί καθαρισμό (Chu et al., 1992). Τα βήματα αυτά είναι σημαντικά για ένα επιτυχημένο πρωτόκολλο, και καθώς αυτά είναι χρονοβόρα (η προετοιμασία του δείγματος είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει το χρόνο που διαρκεί μια ανάλυση και αντιστοιχεί στα 2/3 του συνολικού χρόνου της ανάλυσης) μπορούν να επηρεάσουν την τελική επιλογή της διαδικασίας ανίχνευσης. Η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των μυκοτοξινών από το βιολογικό υλικό εξαρτάται από τη δομή της τοξίνης. Οι φουμονισίνες ως πολικοί μεταβολίτες απαιτούν την παρουσία του νερού, το οποίο συνδυάζεται και με οργανικούς διαλύτες (Shephard, 1998).

Για την απομόνωση υδρόφοβων τοξινών όπως οι αφλατοξίνες χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες. Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης εξαρτάται επίσης από το υλικό (τροφή) το οποίο θα εκχυλιστούν οι ενώσεις, καθώς τα διάφορα χημικά μίγματα μπορούν να το επηρεάσουν (Wilkes et al., 1998). Η χρήση χλωριωμένων χημικών ουσιών για την εκχύλιση μειώνεται σταδιακά καθώς έχει αποδειχθεί πως προκαλεί οικολογικούς κινδύνους (Montreal Protocol, 1998). Η διαδικασία καθαρισμού που χρησιμοποιείται στο πρωτόκολλο είναι το πιο σημαντικό βήμα, καθώς η καθαρότητα του δείγματος επηρεάζει την ευαισθησία των αποτελεσμάτων. Όταν η προς ανάλυση ένωση βρίσκεται σε ίχνη υπάρχει η πιθανότητα να παρεμποδιστεί και να καλυφθεί από άλλες ουσίες οι οποίες βρίσκονται όχι μόνο στη «μήτρα» αλλά και στα χημικά, τα υλικά αλλά και τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην χρησιμοποιούμενη τεχνική. Τα υάλινα σκεύη πρέπει να είναι απαλλαγμένα από υπολείμματα που μολύνουν όπως είναι τα αλκαλικά απορρυπαντικά, τα οποία σχηματίζουν άλατα με τις ενώσεις και οδηγούν σε μικρότερα ποσοστά ανίχνευσης (AOAC, 1997). Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι, που έχουν καταγραφεί για τη χρήση και τον καθαρισμό των δειγμάτων των μυκοτοξινών (Scott et al., 1995) και ορισμένες από εκείνες που χρησιμοποιούνται ευρέως περιγράφονται παρακάτω. Μεταξύ αυτών των μεθόδων είναι η “Εκχύλιση Υγρού- Υγρού” (LLE), η μέθοδος Εκχύλισης Υπερκρίσιμου ρευστού”(SFE), η μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).

Η μέθοδος εκχύλισης “Υγρού - Υγρού” (LLE) βασίζεται στη διαφορά διαλυτότητας της τοξίνης σε υδατική φάση και σε μη αναμίξιμη οργανική φάση, με σκοπό την εκχύλιση των ενώσεων στην μία φάση αφήνοντας τις άλλες ενώσεις εκτός των

φουμονισινών στην άλλη φάση. Οι διαλύτες όπως το εξάνιο και το κυκλοεξάνιο χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση μη πολικών προσμίξεων, όπως τα λιπίδια και η χοληστερόλη. Η διαδικασία είναι αποτελεσματική για πολλές τοξίνες και λειτουργεί ικανοποιητικά σε μικρής κλίμακας παρασκευάσματα (Bauer, Gareis et al., 1987). Ωστόσο είναι χρονοβόρα και εξαρτάται από το υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε και από το ποιες ενώσεις έχουν προσδιοριστεί. Τα μειονεκτήματα αφορούν σε πιθανή απώλεια του δείγματος λόγω της προσρόφησης τους πάνω στο γυαλί.

Στη μέθοδο “Εκχύλισης Υπερκρίσιμου ρευστού”(SFE), χρησιμοποιείται ένα υπερκρίσιμο ρευστό όπως το CO₂ για να εξάγει την ζητούμενη ένωση από το υλικό στο οποίο βρίσκεται. Αυτό λειτουργεί σωστά λόγω της μεγάλης διαλυτικής ικανότητας και της πυκνότητας του υγρού διαλυτοποίησης. Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού σε τριχοειδείς στήλες με ενώσεις πυριτίου (silica) έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό τοξινών, (Young et al., 1992) όμως δεν θεωρείται επιτυχής τεχνική λόγω διαφόρων προβλημάτων (Engelhardt et al., 1993). Επίσης αυτή η τεχνική δεν είναι κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας λόγω του υψηλού κόστους και της ανάγκης εξειδικευμένου εξοπλισμού (Holcomb et al., 1996).

Η βασική αρχή της τεχνολογίας της Εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) είναι μια παραλλαγή των χρωματογραφικών τεχνικών που βασίζονται σε στήλες μιας χρήσης που έχουν ως υλικό πλήρωσης (στατική φάση) πήγμα ενώσεων του πυριτίου σε συνδεδεμένες φάσεις. Το δείγμα διαλύεται σε έναν διαλύτη, υπό μειωμένη πίεση, ξεπλένεται, όπου απομακρύνονται οι περισσότερες προσμίξεις και εκλύεται σε έναν άλλο διαλύτη (EMAN, 2003). Αυτό το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ανοιχτή ή κλειστή γραμμή. Αυτές οι στήλες έχουν υψηλή ικανότητα δέσμευσης μικρών μορίων.

Οι στήλες αυτές περιέχουν διάφορα συνδεδεμένα υλικά πλήρωσης, όπως silica gel, C-18 (δεκαοκτυλοσιλάνιο), Florisil, φαινύλιο, αμινοπροπύλιο, υλικά ιοντοανταλλαγής, τόσο ανιονικά όσο και κατιονικά, καθώς και υλικά ανοσοσυγγένειας (MIPs) (Zambonin et al., 2001, Jornet et al., 2000, Visconti et al., 2000, Sharma et al., 2001, Visconti et al., 1998, Supelco, et al., 1998, Mateo et al., 2002, Vatinno et al., 2008, Katerere et al., 2008, Giraudi et al., 2007, Muñoz et al., 2006, Hernández et al., 2006). Η ανταλλαγή ανιόντων σε συνδεδεμένες φάσεις παρέχει καλό καθαρισμό των εκχυλισμάτων που περιέχουν φουμονισίνες (Sydenham et al., 1992) .

Η μέθοδος (SPE) έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την (LLE), π.χ. χρησιμοποιεί λιγότερο διαλύτη και είναι ταχύτερη. Εκτός από τον καθαρισμό του

δείγματος, ταυτόχρονα επιτυγχάνεται και προσυμπύκνωση του δείγματος διευκολύνοντας τις μεθόδους ανίχνευσης.

Η (SPE) έχει ευρεία χρήση και αποτελεί αναπόσπαστο μέρος σε πολλά πρωτόκολλα εκχύλισης και ανίχνευσης (Turner et al., 2008).

Όσον αφορά την χρήση της SPE στον προσδιορισμό των φουμονισινών B1 (FB1) και B2 (FB2), έχει αναφερθεί η χρησιμοποίηση ισχυρών ανιονανταλλακτικών στηλών για τον καθαρισμό πλάσματος και εκχυλισμάτων ούρων καθώς και η χρήση ανάστροφης φάσης C-18 στηλών για τον καθαρισμό εκχυλισμάτων περιττωμάτων (Shepherd et al., 1995). Η FB2 στα καθαρισμένα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με RP-HPLC με ανιχνευτή φθορισμού μετά από παραγωγοποίηση των φουμονισινών με το αντιδραστήριο o-phthalaldehyde (OPA).

Στις μέρες μας η τεχνική SPE χρησιμοποιείται με μεγαλύτερη συχνότητα στις αναλύσεις ρουτίνας μυκοτοξινών. Η πυριτική πηκτή (silica gel) είναι ένα γνωστό υλικό, που χρησιμοποιείται συχνά για SPE (Turner et al., 2008). Η επιφάνεια των σωματιδίων της πυριτικής πηκτής (silica gel) είναι ετερογενής, με την παρουσία διαφόρων ομάδων σιλανόλης οι οποίες μπορούν να συνδεθούν με τις προς ανάλυση ενώσεις μέσω των πολλαπλών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η προσθήκη των διαφόρων λειτουργικών ομάδων μπορεί να διευρύνει την εφαρμογή της silica. Συνήθως αυτό γίνεται με την αντίδραση ενός οργανοσιλανίου με ένα παράγωγο μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (e.g. C-18 phase) (Supelco, 1998). Η πυριτική πηκτή (silica gel) μπορεί να χρησιμοποιηθεί άπευθείας είτε μετά από τροποποίηση για την ανίχνευση των μυκοτοξινών. Πιο συχνά, όμως, είναι μια υδρόφοβη στατική φάση η οποία χρησιμοποιείται στην ανάλυση αυτών των τοξινών σε περιβαλλοντικά δείγματα καθώς και σε δείγματα τροφίμων, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολικά και μη πολικά συστήματα διαλυτών (Turner et al., 2008).

Υλικά ιόντων ανταλλαγής χρησιμοποιούνται συχνά στην SPE για απομόνωση και προ-συμπύκνωση των τοξινών που βρίσκονται σε υδατικά διαλύματα, (π.χ. φουμονισίνες). Χρησιμοποιούν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ του στοιχειωμένου μορίου και των φορτισμένων ομάδων που είναι συνδεδεμένες με το πυριτικό υλικό (Supelco, 1998). Το pH των δειγμάτων ρυθμίζεται ώστε οι δύο ομάδες να φορτίζονται και τα δείγματα να διηθούνται μέσα από τις στήλες SPE. Το υλικό που δεσμεύεται απομακρύνεται με την προσθήκη ενός ισχυρού ιοντικού διαλύματος ή μεταβάλλοντας το pH. Υπάρχουν διάφορων τύπων ανιονικές και κατιονικές φάσεις. Η στατική φάση SAX (ισχυρή ανταλλαγή ανιόντων) είναι το ιδανικότερο υλικό για την

εκχύλιση των μυκοτοξινών. Οι Pelegri et al., αναφέρουν ένα πρωτόκολλο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ωχρατοξίνης χρησιμοποιώντας στήλες SAX για τον καθαρισμό.

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι υλικά που βασίζονται σε αντίσωμα ΙΑ, είναι μεγάλης αξίας για την ανάλυση των μυκοτοξινών (Visconti et al., 2000, Sharma et al., 2001, Mateo et al., 2002, Scudamore et al., 1998, Solfrizzo et al., 1998, Zimmerli et al., 1995). Προσφέρουν άριστη ανάκτηση στον αναλυτή, λόγω της εξειδίκευσης που επιτυγχάνεται με τη χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων. Το κύριο μειονέκτημα της χρήση αυτών των υλικών είναι ότι έχουν υψηλό κόστος, διότι κάθε στήλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά (λόγω μετουσίωσης των αντισωμάτων).

