



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ1 ΣΤΟ ΓΑΛΑ



Αργύρη Μυρτώ (16007)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μπατρίνου Ανθιμιά

ΑΘΗΝΑ 2022

Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή

Αθήνα, 2021

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ανθμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

2. Μέλος Επιτροπής

Δήμητρα Χούχουλα

Χημικός MSc, PhD, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

3. Μέλος Επιτροπής

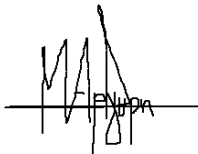
Διονύσιος Αντωνόπουλος

Καθηγητής ΕΔΙΠ, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Δηλώνω υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί Πνευματικής Ιδιοκτησίας, ότι είμαι η αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας πτυχιακής εργασίας, η οποία δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής, ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές (κάθε είδους, μορφής και προέλευσης) που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί διαχρονικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Αργύρη Μυρτώ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Αργύρη Μυρτώ', written over a horizontal line.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες που παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων και αν δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα προσβάλλουν τις ζωοτροφές και στη συνέχεια τα ζώα. Η αφλατοξίνη M1 είναι ένα από τα προϊόντα μεταβολισμού της αφλατοξίνης B1 και σχηματίζεται στο ήπαρ των ζώων που έχουν τραφεί με ζωοτροφές μολυσμένες με αφλατοξίνες, με αποτέλεσμα να περνάει στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθιστώντας τα ακατάλληλα για κατανάλωση. Αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη βιομηχανία τροφίμων λόγω των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλεί στην υγεία ανθρώπων και ζώων, με κυριότερες τις ηπατικές αλλοιώσεις και την καρκινογένεση. Οι αφλατοξίνες κατηγορούνται συχνά για πρόκληση υγειονομικών κρίσεων και είναι από τις κυριότερες αιτίες ανάκλησης τροφίμων από την αγορά. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία γίνεται μια γενική βιβλιογραφική αναφορά στις μυκοτοξίνες, τις αφλατοξίνες και τις επιπτώσεις αυτών στην υγεία, και ειδικότερα στην αφλατοξίνη M1 και το πώς επιδρά στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ αναλύονται και τρόποι ανίχνευσης και προσδιορισμού της ουσίας. Επίσης περιγράφεται το νομοθετικό πλαίσιο που έχει καθοριστεί για τις συγκεκριμένες τοξίνες. Τέλος πραγματοποιείται μια σύντομη στατιστική ανάλυση σε δείγματα γάλακτος από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας τα έτη 2017,2018 σχετικά με την περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνη M1.

Λέξεις-κλειδιά: Μυκοτοξίνες, Αφλατοξίνη M1, Αφλατοξίνη B1, Γάλα, Μόλυνση,

ABSTRACT

Aflatoxins are mycotoxins that are produced by certain species of fungi and if not treated in time they infect feed and then animals. Aflatoxin M1 is one of the metabolic products of aflatoxin B1 and is formed in the liver of animals fed with aflatoxin contaminated feed, as a result of which it passed into milk and dairy products, making them inappropriate for consumption. It poses a serious risk to the food industry due to its adverse effects on human and animal health, mainly liver lesions and carcinogenesis. Aflatoxins are often blamed for causing health crises and are one of the main causes of food recall. In this dissertation , a general bibliographic reference is made to mycotoxins, aflatoxins and their effects on health, and in particular to aflatoxin M1 and how it affects milk and dairy products, while ways of detection and determination of the substance are analyzed. It also describes the legislative framework that has been set for these toxins. Finally, a brief statistical analysis is performed on milk samples from different regions of Greece in the years 2017, 2018 regarding their aflatoxin M1 content.

Keywords: Mycotoxins, Aflatoxin M1, Aflatoxin B1, Milk, Contamination

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ, ΣΤΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	9
1.1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	9
1.1.1 Μυκοτοξίνες και τρόφιμα.....	10
1.2 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ	10
1.2.1 Προέλευση Αφλατοξινών.....	11
1.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά αφλατοξινών	12
1.2.3 Συνθήκες παραγωγής αφλατοξινών – Ανάπτυξη σε προϊόντα.....	13
1.2.4 Αρνητικές επιπτώσεις κατανάλωσης AFs στα ζώα.....	15
1.2.5 Επιπτώσεις AFs στην ανθρώπινη υγεία.....	15
1.3 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1 (AFB1)	17
1.3.1 Βιομετατροπή AFB1 σε AFM1	18
1.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ1 (AFM1)	21
1.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ύπαρξη AFM1.....	22
1.4.2 Επιπτώσεις της AFM1 στη υγεία του ανθρώπου	23
1.4.3 Επιπτώσεις της AFM1 στην υγεία των ζώων	23
1.4.4 Υπολογισμός έκθεσης σε αφλατοξίνες.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Η ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ1 ΚΑΙ Η ΥΠΑΡΞΗ ΤΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΛΑ ΚΑΙ ΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	25
2.1 ΤΟ ΓΑΛΛΑ ΩΣ ΣΤΟΙΧΕΙΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....	26
2.1.1 Ορισμός γάλακτος	26
2.1.2 Τύποι κατανάλωσης γάλακτος	26
2.2 AFM1 ΚΑΙ ΓΑΛΛΑ	26
2.2.1 Επίδραση της συμπύκνωσης-ξήρανσης του γάλακτος στην AFM1	28
2.2.2 Επίδραση θερμικών επεξεργασιών στα επίπεδα AFM1 μέσα από πειράματα	28
2.2.3 Διαφορετικά είδη γάλακτος και AFM1	30
2.3 ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ Η AFM1 ΣΕ ΑΥΤΑ	31
2.3.1 AFM1 και τυρί.....	31
2.3.2 AFM1 σε ζυμωμένα γάλατα	36
2.3.3 Γιαούρτι.....	36
2.3.4 AFM1 σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΕΛΕΓΧΟΣ , ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΦΜ1	42
3.1 ΠΡΟΛΗΨΗ	42
3.1.1 Αγροτικές πρακτικές για μείωση των επιπέδων αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα.....	42
3.1.2 Βιολογικός έλεγχος για μείωση ΑΦΜ1	45
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1	45
3.2.1 Δειγματοληψία.....	46
3.2.2 Εξαγωγή-Καθαρισμός	46
3.2.2 Ανάλυση –Προσδιορισμός ΑΦΜ1:	48
3.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
3.3.1 Ποσοτικές Αναλυτικές Μέθοδοι	48
3.3.2 Ταχείες Αναλυτικές Μέθοδοι (ανοσοδοκιμές).....	52
3.3.3 Άλλες μέθοδοι	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ, ΚΑΤΑΓΕΓΡΑΜΜΕΝΕΣ ΕΞΑΡΣΕΙΣ, ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ	57
4.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΕΓΡΑΜΜΕΝΕΣ ΕΞΑΡΣΕΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΩΣΗΣ.....	57
4.1.2 Επιδημιολογία.....	59
4.2 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΠΛΑΙΣΙΑ	60
4.2.1 Νομοθετικά όρια που έχουν οριστεί για τις μυκοτοξίνες.....	62
4.2.2 Νομοθετικά όρια για τις αφλατοξίνες Β1 και Μ1	62
4.3 ΣΥΣΤΗΜΑ RASFF ΚΑΙ ΑΝΑΚΛΗΣΕΙΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΤΑ ΕΤΗ 2017,2018 ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥΣ ΣΕ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ1	69
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑΣ ΤΑ ΕΤΗ 2017 ΚΑΙ 2018.	69
5.1.1. Γραφήματα	71
5.2 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	90

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Είδη τους γένους <i>Aspergillus</i> που έχουν την ικανότητα παραγωγής αφλατοξινών.....	12
Πίνακας 2.1: Επίδραση θερμικών επεξεργασιών στο περιεχόμενο της AFM1 σε δείγματα γάλακτος σε παλαιότερες μελέτες.....	29
Πίνακας 2.2: Παράγοντες εμπλουτισμού για τυριά διαφορετικής κατηγορίας σκληρότητας.....	33
Πίνακας 4.1: Γενική κατηγοριοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών με βάση την τοξικότητα τους.....	61
Πίνακας 4.2: Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια για την ύπαρξη AFM1 στο γάλα σε διαφορετικές χώρες.....	63
Πίνακας 4.3: Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια για την AFM1 στα γαλακτοκομικά προϊόντα διαφόρων χωρών.....	64
Πίνακας 4.4: Ειδοποιήσεις από το RASFF σε μολυσμένα γαλακτοκομικά προϊόντα τα έτη 2000-2020.....	67
Πίνακας 5.1: Κατηγοριοποίηση δειγμάτων ανάλογα με το περιεχόμενο τους σε AFM1.....	69
Πίνακας 5.2: Κωδικοποίηση των Περιφερειών που συμμετείχαν στην ανάλυση.....	70
Πίνακας 5.3 : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μελέτης και έκφραση επιμολυσμένων δειγμάτων σε ποσοστό %. Όπου Μ.Ε= Μη Επιμολυσμένο και ΕΠ= Επιμολυσμένο.....	86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ, ΣΤΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

1.1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Μυκοτοξίνες ονομάζονται οι δηλητηριώδεις δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από νηματώδεις μύκητες και προκαλούν τοξική δράση κατά την κατανάλωση από ανθρώπους και ζώα. Τα κυριότερα είδη μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες σε μεγάλο βαθμό είναι το *Fusarium*, το *Aspergillus*, το *Penicillium* (Flores-Flores et al., 2015) αλλά και τα είδη του *Ascomycota* (Alshannaq & Yu, 2017). Στη βιβλιογραφία προτάθηκε ο ορισμός των μυκοτοξινών ως «φυσικά προϊόντα που παράγονται από μύκητες και προκαλούν τοξική απόκριση όταν εισάγονται σε χαμηλή συγκέντρωση σε σπονδυλωτά και άλλα ζώα από φυσική οδό» (Alshannaq & Yu, 2017).

Η έκθεση και μόλυνση του ανθρώπου από μυκοτοξίνες γίνεται απευθείας με την έκθεσή του σε τροφές μολυσμένες με τις τοξίνες, όπως για παράδειγμα μέσω της κατανάλωσης γεωργικών προϊόντων δηλαδή καλαμπόκι, δημητριακά, φρούτα, κ.α., είτε από την κατανάλωση ζωικών προϊόντων όπως αυγά, γάλα, κ.α. που έχουν προέλθει από μολυσμένα με μυκοτοξίνες ζώα μέσω ζωοτροφών. Η ανάπτυξη μυκοτοξινών γίνεται σε όλα τα στάδια της συγκομιδής αλλά και σε περιπτώσεις ακατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης. (Flores-Flores et al., 2015). Οι κύριοι μύκητες που προκαλούν συχνές μολύνσεις στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές με τις τοξίνες τους είναι μέλη των γενών των μυκήτων *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium*. Τα είδη *Aspergillus* και *Penicillium* αναπτύσσονται συχνά σε τροφές και ζωοτροφές υπό συνθήκες αποθήκευσης, ενώ τα είδη *Fusarium* συχνά μολύνουν τις καλλιέργειες όπως το σιτάρι, κριθάρι και καλαμπόκι στο χωράφι και πολλαπλασιάζονται στο φυτό. (Alshannaq & Yu, 2017)

Η αυξημένη έκθεση και πρόσληψη μυκοτοξινών από τον ανθρώπινο οργανισμό, και ιδιαίτερα η χρόνια κατανάλωση, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρών τοξικών επιδράσεων. Κυριότερες από αυτές είναι καρκινογενέσεις, νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, αναπαραγωγικές διαταραχές, ανοσοκαταστολή, δερματικοί ερεθισμοί, ακόμα και τερατογενέσεις (Flores-Flores et al., 2015). Κάποιες

μυκοτοξίνες μπορούν να έχουν επιπλέον αποτελέσματα όπως φυτοτοξικότητα ή αντιμικροβιακή δράση(Alshannaq & Yu, 2017).

Έχουν αναγνωριστεί και ονομαστεί πάνω από 300 μυκοτοξίνες. Όμως μόνο κάποιες από αυτές έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν τρόφιμα και ζωοτροφές. Αυτές είναι οι αφλατοξίνες (AF), οι ωχρατοξίνες (OT), η πατουλίνη, η ζεαραλεόνη (ZEA), τα τριχοθεκένια όπως η δεοξυνιβαλενόλη (DON) και η τοξίνη T-2(Alshannaq & Yu, 2017).

Οι φουμονισίνες και η εργοταμίνη είναι επίσης μυκοτοξίνες επιβλαβείς για την υγεία και την οικονομία. Σύμφωνα με τον FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) το 25% των καλλιεργειών παγκόσμια είναι μολυσμένο με μυκοτοξίνες(Campagnollo et al., 2016).

1.1.1 Μυκοτοξίνες και τρόφιμα

Ο αραβόσιτος είναι η καλλιέργεια που είναι πιο ευαίσθητη στη μόλυνση από μυκοτοξίνες, ενώ το ρύζι είναι το λιγότερο. Οι περισσότερες μυκοτοξίνες είναι χημικά και θερμικά σταθερές κατά την επεξεργασία των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του μαγειρέματος, αλλά και της παστερίωσης(Alshannaq & Yu, 2017).

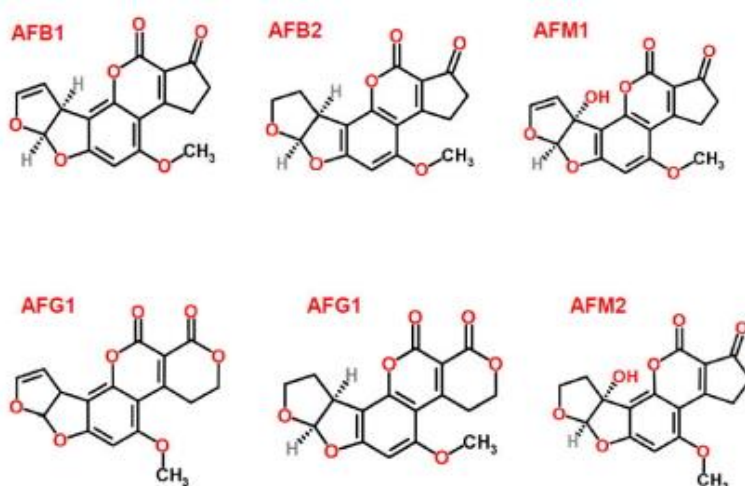
Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την καταπολέμηση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα, είναι ακριβές και προκαλούν μη αποδεκτές αλλαγές που επηρεάζουν τόσο την διατροφή όσο και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους(Campagnollo et al., 2016).

1.2 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

Μεταξύ των μυκοτοξινών, οι αφλατοξίνες (AFs) θεωρούνται οι πιο τοξικές, με σημαντική οικονομική επιβάρυνση για τη γεωργία και γι' αυτό έχουν μελετηθεί περισσότερο από όλες (Alshannaq & Yu, 2017).Υπάρχουν περισσότερες από 20 γνωστές αφλατοξίνες, ωστόσο οι πιο γνωστές που απαντώνται συχνότερα είναι οι: αφλατοξίνη B1 , αφλατοξίνη B2 , αφλατοξίνη G1 και αφλατοξίνη G2(Products & Mohammadi, 2011). Το «B» αναφέρεται στο μπλε (Blue) και το «G» στο πράσινο (Green) χρώμα φθορισμού που εκπέμπουν κατά την έκθεσή τους σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το «M» αναφέρεται στον μεταβολίτη των αφλατοξινών B(Campagnollo et al., 2016). Οι αφλατοξίνες B εκπέμπουν φθορισμό στα 425 nm,

ενώ οι G στα 540 nm υπό την επίδραση UV ακτινοβολίας(Kumar et al., 2017) .Οι αφλατοξίνες M1 και M2 είναι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες των AFB1 και AFB2 αντίστοιχα, μέσω μεταβολικών διεργασιών και εμφανίζονται σε ζώα και ζωικά προϊόντα(Products & Mohammadi, 2011).

Οι αφλατοξίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις στενά συνδεδεμένες (Products & Mohammadi, 2011). Η βιοσυνθετική πορεία τους είναι αρκετά περίπλοκη καθώς αποτελείται από 18 ενζυμικά στάδια και 25 γονίδια για κωδικοποίηση των ενζύμων κάθε σταδίου(Kumar et al., 2017). Είναι παράγωγα διφουρανοκουμαρίνης δηλαδή μια ομάδα διφουρανίου είναι προσαρτημένη στη μια πλευρά του πυρήνα της κουμαρίνης και ένας δακτύλιος πεντανόνης στην άλλη στις AFB1 ,AFB2 , ενώ στις AFG1 ,AFG2 είναι ένας εξαμελής δακτύλιος λακτόνης. Η σειρά τοξικότητας του είναι η εξής: AFTs-B1 > AFTs-G1 > AFTs-B2 > AFTs-G2(Kumar et al., 2017).



Εικόνα 1.1: Η χημική δομή των αφλατοξινών(Alshannaq & Yu, 2017).

1.2.1 Προέλευση Αφλατοξινών

Παράγονται κυρίως από τα γένη *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* και *Aspergillus nomius* , τα οποία αναπτύσσονται σε ζεστά και υγρά κλίματα και έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη είτε ζωική κατανάλωση (Flores-Flores et al., 2015). Το είδος *A.flavus* παράγει αφλατοξίνες B1 και B2 και ο *A.parasiticus* παράγει AFB1,AFB2,AFG1 και AFG2(Alshannaq & Yu, 2017). Αφλατοξίνες μπορεί να παράγονται και από είδη *Aspergillus* όπως η *Emericella* spp.(Kumar et al., 2017). Μελέτες έδειξαν ότι και κάποια στελέχη όπως *A.tamarii* καθώς και το *A.pseudotamarii* μπορούν να παράξουν αφλατοξίνη . Οι

παραπάνω μύκητες ανήκουν στην κατηγορία υφομυκήτων της οικογένειας *Aspergillaceae*. Μολύνουν κατά κύριο λόγο τρόφιμα και γεωργικά προϊόντα, καθώς έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (Products & Mohammadi, 2011). Πιο αναλυτικά τρία sections του γένους *Aspergillus* ,όπως φαίνεται στο Πίνακα 1, είναι ικανά να παράξουν αφλατοξίνες μέσω πολλών υποειδών τους(Campagnollo et al., 2016).

Γένος <i>Aspergillus</i>	
Section	Είδος
Flavi	<i>A.arachidicola</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. novoparasiticus</i> , <i>A.parasiticus</i> , <i>A.parvisclerotigeus</i> , <i>A.pseudocaelatus</i> , <i>A.pseudonomius</i> , <i>A.pseudotamari</i> , <i>A.togoensis</i> , <i>A. Transmontanensis</i> , <i>A. mottae</i> και <i>A. Sergii</i>
Ochraceorosei	<i>A. ocharaceroseseus</i> και <i>A. rambelii</i>
Nidulantes	<i>A.astellatus</i> , <i>A.olivicola</i> , <i>A.venezuelensis</i>

Πίνακας 1.1: Είδη τους γένους *Aspergillus* που έχουν την ικανότητα παραγωγής αφλατοξινών.

1.2.2 Γενικά χαρακτηριστικά αφλατοξινών

Είναι διαλυτές σε διαλύτες όπως χλωροφόρμιο, βενζόλιο και μεθανόλη, έχουν ευρύ φάσμα τοξικότητας και χαμηλό μοριακό βάρος(Campagnollo et al., 2016) και συντίθεται μετά την ενεργό ανάπτυξη του μύκητα(Abrar et al., 2013). Δρουν σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων, είναι ασταθείς στην υπεριώδη ακτινοβολία, πολύ σταθερές σε θερμοκρασία >100°C, ενώ σε θερμικές επεξεργασίες όπως παστερίωση και ψήσιμο δεν αποσυντίθεται σχεδόν καθόλου(Campagnollo et al., 2016).

Είναι λιπόφιλα μόρια και μέσω της ροής του αίματος περνάνε στο ήπαρ όπου και αποθηκεύονται στα ηπατοκύτταρα, εφόσον το περιβάλλον εκεί είναι επίσης λιπόφιλο(Campagnollo et al., 2016).

1.2.3 Συνθήκες παραγωγής αφλατοξινών – Ανάπτυξη σε προϊόντα

Το χαμηλότερο εύρος θερμοκρασιών για την ανάπτυξη του *A.parasiticus* είναι 6-8°C, ενώ το μεγαλύτερο είναι 44-46°C. Το βέλτιστο είναι 25-35°C. Ο *A.flavus* παράγει αφλατοξίνη σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 12-34°C και μπορεί να αναστείλει την παραγωγή τους στους 36°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 28-30°C (Abrar et al., 2013).

Η ανάπτυξη μυκήτων *A.flavus* και η παραγωγή αφλατοξινών σε φυσικά υποστρώματα επηρεάζονται κυρίως από τον τύπο του υποστρώματος, την περιεκτικότητα του υποστρώματος σε υγρασία, καθώς και από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η υγρασία (Ketney et al., 2017) αλλά και από την φυσική ζημιά που έχουν υποστεί οι πυρήνες (Abrar et al., 2013). Ο χρόνος και οι συνθήκες αποθήκευσης αλλά και η παρατεταμένη ξηρασία επίσης επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων στις ζωοτροφές και ευνοούν την σύνθεση αφλατοξινών (Iqbal et al., 2015). Τα ζεστά και υγρά κλίματα είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη των μυκήτων που προκαλούν παραγωγή αφλατοξίνης (Flores-Flores et al., 2015). Το υψηλότερο περιεχόμενο αφλατοξινών σε τρόφιμα παράγεται σε καλλιέργειες που καλλιεργούνται και αποθηκεύονται σε τροπικά κλίματα (Abrar et al., 2013). Αφλατοξίνες βρίσκονται σε οργανικά υλικά αλλά και στα συστατικά τους εδάφους (Alshannaq & Yu, 2017). Καταλαμβάνουν περίπου το 1-6% του συνολικού περιεχομένου των ζωοτροφών και μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο μέσα από ζωικά παράγωγα (Kumar et al., 2017).



Εικόνα 1.2: Προσβεβλημένοι καρποί από αφλατοξίνες.

Παράγοντες που επηρεάζουν την μόλυνση από αφλατοξίνες είναι το κλίμα της εκάστοτε περιοχής, ο γονότυπος της φυτεμένης καλλιέργειας, ο τύπος του εδάφους, η

ημερήσια καθαρή εξάτμιση και η μέγιστες και ελάχιστες θερμοκρασίες κάθε ημέρας(Abrar et al., 2013).Ακόμα η παρουσία οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα, η χρήση φυτοφαρμάκων και μυκητοκτόνων και η ποσότητα σπορίων(Campagnollo et al., 2016). Σημαντικό ρόλο παίζουν το στρες και οι ζημιές στις καλλιέργειες πριν τη συγκομιδή λόγω ξηρασίας, η δραστηριότητα των εντόμων, οι βροχοπτώσεις πριν και μετά τη συγκομιδή και η ανεπαρκής ξήρανση πριν αποθηκευτούν οι καλλιέργειες(Abrar et al., 2013). Το επίπεδο της μόλυνσης είναι σωρευτικό, οπότε η διάρκεια συγκομιδής και οι συνθήκες αποθήκευσης παίζουν επίσης ρόλο στην παραγωγή αφλατοξινών(Campagnollo et al., 2016).

Η μόλυνση γίνεται σε δυο φάσεις. Η πρώτη φάση είναι όταν εμφανίζεται μόλυνση κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Αυτό οφείλεται σε τραυματισμούς των φυτών από άλλους οργανισμούς όπως έντομα, πουλιά ή κρούσεις, είτε οφείλεται σε συνθήκες θερμής ξηρασίας κατά την διάρκεια των οποίων παράγονται τοξικογενείς μύκητες. Η δεύτερη φάση μόλυνσης μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε στιγμή μετά την καλλιέργεια μέχρι την κατανάλωση. Σε αυτή τη φάση παίζουν ρόλο οι συνθήκες στο χωράφι, η υγρασία, και οι συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης(Chiewchan et al., 2015).

Η μόλυνση από αφλατοξίνες σε ζωοτροφές συμβαίνει συχνά στον αραβόσιτο, το κεχρί, επίσης σε τροφές πλούσιες σε φιστίκι , ρύζι / πίτουρο, σόργο, τροφές σόγιας, άχυρο / ενσίρωση, σιτάρι / πίτουρο(Min et al., 2021). Αφλατοξίνες απαντώνται και σε δημητριακά , μπαχαρικά, ξηρούς καρπούς, αποξηραμένα φρούτα και ελαιούχους σπόρους σε διάφορα στάδια της συγκομιδής, της μεταφοράς, της επεξεργασίας και της αποθήκευσης. Καρποί καλαμποκιού, καρύδα, ξηρό κοκοκάρυδο, ξηροί καρποί Βραζιλίας είναι επίσης πολύ ευαίσθητοι στην μόλυνση από αφλατοξίνη(Kumar et al., 2017).



Εικόνα 1.3: Ανάπτυξη μούχλας σε καρπούς

1.2.4 Αρνητικές επιπτώσεις κατανάλωσης AFs στα ζώα

Η τοξικότητα των αφλατοξινών είναι ανάλογη με το φύλλο, την ηλικία και την διατροφική κατάσταση των μολυσμένων από AFs ζώων. Η οξεία αφλατοξίκωση διακρίνεται από συμπτώματα όπως βαθύ ύπνο, οίδημα, αιμορραγία και κίρρωση του ήπατος, ενώ η χρόνια προκαλεί ανοσοκαταστολή, καρκίνο και επιβράδυνση της ανάπτυξης (Kumar et al., 2017), ίκτερο, μειωμένη γαλακτοπαραγωγικότητα, μειωμένη όρεξη και μειώνει την ανοσία των εμβολίων (Iqbal et al., 2015). Λιπώδες διογκωμένο συκώτι, τραχύτητα και χλωμό χρώμα στο τρίχωμα καθώς και έλλειψη όρεξης είναι μερικά ακόμα από τα συμπτώματα της αφλατοξίκωσης στα θηλαστικά.

1.2.5 Επιπτώσεις AFs στην ανθρώπινη υγεία

Οι αφλατοξίνες έχουν αναγνωριστεί ως κάποιες από τις πιο επικίνδυνες μυκοτοξίνες που επηρεάζουν δυσμενώς την υγεία τόσο των ζώων όσο και των ανθρώπων. Ακόμα και χαμηλά επίπεδα αφλατοξινών στη διατροφή θα μπορούσαν να προκαλέσουν κίνδυνο στην ανθρώπινη υγεία (Min et al., 2021). Οι καταναλωτές εκτίθενται άμεσα στις αφλατοξίνες, μόλις καταναλώσουν τρόφιμα μολυσμένα με αυτές, ή έμμεσα αν καταναλώσουν προϊόντα που έχουν ζωική προέλευση, από ζώα που έχουν μολυνθεί με τις τοξίνες (Ketney et al., 2017). Η απορρόφηση από το δέρμα είναι αμελητέα. Οι αφλατοξίνες προκαλούν οξεία ή χρόνια ηπατική νόσο και μπορεί να είναι τερατογόνες και καρκινογόνες. (Flores-Flores et al., 2015). Η μόλυνση στοχεύει ειδικά στο ήπαρ και πρώιμα συμπτώματα είναι ο πυρετός, εμετοί, ανορεξία και κοιλιακό άλγος που οδηγούν σε ηπατίτιδα και ηπατοτοξικότητα. Επίσης η τοξικότητα προκαλεί ανοσοκαταστολή και φλεγμονές στα λεμφοκύτταρα του σπλήνα. Στα παιδιά προκαλούν επίσης καταστολή του ανοσοποιητικού και κίνδυνο για λοιμώξεις. Η

καρκινογένεση του ήπατος από αφλατοξίνες οφείλεται σε υπεροξειδωση των λιπιδίων και άρα οξειδωτική βλάβη στο DNA(Kumar et al., 2017). Η οξεία αφλατοξίκωση μπορεί να προκαλέσει από έμετο, κοιλιακό άλγος, πνευμονικό και εγκεφαλικό οίδημα, κόμα, σπασμούς, μέχρι και θάνατο(Alshannaq & Yu, 2017). Τα παιδιά είναι πιο ευαίσθητα στη οξεία ηπατοτοξικότητα που προκύπτει από έκθεση στις αφλατοξίνες απ'ότι οι ενήλικες λόγω του χαμηλότερου σωματικού βάρους, της ατελούς ανάπτυξης των ιστών και οργάνων τους και του ανώριμου μεταβολισμού(Ishikawa et al., 2016).

Σχεδόν 4,5 δισεκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως διατρέχουν κίνδυνο υπερβολικής έκθεσης σε αφλατοξίνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 4,6% έως 28,2% των συνολικών περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.(Min et al., 2021)

Δεν είναι πλήρως κατανοητό πως επηρεάζει το αναπαραγωγικό σύστημα αλλά φαίνεται ότι η επίδραση τοξικών παραγόντων, όπως οι μυκοτοξίνες, επιδρά στην γυναικεία υπογονιμότητα σε ποσοστό 25%. Ακόμη σε έρευνες βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις αφλατοξινών σε υπογόνιμο σπέρμα ανδρών ήταν σταθερά υψηλότερες σχετικά με το γόνιμο σπέρμα ανδρών. Οι αφλατοξίνες προκαλούν στο σπέρμα ανωμαλίες στην κινητικότητα, την μορφολογία ακόμα και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων(Abrar et al., 2013).

Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) ταξινομεί σε 4 ομάδες τις ουσίες που ευθύνονται για καρκινογένεση στον άνθρωπο (IARC, 2006). Οι κατηγορίες καρκινογόνων διακρίνονται ως εξής(Abrar et al., 2013):

Ομάδα 1 :Ο παράγοντας είναι καρκινογόνος για τον άνθρωπο

Ομάδα 2Α :Ο παράγοντας είναι πιθανώς καρκινογόνος για τον άνθρωπο και

Ομάδα 2Β :Ο παράγοντας θα μπορούσε να είναι καρκινογόνος για τον άνθρωπο,

Ομάδα 3 :Ο παράγοντας δεν ταξινομείται ως προς την καρκινογένεια του για τον άνθρωπο

Ομάδα 4 :Ο παράγοντας πιθανώς δεν είναι καρκινογόνος για τον άνθρωπο.

1.3 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ B1 (AFB1)

Μεταξύ των αφλατοξινών B1, B2, G1, G2 , η AFB1 βρίσκεται συχνότερα στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Flores-Flores et al., 2015). Αποτελεί ισχυρό καρκινογόνο για το ήπαρ και έχει ταξινομηθεί ως επιβεβαιωμένος παράγοντας πρόκλησης ανθρώπινων ηπατικών καρκινωμάτων (Ομάδα 1), αποδεδειγμένο μέσα από επιδημιολογικές ενδείξεις, σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Για Έρευνες στον Καρκίνο (IARC)(Min et al., 2021).

Οι τοξικές επιδράσεις του AFB1 οφείλονται κυρίως στη δέσμευση του βιοενεργοποιημένου AFB1-8,9-εποξειδίου σε κυτταρικά μακρομόρια, κυρίως μιτοχονδριακά και πυρηνικά νουκλεϊκά οξέα και νουκλεοπρωτεΐνες, με αποτέλεσμα γενικές κυτταροτοξικές επιδράσεις(Alshannaq & Yu, 2017).

Την παρουσία της αφλατοξίνης B1 στις ζωοτροφές επηρεάζουν η θερμοκρασία αλλά και η περιεκτικότητα της υγρασίας. Οι μικροοργανισμοί *A.flavus* και *A.parasiticus* έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν ακόμα και σε τροφές με υγρασία από 13%-18% και να παράγουν τοξίνη σε υγρασίες περιβάλλοντος 50%-60% (Products & Mohammadi, 2011). Η AFB1 είναι ανθεκτική σε μεγάλο φάσμα υψηλών θερμοκρασιών μεταξύ αυτών και εκείνες της εμπορικής αποστείρωσης. Η θερμοκρασία αλληλεπιδρά με την ενεργότητα νερού (aw) με αποτέλεσμα να επηρεάζει τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη παραγωγή AFB1 (Kumar et al., 2017).

Η αφλατοξίνη B1 είτε μεταβολίζεται από το σύστημα της μικροσωμικής οξειδάσης μικτής λειτουργίας στο ήπαρ , είτε ακολουθεί άλλες μεταβολικές πορείες ανάλογα με το είδος της(Products & Mohammadi, 2011). Μετά την κατανάλωση AFB1 αυτή διασπάται στο ήπαρ μέσω την ενζυμικής λειτουργίας του κυτοχρώματος P450. Ο μεταβολισμός της AFB1 περιλαμβάνει υδροξείδωση , οξείδωση και απομεθυλίωση. Επίσης παράγεται ένα προϊόν, το AFB1-8,9-εποξείδιο (AFBO) το οποίο είναι καρκινογόνο , μεταλλαξιογόνο και πολύ τοξικό(Campagnollo et al., 2016).

