

**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΠΟΝΗΣΟΥ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ  
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΟΖΟΝ ΣΤΟ ΣΙΤΑΡΙ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΤΑΚΑ ΑΡΕΤΗ**

**Α.Μ.: 2009-001**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

**2015**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΠΟΝΗΣΟΥ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ  
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΟΖΟΝ ΣΤΟ ΣΙΤΑΡΙ»**

**Εξεταστική Επιτροπή : Καπόλος Ιωάννης (Επιβλέπων καθηγητής)**

**Αγριοπούλου Σοφία (Επιβλέπουσα καθηγήτρια)**

**Ζακυνθινός Γεώργιος (μέλος)**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

2015

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ: 5
ABSTRACT.....	.6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΗ....	8
1.1 Μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες.....	10
1.1.1 Ο μύκητας <i>Aspergillus</i> .....	11
1.1.2 <i>Fusarium</i> - ο μύκητας του αγρού.....	13
1.1.3 Ο μύκητας <i>Penicillium spp</i> .....	13
1.1.4 Ο μύκητας <i>Claviceps spp</i> .....	14
1.1.5 <i>Alternaria alternata</i> .....	14
1.2 Κατηγορίες μυκοτοξινών.....	15
1.2.1 Αφλατοξίνες.....	15
1.2.1.1 Προβλήματα που προκαλούν οι αφλατοξίνες στον άνθρωπο και τα ζώα.....	16
1.2.2 Ωχρατοξίνη.....	18
1.2.2.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα.....	19
1.2.3 Τριχοθισίνες.....	20
1.2.3.1 Τοξίνη T-2.....	20
1.2.3.2 Εμετοτοξίνη (δεσοξυνιβαλενόλη, DON).....	21
1.2.4 Ζεαραλενόνη.....	22
1.2.4.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα.....	23
1.2.5 Φουμονισίνες (FBS).....	24
1.2.5.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα.....	25
1.2.6 Πατουλίνη.....	26
1.2.7 Ερυσιβώδους.....	27
1.2.7.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα λόγω των αλκαλοειδών ερυσιβώδους.....	28
1.3 Επιδράσεις μυκοτοξινών.....	29
1.3.1 Τοξικότητα στα ζώα.....	29

1.3.1.1 Ασθένειες που εμφανίζονται στα ζώα και οι μυκοτοξίνες που τις δημιουργούν.....	30
1.3.2 Τοξικότητα στον άνθρωπο.....	33
1.4 Η εμφάνιση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα.....	36
1.4.1 Αφλατοξίνες (AFs).....	36
1.4.2 Ωχρατοξίνες (OTA).....	36
1.4.3 Φουμονισίνες (FMS).....	37
1.4.4 Ζεαραλενόνη (ZEA).....	37
1.4.5 Δεσοξυनिβαλενόλη (DON).....	38
1.4.6 Τοξίνη T-2.....	38
1.4.7 Πατουλίνη.....	39
1.5 Έρευνες που έχουν γίνει για τις μυκοτοξίνες που προσβάλλουν τα τρόφιμα.....	39
1.6 Το πρόβλημα των μυκοτοξινών επηρεάζει και την οικονομία.....	40
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΟΖΟΝ ΣΤΟ ΣΙΤΑΡΙ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΤΟΥ.....</b>	<b>42</b>
2.1 Αφλατοξίνες.....	42
2.1.1 Οι μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες.....	42
2.1.2 Η χημική πλευρά των αφλατοξινών.....	42
2.1.3 Ίδανικές συνθήκες ανάπτυξης.....	44
2.1.3.1 Φυσική αποτοξίνωση.....	44
2.1.3.2 Χημική αποτοξίνωση.....	45
2.1.3.3 Μικροβιακή αποτοξίνωση.....	45
2.1.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες των αφλατοξινών.....	46
2.1.5 Ιστορικές καταγραφές των αφλατοξινών που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα ζώα.....	47
2.1.6 Μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξινών.....	49
2.1.7 Νομοθεσία.....	49
2.2 Όζον.....	51
2.2.1 Η ιστορία και οι εφαρμογές του όζοντος.....	51
2.2.2 Τρόποι παραγωγής του όζοντος.....	55
2.2.3 Η χρήση του όζοντος με βάση τους Διεθνής Οργανισμούς.....	57
2.3 Υλικά και μέθοδοι.....	57

2.3.1 Σχεδίαση πειράματος.....	57
2.3.2 Οζονισμός.....	58
2.3.2.1 Διαδικασία δειγμάτων.....	59
2.3.3 Συνθήκες συστήματος παραγωγοποίησης μετά τη στήλη.....	61
2.3.4 Οι συνθήκες του Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	62
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>63</b>
3.1 Αποτελέσματα του πειράματος.....	63
3.2 Καμπύλες βαθμονόμησης των αφλατοξινών.....	70
3.3 Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από αρκετούς ερευνητές με βάση το όζον και τις αφλατοξίνες.....	72
3.4 Συμπεράσματα.....	73
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>74</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>93</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρόβλημα με τις μυκοτοξίνες είναι σημαντικό και δικαιολογημένα προκαλεί ανησυχίες. Αναφέρεται ως παγκόσμιος κίνδυνος και θεωρείται ως μία από τις πλέον σοβαρές προκλήσεις για την ασφάλεια των τροφίμων, την υγεία των ανθρώπων, των ζώων και για τη σύγχρονη τοξικολογία. Με τον ‘όρο’ μυκοτοξίνες εννοούμε τοξίνες οι οποίες παράγονται από μύκητες. Συγκεκριμένα πρόκειται για προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, κ.α). Υπάρχει μία πληθώρα μυκοτοξινών οι οποίες απαντώνται σε πολλές τροφές, όπως στο γάλα, στα δημητριακά, στους ξηρούς καρπούς, στα αποξηραμένα φρούτα, στο αλεύρι κ.α. που καταναλώνουν καθημερινά οι άνθρωποι, αλλά και σε ζωικές τροφές. Ωστόσο μόνο για κάποιες από αυτές υπάρχουν τεκμηριωμένες μελέτες ενώ ακόμα λιγότερες είναι αυτές, για τις οποίες έχουν προσδιοριστεί τα νόμιμα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης στις τροφές, που καταναλώνονται καθημερινά.

Το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας είναι η κινητική μελέτη που αφορά τη συμπεριφορά των αφλατοξινών έναντι του όζοντος και της θερμοκρασίας. Γνωρίζοντας ότι το όζον είναι αποδεδειγμένα και τεκμηριωμένα το πλέον πιο οξειδωτικό μέσο μετά το φθόριο και έχει ευρεία χρήση σε αρκετούς τομείς των τροφίμων. Το πείραμα αφορούσε την αποικοδόμηση των αφλατοξινών σε σπόρους σιταριού με όζον, το οποίο έδειξε πως το όζον μπορεί να αποικοδομήσει τις αφλατοξίνες, δεν τις εξαλείφει εντελώς, όμως μειώνει τη συγκέντρωσή τους αρκετά. Ακόμη, παρατηρήθηκε το γεγονός ότι όσο πιο μεγάλη ήταν συγκέντρωση του όζοντος σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία, οι αφλατοξίνες μειώνονταν αισθητά.

**Λέξεις κλειδιά:** αφλατοξίνες, όζον, μυκοτοξίνες.

## ABSTRACT

The problem with mycotoxins is a significant and legitimate concern. Referred to as global risk and is considered one of the most serious challenges to food security, human health, animals, and modern toxicology. With the "average" mycotoxins mean toxins produced by fungi. These are secondary metabolic products of fungi (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* etc.). There are a huge variety of different mycotoxins found in many foods such as milk, cereals, nuts, dried fruits, flour, etc. are consumed daily by people, but also in animal feeds. But only some of them are documented studies and even fewer are those, which have been identified the legally permissible concentration limits in foods, are consumed daily.

The subject of this work is the kinetic study on the behavior of aflatoxins against ozone and temperature. All Know that ozone is proven and documented the more oxidant after fluorine and has widespread use in many aspects of the food. The experiment involved the degradation of aflatoxins in corn seeds with ozone, which showed that ozone can degrade aflatoxins, does not completely eliminate, but reduces their concentration enough. It was noted that the greater was the concentration of ozone in combination with the high temperature, aflatoxins reduced considerably.

**Keywords:** aflatoxins, ozon, mycotoxins

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, πρώτη από όλους, την κα. Σοφία Αγριοπούλου για την αμέριστη βοήθεια και την άριστη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και της εκπόνησης της εργασίας. Καθώς, επίσης, και για την ευχάριστη και όμορφη ατμόσφαιρα που υπήρχε μεταξύ μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Καπόλο που με δέχτηκε στην ομάδα του εργαστηρίου του και μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω αυτό το κομμάτι της έρευνας δίπλα του καθώς και δίπλα σε αξιόλογους ανθρώπους. Εκτός όμως, από την επιστημονική και τεχνική τους καθοδήγηση, θα ήθελα, κυρίως, να τους ευχαριστήσω διότι, υποστήριξαν κάθε μου προσπάθεια και έδειξαν εμπιστοσύνη και σεβασμό στο πρόσωπό μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Εμμανουήλ Μαρκόνη και την Ελπίδα Δημητρίου για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Και τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου για την κατανόηση που έχουν δείξει όλο αυτό τον καιρό και για την υποστήριξη που μου δείχνουν σε κάθε μου βήμα.



## 1. ΓΕΝΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΗ

Είναι δύσκολο να οριστεί η μυκοτοξίνη με λίγες λέξεις. Η λέξη μυκοτοξίνη προέρχεται από την ελληνική λέξη «mykes» που σημαίνει μούχλα και «toximum» που σημαίνει δηλητήριο (Brera et al., 2008). Όλες οι μυκοτοξίνες είναι φυσικά προϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους (π.χ. μικρά μόρια) και εξαιρετικά τοξικές χημικές ουσίες που παράγονται ως μη-αντιγονικοί μυκητιασικοί δευτερογενείς μεταβολίτες από νηματοειδείς μύκητες (Smith, 2001). Αυτοί οι μεταβολίτες αποτελούνται από τοξικογόνα και σχηματίζονται από αρκετές μεταβολικές διαδρομές, για παράδειγμα, την πολυκετιδική διαδρομή (αφλατοξίνες), τη διαδρομή των τερπενίων (τριχοθισίνες), τη διαδρομή των αμινοξέων (αφλατοξίνες) και τη διαδρομή του τρικαρβοξυλικού οξέως (ρουμπρατοξίνη). Μερικές μυκοτοξίνες όπως το κυκλοπιαζονικό οξύ σχηματίζεται από τον συνδυασμό δύο η περισσότερων κύριων διαδρομών (Smith, 2001).

Οι μικροσκοπικοί αυτοί νηματοειδείς μύκητες, κοινώς γνωστοί ως μούχλα, μπορούν να αναπτυχθούν σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης (για παράδειγμα, καλαμπόκι, σιτάρι κ.α.) και σε προϊόντα ζωικής προέλευσης (Brera et al., 2008). Αυτά τα μικρά και αρκετά σταθερά μόρια είναι εξαιρετικά δύσκολο να απομακρυνθούν ή να εξαλειφθούν. Επίσης, εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα, διατηρώντας παράλληλα τις τοξικές ιδιότητές τους. Δεν αποτελεί, λοιπόν, έκπληξη το γεγονός, ότι πολλές μυκοτοξίνες εμφανίζουν επικαλυπτόμενες τοξικότητες σε ασπόνδυλα, φυτά και μικροοργανισμούς (Bennett, 1987).

Οι περισσότεροι τοξικοί μύκητες βρίσκονται σε οικογένειες που συνδέονται χημικά με μεταβολίτες (Cole και Cox, 1981). Θεωρούνται αναπόφευκτοι επιμολυντές για τρόφιμα και ζωοτροφές και είναι ένα μεγάλο πρόβλημα σε όλο τον κόσμο με το 25% της παραγωγής των παγκόσμιων καλλιεργειών να έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες (Surai et al., 2010). Περίπου 300 με 400 μυκοτοξίνες είναι γνωστές αλλά οι πιο σημαντικές είναι περίπου 20 ενώσεις (παρ' όλο που οι τοξικοί μεταβολίτες των μυκήτων δυνητικά θα μπορούσαν να ανέρχονται σε χιλιάδες) που παρουσιάζουν τοξικολογικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων (Cole και Cox, 1981, Brera et al., 2008). Οι μυκοτοξίνες έχουν διάφορες χημικές δομές, ως αποτέλεσμα, πολλαπλών ποικιλιών μούχλας που ευθύνονται για την παραγωγή τους (Brera et al., 2008).

Παρ' όλα αυτά, και ενώ, όλες οι μυκοτοξίνες είναι μυκητιακής προέλευσης, δεν είναι όλες τοξικές ενώσεις. Το πρόβλημα της υποβάθμισης από μούχλα και ο κίνδυνος κατανάλωσης κατεστραμμένων σπόρων αναγνωρίζεται πριν από πολλά χρόνια (Attanda et al., 2012). Η παρουσία μυκοτοξίνης στο τρόφιμο μπορεί να συμβεί και με την απουσία της ορατής μούχλας λόγω της παύσης του ζωτικού κύκλου του μικροοργανισμού ή με την επίδραση της αφαίρεσης της μούχλας λόγω των τεχνολογικών επεξεργασιών. Όπως, επίσης, και η εμφάνιση της ορατής μούχλας στην επιφάνεια του τροφίμου δεν συνεπάγει και την παρουσία μυκοτοξίνης. Επιπλέον, μια συγκεκριμένη μυκοτοξίνη μπορεί να παραχθεί από διάφορα γένη και από διάφορα είδη μούχλας και μια συγκεκριμένη μούχλα μπορεί με τη σειρά της να παράγει περισσότερες από μια μυκοτοξίνες (Brera et al., 2008).

Η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με αυτές τις μυκοτοξίνες μπορεί να παράγει τοξικά συμπτώματα στα ζώα και τους ανθρώπους που είναι γνωστά ως μυκοτοξικές δηλητηριάσεις (δηλαδή όταν καταπίνεται, εισπνέεται ή έρχεται σε επαφή με το δέρμα ανώτερων σπονδυλωτών και ζώων) (Sweeney και Dobson, 1998). Υπάρχει μια ασάφεια στη χρήση του όρου μυκοτοξίνη. Οι ζωοτοξίνες και οι φυτοτοξίνες είναι τοξικές ενώσεις για τα ζώα και τα φυτά, αντίστοιχα, ο όρος μυκοτοξίνη αναμένεται να αναφέρεται σε τοξικές ενώσεις με μύκητες αλλά αντ' αυτού χρησιμοποιείται για να περιγράψει ενώσεις που παράγονται από τοξικούς μύκητες. Λόγω της σχετικά υψηλής πρόσληψης δημητριακών και ελαιούχων σπόρων στη διατροφή της εντατικής εκτροφής ζώων, όπως πουλερικά, χοίρους και βοοειδή, έχει υπάρξει εκτενής τεκμηρίωση των αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία των ζώων και παραγωγικά όταν έχουν καταναλωθεί μολυσμένες ζωοτροφές με μυκοτοξίνες (Berry, 1988, Smith and Moss, 1985, Smith et al., 1994). Από την άλλη πλευρά οι ανθρώπινες μυκοτοξικές δηλητηριάσεις είναι λιγότερο κατανοητές (Smith et al., 1995).

Η κατανάλωση των μυκοτοξινών από τον άνθρωπο γίνεται κυρίως μέσω των φυτών των δημητριακών και των υπολειμμάτων των μεταβολιτών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση της υπατικής ή νεφρικής λειτουργίας (Sweeney και Dobson, 1998), στην επαγωγή του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ή αιφνίδιο θάνατο λόγω οξείας τοξικότητας (Lewis et al., 2005). Άλλες μυκοτοξίνες μπορούν να επηρεάσουν το αναπαραγωγικό σύστημα και το ανοσοποιητικό σύστημα, να εμφανίσουν ορμονική δραστηριότητα και να επηρεάζουν συγκεκριμένα όργανα-στόχους, αυτές είναι νευροτοξίνες (Surai et al., 2010), ενώ άλλες δρουν παρεμβαίνοντας στην πρωτεϊνική σύνθεση και εμφανίζουν διάφορα

συμπτώματα, όπως είναι η ευαισθησία του δέρματος, ακόμα και η νέκρωσή του σε ακραίες ανοσοανεπάρκειες (Sweeney και Dobson, 1998). Επίσης, η κατανάλωση μιας μολυσμένης τροφής με μυκοτοξίνη μπορεί να προκαλέσει οξείες και χρόνιες επιδράσεις σε ζώα και ανθρώπους με χειρότερες, την τερατογένεση, την καρκινογένεση και τα οιστρογονικά ή ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα (Jard et al., 2012).

Η ανάπτυξη μούχλας και κατά συνέπεια η παραγωγή μυκοτοξίνης σχετίζονται με τα ακόλουθα:

- Παρουσία των μυκήτων σε ευαίσθητες καλλιέργειες
- Στρες των φυτών που προκαλούνται από ακραία καιρικά φαινόμενα
- Μολυσμένο νερό
- Ζημιά από έντομα και
- Ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης (Surai et al., 2010)

Οι μυκοτοξίνες, επίσης, είναι αβιοτικοί κίνδυνοι αλλά με βιοτική προέλευση. Τα διαγνωστικά χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζουν τις μυκοτοξινώσεις είναι ότι η ασθένεια δεν είναι μεταδοτική, ότι τα φάρμακα με αντιβιοτικά έχουν μικρή ή καθόλου επίδραση και τα κρούσματα είναι εποχιακά. Οι μυκοτοξίνες μπορούν να εμφανιστούν στην τροφική αλυσίδα λόγω της μυκητιασικής λοίμωξης των καλλιεργειών είτε με το να καταναλώνονται άμεσα από τον άνθρωπο είτε να χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές. Ο οργανισμός που προσλαμβάνει τις μυκοτοξίνες οδηγείται σε συσσώρευση των μυκοτοξινών σε διάφορα όργανα ή ιστούς, που εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα μέσω του κρέατος, του γάλακτος ή των αυγών (Marin et al., 2013).

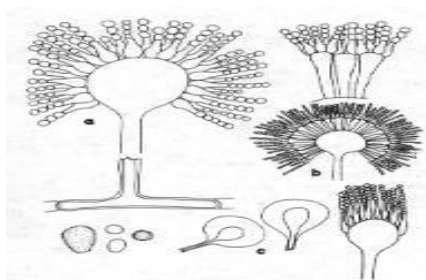
### 1.1 Μύκητες που παράγουν μυκοτοξίνες

Οι κύριοι μυκοτοξιγόνοι μύκητες που συνδέονται με την ανθρώπινη αλυσίδα είναι ο *Aspergillus*, ο *Fusarium*, ο *Penicillium*, ο *Claviceps* και η *Alternaria* (Πίνακας 1.1). Τα είδη *Fusarium* που είναι περίπου 25 (Surai et al., 2010) είναι καταστροφικά παθογόνα των φυτών και παράγουν μυκοτοξίνη πριν ή μετά τη συγκομιδή και έτσι μπορούν να ονομαστούν «μυκοτοξίνες αγρού», τα είδη *Penicillium* που ανέρχονται περίπου στα 75 και *Aspergillus* περίπου στα 45 αναπτύσσονται ως προσμείξεις στις πρώτες ύλες και στα τρόφιμα κατά την ξήρανση και την αποθήκευση (κυρίως των σιτηρών) και έτσι μπορούν να ονομαστούν «μυκοτοξίνες αποθήκευσης» (Surai et al.,

2010, Sweeney και Dobson, 1998). Οι μυκοτοξίνες, επίσης, είναι τοξικές σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι πιο σημαντικές ομάδες μυκοτοξινών που βρίσκονται στα τρόφιμα παράγονται από τα παραπάνω πέντε γένη μυκήτων. Για παράδειγμα,

- Από τον *Aspergillus* παράγεται η αφλατοξίνη
- Από τον *Aspergillus* και από τον *Penicillium* παράγονται:
  1. η ωχρατοξίνη Α και
  2. η πατουλίνη (συμπεριλαμβανομένου του γένους *Byssochlamys*)
- Από τον *Fusarium* παράγονται:
  1. οι τριχοθισίνες, πιο συγκεκριμένα από τον τύπο Α παράγονται οι τοξίνες T-2 και HT-2 και από τον τύπο Β παράγεται η δεσοξυνιβαλενόλη (DON)
  2. η ζεαραλενόνη και
  3. οι φουμονισίνες B1 και B2 και
  4. νέες μυκοτοξίνες που είναι η φουσαπρολιφερίνη, η μονιλιφορμίνη, η μποβερικίνη και η εννιατίνη.
- Τα *Claviceps*, *altenuene*, *altertoxin* και *tenuazonic acid* που παράγονται από τα είδη *alternaria alternata*. (Barkai και Golan, 2008, Bottalico και Logrieco, 1998)

### 1.1.1 Ο μύκητας *Aspergillus*



Εικόνα 1.1.1. Η μορφή του μύκητα *Aspergillus flavus*

Η κύρια μυκοτοξίνη του μύκητα αυτού είναι η αφλατοξίνη. Τα τρόφιμα που προσβάλλονται είναι συνήθως το καλαμπόκι, τα φιστίκια και τα καρύδια. Ο *Aspergillus flavus* ευθύνεται για τη σήψη του καλαμποκιού όπου τα κονίδια που διαβιούν στο έδαφος μεταφέρονται στο φυτό του καλαμποκιού και υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να συνεχιστεί μέχρις ότου η υγρασία στους

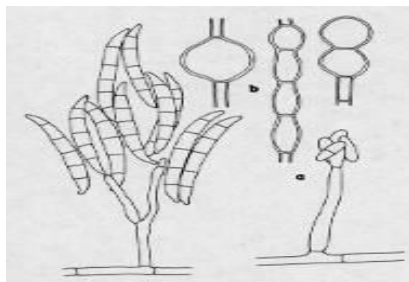
καρπούς φτάσει περίπου στο 15% (Bruegel, 2003). Ο *A. flavus*, του οποίου η μορφή φαίνεται στην Εικόνα 1.1.1, έχει ένα ευρύ φάσμα ανοχής της θερμοκρασίας (19-35°C) με περίπου στους 28°C να είναι η βέλτιστη ανάπτυξη του και στους 28-30°C να γίνεται η παραγωγή της αφλατοξίνης (Sanchis και Magan, 2004). Επίσης, ο *A. flavus* είναι πιο ανθεκτικός στη ξηρασία. Αν και δεν συμβαίνει σε όλες τις καλλιέργειες, οι υψηλές θερμοκρασίες φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη μόλυνση από αφλατοξίνες.

Η αλλαγή του κλίματος, επίσης, μπορεί να έχει άμεση επίδραση στη μόλυνση μιας σειράς βασικών ειδών διατροφής. Τα καρύδια υπό το στρες ξηρασίας θα αναπτύξουν ρωγμές στο λοβό με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του *A. flavus* και κατά συνέπεια την επιμόλυνση με αφλατοξίνες. Άλλα παραδείγματα είναι τα φιστίκια που μπορεί να εμφανίσουν διάσπαση κέλυφους κάτω από θερμότητα ή στρες ξηρασίας (Cotty και Garcia, 2007), η όψιμη συγκομιδή και η δυνατή βροχή μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ποιότητά του και την περαιτέρω μόλυνση από μυκοτοξίνες, αν δεν αποξηρανθούν αποτελεσματικά (Magan et al., 2011). Στο βαμβάκι, τον κύριο ρόλο τον παίζουν τα έντομα που εισέρχονται μέσα στις κάψες του, παρόμοια μόλυνση από τις προνύμφες όμως των εντόμων μπορεί να έχουν και τα αμύγδαλα (Bruegel, 2003). Ακόμη, και το βαμβακέλαιο είναι ευαίσθητο στις αφλατοξίνες (Magan et al., 2011).

Πίνακας 1.1 Τα τρόφιμα και τα είδη μυκήτων που τα προσβάλλουν

<b>ΤΡΟΦΙΜΑ</b>	<b>ΕΙΔΟΣ ΜΥΚΗΤΑ</b>
ΑΡΑΠΙΚΑ ΦΙΣΤΙΚΙΑ	<i>A. flavus</i>
	<i>A. flavus</i> + <i>A. niger</i>
	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
ΑΡΑΒΟΣΙΤΟΣ	<i>A. flavus</i>
	<i>A. flavus</i>
	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i> + <i>A. niger</i>
	<i>A. flavus</i>
ΣΙΤΑΡΙ	<i>A. flavus</i>
	<i>A. flavus</i>
ΡΥΖΙ	<i>A. flavus</i>
	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
ΚΕΧΡΙ	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
ΣΟΓΙΑ	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
ΗΛΙΕΛΑΙΟ	<i>A. flavus</i>
	<i>A. flavus</i>
ΚΑΡΥΔΑ	<i>A. flavus</i>
ΦΙΣΤΙΚΙΑ	<i>A. niger</i> + <i>A. Flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
	<i>A. flavus</i>
ΣΥΚΑ	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>
ΣΠΟΡΟΙ ΜΟΥΣΤΑΡΔΑΣ	<i>A. flavus</i>

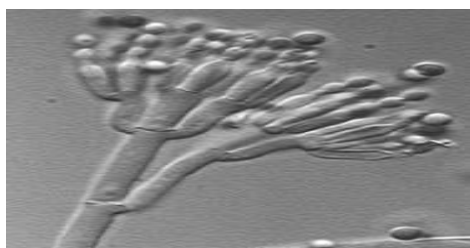
### 1.1.2 *Fusarium*- ο μύκητας του αγρού



Εικόνα 1.1.2. Η μορφή του μύκητα *Fusarium*

Είναι οι λεγόμενες μυκοτοξίνες αγρού που μολύνουν το 100% του κόκκου του βαμβακιού (Surai et al., 2010). Η μορφή αυτού του μύκητα απεικονίζεται στην Εικόνα 1.1.2. Μερικά σημαντικά παθογόνα των φυτών ανήκουν σε αυτό το γένος και είναι αιτία της ψώρας ή των ασθενειών σήψης (οι λεγόμενες μυκοτοξίνες του αγρού, (Surai et al., 2010)). Ο *Fusarium graminearum* είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας. Αλλά και άλλα είδη όπως οι *F. verticillioides*, *F. proliferatum* και ο *F. subglutinans* μπορεί να προκαλέσουν σήψη. Αυτοί επίσης μπορούν να παράγουν φουμονισίνες στο καλαμπόκι. Ο *F. graminearum* είναι το πιο σημαντικό παθογόνο του σιταριού, του κριθαριού και της βρώμης. Επίσης, είναι και ένας από τους σημαντικούς παράγοντες της παραγωγής της δεοξυνιβαλενόλης (DON) σε αυτά. Επίσης, μπορεί να παράγει και τη ζεαραλενόνη σε διάφορα προϊόντα. Ο οργανισμός επιβιώνει στα υπολείμματα των καλλιεργειών και αυτό σημαίνει ότι παραμένει και στη συγκομιδή του επόμενου έτους. Για να εξαλειφθεί αυτός ο παράγοντας θα πρέπει να γίνεται βαθιά άροση και καλή άρδευση κατά την διάρκεια της περιόδου που προσβάλλεται από στρες ξηρασίας (Bruegel, 2003).

### 1.1.3 Ο μύκητας *Penicillium spp.*

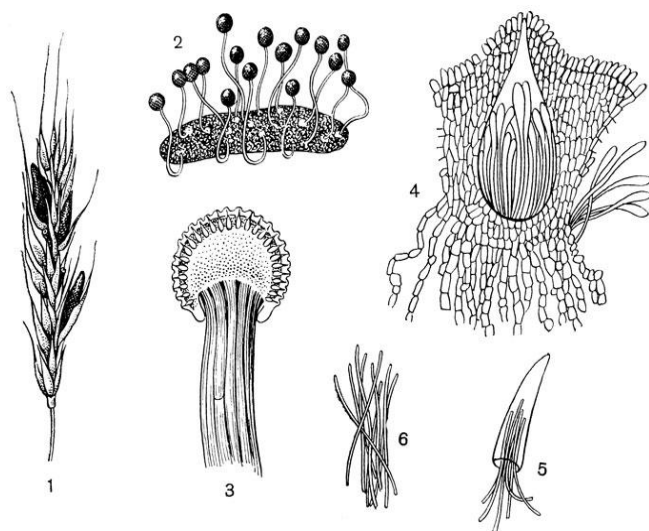


Εικόνα 1.1.3. Η μορφή του μύκητα *Penicillium*

Ο μύκητας *Penicillium* συνδέεται, κυρίως, με την αποθήκευση των τροφίμων και την παραγωγή μυκοτοξινών όπως της ωχρατοξίνης (OTA). Συνήθως σχηματίζεται κατά την αποθήκευση ή κατά τη διάρκεια της ξήρανσης ορισμένων εμπορευμάτων που προορίζονται για μεταποίηση (Bruegel, 2003). Η μορφή του μέσω μικροσκοπίου φαίνεται στην Εικόνα 1.1.3.

#### 1.1.4 Ο μύκητας *Claviceps spp.*

Αυτός ο μύκητας είναι γνωστός ως παράσιτο που αντικαθιστά τις δομές των φυτικών ιστών με μύκητα ο οποίος ονομάζεται ergots ή σκληρώτιο, η μορφή του φαίνεται στην Εικόνα 1.1.4. Αυτά τα μυκητιασικά όργανα συχνά περιέχουν τοξικές ποσότητες αλκαλοειδών που οδηγούν στην ασθένεια γνωστή ως εργοτισμός σε ανθρώπους και σε ζώα. Τα τοξικά αλκαλοειδή επίσης παράγονται από τα γένη *Eriochloe* και *Neotyphodium*, δύο από τα οποία μπορούν να προσβάλουν ορισμένα φυτικά είδη (Bruegel, 2003).