2.4 Μέθοδοι διαχωρισμού φουμονισινών σε τάξεις

Υπάρχουν διάφοροι τύποι χρωματογραφικών μεθόδων για την ανάλυση των μυκοτοξινών (Shephard, 1998, Valenta, 1998). Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), είναι η πιο γνωστή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των μυκοτοξινών, η οποία προσφέρει τη δυνατότητα για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων χωρίς μεγάλο κόστος (Holcomb, et al., 1992, Lin et al., 1990, 1998, Betina et al., 1985, 1993, Scott, et al., 1985, 1987, Kok, 1994). Η χρήση της TLC ανάλυσης για τις μυκοτοξίνες εξακολουθεί να είναι γνωστή τόσο για ποσοτικούς όσο και για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς. Αυτό οφείλεται στον μεγάλο αριθμό δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν, το χαμηλό λειτουργικό κόστος και την εύκολη ταυτοποίηση των ενώσεων, με τη χρήση UV φασματοφωτομετρικής ανάλυσης. Όπως συμβαίνει και με την HPLC, αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να επιτυγχάνουν τα καλύτερα αποτελέσματα για κάθε ξεχωριστή τάξη μυκοτοξίνης και για αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο μονοδιάστατη όσο και δισδιάστατη TLC ανάλυση (Lin et al., 1998).

Ωστόσο, μεγάλη προϋπόθεση για την TLC έχει η προετοιμασία και ο καθαρισμός του δείγματος ο οποίος εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο καθώς και από τις ιδιότητες και τον τύπο των τοξινών που μελετώνται. Η silica είναι μια από τις πιο συνήθεις στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο TLC (Yu et al., 1991). Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα που επιβεβαιώνουν την εφαρμογή της (Richardson et al., 1985, Frohlich et al., 1988, Martin et al., 1986, Stahr et al., 1985, Romer, 1986, Edwards et al., 1987, Jarvis et al., 1992). Μερικές έχουν τροποποιηθεί και μερικές είναι μη τροποποιημένες (Bradburn et al., 1990). Συνδεδεμένες ομάδες στατικών φάσεων είναι οι

δεκαοκτώλιο, φαινύλιο, φάσεις εμποτισμένες με οργανικό οξύ (Colinski et al,1984, Gimeno,1984) και φάσεις με πολυαμίδιο(Aschsc,1992). Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα παραδείγματα των πρωτοκόλλων της TLC που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των μυκοτοξινών.

Πίνακας 3. Παραδείγματα πρωτοκόλλων της TLC που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των μυκοτοξινών.

Toxin	Protocol	Mode of Detection	Matrix
Aflatoxin	Silica gel	Fluorescence densitometry	Rice Wine
Citrinin	F254 fluorescent silica gel TLC	Fluorescent	Brewed beers
Citrinin	Silica gel pre-coated G-25 HR TLC plates	Fluorescent	Apples and pears
Citrinin	Silica gel 60 TLC	Fluorescent	Fungi isolated from grapes
Citrinin	Silica gel TLC plates	Fluorescent	Grain samples and fungal cultures
Citrinin	TLC plates previously impregnated with 10% glycolic acid solution	Fluorescent	Ethanol, in corn and barley
Dcoxynialenol	Silica gel TLC plates	Fluorescent	Grains and animal feed
Fumonisin B1	Silica gel TLC plates	Fluorescent	Maize
Trichothecenes	Comparison with HPLC for detection	UV and Fluorescent	Food
Trichothecene	Silica gel TLC plates	Fluorescent	Animal feed(grains)
OTA	Silica gel	Fluorescence densitometry	Rice
Zearalenone	Silica gel	Fluorescence detection and quenching	Cereals

Πηγή: Turner et al., 2008

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται στη σύγχρονη ανάλυση των μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας διάφορα προσροφητικά υλικά, ανάλογα με τη φυσική και χημική δομή των μυκοτοξινών. Χρησιμοποιούνται στήλες κανονικές και ανάστροφης φάσης για το διαχωρισμό και τον καθαρισμό των τοξινών με βάση την πολικότητά τους.

Οι πιο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης χρησιμοποιούν ανιχνευτές UV ή φθορισμού, οι οποίες βασίζονται στην παρουσία μιας χρωμοφόρου ομάδας στα μόρια. Ορισμένες τοξίνες φθορίζουν (π.χ. OTA, AFT, CIT) και μπορούν να ανιχνευτούν άμεσα με ανιχνευτή φθορισμού HPLC - FD (Valenta et al., 1998), όμως υπάρχουν και άλλες που δεν μπορούν. Τέτοιες είναι οι φουμονισίνες που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium*. στερούνται κατάλληλης χρωμοφόρου ομάδας και ο προσδιορισμός τους απαιτεί παραγωγολογία (EMAN, 2003, Shephard, 1998).

Η Αέρια Χρωματογραφία (GC), χρησιμοποιείται τακτικά για την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση των μυκοτοξινών στα δείγματα τροφίμων και πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για αυτά τα υλικά. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται ο φασματογράφος μάζας (MS), ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID), ο ανιχνευτής Fourier μετασχηματισμού υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FTIR), καθώς και τεχνικές ανίχνευσης πτητικών προϊόντων (Young et al, 1994, Suzuki et al., 1981, Onji et al., 1998). Οι περισσότερες μυκοτοξίνες δεν είναι πτητικές και για αυτό πρέπει να παραγοντοποιηθούν για την ανάλυση με GC (Scott, 1995). Αρκετές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την παραγοντοποίηση των μυκοτοξινών. Χημικές αντιδράσεις όπως σιλανοποίηση (silylation) ή πολυφθοροακυλίωση (polyfluoroacylation) χρησιμοποιούνται προκειμένου να ληφθεί ένα πτητικό υλικό (Scott, 1995). Αρκετά παραδείγματα επιτυχούς χρησιμοποίησης εφαρμογής της GC στην ανάλυση των μυκοτοξινών, υπάρχουν ωστόσο αρκετά μειονεκτήματα. Αρχικά, τα δείγματα προς ανάλυση πρέπει να είναι πτητικές ενώσεις ή ενώσεις που μπορούν να γίνουν πτητικές. Περαιτέρω, η θερμική σταθερότητα είναι ένα πρόβλημα, διότι η θέρμανση υποβαθμίζει μερικές φορές τα δείγματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται απώλεια δείγματος (εξάτμιση) κατά την έγχυση του λόγω της ελαφής του δείγματος με τον πολύ θερμό εισαγωγέα (Turner et al., 2008). Στον πίνακα 4 παρατίθενται παραδείγματα της ανίχνευσης των κοινών μυκοτοξινών με GC.

Πίνακας 4. Παραδείγματα πρωτοκόλλων GC για κοινές μυκοτοξίνες.

Toxin	Protocols	Detection	Matrix
Alternariol,altenuene	Derivatisation by silylation	GC-MS	Human urine
Deoxynivalenol, T-2(+6 others)	Direct analysis without derivatisation	GC-MS	Cereals
Deoxynivalenol and OTA	Gc-Ms combined with electronic nose	GC-MS	Barley grains
Fumonisin B1	Gc-Ms method using B1 as internal standard	GC-MS	
	Before derivatisation		
Trichothecenes	Gc	Flame ionisation	Wheat
Trichothecenes	Trichothecenes in fungal cultures using Gc tandem	GC-MS	Fungal Cultures
	Ms		
Trichothecene	Supercritical fluid extraction followed by detection	Electron capture detection(GC-ECD)	Wheat
Sterigmatocystin(STE)	Gc-Ms along with other methods for comparison	UV detection	Food samples
	Such as LC-MS,LC/MS/MS,and LC-UV methods for		
	STE determination		
Zearalenone	GC	Electron capture detection (GC-ECD)	Poultry feed

Πηγή: Turner et al., 2008

Η Μέθοδος Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης (CE), χρησιμοποιείται στην περίπτωση παρόμοιων δομικά ενώσεων φουμονισινών οι οποίες ανάλογα με το φορτίο και τη μάζα τους μετακινούνται διαφορετικά με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και έτσι διαχωρίζονται. Ο γρήγορος διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, αποκλείοντας έτσι την ανάγκη για χρησιμοποίηση οργανικών διαλυτών (Turner et al., 2008).

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι υπάρχουν και άλλες τεχνικές διαχωρισμού οι οποίες είναι σε θέση να λειτουργούν σε συνδυασμό με τις χρωματογραφικές μεθόδους ή σε αντικατάσταση αυτών. Μεταξύ αυτών είναι η ELISA που πρόσφατα έγινε πολύ γνωστή λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους της και της εύκολης εφαρμογής της (Morgan, 1989, Goryacheva et al., 2007). Τα εμπορικά διαθέσιμα υλικά (κίτ) της ELISA για την ανίχνευση των μυκοτοξινών συνήθως βασίζονται σε ένα ανταγωνιστικό προσδιορισμό που χρησιμοποιεί είτε ένα πρωτεΐν ειδικό αντίσωμα για το μόριο στόχος ή μία σύζευξη ενός ενζύμου και του απαιτούμενου στόχου (Morgan, 1989, Stanker et al., 2008, Pestka et al., 1995). Το σύμπλοκο που σχηματίζεται στη συνέχεια αλληλεπιδρά με ένα χρωμογόνο υπόστρωμα για να δώσει ένα μετρήσιμο αποτέλεσμα. Μπορούν να είναι φορητά, γρήγορα και είναι πολύ εξειδικευμένα, καθώς και απλά στη χρήση. Το μειονέκτημα αυτών των κίτ έγκειται στο γεγονός ότι είναι για μία μόνο χρήση, το οποίο μπορεί να αυξήσει το κόστος όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός δειγμάτων. Επιπλέον, η ανταγωνιστική ELISA μειονεκτεί στο ότι υπάρχει περιορισμένο εύρος ανίχνευσης λόγω της χαμηλής ευαισθησίας των αντισωμάτων, τα οποία είναι μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά. Η ανάπτυξη αντισωμάτων για τις περισσότερες μυκοτοξίνες, λόγω του μικρού μεγέθους τους, απαιτεί την ανάπτυξη ενός μορίου φορέα που είναι συνήθως, μια πρωτεΐνη (π.χ. αλβουμίνη βόειου ορού), για να επιτευχθεί η ανοσογονικότητα. Η διαδικασία σύζευξης μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνη για μειώσεις στην δοκιμασία επιλεκτικότητας (Turner et al., 2008).

2.5 Νομοθετικά όρια των φουμονισινών

2.5.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

- **Κανονισμός 1881/2006**

Ο κανονισμός 1881 εκδόθηκε τη 19^η Δεκεμβρίου του 2006 και αναφέρεται στον καθορισμό των μέγιστων επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα. Ο κανονισμός 466/2001 της επιτροπής , της 8^{ης} Μαρτίου του 2001 , για ορισμένες προσμίξεις στα τρόφιμα τροποποιήθηκε σημαντικά πολλές φορές. Είναι απαραίτητο να τροποποιηθούν πάλι τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ορισμένες ουσίες που είναι επιμολυντές των τροφίμων. Για την προστασία δημόσιας υγείας τα προϊόντα που περιέχουν ουσίες που υπερβαίνουν τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα δεν θα διατίθενται στην αγορά. Επίσης θα πρέπει για τις ουσίες αυτές να υπάρχουν κατάλληλες διατάξεις επισήμανσης.

Η επιστημονική επιτροπή τροφίμων (EET) σχετικά με τις τοξίνες του γένους *Fusarium* θέσπισε για τις φουμονισίνες τον Οκτώβριο του 2000, 2 μg/kg. Με βάση της επιστημονικές γνώμες και την αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης πρέπει να καθοριστούν μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις φουμονισίνες .Οι κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης , και ιδίως κατά την ανθοφορία , επηρεάζουν σημαντικά την περιεκτικότητα σε τοξίνες από μύκητες του γένους *Fusarium*. Η σύσταση 2006/583/EK της επιτροπής της 17^{ης} Αυγούστου 2006, σχετικά με την πρόληψη και τη μείωση των τοξινών από μύκητες του γένους *Fusarium* στα δημητριακά και τα προϊόντα δημητριακών , περιλαμβάνει γενικές αρχές για την πρόληψη και τη μείωση της επιμόλυνσης από τους μύκητες του γένους που προαναφέρθηκε (φουμονισίνες) στα δημητριακά .