Σε έρευνες αποδείχτηκε ότι μετά την κατάποση μολυσμένων ζωοτροφών από γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες , η AFB1 μεταβολίζεται και βιομετατρέπεται πλήρως σε AFM1 στο ήπαρ και στη συνέχεια απεκκρίνεται στο γάλα(Min et al., 2021). Γύρω στο 0,3-6,2% της AFB1 που καταναλώνεται μετατρέπεται σε AFM1 στο γάλα(Ketney

et al., 2017). Η βιομετατροπή του AFB1 σε AFM1 επηρεάζεται από ορισμένους διατροφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου της τροφής, την ποσότητα κατάποσης και την ταχύτητα πέψης, από ζωικούς παράγοντες όπως η φυλή, η ευεξία, η ικανότητα αποτοξίνωσης του ήπατος, η γαλουχική περίοδος και η απόδοση γάλακτος και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η εποχή, το κλίμα, η γεωγραφική θέση και το επίπεδο ανάπτυξης της κάθε περιοχής (Mollayusefian et al., 2021).

1.3.1 Βιομετατροπή AFB1 σε AFM1

Η μετατροπή της AFB1 σε AFM1 γίνεται με τα παρακάτω βήματα:

1) Υποβάθμιση στο αυλό:

Τα μηρυκαστικά έχουν ένα διαφορετικό και περίπλοκο μικρόβιο στην κοιλιά τους, όπου οι τροφές που καταναλώνονται χωνεύονται και υποβάλλονται σε ζύμωση. Ο ρόλος του αυλού στο μεταβολισμό του AFB1 είναι να εκτελεί μικροβιακή και ενζυμική αποικοδόμηση, μετατρέποντας έτσι το AFB1 στους μεταβολίτες του.

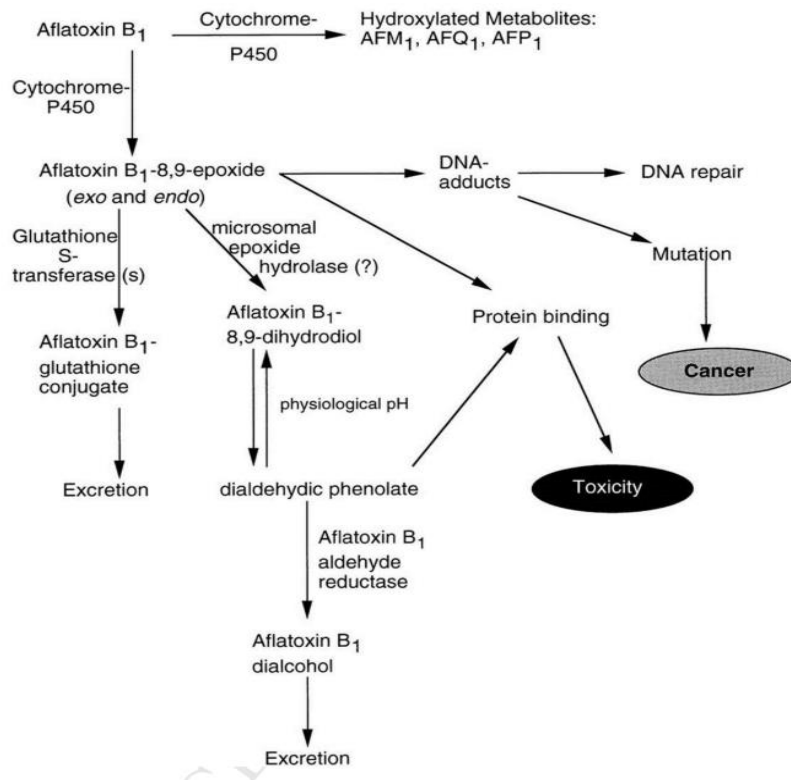
Η ικανότητα των μηρυκαστικών να απενεργοποιούν την αφλατοξίνη B1 είναι περιορισμένη. Σε εργαστηριακό πείραμα (in vitro) σημειώθηκε ότι η ικανότητα αποικοδόμησης της AFB1 είναι μικρότερη από 10% από το υγρό του στομάχου όταν προστέθηκε σε αυτό 1,0mg/ml AFB1. Σε επόμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν σημειώθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά στην ικανότητα αποικοδόμησης της τοξίνης.

Το συμπέρασμα που βγήκε από έρευνες είναι ότι ένα μέρος της AFB1 μετασχηματίζεται μέσω μικροβίων στα μεταβολικά παράγωγά της ενώ η υπόλοιπη απορροφάται στο λεπτό έντερο λόγω του χαμηλού μοριακού της βάρους και στη συνέχεια περνάει στο ήπαρ όπου εκεί μετατρέπεται σε ισχυρές ηπατοτοξίνες και αφλατοξίνη M1, η οποία απεκκρίνεται στο γάλα (Min et al., 2021).

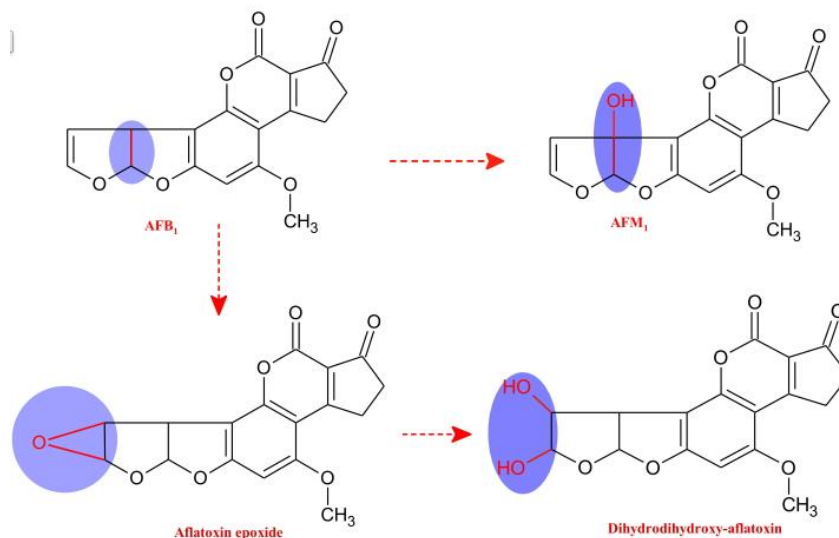
2) Βιομετασχηματισμός AFB1 στο ήπαρ:

Τμήμα της AFB1 μετατρέπεται από μικρόβια της κοιλιάς και σχηματίζεται αφλατοξικόλη, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα φτάνει στο έντερο και απορροφάται από το συκώτι. Εκεί υπόκειται σε μείωση, εποξειδωση, υδροξυλίωση και απομεθυλίωση, και δημιουργούνται διαφορετικά παράγωγα σε κάθε διαδικασία. Ο

βιομετασχηματισμός της τοξίνης AFB1 στο ήπαρ προκαλεί ηπατική τοξικότητα που περιλαμβάνει συμφόρηση, ηπατοκυτταρική νέκρωση, διόγκωση κυττάρων (μεγαλοκυττάρωση). Το κυταρρόπλασμα λεπταίνει και είναι κενώδες και τα κενοτόπια περιέχουν σταγονίδια λίπους. Οι μεταβολίτες που παράγονται τελικά απεκκρίνονται από τα κόπρανα και τα ούρα (Min et al., 2021).



Εικόνα 1.4: Βιομετασχηματισμός της AFB1 στα παράγωγά της.

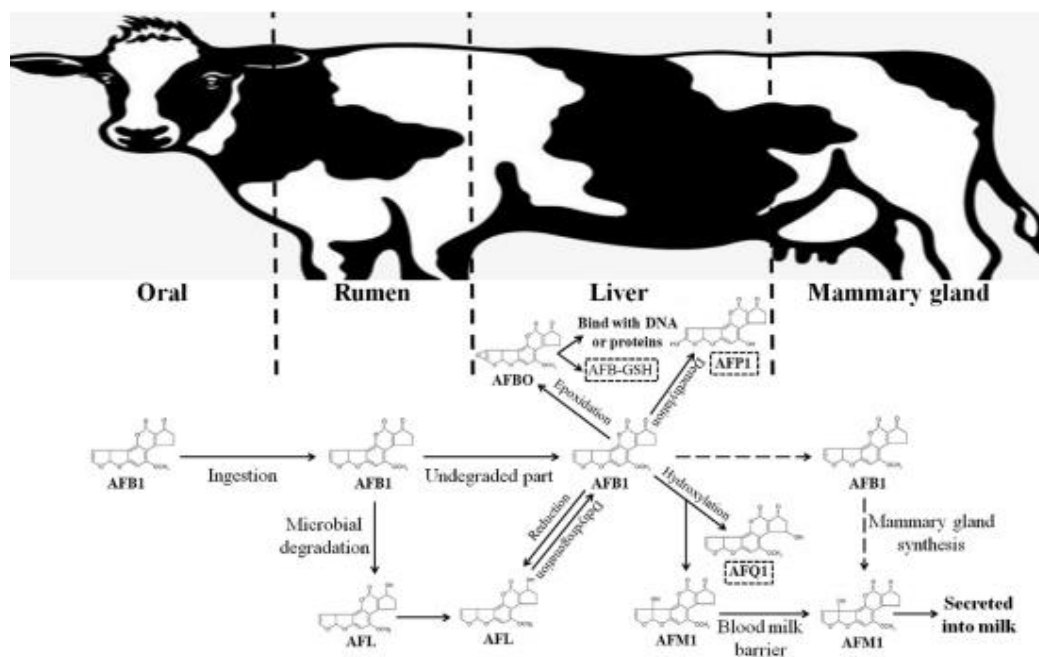


Εικόνα 1.5: Μεταβολισμός AFB1 στο ήπαρ

3) Σχηματισμός AFM1 και έκκριση στον μαστικό ιστό αγελάδων

Η AFB1 είναι ο κύριος υδροξυλιωμένος μεταβολίτης που παράγεται στο ήπαρ μετά από έκθεση σε AFB1. Σχηματίζεται εντός των πρώτων 2- 8 ωρών επώασης της AFB1 στα παθοκύτταρα βοοειδών στο ήπαρ και στη συνέχεια διανέμεται με τη ροή του αίματος στον μαστικό αδένα και από κει εκκρίνεται στο γάλα (Min et al., 2021).

Η λαμβανόμενη AFB1 μετατρέπεται σε AFM1 (ποσοστό 0,3% έως 6,2%) στο ήπαρ θηλαζόντων ζώων μέσω της δράσης του κυτοχρώματος P 450 (Vaz et al., 2020). Ωστόσο, η βιομετατροπή AFB1 σε AFM1 μπορεί επίσης να εμφανιστεί και σε επιθηλιακά κύτταρα θηλαστικών βοοειδών, όπως αποδείχθηκε σε μια *in vitro* μελέτη. Όταν η AFM1 φτάσει στον μαστικό αδένα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μπορεί να απεκκριθεί στο γάλα μέσω παθητικής διάχυσης. Πιο σημαντική όμως είναι η ενεργή μεταφορά, με τη μεσολάβηση της εκροής μεταφορέων της οικογένειας ABC που εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένα. Η πρωτεΐνη (ABCG2) για την αντοχή των κυττάρων στον καρκίνο του μαστού των βοοειδών (BCRP), ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η AFB1 όπως και η AFM1 φαίνεται να αυξάνουν σημαντικά τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης αυτής (ABCG2) ακόμα και όταν υπάρχει σε χαμηλή συγκέντρωση. Ο μεταφορέας BCRP/ABCG2 επηρεάζει θετικά την απόδοση και σύνθεση του γάλακτος διευκολύνοντας τη μεταφορά βασικών συστατικών του γάλακτος από τον αυλό του ζώου στον μαστικό αδένα, αλλά ταυτόχρονα αυξάνει τον κίνδυνο για ανεπιθύμητη μόλυνση του γάλακτος με υπολείμματα φαρμάκων και τοξίνες. Έτσι στο γάλα που παράγεται από αγελάδες υψηλής απόδοσης, αυξάνεται ο κίνδυνος μόλυνσης με AFM1 με αποτέλεσμα ενδεχομένως μια ανεπιθύμητη έκθεση στα βρέφη που τρέφονται με αυτό. Ωστόσο, η μόλυνση του γάλακτος αποτελεί κίνδυνο όχι μόνο ανθρώπινα βρέφη, αλλά και στα θηλάζοντα μοσχάρια. Και τα δύο έχουν ανώριμη ηπατική λειτουργία και συνεπώς περιορισμένη ικανότητα αποτοξίνωσης και απέκκρισης της AFM1. Η ηπατική βλάβη που προκαλείται έχει ως αποτέλεσμα επιπτώσεις στην ανάπτυξη και ωρίμανση των νεαρών μοσχαριών αλλά και στην παραγωγικότητα των ενήλικων ζώων (Min et al., 2021).



Εικόνα 1.6: Οι πορείες μεταβολισμού και βιομετατροπής της AFB1 σε θηλάζουσες γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες (Min et al., 2021).

1.4 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ1 (AFM1)

Η αφλατοξίνη Β1 (AFB1), η οποία μολύνει τις ζωοτροφές με τις οποίες τρέφονται γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες μπορεί να εισάγει την αφλατοξίνη Μ1 (AFM1), τον κύριο τοξικό μεταβολίτη των αφλατοξινών στο γάλα (Min et al., 2021). Είναι το 4-υδρόξυ παράγωγο της αφλατοξίνης AFB1, και σχηματίζεται στο ήπαρ των ζώων. Αποβάλλεται στο γάλα μέσω των μαστικών αδένων όταν καταναλώσουν ζωοτροφές μολυσμένες με AFB1 (Ketney et al., 2017), αλλά και στα ούρα των ζώων (Kumar et al., 2017). Το επίπεδο δραστηριότητας της AFB1 είναι 20 ppb κατά τον σιτισμό αγελάδων γαλακτοπαραγωγής (Ketney et al., 2017).

Περίπου το 0,3-6,2% της AFB1 που υπάρχει στις ζωοτροφές μεταβολίζεται σε AFM1 και το ποσοστό αυτό εξαρτάται από παράγοντες όπως η εποχιακή διακύμανση, η διαδικασία αρμέγματος που ακολουθούν οι κτηνοτρόφοι, οι συνθήκες του περιβάλλοντος και η γενετική των ζώων (Iqbal et al., 2015). Ακόμα, μπορεί να διαφέρει από μέρα σε μέρα, από ζώο σε ζώο αλλά και σε κάθε άρμεγμα. Είναι δυνατό να ανιχνευθεί από 12-24 ώρες μετά την λήψη AFB1, αλλά φτάνει στα υψηλότερα επίπεδα τις επόμενες μέρες. Όταν έχει ολοκληρωθεί η πρόσληψη της AFB1 από τα ζώα, τότε η συγκέντρωση της AFM1 αρχίζει να μειώνεται και μετά το πέρασμα 72 ωρών δεν μπορεί να ανιχνευθεί (Products & Mohammadi, 2011). Μπορεί

επίσης να περάσει στο μητρικό γάλα σε μητέρες που θηλάζουν αν καταναλώνουν τροφή μολυσμένη με AFB1.(Flores-Flores et al., 2015)

1.4.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ύπαρξη AFM1

Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της AFM1 στα γάλα είναι το είδος του ζώου, η γαλουχία, το άρμεγμα, η απόδοση γάλακτος, το επίπεδο μόλυνσης, η πρόσληψη τροφής, η υγεία των ζώων και των μαστών(ύπαρξη ή όχι βακτηριακής μαστίτιδας), η εποχή του έτους και η γεωγραφική θέση(Campagnollo et al., 2016). Το γάλα αγελάδων που τρέφονται με ελεύθερη βοσκή βρέθηκε να έχει χαμηλότερα επίπεδα αφλατοξίνης σε σχέση με το γάλα αγελάδων που τρέφονται με σύνθετες ζωοτροφές αλλά και αποθηκευμένα τρόφιμα όπου εκεί βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα της τοξίνης(Flores-Flores et al., 2015).

Οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής πλέον συνήθως τρέφονται με την μέθοδο του μικτού σιτηρεσίου (TMR), το οποίο περιλαμβάνει την εκάστοτε ζωοτροφή μαζί με συμπλήρωμα συμπυκνωμάτων και υποπροϊόντων (π.χ. σπόρος βαμβακιού), δημητριακών, συμπληρωμάτων πρωτεΐνης, βιταμινών και ανόργανων αλάτων τα οποία αναμιγνύονται και αποτελούν μια ισορροπημένη διαίτα. Σκοπός είναι η υψηλότερη απόδοση σε γάλα. Τα συμπυκνώματα όμως καθώς και τροφές από σόγια, ελαιούχοι σπόροι και άλλοι κόκκοι δημητριακών, μπορεί να αποτελέσουν πηγή ανάπτυξης μυκοτοξινών. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα τα οποία καταλάωναν τροφή TMR βρέθηκε ότι μεγάλο ποσοστό των δειγμάτων βρέθηκαν θετικά στην ανίχνευση αφλατοξίνης M1. Γι αυτό θα πρέπει τα συστατικά που παρέχονται στις αγελάδες μέσω της μεθόδου TMR να ελέγχονται ξεχωριστά για την περιεκτικότητά τους σε αφλατοξίνες(Rodríguez-Blanco et al., 2020).

Μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας μελέτησε την εποχιακή επιρροή στα επίπεδα αφλατοξίνης M1 στο γάλα. Γενικά παρατηρήθηκε ότι τον χειμώνα τα δείγματα περιείχαν υψηλότερα ποσοστά AFM1 σχετικά με το καλοκαίρι. Τον χειμώνα δεν υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα για φρέσκες ζωοτροφές όπως βοσκοτόπια και γρασίδι οπότε οι παραγωγοί χορηγούν στα ζώα συμπυκνωμένες τροφές που αποτελούνται συνήθως από σπόρους καλαμποκιού, βαμβακιού και σιταριού, οι οποίοι λόγω των κακών συνθηκών αποθήκευσης τους περιέχουν τοξικογενείς μύκητες και μολύνονται έτσι από αφλατοξίνες. Τον χειμώνα επίσης η γαλακτοπαραγωγή είναι μειωμένη οπότε η συγκέντρωση τοξικών και άλλων συστατικών αυξάνεται(Campagnollo et al., 2016).

1.4.2 Επιπτώσεις της AFM1 στη υγεία του ανθρώπου

Η AFM1 κατηγοριοποιήθηκε ως ομάδα 2B (πιθανώς καρκινογόνο) ανθρώπινου καρκινογόνου από το IARC, αλλά αργότερα ανακατατάχθηκε επίσης ως ανθρώπινο καρκινογόνο της ομάδας 1 (IARC, 2012)(Min et al., 2021). Είναι λιγότερο μεταλλαξιγόνα από την AFB1 αλλά εμφανίζει γονιδοτοξική δράση (Kumar et al., 2017). Η τοξικότητα της φτάνει μόλις στο 10% της τοξικότητας της AFB1 σε σχέση με την καρκινογένεση που προκαλούν(Iqbal et al., 2015).

Οι νέοι είναι πιο ευπαθείς και πιο ευαίσθητοι στην μόλυνση αφλατοξίνης εφόσον καταναλώνουν πρωτίστως γάλα, γι' αυτό και η αφλατοξίκωση είναι από τα σημαντικότερα προβλήματα αφού η AFM1 υπάρχει στο μητρικό γάλα αλλά και σε γαλακτοκομικά προϊόντα. (Products & Mohammadi, 2011).

Οδηγεί σε καρκινογένεση, μεταλλάξεις, γονοτοξικότητα, τερατογένεση και ανοσοκαταστολή, ακόμη και όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μπορεί επίσης να προκαλέσει γονιδιομεταλλάξεις, βλάβη στο DNA, χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σχηματισμό trans κυττάρων σε κύτταρα θηλαστικών in vitro .Επιπλέον υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση των επιπέδων AFM1 με το βάρος νεογέννητων μωρών (Min et al., 2021). Το 2004 έγιναν κάποιοι συσχετισμοί σχετικά με την έκθεση παιδιών σε αφλατοξίνη και την αμφιβολία στην ανάπτυξη τους(Products & Mohammadi, 2011).

1.4.3 Επιπτώσεις της AFM1 στην υγεία των ζώων

Στα ζώα η αφλατοξίνη M1 προκαλεί μειωμένη παραγωγή γάλακτος , βλάβη στο ήπαρ και αδυναμία παροχής οξυγόνου στους ιστούς λόγω αναιμίας κάτι το οποίο μειώνει και την ανάπτυξη και την όρεξη των γαλακτοπαραγωγικών ζώων . Ακόμα βρέθηκαν αρνητικές συνέπειες στους όρχεις, και την επιδιδυμίδα των αρσενικών ζώων. Μετά το θάνατο έχει βρεθεί ποσότητα αφλατοξίνης στον εγκέφαλο σε πείραμα, κάτι το οποίο σημαίνει ότι οι αφλατοξίνες μπορούν να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Για κάποια μικρά ζώα όπως τα ποντίκια οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά καρκινογόνες, ενώ σε άλλα είναι δυσκολότερο να προκαλέσουν καρκινογένεση.(Kumar et al., 2017).

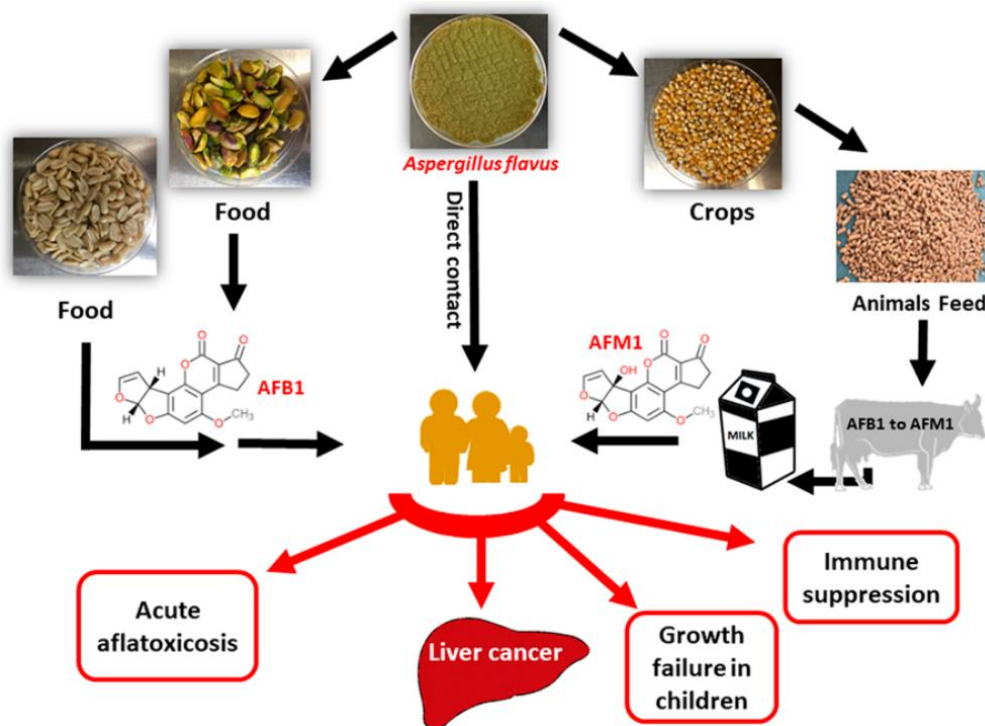
1.4.4 Υπολογισμός έκθεσης σε αφλατοξίνες

Η αξιολόγηση της έκθεσης των καταναλωτών στην κάθε ουσία (είτε μικρόβιο, ή άλλο επιβλαβή παράγοντα) είναι βασικό στάδιο για τον προσδιορισμό της. Συνήθως

μετράται σε $\mu\text{g}/\text{kg}$ ή ml/kg σωματικού βάρους την ημέρα. Επομένως υπολογίζεται ως εξής (Saha Turna & Wu, 2021) :

$\text{ADD} = \text{Cave} * \text{IR}/\text{bw}$, όπου ADD : μέση ημερήσια δόση (έκθεση), Cave : μέση συγκέντρωση τοξίνης στο τρόφιμο (πχ $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM1 στο γάλα) , IR: ρυθμός πρόσληψης του τροφίμου από το άτομο, bw : σωματικό βάρος ατόμου. Για πληθυσμό ατόμων χρησιμοποιούμε μέσο όρο για τις τιμές IR και bw.

Η έκθεση στην AFM1, συμβαίνει κυρίως μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων.



Εικόνα 1.7: Η προέλευση των αφλατοξινών B1 και M1 και τα προβλήματα που προκαλούν μετά την κατανάλωσή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Η ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ1 ΚΑΙ Η ΥΠΑΡΞΗ ΤΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Το γάλα θεωρείται μια τέλεια φυσική τροφή για ανθρώπους και ζώα. Ωστόσο, η αφλατοξίνη Β1 (AFB1), η οποία μολύνει τις ζωοτροφές με τις οποίες τρέφονται γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες μπορεί να εισάγει την αφλατοξίνη Μ1 (AFM1), τον κύριο τοξικό μεταβολίτη των αφλατοξινών στο γάλα, θέτοντας κατά συνέπεια κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Επομένως η συχνότητα εμφάνισης AFM1 στο νοπό γάλα δεν πρέπει να υποτιμάται. Κυρίως δίνεται προσοχή στα υπολείμματα της αφλατοξίνης Μ1 στα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς καταναλώνονται συνήθως από βρέφη (Min et al., 2021).

Η μόλυνση από αφλατοξίνη Μ1 μπορεί να γίνει είτε έμμεσα είτε άμεσα. Η έμμεση μόλυνση γίνεται με μεταφορά της τοξίνης από τις ζωοτροφές. Τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα καταναλώνουν τροφές μολυσμένες με AFB1 επομένως εκκρίνουν στο γάλα τους AFM1. Ως εκ τούτου μελετήθηκε το ποσοστό μεταφοράς AFB1 και οι μεταβλητές που την επηρεάζουν σχετικά με το τελικό ποσοστό αφλατοξίνης Μ1 που εκκρίνεται στο γάλα. Μερικά από τα αποτελέσματα που βγήκαν ανέφεραν του εξής παράγοντες (Prandini et al., 2009):

- Μεταβλητότητα μεταξύ των ζώων,
- στην αρχή του θηλασμού η μεταφορά αφλατοξίνης είναι περίπου 3,5 φορές μεγαλύτερη σχετικά με την μεταφορά σε προχωρημένο στάδιο γαλουχίας,
- οι λοιμώξεις στους μαστούς των ζώων επηρεάζουν την μεταφορά,
- ζώα που καταναλώνουν <40 μg/ημέρα παράγουν γάλα με περιεκτικότητα <0,05 μg/kg σε AFM1.

Η άμεση μόλυνση των γαλακτοκομικών προϊόντων από μυκοτοξίνες είναι αποτέλεσμα ανάπτυξης μυκήτων οι οποίοι χρησιμοποιούνται για ζύμωση ή ακούσιας ανάπτυξης μυκήτων. Τα είδη *Penicillium*, για παράδειγμα, τα οποία χρησιμοποιούνται σαν καλλιέργειες εκκίνησης για την ζύμωση του γαλλικού ροκφόρ και των τυριών Καμαμπέρ, μπορούν να παράξουν μυκοτοξίνες αν μολυνθούν με τοξικογόνα στελέχη ή από το περιβάλλον. Άλλη πιθανή μόλυνση των προϊόντων

γίνεται με τυχαία ανάπτυξη μούχλας σε αυτά, αν και η ύπαρξη καλών πρακτικών παραγωγής μπορεί να αποτρέψει αυτό το φαινόμενο(Prandini et al., 2009).

2.1 ΤΟ ΓΑΛΑ ΩΣ ΣΤΟΙΧΕΙΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Το γάλα είναι μια σημαντική θρεπτική τροφή με σύντομη όμως διάρκεια ζωής και για αυτό απαιτεί αυστηρότητα στην διαχείρισή του ώστε να μην αλλοιωθεί και προκαλέσει πρόβλημα στους καταναλωτές(Campagnollo et al., 2016). Έχει μεγάλη διατροφική αξία καθώς περιέχει υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών και είναι σημαντική πηγή βιταμινών, αντιοξειδωτικών και φυσικά ασβεστίου. Επιπλέον κάποια λιπίδια που περιέχει, όπως για παράδειγμα το βουτυρικό οξύ έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες(Tsakiris et al., 2013). Σύμφωνα με τον FAO, η μέση κατανάλωση γάλακτος ανά κάτοικο παγκόσμια υπολογίζεται περίπου στα 100 kg/έτος, όμως μπορεί να διαφέρει σημαντικά από χώρα σε χώρα (10–300 kg/έτος)(Mollayusefian et al., 2021).

2.1.1 Ορισμός γάλακτος

Σύμφωνα με τον FDA(Food and Drug Administration) γάλα ορίζεται ως η γαλακτώδης έκκριση, απαλλαγμένη πρακτικά από πρωτόγαλα, που λαμβάνεται με το πλήρες άρμεγμα μιας ή περισσότερων υγιών αγελάδων, η οποία μπορεί να διαυγαστεί και να ρυθμιστεί με διαχωρισμό μέρους του λίπους από αυτό σε συμπυκνωμένο γάλα, ανασυσταμένο γάλα και ξηρό πλήρες γάλα.

2.1.2 Τύποι κατανάλωσης γάλακτος

Το γάλα μπορεί να καταναλωθεί είτε ως νοπό είτε ως επεξεργασμένο αλλά και μέσω των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα θερμικά επεξεργασμένα είδη γάλακτος που υπάρχουν είναι το παστεριωμένο, όπου εκεί ανήκει και το γάλα υψηλής παστερίωσης (Extended Self Life-ESL) και το γάλα μακράς διάρκειας (Αποστειρωμένο-UHT). Ακόμη έχουμε τα ζυμωμένα γάλατα όπως το γιαούρτι, το κεφίρ και το ξινόγαλα. Άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι το τυρί, το βούτυρο, το συμπυκνωμένο και ζαχαρούχο γάλα, η σκόνη γάλακτος, οι κρέμες γάλακτος και το παγωτό(Κεχαγιάς, Τσάκαλη, 2017).

2.2 AFM1 ΚΑΙ ΓΑΛΑ

Έχει μελετηθεί σε δείγματα παγκοσμίως ότι η AFM1 εμφανίζεται ως φυσικός ρύπος στο γάλα διαφορετικών ζώων, πριν ή μετά την επεξεργασία γάλακτος. Περίπου το 10% του γάλακτος στα δείγματα που αναλύθηκαν παρουσίασαν επίπεδα AFM1 πάνω

από το μέγιστο επίπεδο με βάση τη νομοθεσία της ΕΕ για αυτή τη μυκοτοξίνη στο ανθρώπινο φαγητό. Η παρουσία της AFM1 έχει μελετηθεί σε ωμά, παστεριωμένα, γάλατα σε σκόνη, συμπυκνωμένα και γάλατα σε υπερυψηλή θερμοκρασία(UHT). Στις περισσότερες μελέτες βρέθηκε κάθε είδος γάλατος να ξεπερνάει τα ευρωπαϊκά όρια σε συγκεντρώσεις AFM1.(Flores-Flores et al., 2015).

Ως υγρό προϊόν το γάλα είναι εξαιρετικά μεταβλητό και μπορεί να υποβαθμιστεί εύκολα η ποιότητα του και να χαλάσει γρήγορα αν δεν αντιμετωπιστεί(Products & Mohammadi, 2011). Η AFM1 έχει μεγάλη θερμική σταθερότητα και γι αυτό το λόγο δεν μπορεί να υποβαθμιστεί ή να καταστραφεί με τις κοινές θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόζονται στα τρόφιμα(Min et al., 2021). Επεξεργασίες όπως η παστερίωση και η αποστείρωση έχει φανεί ότι δεν έχουν μεγάλη επίπτωση στη μείωση της αφλατοξίνης. Με άλλες τεχνικές όπως εξάτμιση, συμπύκνωση ή ξήρανση κάποιες μελέτες έδειξαν σημαντική μείωση, ενώ άλλες καμία αλλαγή στο περιεχόμενο αφλατοξίνης M1 στο προϊόν(Flores-Flores et al., 2015). Υγρά είδη γάλακτος στις μελέτες περιλαμβάνουν νωπό γάλα, παστεριωμένο γάλα, φρέσκο γάλα, γάλα σε υπερυψηλή θερμοκρασία (UHT), συμβατικό γάλα, βιολογικό γάλα(Saha Turna & Wu, 2021).

Γνωρίζουμε ότι η κατανομή της αφλατοξίνης στο γάλα δεν είναι ομοιογενής. Κατά τη διαδικασία διαχωρισμού της κρέμας του γάλακτος επηρεάζεται η κατανομή αυτή, εφόσον το 80% της αφλατοξίνης M1 υπάρχει στο αποβουτυρωμένο γάλα, λόγω της δέσμευσης της AFM1 με την καζεΐνη. Έχει εκτιμηθεί ότι μόνο ένα 30% της αφλατοξίνης M1 συνδέεται με τα στερεά του μη λιπαρού γάλακτος και κυρίως με την καζεΐνη. Μέσα από έρευνες παρατηρήθηκε ότι η AFM1 επικρατεί, λόγω του ημιπολικού χαρακτήρα της, στο μη λιπαρό κλάσμα του γάλακτος κατά τον διαχωρισμό λίπους(Products & Mohammadi, 2011).