Εικόνα 1.1.4. Η μορφή του *Claviceps spp.*

#### 1.1.5 *Alternaria alternata*

Το είδος μύκητα *Alternaria alternata* αποτελείται από ένα μικρό ποσοστό από περισσότερες από 70 φυτοτοξίνες που παράγονται από αυτό το γένος, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί χημικά και συμπεριφέρονται ως μυκοτοξίνες σε ανθρώπους και ζώα. Ανήκουν σε τρεις διαφορετικές δομικές ομάδες:

- στα παράγωγα ντιμπενροπυρόνη (dibenropryone), αρτερναριόλη (alternariol, AOH), αλτερναριόλη μεθυλοαιθέρα (alternariol methyl-ether, AME) και αλτερνουένη (alternuene, ALT),
- στα παράγωγα περυλένη αλτερτοξινόνη (perylene alvertoxinon, ATX-I+II) και
- στα παράγωγα τετραμικού οξέος (tetramικού acid), τενουαζονικού οξέος (tenuazonic acid, TEA) και ισο-τενουαζονικού οξέος (iso-tenuazonic acid, isoTEA)

Ορισμένες τοξίνες όπως οι AOH, AME, TEA και ATX προκαλούν τοξικές επιδράσεις σε ζώα, συμπεριλαμβανομένων των εμβρυοτοξικών και τερατογόνων δράσεων (Marin et al., 2013).

## 1.2 Κατηγορίες μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες αντιπροσωπεύουν ένα αρκετά ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές μοριακές δομές, ως αποτέλεσμα των πολυάριθμων ειδών μυκήτων υπεύθυνων για την παραγωγή τους (Πίνακας 1.2). Παρακάτω παρατίθενται οι πιο κοινές μυκοτοξίνες:

Πίνακας 1.2. Κατηγορίες μυκοτοξινών και οι μύκητες που τις δημιουργούν

<b>Μυκοτοξίνη</b>	<b>Μύκητες</b>
Αφλατοξίνες	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penicillium sp.</i>
Ζεαραλενόνη	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>
Ωχροτοξίνες	<i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Πατουλίνη	<i>Penicillium patulum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>
Αλκαλοειδή του ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
T-2 τοξίνη	<i>Fusarium tricinctum</i>
Τριχοθισίνες	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium roseum</i>

### 1.2.1 Αφλατοξίνες

Ανακαλύφθηκαν το 1958. Είναι αναπόφευκτα ένας φυσικός επιμολυντής των τροφίμων (Surai et al., 2010). Βάσει των ισχυρών τοξικών επιδράσεων τους, οι αφλατοξίνες, ιδίως η αφλατοξίνη B1 (AFB1), είναι ιστορικά οι κύριες τοξίνες που προκαλούν ανησυχία από την ανακάλυψή τους. Αυτές οι τοξίνες παράγονται από τα



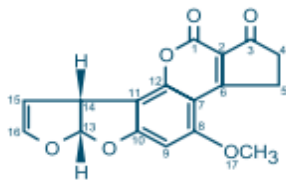
δύο είδη του γένους του μύκητα *Aspergillus*, δηλαδή *A. flavus* και *A. parasiticus*, ιδιαίτερα σε ζεστές και υγρές περιοχές, μαζί με τον *Aspergillus nomius* και τον *Aspergillus pseudotamarii* (Ito et al., 2001, Kurtzman et al., 1987). Υγρασία μεγαλύτερη από 85% και θερμοκρασίες πάνω από 25°C είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των μυκήτων αυτών που παράγονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Diener, 1969). Οι αφλατοξίνες M1 και M2, εκ των οποίων η M1 αποτελεί το κύριο υδροξυλιωμένο παράγωγο της AFB1 (Marin et al., 2013), είναι δύο τοξίνες στο γάλα και στα παράγωγα προϊόντα του, ως αποτέλεσμα του γρήγορου μεταβολισμού των αφλατοξινών B1 και B2 (AFB2) σε ζώα που έχουν τραφεί με μολυσμένες ζωοτροφές.

Οι αφλατοξίνες είναι ουσίες που χημικά σχετίζονται με τη διφουρακουμαρίνη και ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες ανάλογα με τη χημική τους δομή, την ομάδα διφουροκουμαροκυκλοπεντενόνης (συμπεριλαμβανομένων AFB1 και AFB2) και την ομάδα διφουροκουμαρολακτόνης (συμπεριλαμβανομένων AFG1 και AFG2) και της AFM1 (Εικόνα 1.2.1). Η σειρά G περιέχει έναν δακτύλιο D-λακτόνης, ενώ η σειρά B περιέχει ένα δακτύλιο κυκλοπεντενόνης, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεγάλη τοξικότητα της σειράς B. Οι αφλατοξίνες φθορίζουν έντονα στο υπεριώδες φως (περίπου 365 nm), οι AFB1 και AFB2 παράγουν μπλε φθορισμό, ενώ οι AFG1 και AFG2 παράγουν πράσινο φθορισμό. Οι αφλατοξίνες είναι κρυσταλλικές ουσίες, διαλυτές σε μέτρια πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο, είναι ελάχιστα διαλυτές στο νερό (10-30 mg/mL) και αδιάλυτες σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Οι αφλατοξίνες σε ξηρό περιβάλλον είναι πολύ σταθερές στη θερμότητα μέχρι το σημείο τήξης τους. Οι καθαρές αφλατοξίνες καταστρέφονται από ακτινοβολίες UV, ενώ είναι ασταθείς σε pH=3 με την παρουσία οξειδωτικών συστατικών (Brera et al., 2008).

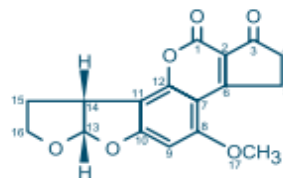
#### 1.2.1.1 Προβλήματα που προκαλεί η αφλατοξίνη στον άνθρωπο και τα ζώα

- Αυτές οι μυκοτοξίνες είναι κοινές μυκητιασικές προσμείξεις των καρπών με κέλφος, αλλά έχουν επίσης βρεθεί να αυξάνονται σε μια ποικιλία από ζωοτροφές, συμπεριλαμβανομένου του αραβοσίτου, του σιταριού, του ρυζιού και του βαμβακόσπορου.
- Η AF μπορεί να γίνει πιο δραστική και επικίνδυνη στο ήπαρ (Haschek et al., 2002).

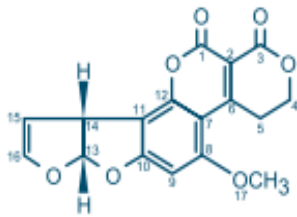
- Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο-στόχος στο οποίο η AF εκφράζει την τοξικότητά της και την καρκινογένεσή της. Η αφλατοξίκωση μπορεί να εξελιχθεί σε δυνητικά θανατηφόρο οξεία ηπατίτιδα με έμετο, κοιλιακό άλγος, ηπατίτιδα, και τελικά θάνατο.
- Η AF μπορεί να διασχίσει το πλακούντα, και έτσι μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα εμβρυϊκά συστήματα, αυξάνοντας τη θνησιγενή και νεογνική θνησιμότητα.
- Οι αφλατοξίνες είναι γνωστό ότι είναι τα αίτια της οξείας αφλατοξίκωσης στον άνθρωπο, ενώ οι περισσότερες χρόνιες ασθένειες, όπως τα καρκινώματα φαίνονται να είναι ασαφή, λόγω της συνύπαρξης της ηπατίτιδας Β στις περιοχές υψηλού κινδύνου για μόλυνση από αφλατοξίνες. Η AFB1 θεωρείται ότι είναι η πιο τοξική και καρκινογόνος ένωση αυτής της ομάδας των μυκοτοξινών. Χαρακτηρίζεται από τον Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο ως καρκινογόνος για τον άνθρωπο.
- Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η kwashiorkor μπορεί να είναι μια μορφή της παιδιατρικής αφλατοξίκωσης, αναφέρεται επίσης ως μια σοβαρή ασθένεια υποσιτισμού των παιδιών της Βόρειας Αφρικής και άλλων υποσιτιζόμενων πληθυσμών, που συνήθως αποδίδεται σε διατροφικές ελλείψεις (Sherif et al., 2009). Κάποιες, ακόμη, ασθένειες για τις οποίες μπορεί να ευθύνεται η AF είναι το σύνδρομο Reye και η εγκεφαλοπάθεια και εκφύλιση των σπλάγχων σε παιδιά και εφήβους αλλά δεν έχει τεκμηριωθεί, ακόμη (Bennett και Klich, 2003). Η έκθεση σε AF στη διατροφή θεωρείται ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του πρωτογενούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ιδιαίτερα σε άτομα που έχουν ήδη εκτεθεί στην ηπατίτιδα Β (Surai et al., 2010).



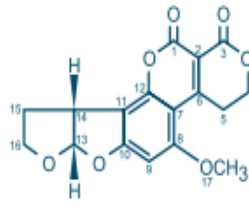
Αφλατοξίνη B1



Αφλατοξίνη B2



Αφλατοξίνη G1



Αφλατοξίνη G2

Εικόνα 1.2.1. Οι χημικές δομές των Αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2.

## 1.2.2 Ωχρατοξίνη

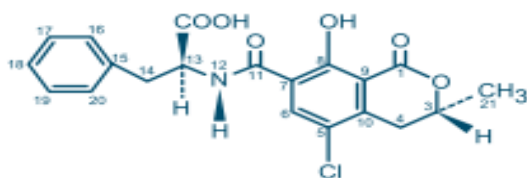
Είναι ένας δευτερογενής μυκητισιακός μεταβολίτης που παράγεται από τα είδη των μυκήτων *Penicillium* και *Aspergillus* κατά την διάρκεια της αποθήκευσης σιτηρών, στα προϊόντα δημητριακών και άλλων φυτικών προϊόντων, με αποτέλεσμα να βρίσκεται σε διάφορες τροφές. Υπάρχουν τέσσερις ωχρατοξίνες: A, B, C, και D. Η ωχρατοξίνη A είναι η πιο διαδεδομένη, ενώ οι ωχρατοξίνες A και C είναι η πιο τοξικές (Haschek et al., 2002). Οι ωχρατοξίνες A (OTA) B και C είναι ενώσεις φαινυλαλανίνης που περιέχουν διυδροισοκουμαρίνη.

Η ωχρατοξίνη A περιέχει επίσης ένα άτομο χλωρίου στον αρωματικό της δακτύλιο, το οποίο ευθύνεται για την τοξικότητά της. Η χημική δομή των ωχρατοξινών A και B φαίνονται στην Εικόνα 1.2.2. Η ωχρατοξίνη παράγεται τόσο από τον *Aspergillus ochraceus* όσο και από τον *Penicillium viridicatum* (Ciegler και Fennell, 1973). Η ωχρατοξίνη A είναι μια άχρωμη κρυσταλλική ένωση που εμφανίζει μπλε φθορισμό κάτω από το υπεριώδες φως. Το άλας του νατρίου της είναι διαλυτό στο νερό, όπως ένα οξύ, είναι μέτρια διαλυτό σε πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη και διαλύεται σε αραιό υδατικό όξινο ανθρακικό νάτριο. Σε όξινη υδρόλυση, η OTA αποδίδει φαινυλαλανίνη και ένα οπτικά ενεργό οξύ λακτόνης. Η αντίδραση σε μεθανόλη και χλωριδρικό οξύ παράγει σε καλλιέργειες τον μεθυλεστέρα της OTA, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντίδραση αναγνώρισης στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

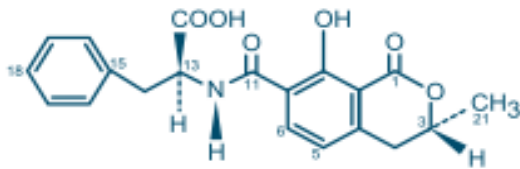
Οι OTA απαντώνται σε σχεδόν όλα τα τρόφιμα που ανήκουν στην τροφική αλυσίδα του ανθρώπου, δηλαδή, στα δημητριακά, το κρασί, το καφέ, τα μπαχαρικά, τη μπίρα, το κακάο, τα αποξηραμένα φρούτα και το χοιρινό κρέας. Η κύρια πηγή της διατροφικής πρόσληψης ωχρατοξίνης A στην Ευρώπη είναι τα δημητριακά και τα παράγωγα προϊόντα τους, στα οποία βασίζεται η παραγωγή πολλών τροφίμων, μαζί με το κρασί και το καφέ (Surai et al., 2010).

### 1.2.2.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα

- Αν και ο μηχανισμός δράσης της ΟΤΑ παραμένει ασαφής, έχει προταθεί ότι η δράση των ωχρατοξινών διαταράσσει το μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης, εισχωρώντας σε κύτταρα και επιβάλλοντας το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση.
- Είναι ανοσοκατασταλτικές, γονοτοξικές, τερατογόνες και καρκινογόνες για μονογαστρικά ζώα και ανθρώπους. Η σημαντικότερη επίδραση της ΟΤΑ είναι η νεφροτοξικότητα.
- Η ΟΤΑ μπορεί να μεταβάλει τόσο τους φραγμούς όσο και την απορροφητική λειτουργία του εντερικού επιθηλίου του εντέρου και να προκαλέσει τραυματισμούς, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής και της διάρροιας (Maresca et al., 2002).
- Η ΟΤΑ σε συνδυασμό με την κολπική μαρμαρυγή έδειξε μια συνεργιστική τοξικότητα (Campbell, 1983).
- Η κατανάλωση μικρών ποσοτήτων μυκοτοξινών μπορεί να οδηγήσει, σε τοξικότητα στα όργανα, σε μειωμένη ανοσία, και μειωμένη αντίσταση στις λοιμώξεις, από ότι σε δόσεις που δεν προκαλούν νεφροτοξικότητα (Alvarez et al., 2004).
- Η ΟΤΑ έχει χαρακτηριστεί ως πιθανή καρκινογόνος για τον άνθρωπο από το Διεθνές Κέντρο Έρευνας για τον Καρκίνο.
- Το χαμηλό αλλά σταθερό οξειδωτικό στρες σε χρόνια επίπεδο μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτό μπορεί τελικά να βλάψει το DNA και να προκαλέσει μεταλλάξεις, που οδηγούν σε καρκινογένεση (Surai et al., 2010).



Οχρατοξίνη Α



Οχρατοξίνη Β

Εικόνα 1.2.2. Χημική δομή των οχρατοξινών Α και Β

### 1.2.3 Τριχοθισίνες

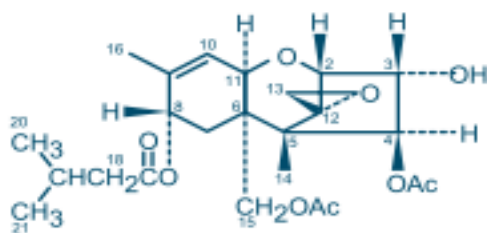
#### 1.2.3.1 Τοξίνη Τ-2

Η ομάδα τριχοθισινών των μυκοτοξινών αντιπροσωπεύει πάνω από 100 μεταβολίτες μυκήτων, εκ των οποίων, η τοξίνη Τ-2 (Εικόνα 1.2.3.1) που παράγεται από τον μύκητα *Fusarium* (*Fusarium graminearum*, *F. sporotrichioides*, και *Stachybotrys chartarum*) ήταν η πρώτη που μελετήθηκε. Είναι ιδιαίτερα διαλυτή σε οξικό αιθυλεστέρα, ακετόνη, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο και διαιθυλαιθέρα. Βρίσκεται συνήθως σε διάφορες καλλιέργειες δημητριακών (σιτάρι, καλαμπόκι, κριθάρι, βρώμη και σίκαλη) και στα μεταποιημένα δημητριακά (βύνη, μύρα και στο ψωμί) (Brera et al., 2008).

Οι αρνητικές συνέπειες της τοξίνης Τ-2 για την υγεία εκφράζονται σε ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, όπως βλάβες του δέρματος, ανοσοκαταστολή, ηπατοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, γονοτοξικότητα ακόμη και θάνατο. Οι ζημιές που προκαλούνται από την εμφάνιση της τοξίνης Τ-2 κυρίως στα κύτταρα διαίρεσης του μυελού των οστών, στα ανοσοεπαρκή όργανα και στο εντερικό βλεννογόνο προκαλούν μια σοβαρή ανοσοκατασταλτική δράση. Η τοξίνη Τ-2 έχει επίσης μια ισχυρή ανασταλτική επίδραση στη σύνθεση της πρωτεΐνης, η οποία με τη σειρά της έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης DNA και RNA (Surai et al., 2010). Επηρεάζει τα ενεργά διαιρούμενα κύτταρα όπως αυτά που επικαλύπτουν τα κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, του δέρματος, των λεμφοειδών και των ερυθροειδών. Μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των αντισωμάτων, των ανοσοσφαιρινών και ορισμένων άλλων χημικών παραγόντων όπως οι κυτοκίνες.

Ορισμένοι μεταβολίτες της τριχοθισίνης είναι εξίσου τοξικοί ή ελαφρώς περισσότερο τοξικοί από την Τ-2 μόνη της. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η τοξίνη Τ-2 συνδέεται με μια ασθένεια στον άνθρωπο που ονομάζεται πεπτική τοξική αλευκία που έπληξε μεγάλο μέρος του πληθυσμού στην περιοχή Όρενμπουργκ κατά τη

διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου. Τα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν φλεγμονή του δέρματος, έμετο και βλάβη σε αιματοποιητικούς ιστούς. Η οξεία φάση συνοδεύεται από νέκρωση της στοματικής κοιλότητας, αιμορραγία από τη μύτη, το στόμα, τον κόλπο και διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (Juan et al., 2008). Όσον αφορά τη Akakabi-byo (νόσος της κόκκινης μούχλας) στην Ιαπωνία που προσβάλλει τις ζωοτροφές χοίρων, οι κεντρικές Ηνωμένες Πολιτείες δεν δέχονται ότι σχετίζεται με τις μυκοτοξίνες, τριχοθισίνες (Desjardins και Proctor, 2007).



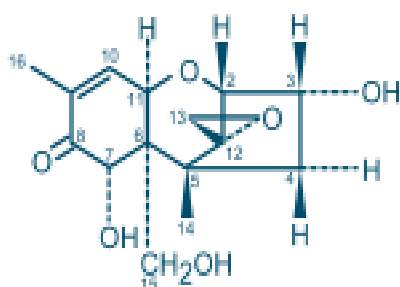
Εικόνα 1.2.3.1. Χημική δομή της τοξίνης T-2

### 1.2.3.2 Εμετοτοξίνη (δεσοξυνιβαλενόλη, DON)

Η DON παράγεται σε όλο τον κόσμο από το γένους *Fusarium* και συγκεκριμένα τα είδη *F. graminearum* και *F. culmorum*. Η DON, περιέχει μια κύρια και δύο δευτεροταγείς υδροξυλομάδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2.3.2 και είναι διαλυτή στο νερό και τους πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Η DON μολύνει διάφορες καλλιέργειες δημητριακών (σιτάρι, καλαμπόκι και κριθάρι), που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών, παρ' όλα αυτά η DON είναι μια από τις λιγότερο τοξικές τοξίνες των τριχοθισινών. Η κύρια τοξική επίδραση σχετίζεται με την αναστολή της σύνθεσης της πρωτεΐνης μέσω πρόσδεσης στο ριβόσωμα. Η επαγωγή της απόπτωσης θεωρείται επίσης ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα της DON σε εντερικά κύτταρα (Maresca et al., 2002). Η DON σε μέτριες έως χαμηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από αρνητικές επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοκαταστολών και αλλάζοντας τις νευροχημικές ουσίες του εγκεφάλου.

Στα παιδιά, η κατάποση μολυσμένων τροφίμων με μεγάλη συγκέντρωση DON έχει ως αποτέλεσμα να κάνουν εμετό μέσα σε λίγες ώρες. Πολλά κρούσματα οξείας ασθένειας, σε ανθρώπους λόγω της DON, που περιλαμβάνουν γαστρεντερικές

διαταραχές και διάρροια έχουν καταγραφεί στην Ασία λόγω της κατανάλωσης μολυσμένων σπόρων από *Fusarium* (Creppy, 2002). Η DON είναι επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία, λόγω της ικανότητάς της να μολύνει τα βασικά γεωργικά προϊόντα, το οποίο είναι αναπόφευκτο, την ικανότητά της να υποβαθμίζει τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της άλεσης ή επεξεργασίας και τη δύναμη που έχει να προκαλεί τοξικότητα σε ανθρώπους και ζώα (Pestka και Amuzie, 2008).



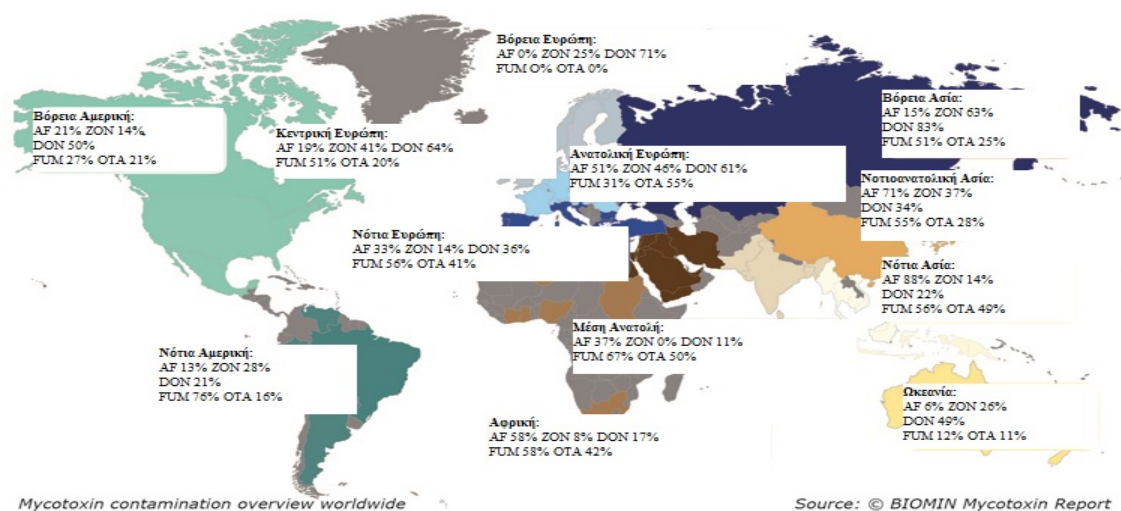
Εικόνα 1.2.3.2. Χημική Δομή της εμετοτοξίνης DON

#### 1.2.4 Ζεαραλενόνη (ZEA)

Η ZEA είναι ένα μη-στεροειδές, μια τοξίνη φαινολικής ρεσορκυκλικής λακτόνης οξέως οιστρογονική (Εικόνα 1.2.4) (Diekman και Green, 1992), που παράγεται κυρίως από τους μύκητες *F. graminearum*, *Fusarium culmorum* και *Fusarium sacchari* (Brera et al., 2008) και έχει συσχετιστεί με οιστρογονικά σύνδρομα στους χοίρους και σε πειραματόζωα (Surai et al., 2010). Η ZEA είναι μια λευκή κρυσταλλική ένωση, η οποία εμφανίζει μπλε-πράσινο φθορισμό όταν διεγείρεται από μακρού μήκους κύματος υπεριώδες φως στα 360 nm και ένα πιο έντονο πράσινο φθορισμό όταν διεγείρεται με φως μήκους κύματος UV στα 260 nm. Είναι διαλυτή στο νερό, ελαφρώς διαλυτή σε εξάνιο και ακόμα πιο διαλυτή στο βενζόλιο, στο ακετονιτρίλιο, στο διχλωρομεθάνιο, στη μεθανόλη, την αιθανόλη και την ακετόνη. Είναι επίσης διαλυτή σε υδατικό αλκάλι (Brera et al., 2008).

Εμφανίζεται φυσικά στο καλαμπόκι υψηλής υγρασίας και έχει βρεθεί σε μουχλιασμένο σανό και σε ζωοτροφές. Οι μύκητες που παράγουν ZEA μολύνουν το καλαμπόκι, επίσης, δημιουργούν αποικίες, σε μικρότερο βαθμό, στο κριθάρι, τη βρώμη, το σιτάρι, το σόργο, το κεχρί και το ρύζι. Η παραγωγή ZEA ευνοείται από

την υψηλή υγρασία και τις χαμηλές θερμοκρασίες, συνθήκες που εμφανίζονται συχνά στις δυτικές πολιτείες κατά τη διάρκεια της συγκομιδής το φθινόπωρο. Είναι μια σταθερή ένωση, τόσο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης/άλεσης όσο και κατά την επεξεργασία/μαγείρεμα των τροφίμων (Surai et al., 2010). Το Παγκόσμιο πρόβλημα των πιο σημαντικών μυκοτοξινών παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2.



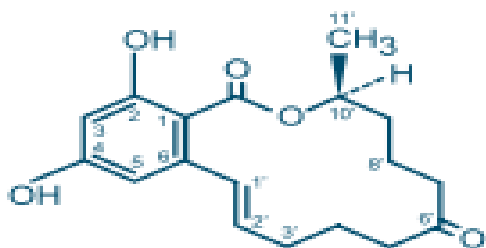
Εικόνα 1.2. Χάρτης που παραθέτει το Παγκόσμιο πρόβλημα των μυκοτοξινών.

#### 1.2.4.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα

- Απορροφάται αρκετά γρήγορα μετά τη χορήγηση από το στόμα.
- Ενώνεται ανταγωνιστικά με τους υποδοχείς οιστρογόνων σε μια σειρά από συστήματα στο σωλήνα, στη μήτρα, στο μαστικό αδέν, το ήπαρ και στον υποθάλαμο των διαφορετικών ειδών.
- Η ΖΕΑ προκαλεί μια ποικιλία από τοξικές επιδράσεις τόσο στα πειραματόζωα όσο και τα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Έχει οιστρογονική και αναβολική δραστηριότητα και έχει δείχθει ότι είναι ανοσοτοξική και γονοτοξική.
- Προκαλεί αλλαγές στο αναπαραγωγικό σύστημα των πειραματόζωων προκαλώντας μειωμένη γονιμότητα, αυξημένες εμβρυικές απορροφήσεις, μειωμένο μέγεθος νεογνού, μειωμένο βάρος των επινεφριδίων, του θυρεοειδούς και των αδένων υπόφυσης και την αλλαγή στα επίπεδα της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης στον ορό. Οι τερατογόνες επιδράσεις της ΖΕΑ απαντώνται σε χοίρους και πρόβατα.



- Η ZEA μπορεί ενδεχομένως να σχετίζεται με την πρόωρη ήβη και το καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Surai et al., 2010).



Εικόνα 1.2.4. Χημική δομή της ζεαραλενόνης (ZEA)

### 1.2.5 Φουμονισίνες (FBS)

Οι FBS είναι μία οικογένεια 28 τοξινών. Οι φουμονισίνες είναι η πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσα οικογένεια αμινοπολυκαρβοξυλικών οξέων (Εικόνα 1.2.5). Ανακαλύφθηκαν το 1988 μετά από ένα ξέσπασμα της λευκοεγκεφαλομαλακίας υποειδών στη Νότια Αφρική το 1970. Οι φουμονισίνες αυτές είναι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από τουλάχιστον 11 είδη του μύκητα *Fusarium*, αλλά τα πιο κύρια είδη μυκήτων από τα οποία παράγονται είναι ο *Fusarium verticillioides* και *Fusarium Nirenberg* (πρώην *F. moniliforme Sheldon*) και ο *Fusarium proliferatum*. Η πιο άφθονη και τοξική είναι η φουμονισίνη B1 (FB1). Η FB1 χημικά περιγράφεται ως διεστέρας προπανο-1,2,3-τρικαρβοξυλικό οξύ και 2-αμινο-12,16-διμεθυλο-3,5,10,14,15-πενταδιϋδροξυεικοσανιο (Friend et al., 1983, Gelderblom et al., 1988).

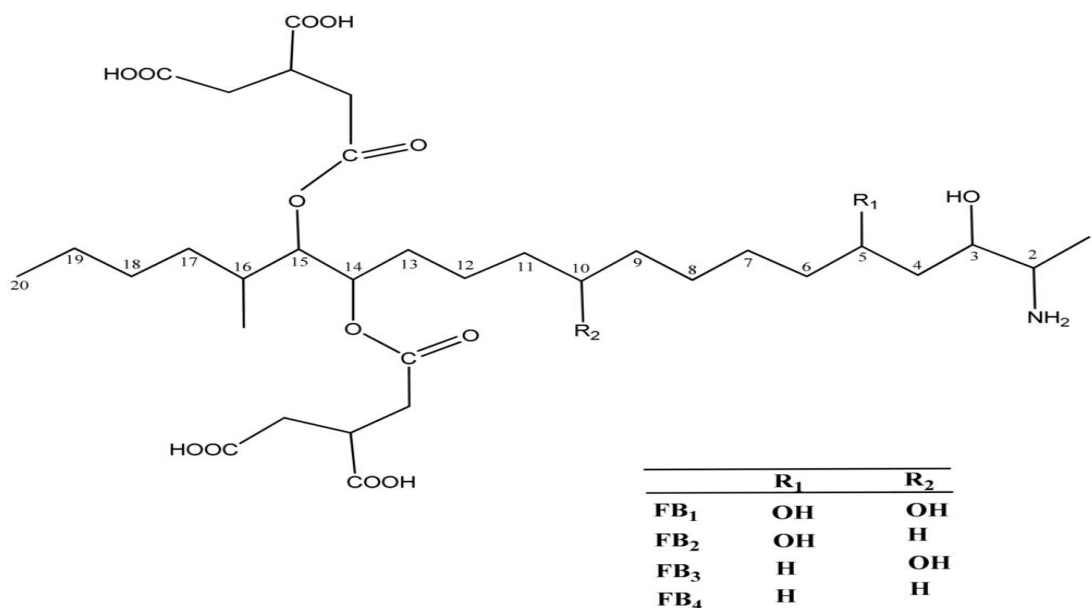
Η φουμονισίνη B2 (FB2) είναι ανάλογη της FB1 στην οποία οι αντίστοιχες μονάδες επιμερών στον εικοσάνιο σκελετό έχουν την ίδια διαμόρφωση. Η πλήρης στερεοχημεία των φουμονισινών B3 (FB3) και B4 είναι άγνωστη ακόμα, αλλά το τελευταίο άμινο της FB3 έχει την ίδια απόλυτη διαμόρφωση όπως εκείνο της FB1 (Bolger et al., 2001, IPCS, 2000). Η FB1 τυπικά αντιπροσωπεύει το 70-80% του συνόλου των FBS που παράγονται, ενώ η FB2 φτάνει συνήθως μέχρι 15-25% και η FB3 φτάνει συνήθως πάνω από 3% έως 8%, όταν εντοπίζονται σε καλαμπόκι ή ρύζι ή σε υγρό μέσο (Rheeder et al., 2002). Η καθαρή ουσία είναι μια λευκή σκόνη, διαλυτή στο νερό, στο ακετονιτρίλιο-νερό και στη μεθανόλη. Η αδιαλυτότητα τους σε πολλούς οργανικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο και το εξάνιο χρησιμοποιείται

συνήθως στην ανάλυση των μυκοτοξινών που εξηγούν εν μέρει τη δυσκολία στην αρχική τους αναγνώριση.