Όσον αφορά τον αραβόσιτο, δεν είναι ακόμη γνωστοί όλοι οι παράγοντες που συντελούν στη δημιουργία τοξινών από μύκητες του γένους *Fusarium*, ιδίως των φουμονισινών B1 και B2. Λόγω των χαμηλών επιπέδων επιμόλυνσης με τοξίνες του ίδιου γένους που παρατηρούνται στο ρύζι δεν προτείνονται μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για το προϊόν αυτό και προϊόντα με βάση αυτό. Στον πίνακα 5 που ακολουθεί παρατίθενται τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα των φουμονισινών που επιμολύνουν τα τρόφιμα σε αντίστοιχο άθροισμα της FB1 και FB2 σε (ppm) (Κανονισμός EK 1881/2006/EC).

Πίνακας 5. Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα .

2.6	Φουμονισίνες	Άθροισμα της B1 και B2
2.6.1	Μη μεταποιημένος αραβόσιτος ⁽¹⁸⁾	2 000 ⁽²³⁾
2.6.2	Αλεύρι αραβοσίτου, σιμιγδάλι αραβοσίτου, χονδραλεσμένος αραβόσιτος, φύτρα αραβοσίτου και ραφινάρισμένο αραβοσιτέλαιο ⁽²¹⁾	1 000 ⁽²³⁾
2.6.3	Τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 2.6.2 και 2.6.4	400 ⁽²³⁾
2.6.4	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά ⁽³⁾ ⁽⁷⁾	200 ²⁴⁾

Πηγή: <http://eur-lex.europa.eu>

- **Κανονισμός 1126/2007**

Ο κανονισμός 1126 εκδόθηκε τη 28^η Σεπτεμβρίου του 2007 και αναφέρεται στην τροποποίηση του κανονισμού 1881/2006 σχετικά με τον καθορισμό των μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες που επιμολύνουν τα τρόφιμα όσον αφορά τις τοξίνες από μύκητες του γένους *Fusarium* στον αραβόσιτο και στα προϊόντα αραβοσίτου. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, για τις περιόδους συγκομιδής 2005 και 2006 διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα στον αραβόσιτο σε σχέση με τις περιόδους συγκομιδής 2003 και 2004, ιδίως όσον αφορά τις φουμονισίνες. Συνεπώς, τα προβλεπόμενα επίπεδα φουμονισινών για τον αραβόσιτο δεν είναι εφικτά υπό ορισμένες κλιματικές συνθήκες , ακόμα και με την εφαρμογή προληπτικών μέτρων , στο μέτρο του δυνατού. Συνεπώς, τα μέγιστα επίπεδα πρέπει να τροποποιηθούν προκειμένου να αποφευχθεί η δυσλειτουργία της αγοράς με παράλληλη διατήρηση υψηλού επιπέδου προστασίας της δημόσιας υγείας με την εξασφάλιση ότι η ανθρώπινη έκθεση θα παραμείνει πολύ χαμηλότερη από την

καθοδηγητική τιμή που επιβάλλεται για την υγεία. Στον πίνακα 6 που ακολουθεί παρατίθενται τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα των φουμονισινών που επιμολύνουν τα τρόφιμα σε αντίστοιχο άθροισμα της FB1 και FB2 σε (ppm). Από τον πίνακα 6 παρατηρείται ότι σε σχέση με τον Κανονισμό 1881/2006 στον παρόν Κανονισμό έχουν προστεθεί επιπλέον δύο εξαιρέσεις που εφαρμόζονται μόνο στον αραβόσιτο που προορίζεται αποκλειστικά για επεξεργασία με τη διαδικασία της υγρής άλεσης (παραγωγή αμύλου)(Κανονισμός ΕΚ 1126/2007/EC).

Πίνακας 6. Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα με την προσθήκη δυο εξαιρέσεων του αραβόσιτου.

2.6	Φουμονισίνες	Άθροισμα της B1 και B2
2.6.1	Μη μεταποιημένος αραβόσιτος ⁽¹⁸⁾ , εξαιρουμένου του μη μεταποιημένου αραβόσιτου που προορίζεται για επεξεργασία με υγρή άλεση (*)	4 000 ⁽²³⁾
2.6.2	Αραβόσιτος που προορίζεται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 2.6.3 και 2.6.4	1 000 ⁽²³⁾
2.6.3	Δημητριακά για πρωινό με βάση τον αραβόσιτο και σνακ με βάση τον αραβόσιτο	800 ⁽²³⁾
2.6.4	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά ⁽³⁾ ⁽⁷⁾	200 ⁽²³⁾
2.6.5	Κλάσματα άλεσης αραβόσιτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1103 13 ή 1103 20 40 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβόσιτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	1 400 ⁽²³⁾
2.6.6	Κλάσματα άλεσης αραβόσιτου με μέγεθος σωματιδίων ≤ 500 μικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1102 20 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβόσιτου με μέγεθος σωματιδίων ≤ 500 μικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	2000 ⁽²³⁾

(*) Η εξαίρεση εφαρμόζεται μόνο στον αραβόσιτο για τον οποίο καθίσταται σαφές π.χ. μέσω της επισήμανσης, της προβλεπόμενης χρήσης, ότι προορίζεται αποκλειστικά για επεξεργασία με τη διαδικασία της υγρής άλεσης (παραγωγή αμούλου). **Πηγή:** <http://eur-lex.europa.eu>

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

1. Να μελετηθεί η ανάπτυξη της μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των φουμονισινών σε εμπορικούς οίνους κρασιού με τη χρήση δυο διαφορετικών πρωτοκόλλων .
2. Στο πρώτο πρωτόκολλο, εφαρμόστηκε παραγωγοποίηση των φουμονισινών με αντιδραστήριο παραγωγοποίησης την ορθο-φθαλαλδεύδη (OPA, O-phthaldialdehyde). Το αντιδραστήριο αυτό παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Στο δεύτερο πρωτόκολλο, εφαρμόστηκε το ίδιο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης αλλά σε αυτοματοποιημένο σύστημα προσθήκης με κάθε πρότυπο διάλυμα φουμονισινών.
3. Να γίνει σύγκριση των πρωτοκόλλων για να παρατηρηθεί εάν θα υπάρξει διαφορά στα αποτελέσματα.
4. Να διαπιστωθεί σε σύγκριση και με άλλες μεθοδολογίες το πώς γίνεται η ανίχνευση των φουμονισινών σε εμπορικούς ερυθρούς οίνους.
5. Να παρατηρηθεί ποια μέθοδος έχει συγκριτικά τα καλύτερα αποτελέσματα και με ποιο τρόπο πραγματοποιείται.

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1 Δείγματα κρασιών

Στον Πίνακα 7 που ακολουθεί παρατίθενται τα 13 δείγματα των ερυθρών κρασιών που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία .

Πίνακας 7. Ταξινόμηση δειγμάτων κρασιών

ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΤΥΠΟΣ ΚΡΑΣΙΟΥ	ΑΛΚΟΟΛ. ΒΑΘΜΟΣ (Vol)	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (ml)
Barbera	2008	Italy	Ερυθρός Οίνος	12,50%	750 ml
Carmenere	2009	Chile	Ερυθρός Οίνος	13%	750 ml
Tempranillo	2011	Spain	Ερυθρός Οίνος	12,50%	750 ml
Cabernet Sauvignon	2011	France	Ερυθρός Οίνος	13%	750 ml
Cabernet Merlot	2011	Argentina	Ερυθρός Οίνος	13%	750 ml
Αγιωργίτικο	2011	Greece	Ερυθρός Οίνος	12%	750 ml
Lambrusco	2011	Italy	Ερυθρός Οίνος	7,50%	750 ml
Shirah	2010	Chile	Ερυθρός Οίνος	13%	750 ml
Ruby Cabemet	2011	California	Ερυθρός Οίνος	12%	750 ml
Cabernet Sauvignon	2012	South Africa	Ερυθρός Οίνος	13,50%	750 ml
Cabernet Sauvignon	2011	Chile	Ερυθρός Οίνος	13%	750 ml
Μαυροδάφνη	2013	Greece- Patra	Ερυθρός Οίνος	15%	750 ml
Merlot	2007	South Africa	Ερυθρός Οίνος	13,50%	750 ml

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο η ανάπτυξη μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των φουμονισινών σε εμπορικούς οίνους με τη χρήση δυο διαφορετικών πρωτόκολλων .

3.1.1 Διαλύτες

- Μεθανόλη
- Ακετονιτρίλιο
- Ακετόνη
- Απιονισμένο νερό (3d)

3.1.2 Αντιδραστήρια

- O-phosphoric acid (H_3PO_4)>85%
- Immunoaffinity columns
- Sodium tetraborate phosphate buffered saline(PBS)
- Fumonisin B1 and B2 standard(Trilogy analytical laboratory)
- 1-Thioglycerol
- Sodium chloride(NaCl)
- Sodium phosphate ($Na_3 PO_4$)
- Sodium tetraborate decahydrate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)
- Sodium dihydrogen phosphate 0,1 M (NaH_2PO_4)
- O – phthaldialdehyde (OPA)
- Στήλες ανοσοσυγγένειας (immunoaffinity clumnd, IAC) (R - BIOPHARM RHONE LTD)
- Αντιδραστήριο OPA (βιομηχανοποιημένο)
- Thiofluor

3.1.3 Συσκευές και Όργανα

- Συσκευή διήθησης
- Rotary evaporator
- Αναλυτικός ζυγός
- Ζυγός ακριβείας
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή υπερύχων
- Πεχάμετρο
- Θερμαντήρας
- Ruritox
- Φούρνος
- Πιπέττες Pasteur
- Πιπέττες Eppendorf σταθερού όγκου 10 - 100μl, 100 - 1000μl και 3000μl
- Θερμόμετρο
- Σιφόνια 2,5 και 10 ml
- Ποτήρια ζέσης, κωνικές φιάλες, ογκομετρικές φιάλες, κωνική φιάλη διηθήσεως χωνί, δοχείο Duran, γυάλινα φιαλίδια, Vial (HPLC)
- Χαρτί διήθησης (Whatman No 4)

4. ΜΕΘΟΔΟΙ - ΠΟΡΕΙΑ

4.1 Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε

4.1.1 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων μίγματος φουμονισινών

Το αρχικό πρότυπο έχει συγκέντρωση 130.000 ppb συνολική φουμονισίνη (100.000 ppb FB1 και 30.000 ppb FB2). B1 και B2 σε 2,0 ml όπου η συγκέντρωση της φουμονισίνης B1 είναι 100.0 µg/ml δηλαδή 100,000 ppb και της φουμονισίνης B2 είναι 30 µg/ml δηλαδή 30.000 ppb. Οι πραγματικές όμως συγκεντρώσεις είναι αντίστοιχα 92.200 ppb και 27.800 ppb για την κάθε τοξίνη. Από αυτό παρασκευάστηκε πρότυπο με συγκέντρωση 4000 ppb σε τελικό όγκο 2 ml. Ο τελικός όγκος υπολογίστηκε ώστε να είναι αρκετός για την παρασκευή όλων των πρότυπων διαλυμάτων που θα χρειάζονταν για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Το εμπορικό πρότυπο διάλυμα φουμονισίνης είναι σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και απιονισμένο νερό. Το πρότυπο διάλυμα των 4000ppb παρασκευάζεται ως εξής: Σε φιαλίδιο των 4 ml περίπου τοποθετείται μίγμα 1,625 µl μεθανόλη, 1,625µl ακετονιτρίλιο και τέλος 3,25µl απιονισμένο νερό και αναδεύεται καλά. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πιπέτας αφαιρούνται 200 µl από το μίγμα και προστίθενται από το αρχικό πρότυπο 200 µl και με αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκε πρότυπο διάλυμα 4000ppb τοξίνης φουμονισινών. Με βάση το πρότυπο 4000ppb παρασκευάζονται οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται είτε με αραιώση σε τελικό όγκο 1 ml ξεκινώντας από το πιο αραιό προς το πιο πυκνό διάλυμα είτε με έγχυση με την αντίστοιχη πιπέτα.