Η χαμηλότερη συγκέντρωση της AFM1 στο νωπό συγκριτικά με το παστεριωμένο γάλα εξηγείται με την αραίωση μολυσμένου γάλακτος με μη μολυσμένο γάλα προερχόμενο από διαφορετικές πηγές(Mollayusefian et al., 2021).

Παστερίωση Γάλακτος:

1. Παστερίωση Χαμηλής Θερμικής Επεξεργασίας για Μακρό Χρονικό Διάστημα (Low Temperature-Long Time)-LTLT : Γίνεται σε δεξαμενές με διπλά τοιχώματα στους 63°C για 30 λεπτά.
2. Παστερίωση Υψηλής Θερμικής Επεξεργασίας Για Βραχύ Χρονικό Διάστημα (High Temperature-Short Time) – HTST : Γίνεται σε πλακοειδής εναλλάκτες θερμότητας στους 71,7°C για 15 δευτερόλεπτα(Κεχαγιάς, Τσάκαλη, 2017).

2.2.1 Επίδραση της συμπύκνωσης-ξήρανσης του γάλακτος στην AFM1

Τα συμπυκνωμένα ή αποξηραμένα και εβαπορέ γάλατα προκύπτουν με την αφαίρεση ποσότητας νερού από αυτά με ή χωρίς θέρμανση το οποίο οδηγεί στην συγκέντρωση της AFM1 στα στερεά συστατικά του και κάνει την τοξίνη πιο ευαίσθητη στο φως, το οξυγόνο και άλλους σταθεροποιητικούς παράγοντες. Οι απώλειες σε κάποιες μελέτες ήταν σημαντικές ενώ σε άλλες το περιεχόμενο AFM1 δεν επηρεάστηκε(Prandini et al., 2009).

Το γάλα σε σκόνη είναι βασικό στοιχείο διατροφής και πηγής πρωτεϊνών παγκοσμίως, κυρίως σε μέρη όπου η ψύξη δεν είναι διαθέσιμη. Είναι ένα αρκετά ομοιογενές προϊόν διατροφής και παρόλο που δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για το αντικείμενο αυτό παγκοσμίως, αυτές που έχουν γίνει είναι αρκετά αντιπροσωπευτικές σχετικά με τα επίπεδα αφλατοξίνης M1 που έχουν βρεθεί(Saha Turna & Wu, 2021).

2.2.2 Επίδραση θερμικών επεξεργασιών στα επίπεδα AFM1 μέσα από πειράματα

Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες στις οποίες μελετήθηκε η συμπεριφορά της AFM1 στο γάλα υπό την επίδραση πολύ χαμηλών θερμοκρασιών αλλά και υψηλών. Για τις ψυχρές επεξεργασίες σημειώθηκε το 1977 ότι η ανιχνεύσιμη ποσότητα AFM1 ελαττώθηκε κατά 11-25% μετά από 3 ημέρες διατήρησης του προϊόντος στους 5°C ενώ το ποσοστό αυτό αυξήθηκε μετά από συντήρηση για περισσότερες ημέρες στους 0°C(Products & Mohammadi, 2011). Το 1973 προτάθηκε ότι η κατάψυξη στους -18°C για 30 ημέρες μπορεί να μειώσει την ποσότητα αφλατοξίνης και να την εξαφανίσει πλήρως μετά το πέρας των 53 ημερών, κάτι το οποίο αμφισβητήθηκε από άλλους ερευνητές το 1981. Όσο για τις επεξεργασίες με υψηλές θερμοκρασίες, οι διάφοροι τρόποι επεξεργασίας έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα. Η θερμική επεξεργασία ανάλογα με τον χρόνο εφαρμογής έδειξε ελάττωση σε ποσοστά από 12% έως και 40%. Το 1998 έρευνα έδειξε ότι στο αγελαδινό γάλα η αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά μείωσε την περιεκτικότητα της AFM1 κατά 12,21% και ο βρασμός κατά

14,50 %. Έτσι βγήκε το συμπέρασμα ότι η καταστροφή της αφλατοξίνης M1 εξαρτάται από συνδυασμό της θερμοκρασίας, της θερμικής επεξεργασίας και του χρόνου που αυτή εφαρμόζεται. Σε έρευνα τα επόμενα χρόνια (2001) σημειώθηκε μείωση του ποσοστού AFM1 κατά 7,62% κατά την παστερίωση. Επιπλέον το 2007 αναφέρθηκε ότι η παστερίωση μπορεί να μειώσει την ποσότητα της αφλατοξίνης M1 στο γάλα(Products & Mohammadi, 2011).

Η θερμική επεξεργασία προκαλεί μείωση στα επίπεδα AFM1 γιατί προκαλεί αποσύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος και διαλυτότητα των αλάτων και έτσι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της καζεΐνης και της AFM1 αλλάζουν(Campagnollo et al., 2016).

Προϊόν	Θερμική επεξεργασία	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Αποτέλεσμα στην AFM1	Έτος μελέτης
Γάλα	Παστερίωση	62	30min	Μείωση 32,5%	1972
Γάλα	Παστερίωση	72	45sec	Μείωση 45,5%	1972
Γάλα	Παστερίωση	80	45sec	Μείωση 63,5%	1972
Γάλα	Θέρμανση	63	30min	Μείωση 9,5%	1992
Γάλα	Θέρμανση	121	15min	Μείωση 26%	1992
Γάλα	Παστερίωση	-	-	Μείωση 7,62%	2001
Βόειο γάλα	Παστερίωση	99	3min	Αμελητέα διαφορά	2002
Βόειο γάλα	Θέρμανση	95	3min	Σταθερό	2006
Γάλα	Παστερίωση	72	2min	Μείωση 9-12%	2007
Βόειο γάλα	Παστερίωση	100	-	Σταθερό	2012
Γάλα	Παστερίωση	95	5min	Μείωση 16,1-17,9%	2012
Γάλα	Αποστείρωση	115	45sec	Μείωση 81,3%	-

Πίνακας 2.1: Επίδραση θερμικών επεξεργασιών στο περιεχόμενο της AFM1 σε δείγματα γάλακτος σε παλαιότερες μελέτες.(Campagnollo et al., 2016)

2.2.3 Διαφορετικά είδη γάλακτος και AFM1

2.2.3.1 Μητρικό γάλα

Το μητρικό γάλα είναι η καλύτερη πηγή θρεπτικών συστατικών εφόσον παρέχει ορμόνες και ανοσολογικούς παράγοντες που προσφέρουν προστασία στα βρέφη. Η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων από τη μητέρα είναι ο κύριος παράγοντας που υποβαθμίζει την ποιότητα του γάλακτος (Maleki et al., 2015). Μερικά συμπεράσματα από έρευνες για την ύπαρξη AFM1 στο μητρικό γάλα ήταν ότι οι διατροφικές συνθήκες των μητέρων ακόμα και μετά τον απογαλακτισμό εκθέτουν τα παιδιά στην αφλατοξίνη. Επίσης κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού η συχνότητα ανίχνευσής της ήταν μεγαλύτερη από εκείνη τους χειμώνες (Ghiasain & Maghsood, 2012). Υπολογίστηκε σε μελέτες η μέση έκθεση των βρεφών στην αφλατοξίνη M1 και ήταν κατά μέσο όρο 2-5,6 mg/kg μέσω του θηλασμού, το οποίο είναι υψηλότερο από τα αποδεκτά όρια. Η AFM1 ανιχνεύεται στο μητρικό γάλα 12- 24 ώρες μετά την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Μειώνεται όμως άμεσα και δεν ανιχνεύεται καθόλου μετά από 3 ημέρες αφού διακόπτεται η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων (Maleki et al., 2015). Έχει βρεθεί ότι και άλλες αφλατοξίνες όπως οι B1, B2, G1, G2 μπορεί περάσουν στο μητρικό γάλα (Products & Mohammadi, 2011). Σε άλλη μελέτη αποδείχθηκε ότι η κατανάλωση δημητριακών, κρέατος, ψαριών αποξηραμένων φρούτων γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων δεν εμφάνισε σημαντικά ποσοστά AFM1 στο μητρικό γάλα (Ishikawa et al., 2016).

Η απουσία AFM1 στο μητρικό γάλα στις χώρες της Ασίας όπου έχουν διεξαχθεί οι περισσότερες μελέτες σχετίζονται με την χαμηλή κατανάλωση του αραβόσιτου που είναι ο νούμερο ένα κίνδυνος μόλυνσης στις ζωοτροφές. Αντίθετα τροφές επικίνδυνες για μόλυνση με AFM1 όπως οι ξηροί καρποί (π.χ φιστίκι, αμύγδαλα) καταναλώνονται συχνά (Ghiasain & Maghsood, 2012).

2.2.3.2 Γάλα γαϊδούρας

Το γάλα γαϊδούρας έχει χαμηλότερη συγκέντρωση καζεΐνης απ'ότι το αγελαδινό γάλα. Επίσης χαρακτηρίζεται από κλινική ανεκτικότητα, διατροφική επάρκεια, γευστικότητα και μεγάλη πεπτικότητα. Είναι αρκετά ανεκτό ακόμα και από βρέφη. Παρέχει πρόσθετες λειτουργίες στον οργανισμό με την κατανάλωσή του όπως μόρια πεπτικής δραστηριότητας, αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και αντιβακτηριακές ουσίες. Είναι κατάλληλη τροφή για θεραπεία αθηροσκλήρωσης, οστεογένεση,

ανάρρωση από κάποια καρδιακή προσβολή, δίαιτες και πρόωρη γήρανση. Ευρέως γνωστή είναι η χρήση στην κοσμετολογία και την ιατρική λόγω της πλούσιας σύστασης σε πρωτεΐνες γάλακτος που περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Σε έρευνες για την μόλυνση δειγμάτων γάλακτος από αφλατοξίνη M1 βρέθηκε ότι η τροφή ήταν σχετικά ασφαλής σύμφωνα με τους ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν. Η μη ανίχνευση AFM1 σε όλα τα γάλατα αποδίδεται στην πολύ χαμηλή περιεκτικότητά του σε καζεΐνη (η οποία έχει την τάση να συνδέεται ισχυρά με την AFM1). Στα γαϊδούρια δείγματα αφλατοξίκωσης είναι η κατάθλιψη, η ανορεξία, ο ίκτερος και ακόμα και ο θάνατος (Altafini et al., 2020).

2.2.3.3 Γάλα καμήλας

Το γάλα καμήλας αποτελεί βασική τροφή για τις ξηρές περιοχές της Αφρικής και των Ασιατικών χωρών. Είναι θρεπτικό, νόστιμο, περιέχει χαμηλά λιπαρά, λακτόζη και χοληστερόλη. Είναι ακόμη πλούσιο σε πρωτεΐνες, λακτοφερίνη, ινσουλίνη, βιταμίνες και μέταλλα. Χρησιμοποιείται πλέον και για ιατρικούς σκοπούς καθώς αποδείχθηκε ότι ενισχύει το ανοσοποιητικό και αντιμετωπίζει ασθένειες όπως η χρόνια ηπατίτιδα, η αναιμία, ο διαβήτης, το άσθμα, αλλεργίες, υποσιτισμό και έλκη(Shokri & Torabi, 2017). Το γάλα καμήλας περιέχει επίπεδα AFM1 χαμηλότερα από το επιτρεπτό όριο, επειδή οι καμήλες βοσκούν στην έρημο, και όχι με συμπυκνωμένες σύνθετες τροφές, όπου οι συνθήκες για ανάπτυξη αφλατοξινών είναι ακατάλληλες(Mollayusefian et al., 2021).

2.3 ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ Η AFM1 ΣΕ ΑΥΤΑ

2.3.1 AFM1 και τυρί

Το τυρί είναι ένα από τα αγαπημένα προϊόντα με βάση το γάλα παγκοσμίως(Sarmast et al., 2021). Σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία τα τυριά είναι προϊόντα ωρίμανσης του πήγματος, απαλλαγμένα από τυρόγαλα στο επιθυμητό βαθμό κάθε φορά και έχουν παρασκευαστεί με την επενέργεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα(νωπό η παστεριωμένο, αγελάδας, κατσίκας, προβάτου, βούβαλου και μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα). Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius για τα τυριά, το τυρί είναι προϊόν που μπορεί να προκύψει από ωρίμανση ή μη και να είναι μαλακό, ημίσκληρο, σκληρό ή πολύ σκληρό(Κεχαγιάς, Τσάκαλη, 2017).

Η εμφάνιση αφλατοξίνης στο τυρί μπορεί να οφείλεται σε τρεις πιθανές αιτίες:

1. Στην παρουσία αφλατοξίνης M1 που ήδη υπάρχει στο νοπό γάλα και προέκυψε από την μεταφορά AFB1 στο γάλα από μολυσμένες ζωοτροφές
2. Σύνθεση αφλατοξίνης (B1, B2, G1 και G2) από μύκητες που αναπτύσσονται στο τυρί (παρόλο που το χαμηλό επίπεδο των υδατανθράκων σε αυτό δεν το καθιστά το καταλληλότερο υπόστρωμα)
3. Η χρήση κονιοποιημένου γάλακτος (γάλα σε σκόνη) που είναι ήδη μολυσμένο με AFM1 για την παραγωγή τυριού (Products & Mohammadi, 2011).

Ο συντελεστής κατανομής της αφλατοξίνης M1 στο νερό δείχνει ότι περισσότερη τοξίνη μεταφέρεται στον ορό του γάλακτος παρά στο τυρόπηγμα (Sarmast et al., 2021). Η αφλατοξίνη M1 συνδέεται ισχυρά με την καζεΐνη με αποτέλεσμα το τυρόπηγμα να περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα AFM1 από τον ορό του γάλακτος. Η σύνδεση της καζεΐνης με την αφλατοξίνη εκφράζεται ως παράγοντας εμπλουτισμού (Enrichment Factor- EF) στη τυροκομία (Campragnollo et al., 2016). Ο παράγοντας εμπλουτισμού είναι σημαντικό να καθοριστεί ώστε να μπορεί να αξιολογείται το επίπεδο μολυσματικών ουσιών σε σύνθετα, επεξεργασμένα αραιωμένα και αποξηραμένα τρόφιμα. Αυτό εξασφαλίζει ότι το τυρί παράγεται από γάλα συμμορφούμενο με τα μέγιστα επίπεδα AFM1, και επομένως τα προϊόντα προστατεύουν την υγεία των καταναλωτών. Τα Ιταλικό Υπουργείο Υγείας καθόρισε τον Παράγοντα εμπλουτισμού 5,5 για το σκληρό τυρί και 3,0 για το μαλακό τυρί. Η αξιολόγηση του Παράγοντα Εμπλουτισμού γίνεται με τη σχέση:

$$EF = [AFM1]_{\text{τυριού}} (\mu\text{g}/\text{kg}) / [AFM1]_{\text{γάλακτος}} (\mu\text{g}/\text{kg}) \text{ (Pecorelli et al., 2020).}$$

Τυρί	Κατηγορία σκληρότητας	Παράγοντας εμπλουτισμού (EF)	Έτος μελέτης
Parmesan	Πολύ σκληρό	5,8	1982
Grana	Σκληρό	<5,8	2009
Pandano			
Gouda	Σκληρό	<5,8	2016
Caciotta	Ημίσκληρο	≈5,2	2016
Cheddar	Ημίσκληρο	≈4,1	1982

Bakers	Μαλακό	2,97	1989/1983/2008
Τελεμές	Μαλακό	4,4	2001
White Pickled		4,0	2006
Crescenza	Μαλακό	2,55	1989/1983/2008
Fior di Latte	Μαλακό	2,9	2020
Primosale	Ημίσκληρο	4,1	2020
Φέτα	Μαλακό	4,3-5,6	2011

Πίνακας 2.2: Παράγοντες εμπλουτισμού για τυριά διαφορετικής κατηγορίας σκληρότητας.(Pecorelli et al., 2020)(Products & Mohammadi, 2011)(Κεχαγιάς, Τσάκαλη, 2017).

2.3.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα AFM1 στο τυρί

Διάφοροι παράγοντες όπως η μεθοδολογία κάθε επεξεργασίας, ο βαθμός μόλυνσης και ο τύπος του γάλακτος που χρησιμοποιείται, η ποιότητα του γάλακτος, οι τεχνικές εξαγωγής και η έκφραση των αποτελεσμάτων, καθώς και η ποσότητα του τυροπήγματος στον ορό του γάλακτος, μπορούν να επηρεάσουν την ύπαρξη και την ποσότητα αφλατοξίνης M1 στην διαδικασία παραγωγής τυριού(Products & Mohammadi, 2011). Ακόμα στην μεταβλητότητα παίζουν ρόλο η ποικιλία του τυριού, οι συνθήκες ωρίμανσης και η γεωγραφική θέση(Fallah et al., 2009).

Το επίπεδο της αφλατοξίνης M1 στο τυρί εξαρτάται από τον τύπο τυριού, την ποσότητα νερού που αποβάλλεται κατά την επεξεργασία του(Campagnollo et al., 2016)και την τεχνολογία επεξεργασίας που χρησιμοποιείται(Products & Mohammadi, 2011). Επίσης για το τυρόπηγμα παίζει ρόλο η θερμοκρασία της πυτιάς, το pH της κορεσμένης άλμης που χρησιμοποιείται και η διάρκεια συμπίεσης. Για τα διαφορετικά περιεχόμενα σε κάθε τύπο τυριού παίζουν ρόλο ακόμα η θερμική επεξεργασία, η έκθεση του μολυσμένου γάλακτος στο φως, η πρωτεόλυση και οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση της τοξίνης(Campagnollo et al., 2016). Για παράδειγμα κατά την παρασκευή ενός ιρανικού λευκού τυριού, η θερμοκρασία προσθήκης της πυτιάς, το κορεσμένο pH της άλμης και η χρόνος συμπίεσης επηρέασαν την ποσότητα νερού που αποβλήθηκε από το τυρόπηγμα και άρα την ποσότητα της περιεχόμενης αφλατοξίνης σε αυτό(Products & Mohammadi, 2011).

Προϊόντα βιομηχανικής κλίμακας περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα AFM1 σε σχέση με τα βιοτεχνικά προϊόντα. Αυτό συμβαίνει διότι οι βιοτεχνίες χρησιμοποιούν γάλα από μία πηγή που μπορεί να περιέχει υψηλή συγκέντρωση αφλατοξίνης, ενώ οι βιομηχανίες αναμιγνύουν γάλατα από περισσότερες πηγές οπότε ο κίνδυνος μόλυνσης μειώνεται (Campagnollo et al., 2016).

Μελέτες έδειξαν ότι σε κάποια είδη μαλακών τυριών τα επίπεδα της τοξίνης ήταν 3 φορές υψηλότερα, και σε σκληρά 5 φορές υψηλότερα, σε σχέση με το γάλα από το οποίο παρασκευάστηκαν, ενώ άλλες έδειξαν ότι τα παραγόμενα τυριά είχαν χαμηλότερη ποσότητα AFM1 απ'ότι το νωπό γάλα (Campagnollo et al., 2016).

2.3.1.2 Πρακτικές που επιδρούν στα επίπεδα της τοξίνης

Αλάτισμα : Η περιεκτικότητα του τυριού σε αλάτι κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του. Τα όξινα τυριά μπορεί να περιέχουν αλάτι από 0,5-0,7% (w/w) στο τυρόπηγμα ενώ 4-6% (w/w) σε τυριά τουρσί. Το αλάτι χρησιμοποιείται κυρίως για βελτίωση της γεύσης και διατήρηση της ποιότητας των προϊόντων. Τα 3 είδη αλατίσματος είναι το ξηρό αλάτισμα που γίνεται απευθείας με προσθήκη αλατιού στο τυρόπηγμα πριν καλουπωθεί, το ξηρό αλάτισμα στην επιφάνεια που γίνεται με τρίψιμο αλατιού στην επιφάνεια και τέλος αλάτισμα με άλμη, όπου το τυρί βυθίζεται σε διάλυμα άλμης. Ωστόσο δεν υπάρχουν πολλές μελέτες για την αξιολόγηση των επιπέδων της AFM1 στα τυριά μετά το αλάτισμα και όσες υπάρχουν έγιναν σε τυριά αλατισμένα με την μέθοδο της άλμης. Τα αποτελέσματα που βρέθηκαν έδειξαν ότι μόνο ένα μέρος της ποσότητας της AFM1 που έφυγε από το τυρί βρέθηκε στην άλμη, το οποίο σημαίνει ότι η υπόλοιπη ποσότητα της αφλατοξίνης που έφυγε από το τυρί πιθανότατα αποικοδομήθηκε στη διάρκεια της ωρίμανσης (Campagnollo et al., 2016).

Ωρίμανση: Η ωρίμανση είναι σημαντικό βήμα στην διαδικασία παρασκευής τυριού. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής πραγματοποιούνται φυσικοχημικές αντιδράσεις και μικροβιολογικές μετατροπές, αναπτύσσονται πτητικές οργανικές ενώσεις, γεύση και υφή στο αποθηκευμένο τυρί υπό ελεγχόμενη υγρασία και θερμοκρασία. Έχει ελεγχθεί η συγκέντρωση της AFM1 σε αρκετά πειράματα και διαφορετικά είδη τυριών κατά την ωρίμανση. Είναι αρκετά πιθανό να μειωθεί η μόλυνση εφόσον η τοξίνη αποικοδομείται ωστόσο δεν είναι επιβεβαιωμένο. Συμπερασματικά οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα της αφλατοξίνης και την μερική καταστροφή της σε αυτό το στάδιο ήταν το μέγεθος του τυριού, η επίδραση διαφόρων

προϊόντων ωρίμανσης, οι χημικές ή ενζυμικές διαδικασίες αποικοδόμησης, ο τρόπος παραγωγής του τυριού και τα πεπτίδια που παράγονται κατά την διάρκεια της πρωτεόλυσης(Campagnollo et al., 2016). Πειραματικά βρέθηκε για το τυρί Καμαμπέρ ότι οι τιμές της αφλατοξίνης M1 ήταν μεγαλύτερες στην αρχή και μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το ίδιο συνέβη και στην παρμεζάνα όπου κατά τον 5^ο μήνα ωρίμανσης σημειώθηκε μείωση στην αφλατοξίνη, αλλά κατά τον 10^ο μήνα αυξήθηκε πάλι με αργό ρυθμό. Τα επίπεδα AFM1 στη Mozzarella παρέμειναν σταθερά κατά τους 4,5 μήνες ωρίμανσης. Το 2005 σε έρευνα διαπίστωσαν ότι το τελικό τυρί μετά την ωρίμανση είναι πλήρως απαλλαγμένο από την AFM1(Products & Mohammadi, 2011).

Αποθήκευση: Μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία ψυγείου ή δωματίου ανάλογα με τον τύπο τυριού. Ορισμένα τυριά όπως τα Tilsit, Limburger, Swiss, Gouda, Brick, Cheddar, Parmesan, Manchego, Camembert και Mozzarella έδειξαν μεγάλη σταθερότητα στα επίπεδα της AFM1 κατά την ωρίμανση και αποθήκευση τους. Τα ζυμωμένα προϊόντα (όπως το τυρί) είναι σημαντικό να διατηρούνται στο ψυγείο και να υπάρχουν καλές πρακτικές υγιεινής σε όλα τα στάδια παραγωγής τους, καθώς και να συσκευάζονται σε κενό ώστε να αποφεύγεται ή ανάπτυξη μούχλας και τοξινών, εφόσον δεν είναι δυνατό με διαδικασίες όπως η παστερίωση και η παραγωγή τυριού να εξαλειφθεί πλήρως ο ποσότητα AFM1(Campagnollo et al., 2016).

Επιπλέον η επίδραση της θερμοκρασίας στην ωρίμανση και αποθήκευση των τυριών δεν είναι σαφής. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της AFM1 μειώθηκαν σημαντικά σε ωρίμανση και αποθήκευση στο ψυγείο, ενώ άλλες δεν έδειξαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα AFM1(Sarmast et al., 2021).

Προσθήκη καλλιεργειών εκκίνησης: Σε τυρί που παράχθηκε από γάλα χωρίς προσθήκη καλλιέργειας το επίπεδο AFM1 ήταν περίπου 2 φορές υψηλότερο από ότι σε τυρί που παράχθηκε με προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης. Ο μηχανισμός της μείωσης δεν είναι ακόμα ακριβής όσο αφορά την σχέση της καλλιέργειας με την αφλατοξίνη. Μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει ισχυρή εξωκυτταρική προσκόλληση της καλλιέργειας (κυρίως των βακτηρίων γαλακτικού οξέος) στην AFM1. Κατά την παραγωγή τυριού τα βακτηριακά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, οι πεπτιδογλυκάνες και οι πολυσακχαρίτες μπορούν να συνδεθούν με την AFM1 και να μειώσουν την βιοδιαθεσιμότητα της(Sarmast et al., 2021).

Επειδή η AFM1 είναι ημιπολική τοξίνη έχει λιγότερη συνδεσιμότητα με τις πρωτεΐνες ορού. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι δεν υπάρχει κάποια απλουστευμένη φυσική μέθοδος ώστε να μπορεί να αφαιρεθεί από το πρόβειο ή το κατσικίσιο γάλα. Τεχνικές όπως η υπερδιήθηση και οι όξινες ή ενζυμικές επεξεργασίες δεν κατάφεραν να επηρεάσουν την σύνδεση την αφλατοξίνης M1 με την καζεΐνη και τις πρωτεΐνες του ορού. Ο μόνος τρόπος για να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες και να χάσουν την ικανότητας δέσμευσης του με την αφλατοξίνη ήταν η συνδυαστική δράση χαμηλού pH και θερμότητας(Products & Mohammadi, 2011).

2.3.2 AFM1 σε ζυμωμένα γάλατα

Η ζύμωση στα τρόφιμα έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και αιώνες σαν μέθοδος συντήρησης. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος μπορούν να ελαττώσουν την ανάπτυξη μούχλας και άρα την μόλυνση από αφλατοξίνες(Elsanhoty et al., 2014). Τα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης (π.χ. γιαούρτι, κεφίρ)παρασκευάζονται θερμαίνοντας το γάλα και προσθέτοντας μια καλλιέργεια εκκίνησης ώστε να ξεκινήσει η ζύμωση(Prandini et al., 2009).

Τα LAB(Lactic Acid Bacteria) και κάποια προβιοτικά στελέχη αποδείχθηκε ότι έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες ουσίες που βρίσκονται στην διατροφή μας, όπως οι αφλατοξίνες, σε κάποιο προϊόν που έχει μολυνθεί από αυτές χρησιμοποιώντας στελέχη LAB σαν εκκινητές σε καλλιέργειες.(Elsanhoty et al., 2014).

Μειονεκτήματα λόγω ύπαρξης AFM1 (Campagnollo et al., 2016):

- Μεγαλύτερος χρόνος ζύμωσης
- Αργός ρυθμός δραστηριότητας των καλλιεργειών εκκίνησης και διαφορές στη μορφολογία τους
- Μετατροπή ομοζυγωτικών εκκινητών σε ετεροζυγωτικούς
- Μείωση της ανάπτυξης των καλλιεργειών
- Ελαττώματα στην υφή και τη γεύση.

2.3.3 Γιαούρτι

Επειδή, αντιθέτως με το τυρί και το γάλα , οι έρευνες για την παρουσία αφλατοξίνης M1 στο γιαούρτι δεν έχουν προχωρήσει αρκετά , παρόλο που το γιαούρτι καταναλώνεται πλέον σε μεγάλες ποσότητες, υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα για

το πόσο σταθερή είναι η αφλατοξίνη M1 κατά την παραγωγή και αποθήκευσή του, αλλά και για το αν τελικά μειώνει την θρεπτική αξία του προϊόντος. Έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με την επίδραση της παραγωγής γιαουρτιού στην περιεχόμενη αφλατοξίνη M1. Κάποιοι συγγραφείς παλαιότερα δεν βρήκαν καμία επίδραση στο περιεχόμενο αφλατοξίνης M1 ενώ άλλοι παρατήρησαν αυξήσεις της συγκέντρωσης AFM1 στο γιαούρτι, οι οποίες σχετίζονταν με το γάλα που χρησιμοποιήθηκε. (Products & Mohammadi, 2011).

2.3.3.1 Πειράματα για την αξιολόγηση των επιπέδων αφλατοξίνης M1 στο γιαούρτι.

1. Ενδεικτικό πείραμα με χρήση LAB (Elsanhoty et al., 2014):

Προετοιμασία δειγμάτων γιαουρτιού: Χρήση γάλακτος σε σκόνη τεχνητά μολυσμένου με αφλατοξίνη M1 συγκέντρωσης 50mg/L. Διάλυση της σκόνης σε απιονισμένο νερό στους 60°C με μηχανική ανάδευση, θέρμανση των δειγμάτων για 15 λεπτά στους 90°C και στη συνέχεια ψύξη σε υδατόλουτρο στους 47°C. Παρασκευάστηκαν 3 διαφορετικές παρτίδες γιαουρτιού.

1^η παρτίδα: Προσθήκη *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus* (εκκινητές No.1)

2^η παρτίδα: Προσθήκη 50% *S. thermophilus* με *L. bulgaricus* και 50% *Lactobacillus plantarium* (εκκινητές No.2)

3^η παρτίδα: Προσθήκη 50% με *L. bulgaricus* και 50% *Lactobacillus acidophilus* (εκκινητές No.3)

- Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 37°C για περίπου 6 ώρες μέχρι να φτάσουν σε pH 4,5.
- Τα δείγματα συλλέχθηκαν μετά από θερμική επεξεργασία και εμβολιασμό με τους εκκινητές, στο τέλος της επώασης και της ψύξης.
- Άλλα δείγματα συλλέχθηκαν μετά από 3,5-7 ημέρες αποθήκευσης στους 5°C και διατήρησης στους 20°C.
- Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης AFM1 έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του AOAC (2005). Η ανάλυση των δειγμάτων για την μέτρηση της τοξίνης έγινε με την μέθοδο HPLC

- Βρέθηκε ότι ακόμα και στον χρόνο 0 τα επίπεδα αφλατοξίνης M1 ήταν αρκετά υψηλότερα από εκείνα που σημειώθηκαν μετά την προσθήκη εκκινητών και το τέλος της αποθήκευσης τους. Η αποικοδόμηση της αφλατοξίνης επίσης διέφερε ανάλογα με τον τύπο εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε.

Αποτελέσματα :

- Το ποσοστό υποβάθμισης σε δείγμα με προσθήκη LAB μετά από μια ημέρα αποθήκευσης ήταν 22,8%-69,8%.
- Το υψηλότερο ποσοστό υποβάθμισης συνέβη μετά την προσθήκη των εκκινητών No.2 (31,5%-87,8%).
- Για τον εμβολιασμό No.3 μετά από μια ημέρα αποθήκευσης παρατηρήθηκε ποσοστό 27,8%-72,8%
- Τα ποσοστά υποβάθμισης της AFM1 στο τέλος της αποθήκευσης για 7 ημέρες ήταν 61,4%, 89,9% και 84,8% για τους εκκινητές 1,2,3 αντίστοιχα, ενώ το δείγμα αναφοράς χωρίς προσθήκη LAB σημείωσε 60%.

2. Σε άλλο πείραμα το 2002 σημειώθηκε ότι σε όλα τα δείγματα γιαουρτιού υπήρξε σημαντική μείωση των επιπέδων αφλατοξίνης σχετικά με αυτή που υπήρχε στο γάλα. Αυτό έγινε λόγω του χαμηλού pH και του σχηματισμού οργανικών οξέων κατά τη ζύμωση. Το χαμηλό pH έχει την ικανότητα να μεταβάλλει τη δομή του γάλακτος και συγκεκριμένα τις πρωτεΐνες (π.χ καζεΐνες) οι οποίες βοηθούν στο πήξιμο του γιαουρτιού. Συγκεκριμένα κατά τον σχηματισμό του γιαουρτιού η αλλαγή στη δομή της καζεΐνης του γάλακτος μπορεί να επηρεάσει την συγκέντρωση της αφλατοξίνης M1 είτε απορροφώντας την τοξίνη είτε αποβάλλοντας την στα υποπροϊόντα της ζύμωσης παρουσία βακτηρίων γαλακτικού οξέος. Όσο για τη σταθερότητα της AFM1 στην αποθήκευση του γιαουρτιού , δεν παρατηρήθηκε κάποια μείωση στην τιμή της σε διάστημα αποθήκευσης 7 ημερών στην ψύξη (7°C)(Products & Mohammadi, 2011).