Οι φουμονισίνες B1 και B2 αναφέρεται να είναι σταθερές για μία περίοδο 6 μηνών στους 251°C σε ακετονιτρίλιο-νερό (1:1) ( Brera et al., 2008). Οι φουμονισίνες αυτές εντοπίζονται κυρίως σε αραβόσιτο και προϊόντα με βάση τον αραβόσιτο. Πολλά διαφορετικά παράγωγα αυτής της μυκοτοξίνης έχουν περιγραφεί από τα οποία η (FB1) αναγνωρίζεται ως η πλέον τοξική και έχει δειχθεί ότι είναι υπεύθυνη για ορισμένες σημαντικές τοξικολογικές επιδράσεις σε ζώα (Surai et al., 2010).

#### **1.2.5.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα**

- Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν μια σχέση μεταξύ της έκθεσης σε φουμονισίνη B1 (FB1) και του καρκίνου του οισοφάγου.
- Η κατανάλωση μουχλιασμένου σόργου ή καλαμποκιού περιέχει υψηλά επίπεδα της φουμονισίνης B1 προκαλώντας την επιδημία μιας ανθρώπινης ασθένειας στην Ινδία η οποία εμπλέκεται με τα γαστρεντερικά συμπτώματα (Creppy, 2002).
- Με βάση τα τοξικολογικά στοιχεία, ο IARC έχει κατατάξει την FB1 ως πιθανώς καρκινογόνα για τον άνθρωπο (ομάδα 2B) (IARC, 2002)
- Οι διαθέσιμες μελέτες δείχνουν ότι οι FBS δεν διαθέτουν υψηλά επίπεδα οξείας τοξικότητας, αν και ορισμένα ζώα, όπως τα πρόβατα, εμφάνισαν οξεία τοξικότητα που επηρέασε κυρίως την ηπατική και νεφρική τους λειτουργία (Edrington et al., 1995).
- Το ήπαρ και τα νεφρά είναι τα κύρια όργανα στόχοι (Voss et al., 2007)
- Το έντερο είναι επίσης ένας πιθανός στόχος για την τοξικότητα των FBS (Bouhet και Oswald, 2007).
- Στα άλογα, η κατανάλωση των μολυσμένων ζωοτροφών με FBS έχει αναγνωριστεί ως αιτία μιας ασθένειας, γνωστή ως λευκοεγκεφαλομαλακία υποειδών (ELEM). Το σύνδρομο ELEM είναι μια θανατηφόρα ασθένεια που εμφανίζεται προφανώς μόνο σε άλογα και συναφών ειδών (Morgavi και Riley, 2007)



Εικόνα 1.2.5. Χημική δομή των φουμονισινών (FBS)

### 1.2.6 Πατουλίνη

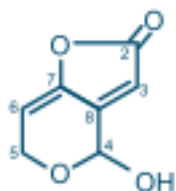
Η πατουλίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1940, αλλά είναι πλέον γνωστό σε όλο τον κόσμο ότι το τρόφιμο το οποίο προσβάλλει είναι το μήλο και τα προϊόντα μήλου. Η πατουλίνη παράγεται από διάφορα είδη των γενών *Penicillium*, *Aspergillus* και *Byssoschlamys* που μπορούν να αναπτυχθούν σε μια ποικιλία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων, των καρπών σιτηρών και του τυριού. Το *Penicillium expansum* είναι ένα από τα σημαντικότερα είδη που παράγουν την τοξίνη αυτή. Η πατουλίνη αναφέρεται ότι καταστρέφεται με αλκοολική ζύμωση και έτσι δεν βρίσκεται είτε σε αλκοολούχα ποτά φρούτων είτε στο ζύδι που παράγεται από χυμούς φρούτων (Stinson et al., 1978, Long, 1997). Η θερμική επεξεργασία φαίνεται να προκαλεί μικρές μειώσεις στα επίπεδα της πατουλίνης, έτσι η συγκέντρωση της πατουλίνης που είναι παρούσα στο χυμό μήλου δεν θα μειωθεί κατά τη διαδικασία της παστερίωσης (IARC, 1986, Mckinley et al., 1991).

Το επίπεδο της μόλυνσης σχετίζεται συνήθως αυστηρά με τη μούχλα και το βαθμό αποσύνθεσης των προϊόντων διατροφής, ακόμη και αν η τοξίνη συγκεντρώνεται μόνο στα μουχλιασμένα μέρη. Η παρουσία της σε χυμούς φρούτων, ιδιαίτερα στο χυμό μήλου, μπορεί να θεωρηθεί ως ο κύριος δυνητικός κίνδυνος για τους ανθρώπους, αφού η σήψη ή τα μουχλιασμένα μέρη των φρούτων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην κατασκευή των προϊόντων (Brega et al., 2008) αυτών και

έχει αποδειχθεί ότι είναι μεταλλαξιογόνα, καρκινογόνα και τερατογόνα (Surai et al., 2010).

Η πατουλίνη από χημικής άποψης είναι μια λακτόνη (Εικόνα 1.2.6) και μπορεί να απομονωθεί ως άχρωμη ουσία σε λευκούς κρυστάλλους από αιθερικά εκχυλίσματα που δεν έχουν οπτική δραστηριότητα. Λιώνει σε περίπου 110<sup>0</sup>C. Είναι διαλυτή στο νερό, στη μεθανόλη, στην αιθανόλη, στην ακετόνη και στο αιθύλιο ή οξικό αμύλιο και λιγότερο διαλυτή στον διαιθυλαιθέρα και στο βενζόλιο. Όλες οι αντιδράσεις που αναμένονται από μια δευτεροταγή αλκοόλη, γίνονται στη πατουλίνη, δηλαδή, μειώνει το θερμό διάλυμα Fehlings και αποχρωματίζει το υπερμαγγανικό κάλιο. Είναι σταθερή σε όξινα διαλύματα, αλλά είναι ευαίσθητη στην αλκαλική υδρόλυση (Brera et al., 2008). Ο κοινός Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας- η επιτροπή εμπειρογνομόνων Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας για τα πρόσθετα τροφίμων έχει εδραιώσει ένα προσωρινό μέγιστο ανεκτό όριο ημερήσιας πρόσληψης για την πατουλίνη στα 0,4 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (Surai et al., 2010).

Η πατουλίνη μπορεί, επίσης, να επηρεάσει τη λειτουργία του εντερικού επιθηλίου επάγοντας εκφυλισμό των επιθηλιακών κυττάρων, φλεγμονή, έλκος και αιμορραγίες (Mahfood et al., 2002).



Εικόνα 1.2.6. Η χημική δομή της πατουλίνης

### 1.2.7 Ερυσιβώδους

Η πρώτη τεκμηριωμένη επιδημία του εργοτισμού πιθανόν να συνέβη το 944-945 μ.Χ., όταν περίπου 20.000 άνθρωποι από την περιοχή Ακουιτανίας της Γαλλίας (περίπου το ήμισυ του πληθυσμού) πέθαναν λόγω δηλητηρίασης η οποία οφείλονταν σε ερυσιβώδους. Η εργολίνη ή αλκαλοειδή ερυσιβώδους πρώτα βρέθηκαν στη σίκαλη, είναι ένας μαύρος κόνδυλος όπως ο μη-ενδοφυτικός μύκητας που μολύνει σπόρους και προκαλεί την ασθένεια γνωστή ως εργοτισμός. Πιο συγκεκριμένα, τα αλκαλοειδή ερυσιβώδους παράγονται από διάφορα είδη *Claviceps* (κυρίως από *Claviceps purpurea*) και είναι γνωστό πως προσβάλλει τους σπόρους των δημητριακών (Surai et al., 2010). Είναι επίσης ένα γένος μυκήτων που εισβάλλει στο

θηλυκό τμήμα του φυτού ξενιστή και αντικαθιστά την ωοθήκη με μια μάζα ιστού που ονομάζεται μυκητιασικό σκληρώτιο.

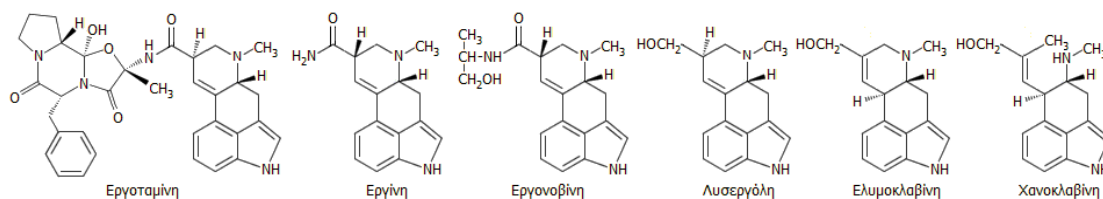
Με τον καθορισμό της βασικής χημικής δομής των αλκαλοειδών ερυσιβόδους στις αρχές του 1930, άρχισε μια εποχή εντατικής εξερεύνησης των συνθετικών παραγώγων. Τα αλκαλοειδή ερυσιβόδους σίκαλης είναι οι ενώσεις ινδόλης που προέρχονται από βιοσυνθετικά L-τρυπτοφάνης και αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη ομάδα των αζωτούχων μυκητιασικών μεταβολιτών που βρίσκονται στη φύση. Πάνω από 80 διαφορετικά αλκαλοειδή ερυσιβόδους έχουν απομονωθεί, κυρίως από διάφορα είδη *Claviceps* (πάνω από 70 αλκαλοειδή), αλλά επίσης και από άλλους μύκητες και ανώτερα φυτά. Εν κατακλείδι, τα αλκαλοειδή της ερυσιβόδους αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των ενώσεων που περιέχουν άζωτο από μύκητες και γενικά χωρίζονται σε τέσσερις μεγάλες ομάδες με βάση τις χημικές διαφορές τους (Εικόνα 1.2.7). Οι οποίες είναι:

1. οι clavines (αγροκλαβίνη (agroclavine), ελυμοκλαβίνη (elymoclavine) και λυσεργόλη (lysergol)),
2. το λυσεργικό οξύ (lysergic acids),
3. τα αμίδια του λυσεργικού οξέος (the lysergic acid amides) (εργίνη (ergine), εργονοβίνη (ergonovine), μεθεργίνη (methergine), μεθυσεργίδη (methysergide) και διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD)) και
4. οι εργοπεπτίνες (ergopeptides) (εργοταμίνη (ergotamine), εργοβαλίνη (ergovaline), α-εργοσίνη (α-ergosine) και α-εργοκρυπτίνη (α-ergocryptine)) (Reháček και Sajdl, 1990).

Επιλεγμένα μέλη αυτών των ομάδων των ενώσεων εμπλέκονται είτε στο νευρικό σύστημα είτε στο σύνδρομο της γάγγραινας στον άνθρωπο και τα ζώα που καταναλώνουν δημητριακά ή προϊόντα δημητριακών που έχουν μολυνθεί με τα σκληρώτια του μύκητα.

#### **1.2.7.1 Προβλήματα στον άνθρωπο και τα ζώα λόγω των αλκαλοειδών ερυσιβόδους**

- Τα αλκαλοειδή ερυσιβόδους είναι μυκοτοξίνες που επηρεάζουν το νευρικό και το αναπαραγωγικό σύστημα των εκτεθειμένων ατόμων, μέσω των αλληλεπιδράσεων με τους υποδοχείς μονοαμίνης.



Εικόνα 1.2.7. Χημικές δομές ορισμένων αλκαλοειδών ερυσιβόδους

### 1.3 Επιδράσεις Μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες μολύνουν το ανθρώπινο και το ζωικό διατροφικό κύκλο με έμμεση ή άμεση μόλυνση. Άμεση μόλυνση συμβαίνει όταν το τρόφιμο ή η ζωοτροφή μολυνθεί με ένα τοξικογόνο μύκητα με επακόλουθο το σχηματισμό τοξινών. Σε αντίθεση, η έμμεση μόλυνση μπορεί να λάβει χώρα όταν ένα κομμάτι της διαδικασίας παραγωγής του τροφίμου έχει ήδη μολυνθεί με τοξίνη που παράγει μύκητες και ενώ ο ίδιος ο μύκητας μπορεί να θανατωθεί ή να αφαιρεθεί κατά την επεξεργασία, η μυκοτοξίνη θα παραμείνει ως επί το πλείστον στο τελικό προϊόν. Οι περισσότερες από τις κοινές μυκοτοξίνες είναι σε γενικές γραμμές, αρκετά ανθεκτικές στις περισσότερες μορφές επεξεργασίας των τροφίμων και των ζωοτροφών (Smith, 2001).

#### 1.3.1 Τοξικότητα στα ζώα

Υπάρχει μια εκτεταμένη βιβλιογραφία που τεκμηριώνει το ευρύ φάσμα των δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία των ζώων και την παραγωγικότητα, όταν οι μυκοτοξίνες, και ιδιαίτερα οι αφλατοξίνες, υπάρχουν στη διατροφή τους (Smith et al., 1994). Τα ζώα μπορούν να δείξουν μεταβλητή ευαισθησία ανάλογα με τους γενετικούς παράγοντες (είδος, φυλή, στέλεχος), με τους φυσιολογικούς παράγοντες (ηλικία, διατροφή) και με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (κλιματολογικές συνθήκες, κτηνοτροφία και διαχείριση). Η σύνθεση των ζωοτροφών, λόγω του φάσματος των προμηθειών των πρώτων υλών, εκθέτουν τα ζώα σε πολλές μυκοτοξίνες. Σε οξείες μορφές μυκοτοξίκωσης τα μεμονομένα ζώα δείχνουν συμπτώματα της νόσου και σε ακραίες περιπτώσεις τα ζώα πεθαίνουν (Smith, 2001).

Για παράδειγμα, όσον αφορά το γάλα, τα νεαρά ζώα που θηλάζουν από μολυσμένη μητέρα μπορεί να παρουσιάσουν κάποια προβλήματα λόγω της αφλατοξίνης (AFM1, η πιο σοβαρή στο γάλα). Μερικά ζώα, επίσης, μπορεί να έχουν διάρροια ή αιμορραγία. Άλλα οιστρογονικά αποτελέσματα που μπορεί να

προκληθούν είναι, το πρησμένο αιδοίο, οι πρησμένες θηλές και η πρωκτική και κολπική πρόπτωση. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε έκτρωση ή μείωση στη σύλληψη ή πρόβλημα στο μέγεθος των νεογνών. Μπορεί να εμφανιστούν συμπτώματα ή κλινικές ενδείξεις ανεπάρκειας ήπατος ή νεφρική βλάβη λόγω της μυκοτοξικότητας. Αυτά τα προβλήματα μπορεί να εμφανιστούν μετά από υψηλή ή παρατεταμένη πρόσληψη (Atanda et al., 2012).

Ορισμένες ασθένειες που έχουν καταγραφεί ιστορικά είναι, η νόσος Turkey-X από αφλατοξίνη, η νεφροπάθεια χοίρων από την ωχρατοξίνη A, αιδοιοκολπίτιδα σε χοίρους από τη ΖΕΑ, η λευκοεγκεφαλομαλακία ιπποειδών και το πνευμονικό οίδημα χοιροειδών από φουμονισίνες. Όμως τα οξεία σύνδρομα που παρατηρούνται είναι η ηπατίτιδα, η αιμορραγία, η νεφρίτιδα, η νέκρωση του στόματος και του εντερικού επιθηλίου. Στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες αναγνωρίζεται ότι τα φυσικά επίπεδα μόλυνσης από τις περισσότερες μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές δεν συμβαίνουν συνήθως σε επίπεδα που ενδέχεται να προκαλέσουν εμφανή τοξικά συμπτώματα, αλλά, αντίθετα να προκαλέσουν συμπτώματα χρόνιας μυκοτοξίκωσης και ανοσοκαταστολής.

Οι πιο κοινές μορφές μυκοτοξίκωσης σε εκτρεφόμενα ζώα είναι η μειωμένη παραγωγικότητα σε μορφή βραδύτερων ρυθμών ανάπτυξης, η μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα, η μειωμένη αποδοτικότητα μετατροπής της τροφής, οι μειωμένες αποδόσεις γάλακτος ή η μειωμένη παραγωγή αυγών. Λόγω της ποικιλομορφίας των χημικών δομών τους και των διαφορετικών φυσικών ιδιοτήτων, οι μυκοτοξίνες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων σε συστήματα θηλαστικών. Επίσης, μπορεί να είναι γονοτοξικές, μεταλλαξιογόνες, καρκινογόνες, εμβρυοτοξικές, τερατογόνες ή οιστρογόνες (Smith και Henderson, 1991). Ορισμένες μυκοτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν καρκίνους σε διάφορα είδη ζώων και στον άνθρωπο. Η σχετικά σύντομη διάρκεια ζωής των πιο εντατικά εκτρεφόμενων ζώων μειώνει τη σπουδαιότητα της ανάπτυξης του καρκίνου σε αντίθεση με τον άνθρωπο (Smith, 2001).

### **1.3.1.1 Ασθένειες που εμφανίζονται στα ζώα και οι μυκοτοξίνες που τις προκαλούν**

Είναι προφανές ότι οι μυκοτοξίνες επηρεάζουν περισσότερο από ένα σύστημα ταυτόχρονα και ως εκ τούτου, παράγουν πολλαπλά συμπτώματα στο

προσβεβλημένο ζώο με αποτέλεσμα να αυξάνεται η δυσκολία εντοπισμού της μυκοτοξίνης στον οργανισμό του ζώου. Τα γενικά αποτελέσματα των μυκοτοξινών στην υγεία και την παραγωγικότητα των ζώων εξαρτώνται από τη δόση, και γενικά οι νέοι ενός είδους είναι πιο ευαίσθητοι στις επιδράσεις των μυκοτοξινών από ό, τι οι ενήλικες (Bruegel, 2003).

- i. Οι αφλατοξίνες είναι τοξίνες του ήπατος και τα περισσότερα είδη ζώων που εκτίθενται σε αυτές δείχνουν σημάδια ηπατικής νόσου που κυμαίνονται από οξεία ασθένεια σε χρόνια ασθένεια. Η ανοσοκαταστολή είναι ένας σημαντικός παράγοντας στα εκτεθειμένα ζώα στην αφλατοξίνη. Οι αφλατοξίνες μετατρέπονται σε ένα άλλο τοξικό μεταβολίτη που απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα και είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη στην αφλατοξίνωση των βοοειδών γαλακτοπαραγωγής. Σοβαρές οικονομικές απώλειες λόγω αφλατοξινών συμβαίνουν στα πουλερικά λόγω της μειωμένης παραγωγικότητας και της νόσου.
- ii. Οι τριχοθισίνες είναι ισχυροί αναστολείς της πρωτεϊνικής βιοσύνθεσης και τα περισσότερα αποτελέσματα σε ζώα έχουν αυτό το βασικό χαρακτηριστικό. Η DON είναι η πιο κοινή αυτής της ομάδας που προκαλεί την ασθένεια των ζώων και οι συνέπειες κυμαίνονται από την άρνηση των ζωοτροφών και την απώλεια της παραγωγικότητας. Η DON των χοίρων είναι πολύ πιο ευαίσθητη από ότι είναι η DON των πουλερικών και των βοοειδών που είναι και αυτά αρκετά ευαίσθητα.
- iii. Τα νεφροτοξικά αποτελέσματα της ωχρατοξίνης A σε χοίρους είναι μια σημαντική ασθένεια, σε ορισμένες χώρες, όπως η Δανία. Τα αποτελέσματα της ωχρατοξίνης σε άλλα ζώα εμφανίστηκαν κυρίως ως μειωμένη παραγωγικότητα.
- iv. Το κυκλοπιαζονικό οξύ είναι μια άλλη μυκοτοξίνη που βρίσκεται σε πολλά προϊόντα και λόγω του ότι εμφανίζεται μαζί με τις αφλατοξίνες, μπορεί να είναι σημαντική για τις ζωικές ασθένειες. Είναι ικανή να επηρεάζει το σχηματισμό του κελύφους των αυγών στα πουλερικά και έχει την ικανότητα να εμφανίζεται στο μυϊκό ιστό των προσβεβλημένων ζώων (Bruegel, 2003).
- v. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η τοξίκωση από φεστούκα (ένα αγρωτώδες ζιζάνιο) είναι ένα πρόβλημα που οφείλεται στο χόρτο των βοσκοτόπων. Ένας τοξικός ενδοφυτικός μύκητας είναι υπεύθυνος για έναν αριθμό σύνδρομων,



συμπεριλαμβανομένης μιας κατάστασης γάγγραινας των άκρων, κυρίως σε βοοειδή που βόσκουν σε βοσκότοπους με φεστούκα.

- vi. Οι επιδράσεις των μυκοτοξινών στον οργανισμό των ζώων συμβαίνουν επειδή οι περισσότερες από τις μυκοτοξίνες έχουν σαν πρώτο τους στόχο ένα συγκεκριμένο σύστημα του οργανισμού, και έτσι, είναι δυνατόν να χρησιμοποιούν ένα πλησιέστερο σύστημα για την ταξινόμησή τους. Οι ανοσολογικές επιδράσεις οφείλονται σε διάφορες μυκοτοξίνες. Οι κυρίαρχες μυκοτοξίνες στον τομέα αυτό είναι οι αφλατοξίνες, οι τριχοθισίνες και η ωχρατοξίνη Α. Ωστόσο, αρκετές άλλες μυκοτοξίνες, όπως οι φουμονισίνες, η ζεαραλενόνη, η πατουλίνη, η κιτρίνη, η γλυτοτοξίνη, η φεστούκα και η αλκαλοειδής ερυσιβόδους όλυρας έχουν αποδειχθεί ότι επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα.
- vii. Οι μυκοτοξίνες που έχουν κυρίως αιμοποιητικά αποτελέσματα είναι οι αφλατοξίνες και οι τριχοθισίνες. Το σύνδρομο της αιμορραγικής αναιμίας μπορεί να αποδοθεί σε κάθε μία από αυτές τις ομάδες των μυκοτοξινών.
- viii. Μεταξύ αυτών των μυκοτοξινών που έχουν πρωταρχική ηπατοτοξική δράση είναι οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες, οι φουμονισίνες, η σποριδεσμίνη, οι ρουμπρατοξίνες και οι φομοψίνες. Όλες τους θα προκαλέσουν σημαντική ηπατική βλάβη όταν χορηγούνται σε ζώα (Bruegel, 2003).
- ix. Οι πιο αξιοσημείωτες μυκοτοξίνες που έχουν επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα είναι η ζεαραλενόνη και τα αλκαλοειδή ερυσιβόδους όλυρας. Ωστόσο, ορισμένα αναπαραγωγικά προβλήματα έχουν παραχθεί σε επιλεγμένα είδη ζώων από τις αφλατοξίνες και την τοξίνη T-2.
- x. Οι τερατογόνες επιδράσεις έχουν αποδειχθεί, τουλάχιστον πειραματικά, από την αφλατοξίνη B1, την ωχρατοξίνη Α, τη Ρουμπρατοξίνη Β, την τοξίνη T-2, τη στεριγματοσιστίνη και τη ζεαραλενόνη.
- xi. Οι νευροτοξικές επιδράσεις των μυκοτοξινών φαίνονται όταν σταματά να υπάρχει η αίσθηση της γεύσης (το γεγονός αυτό προκαλείται από τη DON), όταν εμφανίζεται η επιληπτική κρίση, η εστιακή μαλακία και η υγροποίηση του εγκεφαλικού ιστού με τη μεσολάβηση πιθανώς μέσω της σύνθεσης σφιγγολιπίδιου υπό την επίδραση των φουμονισινών. Επίσης, το τρίκλισμα και οι δονήσεις που παράγονται από έναν αριθμό τρεμοργενικών μυκοτοξινών, η σπασμωδική και άλλες επιδράσεις του νευρικού συστήματος λόγω της ερυσιβόδους αλκαλοειδών και τέλος, η παρασυμπαθομιμητική

δραστηριότητα που προκύπτει από τις επιδράσεις του μεταβολίτη σλαφραμίνη για επιλεγμένους υποδοχείς στο νευρικό σύστημα.

- xii. Πολλές μυκοτοξίνες έχουν ταξινομηθεί ως καρκινογόνες και περιλαμβάνουν τις αφλατοξίνες, τη στεριγματοσιστίνη, την ωχρατοξίνη Α, τις φουμονισίνες, και ενδεχομένως, την πατουλίνη.
- xiii. Αρκετές από τις τριχοθισίνες ταξινομούνται ως δερμονεκρωτικές λόγω της ερεθιστικής και νεκρωτικής δραστηριότητάς τους (Bruegel, 2003).

### 1.3.2 Τοξικότητα στον άνθρωπο

Θα προκαλούσε έκπληξη το γεγονός αν δεν υπήρχαν φυσιολογικές διαταραχές σε ανθρώπους με χρόνια έκθεση στις μυκοτοξίνες, αλλά επί του παρόντος, δεν υπάρχει καμία αποδεκτή μορφή της μέτρησης. Οι επιδράσεις των μυκοτοξινών στην υγεία του ανθρώπου είναι πολύπλοκες και λιγότερο κατανοητές. Ιστορικά, η μυκοτοξίκωση γνωστή ως εργοτισμός προκάλεσε μαζικά προβλήματα και θάνατο στο μεγαλύτερο μέρος της Βόρειας Ευρώπης, το Μεσαίωνα. Αιτία ήταν ο μυκητιακός οργανισμός *Claviceps purpurea*, ο οποίος στη παραγωγή σίκαλης, είχε αναπτύξει δηλητηριώδη αλκαλοειδή τα οποία δεν καταστράφηκαν κατά το ψήσιμο του καρπού και αν καταναλωνόταν αυτό το ψωμί σίκαλης, για παράδειγμα, θα μπορούσε να προκαλέσει διαταραχές του νευρικού συστήματος, νέκρωση, γάγγραινα και απώλεια των άκρων και σε πολλές περιπτώσεις θα υπήρχαν μοιραίες επιπτώσεις στην αναπαραγωγικότητα του ανθρώπου (Matossian, 1989). Άλλα ιστορικά επεισόδια μυκοτοξίκωσης προκάλεσαν πολλούς θανάτους εξαιτίας του πεπτικοτοξικού *Aleukia* (ΑΤΑ), της σταχυμποτρυοτοξίκωσης στη Ρωσία, την ασθένεια του κίτρινου ρυζιού στην Άπω Ανατολή, την ενδημική νεφροπάθεια των Βαλκανίων (ΒΕΝ), την τοξίκωση από κόκκινη μούχλα (Magan και Olsen, 2000) και την οξεία αφλατοξίκωση στη Κένυα (Lewis et al., 2005).

Στις παραπάνω ιστορικές αναφορές, υπήρξε ισχυρή συσχέτιση με την κατανάλωση ισχυρής τοξίνης που μολύνει τα τρόφιμα (Smith, 2001). Σύμφωνα με την έκθεση της Παγκόσμιας Τράπεζας του 1993, περίπου το 40% της αναπηρίας των ενηλίκων στις αναπτυσσόμενες χώρες οφείλονται σε ασθένειες από μυκοτοξίνες (Brera et al., 2008). Γενικά, στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες, δεν είναι πιθανή η κατανάλωση τέτοιας ποσότητας μολυσμένων τροφίμων λόγω του αυστηρού κανονισμού αν και μπορεί να υπάρξουν μεμονωμένα περιστατικά. Οι βελτιωμένες

γεωργικές πρακτικές και οι καλύτερες εγκαταστάσεις αποθήκευσης και μεταφοράς έχουν περιορίσει την τοξικογόνο ανάπτυξη μούχλας σε πρώτες ύλες που προορίζονται για την ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει μια ανησυχία για τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις που προκύπτουν από μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα ορισμένων μυκοτοξινών (Smith et al., 1994).

Εξακολουθεί να είναι ανεπαρκής η κατανόηση των επιπτώσεων των διαφόρων επιπέδων της κατάποσης μιας μυκοτοξίνης ή ενός μείγματος μυκοτοξινών. Αυτές οι επιδράσεις έχουν επίσης αποδειχθεί και στα ζωικά συστήματα με προσεκτικά πειράματα, αλλά η βιομηχανία τροφίμων συνεχίζει να αμφισβητεί την παρουσία τους στα ανθρώπινα προϊόντα. Ελάχιστα όμως είναι τα στοιχεία που υπάρχουν για την πρόσληψη κυρίως των ευπαθών ομάδων όπως είναι, τα παιδιά, οι έγκυες, οι ηλικιωμένοι, οι ανοσοκατασταλμένοι (ασθενείς των οποίων το αμυντικό σύστημα του οργανισμού βρίσκεται σε καταστολή, δηλαδή δεν είναι στο επιθυμητό επίπεδο λειτουργίας) και τα άτομα που δεν ακολουθούν σωστή διατροφή. Οι γνώσεις που υπάρχουν για τους τρόπους δράσης των παθολογικών καταστάσεων και των βαθμών τοξικότητας έχουν αναπτυχθεί μετά από πειραματικές μελέτες σε ζώα, όχι σε ανθρώπους. Για παράδειγμα, το αποτέλεσμα της γονοτοξικότητας με την καρκινογένεση, την μεταλλαξιογένεση και την τερατογένεση έχει συνδεθεί με τις αφλατοξίνες (IARC, 1993).