4.1.2 Δημιουργία Κινητής Φάσης

Αρχικά ζυγίστηκαν 11,998 g Sodium Phosphate σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως προστέθηκε μαγνητάκι, απιονισμένο νερό και τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα χρησιμοποιώντας θέρμανση ύψους το θερμόμετρο να δείξει 53° C μέχρι να διαλυθεί. Μόλις διαλύθηκε και πήρε θερμοκρασία δωματίου τότε μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml και προστέθηκε απιονισμένο νερό ως τη χαραγή. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε ένα μεγάλο ποτήρι ζέσεως, μεταφέρθηκε σε θερμαντήρα και ταυτόχρονα προστέθηκε πεχάμετρο ώστε να γίνουν αντιληπτές οι μεταβολές του pH. Το pH είχε αρχική ένδειξη 12,17 και με μια πιπέτα Pasteur προστέθηκε φωσφορικό οξύ έτσι

μεταβλήθηκε στο 3,3. Αφού πραγματοποιήθηκε διήθηση, το Sodium Dihydrogen Phosphate μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml.

Η κινητή φάση των Φουμονισινών αποτελείται από Μεθανόλη και Sodium Dihydrogen Phosphate 0.1 M σε συγκεντρώσεις (77:23 v/v). Για τη μεθανόλη χρησιμοποιήθηκαν οι ογκομετρικές φιάλες των 500, 250 και 50 ml. Στο Sodium Dihydrogen Phosphate 0.1 M χρησιμοποιήθηκαν οι ογκομετρικές φιάλες των 200, 20 και 10 ml. Μεταφέρθηκαν σε υάλινο δοχείο Duran και αφού καλύφθηκαν με παραφίλ, τοποθετήθηκαν στο λουτρό υπερήχων για περίπου 20 λεπτά. Το λουτρό υπερήχων σπάει τον αέρα της κινητής φάσης.

4.1.3 Παρασκευή Αντιδραστηρίου Παραγωγοποίησης Φουμονισινών ορθο-φθαλαλδεϋδη (OPA, O- phthaldialdehyde)

Πρώτο Πρωτόκολλο:

- **Παρασκευή αντιδραστηρίου Borate Buffer**

Για την Παρασκευή του χειροκίνητου OPA, O- phthaldialdehyde στο εργαστήριο, ζυγίστηκαν 2g Sodium tetraborate decahydrate σε μικρό ποτήρι ζέσεως σε ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια προστέθηκε μαγνητάκι, νερό και τοποθετήθηκε σε αναδευτήρα ώσπου να διαλυθεί. Μετά τη διάλυση έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό ως τη χαραγή της φιάλης. Τέλος τοποθετήθηκε σε ένα διαφορετικό υάλινο σκεύος .

- **Διαδικασία Παρασκευής OPA Reagent**

Ζυγίστηκαν 0,12 g από το στερεό αντιδραστήριο OPA, O- phthaldialdehyde σε ένα ποτήρι ζέσεως, προστέθηκαν με πιπέτα 3 ml μεθανόλη 100%, 15 ml με σιφώνι από το αντιδραστήριο Borate buffer και 179 μl με πιπέτα 1-Thioglycerol. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υάλινο σκεύος και τοποθετήθηκαν όλη τη νύχτα σε ντουλάπι σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο vial για το HPLC τοποθετήθηκαν συνολικά 280μl, 70 μl τοξίνη και τ 70 μl από το OPA, O- phthaldialdehyde. Πραγματοποιήθηκε vortex και τοποθετήθηκε στο

HPLC όπου έγινε η ένεση. Στη συνέχεια των πειραμάτων οι ποσότητες άλλαξαν σε 100μl τοξίνης και 100μl O- phthalaldehyde όπου παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις αρχικές ποσότητες.

Δεύτερο Πρωτόκολλο:

- **Διαδικασία Παρασκευής OPA, O-phthalaldehyde με αυτοματοποιημένο σύστημα προσθήκης**

Χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο OPA, το οποίο παραλείφθηκε από την εταιρεία και είναι βιομηχανοποιημένο. Από το μπουκάλι του που βρίσκεται σε υγρή μορφή, παραλείφθηκαν με σιφώνι 5 ml και τοποθετήθηκαν σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως. Το OPA τοποθετήθηκε σε υάλινο δοχείο Duran και πραγματοποιήθηκε καλή απαέρωση στο λουτρό υπερύχων. Η απαέρωση του γίνεται μόνο την πρώτη φορά με 3 L/min για 50 min. Ζυγίστηκαν 100 mg από το OPA που βρίσκεται σε σκόνη και προστέθηκαν με σιφώνι 10 ml μεθανόλης. Ανακατεύτηκαν με υάλινη ράβδο μέχρι να διαλυθούν. Έπειτα σταματάτησε η παραγωγή φυσαλίδων, μεταφέρθηκαν το OPA και η μεθανόλη στο δοχείο duran όπου βρίσκονταν το OPA σε υγρή μορφή και ξεπλύθηκε το ποτήρι ζέσεως με 1 ml μεθανόλης για δύο φορές με τη χρήση πιπέτας. Τέλος ζυγίστηκαν 2 g Thiofluor σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν τα αρχικά 5 ml όπου είχαν αφαιρεθεί από το υγρό OPA και μεταφέρθηκαν στο δοχείο duran.

Στο πρωτόκολλο αυτό η ποσότητα του αντιδραστηρίου OPA, O-phthalaldehyde που απαιτείται παραλείφθηκε από το αυτοματοποιημένο σύστημα προσθήκης όπου λειτουργεί παράλληλα με το HPLC, σε αντίθεση με το πρώτο πρωτόκολλο που πραγματοποιήθηκε, όπου η προσθήκη του OPA γίνεται χειροκίνητα. Η ένεση γίνεται με 50 μl. Τα αποτελέσματα είναι εμφανώς καλύτερα.

4.1.4 Ανίχνευση Φουμονισινών σε δείγματα κόκκινου κρασιού

Σε 13 δείγματα ερυθρών εμπορικών οίνων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος δειγματοληψίας για την ανίχνευση των φουμονισινών B1 και B2. Έστερα από κάθε άνοιγμα κρασιού παραλείφθηκαν 10 ml δείγματος με σιφώνι και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια έγινε spike στο κρασί. Αρχικά το pH των δειγμάτων των κρασιών ήταν γύρω στο 3,4. Έπειτα τοποθετήθηκε το ποτήρι ζέσεως σε μαγνητικό αναδευτήρα,

αφού προηγουμένως προστέθηκε πεχάμετρο και πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH στο 7,4 με προσθήκη NaOH 0,1 M. Έχοντας ως βάση μια κωνική φιάλη, όπου από τη μια μεριά υπάρχει μια τρύπα η οποία συνδέεται με κενό και στο στόμιο της μπαίνει ένα γκρί πλαστικό λαστιχάκι μεσαίου μεγέθους, τοποθετείται μέσα στην τρύπα του το χωνί (puritox). Με σιφώνι τοποθετήθηκαν στο χωνί (puritox) 5 ml (75% μεθανόλη). Προστέθηκαν με σιφώνι 2 ml από το δείγμα του κρασιού και 8 ml (75% μεθανόλη) αφού έγινε ανάμειξη μεταξύ τους. Τοποθετήθηκαν 8 ml (75% μεθανόλη) στο χωνί (puritox). Επιπλέον ακόμη προστέθηκαν στο χωνί (puritox) 12 ml (CH₃COOH: MeOH) 1:99, 6 ml με σιφώνι αντίστοιχα για το καθένα.

Τα 12 ml μεταφέρθηκαν σε ειδική υάλινη φλάσκα όπου τοποθετήθηκε στο Rotary Evaporator που ρυθμίστηκε στους 60 °C- 70 °C και στις 3 στροφές, μέχρις ότου το υγρό να εξατμιστεί και να μην απομείνει τίποτα στη φλάσκα. Τέλος γίνεται ανασύσταση τοποθετώντας με πιπέτα 1 ml (MeOH:AcN:H₂O) v/v, (25:50:50), vortex και με μια πιπέτα Pasteur παραλείφθηκε το δείγμα και τοποθετήθηκε σε vial όπου σε αυτό έγινε η ένεση στο HPLC. Στην εικόνα 2 που ακολουθεί απεικονίζονται οι εμπορικοί οίνοι της πειραματικής διαδικασίας, ενώ στην εικόνα 3 δείγμα ερυθρού οίνου διηθείται από το χωνί (puritox) στην κωνική φιάλη όπου είναι ειδικά συνδεδεμένη ώστε να δημιουργεί κενό.

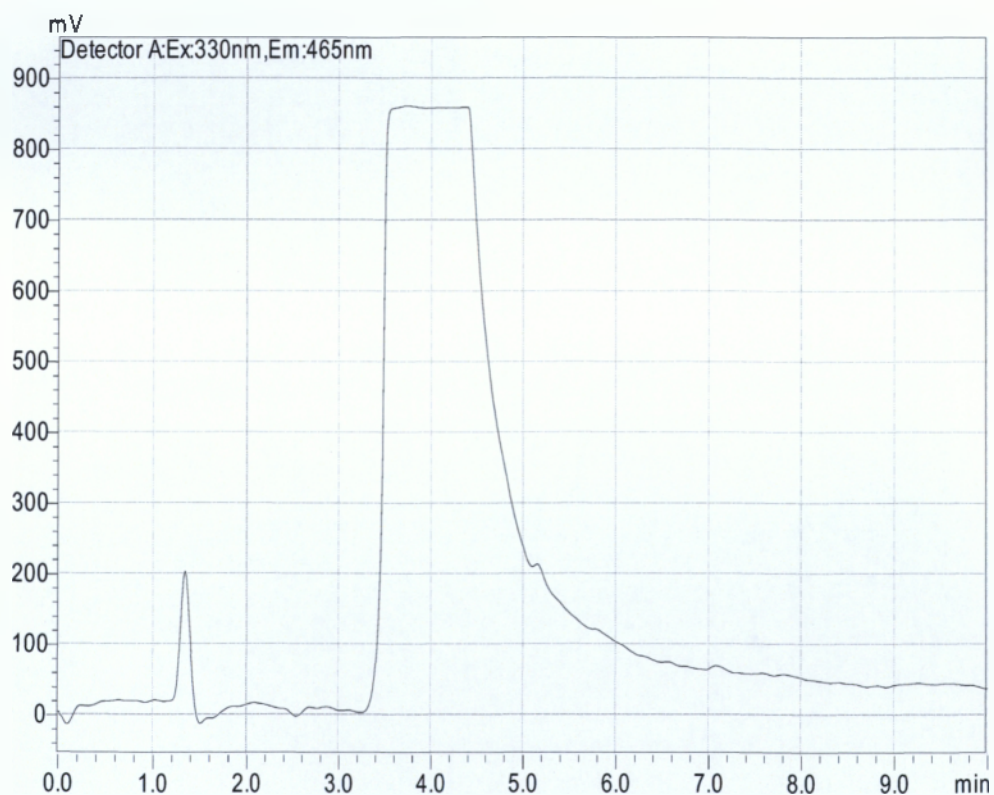


Εικόνα 2. Οι εμπορικοί οίνοι όπου χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία.



Εικόνα 3. Δείγμα ερυθρού οίνου διηθείται από το puritox στην κωνική φιάλη κενού.

Στο διάγραμμα 1 που ακολουθεί παρατίθεται το τυφλό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία για την ανάπτυξη της μεθόδου των φουμονισινών.