Άλλες παρατηρήσεις που έγιναν ήταν ο πλήρης μετασχηματισμός της αφλατοξίνης B1 στο παράγωγο AFB2A, το οποίο προκαλείται από τα γαλακτικά οξέα του

γιαουρτιού, η μεγάλη μείωση σε ποσοστό έως και 97% της AFM1 στο όξινο γάλα και το γιαούρτι, καθώς και η υποβάθμιση της στο βουβαλίσιο γάλα λόγω της πήξης από μικρόβια και οξέα. Στο κατσικίσιο ζυμωμένο γάλα παρατηρήθηκε επίσης μείωση των επιπέδων AFM1. Συμπερασματικά καταλαβαίνουμε και από άλλες παρόμοιες έρευνες με ίδια αποτελέσματα ότι η μείωση των επιπέδων της αφλατοξίνης στο γιαούρτι μπορεί να είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH, της ύπαρξης του *Lactobacillus* sp. και της δημιουργίας οργανικών οξέων ή υποπροϊόντων ζύμωσης. Υποπροϊόντα της ζύμωσης που μπορεί να μειώσουν την AFM1 και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό από τα βιολογικά οξέα είναι πεπτίδια, αμινοξέα, αλδεΐδες και πτητικά λιπαρά οξέα.(Govaris et al., 2002) .

2.3.3.2 Επίδραση παραγόντων στα επίπεδα AFM1

Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η παρασκευή και αποθήκευση του γιαουρτιού δεν επηρεάζει το περιεχόμενο της AFM1 , ενώ άλλοι ανέφεραν από μικρή έως μεγάλη μείωση των επιπέδων.

Το χαμηλό pH μεταβάλλει την δομή των πρωτεϊνών του γάλακτος (π.χ. καζεϊνών). Αυτό οδηγεί στην αλλαγή της σύνδεσης της AFM1 με την πρωτεΐνη προκαλώντας είτε προσρόφηση είτε απόφραξη της τοξίνης στο ίζημα(Govaris et al., 2002).Κατά την αποθήκευση στο ψυγείο βρέθηκε ότι η αφλατοξίνη είναι πιο σταθερή σε γιαούρτια με τιμές pH 4,6 , όπως επίσης και το ποσοστό απώλειας της στο γάλα είναι από 13-22% μέχρι την ολοκλήρωση της ζύμωσης, ενώ αντίθετα είναι λιγότερο σταθερή σε γιαούρτια με pH 4,0 , αλλά το ποσοστό απώλειας υπολογίστηκε 16-34%.

Η σχηματιζόμενη οξύτητα του γιαουρτιού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οφείλεται κυρίως στο γαλακτικό οξύ που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, και το οποίο μπορεί να προκαλέσει την αποικοδόμηση της αφλατοξίνης M1 στο γιαούρτι. Βρέθηκε ότι γάλα οξινισμένο με γαλακτικά, οξικά ή κιτρικά οξέα παρουσίασε μεγάλη μείωση στην AFM1(Govaris et al., 2002). Η επίδραση της οξύτητας του γιαουρτιού στην παρουσία τη αφλατοξίνης πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω εφόσον έχει βρεθεί ότι η έκθεση του μορίου της αφλατοξίνης M1 σε ισχυρά οξέα(π.χ. τριφθοροξικό οξύ) είναι δυνατόν να προκαλέσει ενυδάτωση η οποία έχει καταλυθεί με το οξύ, αλλά όχι εξουδετέρωση ή υποβάθμιση του μορίου(Products & Mohammadi, 2011).

Στο στραγγιστό γιαούρτι βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα από το γιαούρτι που χρησιμοποιήθηκε σαν πρώτη ύλη. Στον ορό του γιαουρτιού τα επίπεδα AFM1 ήταν

χαμηλότερα από εκείνα στο στραγγιστό γιαούρτι και αυτό πιθανότατα οφείλεται στην σύνδεση της καζεΐνης με την AFM1.

Τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα στη δέσμευση της AFM1 μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της τοξίνης σε κάθε προϊόν, τις διαδικασίες εκχύλισης, το χρόνο επαφής των κυττάρων με την τοξίνη, τη βιωσιμότητα των κυττάρων, στη θερμοκρασία, τα επιλεγμένα στελέχη καθώς και τη σύνθεση του μέσου(κυρίως την περιεκτικότητα πρωτεΐνης και λίπους)(Campagnollo et al., 2016). Ακόμα οφείλονται στις διαφορετικές τιμές pH τους, στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AFM1 στο γάλα, σε αλλαγές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των καζεϊνών, στις διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης και φυσικά στην λανθασμένη ή εφαρμογή αναξιόπιστων μεθόδων ανάλυσης(Govaris et al., 2002).

2.3.3.3 Αρνητικές επιδράσεις στα συστατικά του γιαουρτιού.

Σχετικά με την επίδραση της αφλατοξίνης M1 στα θρεπτικά συστατικά του γιαουρτιού παρατηρήθηκαν μερικές αρνητικές επιπτώσεις. Στον *Lactobacillus bulgaricus* βρέθηκε ότι το κυτταρικό τοίχωμα έγινε πιο παχύ και κοντό σε μήκος. Ο *Staphylococcus thermophilus* άλλαξε σχήμα από κοκκοειδές σε ωοειδές ενώ εμφάνισε και μεγαλύτερες κυτταρικές αλυσίδες σε μολυσμένα δείγματα γιαουρτιού απ' ότι σε μη μολυσμένα(Products & Mohammadi, 2011).

2.3.4 AFM1 σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα

Γαλακτοκομικά προϊόντα όπως παγωτό, βούτυρο, κρέμες γάλακτος είναι πιθανό να περιέχουν ποσότητες AFM1.

Από πειράματα βρέθηκε ότι για παράδειγμα τα επίπεδα αφλατοξίνης σε αποβουτυρωμένο γάλα ήταν λίγο χαμηλότερα από εκείνα του κανονικού γάλακτος(Products & Mohammadi, 2011). Σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι κατά την παραγωγή κρέμας μικρό ποσοστό της AFM1 του γάλακτος μεταφέρεται στην κρέμα και το υπόλοιπο παραμένει στο αποβουτυρωμένο γάλα ή βουτυρόγαλα στην περίπτωση παρασκευής βουτύρου(Prandini et al., 2009).

Όσο αφορά το βούτυρο, επειδή κατά την επεξεργασία του η μεμβράνη των πρωτεϊνών γύρω από τα σφαιρίδια λίπους διασπάται και ο ορός διαχωρίζεται, και λόγω της έντονης συγγένειας της AFM1 με την καζεΐνη, η AFM1 απορροφάται από

το πρωτεϊνικό κλάσμα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κρέμα να περιέχει χαμηλότερο ποσοστό τοξίνης από το γάλα και το βούτυρο. Άρα συμπερασματικά προκύπτει ότι η αφλατοξίνη M1 εμφανίζεται λιγότερο στην λιπιδική φάση, δηλαδή στην κρέμα ή το βούτυρο και περισσότερο στον ορό και το πρωτεϊνικό κλάσμα(Products & Mohammadi, 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΕΛΕΓΧΟΣ , ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑFB1

Ο έλεγχος των επιπέδων των AFs στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές χωρίζεται σε 2 κατηγορίες:

- 1) πρόληψη μόλυνσης από μούχλα και ανάπτυξης τοξινών ,
- 2) αποτοξίνωση μολυσμένων προϊόντων .

3.1 ΠΡΟΛΗΨΗ

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος ώστε να ελεγχθούν και να μειωθούν τα επίπεδα της αφλατοξίνης M1 είναι να μειωθεί η μόλυνση των πρώτων υλών και των ζωοτροφών που προορίζονται για τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα από την αφλατοξίνη B1. Επομένως πρέπει να εφαρμόζονται μέτρα πρόληψης ώστε να μειώνεται η ανάπτυξη μυκήτων στα γεωργικά προϊόντα που προορίζονται για ζωοτροφές(Prandini et al., 2009).

Όταν εφαρμόζονται οι κανονισμοί των διεθνών οργανισμών, αναλύονται οι παράγοντες κινδύνου για την AFB1 στις καλλιέργειες και ακολουθούνται τα συστήματα ασφαλείας όπως η ανάλυση κινδύνων στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) , και οι τυπικές διαδικασίες υγιεινής λειτουργίας στις βιομηχανίες τα επίπεδα αφλατοξίνης μπορούν να ελαχιστοποιηθούν(Mollayusefian et al., 2021). Ο περιορισμός της μόλυνσης από μυκοτοξίνες μπορεί να γίνει και με χρήση καλών γεωργικών πρακτικών (GAPs), πρακτικών αποθήκευσης (GSPs) και ορθών πρακτικών παραγωγής (GMPs)(Mahato et al., 2019).

3.1.1 Αγροτικές πρακτικές για μείωση των επιπέδων αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα

Προηγμένες τεχνικές επεξεργασίας που μπορούν να διαχειριστούν τα επίπεδα αφλατοξινών στα τρόφιμα αλλά και να βοηθήσουν ώστε να διατηρηθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αγροτικών προϊόντων, μπορεί να είναι χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, ηλεκτρολυμένου νερού, παλμικού φωτός, δεσμών ηλεκτρονίων, γάμα ακτινοβολίας, φούρνου μικροκυμάτων(Mahato et al., 2019). Επιπλέον η ανάμιξη μολυσμένων με μη μολυσμένες ζωοτροφές, κάπνιση με όζον, προσθήκη αμμωνίας, χρήση προσροφητικών ουσιών, εξαγωγή αφλατοξινών με την χρήση διαλυτών και προσθήκη οξειδωτικών παραγόντων στις ζωοτροφές μπορούν να μειώσουν την μόλυνση τροφίμων από αφλατοξίνες(Mollayusefian et al., 2021).

Η χρήση προσροφητικών προτείνεται για τα υγρά τρόφιμα και συγκεκριμένα ο ενεργός άνθρακας και ο μπετονίτης έχουν ευρεία εφαρμογή για αφαίρεση αφλατοξινών(Chiewchan et al., 2015).

Το όζον κατά την εφαρμογή του αποικοδομεί τις αφλατοξίνες κάνοντας μια ηλεκτρονιόφιλη επίθεση στους διπλούς ανθρακικούς δεσμούς του φουρανίου, και ακολουθεί ο σχηματισμός πρωτογενών οξονιδίων τα οποία αναδιατάσσονται σε μονοζονικά παράγωγα όπως κετόνες, οργανικά οξέα και αλδεΐδες. Λόγω του υψηλού κόστους δεν εφαρμόζεται συχνά στα τρόφιμα(Mahato et al., 2019).

Οι ακτίνες γάμα επιδρούν επίσης στις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από την ραδιόλυση του νερού που προσβάλλει ο δακτύλιος φουρανίου της AFB1 και ανάγει την βιολογική δραστηριότητα των υποπροϊόντων. Οι ακτίνες γάμα είναι πιο αποτελεσματικές σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές(Mahato et al., 2019).

Η χρήση αμμωνίας μπορεί να επηρεάζει θετικά τις τοξικές επιδράσεις αφλατοξινών στις ζωοτροφές από φιστίκια, βαμβακόσπορο κ.α. Χρησιμοποιείται αποτελεσματικά πολλά χρόνια στις ΗΠΑ, την Γαλλία, την Νότια Αφρική, το Μεξικό, τη Βραζιλία. Κατά την αμμωνιοποίηση τα μόρια της αφλατοξίνης μετατρέπονται σε χημικές ενώσεις με ελάχιστη ή μη ανιχνεύσιμη τοξική δραστηριότητα(Spreijers, 2003).

Η χρήση ακτινοβολίας UVC (254 nm) απενεργοποιεί τα σπόρια των μυκήτων. Γενικά τα μολυσμένα σπόρια στις επιφάνειες των τροφίμων αδρανοποιούνται ευκολότερα. Η αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας εξαρτάται από το είδος του μύκητα και την μέθοδο που επιλέγεται. Η AFB1 μπορεί να ανιχνευτεί στα 222,265 και 362nm όπου εκεί απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία έχοντας μέγιστη απορρόφηση στα 362nm (Chiewchan et al., 2015).

Τελευταία έχουν μελετηθεί και αναπτυχθεί επιπλέον τόσο βιολογικές όσο και φυσικοχημικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση της AFB1 στη διατροφή γαλακτοπαραγωγικών αγελάδων(Min et al., 2020). Μερικές από αυτές ήταν η χρήση προσροφητικών ουσιών σε μολυσμένες από AFB1 αγελάδες, η χρήση βιταμίνης E, ενεργής μαγιάς, ολιγοσακχαρίτη μαννάνης, ζυμομυκήτων(*Saccharomyces cerevisiae*). Σε όλες αυτές τις δοκιμές όμως η τιμή ανίχνευσης ξεπερνούσε τα όρια της ΕΕ για την αφλατοξίνη M1(Min et al., 2020). Αντίθετα η χρήση κιτρικού οξέως συνδυαστικά με

την υγρασία και τη υψηλή θερμοκρασία (200°C) και πίεση 8N βρέθηκε αποτελεσματική για αποικοδόμηση αφλατοξινών σε σόργο(Mahato et al., 2019).

Άλλη δοκιμή έγινε με προσθήκη πηλού μπετονίτη και *Saccharomyces cerevisiae* προαιρετικά ώστε να εκτιμηθεί η ασφάλεια στο γάλα μετά από κατανάλωση μεγάλης ποσότητας AFB1 από αγελάδες. Οι συγκεντρώσεις της αφλατοξίνης μειώθηκαν. Επιπλέον χορηγήθηκαν ενέσεις ιχνοστοιχείων(χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγγάνιο) στα ζώα που θα μπορούσαν να μειώσουν το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή, αλλά δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στην ποσότητα αφλατοξίνης M1 (Min et al., 2020).

Είναι σημαντικό να υπάρχει σωστή πρόληψη και πριν την επεξεργασία των καλλιέργειών που έχουν συγκομιστεί. Η μείωση του χρόνου αναμονής, φόρτωσης και εκφόρτωσης στα φορτηγά πριν την αποθήκευση των εμπορευμάτων, καθώς και η αποφυγή θέρμανσης των κόκκων παίζουν ρόλο στην διατήρησή τους(Prandini et al., 2009).

Μια ακόμα σημαντική τεχνική για την συντήρηση γεωργικών προϊόντων είναι η ξήρανση, εφόσον έχει παρατηρηθεί ότι η ενεργότητα νερού κάτω από 0.83 εμποδίζει την παραγωγή αφλατοξινών. Είναι οικονομική και αποδοτική και μπορεί να γίνει με αρκετούς τρόπους όπως αναλύεται παρακάτω(Chiewchan et al., 2015):

- Ξήρανση στον ήλιο. Παραδοσιακή μέθοδος μετά την συγκομιδή. Χαμηλό κόστος λειτουργίας αλλά μεγάλος χρόνος ξήρανσης.
- Ξήρανση με θερμό αέρα ή αναδευόμενο αερισμό, μετά τη συγκομιδή. Σε συνδυασμό με άλλα μέσα επιταχύνει την ξήρανση. 65% μικρότερος χρόνος στεγνώματος σε σχέση με την ξήρανση στον ήλιο.
- Ξήρανση σε ζεστό αέρα. Μείωση χρόνου ξήρανσης, περιορισμός μούχλας, πιο υγιεινό περιβάλλον επεξεργασίας.
- Ξήρανση με υπέρθερμο ατμό (SSD). Παρέχει θερμότητα και απομακρύνει την εξατμιζόμενη υγρασία. Παράγει προϊόντα με μεγαλύτερο πορώδες, πιο ζωντανό χρώμα και με μικρότερη απώλεια σε θρεπτικές ουσίες. Πιο αποδοτικό σχετικά με την μικροβιακή αδρανοποίηση από την ξήρανση με θερμό αέρα.
- Υπέρυθρη ακτινοβολία (IR). Μείωση χρόνου ξήρανσης με παροχή πρόσθετης θερμότητας ώστε να επιταχύνει την διαδικασία. Το βάθος διείσδυσης της

υπέρυθρης ακτινοβολίας εξαρτάται από το είδος του τροφίμου , την σύνθεση και την περιεκτικότητά του σε υγρασία.

3.1.2 Βιολογικός έλεγχος για μείωση AFB1

Ο βιοέλεγχος πρέπει να εφαρμόζεται πριν την συγκομιδή στο χωράφι, αλλά και μετά την συγκομιδή κατά την αποθήκευση (Min et al., 2020).

Για εξουδετέρωση των τοξινών μετά την συγκομιδή έχει προταθεί η χρήση μαγιάς (*Saccharomyces cerevisiae*) και προβιοτικών βακτηρίων, όπως βακτήρια γαλακτικού οξέος. Η προσθήκη τους μπορεί να βοηθήσει στην αναστολή της ανάπτυξης μούχλας κατά την αποθήκευση και να μειώσει την παραγωγή AFB1 λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ βακτηρίων και μούχλας για θρεπτικά συστατικά. Επίσης τα μη τοξικογόνα ανταγωνιστικά στελέχη *A.flavus* και *A.parasiticus* αποκλείουν τα τοξικογόνα στελέχη του *Aspergillus* με αποτέλεσμα να μειώνουν την μόλυνση από αφλατοξίνη B1 στις καλλιέργειες (Min et al., 2020). Κάποιοι φυσικά υπάρχοντες μικροοργανισμοί όπως *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Bacillus* spp. (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis*), *Trichoderma* spp. έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη επιβλαβών μικροβίων που παράγονται από τις αφλατοξίνες στα τρόφιμα (Abrar et al., 2013).

3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1

Τα βήματα σε μια αναλυτική διαδικασία περιλαμβάνουν (Vaz et al., 2020):

- 1) Δειγματοληψία,
- 2) Προετοιμασία του δείγματος ,δηλαδή εξαγωγή και καθαρισμό,
- 3) Ανάλυση, δηλαδή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της ουσίας που μας ενδιαφέρει.

Για τις αναλύσεις μυκοτοξινών συγκεκριμένα η μεταβλητότητα μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αν αυξηθεί το μέγεθος των υποδειγμάτων και του δείγματος, ο βαθμός λείανσης και ο αριθμός των κλασμάτων που προσδιορίζονται. Ανάλογα με το τι θέλουμε να προσδιορίσουμε σε κάθε ανάλυση χρησιμοποιούμε τις αντίστοιχες μεθόδους. Αν θέλουμε να ανιχνεύσουμε την παρουσία της ουσίας που μας ενδιαφέρει στο δείγμα χρησιμοποιούμε ταχείες μεθόδους, ενώ αν θέλουμε να ποσοτικοποιήσουμε την αναλυόμενη ουσία εφαρμόζουμε ποσοτικές μεθόδους. Οι

αφλατοξίνες συνήθως προσδιορίζονται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppb)(Vaz et al., 2020).

3.2.1 Δειγματοληψία

Για να ληφθεί το τελικό αντιπροσωπευτικό δείγμα προς ανάλυση είναι σημαντικό να συλλεχθούν διαφορετικά υποδείγματα από την παρτίδα ανάλογα με το μέγεθός της. Οι μέθοδοι για τη δειγματοληψία και την ανάλυση για τους επίσημους ελέγχους που σχετίζονται με τα επίπεδα αφλατοξίνης στο γάλα έχουν καθοριστεί στον κανονισμό 401/2006 της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Καθορίζεται ότι πρέπει να παρασκευαστεί δείγμα 1 λίτρου ή κιλού τουλάχιστον, από την συλλογή 10 επιμέρους υποδειγμάτων των 100g. Επειδή το γάλα βρίσκεται σε υγρή φάση είναι ευκολότερη η μέτρηση της αφλατοξίνης, σε αντίθεση με τα στερεά προϊόντα όπως το τυρί όπου οι αφλατοξίνη δεν κατανέμεται ομοιόμορφα αλλά μπορεί να συγκεντρωθεί στα λεγόμενα «hot-spots». Άρα για να ληφθεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα πρέπει να ομογενοποιηθεί με άλεση και στη συνέχεια ανάμιξη(Vaz et al., 2020).

3.2.2 Εξαγωγή-Καθαρισμός

Για να γίνει η εξαγωγή (εκχύλιση) της AFM1 από τα δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων πρέπει να προηγηθούν βήματα όπως η αφαίρεση του λίπους και άλλως ακαθαρσιών. Αυτά γίνονται με διήθηση και φυγοκέντρηση(Vaz et al., 2020).

Εξαγωγή με χρήση διαλυτών

Σκοπός της εκχύλισης είναι να απομακρυνθεί η μυκοτοξίνη από τη μήτρα με χρήση κατάλληλου διαλύτη -συνήθως χλωροφόρμιο ή διχλωρομεθάνιο- ή με υδατικά μείγματα οργανικών διαλυτών -όπως ακετόνη, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο- και στη συνέχεια να καθαριστεί ώστε να προσδιοριστεί. Υδατικά διαλύματα χρησιμοποιούνται διότι λειτουργούν καλύτερα με τα επόμενα βήματα του καθαρισμού και συμφέρουν περιβαλλοντικά. Για το τυρί η εκχύλιση γίνεται με χρήση οργανικών διαλυτών σε μείγματα (π.χ. ακετονιτρίλιο-νερό, μεθανόλη-νερό) ή και διχλωρομεθάνιο και χλωροφόρμιο(Vaz et al., 2020).

Εναλλακτικές Μέθοδοι Εκχύλισης

Ανακαλύφθηκαν και άλλες μέθοδοι εκχύλισης χρησιμοποιώντας συνδυασμό ενζύμων όπως πεψίνη-παγκρεατίνη σε πολτοποιημένο δείγμα τυριού το οποίο

αναλύθηκε όπως ένα δείγμα γάλακτος σε στήλες ανοσοσυγγένειας (IAC) και προσδιορίστηκε με HPLC-FLD. Αυτό το είδος εκχύλισης με τα ένζυμα αποδείχθηκε πιο απλό στην εφαρμογή, έδωσε αρκετά ακριβή αποτελέσματα, είχε υψηλότερες ανακτήσεις και τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) ήταν συγκρίσιμα. Επίσης είναι πιο ήπιο για το περιβάλλον (Vaz et al., 2020).

Άλλες εναλλακτικές λύσεις της χρήσης οργανικών διαλυτών είναι είτε η εκχύλιση με στερεά ροφητικά μέσα, όπως εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και εκχύλιση στερεάς μαγνητικής φάσης (MSPE), είτε η μέθοδος QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe).

Μέθοδος QuEChERS

Το πρώτο βήμα της μεθόδου QuEChERS περιλαμβάνει ταυτόχρονη εξαγωγή και διαχωρισμό με χρήση ακετονιτριλίου και αλάτων. Στη συνέχεια ακολουθεί το βήμα του καθαρισμού όπου εκεί εκχυλίζεται η στερεά φάση της διασποράς. Μετά τα δυο αυτά βήματα μπορεί να γίνει επιπλέον καθαρισμός χρησιμοποιώντας διάφορες ροφητικές ουσίες για περισσότερη ακρίβεια στα αποτελέσματα. Ροφητές για τον καθαρισμό επιλέγονται ανάλογα με τη σύνθεση του δείγματος που θέλουμε να εξάγουμε. Κάποιες φορές χρειάζεται να χρησιμοποιήσουμε και πάνω από έναν τύπο. Σάκχαρα, λιπαρά και οργανικά οξέα καθαρίζονται με πρωτοταγή δευτεροταγή αμίνη (PSA). Οκταδεκυλικό πυρίτιο (C18) μπορεί να καθαρίσει αποτελεσματικά στερόλες, πρωτεΐνες και λιπαρές ενώσεις μακράς αλυσίδας. Χρωστικές ενώσεις όπως χλωροφύλλη, πολυφαινόλες αφαιρούνται με γραφίτοποιημένη αιθάλη (GCB) (Vaz et al., 2020).

Καθαρισμός δειγμάτων

Ο καθαρισμός πραγματοποιείται ώστε να εξαλειφθούν οι παρεμβολές στη μήτρα και οι προσυγκεντρώσεις της ουσίας που θα αναλυθεί. Εφαρμόζεται μετά την εξαγωγή ώστε να δώσει πιο ακριβή αποτελέσματα. Στις περισσότερες ταχείες μεθόδους μπορεί να παραληφθεί αφού τα αραιωμένα εκχυλίσματα μπορούν να αναλυθούν χωρίς καθαρισμό.

Πιο κοινές μέθοδοι καθαρισμού που χρησιμοποιούνται είναι οι :IAC (στήλες ανοσοσυγγένειας) ή οι στήλες MycoSep™ το οποίο είναι ένα πολυλειτουργικό σύστημα ενός βήματος.

Η ανάλυση της AFM1 στο γάλα μπορεί να γίνει μετά από αφαίρεση λίπους από τα δείγματα, χωρίς εκχύλιση χρησιμοποιώντας στήλες IAC. Για παχύρευστα ή στερεά δείγματα όμως απαιτείται εξαγωγή.

Η τεχνική στηλών IAC είναι εύκολη στη χρήση έχει μεγάλη εκλεκτικότητα και είναι αρκετά αποτελεσματική. Βασίζεται στην αναγνώριση των τοξινών από ένα αντίσωμα για αυτό είναι μιας χρήσης λόγω τη μετουσίωσης των αντισωμάτων, κάτι που την καθιστά ακριβή(Vaz et al., 2020).

3.2.2 Ανάλυση –Προσδιορισμός AFM1:

Σύμφωνα με τον AOAC(Association of Official Agricultural Chemists) υπάρχουν πολλές μέθοδοι για ποσοτικό προσδιορισμό της περιεχόμενης AFM1 σε γαλακτοκομικά προϊόντα με τις κυριότερες να είναι οι(Vaz et al., 2020):

- Υγρή χρωματογραφία (LC)
- Αέρια χρωματογραφία (GC)- Φασματομετρία μάζας (MS)
- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)
- ELISA
- Χρήση βιοαισθητήρων

Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που αναπτύσσονται για τον προσδιορισμό AFM1 στο γάλα πρέπει να μπορούν να ανιχνεύουν τα ίχνη της αφλατοξίνης σε επίπεδο ng/kg(Vaz et al., 2020).

3.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1 Ποσοτικές Αναλυτικές Μέθοδοι

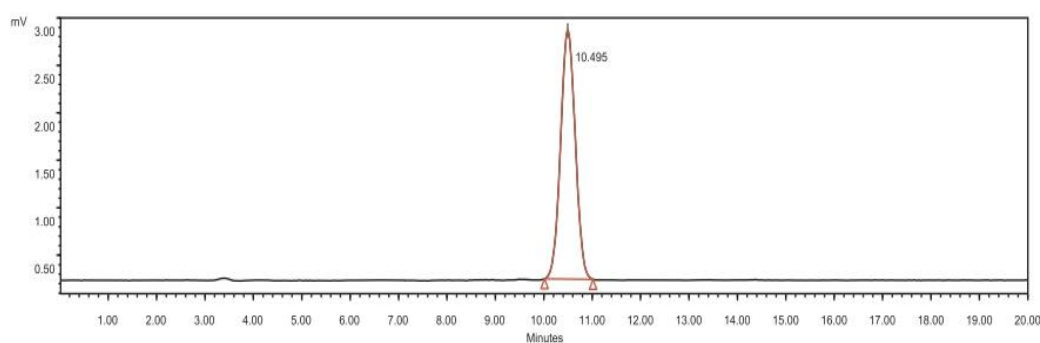
3.3.1.1 Υγρή χρωματογραφία (LC)

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια μέθοδος διαχωρισμού που εφευρέθηκε στις αρχές του 1900. Οι βελτιώσεις στην μέθοδο αυτή έχουν οδηγήσει σε βελτιωμένες αποδόσεις διαχωρισμού. Πλέον χρησιμοποιούνται τεχνικές υψηλών επιδόσεων όπως η High Performance Liquid Chromatography (HPLC) και υπερυψηλών επιδόσεων UltraHPLC (UHPLC)(Kitagawa, 2019). Σαν αναλυτική μέθοδος έχει μεγάλη ευαισθησία, δυναμικό και μεγάλο εύρος και είναι αρκετά πρακτική. Πραγματοποιείται με απορρόφηση ακτινοβολίας UV , ανίχνευση φθορισμού (FLD) ή ανίχνευση φασματομετρίας μάζας(Vaz et al., 2020). Επίσης για πολύ επιλεκτικές και

ευαίσθητες αναλύσεις έχουν χρησιμοποιηθεί συνδυασμοί της HPLC με φασματομετρία μάζας (HPLC-MS/MS). Ο συνδυασμός αυτός βοήθησε και στη ανίχνευση μεταβολιτών σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Kitagawa, 2019)

Τεχνικές με βάση την υγρή χρωματογραφία που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό AFM1 είναι οι εξής:

- HPLC αντίστροφης φάσης που έχουν ως κινητή φάση μείγματα μεθανόλης, νερού και ακετονιτριλίου. Τα εκλουστικά αυτής της μεθόδου σβήνουν τον φθορισμό των μυκοτοξινών και γι αυτό είναι απαραίτητο να γίνει χημική παραγωγοποίηση πριν ή μετά τη στήλη. Όταν γίνεται πριν τη στήλη χρησιμοποιείται τριφθορικό οξύ (TFA) ενώ μετά κάποιο αντιδραστικό αλογόνο, συνήθως βρώμιο ή ιώδιο.
- Σύζευξη LC με φασματομετρία μάζας : LC-MS ή LC-MS/MS ανάλογα το όργανο που θα χρησιμοποιηθεί. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν μια εκχύλιση και μετά ενόργανο προσδιορισμό, χωρίς να προηγηθεί καθαρισμός.
- Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συνδυαστικά με τριπλό ιονισμό ηλεκτροψεκασμού και τετραπολική διαδοχική φασματομετρία μάζας (UHPLC-ESI-MS/MS), η οποία επέτρεπε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό AFM1, ζεαραλεόνης και ωχρατοξίνης A με μεγάλη ταχύτητα και ευαισθησία. Το όριο ποσοτικοποίησης για τις μυκοτοξίνες ήταν 0,003-0,005 μg/kg (Vaz et al., 2020).

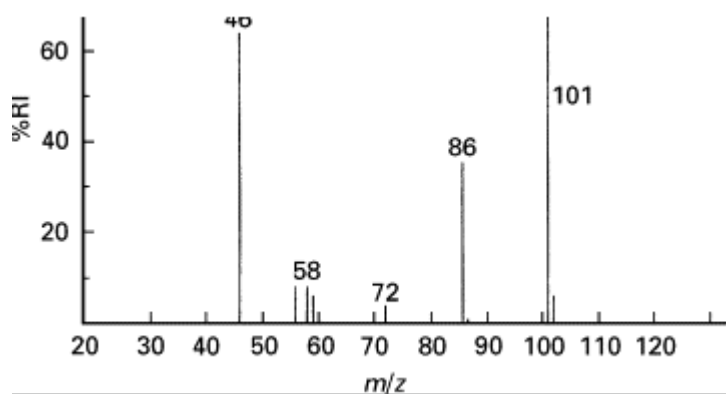


Εικόνα 3.1 . Χρωματογράφημα ενός θετικού δείγματος με αφλατοξίνη B1

3.3.1.2 Αέρια χρωματογραφία(GC)- Φασματομετρία μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια τεχνική ανάλυση χημικών ουσιών που αναπτύχθηκε ραγδαία τον 21^ο αιώνα. Έχει συμβάλλει σε πολλές φυσικές, βιολογικές

και χημικές ανακαλύψεις. Χρησιμοποιείται ειδικά στην ανακάλυψη φαρμάκων και στη βιομηχανία τροφίμων για την ασφάλεια και τον έλεγχο τους. Είναι ενόργανη τεχνική διαχωρισμού για ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια στην αέρια φάση τους. Τα φορτισμένα αυτά σωματίδια (ιόντα) παράγονται στην πηγή ιόντων. Η πηγή ιόντων επίσης βοηθά την μεταφορά στερεάς ή υγρής φάσης στην αέρια φάση. Στην συνέχεια τα ιόντα της αέρια φάσης μεταφέρονται στον αναλύτη μάζας ο οποίος ταξινομεί τα ιόντα σύμφωνα με τους λόγους μάζας-φορτίου τους (m/z). Τα διαχωρισμένα ιόντα ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή ιόντων. Τα ηλεκτρικά σήματα που παράγονται από τον ανιχνευτή ιόντων τέλος υποβάλλονται σε επεξεργασία ώστε να παραχθούν τα φάσματα μάζας. Η MS ενεργοποιεί την άμεση αναγνώριση των μορίων με βάση την αναλογία μάζας φορτίου και γι αυτό αποτελεί μια ποιοτική αναλυτική τεχνική με μεγάλη επιλεκτικότητα (Urban, 2016).



Εικόνα 3.2: Ενδεικτικό γράφημα φασματομετρίας.

Η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι ιδανική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρού μεγέθους μοριακών μεταβολιτών όπως λιπαρά οξέα, αλκοόλες, οξέα, στερόλες, τοξίνες, αμινοξέα και σάκχαρα. Είναι η πιο τυποποιημένη μέθοδος για αναλύσεις μεταβολιτών. Έχει χαρακτηριστεί λόγω των πλεονεκτημάτων της ως το «χρυσό πρότυπο», δηλαδή μέθοδος που αποτελεί πρότυπο σύγκρισης για νέες μεθόδους ανίχνευσης μεταβολιτών που αναπτύσσονται, ως προς την ευαισθησία, το εύρος και την εξειδίκευση της ανίχνευσης (Drive, 2017). Η GC-MS αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1950 και είναι απαραίτητο εργαλείο στα αναλυτικά εργαστήρια. Πέρα από το προσδιορισμό φαρμάκων και μεταβολιτών είναι ιδανική για τον προσδιορισμό πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων σε διάφορα εδάφη και περιβαλλοντικά δείγματα,

καθώς αποτελεί βάση για πολλές επίσημες μεθόδους της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA)(Sneddon et al., 2007).