Είναι πλέον αποδεκτό ότι οι αφλατοξίνες είναι καρκινογόνες για τον άνθρωπο. Η καρκινογένεση της στεριγματοκιστίνης, της ωχρατοξίνης A, της τοξίνης T-2, της πατουλίνης, της γρισεοφουλβίνης και της ζεαραλενόνης είναι αποδεκτή για τα ζώα και ιδιαίτερα ύποπτη για τον άνθρωπο. Λόγω της ασαφούς σχέσης μυκοτοξίνες και ανθρώπινες ασθένειες πρόσφατα αναπτύχθηκαν κάποιοι μέθοδοι για τη βιοπαρακολούθηση ατομικών δεικτών που θα ερευνούν αυτή τη σχέση. Η ανάπτυξη των βιολογικών δεικτών για την αφλατοξίνη και για άλλες μυκοτοξίνες, στηρίζεται στη γνώση του μεταβολισμού και του μακρομοριακού προϊόντος προσθήκης που σχηματίζει αυτές τις μυκοτοξίνες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν τέτοιους δείκτες βρίσκονται στα ούρα, το αίμα και το γάλα για να εκτιμηθεί η έκθεση των ατόμων και να προβλεφτεί ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου και άλλων ασθενειών (Coker, 1997, Wild et al., 1998).

Τιχη αφλατοξίνης βρέθηκαν στη διατροφή του ανθρώπου σε ζεστές, υγρές αναπτυσσόμενες χώρες, στο ανθρώπινο μητρικό γάλα, στο αίμα των εγκύων και στο αίμα του ομφάλιου λώρου των βρεφών κατά τη γέννηση. Έχει βρεθεί, ακόμη, και σε

δείγματα ηρωίνης στο Ηνωμένο Βασίλειο (Smith et al., 1995). Επιστημονικές ενδείξεις φέρουν το αποτέλεσμα ότι πολλές μυκοτοξίνες μπορούν να βλάψουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Πολλοί τοξικολόγοι προτείνουν τώρα ότι οι τοξικές επιδράσεις πολλών μυκοτοξινών θα μπορούσαν να έχουν δυσμενείς συνέπειες για το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα (Pestka και Bondy, 1994).

Η χρόνια έκθεση σε μυκοτοξίνες στη διατροφή του ανθρώπου θα μπορούσε να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του. Μολυσματικές ασθένειες όπως οι αναπνευστικές λοιμώξεις, οι διαρροϊκές ασθένειες, η φυματίωση, η ιλαρά, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και αρκετές άλλες συμμετέχουν στο θάνατο των παιδιών στις αναπτυσσόμενες χώρες (Miller, 1998, Smith, 2001). Επίσης, οι φουμονισίνες έχουν συνδεθεί με τον καρκίνο του οισοφάγου στην Νότια Αφρική (Sydenham et al., 1990). Άλλες σοβαρές ασθένειες που πλήττουν την Αφρική είναι η ελονοσία και το Kwashiorkor (Wagacha και Muthomi, 2008). Κυρίως, λοιπόν, οι υποσαχάριοι πληθυσμοί βρίσκονται σε κίνδυνο λόγω της κατάποσης τροφίμων, τα οποία είναι μολυσμένα από αυτές τις μυκοτοξίνες, ως βασική διατροφή. Έτσι, οι καλλιέργειες σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές είναι πιο επιρρεπείς σε μολύνσεις λόγω των ευνοϊκών κλιματικών συνθηκών (Bankole και Adebajo, 2003).

Ενώ, η τοξικότητα μιας οποιαδήποτε μυκοτοξίνης εξαρτάται από τη δόση, αυτή η δόση δεν είναι η πραγματικά χορηγούμενη δόση της τοξίνης αλλά είναι η πραγματική συγκέντρωση της μυκοτοξίνης στο χώρο της κυτταρικής δράσης που θα καθορίσει την κυτταροτοξικότητα. Εάν, η συγκέντρωση της είναι πολύ μικρή δεν μπορεί να είναι τοξική, ενώ η βιομετατροπή της θα μπορούσε να οδηγήσει σε τοξικό μεταβολίτη. Η απορρόφηση μιας μυκοτοξίνης θα συμβεί εάν διασχίσει τις μεμβράνες του δέρματος και εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Οι βασικές θέσεις απορρόφησης της μυκοτοξίνης είναι, ο γαστρεντερικός σωλήνας (κατάποση), οι πνεύμονες (εισπνοή) και το δέρμα (άμεση επαφή). Τα συκώτια και τα νεφρά έχουν μεγάλη ικανότητα να δεσμεύουν πολλές μυκοτοξίνες, πολλές από αυτές όμως είναι λιπόφιλες και μπορούν να συγκεντρωθούν στο σωματικό λίπος (Smith et al., 1994).

## 1.4 Η εμφάνιση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα

### 1.4.1 Αφλατοξίνες (AFs)

Οι AFs εντοπίζονται συχνά στα δημητριακά και τα παράγωγά τους, στα καρύδια, και σε άλλα είδη. Η Ανάλυση των δειγμάτων των τροφίμων αυτών αποκαλύπτει ότι το ποσοστό της AFB1 είναι συχνά το υψηλότερο. Τα καρύδια και τα φιστίκια παρουσιάζουν μια πολύ υψηλότερη μέση και μέγιστη τιμή από τις άλλες ομάδες τροφίμων. Επιπλέον, τα σύκα, τα φιστίκια, τα καρυκεύματα, τα φουντούκια και τα αμύγδαλα, όσον αφορά την συγκέντρωση της AFB1 είναι συνήθως στα 2 µg/kg και πάνω από 4 µg/kg για το σύνολο των AFs.

Ο καθαρισμός των δημητριακών ή των ξηρών καρπών, όπου η μούχλα έχει βλάψει τους σπόρους αφαιρείται από το άθικτο αγαθό και μπορεί να οδηγήσει σε 40-80% μείωση των AFs (Park, 2002). Τα αποτελέσματα του φρεζαρίσματος των δημητριακών οδηγούν σε μια ανακατανομή των AFs και άλλων τοξινών που λαμβάνονται σε διάφορα κλάσματα, το λιγότερο μολυσμένο αλεύρι και η απολέπιση κόκκων προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Το Ψήσιμο, το μαγείρεμα, το βράσιμο, το τηγάνισμα και το καβούρδισμα οδηγεί σε διαφορετικά επίπεδα αδρανοποίησης των αφλατοξινών (Bullerman και Bianchini, 2007).

Πολλές τροφές μπορεί να περιέχουν αφλατοξίνες, όπως για παράδειγμα, οι αραχίδες, το βαμβακέλαιο και το καλαμπόκι είναι οι πιο σημαντικοί φορείς αφλατοξινών στις αγελάδες. Πρόσφατα στοιχεία για την AFM1 σε δείγματα γάλακτος σε διάφορες μελέτες από διάφορες χώρες της ΕΕ δείχνουν ότι η επικράτηση της AFM1 σε μολυσμένα δείγματα φαίνεται να είναι πολύ χαμηλή

### 1.4.2 Ωχρατοξίνη (OTA)

Μετά από έρευνες, περισσότερο από το 50% των δειγμάτων είχαν θετικά αποτελέσματα στην ωχρατοξίνη, για παράδειγμα, το κακάο και τα παράγωγα προϊόντα του είχαν 81%, τα αποξηραμένα φρούτα 73%, το κρασί 59%, τα δημητριακά 54% και τα καρυκεύματα 52%, αν και τα θετικά δείγματα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα επίπεδα LOD. Ωστόσο, τα υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης αναφέρθηκαν για τα αποξηραμένα φρούτα, το πράσινα καφέ και τα μπαχαρικά. Παρά το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν στοιχεία που να επιβεβαιώνουν τη μόλυνση από ωχρατοξίνη στους κόκκους κακάο, τα αποτελέσματα για τα μεταποιημένα προϊόντα

του επιβεβαίωσαν τους σπόρους του κακάο σαν μια πρώτη ύλη, η οποία είναι σε μεγάλο βαθμό ευαίσθητη στη μόλυνση από ΟΤΑ.

Μεταξύ των διαφόρων μπαχαρικών, το μοσχοκάρυδο, η πάπρικα, το κόλιανδρο και το πιπέρι, έχουν τη πιο μεγάλη και συχνή μόλυνση. Όσον αφορά τους οίνους, το κόκκινο και γλυκό κρασί φαινόταν να είναι το πιο μολυσμένο. Τα στοιχεία που αφορούσαν τα αποξηραμένα φρούτα, με ιδιαίτερη αναφορά στα παράγωγα προϊόντα των φρούτων, υποδεικνύουν ότι αυτά τα προϊόντα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη μόλυνση από ΟΤΑ, και αυτό συμβαίνει, μάλλον, λόγω της διαδικασίας ξήρανσης στην οποία υποβάλλονται. Ο πράσινος καφές έχει επιβεβαιωθεί ότι είναι μια πρώτη ύλη επιδεκτική στη μόλυνση από ΟΤΑ.

Η Σύγκριση μεταξύ των πράσινων και των επεξεργασμένων δειγμάτων καφέ δείχνει σημαντική μείωση της ΟΤΑ και αυτό συμβαίνει, κατά πάσα πιθανότητα, λόγω της ανάμειξης και των ζημιών κατά τη διάρκεια των διαδικασιών του ψησίματος. Μεταξύ των σιτηρών, η σίκαλη έδειξε το υψηλότερο επίπεδο μόλυνσης (με 50% θετικά δείγματα), και ακολουθείται από το κριθάρι και το σιτάρι. Η έκταση της ΟΤΑ που είχε επίπτωση σε μολυσμένη μύρα ήταν αρκετά χαμηλή (Marin et al., 2013).

#### **1.4.3 Φουμονισίνες (FMS)**

Ο Αραβόσιτος είναι, κατά πολύ, το πιο επιρρεπές τρόφιμο στη μόλυνση από φουμονισίνες. Το γλυκό καλαμπόκι είναι λιγότερο ευαίσθητο στη μόλυνση από μύκητες του γένους *Fusarium* σε σχέση με άλλες ποικιλίες καλαμποκιού. Ορισμένες θερμικές επεξεργασίες ή η εξώθηση, έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν σε κάποιο βαθμό την παρουσία των φουμονισινών στα τρόφιμα, σε γενικές γραμμές, τα προϊόντα για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, όπως οι νιφάδες καλαμποκιού έχουν χαμηλά επίπεδα φουμονισινών (Marin et al., 2013).

#### **1.4.4 Ζεαραλενόνη (ZEA)**

Σύμφωνα με τον EFSA (2011), μεταξύ των σπόρων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, η συχνότητα εμφάνισης της ζεαραλενόνης στον αραβόσιτο (33%) και τα μέσα επίπεδα του περιεχομένου της (15μg/kg) είναι σημαντικά υψηλότερα. Σε γενικές γραμμές, η ζεαραλενόνη αναδιανέμεται μεταξύ των κλασμάτων άλεσης. Τα υποπροϊόντα από τον καθαρισμό των πρώτων κόκκων

δημητριακών (σκόνη, φλοιοί, και άλλα) χαρακτηρίστηκαν από 3 έως 30 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις ΖΕΑ από τους καθαρισμένους κόκκους δημητριακών, ενώ το πίτουρο περιείχε έως 2 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις. Γενικά, η ζεαραλενόνη δεν επηρεάζεται από το μαγείρεμα. Μόνο κάτω από αλκαλικές συνθήκες ή κατά το μαγείρεμα εξώθησης (θέρμανση κάτω από υψηλό βαθμό πίεσης) παρατηρήθηκε μείωση άνω του 40% (EFSA, 2011).

#### 1.4.5 Δεσοξυνιβαλενόλη (DON)

Όσον αφορά την DON, το σιτάρι έχει διερευνηθεί ευρύτερα σε σχέση με τα άλλα δημητριακά. Ο αραβόσιτος δείχνει το υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων (89%) και μετά ακολουθεί το σιτάρι. Λαμβάνοντας υπόψη τα ανώτατα όρια της ΕΕ, η DON προσβάλλει κατά κύριο λόγο το σιτάρι. Παρά το γεγονός ότι το ποσοστό των θετικών δειγμάτων ήταν υψηλό στις πρώτες ύλες και στα προϊόντα διατροφής, παρέμεινε χαμηλό στα μεταποιημένα τρόφιμα. Για παράδειγμα, τα μπισκότα, το ψωμί και τα ζυμαρικά μολύνονται λιγότερο από το σιτάρι. Ομοίως, τα δημητριακά πρωινού και οι παιδικές τροφές που μπορεί να περιέχουν αραβόσιτο, μπορεί να περιέχουν χαμηλότερη συγκέντρωση της DON από το σιτάρι και το καλαμπόκι. Κατά συνέπεια, το ψήσιμο του ψωμιού, τα cookies και τα μπισκότα έχουν μειώσει την DON από το 0% έως το 71% (Bullerman και Bianchini, 2007). Η κονσερβοποίηση του καλαμποκιού οδήγησε σε 12% μείωση (Wolf-Hall et al., 1999).

#### 1.4.6 Τοξίνη T-2

Μετά από έρευνες, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η βρώμη μπορεί να είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη μόλυνση από T-2, με υψηλή συχνότητα εμφάνισης και υψηλές συγκεντρώσεις και μετά ακολουθεί το κριθάρι. Ο αραβόσιτος μπορεί περιστασιακά να μολυνθεί με μέτριες συγκεντρώσεις, ενώ η μόλυνση του σιταριού δεν συμβαίνει συχνά και όταν συμβαίνει υπάρχει σε χαμηλό επίπεδο συγκέντρωσης (SCOOP, 2003). Η επεξεργασία των σιτηρών θα μειώσει σημαντικά την μόλυνση από την τοξίνη T-2 στα περισσότερα προϊόντα τροφίμων. Όπως και για τις περισσότερες μυκοτοξίνες, επειδή οι τοξίνες T-2 ως επί το πλείστον συνδέονται με το εξωτερικό κύτος του κόκκου, ο καθαρισμός, η διαλογή, το κοσκίνισμα και το ξεφλούδισμα των

κόκκων οδηγεί σε σημαντικές αυξήσεις της τοξίνης T-2 σε υποπροϊόντα δημητριακών, όπως για παράδειγμα στο πίτουρο (Marin et al., 2013).

#### **1.4.7 Πατουλίνη**

Η εμφάνιση της πατουλίνης γίνεται πιο συχνά στο χυμό μήλου και τα προϊόντα μήλου, παρουσιάζοντας υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης. Όσον αφορά τους χυμούς από διάφορα φρούτα εκτός του μήλου, η συγκέντρωση της πατουλίνης είναι χαμηλότερη από την συγκέντρωση που υπάρχει συνήθως στο χυμό μήλου (Marin et al., 2013).

### **1.5 Έρευνες που έχουν γίνει για τις μυκοτοξίνες που προσβάλλουν τα τρόφιμα**

Τουλάχιστον το 25% της παραγωγής σιτηρών στον κόσμο έχει μολυνθεί με μυκοτοξίνες (Fink- Gremmels, 1999). Για παράδειγμα, οι AF θεωρούνται αναπόφευκτες προσμείξεις των τροφίμων, δεδομένου ότι δεν μπορούν να προληφθούν ή να εξαλειφθούν με την τρέχουσα γεωργική πρακτική (Peraica και Domijan, 2001). Στην Αφρική, η πρόσληψη AFM1 από το γάλα υπολογίζεται ότι κυμαίνεται από 0,1 ng/άτομο/ημέρα έως 12 ng/άτομο/ημέρα σε χώρες της Άπω Ανατολής (Creppy, 2002). Έχει αναλυθεί το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που αγοράζονται στην αιγυπτιακή αγορά και το μητρικό γάλα από μητέρες που θηλάζουν. Τρία από τα 15 δείγματα αγελαδινού γάλακτος βρέθηκαν θετικά στην AFM1 με μέση τιμή 6,3 ng/kg. Το 20% των δειγμάτων σκληρού τυριού περιείχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα AFM1 και κάποια περιείχαν και AFB1 και AFG1. Όσον αφορά το μητρικό γάλα, δύο στα δέκα δείγματα ήταν θετικά για την AFM1 με μέση τιμή 2,75 ng/kg, ενώ τρία στα δέκα δείγματα ήταν θετικά για την OTA (Ei- Sayed et al., 2000). Στη Τουρκία, η συχνότητα εμφάνισης της AFM1 στο τυρί ήταν 89,5% με την υψηλότερη συγκέντρωση να είναι 810 ng/kg (Huseyin και Sonal, 2001).

Η πιθανότητα εμφάνισης των μυκοτοξινών στη διατροφή μας είναι πολύ υψηλή. Για παράδειγμα, τα αποτελέσματα μιας έρευνας από 313 δείγματα από το Ηνωμένο Βασίλειο από τρόφιμα λιανικής και 153 δείγματα δημητριακών από το Ηνωμένο Βασίλειο έδειξαν ότι ανιχνεύθηκε OTA στο 25% των δειγμάτων με 27 δείγματα να περιέχουν OTA σε συγκεντρώσεις πάνω από 4 ng/gr (Atkins και Norman, 1998). Η συχνότητα της μόλυνσης με OTA στο ψωμί σε διάφορες χώρες



ήταν επίσης αρκετά υψηλή. Η DON ανιχνεύθηκε σε διάφορα προϊόντα διατροφής (ψωμί, δημητριακά για πρωινό, μπίρα και παιδικές τροφές) στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (Creppy, 2002). Όταν 88 εμπορικά διαθέσιμα δείγματα πρωινού με βάση το σιτάρι συλλέχθηκαν τυχαία από διάφορα σούπερ μάρκετ στη Λισαβόνα, το 72.8 % των δειγμάτων περιείχαν επίπεδα της DON μεταξύ 103 και 6.040 μg/kg με μέσο όρο τα 754 μg/kg (Martins και Martins, 2001). Όταν οι 363 παιδικές τροφές με βάση τα σιτηρά στην канаδική αγορά αναλύθηκαν για μυκοτοξίνες, η DON ανιχνεύθηκε στο 63% των δειγμάτων (Lombaert et al., 2003).

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να μολύνουν σχεδόν όλα τα συστατικά των ζωοτροφών και των τροφίμων. Για παράδειγμα, τα είδη *Fusarium* έχουν βρεθεί σε σιτάρι, καλαμπόκι, κριθάρι, βρώμη και σίκαλη. Από την άλλη πλευρά, οι αφλατοξίνες μπορούν επίσης να μολύνουν τους ελαιούχους σπόρους και άλλα συστατικά ζωοτροφών.

## **1.6 Το πρόβλημα των μυκοτοξινών επηρεάζει και την οικονομία**

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι περίπου το 25% των παγκόσμιων καλλιεργειών τροφίμων πλήττονται κάθε χρόνο από διάφορες μυκοτοξίνες που μπορεί να έχουν σημαντικές οικονομικές συνέπειες για την καλλιέργεια, τους κτηνοτρόφους, τους χειριστές σιτηρών, τους μεταποιητές, τους καταναλωτές, ακόμα και για τις εθνικές οικονομίες (Miller, 1998). Μια εκτίμηση είναι ότι οι ετήσιες απώλειες στις ΗΠΑ και τον Καναδά, ως αποτέλεσμα της εμφάνισης των μυκοτοξινών στις βιομηχανίες ζωοτροφών και ζώων ανέρχεται στα 5 δις δολάρια (Charmley et al., 1995). Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η τακτική παρουσία των μυκοτοξινών στη διατροφή θα επηρεάσει επίσης τους ανθρώπινους πληθυσμούς, προκαλώντας νοσηρότητα και πρόωρους θανάτους.

Εκτός από σοβαρά προβλήματα υγείας, οι οικονομικές απώλειες και οι εμπορικοί φραγμοί αποτελούν ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα για τη γεωργία στις πληγείσες χώρες. Δεδομένου ότι πολλά νομοθετικά όργανα, όπως η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (EC, 2006) ίδρυσε κανονιστικά όρια για την πληθώρα μυκοτοξινών στα τρόφιμα, τις εξαγωγές γεωργικών προϊόντων και ιδιαίτερα, των αράπικων φιστικιών, (*Arachis hypogaea*) που μειώνονται δραματικά (Otsuki και Sewadeh, 2001). Ωστόσο, στην υποσαχάρια Αφρική τα κανονιστικά όρια είναι σπάνια στη θέση τους ή δεν εφαρμόζονται σωστά και η τακτική παρακολούθησης είναι συχνά ένα σημαντικό

ζήτημα. Το 2003, ο FAO πραγματοποίησε έρευνα σχετικά με διεθνείς κανονισμούς μυκοτοξινών στην οποία η Μοζαμβίκη δήλωσε ως ανώτατο όριο για τις συνολικές αφλατοξίνες, μια ανεκτή συγκέντρωση των 10ppb (μg/kg) στα αράπικα φιστίκια, στο γάλα φιστικιού και στις ζωοτροφές. Σε αντίθεση, η Μπουρκίνα Φάσο δεν έχει κανονισμούς για μυκοτοξίνες (FAO, 2003). Η έλλειψη ρύθμισης οφείλεται εν μέρει σε ελλιπείς πληροφορίες σχετικά με την εμφάνιση ορισμένων τοξινών, η οποία αποτελεί προϋπόθεση για την αποτελεσματική αντιμετώπιση.

Άμεσες οικονομικές απώλειες λόγω της παρουσίας των μυκοτοξινών (κυρίως της αφλατοξίνης) σε γεωργικές καλλιέργειες μπορούν να ανιχνευθούν λόγω της μείωσης των αποδόσεων των καλλιεργειών και της χαμηλότερης ποιότητάς τους, λόγω της μειωμένης απόδοσης των ζώων και των δυνατοτήτων αναπαραγωγικότητας και της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης διαφόρων νόσων. Στο παρελθόν, οι έμμεσες απώλειες έχουν υποτιμηθεί σημαντικά. Για παράδειγμα, οι παραγωγοί καλλιεργειών με μολυσμένα προϊόντα από αφλατοξίνη θα υποστούν υποβάθμιση των καλλιεργειών, μείωση των αγορών, αύξηση της διακίνησης και επεξεργασίας, και αύξηση του κόστους της αποτοξίνωσης ή αραίωσης. Στις επεξεργασμένες ζωοτροφές και τροφές θα προσδιοριστεί επίσης αυξημένο κόστος για την περαιτέρω επεξεργασία των αναγκών τους, ιδίως, τις αναλύσεις και παρακολουθήσεις για την παρουσία των μυκοτοξινών. Ομοίως, οι παραγωγοί ζώων θα εντοπίσουν αυξημένες δαπάνες παραγωγής που συνδέονται με τις κτηνιατρικές απαιτήσεις, τη μείωση της παραγωγής και, ενδεχομένως, την αναζήτηση νέων προμηθειών. Η πρόβλεψη των επιπτώσεων των μυκοτοξινών στα καθαρά έσοδα για τους παραγωγούς σιτηρών αποτέλεσε το αντικείμενο έντονων μελετών κυρίως στον Καναδά, όπου οι επιστήμονες έχουν επινοήσει έναν τύπο πρόβλεψης (Charmley et al, 1995).

## 2. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΟΖΟΝ ΣΤΟ ΣΙΤΑΡΙ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΤΟΥ

### 2.1 Αφλατοξίνες

#### 2.1.1 Οι μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες

Οι αφλατοξίνες είναι μια ομάδα μυκοτοξινών που αποτελείται από 20 μέλη (Μαρκάκη και συν., 2007, Prandini et al., 2009). Παράγονται από τα είδη του γένους *Aspergillus*, πιο συγκεκριμένα, από τα είδη *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. ochraceoroseus* και *A. tamari* (Moss, 2002). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι και τα είδη *A. pseudotamarii*, *A. bombyris* και *Emericella venezuelensis* μπορεί να παράγουν αφλατοξίνες (Yu et al., 2008). Από όλα αυτά τα είδη μόνο ο *A. flavus* και ο *A. parasiticus* παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τα τρόφιμα και τη Δημόσια Υγεία (Moss, 2002), και αυτό επειδή αναπτύσσονται σε διάφορα τρόφιμα (ξηρούς καρπούς, μπαχαρικά, δημητριακά κ.α.) (Sheibani και Ghaziaskar, 2008, Maroto et al., 2005). Οι πιο τοξικές είναι οι B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), M1 (AFM1) και M2 (AFM2) (Μαρκάκη και συν., 2007, Prandini et al., 2009). Η τοξικότητά τους είναι ακριβώς στην κατεύθυνση αυτή B1>G1>B2>G2 (Pacheco, 2011).

Οι μύκητες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον είναι ο *A. flavus* και ο *A. parasiticus* και αυτοί ευθύνονται για την παραγωγή των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2. Οι αφλατοξίνες (aflatoxins) πήραν το όνομά τους από το μύκητα *A. flavus*, δηλαδή, το «a» από το γένος *Aspergillus*, «fla» από το είδος FLAVus και το ουσιαστικό «toxin» που σημαίνει δηλητήριο (Ellis et al., 1991). Τα αρχικά των επιμέρους ειδών αφλατοξίνης προέρχονται από το χρώμα φθορισμού που δίνουν κατά την ανίχνευσή τους στο υπεριώδες φως (UV) (Jaimez et al., 2000), δηλαδή, G για το πράσινο (green) στα 450nm και B για το μπλε (blue) στα 425nm ενώ οι δείκτες 1 και 2 αναφέρονται στη σειρά με την οποία διαχωρίζονται (IARC, 2002).

#### 2.1.2 Η χημική πλευρά των αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες είναι μια ομάδα με υψηλά επίπεδα οξυγονομένων (Sheibani και Ghaziaskar, 2008) φθορίζουσων ετεροκυκλικών ενώσεων που αποτελούνται από

τιμήματα διυδροδιφουρανίου και τετραυδροδιφουρανίου συγγωνευμένα στο μόριο της κουμαρίνης. Είναι χαμηλού μοριακού βάρους (Yu et al., 2008). Οι αφλατοξίνες ταξινομούνται ανάλογα με τη χημική τους δομή, στη σειρά δι-φουρο-κουμαρο-κυκλοπεντενόνης, οι οποίες είναι οι AFB1, AFB2, AFM1, AFM2 και η αφλατοξικόλη και στη σειρά δι-φουρο-κουμαρο-λακτόνης οι AFG1 και AFG2 (Cast, 2003).

Ο *A. flavus* παράγει τις αφλατοξίνες B1 και B2 αλλά και το κυκλοπιαζονικό οξύ. Ήταν η αιτία για το πρώτο καταγεγραμμένο κρούσμα αφλατοξίκωσης σε γαλοπούλες, που ονομάστηκε 'Turkey X'. Αντίθετα, ο *A. parasiticus* παράγει όλες τις κύριες αφλατοξίνες B1, B2, G1 και G2 (D' Mello και McDonald, 1997). Άλλα συγκεκριμένα στελέχη του *A. flavus* μπορούν να παράγουν, επίσης, τις G1 και G2, μετά από έρευνες σε Αφρική και Αμερική (Cotty και Cardwell, 1999). Ο *A. nomius* μοιάζει μορφολογικά με τον *A. flavus* αλλά παράγει και αυτός B και G, όπως ο *A. parasiticus*. Σε όλα τα είδη μυκήτων, υπάρχουν και στελέχη που δεν είναι μυκοτοξινογόνα (Jay, 2000).

Οι αφλατοξίνες είναι ενώσεις άκρως τοξικές, μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες (Rustom, 1997, Sumit et al., 2010). Δείχνουν την οξεία τοξικότητά τους με την ασθένεια αφλατοξίκωση σε ανθρώπους και ζώα. Η χρόνια έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει δείξει μετά από μελέτες σε πειραματόζωα, την ανάπτυξη του καρκίνου του ήπατος (Robons και Richard, 1992, Wogan και Newberne, 1967). Ακόμη, μετά από μελέτες σε πληθυσμούς, η χρόνια έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις αφλατοξίνης συνδέεται επίσης με το καρκίνο του ήπατος και στον άνθρωπο (Groorpan et al., 1988, Yeh et al., 1989), που ονομάζεται ανθρώπινη υπατική και εξωπατική καρκινογένεση (Massey et al., 1995). Για αυτούς τους πληθυσμούς, η έκθεση στις αφλατοξίνες είναι κυρίως μέσω της διατροφής (Firibu και Dixon, 2010). Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τα Τρόφιμα (EET), όσον αφορά τις αφλατοξίνες δήλωσε στην έκθεση της 23<sup>ης</sup> Σεπτεμβρίου 1994, ότι οι αφλατοξίνες είναι γονιδιοτοξικά καρκινογόνα (EK, 2006).

Η αφλατοξίνη B1 είναι η πιο ισχυρή καρκινογόνα, μεταλλαξιογόνα και υπατοκαρκινογόνα ένωση στην οικογένεια αυτή των αφλατοξινών και έχει χαρακτηριστεί από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο ως ομάδα 1 καρκινογόνα (IARC, 1993). Η απομόνωση και η αφαίρεση αυτού του τοξικού μεταβολίτη από τους μύκητες προκαλεί ακόμη ανησυχία (Sumit et al., 2010, Kabak et al., 2006).

### 2.1.3 Ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης

Ο *A. parasiticus* επιβιώνει στο έδαφος και προσβάλλει κυρίως τις αραχίδες, ενώ ο *A. flavus* επιβιώνει στον αέρα και στο περιβάλλον του φυλλώματος των φυτών και προσβάλλει κυρίως τον αραβόσιτο, τα ξηρά φρούτα, το βαμβάκι, το σιτάρι, το ρύζι, τη βρώμη, το κριθάρι (Prandini et al., 2009, EFSA, 2012), το φυσικέλαιο, τη σόγια, τα καρύδια και τα προϊόντα που προέρχονται από όλα αυτά (Etcheverry et al., 1999, Gourama και Bullerman, 1995).

Η αύξηση του πληθυσμού των μυκήτων και η παραγωγή μυκοτοξινών δεν είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα (Bertin et al., 2009). Οι μύκητες αυτοί δημιουργούν αποικίες σε καρπούς που αναπτύσσονται σε κλίματα τροπικά ή υποτροπικά αλλά και σε καρπούς μετά το στάδιο της συγκομιδής τους. Η θερμοκρασία ανάπτυξης των μυκήτων αυτών είναι από 12-48°C, ενώ οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης κυμαίνονται μεταξύ 36 και 38°C. Η παραγωγή των αφλατοξινών παρατηρείται όταν οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 20 και 30°C (O Brian et al., 2007).