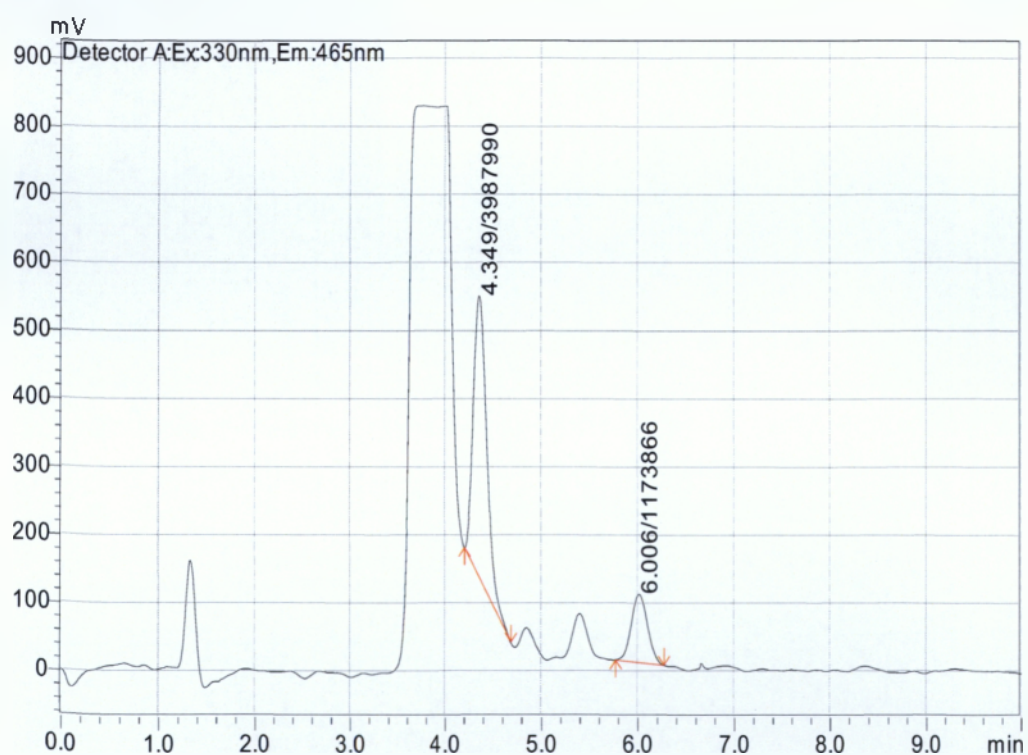


Διάγραμμα 1. Τυφλό δείγμα Κρασί 1.

Στο πίνακα 8 παρατίθενται τα αποτελέσματα του πρότυπου διαλύματος σε 500 ppb. Ακολούθως στους πίνακες 9 και 10 παρατίθενται τα αποτελέσματα από τα spike 300 και 500 ppb για τις φουμονισίνες FB1, FB2 και τα αντίστοιχα διαγράμματά τους.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα Πρότυπου Διαλυμάτων 500 ppb.

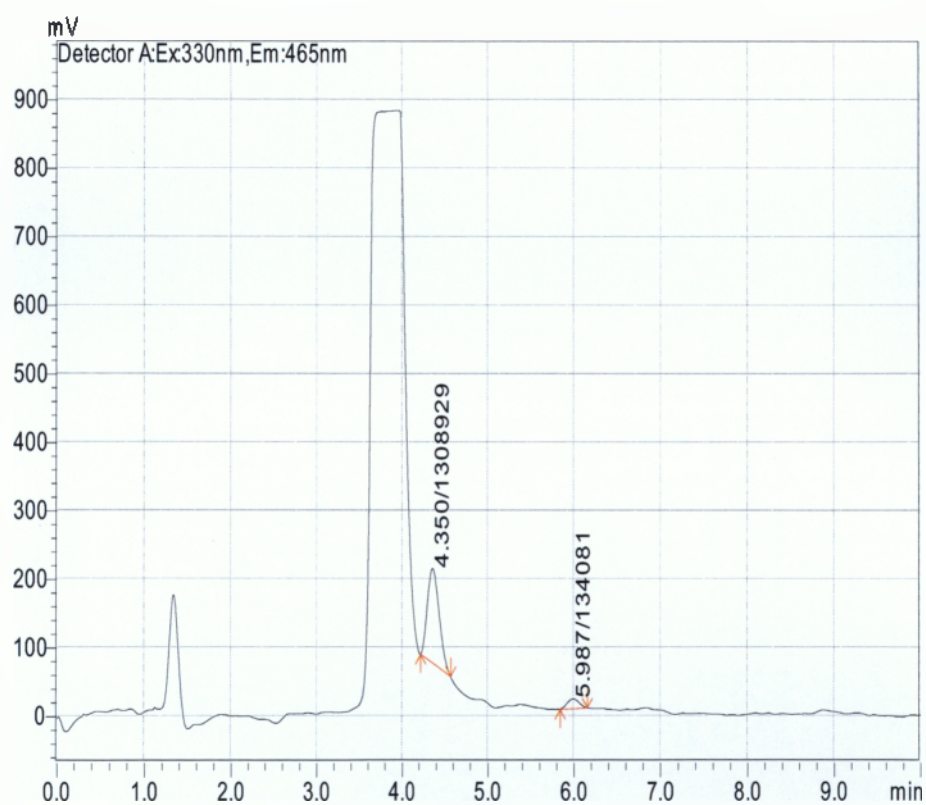
Συγκέντρωση(ppb)	Area	Retention Time	P(bar)
500 ppb	FB1 3.987.990	4.3	151
500 ppb	FB2 1.173.866	6.0	151



Διάγραμμα 2. Συσχετισμός μεταξύ επιφάνειας και χρόνου των φουμονισινών FB1 και FB2 σε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 500 ppb.

Πίνακας 9. Spike σε συγκέντρωση 300 ppb.

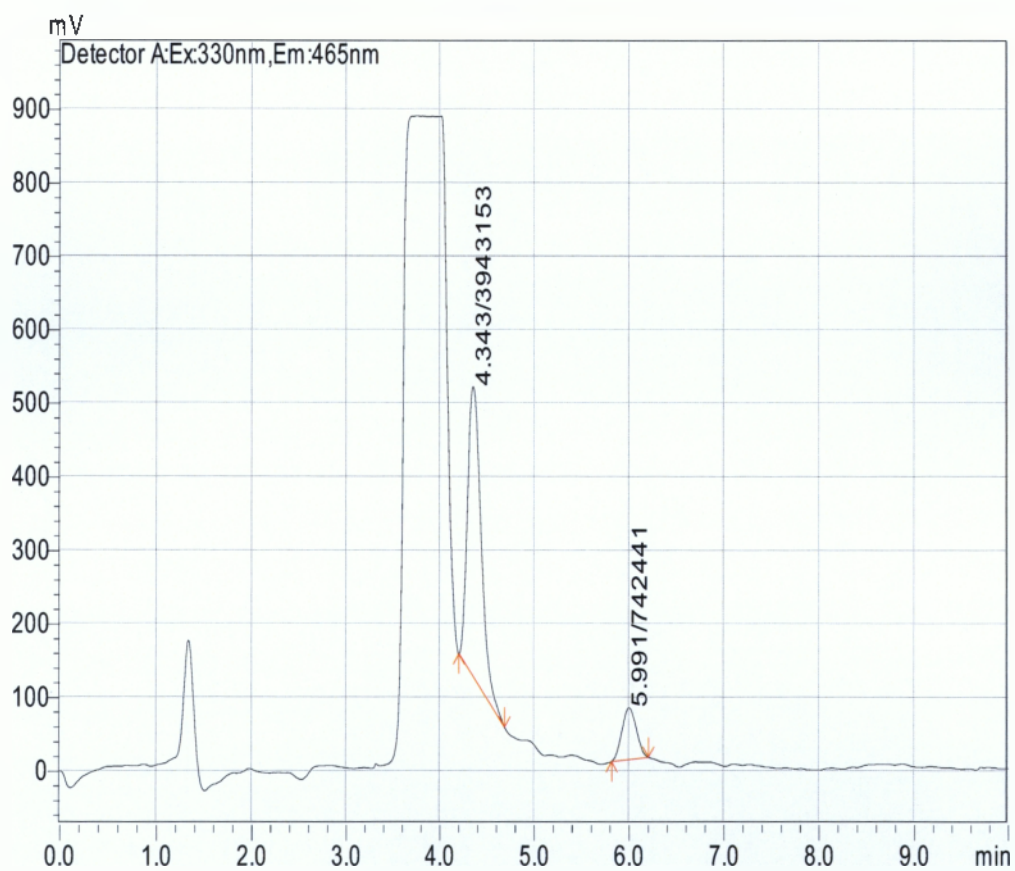
Συγκέντρωση(ppb)	Area	Retention Time	P(bar)	C/ppb για Spike	Ανάκτηση(%)
300 ppb	FB1 1.308.929	4.3	153	115.7	54%
300 ppb	FB2 134.081	5.9	153	14.67	22%



Διάγραμμα 3. Spike 300 ppb συσχέτιση επιφάνειας και χρόνου για τις φουμονισίνες FB1 και FB2.

Πίνακας 10. Spike σε συγκέντρωση 500 ppb.

Συγκέντρωση (ppb)	Area	Retention Time	P(bar)	C/ppb για Spike	Ανάκτηση(%)
500 ppb	FB1 3.943.153	4.3	153	415.08	117%
500 ppb	FB2 742.491	5.9	153	102,89	96%



Διάγραμμα 4. Spike 500 ppb συσχέτιση επιφάνειας και χρόνου για τις φουμονισίνες FB1 και FB2.

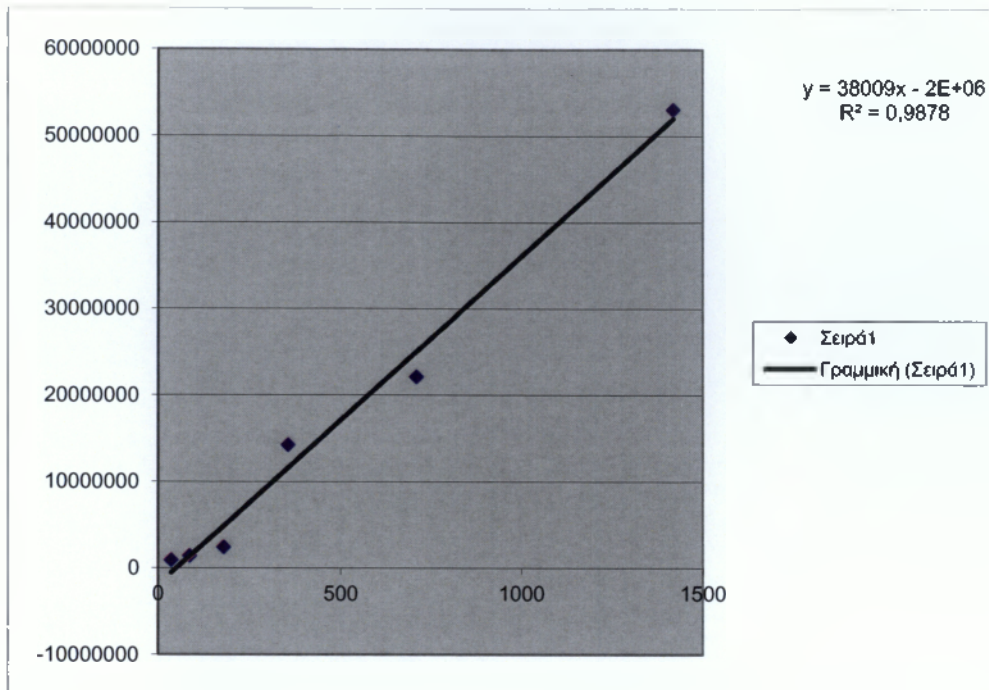
4.1.5 Καμπύλη Βαθμονόμησης

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματος από τις φουμονισίνες FB1 και FB2 σε συγκεντρώσεις όπως παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα (πίνακας 7) για τελικό όγκο 1 ml. Τα πρότυπα προήλθαν από το πρότυπο των 4000ppb συνολική αφλατοξίνη, το οποίο περιείχε 100.0 µg/ml B1 και 30 µg/ml B2. Ο διαλύτης των πρότυπων διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν μίγμα νερού-μεθανόλης 50:50, όμοιος με το διαλύτη της κινητής φάσης στην ανάλυση με HPLC. Για κάθε μια συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