Ο συνδυασμός των 2 μεθόδων οδηγεί σε πλεονεκτήματα. Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να διαχωρίσει πολλές πτητικές και ημιπτητικές ενώσεις αλλά όχι πάντα επιλεκτικά ενώ η φασματομετρία μάζας μπορεί να ανιχνεύσει επιλεκτικά ενώσεις αλλά όχι να τις διαχωρίσει. Το όριο ανίχνευσης γίνεται όσο το δυνατό χαμηλότερο(Sneddon et al., 2007).

3.3.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) εφαρμόζεται από το 1990 (Vaz et al., 2020) και είναι μια σημαντική μέθοδος για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ενώσεων. Έχει χαμηλό κόστος και μικρό συνολικό χρόνο ανάλυσης(Pyka, 2014). Ήταν η πρώτη μέθοδος που εγκρίθηκε από τον AOAC για ανίχνευση της AFM1 σε επίπεδα έως 1 ng/g. Πλέον λόγω του υψηλού ορίου ανίχνευσης ($>0,05\text{ng/g}$) και της χαμηλής ακρίβειας, δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1(Sarmast et al., 2021).



Εικόνα3.3:Ενόργανη ανάλυση TLC.

Πλεονεκτήματα:

- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις που η HPLC-UV και GC δεν είναι κατάλληλες λόγω απουσίας δραστηριότητας στην υπεριώδη ακτινοβολία ή απουσία πτητικότητας που είναι σημαντικός παράγοντας για την GC.

- Συγκριτικά με την HPLC έχει μεγαλύτερη καθαρότητα και υψηλότερες συγκεντρώσεις των ουσιών στα δείγματα. Επίσης δεν υπάρχει κίνδυνος οι ακαθαρσίες των δειγμάτων να επηρεάσουν την στήλη.
- Δεν χρειάζεται ακριβό εξοπλισμό και είναι ευκολότερη στην λειτουργία της συγκριτικά με τις HPLC, GC.
- Επιτρέπει παράλληλο διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα.
- Είναι δυνατό να τοποθετηθεί σε πλάκες TLC μεγάλος όγκος δείγματος επειδή η περίσσεια του διαλύτη αφαιρείται (Pyka, 2014).

Τεχνικές TLC που χρησιμοποιούνται ευρέως για ανίχνευση αφλατοξινών (Vaz et al., 2020):

- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC).

TLC και HPTLC διαφέρουν στην επεξεργασία των δειγμάτων και των δεδομένων και στα διαφορετικά μεγέθη της στατικής φάσης.

- Χρωματογραφία στιβάδας υπερπίεσης (OPLC). Συνδυάζει τα οφέλη TLC-HPTLC.

3.3.2 Ταχείες Αναλυτικές Μέθοδοι (ανοσοδοκιμές)

Οι ανοσοδοκιμές είναι μια μέθοδος ανάλυσης που απαιτεί ένα βήμα προετοιμασίας του δείγματος και βασίζεται σε μια αντίδραση αντισώματος-αντιγόνου. Για το γάλα πρέπει να γίνει φυγοκέντρηση ώστε να γίνει απολίπανση ενώ το αποβουτυρωμένο γάλα αναλύεται απευθείας. Το τυρί πρέπει να περάσει το στάδιο της εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες (π.χ. μεθανόλη, εξάνιο) για αφαίρεση παρεμβολών όπως το λίπος (Vaz et al., 2020).

3.3.2.1 Μέθοδος ELISA

Η μέθοδος ELISA είναι η πιο διαδεδομένη για την αφλατοξίνη M1 σε βρεφικό γάλα, γάλα σε σκόνη, γάλα παστεριωμένο σε υπερύψηλη θερμοκρασία (UHT) παγωτό, τυρί και γιαούρτι. Έχει μεγάλη ευαισθησία, είναι απλή και υπάρχει μεγάλος αριθμός διαθέσιμων κιτ ELISA που διατίθενται εύκολα (Vaz et al., 2020). Το όριο ανίχνευσης είναι 0,015 μg/kg (Fan et al., 2020).

Βασίζεται στις αντιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος, που αντιπροσωπεύουν τη χημική αλληλεπίδραση μεταξύ των αντισωμάτων που παράγονται από τα Β κύτταρα των λευκοκυττάρων και των αντιγόνων. Αυτή η απόκριση παίζει ρόλο στην προστασία του οργανισμού από παθογόνους μικροοργανισμού και τοξίνες. Η ELISA επομένως μπορεί να φανεί χρήσιμη στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, με εκλεκτικότητα και ευαισθησία, των αντιγόνων όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, ορμόνες, δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες και πεπτίδια(Sakamoto et al., 2018)

Πλεονεκτήματα ELISA:

- Απλή διαδικασία
- Μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία
- Μεγάλη αποτελεσματικότητα αφού μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονες αναλύσεις χωρίς πολύπλοκες προεπεξεργασίες στα δείγματα
- Ασφαλείς και φιλική προς το περιβάλλον, δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών
- Οικονομική αφού χρησιμοποιεί χαμηλού κόστους αντιδραστήρια(Sakamoto et al., 2018).

Μειονεκτήματα ELISA :

- Εντατική εργασία, δαπανηρή παρασκευή των αντισωμάτων λόγω της πολυπλοκότητας της τεχνικής αφού απαιτεί ακριβά κυτταρικά μέσα καλλιέργειας για λήψη ενός συγκεκριμένου αντισώματος.
- Μεγάλη πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων
- Αστάθεια αντισωμάτων γιατί τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που έχουν συγκεκριμένες απαιτήσεις στην ψύξη, μεταφορά και αποθήκευσή τους(Sakamoto et al., 2018).
- Μεγάλες περίοδοι επώασης, πολλά στάδια πλύσης και ανάμιξης(Vaz et al., 2020).

Τύποι ELISA(Sakamoto et al., 2018):

1. Άμεση ELISA: Ένα αντιγόνο ή ένα αντίσωμα ακινητοποιείται στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Αφού η επιφάνεια φράζει με άλλες πρωτεΐνες (όπως καζεΐνη, αλβουμίνη και ζελατίνη), για να αποφευχθεί η μη ειδική προσρόφηση

άλλων πρωτεϊνών, το αντίσωμα ή αντιγόνο με το αντίστοιχο ένζυμο αφήνεται να αντιδράσει με τους ακινητοποιημένους στόχους και αναπτύσσει χρώμα στα κατάλληλα υποστρώματα. Το σήμα αυξάνεται όταν αυξάνεται ο αριθμός στόχων. Η άμεση ELISA χρησιμοποιείται για ποιοτική ανάλυση μακρομορίων.

2. Ανταγωνιστική ELISA: Βασίζεται στη ανταγωνιστική αντίδραση μεταξύ στόχων (αντιγόνο ή αντίσωμα) των δειγμάτων με ένζυμο στόχους έναντι ακινητοποιημένων αντισωμάτων ή αντιγόνων που ανταποκρίνονται. Για να ανιχνευθεί το αντιγόνο στην ανταγωνιστική ELISA, χρησιμοποιείται ένα αντιγόνο σεσημασμένο με ένζυμο ώστε να ανταγωνιστεί τα αντιγόνα στόχους. Άρα όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα αντιγόνου στο δείγμα, τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα σεσημασμένου με ένζυμο αντιγόνου που έχει συνδεθεί με το αντίσωμα. Το σήμα μειώνεται με αύξηση της ποσότητας του αντιγόνου στόχου. Στην περίπτωση αυτή είναι κατάλληλη για την μέτρηση μακρομορίων. Εάν το αντιγόνο όμως είναι ένωση χαμηλού μοριακού βάρους τα προϊόντα σύζευξης που προκύπτουν δεν αναγνωρίζονται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα, οπότε η ανάλυση αποτυγχάνει. Οι άμεσες και ανταγωνιστικές μέθοδοι ELISA είναι απλές γιατί απαιτούν για την ανάλυση μόνο ένα αντίσωμα.
3. Έμμεση ELISA: Η έμμεση ELISA έχει αναπτυχθεί σύμφωνα με την άμεση ELISA για να αξιολογεί την παρουσία αντισωμάτων στους αντιορούς. Το βασικό βήμα στην τεχνική είναι η διεργασία δυο δεσμεύσεων, του πρωτογενούς αντισώματος και του δευτερογενούς ενζυμικά επισημασμένου αντισώματος. Το αντιγόνο στόχος δηλαδή ανιχνεύεται έμμεσα από το δευτερεύον αντίσωμα που έχει επισημανθεί με ένζυμο. Το αντιγόνο είναι ακινητοποιημένο στη πλάκα μικροτιτλοδότησης που φράζει την επιφάνεια με πρωτεΐνες. Το πρωτεύον αντίσωμα δεσμεύει το ακινητοποιημένο αντιγόνο και στη συνέχεια αντιδρά με το δευτερεύον αντίσωμα που έχει το ένζυμο και αναπτύσσει χρώμα. Το σήμα αυξάνεται όταν αυξάνεται η ποσότητα του ακινητοποιημένου αντιγόνου στόχου. Η έμμεση ELISA είναι κατάλληλη για την ανάλυση μακρομορίων.
4. Έμμεση ανταγωνιστική ELISA (icELISA): Αποτελεί συνδυασμό της έμμεσης με την ανταγωνιστική ELISA. Το αντιγόνο στόχος ακινητοποιείται σε στερεή φάση στην πλάκα μικροτιτλοδότησης η οποία είναι φραγμένη. Έπειτα το

ελεύθερο αντιγόνο στόχος και το αντίσωμα αφήνονται να επωαστούν και να υπάρξει ανταγωνισμός μεταξύ του ελεύθερου και του ακινητοποιημένου αντιγόνου ενάντια στα αντισώματα. Το πρωτεύον αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το ακινητοποιημένο αντιγόνο ανιχνεύεται από το δευτερογενές ενζυμικά σεσημασμένο αντίσωμα. Το σήμα μειώνεται όταν αυξάνεται η ποσότητα του ελεύθερου αντιγόνου. Είναι κατάλληλη τεχνική για μέτρηση μακρομορίων αλλά και του απτενίου(ένωση χαμηλού μοριακού βάρους).

Υπάρχουν πλεονεκτήματα στις έμμεσες μεθόδους συγκριτικά με τις άμεσες λόγω της χρήσης ενζυμικά σεσημασμένων δευτερογενών αντισωμάτων σχετικά με την ευελιξία και την ευαισθησία τους.

5. Sandwich ELISA: Στην τεχνική αυτή το αντιγόνο στόχος ανιχνεύεται μεταξύ δυο αντισωμάτων. Η ELISA αυτή ξεκινά με την ακινητοποίηση ενός αντισώματος (αντίσωμα σύλληψης) στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Για την αποφυγή προσρόφησης άλλως μη ειδικών πρωτεϊνών το αντιγόνο του δείγματος αφήνεται να αντιδράσει με το αντίσωμα σύλληψης και το αντιγόνο του αντισώματος αυτού επαλείφεται με ένα ενζυμικά σεσημασμένο αντίσωμα ώστε να αναπτύξει χρώμα. Χρησιμοποιείται για μέτρηση μακρομορίων με μερικές εξαιρέσεις. Παρουσιάζει επίσης μεγαλύτερη εξειδίκευση και μεγαλύτερο εύρος εργασίας σχετικά με άλλους τύπους ELISA.

Λόγω των μειονεκτημάτων της μεθόδου έχουν αναπτυχθεί νέες βελτιωμένες τεχνικές που ανιχνεύουν την AFM1 σε γάλα και προϊόντα του όπως ο ανοσολογικός προσδιορισμός χημειοφωταύγειας (CL ELISA) που επιτρέπει τη χρήση πλακών με έως και 384 φρεάτια και όγκο ανάλυσης 20μL αντίθετα με την απλή μέθοδο χωρητικότητας 96 φρεατίων. Έχει μειωμένο κόστος ανάλυσης και έχει υψηλή αναλυτική απόδοση(Sakamoto et al., 2018).

3.3.2.2 Βιοαισθητήρες

Ο βιοαισθητήρας είναι μια φορητή αναλυτική συσκευή μικρού μεγέθους, που αναγνωρίζει συνδυασμούς βιομορίων, όπως νουκλεϊκά οξέα και αντισώματα και μπορεί να ανιχνεύει βιολογικά ή χημικά υλικά με μεγάλη ευαισθησία. Είναι απλή, οικονομική και γρήγορη συσκευή ειδική για την ανίχνευση της μυκοτοξίνης που θέλουμε(Vaz et al., 2020).

Οι ανοσοαισθητήρες είναι τύποι βιοαισθητήρων. Κάνουν χρήση της τεχνικής της μεταξοτυπίας. Έχουν ένα ζεύγος ηλεκτροδίων (ένα μέτρησης , ένα αναφοράς). Το ένα ηλεκτρόδιο είναι επικαλυμμένο με τα αντισώματα που διατηρούν τις αφλατοξίνες του δείγματος που μας ενδιαφέρουν και το άλλο αποτελείται από ένα μίγμα Ag/AgCl. Η μέτρηση είναι παρόμοια με εκείνη της ELISA(Vaz et al., 2020).

3.3.3 Άλλες μέθοδοι

Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1 σε γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ο κολλοειδής χρυσός με όριο 0,3 μg/kg, η χημειοφωταύγεια με όριο 0,025 μg/kg, η UHPLC με όριο 0,001 μg/kg και η HPLC με 0,003 μg/kg. Επίσης η μέθοδος AFM1-POCT (Point-Of-Care Testing) απαιτεί πολύ λίγο χρόνο πραγματοποιώντας όμως ανίχνευση μεγάλης ακρίβειας. Βασίζεται σε ανοσοδοκιμασία φθορισμού. Το όργανο είναι φορητό και ο χρόνος ανίχνευσης είναι 5 λεπτά. Πληροί το όριο ανίχνευσης (0,05-0,5 μg/kg) και μπορεί να γίνει δειγματοληψία επιτόπου(Fan et al., 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ, ΚΑΤΑΓΕΓΡΑΜΜΕΝΕΣ ΕΞΑΡΣΕΙΣ, ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

4.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΕΓΡΑΜΜΕΝΕΣ ΕΞΑΡΣΕΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΚΩΣΗΣ

Η αφλατοξίνη ανακαλύφθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1960 μετά το ξέσπασμα μιας άγνωστης νόσου που ονομάστηκε «Νόσος Turkey X», όπου πολλές γαλοπούλες πέθαναν ξαφνικά μετά από κατανάλωση μουχλιασμένων φιστικιών. Τα φιστίκια βρέθηκε ότι είχαν μολυνθεί από *A. flavus* (Tan, 2020). Το πρώτο άρθρο που γράφτηκε και αναφέρθηκε στην αφλατοξίνη B1 ήταν το 1963 από τον Armbricht (ο οποίος ανακάλυψε και το συγκεκριμένο τύπο μυκοτοξίνης στην Αγγλία) και τους συνεργάτες του, για την ύπαρξη της σε μολυσμένο φυσικόλευρο (Klingelhöfer et al., 2018).

Το 1974 καταγράφηκε σε περίπου 200 χωριά της δυτικής Ινδίας ένα μεγάλο ξέσπασμα ηπατίτιδας που προκλήθηκε από αφλατοξίνες. Κράτησε 2 περίπου μήνες και προκλήθηκαν 106 θάνατοι. Οι κάτοικοι που προσβλήθηκαν από τον ιό κατανάλωναν σαν βασική τροφή μολυσμένο αραβόσιτο. Η ανάλυση των δειγμάτων του αραβόσιτου έδειξε ότι είχε μολυνθεί από *A. flavus* σε επίπεδα 6,25-15,6 ppm και τα άτομα κατανάλωναν ποσότητες αφλατοξινών σε επίπεδα 2000-6000 μg/kg καθημερινά για διάστημα ενός μήνα. Τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς ήταν οιδήματα στα κάτω άκρα, ταχέως αναπτυσσόμενος ασκίτης (συσσώρευση υγρού στην κοιλιακή περιοχή), πυλαία υπέρταση και αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας. Το 1974 υπήρξε άλλη μια έξαρση τοξικής ηπατίτιδας σε ανθρώπους και σκύλους. Οι μελέτες και στις 2 εστίες έδειξαν ότι η αιτία των εξάρσεων ήταν οι αφλατοξίνες. Στην 10ετή παρακολούθηση στους ασθενείς που ακολούθησε μετά την προσβολή τους από την ασθένεια, όλοι είχαν αναρρώσει πλήρως και δεν είχαν κάποια αρνητική επίδραση στην υγεία τους (Reddy & Raghavender, 2007).

Το 1982 στην Κένυα καταγράφηκε επίσης μεγάλο ξέσπασμα αφλατοξινών. Τα περιστατικά αυτά είχαν τρομερές οικονομικές απώλειες, ελλείψεις στα τρόφιμα και επιπτώσεις στο αγροτικό εμπόριο (Tan, 2020).

Τον Οκτώβριο του 1985 σε εστία αφλατοξίκωσης στην κεντρική Ινδία σε πουλερικά η παραγωγή αυγών μειώθηκε κατά 40-85% και τα πτηνά έπασχαν από διάφορες ηπατικές αλλοιώσεις. Στις ζωοτροφές των πτηνών ανιχνεύτηκαν ποσότητες 600 µg/kg αφλατοξίνης. Δεν σημειώθηκε θνησιμότητα όμως και μετά την αλλαγή της τροφής η παραγωγή αυγών αυξήθηκε σταδιακά. Στην ίδια περιοχή υπήρξε άλλη μια εστία αφλατοξίκωσης σε πτηνοτροφικές μονάδες που οδήγησε σε ποσοστό θνησιμότητας 100%. Τα πουλιά τράφηκαν με αραβόσιτο και αραχίδες με επίπεδα αφλατοξίνης 1400-3600 µg/kg (Reddy & Raghavender, 2007).

Το 1988 στη Μαλαισία πέθαναν 13 παιδιά κατά τη διάρκεια μιας έξαρσης οξείας ηπατικής εγκεφαλοπάθειας που προκλήθηκε από αφλατοξίνες (Klingelhöfer et al., 2018).

Σε μια άλλη περιοχή της Ινδίας το 1994, πάνω από 200.000 κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής πέθαναν αφού κατανάλωσαν μολυσμένο γεύμα αραχίδων με αφλατοξίνες σε επίπεδο 3590 µg/kg (Reddy & Raghavender, 2007).

Το μεγαλύτερο ξέσπασμα αφλατοξίκωσης που έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα έγινε σε μία περιοχή της Κένυας με 771.500 κατοίκους τον Ιανουάριο- Ιούνιο του 2004 (Reddy & Raghavender, 2007), όπου προηγουμένως το 1981 υπήρξε άλλη μια μόλυνση από αφλατοξίνες. Η επιδημία είχε ως αποτέλεσμα 317 κρούσματα και 125 θανάτους. Η πηγή της αφλατοξίνης ήταν κυρίως μολυσμένος αραβόσιτος όπου τα επίπεδα που περιείχε ξεπερνούσαν τα 5000 ng/kg, ενώ το όριο ήταν τα 20 ng/kg. Τα συμπτώματα που παρουσίασαν οι ασθενείς ήταν κοιλιακοί πόνοι, ηπατική νέκρωση και πνευμονικό οίδημα. Αργότερα διαγνώστηκαν με αφλατοξίκωση. Οι ασθενείς κυμαίνονταν σε ηλικίες από 1 έως 83 ετών με μέσο όρο τα 22 έτη. Η κατάποση υπολογίστηκε περίπου στα 50mg AFB1/ημέρα (Tan, 2020).

Έρευνες μετά το μεγάλο αυτό ξέσπασμα ανέλυσαν τους παράγοντες που το προκάλεσαν. Κάποιοι από αυτούς ήταν το γεγονός ότι το καλαμπόκι αποθηκεύτηκε σε υγρό και ζεστό περιβάλλον ευνοώντας την ανάπτυξη των μυκήτων. Επίσης δεν εφαρμόστηκε μηχανική ξήρανση στις καλλιέργειες για να αποφευχθεί η υγρασία. Ακόμη έγινε πρόωρη συγκομιδή λόγω έντονων βροχοπτώσεων και αποθήκευση σε σπίτια με ελλιπείς εγκαταστάσεις. Θύματα του ξεσπάσματος ήταν κυρίως άτομα χαμηλής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης που αναγκαστικά τρέφονταν με

αραβόσιτο. Σημαντικό ρόλο έπαιξε και η έλλειψη ιατρικών πόρων στη χώρα και η δύσκολη πρόσβαση σε ιατρική περίθαλψη(Tan, 2020).

Κάποια μέτρα που πάρθηκαν για να αντιμετωπιστούν τέτοια ζητήματα ήταν το δημόσιο έργο AflaSTOP που ξεκίνησε από τοπικούς φορείς, το οποίο παρέχει μέσα για ασφαλή αποθήκευση όπως το φορητό στεγνωτήριο EasyDry για την μείωση της υγρασίας(Tan, 2020).

Το 2013 στη Σερβία ξέσπασε σοβαρό πρόβλημα στις ζωοτροφές λόγω ύπαρξης αφλατοξινών(Horvatovic et al., 2018). Την ίδια χρονιά καταγράφηκαν και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες όπως Ρουμανία και Κροατία δείγματα γάλακτος μολυσμένα με αφλατοξίνη(Kumar et al., 2017).

Τον Ιούνιο του 2016 σε διαφορετικά χωριά σε περιοχές της κεντρικής Τανζανίας ξέσπασε μια άγνωστη ασθένεια με συμπτώματα όπως ηπατική ανεπάρκεια και γαστρεντερικές διαταραχές. Τελικά αφού αποκλείστηκαν άλλες αιτιολογίες και αφού τα συμπτώματα έμοιαζαν με εκείνα της οξείας αφλατοξίκωσης επιβεβαιώθηκε ότι η νόσος προκλήθηκε από αφλατοξίνες. Οι κάτοικοι στις περιοχές αυτές είναι γεωργοί και έτσι παρήγαγαν και κατανάλωναν σε μεγάλες ποσότητες αραβόσιτου ο οποίος είναι ευαίσθητος στην μόλυνση από αφλατοξίνες και το ημίξηρο κλίμα ευνοούσε την ανάπτυξή τους. Οι έρευνες που έγιναν μετά το ξέσπασμα έδειξαν ταυτόχρονη εμφάνιση αφλατοξινών με άλλες μυκοτοξίνες. Συνολικά καταγράφηκαν 68 περιπτώσεις οξείας αφλατοξίκωσης με 20 θανάτους (ποσοστό θνησιμότητας 30%). Το 1^ο κρούσμα ήταν ένα αγόρι 17 ετών και τα συμπτώματα που εμφάνισε ήταν εμετοί, αδιαθεσία, κοιλιακοί πόνοι, ίκτερος και χρειάστηκε να νοσηλευτεί , όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειάς του. Τα ζώα του ίδιου νοικοκυριού παρουσίασαν επίσης συμπτώματα και κάποια πέθαναν(Kamala et al., 2018).

4.1.2 Επιδημιολογία

Οι αφλατοξίνες συνδέονται σημαντικά με τον κίνδυνο για Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα (HCC). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) καταγράφηκαν το 2015 788.000 θάνατοι από HCC και χαρακτηρίστηκε ως η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως μετά από τον καρκίνο στον πνεύμονα. Επίσης οι αφλατοξίνες σε συνδυασμό με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV)είναι ιδιαίτερα καρκινογόνες(Klingelhöfer et al., 2018).

Σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες 4,5 δισεκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έχουν εκτεθεί σε αφλατοξίνες. Κάθε χρόνο 15.000-25.000 περιστατικά καρκίνου του ήπατος είναι αποτέλεσμα της χρόνια έκθεσης στις αφλατοξίνες κυρίως στις χώρες της Αφρικής και της Ασίας, όπου ο πληθυσμός εκτίθεται ήδη στον ιό της ηπατίτιδας Β(Tan, 2020)(Chiewchan et al., 2015).

4.2 ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΠΛΑΙΣΙΑ

Η Επιτροπή Διατροφικού Κώδικα (Codex Alimentarius Commission) μαζί με άλλους οργανισμούς της, διαμορφώνει πρότυπα οδηγίες και συστάσεις ώστε να αντιμετωπίσουν ζητήματα ασφάλειας τροφίμων σχετικά με χημικούς, φυσικούς και βιολογικούς κινδύνους. Το HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) είναι ένα σύστημα που αναγνωρίζει συγκεκριμένους κινδύνους και προβλέπει προληπτικές μετρήσεις για τον έλεγχο των κινδύνων αυτών(Giagkinhs et.al.,2015).

Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) είναι ο οργανισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης που παρέχει επιστημονικές συμβουλές και επικοινωνεί σχετικά με αναδυόμενους κινδύνους που σχετίζονται με την τροφική αλυσίδα. Ο αντίστοιχος οργανισμός στην Αμερική είναι ο FDA (Food and Drug Administration).

Παράγοντες προσδιορισμού της δράσης των ουσιών:

- 1) Αποτελεσματική δόση (Effective Dose-ED) : Χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να εκφράσουμε τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου συναρτήσει της θεραπευτικής του δράσης.
- 2) Τοξική δόση (Toxic Dose –TD) – Θανατηφόρα δόση (Lethal Dose- LD) : χρησιμοποιούνται σε τοξικολογικές μελέτες για την έκφραση της συγκέντρωσης ενός ξενοβιοτικού παράγοντα συναρτήσει της τοξικής του δράσης. Η LD χρησιμοποιείται κυρίως σε μελέτες οξείας τοξικότητας όπου η τοξική ουσία μπορεί να προκαλέσει θάνατο.

Για τους παράγοντες αυτούς προσδιορίζεται συνήθως η δόση αυτή που μπορεί να προκαλέσει το αναμενόμενο αποτέλεσμα στο 50% του πληθυσμού στον οποίο εκτελείται το πείραμα. Η ED₅₀ είναι η δόση που προκαλεί το αναμενόμενο θεραπευτικό αποτέλεσμα στο 50% του πληθυσμού που χορηγήθηκε. Η TD₅₀ είναι η δόση η οποία προκαλεί ένα προκαθορισμένο τοξικό αποτέλεσμα στο 50% του

πληθυσμού. Η LD₅₀ είναι η δόση που προκαλεί τον θάνατο στο 50% του πληθυσμού που χορηγήθηκε (Giagkinhs et.al.,2015).

Κατηγορίες τοξικότητας	Συγκέντρωση ουσίας ανά kg βάρους σώματος
Πολύ υψηλής τοξικότητας	≤1 mg/kg
Υψηλής τοξικότητας	1-50 mg/kg
Μέτριας τοξικότητας	50-500 mg/kg
Ελάχιστης τοξικότητας	0,5-5 g/kg
Πρακτικά μη τοξικές	5-15 g/kg
Σχετικά αβλαβής	>15 g/kg

Πίνακας 4.1: Γενική κατηγοριοποίηση ξеноβιοτικών ουσιών με βάση την τοξικότητα τους (Giagkinhs et.al.,2015).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει θεσμοθετήσει κάποιες παραμέτρους εκτίμησης κινδύνου για τις δυνητικά τοξικές ουσίες στις οποίες εκτίθεται ο άνθρωπος (Γιαγκίνης et.al.,2015).

- Ημερήσια αποδεκτή πρόσληψη (Acceptable Daily Intake –ADI): εκτίμηση της ημερήσιας δόσης που μπορεί να προσληφθεί χωρίς να προκαλέσει επιβλαβείς επιδράσεις στην υγεία του πληθυσμού. Χρησιμοποιείται κυρίως για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας των υπολειμμάτων μιας τοξικής ουσίας στα τρόφιμα.
- Ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (Tolerable Daily Intake –TDI) : εκφράζει την ημερήσια δόση μιας χημικής ουσίας, η οποία αν και δεν είναι αποδεκτή, θεωρείται ανεκτική καθώς με τη δόση αυτή δεν προκαλούνται τοξικές επιδράσεις στην υγεία.
- Μέγιστη ανεκτή δόση (Maximum Tolerated Dose – MTD) : καθορίζει την υψηλότερη δόση που στα ζώα δεν επηρεάζει σε σημαντικό στατιστικό βαθμό την καλή υγεία και μακροζωία τους. Χρησιμοποιείται για τοξικές ουσίες που είναι άμεσα καρκινογόνες (π.χ. αφλατοξίνες) και δρουν σε οποιαδήποτε συγκέντρωση μεγαλύτερη της μηδενικής.

Για κάθε τοξική ουσία καθορίζεται επίσης ένα μέγιστο όριο καταλοίπων (Maximum Residue Level- MRL) το οποίο εκφράζει τη μέγιστη ποσότητα υπολειμμάτων μιας ουσίας που βρίσκεται σε ένα τρόφιμο και η οποία είναι τοξικολογικά αποδεκτή κατά

την κατανάλωσή του. Η παράμετρος MRL δεν αποτελεί τοξικολογικό δείκτη αλλά χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την εισαγωγή και διάθεσή του προϊόντος στην αγορά(Γιαγκίνης et.al.,2015).

4.2.1 Νομοθετικά όρια που έχουν οριστεί για τις μυκοτοξίνες

Μεγαλύτερο ποσοστό από το 25% της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής είναι μολυσμένο με μυκοτοξίνες που το επίπεδο τους ξεπερνάει τα όρια της ΕΕ και του Codex(Vaz et al., 2020). Η ύπαρξη μυκοτοξινών δεν αποτελεί μόνο πρόβλημα υγείας για τον άνθρωπο και τα ζώα, αλλά προκαλεί και οικονομικές απώλειες για την πρωτογενή παραγωγή εφόσον προκαλούν κακή παραγωγικότητα των ζώων. Επομένως οι σοβαρές συνέπειες της κατανάλωσης μυκοτοξινών οδήγησαν την Ευρωπαϊκή Ένωση στον καθορισμό ανώτατων ορίων (MIs) σε ορισμένες επιβλαβείς μυκοτοξίνες για την ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση(Flores-Flores et al., 2015). Γενικά τα όρια της νομοθεσίας αλλάζουν από χώρα σε χώρα ανάλογα με το επίπεδο ανάπτυξης κάθε μίας αλλά και την οικονομική κατάστασή της(Products & Mohammadi, 2011). Οι τιμές LD50 για τις μυκοτοξίνες κυμαίνονται μεταξύ 0,5-10 mg/kg σωματικού βάρους σε διαφορετικά είδη ζώων(Alshannaq & Yu, 2017).

4.2.2 Νομοθετικά όρια για τις αφλατοξίνες B1 και M1

Από το 1969 ο FDA ελέγχει και ορίζει τα επίπεδα των αφλατοξινών λόγω των ανησυχητικών αρνητικών επιδράσεων τους στην υγεία, και έτσι έχει καθορίσει συγκεκριμένα επιτρεπόμενα όρια που πρέπει να απαντώνται στα τρόφιμα αλλά και τις ζωοτροφές(Alshannaq & Yu, 2017).

Για την αφλατοξίνη B1 που θεωρείται από τις πιο τοξικές χημικές ενώσεις έχει σημειωθεί σαν θανατηφόρα δόση (LD50) ένα εύρος από 5 έως 50 mg/kg για τα περισσότερα είδη ζώων. Για άλλα είδη πιο ευαίσθητα όπως σκυλιά, γάτες, πάπιες, γουρούνια το όριο είναι ακόμη χαμηλότερο(Ketney et al., 2017).

Τα συνήθη όρια για την AFB1 είναι 5 mg/kg και για τις συνολικές αφλατοξίνες 15 mg/kg, αλλά η Ευρωπαϊκή Ένωση (E.E. 2006) καθόρισε πιο αυστηρούς κανονισμούς για την AFB1 αλλά και τις συνολικές αφλατοξίνες σε δημητριακά, ξηρούς καρπούς, φιστίκια και αποξηραμένα φρούτα(Ketney et al., 2017). Καθόρισε ως μέγιστο επιτρεπόμενο επίπεδο για την AFB1 στα δημητριακά και τα προϊόντα τους τα 2,0 mg/kg και 0,1 mg/kg στις επεξεργασμένες παιδικές τροφές με βάση δημητριακά(Klingelhöfer et al., 2018). Για τα υλικά ζωοτροφών έχει καθορίσει ως

όριο τα 20 µg/kg, για συμπληρωματικές και πλήρεις τροφές τα 10 µg/kg και για σύνθετες ζωοτροφές τα 5 µg/kg στα γαλακτοπαραγωγικά βοοειδή, μοσχάρια, αρνιά, πρόβατα κατσίκες αλλά και πουλερικά και χοιρίδια (Tozzi et al., 2016).

Στην Αμερική ο FDA όρισε ως ανεκτό επίπεδο για την AFB1 τα 20 mg/kg και τα 0,5 mg/kg ως μέγιστο ανεκτό επίπεδο για την AFM1 στο γάλα (FDA 2000) (Klingelhöfer et al., 2018).

Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια για την ύπαρξη AFM1 στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν καθοριστεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή τα 0,05µg/kg για το γάλα(νωπό, παστεριωμένο, θερμικά επεξεργασμένο και γάλα για παρασκευή προϊόντων) και 0,025 ng/kg για παιδικές τροφές με γάλα (Pandey et al., 2021) (Batrinou et al., 2020). Στην Αυστρία και την Ελβετία, το μέγιστο επίπεδο για τις βρεφικές τροφές είναι μόλις 10 pg/mL (Govaris et al., 2002). Επίσης για το τυρί τέθηκαν προσωρινά όρια 0,02µg/kg στην Ολλανδία, 0,025µg/kg στην Ελβετία και 0,045 µg/kg στην Ιταλία (Batrinou et al., 2020).

Χώρα	Όρια (µg/kg)	Πηγή (Οργανισμός)
Ηνωμένες Πολιτείες	0,05	US FDA
Ευρωπαϊκές χώρες	0,05	European Commission
Ιράν	0,05	ISIRI
Τουρκία	0,05	Codex Alimentarius
Βραζιλία	0,50	
Ιταλία	0,05	
Κίνα	0,50	
Πακιστάν	0,05	
Ελβετία	0,05	
Ολλανδία	0,05	
Αργεντινή	0,05	
Αίγυπτος	0,00	
Μεξικό	0,50	
Συρία	0,20	
Ινδονησία	5,00	

Πίνακας 4.2: Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια για την ύπαρξη AFM1 στο γάλα σε διαφορετικές χώρες(Campagnollo et al., 2016)(Vaz et al., 2020).

Χώρα	Γαλακτοκομικό Προϊόν	Μέγιστο όριο ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Πηγή(Οργανισμός)
Ηνωμένες Πολιτείες	Γαλακτοκομικά προϊόντα	0,50	US FDA
Ευρώπη	Γαλακτοκομικά πρ.	0,05	European Comission
Ιράν	Σκόνη γάλακτος	0,50	ISIRI
Ιράν	Βούτυρο	0,020	ISIRI
Ιράν	Τυρί	0,250	ISIRI
Τουρκία	Τυρί	0,250	Codex ALimentarius
Βραζιλία	Τυρί	2,50	
Βραζιλία	Σκόνη γάλακτος	5,00	
Ιταλία	Μαλακό τυρί	0,250	
Ιταλία	Σκληρό τυρί	0,450	
Κίνα	Γαλακτοκομικά πρ.	0,50	
Ελβετία	Τυρί	0,250	
Αργεντινή	Σκόνη γάλακτος	0,50	
Αργεντινή	Τυρί	0,25	
Αίγυπτος	Γαλακτοκομικά πρ.	0,00	
Ολλανδία	Βούτυρο	0,020	
Ολλανδία	Τυρί	0,020	
Μεξικό	Γαλακτοκομικά πρ.	0,50	
Συρία	Σκόνη γάλακτος	0,05	

Πίνακας 4.3: Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια για την AFM1 στα γαλακτοκομικά προϊόντα διαφόρων χωρών(Campagnollo et al., 2016),(Vaz et al., 2020).

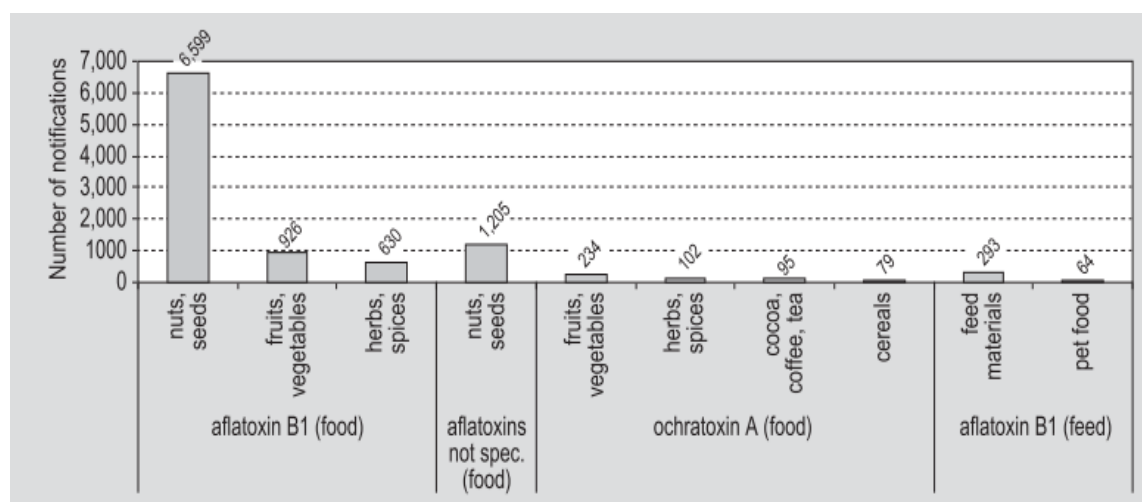
4.3 ΣΥΣΤΗΜΑ RASFF ΚΑΙ ΑΝΑΚΛΗΣΕΙΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Το σύστημα RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) ιδρύθηκε το 1971 από την Ε.Ε ώστε να γίνεται γρήγορα η πληροφόρηση για τους κίνδυνους στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές μεταξύ των χωρών της Ε.Ε.(Alshannaq & Yu, 2021a).

Τύποι ειδοποιήσεων RASFF:

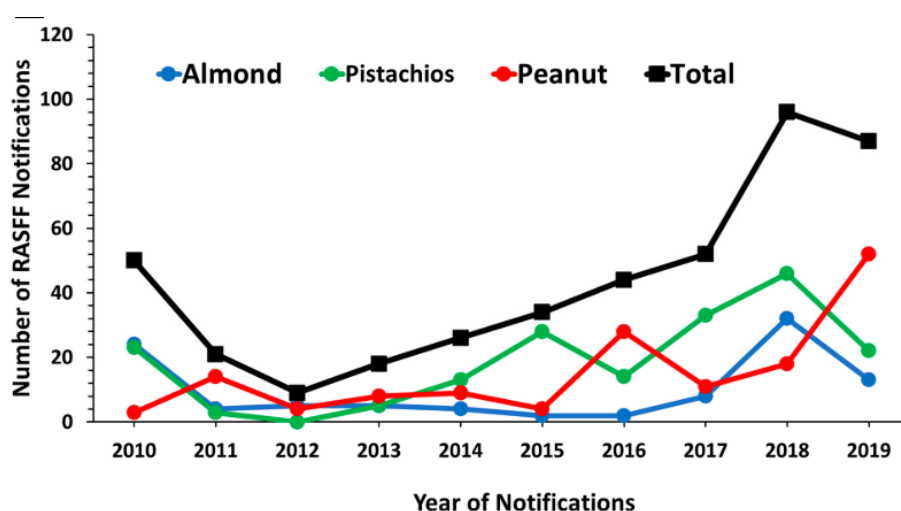
- Ειδοποιήσεις alert: γίνονται μέσω του RASFF όταν ανιχνεύεται κίνδυνος σε τρόφιμα και ζωοτροφές που ήδη υπάρχουν στην αγορά και απαιτείται ταχεία ενημέρωση των καταναλωτών.
- Ειδοποιήσεις πληροφορίας: γίνονται όταν εντοπίζεται κίνδυνος σε προϊόντα που έχουν διατεθεί σε μια χώρα της Ε.Ε αλλά δεν έχουν φτάσει στην αγορά άλλων χωρών της Ε.Ε. Χωρίζονται σε «ενημερωτικές κινήσεις για παρακολούθηση» και «ειδοποιήσεις πληροφοριών για προσοχή».
- Απορρίψεις συνόρων: αφορούν αποστολές τροφίμων και ζωοτροφών που έχουν απορριφθεί εκτός συνόρων της Ε.Ε λόγω παρουσίας κινδύνου σε αυτά.

Από το 1981 μέχρι το 2017 οι μυκοτοξίνες ήταν η πιο συχνά αναφερόμενη κατηγορία κινδύνου στο σύστημα RASFF (ποσοστό 21% των ειδοποιήσεων). Περίπου το 96% των ειδοποιήσεων για τις μυκοτοξίνες αφορούσαν τα τρόφιμα και το 4% τις ζωοτροφές. Ο μεγαλύτερος αριθμός ειδοποιήσεων αφορούσε την αφλατοξίνη B1 (8.784 , 80%), τις μη προσδιορισμένες αφλατοξίνες (1.376 , 13%) και την ωχρατοξίνη A (550, 5%). Ειδοποιήσεις έχουν γίνει και για άλλες μυκοτοξίνες όπως φουμονισίνες, πατουλίνη, ζεαραλεόνη, T-2 και αφλατοξίνη M1. Οι ειδοποιήσεις αφορούν κυρίως του ξηρούς καρπούς και τους σπόρους, τα λαχανικά, τα φρούτα, τα μπαχαρικά και τα βότανα και έχουν γίνει κυρίως στην Ολλανδία, την Ιταλία, τη Γερμανία, την Ελλάδα το Ηνωμένο Βασίλειο και την Ισπανία(Pigłowski, 2019).



Εικόνα 4.1: Αριθμός ειδοποιήσεων για μυκοτοξίνες σε τρόφιμα και ζωοτροφές ανάλογα με την κατηγορία προϊόντων(Pigłowski, 2019).

Πιο συχνές απορρίψεις γίνονται λόγω των επιπέδων AFs που ξεπερνούν τα όρια της E.U. και του FDA. Στο διάστημα 2010-2019 έγιναν 442 ειδοποιήσεις για μυκοτοξίνες σε τρόφιμα που προέρχονταν από την Αμερική και εξάγονταν στην Ευρώπη και οι 437(ποσοστό 98,9%) ήταν για AFs. Το τρόφιμα που κατηγορήθηκαν ήταν κυρίως ξηροί καρποί (αμύγδαλα, φιστίκια).Επίσης την ίδια χρονική περίοδο ο RASFF ανέφερε 5.045 ειδοποιήσεις για μυκοτοξίνες σε τρόφιμα και 439 σε προϊόντα ζωοτροφών που εξάχθηκαν στην Ε.Ε από όλο τον κόσμο. Στα προϊόντα ζωοτροφών (κυρίως αραχίδες και αραβόσιτος, ηλιόσποροι, πίτουρο, βαμβακόσποροι, σύνθετες ζωοτροφές) η μόλυνση από αφλατοξίνες αφορούσε το 98,4% των ειδοποιήσεων, καθώς ξεπερνούσαν τα καθορισμένα ανώτατα όρια και τα επίπεδα δράσης (Alshannaq & Yu, 2021b).



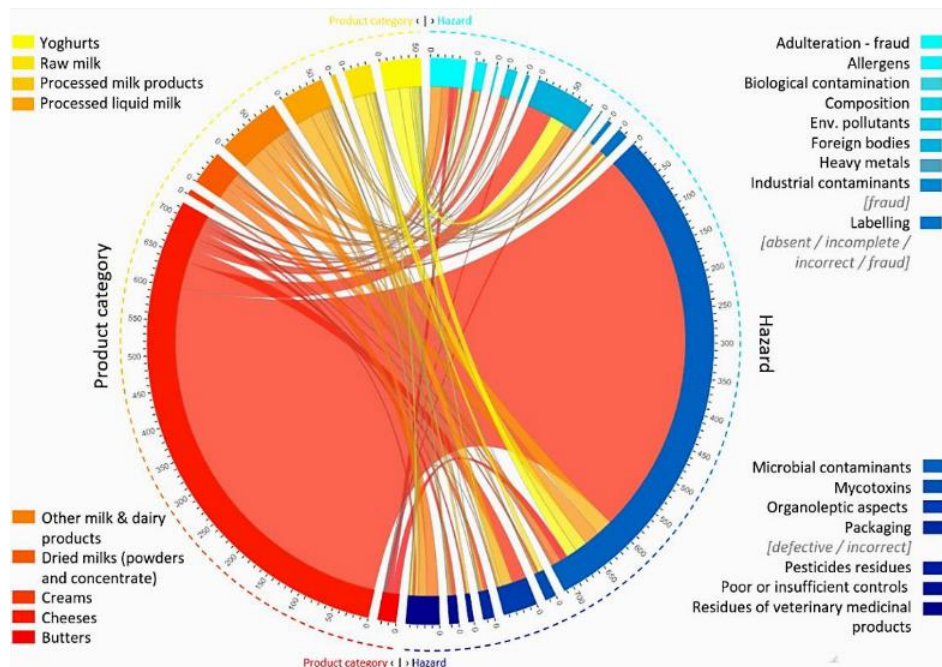
Εικόνα 4.2 : Αριθμός ειδοποιήσεων RASFF για αφλατοξίνες στα τρόφιμα τα έτη 2010-2019(Alshannaq & Yu, 2021b)

Σε όλες τις περιπτώσεις των MMP (Milk-Milk products) οι αιτίες ήταν μυκοτοξίνες και ιδιαίτερα αφλατοξίνες (ποσοστό 93%) και αφλατοξίνη M1 που είχε μεταφερθεί στο γάλα(POSTOLACHE et al., 2020).

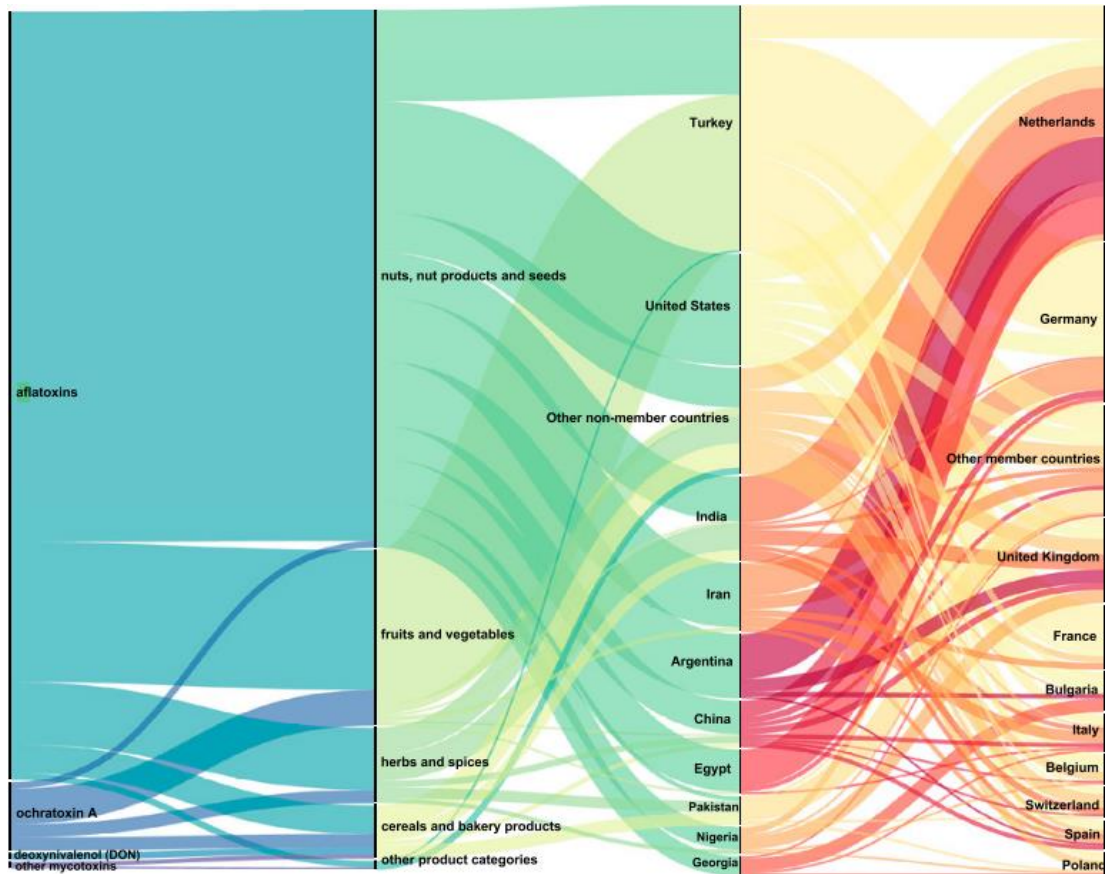
Κατηγορία	Προϊόν	Αριθμός ειδοποιήσεων	Ποσοστό %
1	Τυρί	717	68,74
2	Γάλα, γαλακτοκομικά πρ.	88	8,44

3	Επεξεργασμένο υγρό γάλα	61	5,85
4	Γιαούρτια	56	5,37
5	Βούτυρα	25	2,40
6	Σκόνες, συμπυκνωμένα γάλατα	47	5,37
7	Νωπό γάλα	36	3,46
8	Επεξεργασμένα γαλακτ. πρ.	6	0,58
9	Κρέμες	7	0,67

Πίνακας 4.4: Ειδοποιήσεις από το RASFF σε μολυσμένα γαλακτοκομικά προϊόντα τα έτη 2000-2020.



Εικόνα 4.3: Ειδοποιήσεις σε κατηγορίες προϊόντων MMP τα έτη 2000-2020. Τα μήκη των τόξων στο εξωτερικό κύκλο είναι ανάλογα με τον αριθμό ειδοποιήσεων κάθε κατηγορίας (POSTOLACHE et al., 2020).



Εικόνα 4.4 : Κίνδυνοι από μυκοτοξίνες που κοινοποιήθηκαν το 2020, σύμφωνα με την κατηγορία προϊόντων διατροφής που ορίζονται έναντι της τρίτης χώρας προέλευσης και κατά της κοινοποιούσας χώρας. (RASFF, 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΤΑ ΕΤΗ 2017,2018 ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥΣ ΣΕ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Μ1

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ Μ1 ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑΣ ΤΑ ΕΤΗ 2017 ΚΑΙ 2018.

Η ανάλυση της αφλατοξίνης Μ1 έγινε με την μέθοδο ενζυμικά συνδεδεμένης ανοσοπροσροφητικής δοκιμασίας (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay-ELISA) σε 3044 δείγματα αγελαδινού γάλακτος συνολικά. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και σε συνεργαζόμενα εργαστήρια.

Ανάλογα με την τιμή της AFM1, τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν σε 4 κατηγορίες, όπως φαίνεται στον πίνακα 1 σε:

- α) μη επιμολυσμένα (not contaminated), όταν η τιμή ήταν στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου ή κάτω από το όριο το οποίο ήταν 0,005μg/kg,
- β) αποδεκτά (acceptable), όταν η τιμή ήταν μεταξύ 0,006-0,05 μg/kg , όπου τα 0,05μg/kg είναι το ανώτατο επιτρεπτό όριο σύμφωνα με τη νομοθεσία της Ε.Ε. ,
- γ) επιμολυσμένα (contaminated), όταν η τιμή ήταν 0,051-0,250 ,
- δ)πολύ επιμολυσμένα (very contaminated), όταν η τιμή ήταν >0,250.

Τιμή AFM1 (μg/Kg)	Περιγραφή	Κωδικός
<=0,005	Not contaminated	1
0,006-0,05	acceptable	2
0,051-0,25	contaminated	3
>0,250	Very contaminated	4

Πίνακας 5.1:Κατηγοριοποίηση δειγμάτων ανάλογα με το περιεχόμενο τους σε AFM1

Τα δείγματα είχαν συλλεχθεί από 24 διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, οι οποίες καταχωρήθηκαν ανάλογα με την Περιφέρεια που άνηκαν σε συνολικά 8 περιφέρειες, όπως φαίνεται στον πίνακα 2:

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ
ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ ΚΑΙ ΘΡΑΚΗ	1
ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	2
ΔΥΤΙΚΗ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ	3
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	4
ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ	5
ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ	6
ΑΤΤΙΚΗ	7
ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ	8

Πίνακας 5.2: Κωδικοποίηση των Περιφερειών που συμμετείχαν στην ανάλυση

Στα παρακάτω γραφήματα αποτυπώνεται η εικόνα των τιμών της αφλατοξίνης Μ1 στις τέσσερις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω σε νοπό γάλα σε σχέση με διάφορες παραμέτρους όπως :

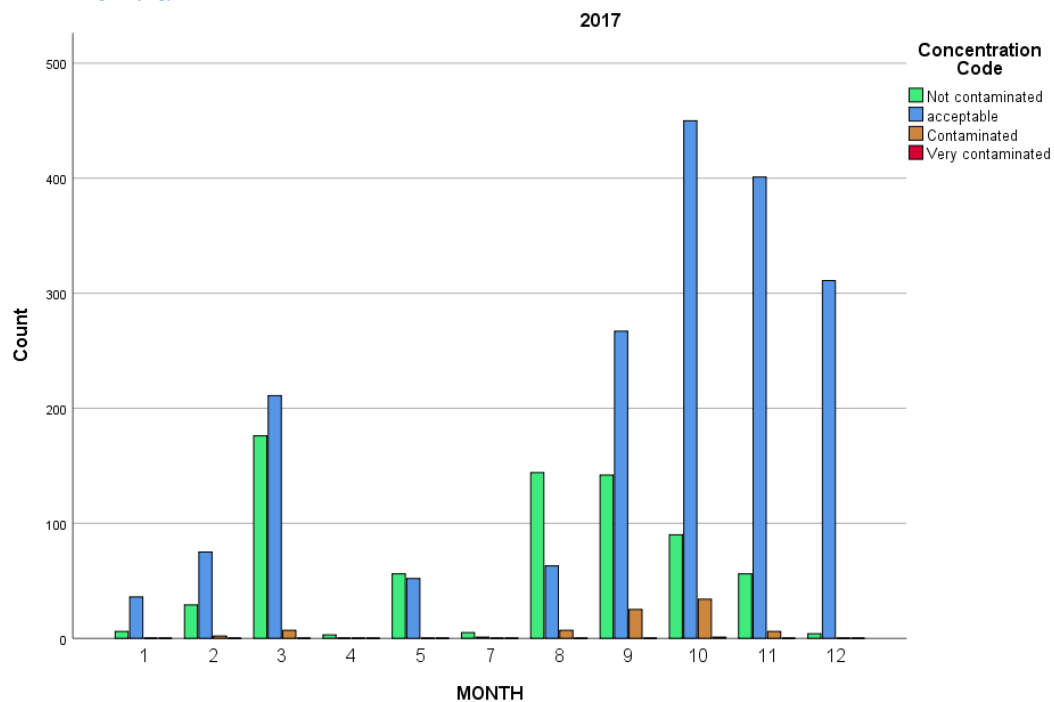
Α) Έτος δειγματοληψίας: δύο έτη συνολικά, το 2017 και το 2018,

Β) Μήνας δειγματοληψίας :συλλέχθηκαν δεδομένα και για τους 12 μήνες για κάθε έτος,

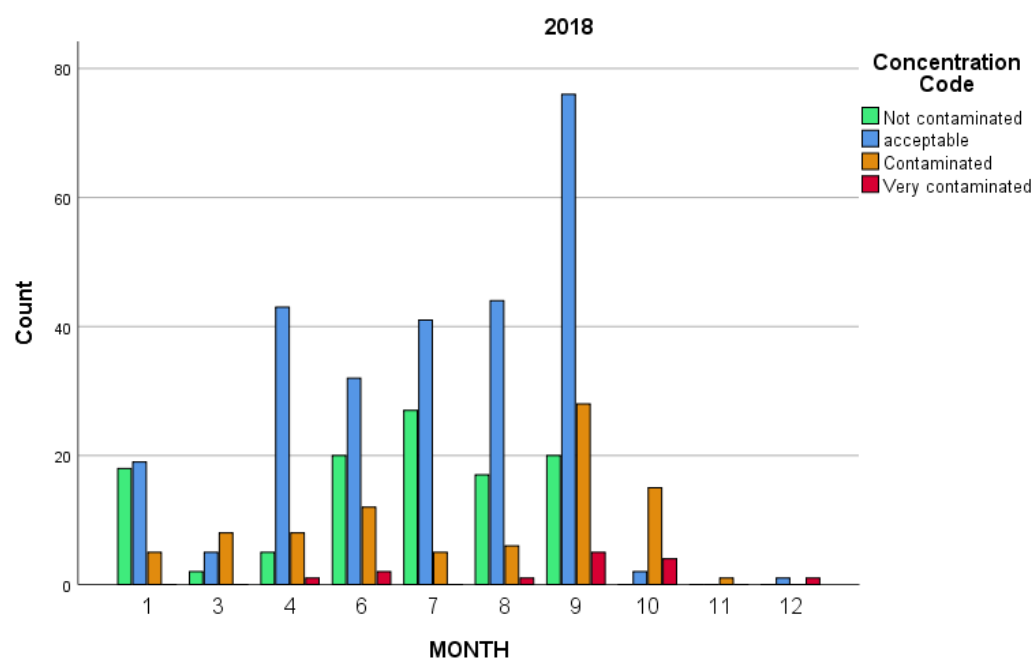
Γ)Εποχή δειγματοληψίας : απεικονίζονται τα αποτελέσματα για τις 4 εποχές ανά έτος,

Δ)Περιφέρεια: για κάθε περιφέρεια εμφανίζεται το σύνολο των αποδεκτών/επιμολυσμένων δειγμάτων.

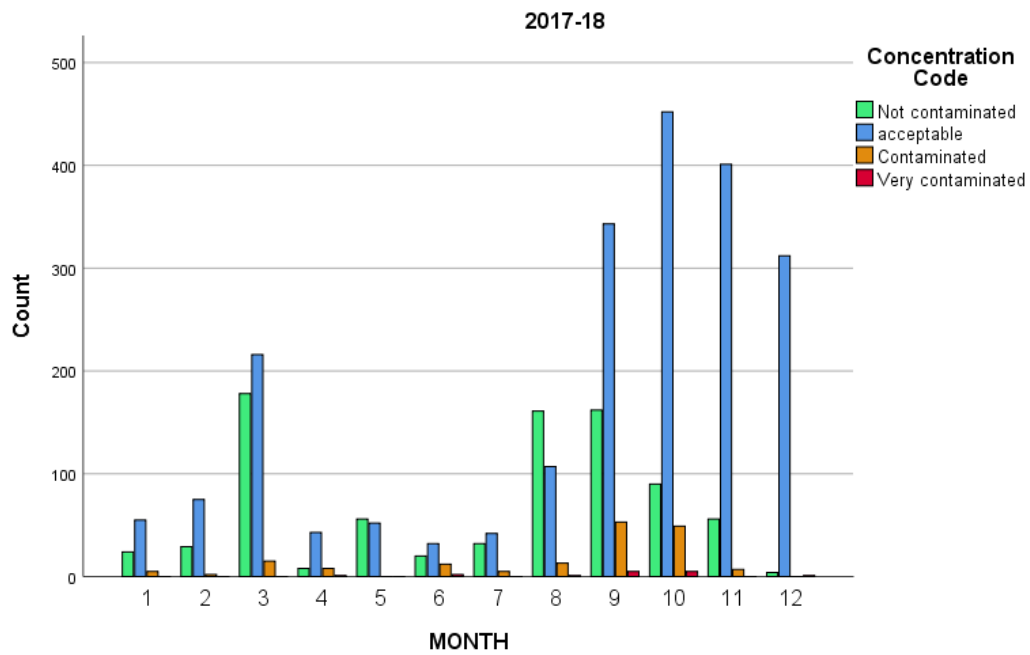
5.1.1. Γραφήματα



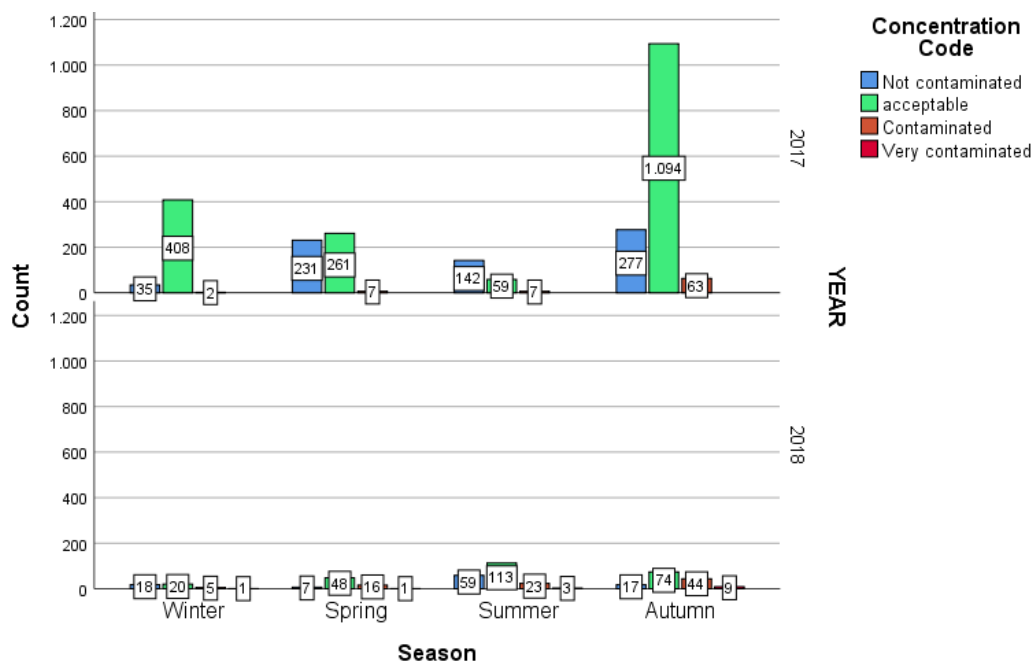
Εικόνα 5.1: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα το έτος 2017



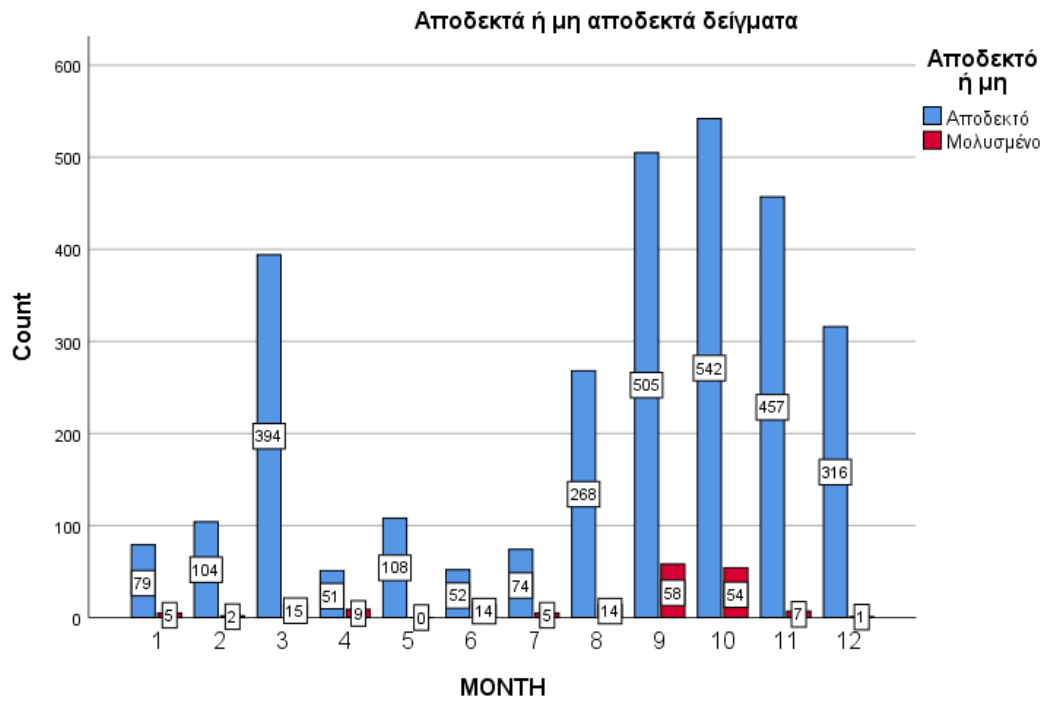
Εικόνα 5.2: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα το έτος 2018



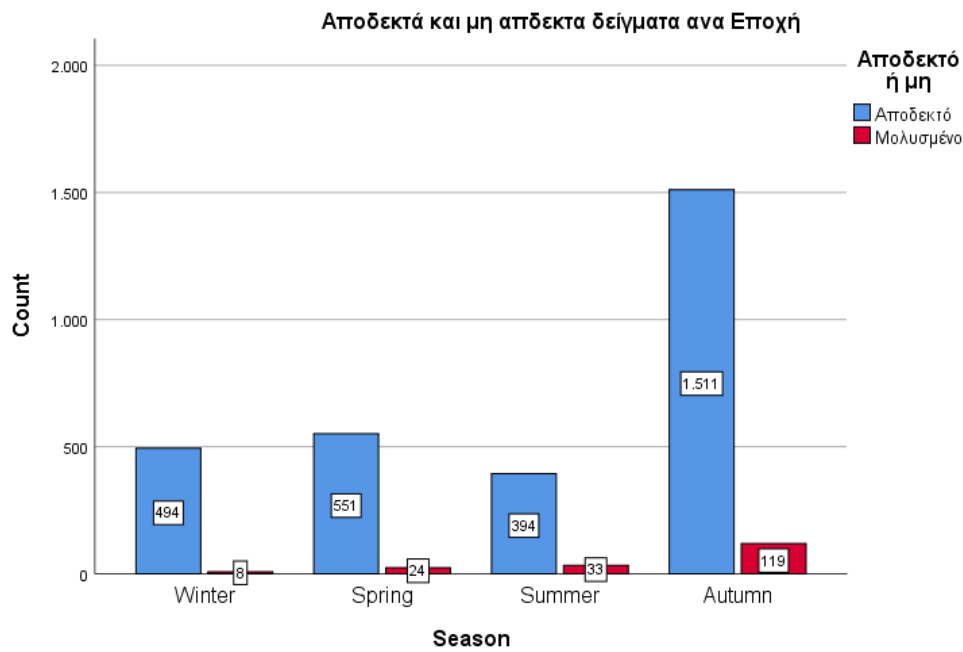
Εικόνα 5.3: Συνολική περιεκτικότητα σε AFM1 των δειγμάτων ανά μήνα τα έτη 2017-2018