Αρκετοί αβιοτικοί και βιοτικοί παράγοντες μπορούν να καθορίσουν τη μόλυνση και την ανάπτυξη των μυκήτων, καθώς και τη παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συγκομιδή. Στη διαδικασία μετά τη συγκομιδή, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα του νερού, το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα, η μόλυνση από έντομα και τρωκτικά, τα θραύσματα, ο καθαρισμός του προϊόντος, το τοξικογόνο φορτίο μυκήτων, ο μικροβιακός ανταγωνισμός, η παρουσία αντιμυκητιασικών ενώσεων και η σύνθεση του υποστρώματος είναι πάρα πολύ σημαντικά (Pacheco, 2011). Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά ανθεκτικές στις περισσότερες συνθήκες αποθήκευσης, στο χειρισμό και στην επεξεργασία των τροφίμων και των ζωοτροφών (Velazhahan et al., 2010).

Διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές τεχνικές είναι διαθέσιμες για την απομάκρυνση τους από τα τρόφιμα (Sumit et al., 2010, Phillips et al., 2008, Alberts et al., 2006, Alberts et al., 2009).

#### 2.1.3.1 Φυσική Αποτοξίνωση

Η φυσική αποτοξίνωση μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα με την ακτινοβολία UV, η έκθεση των αφλατοξινών στην ακτινοβολία

UV μπορεί να προκαλέσει υποβάθμιση λόγω της φωτοευαισθησίας τους (Van der zijden et al., 1962), με τον φωτοχημικό μετασχηματισμό, ο οποίος διασπά και μετατρέπει τις φωτοευαίσθητες ενώσεις των αφλατοξινών σε αβλαβείς ουσίες (Jabusch και Tjeerdema, 2006, Urzedo et al., 2007, Hu et al., 2009), με σκόνες και εκχυλίσματα πολλών φαρμακευτικών βοτάνων (Velazhahan et al., 2010), με φυτικά εκχυλίσματα (Hajare et al., 2005, Sandoskumar et al., 2007, Sarcota et al., 2005), εκχυλίσματα σπόρων του *Trachyspermum Ammi* (Velazhahan et al., 2010), με τον μηχανισμό διαχωρισμού του καθαρού προϊόντος από το μολυσμένο προϊόν, με υψηλές θερμοκρασίες και τέλος με τις επιδράσεις του φωτός, τη λείανση, το πλύσιμο και τη χρήση προσροφητικών.

### 2.1.3.2 Χημική Αποτοξίνωση

Η χημική αποτοξίνωση χρησιμοποιεί άλλες μεθόδους, οι οποίες είναι η πλήρη εξάλειψη των αφλατοξινών με θέρμανση στους 100°C με μεθυλαμίνη και υδροξείδιο του νατρίου (Mann et al., 1970), οι ανόργανες- οργανικές βάσεις (αμμωνία, αιθυλαμίνη και μεθυλαμίνη) (Dollear et al., 1968), η αμμωνιοποίηση (Coker et al., 1985, Frayssi net και Lafarge, 1990, Gardner et al., 1971), η φορμαλδεύδη και το υδροξείδιο του ασβεστίου (Codifer et al., 1976), το όζον, το οποίο είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας (Dwarakanath et al., 1968) το αέριο χλώριο (Fischbach και Campbell, 1965), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Sreenivasamurthy et al., 1967), τα προσροφητικά, τα οποία μπορεί να είναι διάφορα ορυκτά αργίλια, η εστεροποιημένη γλυκομαννάνη, ο ενεργός άνθρακας και η πολυβινυλοπολυπυρρολιδόνη (Diaz et al., 2002), η επίδραση οξέων και βάσεων (10) και η επίδραση οξειδωτικών παραγόντων (7 του 10).

### 2.1.3.3 Μικροβιακή Αποτοξίνωση

Στη μικροβιακή αποτοξίνωση χρησιμοποιούνται τα εξής, *Flavobacterium aurantiacum* (Ciegler et al., 1966, Hao και Brackett, 1988), *Mucor spp.* (Zuber και Lillehoj, 1993), *Rhizopus spp.* (Cole και Kirksey, 1971), *Corynebacterium rubrum* (Mann και Rehm, 1976), *Phoma sp.* (Shantha, 1999), *Rhodococcus erythropolis* και *Mycobacterium fluoranthenvivorans sp. nov* (Teniola et al., 2005).

Ωστόσο, αν οι συνθήκες αποθήκευσης δεν είναι καλές μετά τη συγκομιδή, οι αφλατοξικογόνοι μύκητες εισβάλλουν στους σπόρους και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές ζημιές. Αν και μερικά από τα μυκητοκτόνα βρέθηκαν να μειώνουν την αύξηση του *A. flavus* κατά την αποθήκευση, ιδίως ως απολυμαντικό (Paster et al., 1995), οι ανησυχίες των καταναλωτών για τους κινδύνους που κρύβονται στα μυκητοκτόνα, έχει οδηγήσει σε εντατική έρευνα για ασφαλέστερες και πιο αποτελεσματικές επιλογές ελέγχου που μειώνουν τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

#### **2.1.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες των αφλατοξινών**

Οι αφλατοξίνες είναι κρυσταλλικές ουσίες, άχρωμες έως κίτρινες (η B1) και άοσμες, διαλυτές σε ελαφρούς έως μέτριους πολικούς διαλύτες (Jaimez et al., 2000), όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο, το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη, η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο ενώ είναι αδιάλυτες σε μη πολικούς διαλύτες. Είναι σχετικά υδρόφιλα αρωματικά μόρια, με πολύ ισχυρή τάση να προσροφώνται σε υδρόφοβες επιφάνειες. Σε κρυσταλλική κατάσταση είναι εξαιρετικά σταθερές όταν δεν υπάρχει φως και ιδιαίτερα όταν δεν υπάρχει η ακτινοβολία UV ακόμα και σε θερμοκρασίες άνω των 100°C.

Είναι ασταθείς στην υπεριώδη ακτινοβολία με παρουσία οξυγόνου και σε περιοχές με pH<3 και pH>10 (IARC, 2002). Γενικά, είναι σταθερές στη θερμότητα μέχρι το σημείο τήξης τους (Πίνακας 2.1.4), υδρολύονται στο λακτονικό δακτύλιο παρουσία αλκαλικών διαλυμάτων και χάνουν το χαρακτηριστικό του φθορισμού όταν αντιδράσουν με οξειδωτικούς παράγοντες, όπως το υποχλωριώδες νάτριο και το χλώριο (Reddy και Waliyar, 2011). Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τους δεν γίνονται αντιληπτές ούτε με την όσφρηση ούτε με τη γεύση, καθώς επίσης δεν καταστρέφονται με τις συνήθεις τεχνικές επεξεργασίας των τροφίμων, όπως η θερμική επεξεργασία, η ζύμωση, η ψύξη και η κατάψυξη (Neagu et al., 2009, Oruc et al., 2006).

Πίνακας 2.1.4. Σύνοψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αφλατοξινών (Πετρωτός, 2010)

Αφλατοξίνη	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος	Σημείο τήξης (°C)	Πηγές και Ιδιότητες
B1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312,28	268-269	Παράγεται από τον <i>A. flavus</i> και τον <i>A. parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός. Θεωρείται ως η ισχυρότερη καρκινογόνος ουσία για το ήπαρ.
B2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,29	286-289	Παράγεται από τον <i>A. flavus</i> και τον <i>A. parasiticus</i> . Κυανός φθορισμός.
G1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,28	244-246	Παράγεται από τον <i>A. parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός.
G2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,29	237-240	Παράγεται από τον <i>A. parasiticus</i> . Πράσινος φθορισμός.
M1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328,28	299	Μεταβολίτης της B1 στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο μητρικό γάλα σε ποσότητες ng.
M2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,29	293	Μεταβολίτης της B2 στους ανθρώπους και τα ζώα. Βρίσκεται στο γάλα (και σε γαλακτοκομικά προϊόντα) βοοειδών που τρέφονται με τροφές μολυσμένες με B2.
B2a	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,29	240	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στην B1. Κυανός φθορισμός.
G2a	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	346,29	190	Προϊόν προσθήκης ύδατος (καταλυόμενη από οξέα) στην G1. Πράσινος φθορισμός.

### 2.1.5 Ιστορικές καταγραφές των αφλατοξινών που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα ζώα

Το θέμα των αφλατοξινών είναι γνωστό σε όλο τον κόσμο για τον κίνδυνο που κρύβουν για την υγεία, όχι μόνο των ανθρώπων αλλά και των ζώων (Pacheco, 2011). Αρχικά, οι αφλατοξίνες αναγνωρίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1950 (Rustom, 1997), με την εξέγερση της νόσου των γαλοπουλών που ονομάστηκε «Turkey X», μια επιδημία που εμφανίστηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο (Rustom, 1997). Αποτέλεσμα αυτής ήταν ο θάνατος πτηνών (περίπου 100000 γαλοπούλες) που τράφηκαν με



ζωοτροφές που περιείχαν φιστίκια Βραζιλίας. Το περιστατικό συσχετίστηκε με την παρουσία του μύκητα *A. flavus* (Rustom, 1997), ο οποίος συχνά αναπτύσσεται σε αυτό τον καρπό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του (Jaimez et al., 2000).

Η μετέπειτα ανάλυση χρησιμοποιώντας TLC έδειξε ότι μια σειρά από φθορίζουσες ενώσεις ήταν υπεύθυνες, οι οποίες αργότερα ονομάστηκαν αφλατοξίνες (Sargeant et al., 1961, Davis και Diener, 1979). Εξάρσεις τοξικότητας προκλήθηκαν τα επόμενα χρόνια (1961) σε βοοειδή και σε χοίρους που είχαν τραφεί με μολυσμένη ζωοτροφή αραχίδων (Raper και Fennell, 1965). Περίπου την ίδια περίοδο στις ΗΠΑ, παρατηρήθηκε μια έξαρση του καρκίνου του ήπατος στις πέστροφες, η οποία αργότερα αποδόθηκε στη μόλυνση από αφλατοξίνες σε μίγμα βαμβακόσπορου, συστατικό της διατροφής των εν λόγω ψαριών (Jaimez et al., 2000).

Ακολούθησαν πολλές έρευνες που απέδειξαν ότι η αφλατοξίνη μπορεί να προκαλέσει οξεία ηπατοπάθεια σε χηνάρια και καρκίνο του ήπατος σε ποντίκια (Lancaster et al., 1961, Sargeant et al., 1961). Το 1971 εντοπίστηκαν αξιοσημείωτα επίπεδα αφλατοξινών στο ήπαρ 23 παιδιών στην Ταϊλάνδη που πέθαναν από το σύνδρομο «Reye», έτσι οι επιστήμονες συσχετίζουν την αφλατοξίνη με το σύνδρομο αυτό. Επίσης μετά από νεκροτομή, συγκεντρώσεις αφλατοξινών βρέθηκαν και σε παιδιά της Τσεχοσλοβακίας και της Νέας Ζηλανδίας που πέθαναν από το ίδιο σύνδρομο (Shank et al., 1971).

Στην Ινδία το 1974, καταγράφηκαν 397 άνθρωποι που είχαν προσβληθεί από μυκοτοξίκωση με σοβαρή ηπατίτιδα, για τους 108 από αυτούς ήταν θανατηφόρα, το περιστατικό συνδέθηκε με την κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού με αφλατοξίνες (Semple et al., 1989), σε επίπεδα από 0,25-15 mg/kg (Jaimez et al., 2000). Το 1988, 13 άτομα πέθαναν στη Μαλαισία από οξεία εγκεφαλοπάθεια από βρώμη ζυμαριού, παρασκευασμένη από ρύζι και άλλα δημητριακά που περιείχαν αφλατοξίνη (Agag, 2004). Μόλις το 2004, στη Κένυα, 317 άτομα εμφάνισαν οξεία ηπατική ανεπάρκεια συνδεδεμένη και αυτή με τις αφλατοξίνες μετά από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού (Azziz-Baumgartner et al., 2005). Επίσης, και η νόσος «Kwashiorkor» δείχνει να οφείλεται στις αφλατοξίνες, και είναι συνέπεια της πρωτεϊνης υποσιτισμού σε παιδιά (Adhikari et al., 1994).

Τέλος η κατάποση αφλατοξινών οδηγεί σε απώλεια παραγωγικότητας και υποβάθμιση της ποιότητας του κρέατος σε εκτρεφόμενα ζώα που κατανάλωσαν μολυσμένα άλευρα με αφλατοξίνη (Bonomi et al., 1993, 1994). Το 1986 υπήρξε απώλεια περίπου στα 140 εκατομμύρια δολάρια ως άμεση ακολουθία της απώλειας

βάρους σε κοτόπουλα πάχυνσης που κατανάλωσαν χαμηλά επίπεδα μυκοτοξινών (Palmgren και Hayes, 1987).

### 2.1.6 Μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξινών

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την ανίχνευση αφλατοξινών είναι οι εξής:

1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) (Pacheco, 2011)
2. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC) (Jaimez et al., 2000)
3. Χρωματογραφία Φυσικού Αερίου (Pacheco, 2011)
4. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)
5. Ενζυμική ανοσοαπορρόφηση (ELISA) (Pacheco, 2011)
6. Φθορομετρική Μέθοδος (Pacheco, 2011)
7. Χρωματογραφία Στοιβάδας ούλτρα-πίεσης (Pacheco, 2011)
8. Υγρή Χρωματογραφία Φασματομετρία Μάζας του Κάμντεν (Pacheco, 2011)
9. Απορρόφηση στο υπεριώδες (Pacheco, 2011)
10. Φασματοσκοπία (Pacheco, 2011)
11. Φθορισμός (Pacheco, 2011)
12. Βιοαισθητήρες (Pacheco, 2011)
13. Ηλεκτροκινητική (Pacheco, 2011)
14. Ηλεκτροκινητική X pre-face μεταγωγή (Pacheco, 2011)
15. Αμπερομετρική Ανίχνευση και Βολταμετρία Προσρόφησης (Pacheco, 2011)
16. Η τετραπλάσια-ώρα-πτήσης του φασματόμετρου μάζας (Q-TQF). Κατάλληλο αναλυτικό εργαλείο για τον εντοπισμό των μεταβολιτών (Bateman et al., 2007, Pico και Barcelo, 2008).

### 2.1.7 Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή Ένωση κατατάσσει τις αφλατοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006) (Εικόνα 2.1.7) (ΕΚ, 2006). Οι επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης που εφαρμόζονται, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus*, γι' αυτό το λόγο δεν μπορούν οι αφλατοξίνες να εξαφανιστούν πλήρως από τα

τρόφιμα και τις ζωοτροφές (ΕΚ, 2006). Αυτό που κάνει η Ευρωπαϊκή Ένωση λοιπόν, είναι να μειώσει τα όρια στα τρόφιμα, στο κατώτερο δυνατό. Περιορίζεται, και η συνολική περιεκτικότητα των αφλατοξινών και ξεχωριστά η περιεκτικότητα της Β1.

Αναμφίβολα, πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν κυρίως οι ευαίσθητες ομάδες και κυρίως τα βρέφη. Για την οριοθέτηση αυτών των ορίων απαιτείται η εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Καθώς, επίσης, πρέπει να συνδέονται όλοι αυτοί οι παράγοντες με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και με την συγκέντρωση των αφλατοξινών, στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές.

Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων έχει θέσει ένα όριο για τις αφλατοξίνες στα 20 µg/kg για τα τρόφιμα, για πολλές ζωοτροφές και για τα συστατικά ζωοτροφών. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ένα πολύ πιο αυστηρό όριο ανοχής της αφλατοξίνης στα 2 µg/kg για την Β1 και 4 µg/kg για τις συνολικές αφλατοξίνες για τα καρύδια και τα δημητριακά που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (Bankole και Adebajo, 2003).

Τρόφιμα (*)	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)		
	B <sub>1</sub>	Λόβροισμα των αφλατοξινών B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> και G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
<b>Αφλατοξίνες</b>			
Αράπικα φιστίκια που υφίστανται κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα	8,0 (†)	15,0 (†)	—
Καρποί με κέλυφος που υφίστανται κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα	5,0 (†)	10,0 (†)	—
Αράπικα φιστίκια και ξηροί καρποί με κέλυφος και μεταποιημένα προϊόντα τους, που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα	2,0 (†)	4,0 (‡)	—
Ξηρά φρούτα που υφίστανται κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα	5,0	10,0	—
Ξηρά φρούτα και μεταποιημένα προϊόντα τους που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα	2,0	4,0	—
Όλα τα δημητριακά και όλα τα προϊόντα που παράγονται από δημητριακά, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων με βάση τα δημητριακά, εξαφρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται στα σημεία 2.1.7, 2.1.10 και 2.1.12	2,0	4,0	—
Αραβόσιτος που υφίσταται κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	5,0	10,0	—
Ναπό γάλα (‡), θερμικά επεξεργασμένο γάλα και γάλα για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα	—	—	0,050

Τα εξής είδη καρυκευμάτων: <i>Capsicum</i> spp. (ξηροί καρποί, ολόκληροι ή αλεσμένοι, συμπεριλαμβανομένου του τσίλι, του τοπίλ σε σκόνη, του καγιέν και της πάπρικας) <i>Piper</i> spp. (καρποί, συμπεριλαμβανομένου του λευκού και μαύρου πιπεριού) <i>Myristica fragrans</i> (μοσχοκάρυδο) <i>Zingiber officinale</i> (πιπερόριζα) <i>Curcuma longa</i> (κουρκούμη ή χρυσόριζα)	5,0	10,0	—
Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά (*) (†)	0,10	—	—
Παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος για βρέφη και του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας (*) (†)	—	—	0,025
Διατητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς (*) (†) που προορίζονται ειδικά για βρέφη	0,10	—	0,025

Εικόνα 2.1.7 Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια των αφλατοξινών για κάθε τρόφιμο, με βάση τον κανονισμό 1881/2006.

## 2.2 Όζον

### 2.2.1 Η ιστορία και οι εφαρμογές του όζοντος

Αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποτοξίνωση της αφλατοξίνης σε βασικά γεωργικά προϊόντα. Κάθε χημική αποτοξίνωση θα πρέπει να μειώσει το επίπεδο των μυκοτοξινών εντός των ορίων που καθορίζονται από τους κατάλληλους ρυθμιστικούς οργανισμούς (για παράδειγμα, τα όρια που θέτει η Ευρωπαϊκή Ένωση), δεν πρέπει να έχει τοξικά κατάλοιπα και δεν πρέπει να μειώνει την θρεπτική αξία του επεξεργασμένου εμπορεύματος (Alfred et al., 1976). Μια από αυτές τις μεθόδους είναι ο οζονισμός, ο οποίος είναι σχετικά νέα μέθοδος για την επεξεργασία τροφίμων (Akbas και Ozdemir, 2006).

Το όζον, το δεύτερο πιο ισχυρό οξειδωτικό μετά το φθόριο (Diao et al., 2013), βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως ένα ισχυρό απολυμαντικό στην επεξεργασία του νερού, στην επεξεργασία και διατήρηση τροφίμων και σε διάφορες άλλες περιβαλλοντικές εφαρμογές (Πίνακας 2.2.1). Το όζον ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1839 από τον Schönbein, ο οποίος παρατήρησε ότι στην ηλεκτρόλυση του νερού παράγεται ένα εύοσμο αέριο και το ονόμασε «όζον», από την αρχαία ελληνική λέξη «όζειν» που σημαίνει «μυρωδιά» (Manley και Niegowski, 1967, Rice και Bollyky, 1981, Kogelschatz, 1988).

Από το 1997, έχει θεωρηθεί ως GRAS ουσία (Γενικά Αναγνωρισμένη ως Ασφαλής) (Graham et al., 1997). Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό και έχει πολλές

πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των πλεονεκτημάτων του έναντι των παραδοσιακών τεχνικών συντήρησης των τροφίμων. Η εφαρμογή του όζοντος, είτε σε υγρή, είτε σε αέρια μορφή, συχνά χρησιμοποιείται για την επεξεργασία φρούτων και λαχανικών για να αδρανοποιήσει τα παθογόνα και τους μικροοργανισμούς (Cullen et al., 2009).

Εκτός από το ευρύ φάσμα της μικροβιακής αδρανοποίησης, το όζον έχει, επίσης, τη δυνατότητα να σκοτώνει τα παράσιτα που αναπτύσσονται στην αποθήκευση και τις μυκοτοξίνες, όπως για παράδειγμα, τις αφλατοξίνες, τη φουμονισίνη B1, την ωχρατοξίνη A, την πατουλίνη, τη ζεαραλενόνη, το κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA) και το σεκαλονικό οξύ D (Mckenzie et al., 1997). Τα προϊόντα αποικοδόμησης του είναι γενικά ακίνδυνα. Για παράδειγμα, το όζον θα αντιδράσει με τον διπλό δεσμό του δακτυλίου φουρανίου των αφλατοξινών μέσω της ηλεκτρόφιλης επίθεσης, προκαλώντας το σχηματισμό των πρωτογενών οζονιδίων που ακολουθούν αναδιάταξη στα παράγωγα μονοζονίδια όπως είναι οι αλδεΐδες, οι κετόνες και τα οργανικά οξέα (Proctor et al., 2004).

Ένα από τα μεγάλα του πλεονεκτήματα είναι ότι η περίσσεια του όζοντος αυτοαποσυντίθεται γρήγορα και παράγει οξυγόνο με αποτέλεσμα, να μην αφήνει υπολείμματα στα τρόφιμα. Το όζον έχει υψηλή αντιδραστικότητα και διεισδυτικότητα (δηλαδή, διεισδύει εύκολα) σε ένα μη τοξικό προϊόν (O<sub>2</sub>), χωρίς να σχηματίζει επικίνδυνα κατάλοιπα στα προϊόντα του (Karaca και Velioglu, 2007). Λόγω της αποτελεσματικότητάς του, μπορεί να καταστρέψει ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών όπως είναι τα βακτήρια (*Salmonella*, *Typhimurium*, *Escherichia Coli* και *Listeria Monocytogenes* (De Alencar et al., 2012)), οι μύκητες (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Alternaria* και *Mucor* (Zotti et al., 2008, Raila et al., 2006, Wu et al., 2006)), οι ιοί (όπως, τον ιό εγκεφαλομυελίτιδας ίππων, την ηπατίτιδα A, τη γρίπη A, τον ιό κυστικής στοματίτιδας και τον ιό μολυσματικής ρινοτραχειίτιδας των βοοειδών (Guzel-Seydim et al., 2004)), τα πρωτόζωα (*Cyptosporidium parvum* (De Alencar et al., 2012)) και τα βακτηριακά σπόρια των μυκήτων (Cullen et al., 2009, Khadre et al., 2001, Restaino et al., 1995). Επίσης, χρησιμοποιείται έναντι της ανάπτυξης εντόμων (O'Donnell et al., 2012).

Η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών από το όζον οφείλεται κυρίως στη διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης και στην επακόλουθη διασπορά των κυτταροπλασματικών περιεχομένων λόγω υψηλής οξειδωτικής ισχύς αυτού του αερίου (Cullen et al., 2006). Τέτοια πλεονεκτήματα κάνουν το όζον ελκυστικό για τη

βιομηχανία τροφίμων και κατά συνέπεια έχει επιβεβαιωθεί γενικά ως ασφαλές για τη χρήση του (Graham, 1997). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) είναι αυτοί που έχουν εδραιώσει το όζον ως μία ασφαλή και αποτελεσματική χημική ουσία που εφαρμόζεται στη βιομηχανία τροφίμων (WHO, 2007, FAO, 2003, FDA, 2001).

Πολλές βιβλιογραφίες, όμως αναφέρουν ότι το όζον επηρεάζει την ποιότητα των τροφίμων, όπως το χρώμα, τη γεύση, το άρωμα, τις βιταμίνες και τη βλάστηση των σιτηρών (Zhang et al., 2005, Beltran et al., 2005, Aguayo et al., 2006, Wu et al., 2006, Ölmez και Akbas, 2009). Η αποτελεσματικότητα του όζοντος έναντι των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα τρόφιμα εξαρτάται από πολλούς και διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του ποσού του όζοντος που εφαρμόζεται, το όζον που θα απομείνει στο μέσο και διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH του μέσου, τη θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία, τα πρόσθετα και την ποσότητα της οργανικής ύλης που περιβάλλει τα κύτταρα (O'Donnell et al., 2012).

Μελέτες από πολλούς συγγραφείς δείχνουν ότι η χρήση του όζοντος ως απολυμαντικό δημητριακών είναι μια βιώσιμη εναλλακτική λύση, για το περιβάλλον και για την οικονομία (Islam et al., 2009, Pereira et al., 2008a,b, Pimentel et al., 2009). Για παράδειγμα, μελέτες έδειξαν ότι το όζον αποικοδομεί τις αφλατοξίνες στο βαμβακέλαιο (Dwarakanath et al., 1968), σε γεύματα φυσικέλαιου (Dwarakanath et al., 1968, Dollear et al., 1968, Rayner et al., 1971) και σε υδατικά διαλύματα (Maeba et al., 1988). Επίσης, οι McKenzie et al. (1998) ανέφεραν ότι η θεραπεία με όζον μείωσε την τοξική επίδραση των μολυσμένων καλαμποκιών με αφλατοξίνες από το οποίο τρέφονταν νεοσσοί γαλοπούλες. Ο συνδυασμός της θερμότητας και των αερίων επεξεργασίας του όζοντος έδειξε να είναι αποτελεσματικός για τη μείωση του επιπέδου των αφλατοξινών σε φιστίκια εδάφους και σε αλεύρι φιστικιών (Proctor et al., 2004).

Το όζον χρησιμοποιείται για την επεξεργασία του νερού (που ήταν το πρώτο που ήρθε σε επαφή με το όζον το 1906 στη Νίκαια της Γαλλίας (Hill και Rice, 1982)), την απολύμανση, το πλύσιμο και την απολύμανση εξοπλισμού, την απομάκρυνση οσμών καθώς επίσης, χρησιμοποιείται στα φρούτα, τα λαχανικά, το κρέας και στην επεξεργασία των θαλασσινών. Μία ακόμα χρήση του όζοντος είναι αυτή ως άμεσο πρόσθετο τροφίμων (Tiwari και Rice, 2012).

Πίνακας 2.2.1 Η ιστορία της εφαρμογής του όζοντος και του κανονισμού του.

<b>ΕΤΟΣ</b>	<b>ΕΦΑΡΜΟΓΗ</b>
<b>1839</b>	Ανακάλυψη του όζοντος από τον Schönbein
<b>1886</b>	Το δυναμικό του όζοντος αναγνωρίζεται στην Ευρώπη για την απολύμανση του μολυσμένου νερού.
<b>1891</b>	Τα αποτελέσματα των δοκιμών από τη Γερμανία δείχνουν ότι το όζον είναι αποτελεσματικό κατά των βακτηρίων.
<b>1893</b>	Πρώτη εφαρμογή του όζοντος για το πόσιμο νερό σε πλήρη κλίμακα στην Ολλανδία.
<b>1895</b>	Ο μοριακός τύπος του όζοντος καθορίζεται από τον Soret
<b>1906</b>	Οι επιτροπές της Γαλλίας για τις πρώτες δημοτικές μονάδες του όζοντος στο πόσιμο νερό.
<b>1909</b>	Το όζον χρησιμοποιείται για τη συντήρηση του κρέατος στη Γερμανία.
<b>1914</b>	Η έρευνα οδηγεί στην παραγωγή φθινών αερίων χλωρίου και το ενδιαφέρον για το όζον για την επεξεργασία του νερού αρχίζει να μειώνεται.
<b>1936</b>	Το όζον χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των οστρακοειδών στη Γαλλία.
<b>1939</b>	Το όζον βρέθηκε να εμποδίζει την ανάπτυξη της μαγιάς και της μούχλα κατά την αποθήκευση των καρπών.
<b>1942</b>	Το όζον χρησιμοποιείται στους χώρους αποθήκευσης των αυγών και στις εγκαταστάσεις αποθήκευσης τυριού στις ΗΠΑ.
<b>1957</b>	Το όζον εφαρμόζεται στην οξειδωση του σιδήρου και του μαγγανίου στο Γερμανικό πόσιμο νερό.
<b>1964</b>	Αυθόρμητη κροκίδωση σε θαλάμους που έρχονται σε επαφή με το όζον οδηγεί την Γαλλία στην κατασκευή ενός εργοστασίου όζοντος για την ενίσχυση της απομάκρυνσης των σωματιδίων αυτών.
<b>1965</b>	Το όζον χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του χρώματος των επιφανειακών υδάτων στην Ιρλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Το όζον χρησιμοποιείται για την οξειδωση μικρορουπαντών όπως οι φαινολικές ενώσεις και διάφορα φυτοφάρμακα στην Ελβετία.
<b>1970</b>	Το όζον αξιοποιήθηκε για τον έλεγχο των φυκών στη Γαλλία.
<b>1982</b>	Ο FDA των ΗΠΑ χορηγεί το καθεστώς GRAS (γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές) για απολύμανση με όζον του εμφιαλωμένου νερού.
<b>1987</b>	600 MGD (εκατομμύρια γαλόνια ανά ημέρα) οζονισμένου φυτού έρχεται στο Λος Άντζελες μετά από επτά χρόνια πιλοτικής δοκιμής.
<b>1995</b>	Ο FDA ανανεώνει την έγκριση GRAS για απολύμανση του εμφιαλωμένου νερού με όζον
<b>1997</b>	Ομάδα εμπειρογνομόνων που συγκαλείται από το Ινστιτούτο Ερευνών Ηλεκτρικής Ενεργειας (Electric Power Research

	Institute (EPRI)) επιβεβαιώνει το όζον ως GRAS για άμεση επαφή με τα τρόφιμα. Ο FDA δεν έχει αντίρρηση για την επιβεβαίωση GRAS. Οι ρυθμιστικές αρχές έχουν τη δυνατότητα να προσθέσουν αργότερα ελέγχους σχετικά με τη χρήση του όζοντος.
<b>1999</b>	Το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA) απορρίπτει το πρωτόκολλο του όζοντος στην εφαρμογή του κρέας, επικαλούμενη την δήλωση για GRAS ουσία του 1982 για την απολύμανση του εμφιαλωμένου νερού στα οποία ο FDA δήλωσε ότι «οποιαδήποτε άλλη χρήση, πρέπει να ρυθμίζεται από την αναφορά προσθέτων τροφίμων».
<b>2000</b>	Αναφορά Α προσθέτων τροφίμων (FAP) που κατατέθηκε από την EPRI ζητά την έγκριση του FDA για να έρχονται τα τρόφιμα σε άμεση επαφή με το όζον.
<b>2001</b>	Η έγκριση του FDA ότι το όζον μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δευτερεύον άμεσο πρόσθετο τροφίμων και ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Federal Register, Τόμος. 66, 123 αριθ. 26 Ιουνίου). Στην απάντησή της, η FSIS ορίζει ότι, «Η χρήση του όζοντος στο κρέας και τα προϊόντα πουλερικών, συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας των προϊόντων κρέατος και πουλερικών έτοιμων προς κατανάλωση μόλις πριν από τη συσκευασία, είναι αποδεκτή».
<b>2004</b>	Οι οδηγίες για τις βιομηχανίες που δόθηκαν από τον FDA και οι συστάσεις στους μεταποιητές του χυμού μήλου ή του μηλίτη σχετικά με τη χρήση του όζοντος για τον σκοπό της μείωσης των παθογόνων.