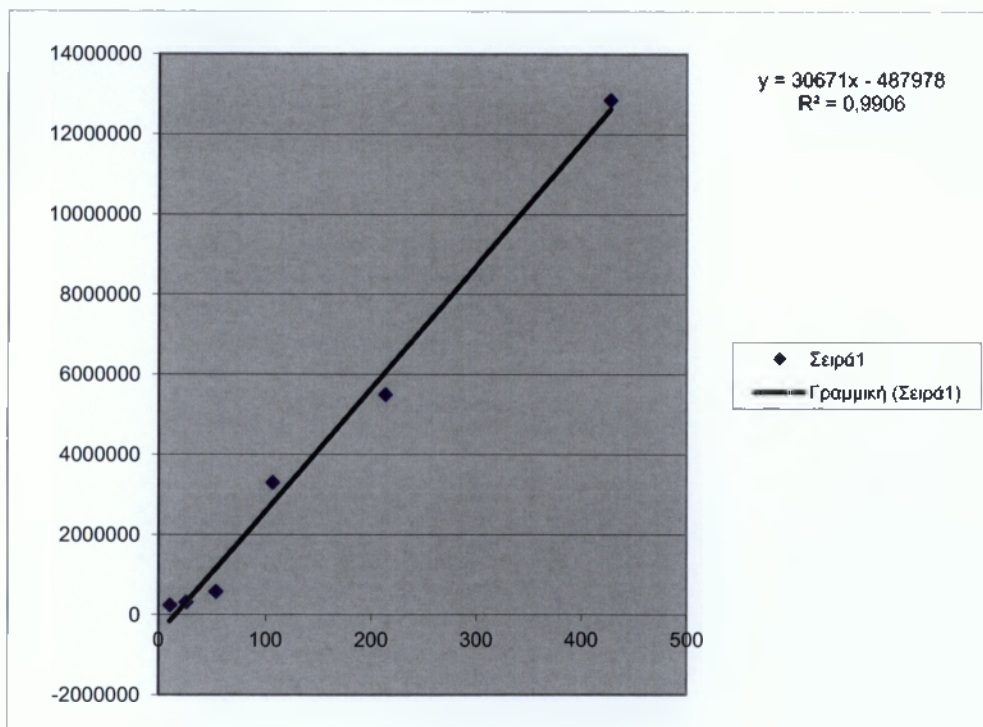
Πίνακας 11. Συγκεντρώσεις Φουμονισινών για κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης-Υπολογισμός αυτοματοποιημένης παραγωγολοίησης.

Συγκεντρώσεις (ppb)	Area F1	Area F2	Retention Time F1	Retention Time F2
50ppb	942.314	240.919	7,6	10,7
120ppb	1.438.174	315.651	7,6	10,7
250ppb	2.434.215	577.652	7,6	10,7
500ppb	4.267.855	3.300.065	7,6	10,7
1000ppb	22.143.008	5.499.068	7,6	10,7
2000ppb	53.060.120	12.848.947	7,6	10,7

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρουσιάζονται στον πίνακα 11. Δημιουργήθηκαν 2 καμπύλες για την αυτοματοποιημένη παραγωγολοίηση για τις φουμονισίνες FB1 και FB2. Στη χειροκίνητη παραγωγολοίηση δεν υπήρξαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε αυτή τη μέθοδο σε σχέση με την αυτοματοποιημένη παραγωγολοίηση. Στα διαγράμματα 5 και 6 φαίνονται οι καμπύλες βαθμονόμησης του Δεύτερου πρωτοκόλλου για την αυτοματοποιημένη παραγωγολοίηση.



Διάγραμμα 5. Συσχετισμός μεταξύ επιφανειών και συγκέντρωσης της FBI σε πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 50- 2000 ppb.



Διάγραμμα 6. Συσχετισμός μεταξύ επιφανειών και συγκέντρωσης της FB2 σε πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 50- 2000 ppb.

4.1.6 Ανάπτυξη μεθοδολογίας για προσδιορισμό φουμονισινών σε εμπορικούς οίνους, με χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης (HPLC).

➤ Μέθοδος Ανάλυσης (HPLC): Χρωματογραφία HPLC αναστρόφου φάσεως με ισοκρατική έκλουση

Όργανο: Shimadzu, LC-A series, Kyoto, Japan)

Στήλη: C18 Inertsil ODS-3V (5μm)(150x4,6mm), μεταλλική στήλη ανάστροφης φάσης από ανοξείδωτο χάλυβα όπου τοποθετείται στο φούρνο του συστήματος παραγωγοποίησης

Ανιχνευτής: Φθορισμομετρικός Ανιχνευτής (Spectrofluorometric detector, mod. RF-20A/20AXs, Prominence (335, 440,330,465 nm)

Ροή Διαλυτών: 1 ml/min

Όγκος Ένεσης: 50μl

Θερμαντήρας Στήλης: 40°C

➤ Σύστημα Παραγωγοποίησης μετά τη στήλη(post column derivatization)

Όργανο: Pinnacle PCX

Ροή Διαλυτών: 1,4 ml

Ταχύτητα Ροής: 0,3 ml/min

Θερμοκρασία Φούρνου: 60°C

Αντιδραστήριο: OPA, O-phthaldialdehyde

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ύστερα από την πραγματοποίηση της ανάπτυξης μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των φουμονισινών FB1 και FB2 σε 13 εμπορικούς οίνους παρατηρήθηκε ότι και τα 13 δείγματα των ερυθρών οίνων ήταν καθαρά από τις τοξίνες. Ακολούθησε η μεθοδολογία βασισμένη σε μελέτη μέσα από βιβλιογραφία και εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα αντίστοιχα. Με βάση τη μεθοδολογία για τον έλεγχο των ερυθρών οίνων δημιουργήθηκε από το αρχικό πρότυπο των 130.000 ppb ένα πρότυπο διάλυμα 3,2 ml, όπου παρασκευάστηκε με 0,8 ml MeOH, 0,8 ml AcN και 1,6 ml H₂O. Αφαιρέθηκαν 100 μl από το πρότυπο διάλυμα που δημιουργήθηκε και προστέθηκαν 100 μl από το πρότυπο των 130.000 ppb. Ο καθαρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τα χωνιά (puritox) όπου λειτουργούν όπως οι στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC). Στον πίνακα 12 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο των ερυθρών οίνων.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα δειγμάτων ερυθρών οίνων.

Α/Α	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜ. (ml)	ΤΥΠΟΣ ΚΡΑΣΙΟΥ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
1	Barbera	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
2	Carmenere	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
3	Tempranillo	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
4	Cabernet Sauvignon	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
5	Cabernet Merlot	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
6	Αγιωργίτικο	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
7	Lambrusco	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
8	Shirah	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
9	Ruby Cabernet	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
10	Cabernet Sauvignon	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
11	Cabernet Sauvignon	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
12	Μκυροδάφνη	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό
13	Merlot	10ml	Ερυθρός Οίνος	Καθαρό

Πραγματοποιήθηκε Spike στο κρασί Νο 3 όπου δημιουργήθηκε από το πρότυπο των 3,2 ml. Χρησιμοποιήθηκαν 0,6 ml και τοποθετήθηκαν στα 10 ml του δείγματος με βάση τη μέθοδο. Με το Spike ανιχνεύτηκε η FB2. Ακολουθούν τα τελικά αποτελέσματα του πειράματος με το δεύτερο πρωτόκολλο της αυτοματοποιημένης παραγωγολοίησης με αντιδραστήριο OPA, O- phthaldialdehyde.

Πίνακας 13 . Αποτελέσματα Αυτόματης Παραγωγολοίησης με το αντιδραστήριο (OPA , O- phthaldialdehyde) .

Όγκος Αντιδραστήρια (ml)	Ένεση (μl)	Συγκεντρώσεις (ppb)	Διάρκεια Πειράματος (minute)	Πίεση (bar)	Χρόνοι (min.)	Αποτελέσματα (results)	2 ^ο Επανάληψη
1,4	50	2000	15	151	Rt1:7,6 Rt2:10,7	FB1:53.060.120 FB2:12.848.947	
1,4	50	1000	15	151	Rt1:7,6 Rt2:10,7	FB1:22.143.008 FB2:5.499.068	
1,4	50	500	15	151	Rt1:9,5 Rt2:12,0	FB1:4.667.798 FB2:664.729	FB1:2.0095 96 FB2:3.589. 425
1,4	50	250	15	151	Rt1:7,6 Rt2:10,7	FB1:2.321.985 FB2:514.850	FB1:2.434. 215 FB2:577.65 2
1,4	50	120	15	151	Rt1:9,5 Rt2:12,0	FB1:454.235 FB2:69.808	FB1:1.438. 174 FB2:315.65 1
1,4	50	500	15	151	Rt1:7,6 Rt2:10,7	FB1:14.267.855 FB2:3.300.065	
14	50	50	15	151	Rt1:7,6 Rt2:10,7	FB1:942,3145 FB2:240,919	

5.1 Αποτελέσματα του LOD (Όριο Ανίχνευσης) και LOQ (Όριο Ποσοτικοποίησης)

Ως όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection) ή Αναλυτική ευαισθησία (Analytical Sensitivity) ορίζεται το όριο ανίχνευσης ενός συστατικού με μια μέθοδο όπου είναι η συγκέντρωση για την οποία η απόκριση της μεθόδου διαφέρει από την απόκριση του τυφλού κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου του τυφλού. Το όριο Ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation) ή Λειτουργική ευαισθησία (Functional Sensitivity) είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί (να προσδιοριστεί ποσοτικά) με αποδεκτή ακρίβεια και επανάληψη (Λεϊμονή,2009).

Στον πίνακα 14, 15 παρατίθενται τα αποτελέσματα των δυο πρωτοκόλλων για το LOD (Όριο Ανίχνευσης) και LOQ (Όριο Ποσοτικοποίησης) αντίστοιχα.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα LOD (Όριο Ανίχνευσης) και LOQ (Όριο Ποσοτικοποίησης) για τη Χειροκίνητη Παραγωγή.

Φουμονισίνες	Όριο ανίχνευσης(ng/mL)	Όριο ποσοτικοποίησης (ng/mL)
FB1	120	360
FB2	63	189

Πηγή: <http://www.ehealthcyprus.com>

Πίνακας 15. Αποτελέσματα LOD (Όριο Ανίχνευσης) και LOQ (Όριο Ποσοτικοποίησης) για την Αυτοματοποιημένη Παραγωγή.