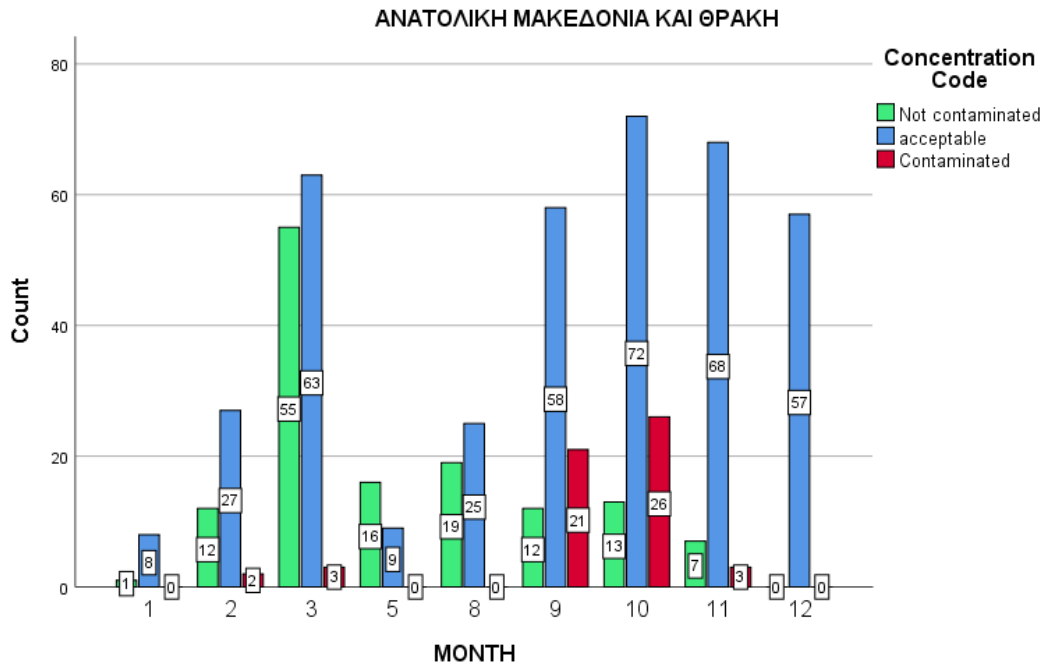
Εικόνα 5.4: Συνολική περιεκτικότητα των δειγμάτων σε AFM1 ανά εποχή τα έτη 2017-2018



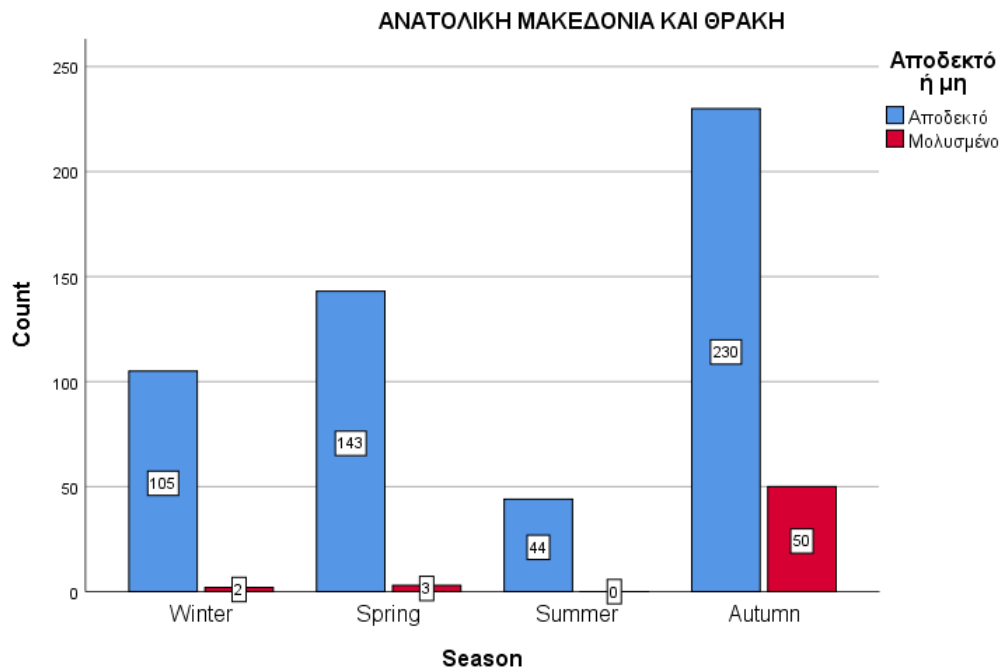
Εικόνα 5.5: Συνολική εικόνα αποδεκτών/μη αποδεκτών δειγμάτων ανά μήνα σύμφωνα με το περιεχόμενο AFM1



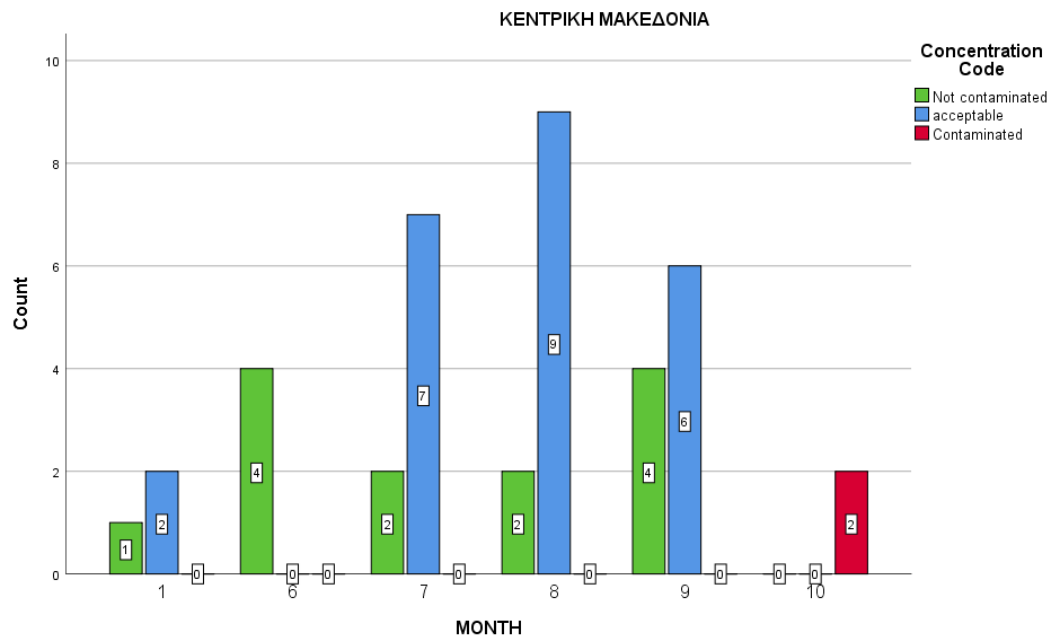
Εικόνα 5.6: Συνολική εικόνα αποδεκτών/ μη αποδεκτών δειγμάτων ανά εποχή ανάλογα με το περιεχόμενο του σε AFM1.



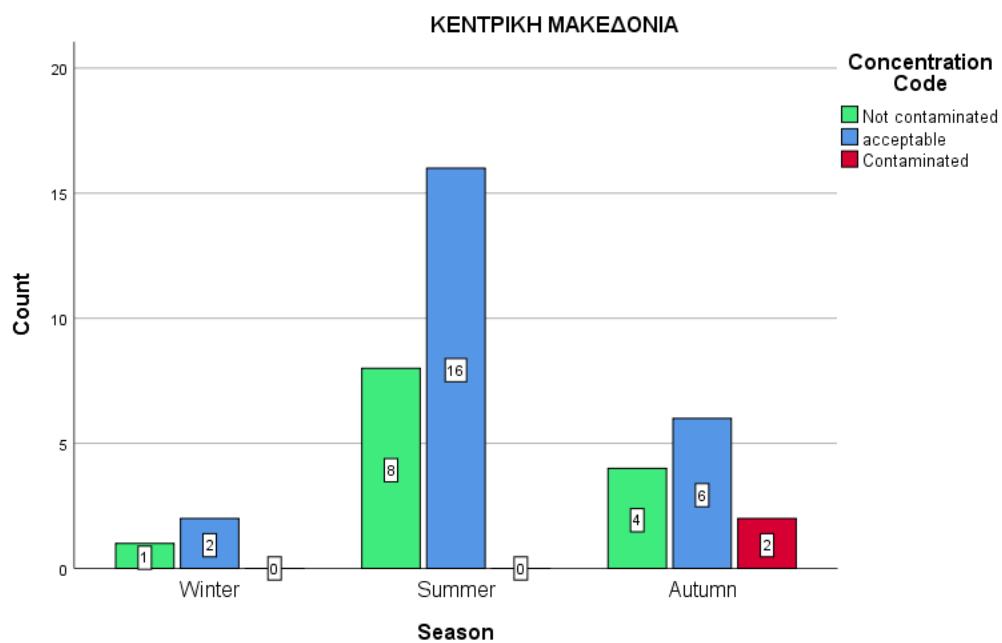
Εικόνα 5.7: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 στην Περιφέρεια Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης ανά μήνα .



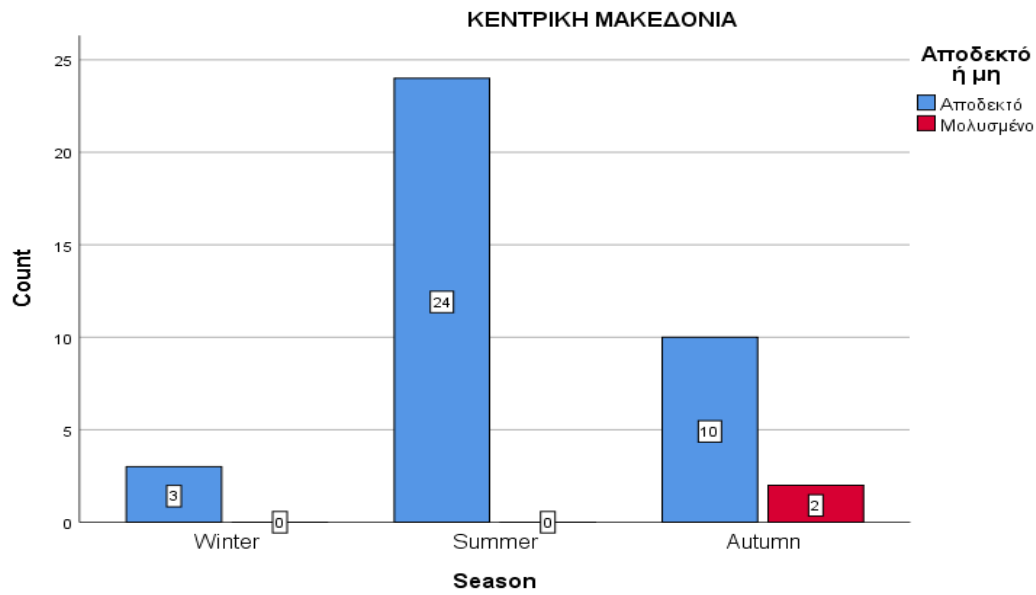
Εικόνα 5.8: Αποδεκτά/μη αποδεκτά δείγματα κάθε εποχή για την Περιφέρεια ανατολικής Μακεδονία και Θράκης



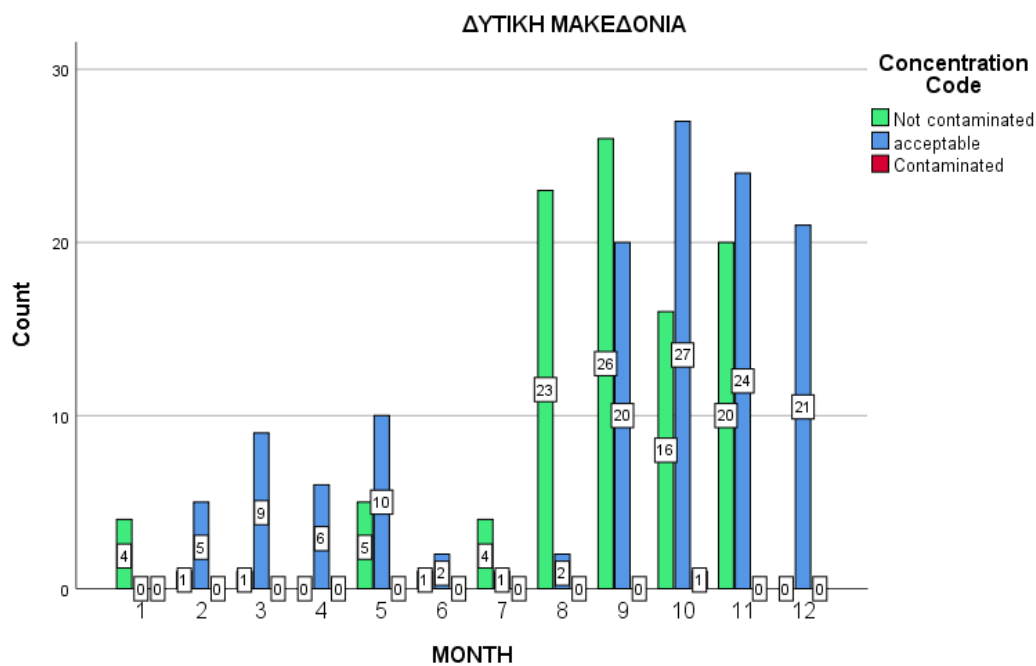
Εικόνα 5.9: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα στην Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας.



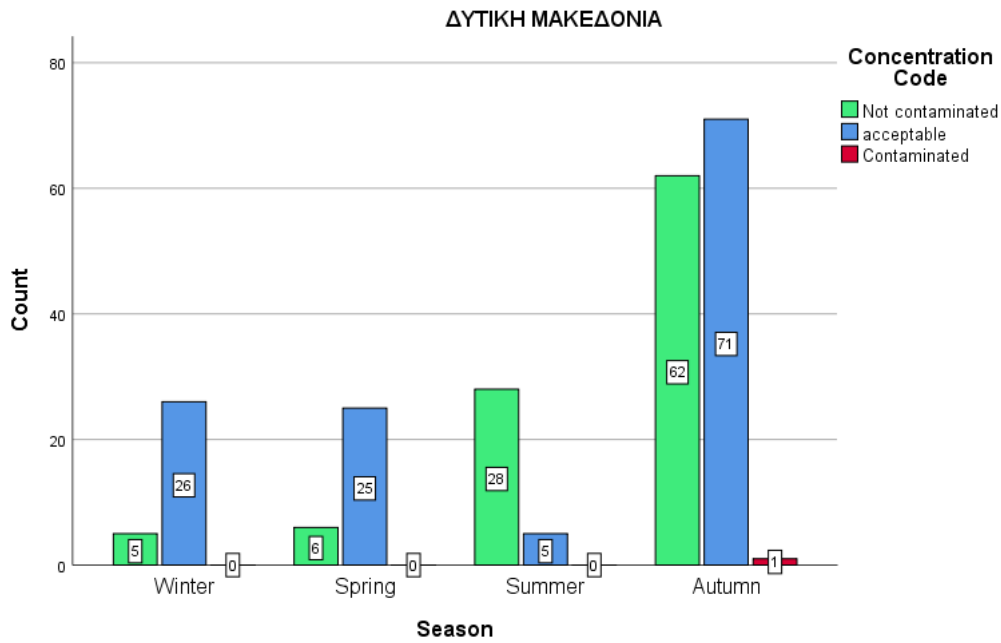
Εικόνα 5.10: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά εποχή στην Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας.



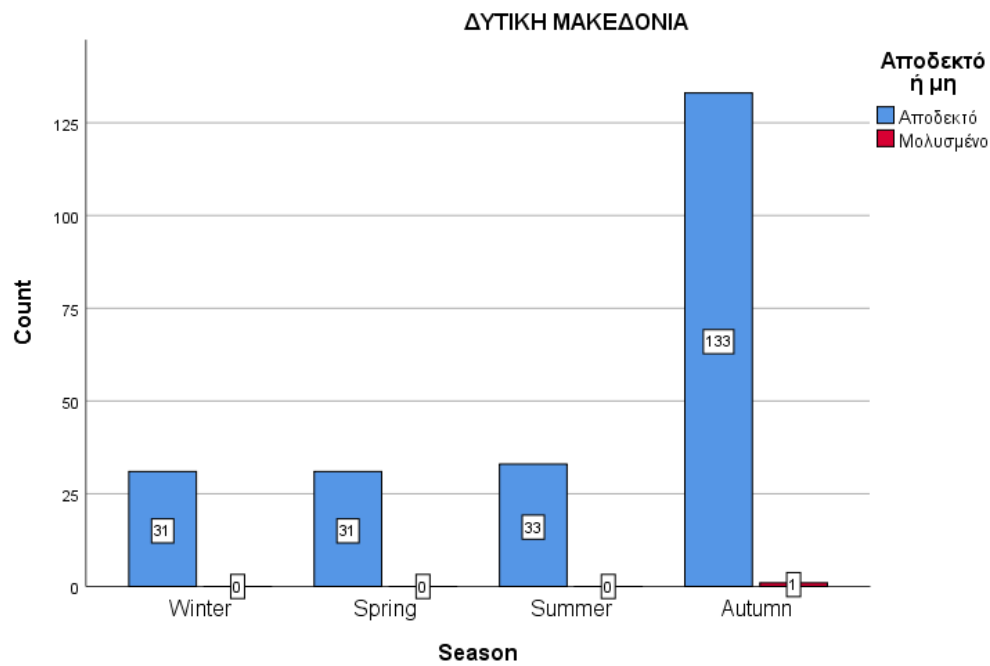
Εικόνα 5.11: Αποδεκτά και μη αποδεκτά δείγματα ανάλογα με το περιεχόμενό τους σε AFM1 ανά εποχή στην Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας.



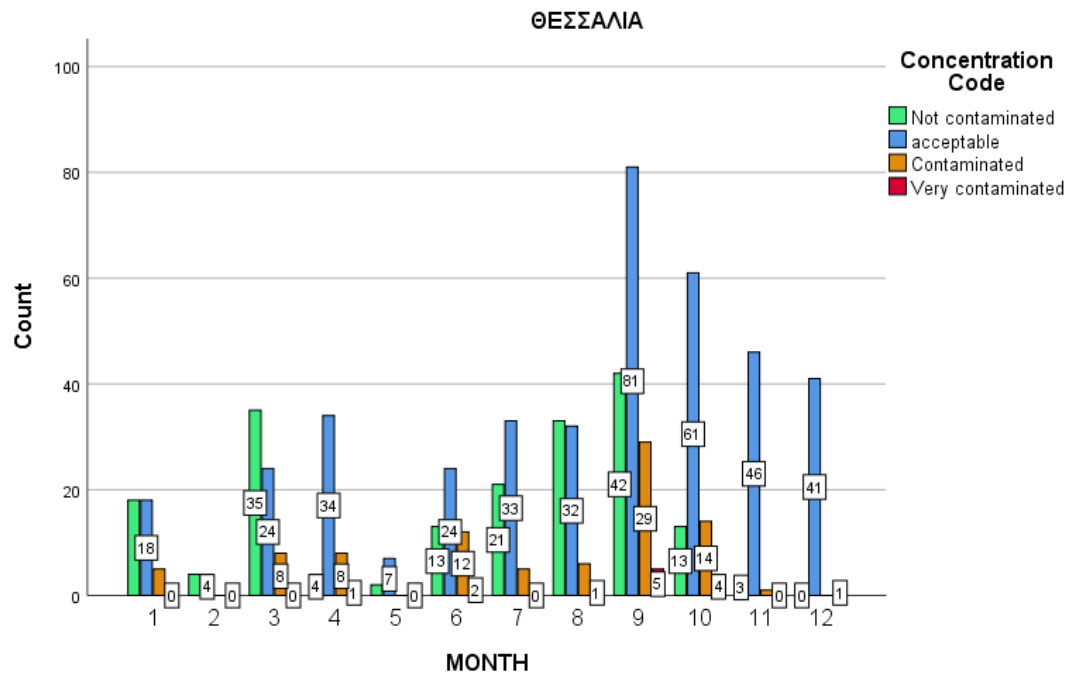
Εικόνα 5.12: Περιεκτικότητα των δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα στην Περιφέρεια Δυτικής Μακεδονίας.



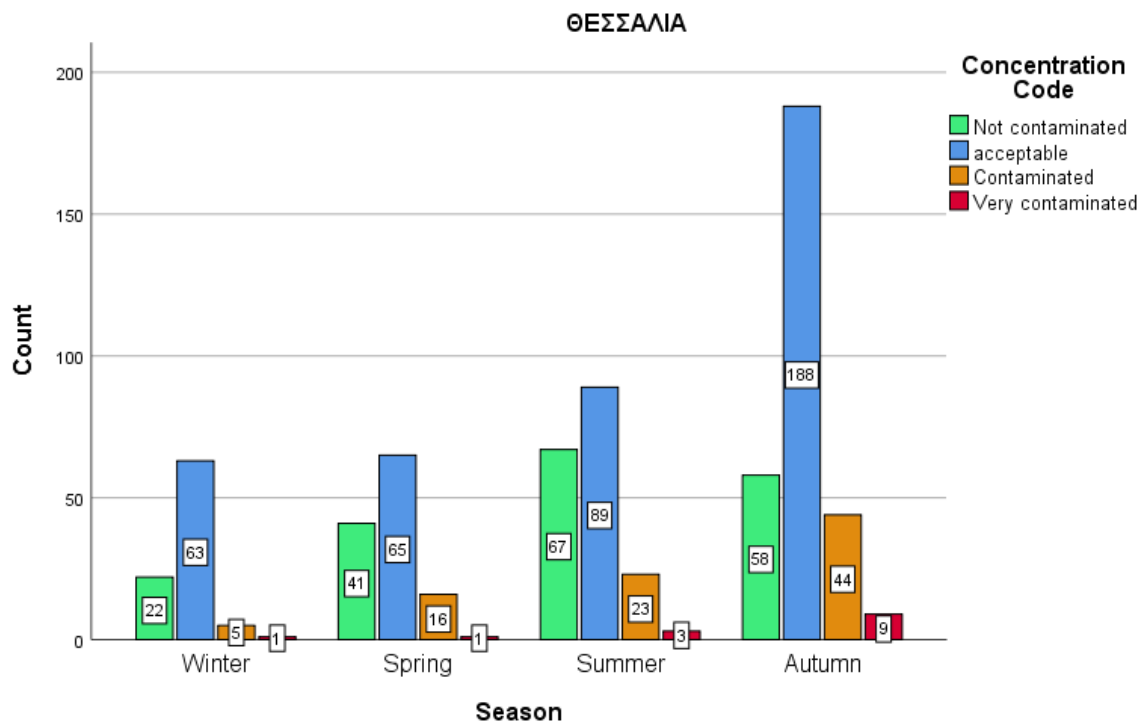
Εικόνα 5.13: Επίπεδα AFM1 στα δείγματα της Περιφέρειας Δυτικής Μακεδονίας ανά εποχή



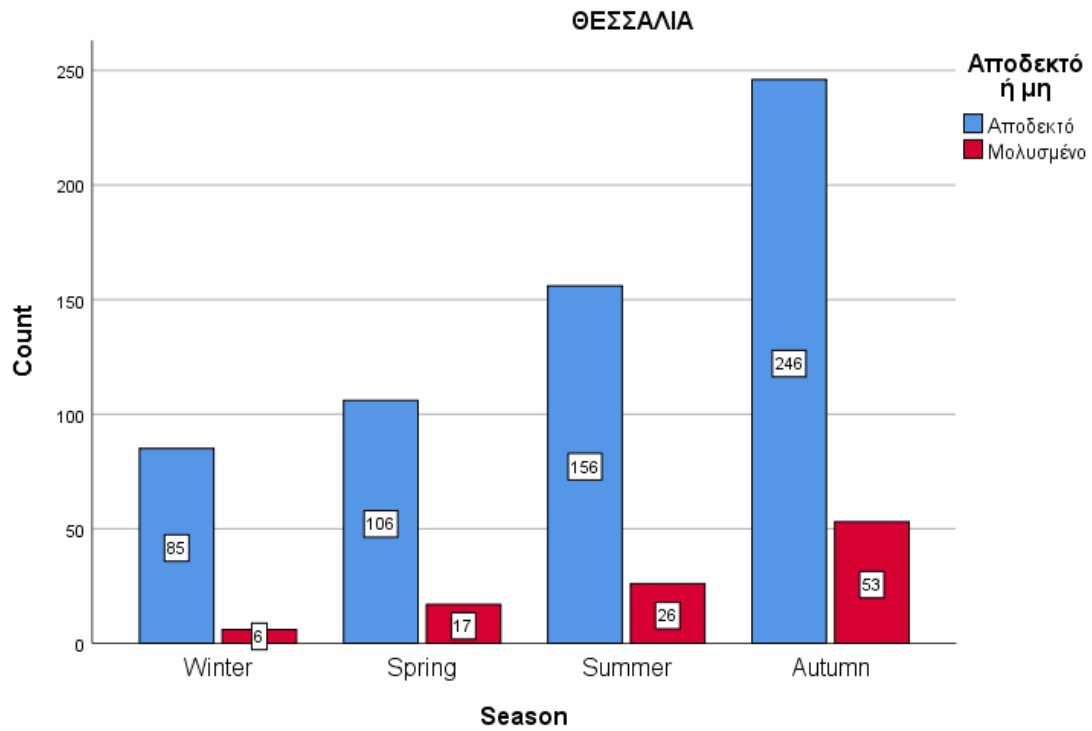
Εικόνα 5.14: Αποδεκτά και μη αποδεκτά δείγματα στην Περιφέρεια Δυτ. Μακεδονίας ανά εποχή.



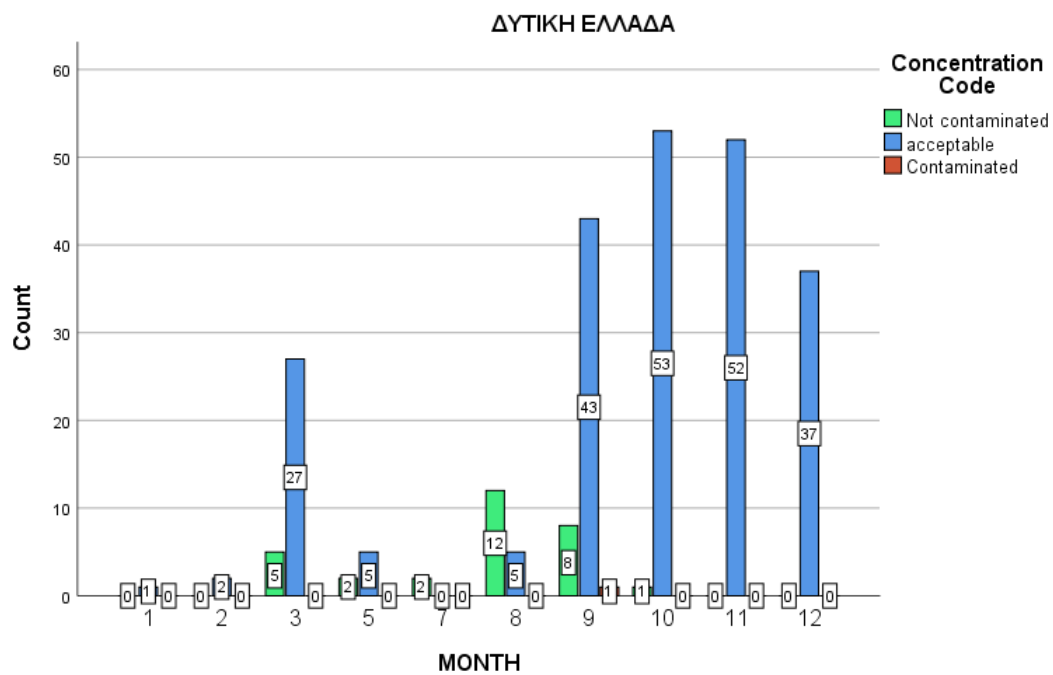
Εικόνα 5.15: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα στην Περιφ. Θεσσαλίας.



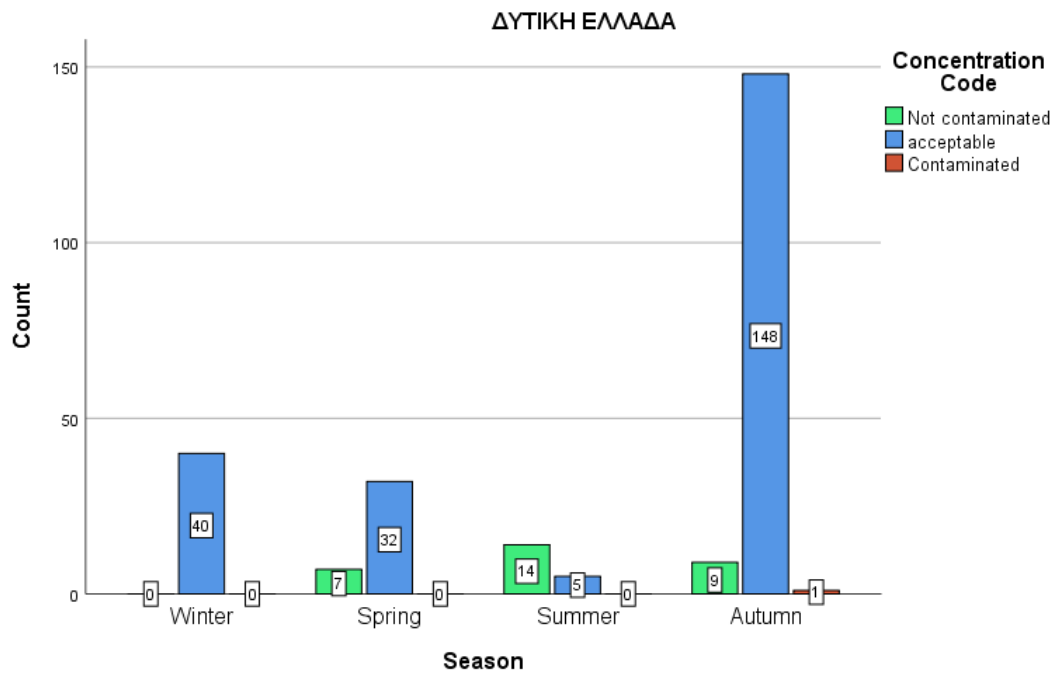
Εικόνα 5.16: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά εποχή στην Περιφ. Θεσσαλίας.



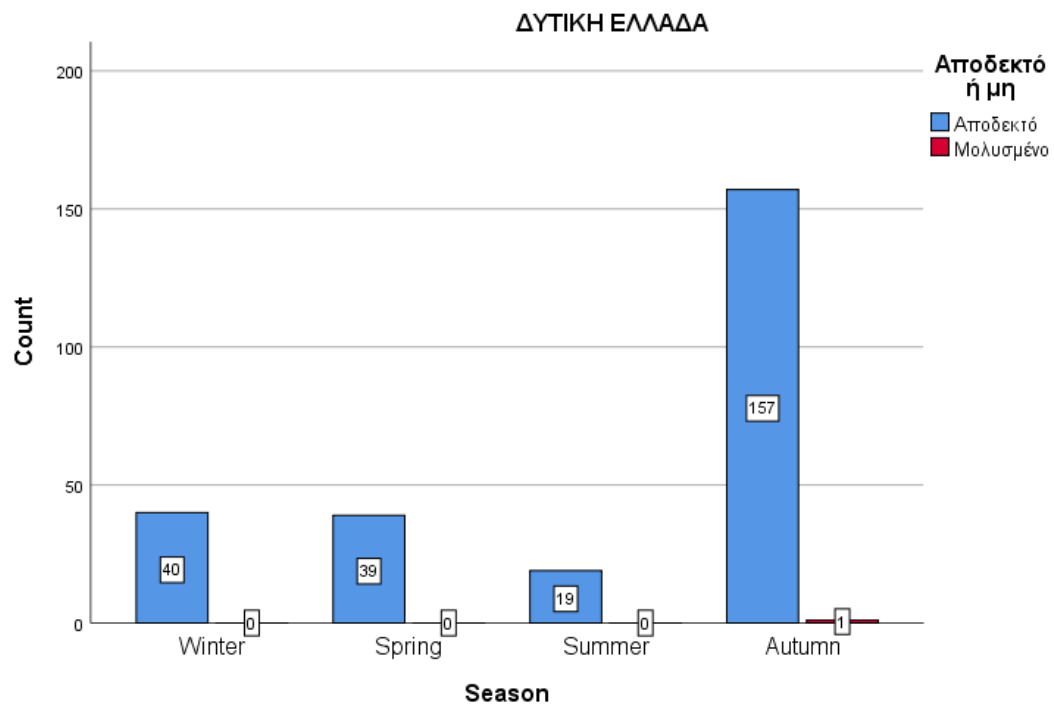
Εικόνα 5.17: Αποδεκτά/μη αποδεκτά δείγματα ανάλογα με τα επίπεδα AFM1 στην Περιφ. Θεσσαλίας ανά εποχή.