### 2.2.2 Τρόποι παραγωγής του όζοντος

Το κύριο χαρακτηριστικό για την βιομηχανική παραγωγή του όζοντος είναι το οξυγόνο (O<sub>2</sub>) το οποίο είναι άφθονο και ανεξάντλητο. Το όζον (O<sub>3</sub>) προκύπτει από την αναδιάταξη των ατόμων όταν τα μόρια του οξυγόνου υποβάλλονται σε υψηλής τάσης ηλεκτρική εκκένωση. Η μοριακή δομή του όζοντος φαίνεται στην Εικόνα 2.2.2. Το προϊόν είναι ένα γαλαζωπό αέριο σε κανονική θερμοκρασία όταν παράγεται από αποξηραμένο αέρα αλλά άχρωμο όταν παράγεται από οξυγόνο υψηλής καθαρότητας (Greene et al., 2012), με έντονη οσμή και ισχυρές οξειδωτικές και απολυμαντικές (Mckenzie et al., 1997) ιδιότητες.

Το όζον είναι ελαφρώς πυκνότερο από τον αέρα σε 0 °C (Greene et al., 2012) και 1,5 φορές ισχυρότερο από το χλώριο (Xu, 1999). Παράγεται από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου με διατομικό οξυγόνο για να σχηματίσει τριατομικά μόρια οξυγόνου. Η παραγωγή της ελεύθερης ρίζας οξυγόνου λαμβάνει



χώρα με θραύση των ισχυρών δεσμών O-O, που απαιτεί μια σημαντική κατανάλωση ενέργειας. Η υπεριώδης ακτινοβολία και η μέθοδος εκκένωσης στεφάνι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να κινήσουν το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και έτσι να παράγουν όζον. Εκτός από τις φωτοχημικές (υπεριώδη ακτινοβολία) και τις ηλεκτρικές μεθόδους εκκένωσης, το όζον μπορεί να παραχθεί με χημικές, θερμικές, χημικοπυρηνικές και ηλεκτρολυτικές μεθόδους (Kim et al., 1999).

Γενικά, η μέθοδος εκκένωσης στεφανίου χρησιμοποιείται για την παραγωγή του όζοντος, σε εμπορικό επίπεδο. Η διαδικασία είναι η εξής, δύο ηλεκτρόδια, υψηλής τάσης και χαμηλής τάσης (ηλεκτρόδιο γείωσης), που χωρίζονται από ένα κεραμικό διηλεκτρικό μέσο παρέχουν ένα στενό διάκενο εκροής (Mahapatra et al., 2005). Τα ηλεκτρόδια με αρκετή κινητική ενέργεια για να χωρίσουν το μόριο του οξυγόνου συγκρούονται και ένα μόριο του όζοντος μπορεί να σχηματίζεται από κάθε άτομο οξυγόνου (Guzel Seydim et al., 2004). Ατμοσφαιρικός αέρας διέρχεται μέσω της γεννήτριας ως αέριο τροφοδοσίας και μπορεί να παράγει 1-3% όζον. Η συγκέντρωση του όζοντος δεν μπορεί να αυξηθεί πέρα από το σημείο όπου ο ρυθμός του σχηματισμού και της καταστροφής να είναι ίσος. Το όζον παράγεται στις εγκαταστάσεις της επιχείρησης και δεν μπορεί να αποθηκευτεί.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την παραγωγή του όζοντος, όπως η ηλεκτρική εκκένωση σε οξυγόνο, η ηλεκτρόλυση του νερού και η θερμική ή φωτοχημική ή ραδιοχημική μέθοδος. Για βιομηχανική χρήση, το όζον παράγεται κυρίως από καθαρό οξυγόνο ή οξυγόνο της ατμόσφαιρας σε μια διαδικασία που ονομάζεται εκκένωση κορώνας (Mckenzie et al., 1997, Pala, 2001).

Το όζον, σε θερμοκρασία δωματίου είναι ασταθές. Διασπάται εύκολα (Manley και Niegowski, 1967), αλλά έχει μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής στην αέρια κατάσταση από ότι στην υδατική κατάσταση (Rice, 1986). Η καθαρότητα του νερού συνήθως επηρεάζει τη σταθερότητα του όζοντος. Αν και το όζον σε καθαρό νερό διασπάται αρκετά γρήγορα σε οξυγόνο. Οι Hill και Rice (1982) ανέφεραν ότι περίπου το 50% του όζοντος καταστρέφεται μέσα σε 20 λεπτά στους 20 °C σε αποσταγμένο νερό. Η διαλυτότητα του όζοντος στο νερό είναι 13 φορές μεγαλύτερη από αυτή του οξυγόνου στους 0-30 °C και είναι προοδευτικά πιο διαλυτό στο ψυχρότερο νερό (Rice, 1986).



Εικόνα 2.2.2 Μοριακή δομή του όζοντος

### 2.2.3 Η χρήση του όζοντος με βάση τους Διεθνείς Οργανισμούς

Παρ' όλο που το όζον ανακαλύφθηκε πρώτη φορά το 1839, η νομοθεσία του είναι σχετικά πρόσφατη. Το όζον είναι γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (GRAS) στις ΗΠΑ για την απολύμανση του εμφιαλωμένου νερού και ως απολυμαντικό για τις εγκαταστάσεις του (FDA, 1995). Το 1997, το όζον επιβεβαιώθηκε ότι μπορεί να έρχεται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα από ανεξάρτητη ομάδα εμπειρογνομόνων, που χρηματοδοτήθηκε από το Ερευνητικό Ινστιτούτο Ηλεκτρικής Ενέργειας (EPRI) (Graham et al., 1997).

Η FDA δημοσίευσε μια τελική απόφαση τον Ιούνιο του 2001, ως απάντηση σε μια αναφορά για τα πρόσθετα τροφίμων που έκανε το EPRI, για την τροποποίηση προηγούμενου κανονισμού και τη χορήγηση των σχετικών εγκρίσεων ότι το όζον είναι αντιμικροβιακός παράγοντας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άμεση επαφή με τα τρόφιμα (FDA, 2001). Το όζον έχει, επίσης, εγκριθεί στις ΗΠΑ για χρήση σε όλα τα προϊόντα με βάση το κρέας και τα πουλερικά από το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA (US Department of Agricultural) FSIS (Food Safety and Inspection Service), 2001), όταν εφαρμόζεται σύμφωνα με τα ισχύοντα πρότυπα της βιομηχανίας και της ορθής παρασκευαστικής τεχνικής (FDA, 2003).

## 2.3 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.3.1 Σχεδίαση πειράματος

Η κινητική μελέτη αποικοδόμησης των αφλατοξινών στο σιτάρι από το όζον πραγματοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις ολικών αφλατοξινών στα 2 ppb (B1 1,91, B2 1,99, G1 0,48, G2 0,52) και στα 10 ppb (μg/kg) (B1 9,55, B2 9,95, G1 2,4, G2 2,6), σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες 25, 35, 45, 55 και 65 °C και σε τρεις

διαφορετικές συγκεντρώσεις όζοντος 7, 13,7 και 40 ppm. Όλη η διαδικασία του πειράματος διαρκούσε 4 ώρες.

### 2.3.2 Οζονισμός

Ο οζονισμός των δειγμάτων σιταριού πραγματοποιήθηκε σε ένα θάλαμο σταθερών κλιματικών συνθηκών (φούρνος) (Binder, KBF 115, 09-06418), στον οποίο ρυθμιζόταν η θερμοκρασία και η υγρασία. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η υγρασία καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν στο 0- 3%. Ο θάλαμος συνδέονταν με μια γεννήτρια όζοντος (Ozone Solutions, TG-10, Ozone Generator) στην οποία μέσω φιαλών χορηγούνταν οξυγόνο και άζωτο το οποίο βοηθούσε στην προώθηση του όζοντος προς το θάλαμο. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του όζοντος ανιχνευόταν από ένα ψηφιακό αισθητήρα (Eco Sensors, Ozone Analyzer, UV- 100).

Μια ποσότητα των 80g σιταριού διαιρέθηκε σε τέσσερα γυάλινα σιτάκια (όσες και οι ώρες που διαρκούσε το πείραμα), αφού είχε μολυνθεί πριν το σιτάρι με την επιθυμητή συγκέντρωση αφλατοξινών, τότε τοποθετούνταν τα γυάλινα σιτάκια σε ειδικό στατό το οποίο ήταν μέσα στο θάλαμο και συνδέονταν στο καθένα ο κατάλληλος σωλήνας ο οποίος ρυθμιζόταν χειροκίνητα εξωτερικά του θαλάμου από ειδικές βαλβίδες. Τα τέσσερα γυάλινα σιτάκια τοποθετούνταν στο θάλαμο οζονισμού αφού είχε αναπτυχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση όζοντος (Εικόνα 2.3.2.γ). Τα χρωματογραφήματα των επιμολύνσεων (spike) φαίνονται στις Εικόνες 2.3.2.α και 2.3.2.β.



Εικόνα 2.3.2.γ. Η πειραματική διάταξη του οζονισμού των επιμολυσμένων σιταριών με αφλατοξίνες.

### 2.3.2.1 Διαδικασία δειγμάτων

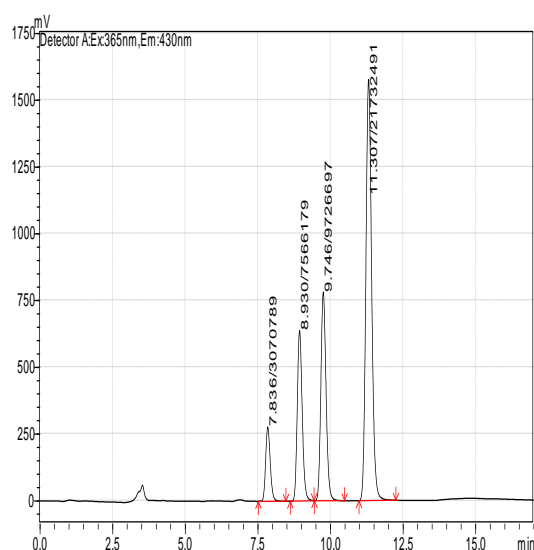
Τα πρότυπα διαλύματα των αφλατοξινών παρασκευάστηκαν σε ακετονιτρίλιο (AcN). Το εταιρικό πρότυπο των αφλατοξινών της εταιρίας Trilogy Analytical Laboratory ήταν 10 mL, στο οποίο έγινε ανασύσταση με 10 mL AcN, με τελική συγκέντρωση του εταιρικού διαλύματος στα 5000 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), οι συγκεντρώσεις της κάθε αφλατοξίνης είναι, B1 1,91ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), B2 0,48ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), G1 1,99ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ), G2 0,52ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ). Με βάση τις πιο πάνω συγκεντρώσεις παρασκευάζονται με αραίωση τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα που δίνονται στο Πίνακα 2.3.2.1.

Πίνακας 2.3.2.1. Οι συγκεντρώσεις της κάθε μίας αφλατοξίνης με βάση την μαθηματική μέθοδο

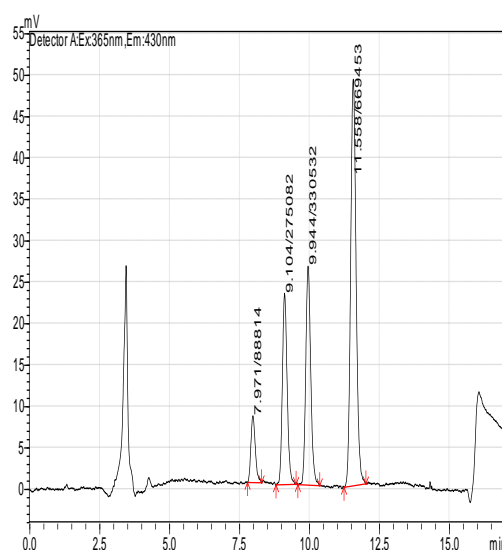
Πρότυπα Διαλύματα (ppb):	B1	B2	G1	G2
0,5	0.4775	0.4975	0.12	0.13
1	0.955	0.995	0.24	0.26
2	1.91	1.99	0.48	0.52
5	4.775	4.975	1.2	1.3
10	9.55	9.95	2.4	2.6

Οι αναλύσεις των δειγμάτων του σιταριού πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC- High Performance Liquid Chromatography), για να προσδιοριστεί αν το δείγμα ήταν μολυσμένο από αφλατοξίνες. Τα 20g σιτάρι, αλέσθηκαν στο μύλο (Hawo's Oktagan 1+2), προσθέτονταν 2g αλάτι και 100 mL από το διάλυμα μεθανόλης:νερό (MeOH:H<sub>2</sub>O 60/40 v/v). Στη συνέχεια, αναδεύονταν για 1 λεπτό, σε ειδικό ομογενοποιητή (Ultra Durax). Προσθέτονταν 100 mL νερό υπερκάθαρο (ELGA, Purelab Ultra, LC 134) και αναδεύονταν ελαφρά με γυάλινη ράβδο για 1 λεπτό. Τέλος, διηθούνταν όλο το μείγμα από ειδικό διηθητικό χαρτί (Whatman No. 4).

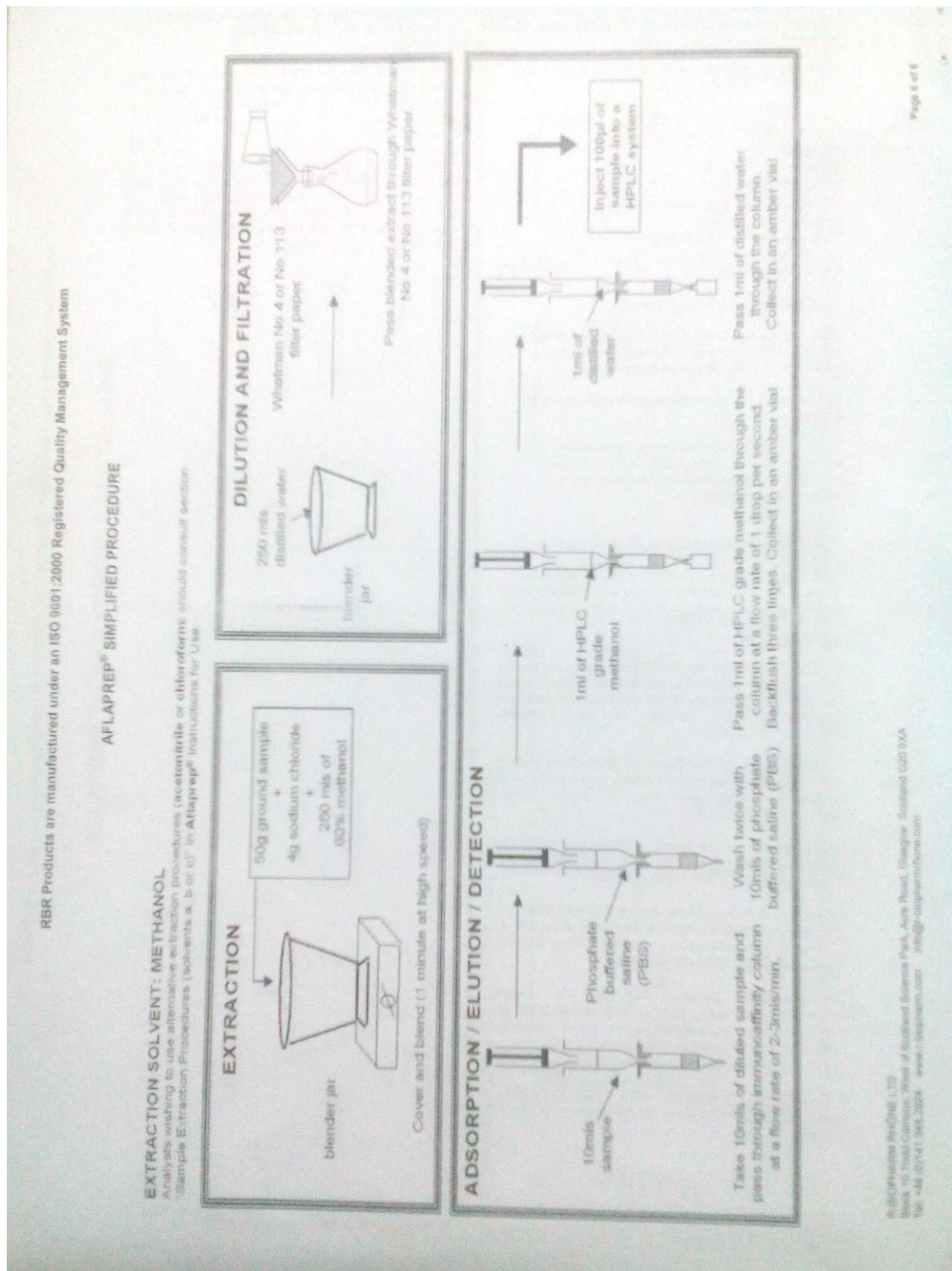
Για να γίνει η διαδικασία έκλουσης των αφλατοξινών χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες ανοσοσυγγένειας (immunoaffinity columns, IAC) (Εικόνα 2.3.2.1) με τη βοήθεια διαλύματος PBS. Προσθέτονταν στη στήλη 10 mL από το διάλυμα του δείγματος με ελεγχόμενη ροή, 3 mL/min σε 5 min. Η ίδια ποσότητα PBS (10 mL) με ελεγχόμενη ροή 5 mL/min σε 2 λεπτά. Το διάλυμα έκλουσης PBS χρησιμοποιούνταν για τον καθαρισμό των στηλών ανοσοσυγγένειας, δηλαδή για την απομάκρυνση όλων των ανεπιθύμητων ουσιών των δειγμάτων προκειμένου να μείνουν μόνο οι αφλατοξίνες. Τέλος, για την ανάκτηση των αφλατοξινών χρησιμοποιούνταν 1 mL μεθανόλης (MeOH), η οποία ακολουθούσε τη μέθοδο της αναστροφής της ροής (back flash) με συγκεκριμένες σταγόνες, ακόμη προσθέτονταν 1 mL νερό. Το δείγμα (δηλαδή τα τελικά 2 mL) συλλέγονταν σε γυάλινο φιαλίδιο.



Εικόνα 2.3.2.α. Spike 2ppb σε 20gr σιτάρι.



Εικόνα 2.3.2.β. Spike 10ppb σε 20gr σιτάρι.



Εικόνα 2.3.2.1 Το σχεδιάγραμμα της διαδικασίας της έκλουσης των αφλατοξινών από την εταιρία

### 2.3.3 Συνθήκες συστήματος παραγωγοποίησης μετά τη στήλη

Η παραγωγοποίηση των αφλατοξινών γίνεται με την μέθοδο Post Column Derivatization (Παραγωγοποίηση μετά τη στήλη) (Pinnacle PCX). Η παραγωγοποίηση των αφλατοξινών γίνονται με διάλυμα ιωδίου το οποίο

παρασκευαζόταν στο εργαστήριο. Το σύστημα παραγωγοποίησης μετά τη στήλη παρεμβάλλεται μετά την έκλουση των δειγμάτων από τη χρωματογραφική στήλη και πριν την είσοδο στο φθορισμομετρικό ανιχνευτή.

Η διαδικασία παρασκευής 500 mL ιωδίου γινόταν σε ειδικό γυάλινο φιαλίδιο με εσμιρισμένο πώμα. Η ποσότητα ιωδίου που χρησιμοποιούνταν ήταν 0,05g και αναμιγνύονταν με 2,5 mL MeOH. Μεταφέρονταν σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και προστίθονταν υπερκάθαρο νερό μέχρι τη χαραγή. Γινόταν απαέρωση του διαλύματος του ιωδίου για 15 λεπτά με αδρανές αέριο, άζωτο (NG, Nitrogen Generator 2301, Claind), λόγω του ότι οι φυσαλίδες μπορούσαν να δημιουργήσουν πρόβλημα στη στήλη. Ταυτόχρονη απαέρωση με το ίδιο αέριο γινόταν στο νερό το οποίο χρησιμοποιούνταν για την πλύση του συστήματος παραγωγοποίησης στο πέρας των αναλύσεων. Ο όγκος του αντιδραστήρα στον οποίο γινόταν η παραγωγοποίηση ήταν 1,4 mL, η ταχύτητα ροής ρυθμιζόταν στα 0,3 mL/min και η θερμοκρασία του αντιδραστήρα ήταν στους 90 °C.

#### **2.3.4 Οι συνθήκες του Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Απόδοσης (HPLC)**

Ο HPLC (HPLC-Shimadzu, LC-A series, Kyoto, Japan) είναι συνδεδεμένος με το φθορισμομετρικό ανιχνευτή του οποίου το μήκος κύματος διέγερσης (excitation wavelength) ορίστηκε στα 365nm και το μήκος κύματος εκπομπής (emission wavelength) ορίστηκε στα 430nm. Ο διαχωρισμός των αφλατοξινών γινόταν με τη χρήση μιας στήλης ανάστροφης φάσης (Mycotox, C<sub>18</sub>) από ανοξειδωτο χάλυβα, διαστάσεων 4,6x250nm και μέγεθος σωματιδίων πλήρωσης 5μm και μιας προστήλης η οποία τοποθετήθηκε πριν από την αναλυτική στήλη. Αυτές οι δύο στήλες ήταν τοποθετημένες στο φούρνο του συστήματος παραγωγοποίησης και όχι του HPLC.

Η σύσταση της κινητής φάσης ήταν νερό:μεθανόλη:ακετονιτρίλιο (H<sub>2</sub>O:MeOH:AcN) σε αναλογία 56/22/22 v/v/v. Η ταχύτητα ροής ρυθμιζόταν στο 1mL/min υπό ισοκρατικές συνθήκες, έτσι ώστε η σύσταση της κινητής φάσης να παραμένει αμετάβλητη κατά τη διάρκεια των χρωματογραφικών διαχωρισμών. Ενώ η πίεση κατά τη διάρκεια της ανάλυσης κυμαίνονταν από 160-180 Bar. Η θερμοκρασία της στήλης και της προστήλης ρυθμιζόταν στους 45 °C και ο όγκος ένεσης στα 10 μL. Ο χρόνος ανάλυσης των αφλατοξινών ήταν 17 λεπτά.

### 3. ΣΥΜΠΕΡΑΜΑΤΑ

#### 3.1 Αποτελέσματα του πειράματος

Η συμπεριφορά των αφλατοξινών έναντι του όζοντος ήταν αισθητή, δηλαδή, η συγκέντρωση των αφλατοξινών με την οποία επιμολύνθηκε το σιτάρι μειωνόταν σταδιακά ανάλογα με τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση του όζοντος. Για παράδειγμα, όταν μολύνθηκε το σιτάρι με τη μικρότερη από τις δύο συγκεντρώσεις τοξίνης (2ppb) παρατηρήθηκε ότι αποικοδομήθηκε πιο εύκολα απ' ό,τι στα 10ppb, για του λόγου το αληθές, στα 2ppb συγκέντρωση τοξίνης με 7ppm συγκέντρωση όζοντος στους 25°C η G2 ξεκίνησε με 0,45ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 0,3ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,22ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,19ppb και τη τέταρτη πλέον ώρα είχε φτάσει στα 0,18ppb. Η G1 στις αντίστοιχες συνθήκες ξεκίνησε με 1,98ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 1,87ppb, τη δεύτερη ώρα στα 1,49ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 1,47ppb και την τελευταία ώρα του πειράματος είχε φτάσει στα 1,39ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,47ppb, την 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,32ppb, τη δεύτερη στα 0,31ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,28ppb και την τέταρτη ώρα στα 0,26ppb. Η B1 στις ίδιες συνθήκες ξεκίνησε με 1,76ppb και την 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,62ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,44ppb, την 3<sup>η</sup> στα 1,17ppb και την 4<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,15ppb.

Με τις ίδιες συνθήκες αλλά με μόνη διαφορά την αύξηση της θερμοκρασίας στους 35°C η G2 ξεκίνησε από τα 0,42ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 0,21ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,18ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,16ppb και τη τέταρτη στα 0,15ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,96ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,66ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,39ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,95ppb και τη τέταρτη στα 0,68ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,39ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 0,28ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,25ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,23ppb και την τελευταία ώρα έφτασε στα 0,19ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,71ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 1,42ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 1,22ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,94ppb και τέλος μειώθηκε μέχρι και τα 0,62ppb.

Αυξάνοντας και άλλο τη θερμοκρασία με τιμή στους 45°C, η συμπεριφορά της G2 ήταν η εξής: ξεκίνησε με 0,39ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,19ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,16ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,13ppb και την 4<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε μέχρι και τα 0,07ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,72ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,53ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 1,22ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,88ppb και τη τέταρτη στα 0,53ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,37ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,25ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα δεν ήταν αισθητή η μείωση



παραμόνο ελάχιστη φτάνοντας στα 0,24ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,17ppb και τη τέταρτη στα 0,16ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,69ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,35ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,21ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,85ppb και τη τέταρτη ώρα έφτασε στα 0,55ppb.

Στους 55°C με όλες τις υπόλοιπες συνθήκες ίδιες η G2 ξεκίνησε με 0,38ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,18ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,12ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,09ppb και τη τέταρτη ώρα στα 0,04ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,71ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,35ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,08ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,76ppb και τη τέταρτη στα 0,35ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,34ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα είχε φτάσει στα 0,23ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,15ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,12ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,07ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,68ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,32ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 1,05ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,64ppb και τη τέταρτη ώρα στα 0,36ppb.

Αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 65°C παρατηρήσαμε πιο απότομες μειώσεις, δηλαδή η G2 ξεκίνησε με 0,36ppb και τη 1<sup>η</sup> κιάλας ώρα είχε φτάσει στα 0,17ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,11ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,07ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,03ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,37ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 1,14ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 1,03ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,71ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,29ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,31ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,21ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,13ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,11ppb και τη 4<sup>η</sup> πλέον ώρα είχε φτάσει στα 0,06ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,59ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,31ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 1,02ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,53ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,34ppb.

Όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του όζοντος στα 13,7ppm με τη ίδια συγκέντρωση αφλατοξινών στα 2ppb, η επιμέρους αφλατοξίνες στους 25°C συμπεριφέρθηκαν ως εξής, η G2 ξεκίνησε με 0,37ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,24ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,21ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,19ppb και στη 4<sup>η</sup> στα 0,18ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,58ppb και την 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,27ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,13ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,85ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,76ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,41ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,29ppb, τη 2<sup>η</sup> 0,28ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,24ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,19ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,73ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 1,53ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,95ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,83ppb και τη τελευταία ώρα στα 0,66ppb.

Με τις ίδιες συνθήκες στους 35°C η G2 ξεκίνησε με 0,35ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,19ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,17ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,14ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,13ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,28ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα είχε φτάσει στα 1,15ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,99ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,78ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,37ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,38ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,23ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,19ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,13ppb και τη

τέταρτη δεν μεταβλήθηκε καθόλου παρέμεινε στα 0,13ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1.64ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα είχε μειωθεί στα 1,31ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,86ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,74ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,54ppb.

Με τη θερμοκρασία στους 45°C η G2 ξεκίνησε με 0,33ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 0,17ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,09ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,08ppb και τη τελευταία ώρα στα 0,05ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,23ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,14ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,97ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,76ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,29ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,33ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,22ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,18ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,12ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,11ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,61ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,25ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,81ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,67ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,48ppb.

Στους 55°C με τις ίδιες συγκεντρώσεις όζοντος και αφλατοξινών η G2 ξεκίνησε με 0,32ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,13ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,08ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,06ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,03ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,18ppb μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,11ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,78ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,73ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,28ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,29ppb και έφτασε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,19ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,14ppb, τη 3<sup>η</sup> 0,11ppb και τη 4<sup>η</sup> πλέον ώρα είχε φτάσει στα 0,06ppb και η B1 ξεκίνησε με 1,55ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,23ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,78ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,31ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,23ppb.

Με την τελευταία θερμοκρασία των πειραμάτων τους 65°C, η G2 ξεκίνησε με 0,31ppb μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,12ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,06ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,03ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,02ppb. Η G1 ξεκίνησε με 0,96ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,74ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,54ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,41ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,21ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,24ppb φτάνοντας να μειωθεί τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,16ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,12ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,08ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,03ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,46ppb και 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,12ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,63ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,25ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,15ppb.

Με την ίδια συγκέντρωση των αφλατοξινών (2ppb) αλλά με αύξηση της συγκέντρωσης του όζοντος στα 40ppm, στους 25°C η G2 ξεκίνησε με 0,32ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 0,17ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,15ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,12ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,11ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,31ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,69ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,64ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,53ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,43ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,45ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,27ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,24ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,21ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,19ppb και η B1 ξεκίνησε με 1,71ppb φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα να μειωθεί στα 1,09ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,87ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,53ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,47ppb.

Στους 35°C η G2 ξεκίνησε με 0,29ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,12ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,09ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,07ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,05ppb. Η G1 ξεκίνησε με

1,23ppb και μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,68ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,59ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,51ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,35ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,37ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,21ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,16ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,12ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,11ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,63ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,02ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,85ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,45ppb και τη τελευταία ώρα έφτασε στα 0,36ppb.

Στους 45°C με όλες τις άλλες συνθήκες ίδιες, η G2 ξεκίνησε με 0,28ppb μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,11ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,08ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,06ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,03ppb. Η G1 ξεκίνησε με 1,18ppb, μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,61ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,53ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,47ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,25ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,32ppb, έφτασε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,19ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,15ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,11ppb και τη τέταρτη ώρα στα 0,07ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,48ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,99ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,78ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,33ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,29ppb.

Μετά, αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 55°C η G2 ξεκίνησε με 0,21ppb και μειώθηκε στα 0,09ppb τη 1<sup>η</sup> ώρα, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 0,07ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,04ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,02ppb. Η G1 ξεκίνησε με 0,99ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,59ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,52ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,43ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,23ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,24ppb φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,15ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,13ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,09ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,05ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,35ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,96ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,75ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,29ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,18ppb.