Φουμονισίνες	Όριο ανίχνευσης(ng/mL)	Όριο ποσοτικοποίησης (ng/mL)
FB1	102	306
FB2	27	81

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε σε εργαστηριακές συνθήκες η ανάπτυξη μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των φουμονισινών FB1 και FB2 σε 13 ερυθρούς εμπορικούς οίνους. Η μελέτη αφορούσε την ανάπτυξη της μεθοδολογίας με τη χρήση δυο πρωτοκόλλων. Το πρώτο πρωτόκολλο αφορούσε χειροκίνητη παραγωγοποίηση του αντιδραστήριου OPA, O-phthaldialdehyde και το δεύτερο πρωτόκολλο την αυτοματοποιημένη παραγωγοποίηση του αντιδραστήριου OPA ,O- phthaldialdehyde. Από τη μελέτη αυτή προέκυψαν τα ακόλουθα:

- ❖ Σε όλα τα ερυθρά κρασιά που χρησιμοποιήθηκαν για την πτυχιακή μελέτη δεν βρέθηκε ίχνος τοξίνης.
- ❖ Ύστερα από τη δημιουργία ενός αριθμού πρότυπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η ανάπτυξη των δυο πρωτοκόλλων.
- ❖ Με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) μπορούμε να πραγματοποιήσουμε την ανίχνευση των φουμονισινών. Υπάρχουν όμως και άλλες μέθοδοι, οι οποίες θεωρούνται πιο κατάλληλες για τον ακριβή προσδιορισμό τους. Και είναι πιο γρήγορες και ακριβείς.
- ❖ Με βάση τη βιβλιογραφία η φουμονισίνη FB2 συναντάται πιο συχνά κυρίως σε ερυθρούς οίνους. Ακόμα μπορεί να ανιχνευτεί και η FB4.
- ❖ Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το δεύτερο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε η αυτοματοποιημένη παραγωγοποίηση με το αντιδραστήριο OPA, O-phthaldialdehyde είχε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το πρώτο πρωτόκολλο της χειροκίνητης παραγωγοποίησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ.1881/2001/ΕC του Συμβουλίου της 19^{ης} Δεκεμβρίου 2006, Για τον καθορισμό των μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ.1126/2007/ EC του Συμβουλίου της 28^{ης} Σεπτεμβρίου 2007, Για την τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ.1881/2001/ΕC σχετικά με τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες που επιμολύνουν τα τρόφιμα όσον αφορά τις τοξίνες από τους μύκητες του γένους *Fusarium* στον αραβόσιτο και στα προϊόντα αραβοσίτου.
- Λεϊμονή Ε.Δ. (2009). Πως υπολογίζουμε το Όριο ανίχνευσης και το Όριο ποσοτικοποίησης. Διαθέσιμο στη σελίδα: <http://www.ehealthcyprus.com/>. Τελευταία επίσκεψη: 20/4/2014.
- Τσακίρης Α. (2008). *Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί*. Αθήνα: Ψυχάλου.
- Χατζηνικολάου Δ. (2004). *Οίνος ο Αγαπητός*. Αθήνα: Ελευθερουδάκης.

Ξενόγλωσση

- Aliakbari F., Mirabolfathy M., Emami M., Mazhar S.F and Karami Osboo R.K. (2007). Natural occurrence of *Fusarium* species in maize kernels at Gholestan province in northern Iran. *Asian J Plant Sci*, 8, 1276–1281.
- ArSimon J.W. (2001). Structure, synthesis, and biosynthesis of fumonisin B1 and related compounds, *Environ. Health Perspect* , 109, 245–9.
- Aschse J. (1992). *J. Chromatogr*, 609, 349.
- Association of Analytical Communities, AOAC Int (1997). Gaithersburg, Maryland.
- Bauer J., Gareis M., (1987) . *J. Vet. Med. Ser. B* 34 ,613.

- Betina V. (1985) *J. Chromatogr.* 334, 211.
- Betina V. (1993). *J. Chromatogr. Libr*,54, 141.
- Bezuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-Allman C.P., Horak R.M., Marasas W.F.O., Spiteller G. and Vleggaar R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun* , 743–5.
- Blackwell B.A., Edwards O.E., ApSimon J.W. and Fruchier A. (1995). Relative configuration of the C-10 to C-16 fragment of fumonisin B1. *Tetrahedron Lett*, 36, 1973–6.
- Blackwell B.A., Edwards O.E., Fruchier A., ApSimon J.W. and Miller J.D. (1996). NMR structural studies of fumonisin B1 and related compounds from *Fusarium moniliforme*, in Jackson L.S., DeVries J.W. and Bullerman L.B, *Fumonisin in Food*, New York, Plenum Press, 75–91.
- Bottalico A. (1999). Muffe e micotossine nelle granaglie. *Tecnica Molitoria*, 12, 195–219.
- Bradburn N., Coker R.D., Jewers K.. (1990) . *Chromatographia* 29 ,177.
- Cahagnier B., Melcion D and Richard-Molard, D. (1995). Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B on maize grain as a function of different water activities. *Lett. Appl. Microbiol*,20, 247–251.
- Cavaglieri L.R., Keller K.M., Pereyra C.M., Gonzalez Pereyra M.L., Alonso V.A., Rojo F.G., Dalcero A.M and Rosa C.A.R. (2009) .Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. *J Stored Prod Res* 45, 147–150.

- Cawood M.E., Gelderblom W.C.A., Vleggaar R., Beh Y., Thiel P.G. and Marasas W.F.O. (1991). Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach, *J. Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1958–62.
- Charmley L.L., Rosenber A. and Trenholm H.L. (1994). Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. *Mycotoxins in Grain Compounds Other Than Aflatoxin* (Miller J.D and Trenholm HL, eds), Eagan Press, St Paul, MN, 471–486.
- Chu in F.S., Handbook of applied mycology, in: Bhatnagar D., Lillehoj E.B., Arora D.K. (Eds). (1992). *Mycotoxins in Ecological Systems*, Marcel Dekker, New York, 87.
- Colinski P., Rabarkiewicz-Szcesna J. (1984). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 ,1108.
- Colvin B.M. and Harrison L.R. (1992). Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine, *Mycopathologia*, 117, 79–82.
- Conner R.L., Hwang S.F and Stevens R.R. (1996). *Fusarium proliferatum*: a new causal agent of black point in wheat. *Can J Plant Pathol* ,18, 419–423.
- Delongchamp R.R. and Young J.F. (2001). Tissue sphinganine as a biomarker of fumonisin induced apoptosis, *Food Addit. Contam*, 18, 255–61.
- D’Mello J.P.F. and Macdonald A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- Desai K., Sullards C., Allegood J., Wang E., Schmelz E.M., Hartl M., Humpf H-U., Liotta D.C., Peng Q. and Merrill A.H.Jr. (2002). Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585, 188– 92.
- Desjardins A.E., Manandhar H.K., Plattner R.D., Manandhar G.G., Poling S.M and Maragos C.M. (2000). *Fusarium* species from Nepalese rice and production of

- mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Appl Environ Microb* 66, 1020–1025.
- Desjardins A.E., Busman M., Muhitch M.J and Proctor R. (2007). Complementary host–pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays*–*Gibberella moniliformis* seedling interaction. *Physiol Mol Plant* ,70, 149–160.
 - Duvick J. (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification, *Environ. Health Perspect*, 109 (Suppl. 2), 337–42.
 - Edwards J.V., Lillehoj E.B. (1987) .*J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 70 ,126.
 - EMAN, European Mycotoxin Awareness Network coordinated by Leatherhead Food Research Association (UK) (2003). Διαθέσιμο στη σελίδα: <http://www.lfra.co>.
 - Engelhardt H., Hass P., (1993) . *J. Chromatogr. Sci*, 31 ,13.
 - Enzinger P.C. and Mayer R.J. (2003). Esophageal cancer. *New England Journal of Medicine*, 349, 2241 - 2252.
 - FAMIC. (n.d.). Διαθέσιμο στη σελίδα: <http://www.famic.go>. Τελευταία επίσκεψη: 18/10/2013.
 - Farrar J.J. and Davis R.M. (1991). Relationships among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. *Phytopathology*, 81,661-666.
 - Floss J.L., Casteel S.W., Johnson G.C., Rottinghouse G. E. and Krause G.F. (1994). Developmental toxicity of fumonisin in Syrian hamster, *Mycopathologia*, 128, 33–8.
 - Frisvad J.C., Smedsgaard J.J., Samson R.A., Larsen T.O. and Thrane U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9727–9732.

- Frohlich A.A., Marquardt R.R., Bernatsky A. (1988). *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 71, 949.
- Fumonisin. (n.d.). Διαθέσιμο στη σελίδα: www.mycotoxins.org. Τελευταία επίσκεψη: 23/11/2013.
- Chu in F.S., Handbook of applied mycology, in: Bhatnagar D., Lillehoj E.B., Arora D.K. (Eds). (1992). *Mycotoxins in Ecological Systems*, Marcel Dekker, New York, 87.
- Gimeno A. (1984) *J. Assoc. Anal. Chem*, 67, 194.
- Giraudi G., Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., Tozzi C. (2007). *J. Chromatogr. A*, 1175, 174.
- Goryacheva Y., De Saeger S., Ercmin S.A., Van Peteghem C. (2007) *Food Addit. Contam.A* 10, 1169.
- Gumprecht L.A., Beaslet V.R., Weigel R.M., Parker H.M., Tumbleson M.E., Bacon C.W., Meredith F.I. and Haschek W.M. (1998). Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations, *Toxicol.-Pathol*, 26, 777–88.
- Harrison L.R., Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E. and Cole L.R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, *J. Vet Diagn. Invest*, 2, 217–21.
- Haschek W.M., Gumprecht L.A., Smith G., Tumbleson M.E. and Constable P.D. (2001). Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives, *Environ. Health Perspect*, 109 (Suppl. 2), 251–7.
- Hernández M.J., Moreno M.V.G., Durán E., Guillén D., Barroso C.G. (2006) *Anal. Chim. Acta*, 566, 117.
- Holcomb M., Wilson D.M., Trucksess M.W., Thompson H.C. Jr., *J. Chromatogr.* 624 (1992) 341.

- Holcomb M., Thompson Jr H.C., Cooper W.M. (1996). *J. Supercrit. Fluids*, 9, 118.
- Huffman J., Gerber R. and Du L. (2010). Recent Advancements in the Biosynthetic Mechanisms for Polyketide-Derived Mycotoxins. *Biopolymers*, 93, 764–776.
- IARC (2002). Fumonisin B1. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, 82, Lyon, France 301.
- Javed T., Bennett G.A., Richard J.L., Dombrink-Kurtzman M.A., Côté L.M. and Buck W.A. (1992a). Mortality in broiler chicks on feed amended with a *Fusarium proliferatum* culture or with purified fumonisin B1 and moniliformin, Abst. 106 th AOAC Int. Ann. Mtg. Aug 31–Sept, 3, 1992, Cincinnati, OH, 232.
- Javed T., Bunte R.M., Bennett G.A., Richard J.L., Dombrink-Kurtzman M.A., Côté L.M. and Buck W.A. (1992b). Comparative pathologic changes in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B1 and moniliformin, Abst. 106 th AOAC Int. Ann. Mtg. Aug 31–Sept 3, 1992, Cincinnati, OH, 230.
- Javed T., Richard J.L., Bennett G.A., Dombrink-Kurtzman M.A., Bunte R.M., Koelkebeck K.W., Côté L.M., Leeper R.W. and Buck W.A. (1992c). Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B1 or *Fusarium proliferatum* culture material on chick embryos, Abst. 106 th AOAC Int. Ann. Mtg. Aug 31–Sept 3, 1992, Cincinnati, OH, 231.
- Jarvis B.B., De Silva T., McAlpine J.B., Swanson S.J., Whittern D.N. (1992) . *J. Nat. Prod*, 55, 1441.
- Jornet D., Busto D.O., Guasch J. (2000) . *J. Chromatogr. A* 882 ,29.