Με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση όζοντος στα 40ppm, η μεγαλύτερα θερμοκρασία του πειράματος έτεινε να εξαλείψει εντελώς τις 4 αφλατοξίνες με αποτέλεσμα οι τιμές τους να κυμαίνονται ως εξής, στη G2 η οποία ξεκίνησε με 0,19ppb τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,07ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,05ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,02ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,01ppb. Η G1 ξεκίνησε με 0,92ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 0,56ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,49ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,25ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,19ppb. Η B2 ξεκίνησε με 0,21ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,11ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,09ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,06ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,02ppb. Η B1 ξεκίνησε με 1,19ppb και μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 0,78ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,61ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,21ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,12ppb.

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων ξεκίνησε με συγκέντρωση αφλατοξινών στα 10ppb και συγκέντρωση όζοντος στα 7ppm. Στους 25°C λοιπόν, η G2 σε αυτή τη περίπτωση ξεκίνησε με 2,51ppb, φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 2,32ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 1,96ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,56ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 1,22ppb. Η G1 ξεκίνησε με 9,83ppb, η οποία μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 9,11ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 8,83ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 6,66ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,97ppb. Η B2 ξεκίνησε με 2,22ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα είχε φτάσει στα

2,05ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,72ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,48ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 1,37ppb και η B1 ξεκίνησε με 9,48ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 8,85ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 6,76ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 5,95ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,43ppb.

Στους 35°C η G2 ξεκίνησε με 2,48ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν τα 2,42ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,94ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,52ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 1,12ppb. Η G1 ξεκίνησε με 9,59ppb φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 8,97ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 8,82ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 6,39ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,69ppb. Η B2 ξεκίνησε με 2,19ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,94ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,47ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,25ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,97ppb και η B1 είχε ξεκινήσει με 9,01ppb, μειώθηκε στα 8,54ppb τη 1<sup>η</sup> ώρα, στα 6,63ppb τη 2<sup>η</sup> ώρα, στα 5,34ppb τη 3<sup>η</sup> ώρα και στα 4,21ppb τη 4<sup>η</sup> ώρα.

Στους 45°C οι αφλατοξίνες συμπεριφέρθηκαν ως εξής, η G2 ξεκίνησε με 2,39ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα είχε φτάσει στα 2,12ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,89ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 1,31ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 1,09ppb. Η G1 ξεκίνησε με 9,35ppb, μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 7,35ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 6,99ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 6,12ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,33ppb. Η B2 ξεκίνησε με 1,99ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,58ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,35ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,99ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,91ppb και η B1 ξεκίνησε με 8,99ppb φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 7,98ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 6,03ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,97ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 3,94ppb.

Στους 55°C, η G2 ξεκίνησε με 2,21ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,99ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,81ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,27ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 1,05ppb. Η G1 ξεκίνησε με 8,59ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 7,27ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 6,79ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 5,82ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,13ppb. Η B2 ξεκίνησε με 1,78ppb, φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,46ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,21ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,91ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,85ppb και η B1 ξεκίνησε και αυτή με 7,32ppb μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 6,48ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 5,04ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 3,98ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 2,33ppb.

Στην μεγαλύτερη θερμοκρασία, δηλαδή στους 65°C, η υποβάθμιση των αφλατοξινών είχε ως εξής, η G2 ξεκίνησε με 1,84ppb, έφτασε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,69ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,52ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,26ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,99ppb. Η G1 ξεκίνησε με 8,32ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 6,54ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 6,47ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 5,77ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 3,52ppb, η B2 ξεκίνησε με 1,54ppb έφτασε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,39ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,09ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,83ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,39ppb. Η B1 ξεκίνησε με 7,12ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 6,27ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 4,85ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 3,76ppb και τη 4<sup>η</sup> πλέον ώρα είχε φτάσει στα 2,01ppb.

Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του όζοντος στα 13,7ppm και με συγκέντρωση αφλατοξινών 10ppb, στους 25°C η G2 ξεκίνησε με 2,03ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα

1,71ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,43ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,02ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,99ppb. Η G1 ξεκίνησε με 9,76ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 8,98ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 8,23ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 5,97ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,77ppb. Η B2 ξεκίνησε με 2,18ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,99ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,53ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,38ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,99ppb και η B1 ξεκίνησε με 8,78ppb η οποία μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 6,83ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 5,48ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,67ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,16ppb.

Στους 35°C η G2 ξεκίνησε με 2,02ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,65ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,41ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,99ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,69ppb. Η G1 ξεκίνησε με 8,23ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 7,68ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 6,21ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,91ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 3,99ppb. Η B2 ξεκίνησε με 2,13ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,76ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,34ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,17ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,89ppb. Η B1 ξεκίνησε με 7,68ppb, φτάνοντας να μειωθεί τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 5,79ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 5,09ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,31ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,12ppb.

Στους 45°C η G2 ξεκίνησε με 2,01ppb και ήταν στα 1,59ppb τη 1<sup>η</sup> ώρα, στα 1,35ppb τη 2<sup>η</sup>, στα 0,86ppb τη 3<sup>η</sup> και στα 0,62ppb τη 4<sup>η</sup> ώρα. Η G1 ξεκίνησε με 8,03ppb και μειώθηκε στα 7,32ppb τη 1<sup>η</sup> ώρα, στα 5,43ppb τη 2<sup>η</sup> ώρα, στα 4,83ppb τη 3<sup>η</sup> ώρα και τη 4<sup>η</sup> στα 3,54ppb. Η B2 ξεκίνησε με 1,95ppb και μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,43ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,29ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,89ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,76ppb και η B1 ξεκίνησε με 7,33ppb φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 5,31ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 4,91ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,22ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 3,63ppb.

Αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 55°C η G2 ξεκίνησε με 1,95ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 1,43ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,25ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,83ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,54ppb. Η G1 ξεκίνησε με 8,02ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 5,95ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 4,71ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,05ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 3,28ppb. Η B2 είχε ξεκινήσει με 1,73ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα είχε φτάσει στα 1,37ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,16ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,83ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,61ppb και η B1 ξεκίνησε με 6,34ppb αλλά τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 5,14ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,94ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 2,55ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 2,16ppb.

Και στους 65°C η G2 ξεκίνησε με 1,75ppb φτάνοντας τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,23ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,22ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,76ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,51ppb. Η G1 ξεκίνησε με 7,77ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 4,94ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,38ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 3,01ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 2,25ppb. Η B2 ξεκίνησε με 1,47ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,25ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,99ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,54ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,27ppb και η B1 είχε ξεκινήσει με 6,33ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 4,49ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,63ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 2,49ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 1,99ppb.

Τέλος, τα τελευταία 5 πειράματα έγιναν με συγκέντρωση αφλατοξινών στα 10ppb και συγκέντρωση όζοντος στα 40ppm. Έτσι, η τέσσερις αφλατοξίνες στους 25°C έχουν ως εξής, η G2 ξεκίνησε 1,95ppb και μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,24ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,14ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,86ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,77ppb. Η G1 ξεκίνησε με 8,75ppb μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 8,23ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 6,44ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 5,65ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,55ppb. Η B2 ξεκίνησε με 2,05ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,78ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,29ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 1,03ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,97ppb και η B1 ξεκίνησε με 7,34ppb, μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 5,84ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 4,85ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,63ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,05ppb.

Στους 35°C η G2 ξεκίνησε με 1,93ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,23ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,98ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,84ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,65ppb. Η G1 ξεκίνησε με 8,12ppb έφτασε στα 5,71ppb τη 1<sup>η</sup> ώρα, τη 2<sup>η</sup> στα 4,87ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,77ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 4,04ppb. Η B2 ξεκίνησε με 2,04ppb και μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 1,47ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,08ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,99ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,87ppb και η B1 ξεκίνησε με 6,45ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 4,61ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,88ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 3,59ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 3,09ppb.

Στους 45°C η G2 ξεκίνησε με 1,87ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 1,19ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,96ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,78ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,43ppb. Η G1 ξεκίνησε με 7,68ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώνεται στα 5,59ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 4,79ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 4,73ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 3,27ppb. Η B2 ξεκίνησε στα 1,73ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 1,39ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 1,12ppb, τη 3<sup>η</sup> ώρα στα 0,79ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 0,63ppb και η B1 ξεκίνησε με 5,95ppb και μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 4,35ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,83ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 3,36ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 2,84ppb.

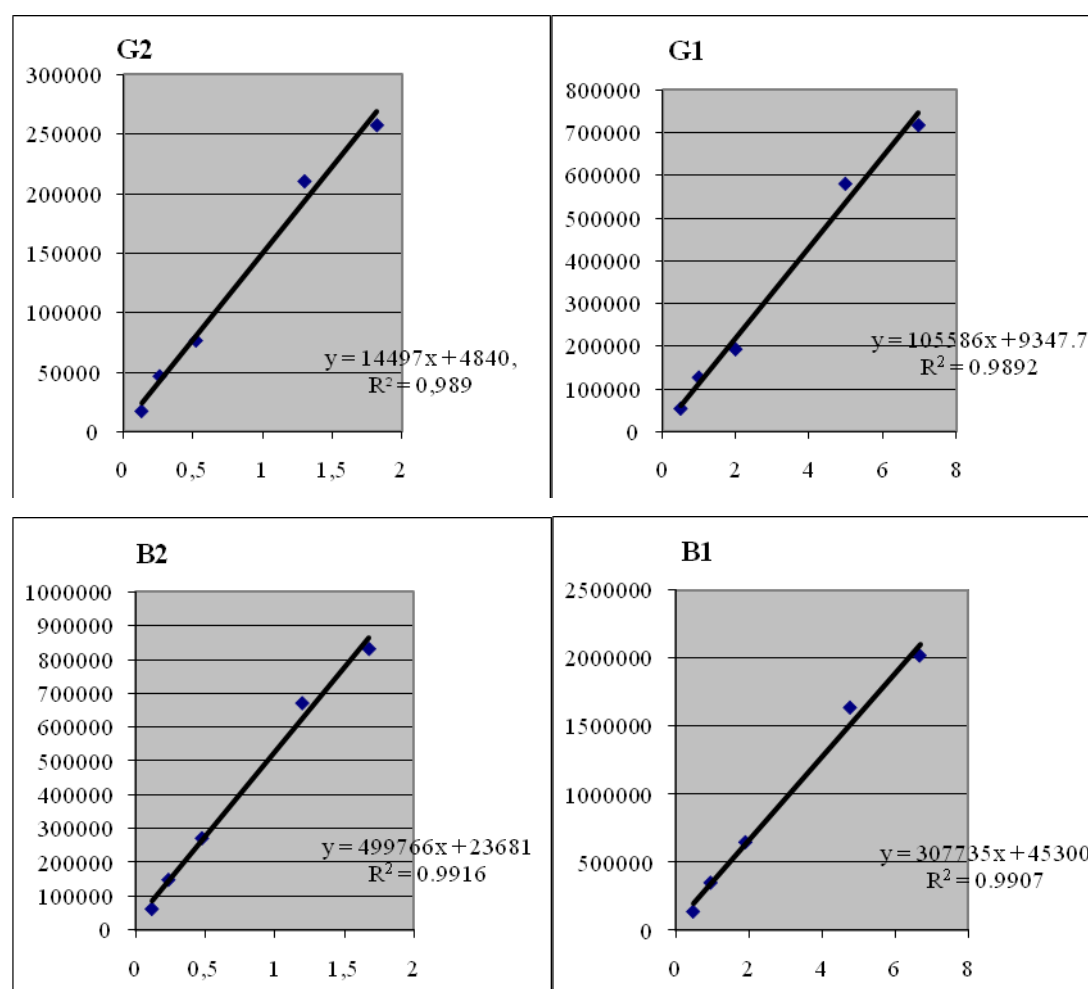
Στους 55°C η G2 ξεκίνησε με 1,89ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα είχε φτάσει στα 1,18ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,89ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,71ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,33ppb. Η G1 ξεκίνησε με 7,38ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα ήταν στα 5,45ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,89ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 3,38ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 2,67ppb. Η B2 ξεκίνησε με 1,65ppb, τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 1,24ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 1,01ppb τη 3<sup>η</sup> στα 0,72ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,51ppb και η B1 ξεκίνησε με 5,34ppb και μειώθηκε τη 1<sup>η</sup> ώρα στα 4,32ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,79ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 2,46ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 1,01ppb.

Και στη τελευταία θερμοκρασία και την υψηλότερη, δηλαδή στους 65°C, η G2 ξεκίνησε με 1,69ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα κιόλας μειώθηκε στα 1,11ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,82ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,67ppb και τη 4<sup>η</sup> αποικοδομήθηκε εντελώς φτάνοντας στο 0ppb. Η G1 ξεκίνησε με 6,59ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα έφτασε στα 4,52ppb, τη 2<sup>η</sup> ώρα στα 3,24ppb, τη 3<sup>η</sup>

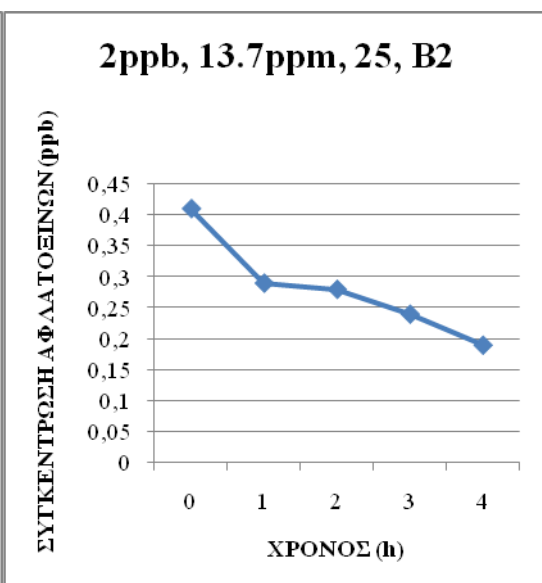
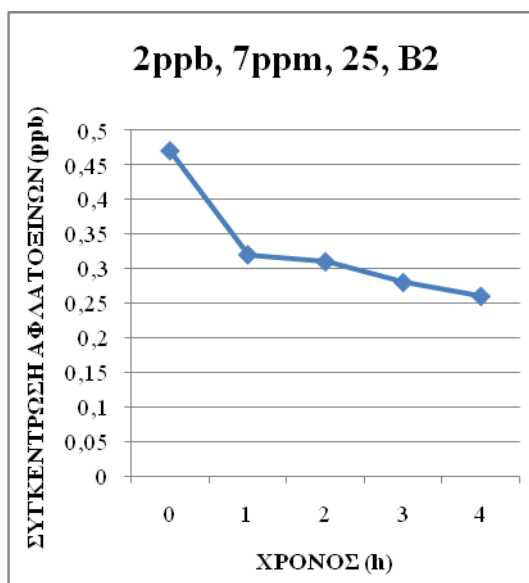
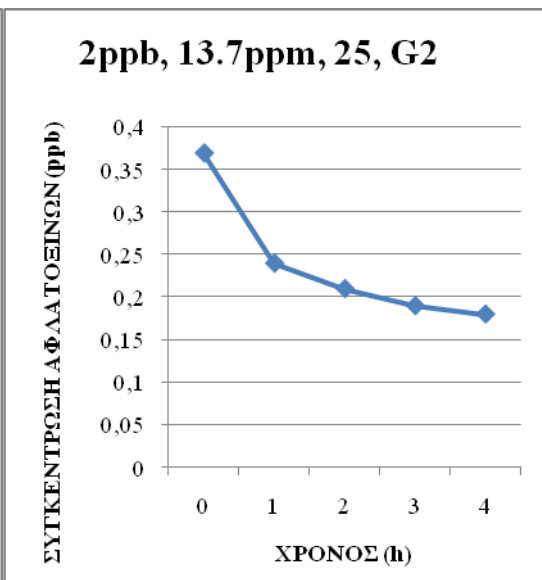
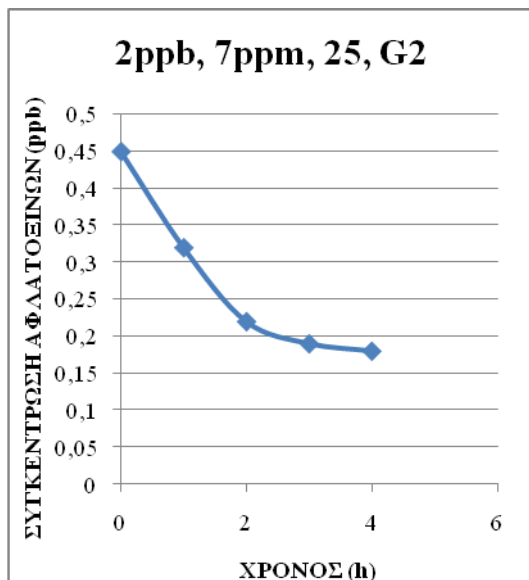
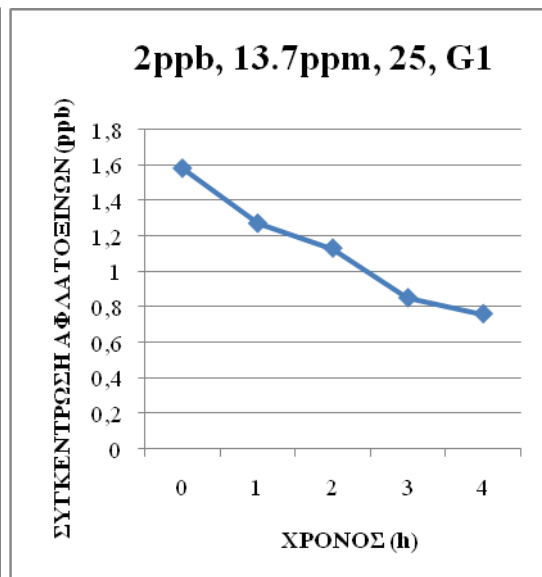
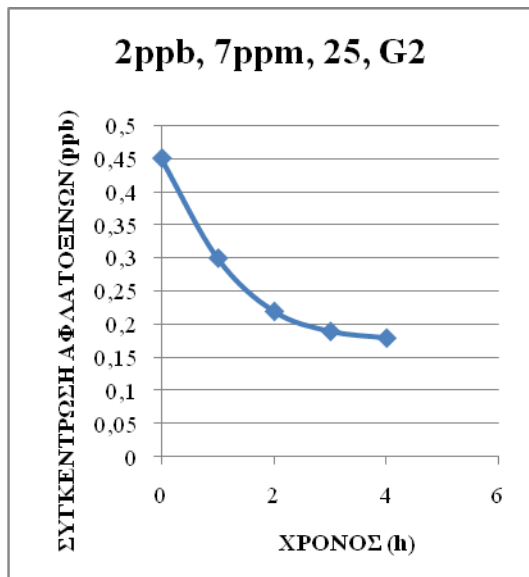
ώρα στα 2,66ppb και τη 4<sup>η</sup> ώρα στα 1,88ppb. Η B2 ξεκίνησε με 1,21ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 0,96ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 0,84ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 0,53ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,07ppb και η B1 ξεκίνησε με 4,63ppb και τη 1<sup>η</sup> ώρα μειώθηκε στα 3,99ppb, τη 2<sup>η</sup> στα 3,51ppb, τη 3<sup>η</sup> στα 2,24ppb και τη 4<sup>η</sup> στα 0,94ppb.

### 3.2 Καμπύλες βαθμονόμησης των αφλατοξινών

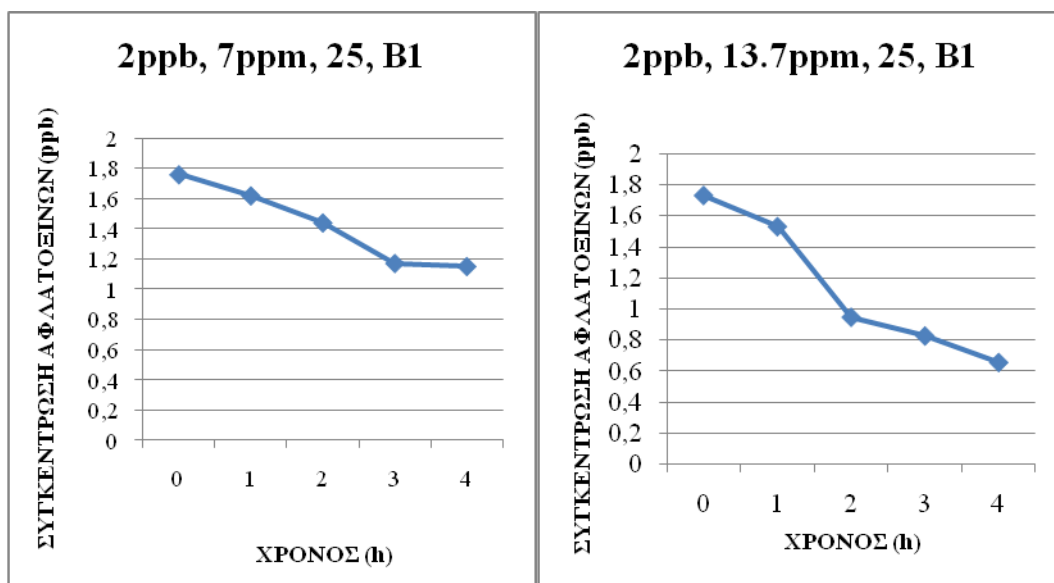
Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες βαθμονόμησης των αφλατοξινών (Εικόνα 3.2.α) στις οποίες βασίστηκαν οι οζονισμοί. Καθώς επίσης και κάποιες από τις καμπύλες οζονισμού (Εικόνα 3.2.β):



Εικόνα 3.2.α. Καμπύλες βαθμονόμησης των αφλατοξινών G2, G1, B2, B1.







Εικόνα 3.2.β. Διάσπαση αφλατοξινών σε αέριο όζον, με αρχική συγκέντρωση αφλατοξινών 2ppb, έναντι του χρόνου σε θερμοκρασία 25°C.

### 3.3 Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από αρκετούς ερευνητές με βάση το όζον και τις αφλατοξίνες

Στο πείραμα των Abdel-Wahhab et al. (2011), στο οποίο προσπαθούσαν να υποβαθμίσουν τις αφλατοξίνες με 20ppm όζοντος για 5min, 40ppm όζοντος για 10min και 50ppm όζοντος για 5min, βρήκαν πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση όζοντος είναι πιο αποτελεσματική απ' ότι η χαμηλότερη. Το πείραμά τους βέβαια αφορούσε τα φιστίκια από τρεις διαφορετικές χώρες, τα οποία μόλυναν απευθείας με διάφορους μύκητες.

Επίσης, σύμφωνα με τον Freitas-Silva, η εφαρμογή του όζοντος είναι ένα από τα πολλά υποσχόμενα εργαλεία το οποίο διασφαλίζει την ασφάλεια των τροφίμων. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσο και μπορεί να προκαλέσει ανύψωση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου σε ζωντανά κύτταρα οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες. Αυτή η επίδραση έχει αξιοποιηθεί για την συντήρηση των τροφίμων και ειδικότερα των φρέσκων προϊόντων (Barth et al., 1995, Liew και Prange, 1994, Tzortzakis et al., 2008). Η αποτελεσματικότητα του όζοντος έναντι της ανάπτυξης των μυκήτων εξηγήθηκε και από τους Adams και Moss (2008).

Οι Tiwari et al. (2010), παρατήρησαν ότι η απενεργοποίηση διάφορων μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες όπως είναι οι αφλατοξίνες, η πατουλίνη, το κυκλοπιαζονικό οξύ, το σεκαλονικό οξύ D, η ωχρατοξίνη και η ζεαραλενόνη και κατ'

επέκταση, η απολύμανση των μυκοτοξινών αυτών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της συγκέντρωσης του όζοντος, του χρόνου έκθεσης, του pH και της περιεχόμενης υγρασίας της μάζας των καρπών. Για παράδειγμα, οι Raila et al. (2006) παρατήρησαν 2,2 φορές υψηλότερη απολύμανση των κόκκων σιταριού με περιεκτικότητα σε υγρασία των κόκκων 15,2% και 3 φορές υψηλότερη με 22% υγρασία στους κόκκους, σε σύγκριση με ξηρές συνθήκες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του όζοντος σε υδατικά μέσα παρά σε αέρια μέσα. Ως εκ τούτου, η υγρασία είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του όζοντος. Για παράδειγμα, ο Young (1986) παρατήρησε μία μείωση της δεσοξυνιβαλενόλης κατά 90% με υγρό όζον (1,1 Mol%) και μία μείωση 70% στον αραβόσιτο μετά από 1ώρα σε παρόμοιες πειραματικές συνθήκες.

Οι Proctor et al. παρατήρησαν υψηλό επίπεδο υποβάθμισης της αφλατοξίνης σε φιστίκι-ψίχα απ' ότι στο αλεύρι φιστικιού και πως η AFB1 ήταν περισσότερο ευαίσθητη στη θεραπεία με όζον. Αυτό το αποτέλεσμα το θεώρησαν σημαντικό, διότι η AFB1 είναι η πιο ισχυρή τοξίνη μεταξύ άλλων. Οι McKenzie et al. κατέδειξαν ότι οι AFB1 και AFG1 υποβαθμίζονταν πιο γρήγορα απ' ότι οι AFB2 και AFG2 με τη βοήθεια του όζοντος και αυτό το αποδίδουν στο διπλό δεσμό που έχουν στον άνθρακα 8,9.

### **3.4 Συμπεράσματα**

Παρατηρείται, λοιπόν, από τα αποτελέσματα ότι η αρχική συγκέντρωση επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του οζονισμού διότι όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση της αρχικής τοξίνης του δείγματος στην ίδια θερμοκρασία τόσο μειωνόταν η συγκέντρωση της τοξίνης την 4<sup>η</sup> και τελευταία ώρα. Επίσης, εκτός από την αρχική συγκέντρωση τα αποτελέσματα επηρεάστηκαν και από την θερμοκρασία, παρατηρήθηκε πιο γρήγορη μείωση της τοξίνης όταν η θερμοκρασία αυξανόταν, και από τη συγκέντρωση του όζοντος, όσο πιο χαμηλή συγκέντρωση είχε το όζον, τόσο πιο αργή ήταν και η αποικοδόμηση της τοξίνης.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ**

### **Ξένη Βιβλιογραφία:**

- Abdel-Wahhab M.A., Sehab A.F., Hassanien F.R., El-Nemr Sh.E., Amra H.A. και Abdel-Alim H.A. (2011). Efficacy of Ozone to Reduce Fungal Spoilage and Aflatoxin Contamination in Peanuts. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2 (4), 01-14.
- Adams M.R. και Moss M.O. (2008). *Microorganisms and food materials. Food Microbiology*. Royal Soc. Chem., pp. 6-20.
- Adhikari M., Ramjee G. και Berjak P. (1994). Aflatoxin, kwashiorkor, and morbidity. *Natural Toxins*, 2, 1-3.
- Agag B.I. (2004). Mycotoxins in food and feeds-Aflatoxins. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res*, 7(1), 173-206.
- Aguayo E., Escalona V.H. και Arts F. (2006). Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.*, 39 (2), 169–177.
- Akbas Y.M. και Ozdemir M. (2006). Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2099-2104.
- Alberts J.F., Engelbrecht Y., Steyn P.S., Holzapfel W., Van Zyl W.H. (2006). Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal Food Microbiologist*, 109, 121–126.
- Alberts J.F., Gelderblom W.C.A., Botha A., Van Zyl W.H. (2009). Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *International Journal Food Microbiologist*, 135, 47–52.
- Alfred C., Beckwith C.A., Ronald F., Vesonder F.R. και Ciegler A. (1976). *Chemical Methods Investigated for Detoxifying Aflatoxins in Foods and Feeds*. Purchased by US Department of Agricultural for Official Use.
- Alvarez L., Gil A.G., Ezpeleta O., García-Jalón J.A. και López de Cerain A. (2004). Immunotoxic effects of Ochratoxin A in Wistar rats after oral administration. *Food Chem Toxicol*, 42, 825–834.

- Atanda S.A., Aina J.A., Agoda S.A., Usanga O.E. και Pessu P.O. (2012). Mycotoxin management in agriculture: a Review. *Journal of Animal Science Advances*, 2, 250-260.
- Atkins D. και Norman J. (1998). Mycotoxins and food safety. *Nutr Food Sci*, 5, 260–266.
- Azziz-Baumgartner E., Lindblade K., Gieseke K., Rogers H.S., Kieszak S., Njapau, H. et al. (2005). Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Envir Health Perspectives*, 113(12), 1779-1783.
- Bankole S.A. και Adebajo A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *Afr. J. Biotechnol.*, 2, 254–274.
- Barkai-Golan R., (2008). *Alternaria mycotoxins*. In: Barkai-Golan R., Nachman P., (Eds.). *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp.185–203.
- Barth, M.M.; Zhou, C.E.N.; Mercier, J.; Payne, F.A., (1995). Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *J. Food Sci.*, 60: 1286-1288.
- Bateman K.P., Castro-Perez J., Wrona M., Shockcor J.P., Yu K., Oballa R., Nicoll-Griffith D.A. (2007). MSE with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 1485.
- Beltran D., Selma M.V., Marvn A. και Gil M.I. (2005). Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5654–5663.
- Bennett J.W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. *Mycopathl.*, 100, 3-5.
- Bennett J.W. και Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16, 497–516.
- Berry C.L. (1988). The pathology of mycotoxins. *J. Pathology*, 154, 301–311.
- Bertin G., Jouany J.P. και Yiannikouris A. (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. In *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats CIHEAM / FAO / NAGREF*, Zaragoza, Options, Mediterran, A, 85, 205-224

- Biomin Survey (2010). Mycotoxins inseparable from animal commodities and feed. All about Feed, Vol. 2, Nr. 2.
- Bolger M., Coker R.D., Dinovi M., Gaylor D., Gelderblom M.O., Paster N., Riley R.T., Shephard G. και Speijers J.A. (2001). Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food: Fumonisin, Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization Food Additives, Paper 74, Series 47, 103–279.
- Bonomi A., Quarantelli A., Mazzali I., Cabassi E., Corradi A., Ubaldi A., Fusari A. και Chizzolini R. (1993). The effects of aflatoxin G1 contaminated rations on the productive efficiency and on the meat yield and quality in fattening pigs (experimental contribution). Riv. Sci. Aliment., 22, 351-377.
- Bonomi A., Quarantelli A., Mazzali I., Cabassi E., Corradi A., Lecce R., Ubaldi A., Fusari A. και Chizzolini A. (1994). Effects of aflatoxins B1 and G1 on productive efficiency, meat yield and quality in fattening pigs (experimental contribution). Riv. Sci. Aliment., 23, 251-277.
- Bottalico A. και Logrieco A., (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: Sinha K.K., Bhatnager D. (Eds.) Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Marcel Dekker, New York, pp.65–108.
- Brera C., De Santis B., Debegnach F. και Miraglia M. (2008). Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 51, Chapter 12, Mycotoxins, Elsevier B.V.
- Brian G.R., Georgianna D.R., Wilkinson J.R., Yu J., Abbas H.K., Bhatnagar D. et al. (2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. Mycologia, 99(2), 232-239.
- Bruegel P. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Council for Agricultural Science and Technology, No. 139.
- Bullerman L.B. και Bianchini A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. Int. J. Food Microbiol., 119, 140–146.
- Campbell M.L, Jr May J.D., Huff W.E. και Doerr J.A. (1983). Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. Poultry Sci, 62, 2138–2144.
- CAST (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Task force report 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA, 13-157.

- Charmley L.L., Trenholm H.L., Prelusky D.B. και Rosenberg A. (1995). Economic losses and decontamination, *Nat. Toxins*, 3, 199–203.
- Ciegler A., Lillehoj E.B., Peterson R.E. και Hall H.H. (1966). Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14, 934–939.
- Ciegler D.I., Fennell G.A., Sansing R.W., Detroy και Bennett G.A. (1973). *Appl. Microbiol.*, 26, 271.
- Codifer L.P., Jr. Mann R. και Dollear F.G. (1976). Aflatoxin inactivation: Treatment of peanut meal with formaldehyde and calcium hydroxide. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 53, 204–206.
- Coker R.D. (1997). *Mycotoxins and Their Control: Constraints and Opportunities*. Natural Resources Institute, The University of Greenwich, Bulletin 73.
- Coker R.D., Jewers K. και Jones B.D. (1985). The destruction of aflatoxin by ammonia: Practical possibilities. *Tropical Science*, 25, 139–154.
- Cole R.J., Cox R.H. (1981). *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, New York, N.Y.
- Cole R.J. και Kirksey J.W. (1971). Aflatoxin G1 metabolism by *Rhizopus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, C19, 222.
- Commission Regulation (EC) (2006). No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L364, 15–24.
- Cotty P.J. και Cardwell K.F. (1999). Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus section flavi*. *Appl Environ Microb*, 65(5), 2264-2266.
- Cotty P.J., Jaime-Garcia R. (2007). Influences of the climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 109–15.
- Creppy EE. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett.*, 127, 19–28.
- Cullen P.J., Tiwari B.K., O'Donnell C.P. και Muthukumarappan K. (2006). Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. *Trends Food Science and Technology*, 20, 125–136.

- Davis N.D. και Diener U.L. (1979). Mycotoxins. In Food and Beverage Mycology, ed. L.R. Beuchat. AVI Publishing Company, West Port, CT, pp. 397444.
- De Alencar R.E., Faroni D.R.L., Soares F.F.N., Da Silvaca A.W. και Da Silva Carvalhob C.M. (2012). Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. *Journal Science of Food Agricultural*, 92, 899-905.
- Desjardins A.E. και Proctor R.H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int J Food Microbiol.*, 119, 47–50.
- De Urzedo A.P.F.M., Diniz M.E.R., Nascentes C.C., Catharino R.R., Eberlin M.N., Augusti R. (2007). Photolytic degradation of the insecticide thiamethoxam in aqueous medium monitored by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *J.Mass Spectrom*, 42, 1319.
- Diao E., Hou H., Chen B., Shan C. και Dong H. (2013). Ozonolysis efficiency and safety evaluation of aflatoxin B1 in peanuts. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 519 525.
- Diaz D.E., Jr. Hagler W.M., Hopkins B.A. και Whitlow L.W. (2002). Aflatoxin binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia*, 156, 223-226.
- Diekman M.A. και Green M.L. (1992). *J. Anim. Sci.*, 70, 1615.
- Diener U.L. (1969). *J. Stored Prod. Res.*, 5, 251.
- D’Mello J.P.F. και McDonald A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- Dollear F.G., Mann G.E., Codifer L.P., Jr. Gardner H.K., Jr. Koltun S.P. και Vix H.L.E. (1968). Elimination of aflatoxin from peanut meal. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 862–865.
- Dwarakanath C.T., Rayner E.T., Mann G.E. και Dollear F.G. (1968). Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45, 93–95.
- EFSA (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. Scientific Report submitted to the European Food Safety Authority, 1-172.

- Ei-Sayed A.M.A.A, Nemat-Allah A.A. και Soher E.A. (2000). Situation of mycotoxins in milk, dairy products and human milk in Egypt. *Mycotoxin Res*, 16, 91–100.
- Ellis W.O., Smith J.P., Simpson B.K. και Oldham J.H. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30, 403439.
- Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A. και Chulze S. (1999). Occurrence of *Aspergillus section Flavi* and aflatoxin B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia*, 147, 37–41.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011). Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA J.*, 9, 2197.
- FAO (2003). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed; <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf> (accessed July 17, 2012).
- FAO (2003). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed. Food and Nutrition, paper 81. Available at <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>.
- FDA (1995). Beverages: bottled water; final rule, Food and Drug Administration. *Fed. Reg.*, 60, 57, 075–130.
- FDA (Food and Drug Administration) (2001). Code of Federal Regulations, Title 21, Part 173, Section 173, 368. Available at <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title21-vol3/xml/CFR-287-2012-title21-vol3-sec-173-368.xml>.
- FDA (2001). Hazard analysis and critical point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. *Federal Register*, 66, 6137–6202.
- FDA (2003). Code of Federal Regulations, Title 21. USA: Government Printing Office.
- Fink-Gremmels J. (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet Quatery*, 21, 115–120.
- Firibu K.S. και Dixon R.P. (2010). Degradation of aflatoxins in aqueous buffer in the presence of nucleophiles. *Food Control*, 21, 1066-1069.



- Fischbach H. και Campbell A.D. (1965). Note on the detoxification of aflatoxins. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 48, 28.
- Frayssinet C. και Lafarge F.C. (1990). Effect of ammoniation on the carcinogenicity of aflatoxin-contaminated groundnut oil cakes: Long-term feeding study in the rat. *Food Additives and Contaminants*, 7, 63–68.
- Freitas-Silva O. και Venâncio A., (2010). Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. *Drug Metabol. Rev.*, 42, 612-620.
- Friend S.C.E., Babiuk L.A. και Schiefer H.B. (1983) *Can. J. Comp. Med.*, 47, 291.
- Gardner H.K., Jr. Koltun S.P., Dollear F.G. και Rayner E.T. (1971). Inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals by ammoniation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48, 70–73
- Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak R.M., Vlegaar R. και Kriek N.P.J. (1988). *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1806.
- Graham D.M. (1997). Use of ozone for food processing. *Food Technology*, 51, 121–137.
- Graham D.M., Pariza M.W., Glaze W.H., Erdman J.W., Newell G.W. και Borzelleca J.F. (1997). Use of ozone for food processing. *Food Technology*, 51(6), 72–6.
- Greene K.A., Gózel-Seydim B.Z. και Seydim C.A. (2012). Chemical and Physical Properties of Ozone. Unit 3, Ozone in Food Processing.
- Groopman J.D., Cain L.G. και Kensler T.W. (1988). Aflatoxin exposure in human populations: Measurements and relationships to cancer. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 19, 113–145.
- Gourama H. και Bullerman B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *Journal of Food Protection*, 51, 263–268.
- Güzel-Seydim Z.B, Bever J.P.I. και Greene A.K. (2004). Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food Microbiology*, 21, 475–479.
- Guzel-Seydim Z.B., Greene A.K. και Seydim A.C. (2004). Use of Ozone in the Food Industry. *LWT-Food Sci. Technol.*, 37, 453–460.

- Hajare S.S., Hajare S.H. και Sharma A. (2005). Aflatoxin inactivation using aqueous extract of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) seeds. *Journal of Food Science*, 70, 29–34.
- Hao Y.Y. και Brackett R.E. (1988). Removal of aflatoxin B1 from peanut milk inoculated with *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Science*, 53, 1384–1386.
- Haschek W.M., Voss K.A. και Beasley V.R. (2002). Selected mycotoxins affecting animal and human health. In: Haschek W.M., Roussex C.G. και Wallig M.A., (eds.). *Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press, 2nd edn, New York, 645–698.
- Hill A.G. και Rice R.G. (1982). Historical background, properties and applications, in Rice R.G. and Netzer, A. (eds). *Handbook of Ozone Technology and Applications*, Vol. 1, Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publishers, pp. 1–37.
- Hu J.Y., Liu C., Zhang X., Qin D.M. και Liu C.L. (2009). Photodegradation of Flumorph in aqueous solutions and natural water under abiotic conditions. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 57, 9629.
- Huseyin H. και Sonal S. (2001). Determination of aflatoxin M1 levels in cheese and milk consumed in Bursa, Turkey. *Vet Hum Toxicol*, 43, 292–293.
- IARC (1986). *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Vol. 40, Lyon.
- International Agency for Research on Cancer (1993). Aflatoxins, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 56, IARC, Lyon.
- IARC (2002). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. International Agency for Research on Cancer, IARC/WHO, Lyon, 82, 171-275.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) (2000), *Environmental Health Criteria 219-Fumonisin B1*. Available at <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm>

- Islam M.S., Hasan M.M., Xiong W., Zhang S.C. και Lei C.L. (2009). Fumigant and repellent activities of essential oil from *Coriandrum sativum* (L.) (Apiaceae) against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Pest Science*, 82 (2), 171–177.
- Ito Y., Peterson S.W., Wicklow D.T. και Goto T. (2001) *Mycol. Res.*, 105, 233.
- Jabusch T.W. και Tjeerdema R.S. (2006). Photodegradation of Penoxsulam. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 54, 5958.
- Jaimez J., Fente C.A., Vazquez B.I., Franco C.M., Cepeda A., Mahuzier G. και Prognon P. (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A.*, 882 p. 1-10.
- Jard G., Liboz T., Mathieu F., Guyonvarc’h A. και Le Brihi A. (2012). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants*, London, U.K.
- Jay J.M. (2000). *Modern Food Microbiology*, 6th Edition, Aspen Publishers, Maryland, USA, 595-606.
- Juan C., Zinedine A., Idrissi L. και Mañes J. (2008). Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. *Int J Food Microbiol*, 126, 83–85.
- Kabak B., Dobson A.D.W. και Var I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Food Science Nutrition*, 46(8), 593–619.
- Karaca H. και Velioglu Y.S. (2007). Ozone applications in fruit and vegetable processing. *Food Rev. Int.*, 23, 91–106.
- Khadre M.A., Yuosef A.E. και Kim J. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, 6, 1242–1252.
- Kim J.G., Yousef A.E. και Dave S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection* 62, 1071–1087.
- Kogelschatz U. (1988). Advanced ozone generation, in Stucki, S. (ed) *Process Technologies for Water Treatment*, New York, NY: Plenum Publishers, pp. 87–120.

- Kurtzman C.P.B., Horn B.W. και Hesseltine C.W., Van Leeuwenhoek A.J. (1987). *Microbiol.*, 53, 147.
- Lancaster M.C., Jenkins F.P. και Philip J.M. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, 192, 1095-1096.
- Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Luber G. και Kieszak S. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113, 1763–7.
- Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Luber G., Kieszak S., Nyamongo J., Backer L., Dahiye A.M., Misore A., DeCock K., Rubin C., Nyikal J., Njuguna C., Langat A., Kilei I.K., Tetteh C., Likimani S., Oduor J., Nzioki D., Kamau B.W., Onsongo J., Slutsker L., Mutura C., Mensah P., Kessel F., Park D.L., Trujillo S., Funk A., Geiseker K.E., Azziz-Baumgartner E., Gupta N. (2005). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ. Health Perspect.*, 113, 1763–1767.
- Liew C.L. και Prange R.K. (1994). Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 119, 563- 567.
- Lombaert G.A., Pellaers P., Roscoe V., Mankotia M., Neil R., Scott P.M. (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit Contam.*, 20, 494–504.
- Long T. (1997). Fate of patulin in fermentation products, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (UK). Research and Development Report, No. 599.
- Maeba H., Takamoto Y., Kamimura M. και Miura T. (1988). Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *J Food Sci* 53, 667–668.
- Mahapatra A.K., Muthukumarappan K. και Julson J.L. (2005). Applications of ozone bacteriocins and irradiation in food processing: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 447–461.
- Magan N., Medina A. και Aldred D. (2011). Possible climate- change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and post harvest. *Plant Pathology*, 60, 150-163.

- Magan N. και Olsen M. (2000). *Mycotoxins in food*. Wood Head Publishing in Food Science and Technology, CRC Press, Boca Raton Boston New York Washington, D.C.
- Mahfoud R., Maresca M., Garmy N. και Fantini J. (2002). The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*, 181, 209–218.
- Manley T.C. και Niegowski S.J. (1967). Ozone, in *Encyclopedia of Chemical Technology*. 2 edn, New York, NY: John Wiley & Sons, pp. 410–32.
- Mann G.E., Codifer L.P., Gardner H.K., Jr. Koltun S.P. και Dollear F.P. (1970). Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 47, 173–176
- Mann R. και Rehm H.J. (1976). Degradation products from aflatoxin B1 by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambigus*. *European Journal of Applied Microbiology*, 2, 297–306.
- Maresca M., Mahfoud R., Garmy N. και Fantini J. (2002). The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J Nutr*, 132, 2723–2731.
- Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G. και Sanchis V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
- Maroto A., Boque R., Riu J., Ruisanchez It. και Odena M. (2005). Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests. *Analytical Bioanalysis Chemistry*, 382, p.1562-1566.
- Martins M.L. και Martins H.M. (2001). Determination of deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal. *J Food Prot*, 64, 1848–1850.
- Massey T.E., Stewart R.K., Daniels J.M. και Ling L. (1995). Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proceed. Sot. Exp. Biol. Med.*, 208, 213-227.
- Matossian M.K. (1989). *Poisons of the Past: Moulds, epidemics and history*. New Haven, Yale University Press.

- McKenzie K.S., Kubena L.F., Denvir A.J., Rogers T.D., Hitchens G.D., Bailey R.H. et al. (1998). Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. *Poult Sci*, 77, 1094–1102.
- McKenzie K.S., Sarr A.B., Maymura K., Bailey R.H., Miller D.R., Rogers T.D., Norred W.P., Voss K.A., Plattner R.D., Kubena L.F. και Phillips T.D. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 35, 807–820.
- McKinley E.R. και Carlton W.W. (1991). In: Sharma R.P. και Salunkhe D.K., *Mycotoxins and Phytoalexins, Patulin*, CRC Press, Atlanta.
- Miller J.D. (1998). Global significance of mycotoxins. In Miraglia M., Van Egmond H., Brera C. και Gilbert J. *Mycotoxins and Phycotoxins: Developments in chemistry, toxicology and food safety*, Alaken Inc., Fort Collins, Colorado, 3–15.
- Moss M.O. (2002). Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Int Biodete Biodegr*, 50, 137-142.
- Neagu D., Perrino S., Micheli L., Palleschi G. και Moscone D. (2009). Aflatoxin M1 determination and stability study in milk samples using a screenprinted 96-well electrochemical microplate. *Int Dairy J*, 19, 753-758.
- O'Donnell C., Tiwari B.K., Cullen P.J. and Rice G.R. (2012). Status and Trends of Ozone in Food Processing. Unit 1. Ozone in Food Processing.
- Ölmez H. και Akbas M.Y. (2009). Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce. *J. Food Eng.*, 90 (4), 487–494.
- Oruc H.H., Cibik R., Yilmaz E. και Kalkanli O. (2006). Distribution and stability of Aflatoxin M1 during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Addit Contam*, 23(2), 190-195.
- Otsuki T. και Sewadeh W. J. M. (2001). What price precaution? European harmonisation of aflatoxin regulations and African groundnut exports. *Eur. Rev. Agric. Econ.*, 28, 263–283.
- Pacheco T.I. (2011). Aflatoxins-Detection, measurement and control. E-book, Intech, Open Access Publisher.

- Pala M. (2001). Ozone and ozone treatment in the fruit juice industry. *Gida Teknolojisi*, 5, 59–65.
- Palmgren M.S. και Hayes A.W. (1987). Aflatoxins in foods. In *Mycotoxins in Food*, ed. P. Krogh. Academic Press, London, pp. 6596.
- Paranagama P.A., Abeysekera K.H.T., Abeywickrama K.P. και Nugaliyadde L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citrates* (DC) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* link isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 86–90.
- Park D.L. (2002). Effect of processing on aflatoxin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 504, 173–179.
- Paster N., Menasherov M., Ravid U. και Juven B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, 58, 81–85.
- Peraica M και Domijan A.M. (2001). Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 52, 23–35.
- Pereira A.D.M., Faroni L.R.D., Jr. Silva A.G.D.S., Sousa A.H.D. και Paes J.L. (2008a). Economical viability of ozone use as fumigant of stored corn grains. *Engenharia Na Agricultura*, 16 (2), 144–154.
- Pereira A.D.M., Faroni L.R.D.A., De Sousa A.H., Urruchi W.I. και Paes J.L. (2008b). Influence of the grain temperature on the ozone toxicity to *Tribolium castaneum*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 12 (5), 493–497.
- Pestka J.J. και Amuzie C.J. (2008). Tissue distribution and proinflammatory cytokine gene expression following acute oral exposure to deoxynivalenol: comparison of weanling and adult mice. *Food Chem Toxicol*, 46, 2826–2831.
- Pestka J.J. και Bondy G.S. (1994). Mycotoxin-induced immune modulation. In Dean J.H., Luster M.I., Munson A.E. και Kimber I. *Immunotoxicity and Immunopharmacology*. Raven Press. 2nd Edition, New York, 163–182.
- Phillips T.D., Afriyie-gyawu E., Williams J., Huebner H., Ankrah N.A., Ofori-adjei D., Jolly P., Johnson N., Taylor J., Marroquincardona A., Xu L., Tang L. και Wang J.S. (2008). Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. *Food Additives Contamination*, 25(2), 134–145.

- Picó Y. και Barceló D. (2008). The expanding role of LC–MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *Trends Anal. Chem.*, 27, 821.
- Pimentel M.A.G., Faroni L.R.D., Guedes R.N.C., Sousa A.H. και Totola M.R. (2009). Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 45(1), 71–74.
- Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M. και Piva G. (2009a). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol.* 47(5), 984-991.
- Proctor A.D., Ahmedna M., Kumar J.V. και Goktepe I. (2004). Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants*, 21, 786–793.
- Raila A., Lugauskas A., Steponavicius D., Railien M., Steponavicien A. και Zvicevicius E. (2006). Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. *Ann Agric Environ. Med.*, 13, 287–294.
- Raper B.K. και Fennell I.D. (1965). *The genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore USA.
- Rayner E.T., Dwarakanath C.T., Mann G.E. και Dollear F.G. (1971). Aflatoxin reduction. US Patent 3592641.
- Reddy S.V. και Waliyar F. (2011). Properties of aflatoxin and it producing fungi. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Reháček Z. και Sajdl P. (1990). *Ergot Alkaloids*. Elsevier Science, New York.
- Restaino L., Frampton E., Hemphill J. και Palnikar P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food related micro-organisms. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3471–3475.
- Rheeder J.P., Marasas W.F.O. και Vismer H.F. (2002). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2101.
- Rice R.G. (1986). Application of ozone in water and wastewater treatment, in Rice R.G., Bollyky L.J. και Lacy W.J. (eds) *Analytical Aspects of Ozone Treatment of Water and Wastewater*. Chelsea, MI: Lewis Publishers, pp. 7–26.



- Rice R.G. και Bollyky L.J. (1981). Fundamental aspects of ozone technology, in Rice R.G. (ed) *Ozone Treatment of Water for Cooling Applications*. Vienna, VA: The International Ozone Association, pp. 1–19.
- Robens J.F. και Richard J.L. (1992). Aflatoxins in animal and human health. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 127, 69–94.
- Rustom I.Y.S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59, 57–67.
- Sanchis V. και Magan N. (2004). Environmental profiles for growth and mycotoxin production. In: Magan N, Olsen M., eds. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, 174–89.
- Sandoskumar R., Karthikeyan M., Mathiyazhagan S., Mohankumar M., Chandrasekar G. και Velazhahan R. (2007). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B1 by the medicinal plant zimmu (*Allium sativum* L. – *Allium cepa* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1007–1014.
- Sapkota D., Islam R. και Mehdi A.K. (2005). Efficacy of *Andrographis paniculata* in ameliorating aflatoxicosis in broilers. *Indian Veterinary Journal*, 82, 529–532.
- Sargeant K., Sheridan A., O’Kelly J. και Carnagham R.B.A. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 192, 1096-1097.
- SCOOP (2003). Reports on Tasks for Scientific Cooperation – Report of Experts Participating in Task 3.2.10 – Collection of Occurrence Data of Fusarium Toxins in Food and Assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member States.
- Semple R.L., Frio A.S., Hicks P.A. και Lozare J.V. (1989). Mycotoxin prevention and control in foodgrains. WHO/FAO.
- Shank R.C., Bourgeois C.H., Keshamras N. και Chandavimol P. (1971). Aflatoxins in Autopsy Specimens from Thai Children with an Acute Disease of Unknown Aetiology. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 9, 501-507.
- Shantha T. (1999). Fungal degradation of aflatoxin B1. *Natural Toxins*, 7, 175–178.

- Sheibani A. και Ghaziaskar S.H. (2008). Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B1 and B2 from pistachio. *Food Control*, 20 p. 124-128.
- Smith J.E. (2001). *Mycotoxins*. Woodhead Publishing Ltd, University of Strathclyde, Glasgow, Chapter 11.
- Smith J.E. και Henderson R.S. (1991). *Mycotoxins and animal foods*. CRC Press, Boca Raton.
- Smith J.E., Lewis C.W., Anderson J.G. και Solomons G.L. (1994). *Mycotoxins in human nutrition and health*. Directorate-General XII Science, Research and Development, EUR 16048 EN.
- Smith J.E. και Moss M.O. (1985). *Mycotoxins: Formation, analysis and significance*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- Smith J.E., Solomons G., Lewis C. και Anderson J.G. (1995). The role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. *Nat. Toxins*, 187–192.
- Sreenivasamurthy V., Parpia H.A.B., Srikanta S. και Shankar Murti A. (1967). Detoxification of aflatoxin in peanut meal by hydrogen peroxide. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.*, 50, 350–354.
- Stinson E.E., Osman S.F., Huhtanen C.N. και Bills D.D. (1978). *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 620.
- Sumit R., Ji Eun K. και Roger Coulombe J. (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res Vet Sci*, 89, 325–331.
- Surai P., Meres M., Fotina T.I. και Denev S.D. (2010). *Mycotoxins in human diet: A hidden danger*. Springer Science and Business Media, Ch. 18
- Sweeney J.M. και Dobson D.W.A. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species: a Review. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 141-158.
- Sydenham E.W., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Shephard G.S., Van Schalkwyk D.J., Koch K.R. (1990). Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Southern Africa*, 38, 1900–1903.
- Teniola O.D., Addo P.A., Brost I.M., Farber P., Jany K.D., Alberts J.F. et al. (2005). Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus*

- erythropolis and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov DSM44556(T)..  
International Journal of Food Microbiology, 105, 111–117.
- Tiwari B.K., Brennan C.S., Curran T., Gallagher E., Cullen P.J. και O’Donnell C.P. (2010). Application of ozone in grain processing. *Journal of Cereal Science*, 51, 248-255.
  - Tiwari B.K. και Rice G.R. (2012). Regulatory and Legislative Issues. Unit 2, Ozone in Food Processing.
  - Tzortzakis N. Singleton I. και Barnes J. (2008). Impact of low-level atmospheric ozone enrichment on black spot and anthracnose rot of tomato fruit. *Post harvest Biol. Technol.*, 47, 1- 9.
  - USDA FSIS (2001). Letter from Robert C. Post (FSIS, Washington, DC) to Mark D. Dopp (Am. Meat Institute, Arlington, VA) dated Dec. 21.
  - Van der zijden A.S.M., Blanche Koelensmid W.A.A., Boldingh J., Barrett J.C.B., Ord W.O. και Philp J. (1962). *Aspergillus flavus* and Turkey X disease: isolation in crystalline form of a toxin responsible for Turkey X disease. *Nature*, 195, 1060.
  - Velazhahan R., Vijayanandraj S., Vijayasamundeeswari A., Paranidharan V., Samiyappan R., Iwamoto T., Friebe B. και Muthukrishnan S. (2010). Detoxification of aflatoxins by seed extracts of the medicinal plant, *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill – Structural analysis and biological toxicity of degradation product of aflatoxin G1. *Food Control*, 21, 719-725.
  - Wagacha J.M., Muthomi J.W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 1–12.
  - WHO (World Health Organization) (2007). Food safety and foodborne illness fact sheet. No. 237. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>.
  - Wild C.P., Daudt A.W. και Castegnaro M. (1998). The molecular epidemiology of mycotoxin-related diseases. in Miraglia M., Van Egmond H.P., Brera C. και Gilbert J. *Mycotoxins and Phycotoxins: Developments in chemistry, toxicology and food safety*. Alaken Inc., Fort Collins, Colorado, 213– 232.

- Wogan G.N. και Newberne P.M. (1967). Dose response characteristics of aflatoxins B1 carcinogenesis in rats. *Cancer Res.*, 27, 2370–2376.
- Wolf-Hall C.E., Hanna M.A. και Bullerman L.B. (1999). Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods. *J. Food Prot.*, 62, 962–964.
- Wu J.N., Doan H. και Cuenca M.A. (2006). Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81 (7), 1288–1293.
- Xu A. (1999). Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, 53, 58–62.
- Yeh F.S., Yu M.C., Mo C.C., Luo S., Tong M.J. και Henderson B. (1989). Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in Southern Guannxi, China. *Cancer Res.*, 49, 2506–2509.
- Yin M.C. και Cheng W.S. (1998). Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *Journal of Food Protection*, 61, 123–125.
- Young J.C. (1986). Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated corn by chemical and physical treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34 (3), 465–467.
- Yu J., Payne A.G., Campbell C.B., Guo B., Cleveland E.T., Robens F.J., Keller P.N., Bennett W.J. και Nierman C.W. (2008). Mycotoxin production and prevention of aflatoxin contamination in food and feed. Ch. 27, p. 457–472, Goldman H.G. και Osmani A.S. *The Aspergilli*. *Mycology*, 26, CRC Press.
- Zhang L., Lu Z., Yu Z. και Gao X. (2005). Preservation of fresh-cut-celery by treatment of ozonated water. *Food Control*, 16, 279–283.
- Zotti M., Porro R., Vizzini A. και Mariotti M.G. (2008). Inactivation of *Aspergillus* spp. by Ozone Treatment. *Ozone: Science and Engineering*, 30, 423–430.
- Zuber M.S. και Lillehoj E.B. (1993). Aflatoxin contamination in maize and its biocontrol. In K. G. Mukerji & K. L. Garg (Eds.). *Biocontrol of plant diseases* (Vol. II, pp. 86–102). New Delhi: CBS Publishers.

### **Ελληνική Βιβλιογραφία:**

- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα».
- Μαρκάκη Π., Βαλαβανίδης Α. και Ευσταθίου Κ. (2007). Η χημική ένωση του μύκητα: AFs. Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

### **Πίνακας 2.1.4.**

- Πετρωτός Κ. (2010). Ανάπτυξη ταχείας μεθόδου ανάλυσης επικίνδυνων μυκοτοξινών σε ξηρούς καρπούς. ΓΕΩΝΑΤΣ Ε.Π.Ε., Λάρισα.

### **Χάρτης 2.2**

- <http://petindustrynews.blogspot.gr/2012/05/biomin-releases-report-on-mycotoxins-in.html>

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



**TRILOGY**  
**Analytical Laboratory**

## Certificate of Analysis

<u>Catalog Number:</u>	TS-I08 (P86)
<u>Lot Number:</u>	111005-285
<u>Toxin:</u>	Aflatoxin B1, B2, G1, G2
<u>Quantity:</u>	10.0 ml
<u>Concentration or Concentration after reconstitution:</u>	2.0 ug/ml Aflatoxin B1 2.0 ug/ml Aflatoxin G1 0.5 ug/ml Aflatoxin B2 0.5 ug/ml Aflatoxin G2
<u>Reconstitution if applicable:</u>	To reconstitute use a volumetric pipette to accurately pipette 10.0 ml of Acetonitrile into each standard vial. Cap tightly and vortex (mix) for at least 30 seconds.
<u>Solvent:</u>	Acetonitrile
<u>Storage:</u>	8°C or lower
<u>Date of Manufacturing:</u>	October 5, 2011
<u>Date of Expiration:</u>	12 months before reconstitution from certificate date (see below) and 6 months after reconstitution
<u>Purity:</u>	≥ 98%
<u>Traceability:</u>	All components used in production of this standard can be tracked back to their source for each batch produced, allowing full product traceability.
<u>Testing Method:</u>	HPLC
<u>Testing Equipment Conditions:</u>	Column: Perkin Elmer, Spheri-5 RP-18, 5 um, 100X4,6mm Guard Column: Perkin Elmer, NewGuard, RP-18, 7 um, 15X3.2mm  Mobile Phase: Water/Methanol/Acetonitrile (2500/550/550). Add 1.2g of Potassium Bromide and 360µl of nitric acid  Flow Rate: 2ml/min  Fluorescence Detector: Emission = 440nm, Excitation = 360nm  Post Column Derivatization: Kobra Cell:
<u>Standard Uncertainty (µg/ml):</u>	Aflatoxin B1: ± 0.05                      Aflatoxin B2: ± 0.01 Aflatoxin G1: ± 0.05                      Aflatoxin G2: ± 0.01
<u>Product Specification:</u>	Aflatoxin B1, G1: (1.9µg/ml-2.1µg/ml) Aflatoxin B2, G2: (0.45µg/ml-0.55µg/ml)
<u>Results (µg/ml):</u>	Aflatoxin B1: 1.91 µg/ml                      Aflatoxin B2: 0.48 µg/ml Aflatoxin G1: 1.99 µg/ml                      Aflatoxin G2: 0.52 µg/ml

This is to certify that Aflatoxin standard Lot number 111005-285 passes the required specifications and is released for sale.

Carrie Maune - Quality Manager  
October 12, 2011

Trilogy Analytical Laboratory, Inc,  
870 Vossbrink Drive Washington, MO 63090  
Phone: 636-239-1521 Fax: 636-239-153

[www.trilogylab.com](http://www.trilogylab.com)