- Jurado M., Vázquez C., Callejas C and González-Jaén M.T. (2006) .Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the south west of Spain. *Mycotoxin Res* ,22, 87–91.
- Katerere D.R., Stockenström S., Shephard G.S. (2008) . *Food Contam.* 19 ,389.
- Kellerman T.S., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Gelderblom W C A., Cawood M. and Coetzer J.A.W. (1990). Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1, *Onderstepoort J. Vet. Res*, 57, 269–75.
- Knudsen P.B., Mogensen J.M., Larsen T.O. and Nielsen K..F. (2011). Occurrence of Fumonisin B2 and B4 in Retail Raisins. *J. Agricultural and Food Chemistry*, 59, 772–776.
- Kodell R.L., Young J.F., Delongchamp R.R., Turturro A., Chen J.J., Gaylor D.W., Howard P C. and Zheng Q. (2001). A mechanistic approach to modelling the risk of liver tumours in mice exposed to fumonisin B1 in the diet, *Food Addit. Contam.*, 18, 237–53.
- Lacey, J. and Magan N. (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationship. In: Chelkowski (ed.), *Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage* (Elsevier), 77–111.
- Lin L., Chin. (1990). *J. Chromatogr.* 8, 233.
- Lin L., Zhang J., Wang P., Wang Y., Chen J. (1998). *J. Chromatogr. A*, 815, 3.
- Logrieco A., Mule` G, Moretti A and Bottalico A.(2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol* ,108, 597–609.
- Ma L., Xu W., He X., Huang K., Wang Y. and Luo Y. (2012). Determination of fumonisins B1 and B2 in Chinese rice wine by HPLC using AQC precolumn derivatisation, *J Sci Food Agric*, 93, 1128–1133.

- Marasas W.F.O., Kellerman T. S., Gelderblom W.C.A., Cotzer J.A.W., Thiel P.G. and van der Lugt J.J.(1988).Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*, *Onderstepoort J. Vet Res*, 55, 197–203.
- Marasas W.F.O. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective, *Environ. Health Perspect*, 109 (Suppl. 2), 239–243.
- Marin S., Sanchis V., Vinas I., Canela R. and Magan, N.(1995). Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B and B production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Lett. Appl. Microbiol*, 21, 298–301.
- Martin P.J., Stahr H.M., Hyde W., Domoto M. (1986). *J. Liq. Chromatogr*, 9 ,1591.
- Mateo J.J., Mateo R., Hinojo M.J., Llorens A., Jimenez M. (2002) . *J. Chromatogr. A*, 955 ,245.
- Medina A., Valle-Algarra F.M., Mateo R., Gimeno-Adclantado J.V., Mateo F and Jimenez M.(2006).Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Food Microbiol*, 198, 196–203.
- Merrill A.H.Jr., Sullards M.C., Wang E., Voss K.A. and Riley R.T. (2001). Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins, *Environ. Health Perspect*, 109 (Suppl. 2), 283–9.
- Mogensen J.M., Frisvad J.C., Thrane U. and Nielsen K.F. (2009). Production of fumonisin B 2 and B 4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *J Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/jf903116q.
- Montreal Protocol. (1998). Διαθέσιμο στην σελίδα:<http://www.uncetp.org> , 09 June 2003.
- Morgan M.R.A.(1989). *Tetrahedron* 45, 2237.

- Muñoz K., Vega M., Rios G., Muñoz S., Madariaga R. (2006). *Food Chem. Toxicol*, 14 ,1884.
- Musser S.M., Gay M.L. and Mazzola E.P. (1996). Identification of a new series of fumonisins containing 3-hydroxypyridine, *J. Nat. Prod*, 59, 970–2.
- Musser S.M. and Plattner R.D. (1997). Fumoinisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*, *J. Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1169–73.
- Noonim P., Mahakarnchanakul W., Nielsen K.F., Frisvad J.C. and Samson R.A. (2009). Fumoinisin B2 production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. *Food Additive Contamination*, 26, 94–100.
- Odhav B., Adam J.K.. and Bhoola K..D. (2008). Modulating effects of fumoinisin B1 and ochratoxin A on leukocytes and messenger cytokines of the human immune system. *International Immunopharmacology*, 8, 799 - 809.
- Onji Y., Aoki Y., Tani N., Umebayashi K., Kitada Y., Dohi Y. (1998). *J. Chromatogr. A*, 815, 59.
- Pena R., Alcaraz M.C., Arce L., Rios A., Valcarel M. (2002). *J. Chromatogr. A* ,967, 303.
- Pestka J.J., Abouzied M.N., Sutikno M. (1995). *Food Technol*, 49, 120.
- Pitt J.I. and Hocking A.D. eds. (1997). *Aspergillus and related tele- omorphs. Fungi and Food Spoilage*, Academic Press, London, 339–416.
- Reyneri A. (2006). The Role of Climatic Condition on Micotoxin Production in Cereal. Department of Agronomy and Crop Science, University of Turin, Italy, *Veterinary Research Communications*, 30, 87-92.

- Rheeder J.P., Marasas W. F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S. and Van Schalkwyk D.J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkeim, *Phytopathology*, 83, 353–7.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O. and Vismer H.F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2101–5.
- Richard J.L., Payne G.A., Anne E. Desjardins A.E., Maragos C., Norred W.P., Pestka J.J., Phillips T.D., van Egmond H.P., Vardon P.J., Whitaker T.B., Wood G. (2003). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. In: Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA: United States of America January 2003.
- Richardson K.E., Hagler W.M., Mirocha C.J. (1985). *J. Agric. Food Chem.* 33, 862.
- Riley R.T., Wang E., Schroeder J.J., Smith E.P., Plattner R.D., Abbas H., Yoo H.S. and Merrill A.H.Jr. (1996). Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins, *Nat. Toxins*, 4, 3–15.
- Riley RT., Enongene E., Voss K.A., Norred W.P., Meredith M.I., Sharme R. P., Spitsbergen J., Williams D.E., Carlson D.B. and Merrill A.H.Jr. (2001). Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ. Health Perspect*, 109 (Suppl. 2), 301–8.
- Roch O.G., Blunden G., Coker R.D., Nawaz S. (1995). *Food Chem*, 52, 93.
- Romer T.R. (1986) *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 69 ,699.
- Ross P.F., Rice L.G., Osweiler G.D., Nelson P.E., Richard J.L. and Wilson T. M. (1992). A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates, *Mycopathologia*, 117, 109–14.

- Scott P.M. (1985) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68, 242.
- Scott P.M.(1987) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 ,276.
- Scott P.M. (1993). Fumonisin, *Int. J. Food Microbiol*, 18, 257–70.
- Scott P.M. (1995). *Food Addit. Contam*, 12 ,395.
- Scudamore K.A., MacDonald S.J. (1998). *Food Addit. Contam*, 15, 401.
- Seefelder W., Hartl M. and Humpf H-U. (2001). Determination of N-(carboxymethyl) fumonisin B1 in corn products by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem*, 49, 2146–51.
- Seo J.A. and Lee Y.W. (1999). Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn, *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 1331–4.
- Sharma M., Márquez C. (2001) *Anim. Feed Sci Technol*, 93 ,109.
- Shephard G.S., Thiel P.G., Sydenham E.W. (1995). *J. Chromatogr. A*, 692, 39.
- Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenstrom S. and Sydenham E.W. (1996a), Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products, *J. AOAC Int*, 79, 671–87.
- Shephard G.S., van der Westhuizen L., Thiel P.G., Gelderblom W C A., Marasas W.F.O. and van Schalkwyk D.J. (1996b). Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material, *Toxicon*, 34, 527–34.
- Shephard G.S. and van der Westhuizen L.(1998).Liquid chromatographic determination of the sphinganine/sphingosine ratio in serum, *J. Chromatogr*, 710, 219–22B.

- Shephard G.S. (1998). *J Chromatogr A*, 815, 31.
- Shephard G.S., Marasas W.F.O., Burger H.M., Somdyala N. I., Rheeder J.P. and Van der Westhuizen L. (2007). Exposure assessment for fumonisins in the former Transkei region of South Africa. *Food Additives and Contaminants*, 24, 621 - 629.
- Soldevilla C., Vázquez C., Patiño B., Jurado M and González-Jaén M.T. (2005). Hongos toxigénicos asociados a trigos y cebadas de Castilla y León. *Bol San Veg Plagas* ,31, 519–529.
- Solfrizzo M., Avataggiato G., Visconti A. (1998). *J. Chromatogr. A*, 815, 67.
- Souza De. J and Formento N. (2004). Estudios de ané debate en trigo y su relación con la fusariosis (*Fusarium graminearum* y *Fusarium* spp.). VI Congreso Nacional de Trigo. IV Simposio Nacional de Cultivos de Siembra Otoño-Invernal, 211–212. Bahía Blanca, Buenos Aires, 20–22 October.
- Stahr H.M., Domoto M., Hyde W., Martin P.J. (1985). *J. Microchem*, 32 ,266.
- Stanker L.H., Merrill P., Scotcher M.C., Cheng L.W.(2008). *J. Immunol. Methods* 336,1.
- Supelco (1998) . Guide to solid phase extraction, *Supelco Bull.* 910 ,1.
- Suzuki T., Kurisu M., Nose N., Watanabe A. (1981). *J. Food Hyg. Soc.* 22, 197.
- Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G. (1992). *J. AOAC Int.* 75 ,313.
- Sydenham E.W., Thiel P.G. and Vlegaar R. (1996a). Physicochemical data for some selected *Fusarium* toxins, *J. AOAC Int*, 79, 1365–79.
- Tamura M., Takahashi A., Uyama A. and Mochizuki N. (2012). A Method for Multiple Mycotoxin Analysis in Wines by Solid Phase Extraction and

Multifunctional Cartridge Purification, and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, *Toxins*, 4, 476-486.

- Tomlins K.I., Jewers K., Coker R.C., Nagler M.J. (1989) . *Chromatographia* 27, 27.
- Tsunoda M., Sharma R.P. and Riley R.T. (1998). Early fumonisin B1 toxicity in relation to disrupted sphingolipid metabolism in male BALB/c mice, *J. Biochem. Molec. Toxicol*, 12, 81–289.
- Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168–180.
- Valenta H. (1998). *J. Chromatogr. A*, 815, 75.
- Van der Westhuizen L., Brown N.L., Marasas W.F.O., Swanevelder S. and Shephard G.S. (1999). Sphinganine/sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa, *Food Chem. Toxicol*, 37, 1153–8.
- Vatinno R., Vuckovic D., Zamboni C.G., Pawliszyn J. (2008) . *J. Chromatogr. A*, 1201- 215.
- Vesconder R.F., Labeda D.P. and Peterson R.E. (1992). Phytotoxicity of selected water-soluble metabolites of *Fusarium* against *Lemna minor* L (Duckweed), *Mycopathologia*, 118, 185–9.
- Visconti A. and Doko M.B. (1994). Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC. Int*, 77, 546–550.
- Visconti A., Pascale M. (1998). *J. Chromatogr. A*, 818, 133.
- Visconti A., Pascale M., Centonze G. (2000) . *J. Chromatogr. A* 888, 321

- Wang H., Jones C., Ciacci-Zanella J., Holt T., Gilchrist D.G. and Dickman M. B. (1996). Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 93, 3461-5.
- Wang L.D., Yang H.H., Fan Z. M., Lu.X.D., Wang J.K.. and Liu X.L. (2005). Cytological screening and 15 years follow-up (1986-2001) for early esophageal squamous cell carcinoma and precancerous lesions in a high-risk population in Anyang County, Henan Province, Northern China. *Cancer Detection and Prevention*, 29, 317 - 322.
- Wilkes J.G., Sutherland J.B., (1998) . *J. Chromatogr B*, 717 ,135.
- Young J.C., Games D.E. (1992). *J. Chromatogr*, 627, 247.
- Young J.C., Games D.E. (1994). *J. Chromatogr. A*, 663 ,21.
- Yu J.,Chu F.S.(1991). *J.Assoc.Off.Anal.Chem*,74,665.
- Zambonin C.G., Monachi L., Aresta A. (2001). *Food Chem*, 75, 249.
- Zimmerli B., Dick R. (1995). *J. Chromatogr B*, 666, 85.