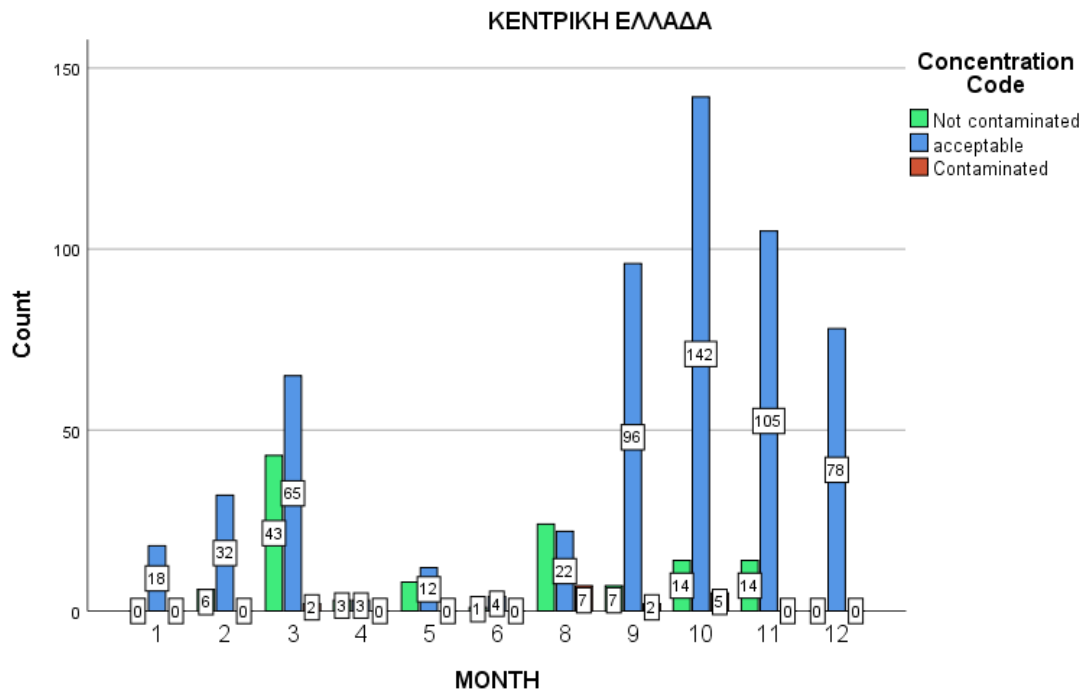
Εικόνα 5.18: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα στην Περιφ. Δυτ. Ελλάδας.



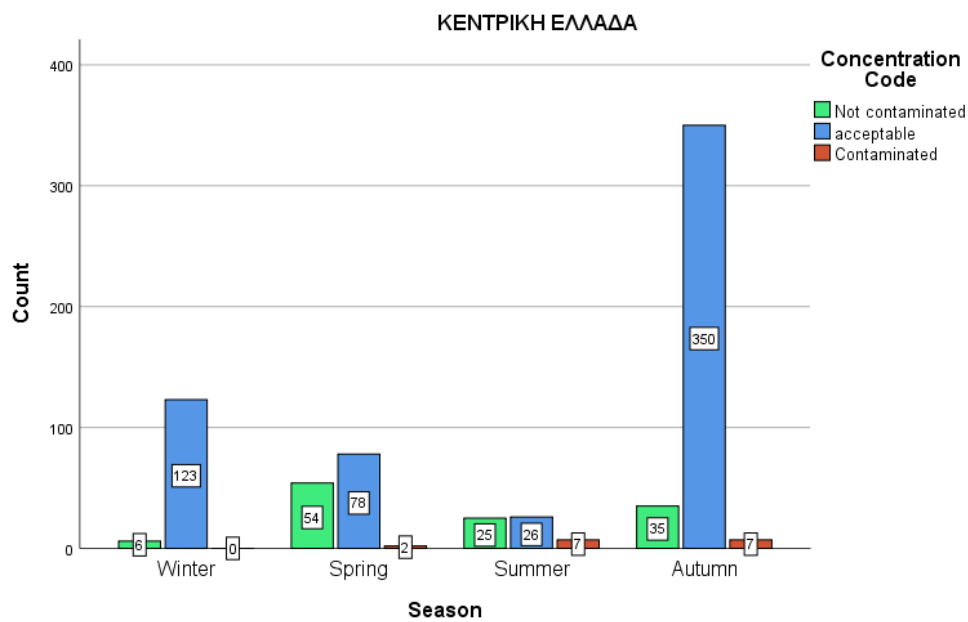
Εικόνα 5.19: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά εποχή στην Περιφ. Δυτ.Ελλάδας.



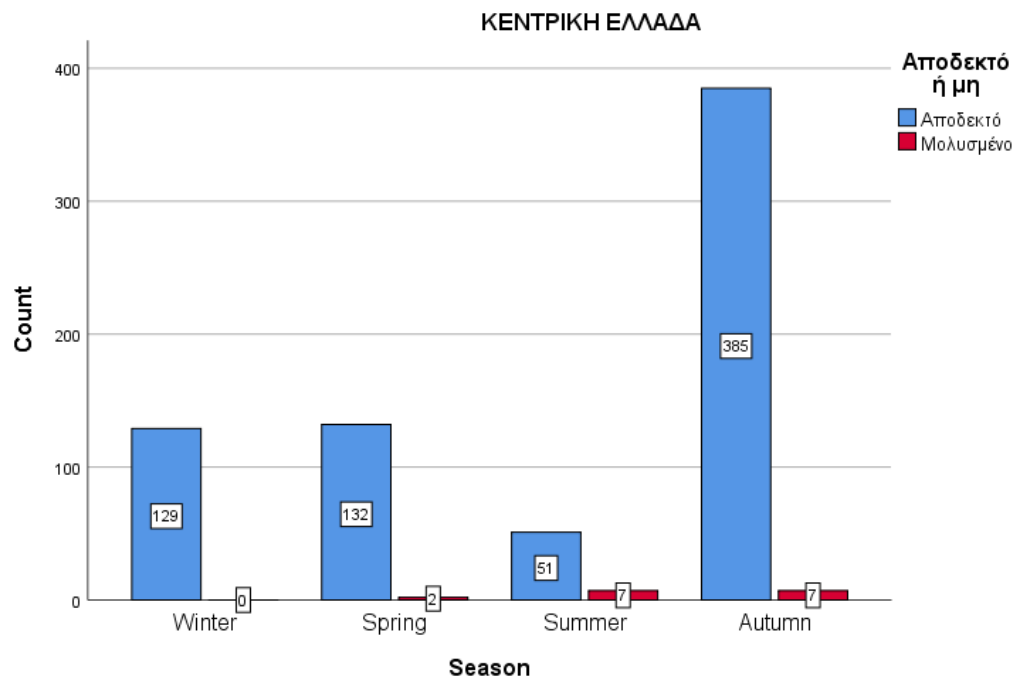
Εικόνα 5.20: Αποδεκτά/μη αποδεκτά δείγματα ανά εποχή στην Περιφ.Δυτ.Ελλάδας.



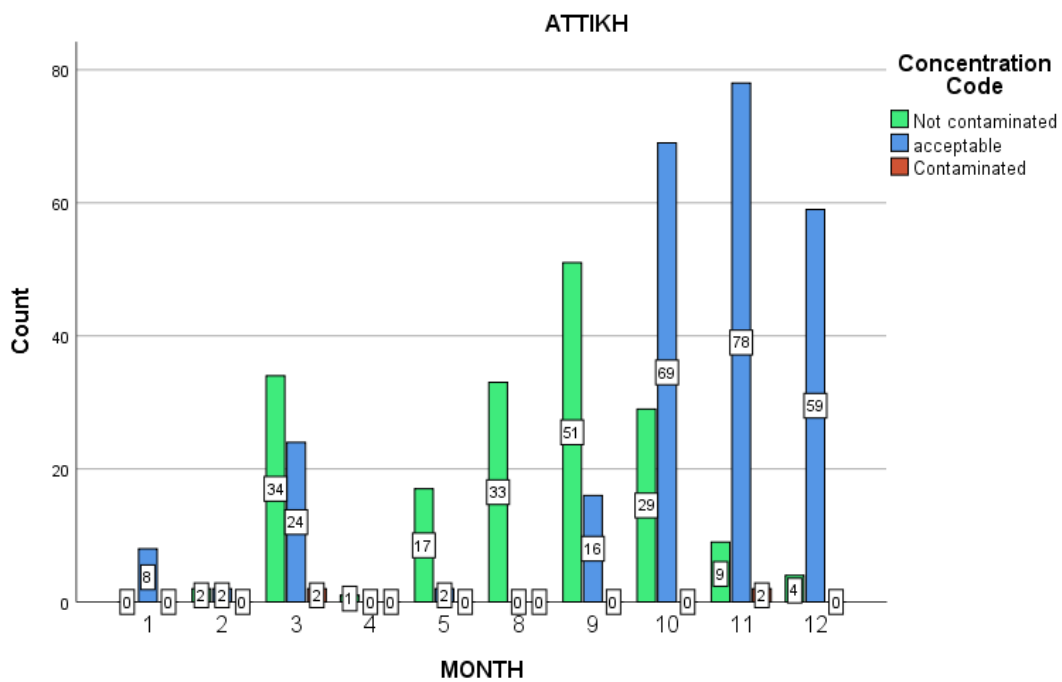
Εικόνα 5.21: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα στην Περιφ. Στερεάς Ελλάδας.



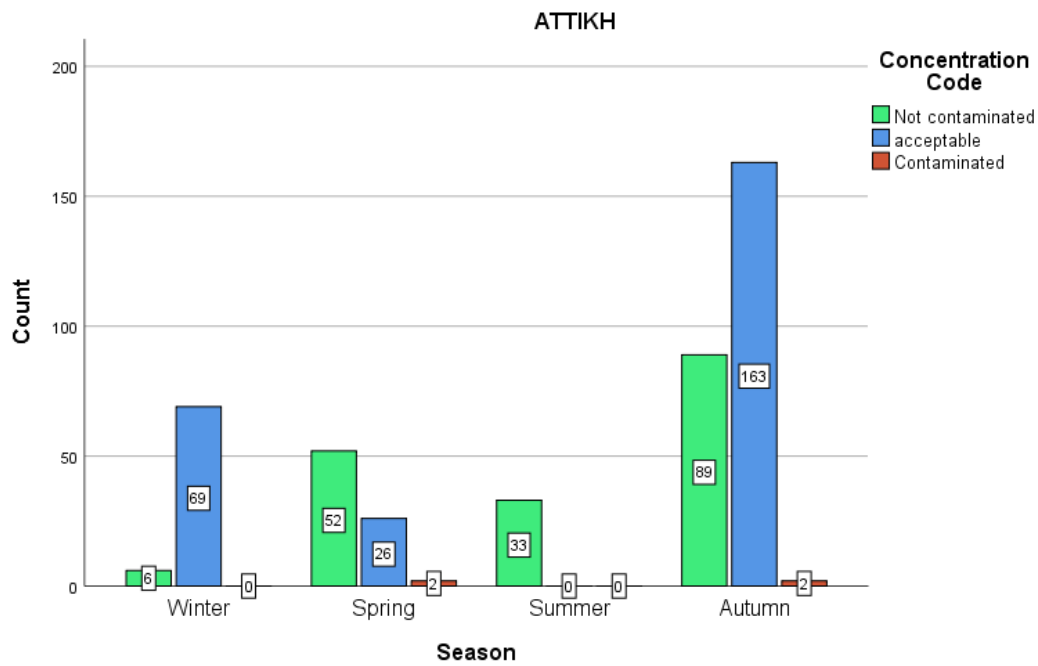
Εικόνα 5.22: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά εποχή στην Περιφ. Στερεάς Ελλάδας.



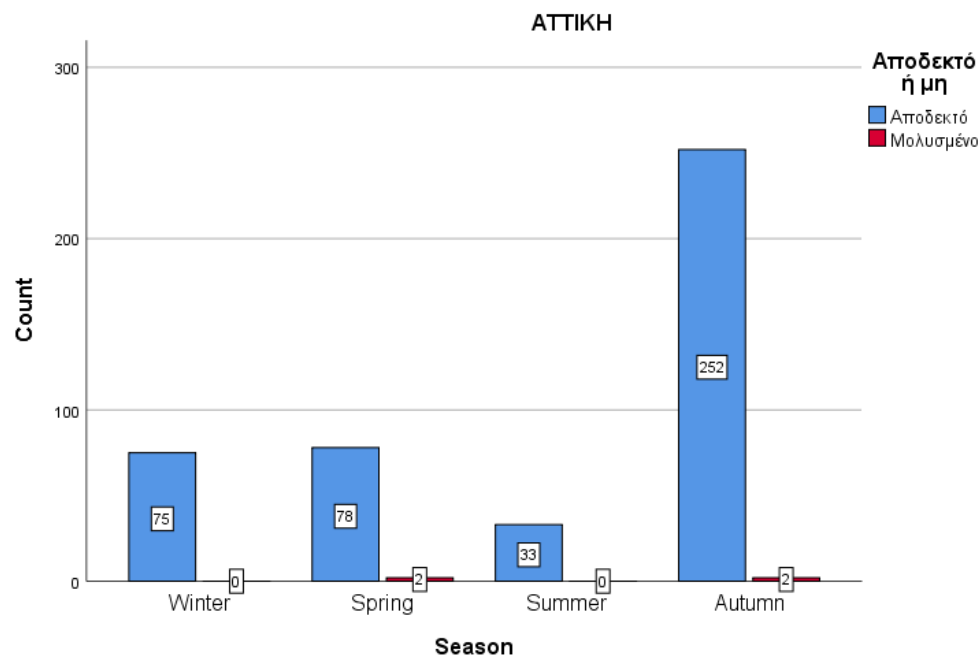
Εικόνα 5.23: Αποδεκτά/μη αποδεκτά δείγματα ανά εποχή στην Στερεά Ελλάδα.



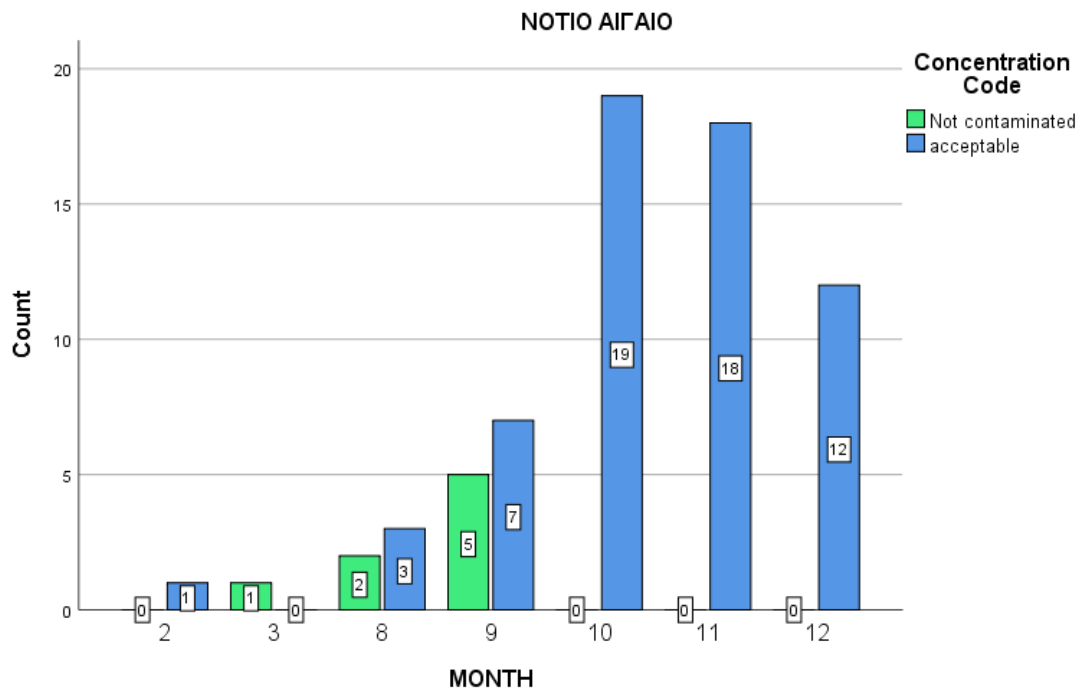
Εικόνα 5.24: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά μήνα στη Περιφέρεια Αττικής.



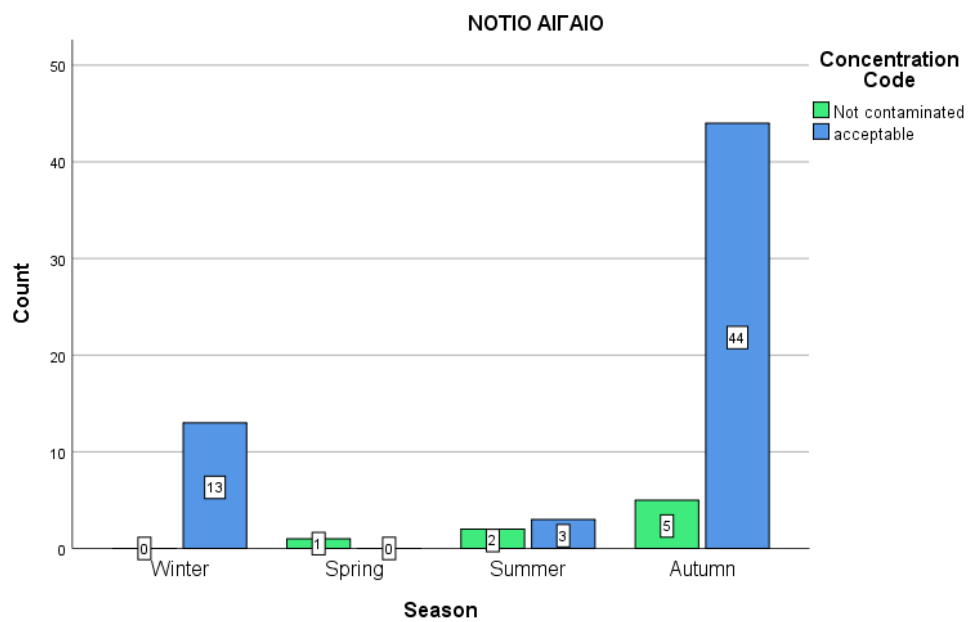
Εικόνα 5.25: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά εποχή στην Περιφέρεια Αττικής.



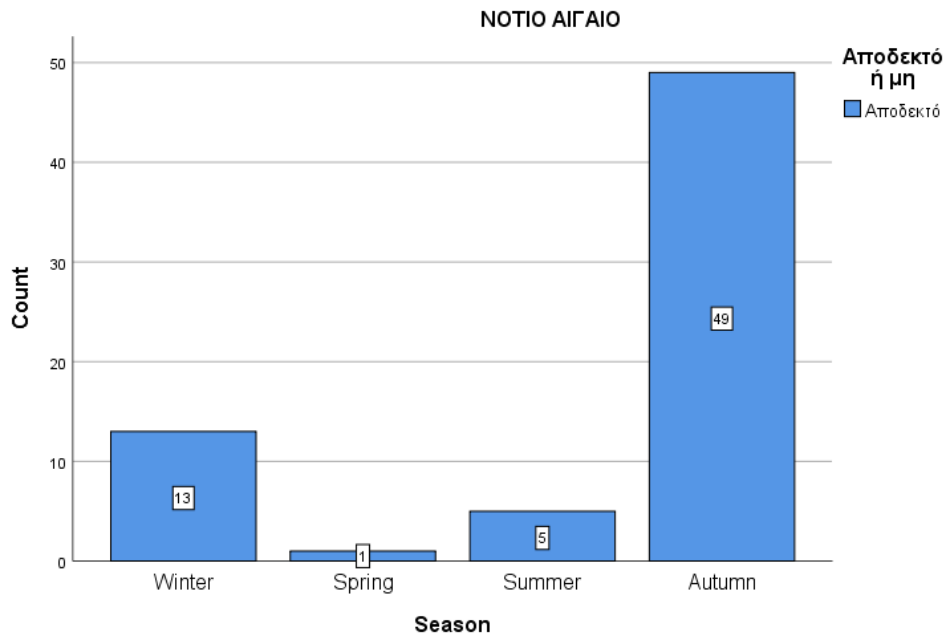
Εικόνα 5.26: Αποδεκτά/μη αποδεκτά δείγματα ανά εποχή στην Περιφ.Αττικής



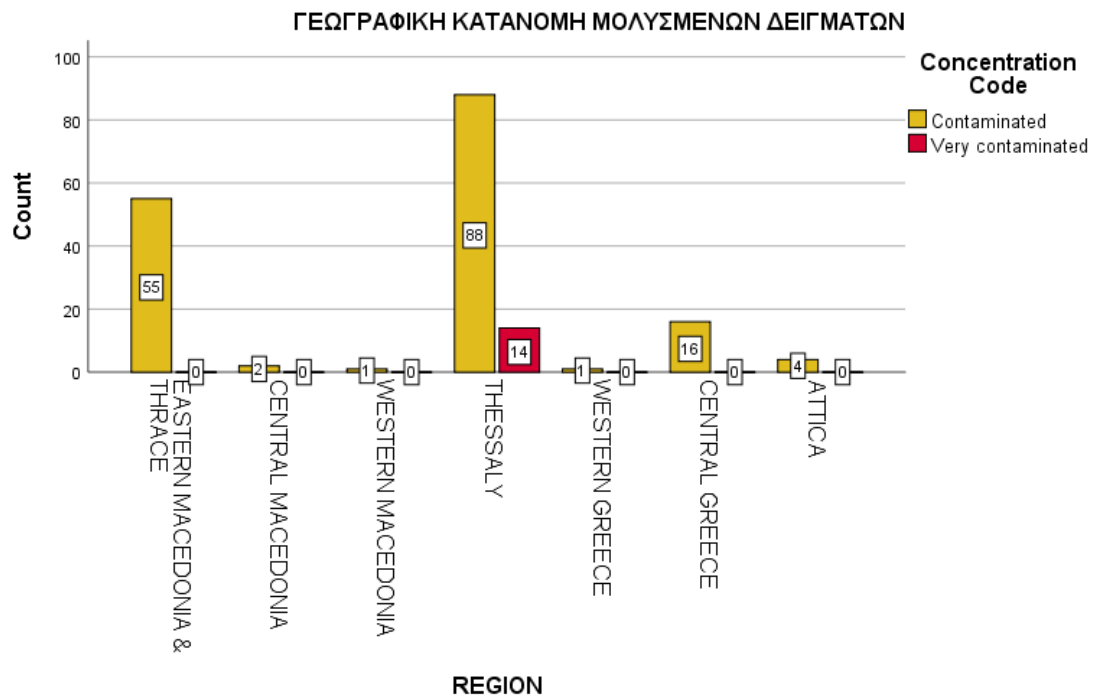
Εικόνα 5.27: Περιεκτικότητα AFM1 σε δείγματα ανά μήνα στην Περιφ. Νοτίου Αιγαίου.



Εικόνα 5.28: Περιεκτικότητα δειγμάτων σε AFM1 ανά εποχή στην Περιφ.Νοτίου Αιγαίου.



Εικόνα 5.29: Αποδεκτά/μη αποδεκτά δείγματα ανά εποχή στην Περιφ.Νοτ.Αιγαίου.



Εικόνα 5.30: Κατανομή μολυσμένων δειγμάτων στις Περιφέρειες που διεξήχθη η μελέτη.

Περιφέρεια	Χειμώνας			Άνοιξη			Καλοκαίρι			Φθινόπωρο			Σύνολο		
	Μ.Ε	ΕΠ	%ΕΠ	Μ.Ε	ΕΠ	%ΕΠ	Μ.Ε	ΕΠ	%ΕΠ	Μ.Ε	ΕΠ	%ΕΠ	Μ.Ε	ΕΠ	%ΕΠ
Ανατολική Μακεδονία- Θράκη	105	2	1,9%	143	3	2,1%	44	0	0,0%	230	50	21,7%	522	55	10,5%
Κεντρική Μακεδονία	3	0	0,0%	0	0	-	24	0	0,0%	10	2	20,0%	37	2	5,4%
Δυτική Μακεδονία	31	0	0,0%	31	0	0,0%	33	0	0,0%	133	1	0,8%	228	1	0,4%
Θεσσαλία	85	6	7,1%	106	17	16,0%	156	26	16,7%	246	53	21,5%	593	102	17,2%
Δυτική Ελλάδα	40	0	0,0%	39	0	0,0%	19	0	0,0%	157	1	0,6%	255	1	0,4%
Κεντρική Ελλάδα	129	0	0,0%	132	2	1,5%	51	7	13,7%	385	7	1,8%	697	16	2,3%
Αττική	75	0	0,0%	78	2	2,6%	33	0	0,0%	252	2	0,8%	438	4	0,9%
Νότιο Αιγαίο	13	0	0,0%	1	0	0,0%	5	0	0,0%	49	0	0,0%	68	0	0,0%
Σύνολο	481	8	1,7%	530	24	4,5%	365	33	9,0%	1462	116	7,9%	2838	181	6,4%

Πίνακας 5.3 : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μελέτης και έκφραση επιμολυσμένων δειγμάτων σε ποσοστό %. Όπου Μ.Ε= Μη Επιμολυσμένο και ΕΠ= Επιμολυσμένο.

5.2 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα γραφήματα του έτους 2017 παρατηρούμε ότι όλες τις εποχές του έτους η πλειοψηφία των δειγμάτων είναι εντός ορίων στα επίπεδα AFM1 ενώ υπάρχουν και πολλά που δεν περιέχουν καθόλου αφλατοξίνη. Μόνο την άνοιξη παρατηρούνται ελάχιστα δείγματα μολυσμένα, όπως και το φθινόπωρο τους μήνες Σεπτέμβρη, Οκτώβρη, Νοέμβρη.

Το 2018 όλες τις εποχές μετρήθηκαν δείγματα περισσότερο εντός ορίων και χωρίς περιεκτικότητα AFM1, ενώ υπήρξαν και αρκετά που ήταν μολυσμένα. Το καλοκαίρι και το φθινόπωρο του μήνες Αύγουστο, Σεπτέμβρη και Οκτώβρη υπήρξαν και λίγα δείγματα τα οποία περιείχαν πολύ υψηλές ποσότητες AFM1.

Η γενική εικόνα και για τα δύο έτη συνολικά μας δείχνει ότι του περισσότερους μήνες τα δείγματα είναι κυρίως αποδεκτά ή και χωρίς επιμόλυνση AFM1 ενώ τον Σεπτέμβρη και τον Οκτώβρη αυξήθηκαν τα επιμολυσμένα δείγματα γάλακτος.

Στην Περιφέρεια Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης μετρήθηκαν όλες τις εποχές του έτους περισσότερα δείγματα εντός ορίων ΕΕ ή και μη επιμολυσμένα ενώ το φθινόπωρο τους μήνες Σεπτέμβρη, Οκτώβρη βρέθηκαν αρκετά επιμολυσμένα με AFM1 δείγματα.

Στην Κεντρική Μακεδονία τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν εντός ορίων και χωρίς περιεκτικότητα AFM1 με 2 μόνο δείγματα το φθινόπωρο να περιέχουν αφλατοξίνη σε μη αποδεκτά επίπεδα.

Στην Δυτική Μακεδονία όλους τους μήνες τα δείγματα βρέθηκαν εντός ορίων και χωρίς AFM1 με 1 μόνο δείγμα μολυσμένο το φθινόπωρο.

Στην Περιφέρεια Θεσσαλίας η πλειοψηφία των δειγμάτων κάθε μήνα ήταν χωρίς AFM1 ή με επίπεδα εντός ορίων. Κάθε εποχή όμως, κυρίως του μήνες Μάρτιο, Απρίλιο, Ιούνιο, Ιούλιο, Αύγουστο, Σεπτέμβρη, Οκτώβρη, υπήρχαν πολλά επιμολυσμένα δείγματα τα οποία βρέθηκαν κυρίως το φθινόπωρο και το καλοκαίρι.

Στην Δυτική Ελλάδα τα δείγματα το φθινόπωρο ήταν κυρίως εντός ορίων και τους μήνες Αύγουστο, Σεπτέμβρη δεν περιέχουν καθόλου AFM1. Κάθε εποχή του έτους τα δείγματα ήταν αποδεκτά.

Τα δείγματα στην Στερεά Ελλάδα ήταν στην πλειοψηφία του εντός ορίων με κάποια να μην περιέχουν καθόλου AFM1, ενώ την άνοιξη το καλοκαίρι και το φθινόπωρο βρέθηκαν μερικά μολυσμένα και άρα μη αποδεκτά.

Στη Αττική τα δείγματα την άνοιξη ήταν καθαρά από AFM1 και το φθινόπωρο εντός ορίων με 2 μόνο μολυσμένα αυτές τις εποχές.

Στο Νότιο Αιγαίο τα περισσότερα δείγματα βρέθηκαν εντός ορίων με λίγα να μην περιέχουν ποσότητα AFM1 κάθε εποχή του έτους.

Από το γράφημα της Γεωγραφικής Κατανομής των μολυσμένων δειγμάτων παρατηρούμε ότι κυρίως στην Ανατολική Μακεδονία και Θράκη και στη Θεσσαλία

έχουμε τα περισσότερα μολυσμένα δείγματα ενώ κάποια υπάρχουν και στην Στερεά Ελλάδα.

Δεδομένου ότι η Ελλάδα βρίσκεται στη Μεσόγειο και περιτριγυρίζεται από θάλασσα έχει αυξημένα επίπεδα υγρασίας. Η θερμοκρασία επίσης είναι αρκετά υψηλή σχεδόν όλους τους μήνες του έτους. Επομένως το κλίμα της και ειδικότερα σε κάποιες περιοχές πιο υγρές και ζεστές ευνοεί την ανάπτυξη τοξικογενών μυκήτων και κατά συνέπεια την ανάπτυξη αφλατοξινών, εφόσον οι μύκητες αναπτύσσονται σε επίπεδα υγρασίας ακόμα και 15%, ενώ παράγουν τοξίνες σε υγρασία 50-60% σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη μυκήτων κυμαίνονται στους 25-30 °C , τιμές που στην Ελλάδα μπορούν να υπάρξουν σχεδόν όλους τους μήνες. Άρα λόγω των κλιματικών συνθηκών είναι λογικό να αναπτυχθούν αφλατοξίνες στις ζωοτροφές, πριν ή και μετά τη συγκομιδή κατά την αποθήκευση τους σε ανεπαρκείς εγκαταστάσεις εκτεθειμένες στις καιρικές συνθήκες, και συγκεκριμένα AFB1 η οποία μεταβολίζεται σε AFM1 και ανιχνεύεται στο γάλα των ζώων.

Το καλοκαίρι και το φθινόπωρο παρατηρήθηκαν τα περισσότερα θετικά δείγματα, κάτι το οποίο εξηγείται λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας και της υγρασίας. Τα καλοκαίρια υπάρχει παρατεταμένη ξηρασία πράγμα το οποίο επίσης διευκολύνει την ανάπτυξη μούχλας στα προϊόντα. Το φθινόπωρο λόγω των βροχοπτώσεων και την υψηλής θερμοκρασίας αυξάνονται αρκετά τα επίπεδα υγρασίας. Κάποιες αυξημένες τιμές AFM1 την άνοιξη μπορεί να οφείλονται στην αύξηση της θερμοκρασίας που συμβαίνει αυτούς τους μήνες.

Η Θεσσαλία λόγω της τοποθεσίας της , καθώς βρίσκεται δίπλα σε θάλασσα και έχει μεγάλες πεδινές εκτάσεις, άρα έχει εύκρατο, υγρό κλίμα, εξηγεί τα υψηλά επίπεδα AFM1 που βρέθηκαν στα δείγματά της. Επίσης η Ανατολική Μακεδονία και Θράκη παρόλο που είναι πιο βόρεια περιέχει μολυσμένα δείγματα, κάτι που μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη υγρασία λόγω της θάλασσας.

Εκτός από την τοποθεσία και το κλίμα της κάθε περιοχής υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσαν αύξηση των επιπέδων AFM1. Κάποιοι από αυτούς είναι κακές γεωργικές πρακτικές στο χωράφι και στη συγκομιδή των προϊόντων, κακές συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας των ζωοτροφών, καθώς και ελλιπής ξήρανση τους αλλά και κακή διαχείριση και καταπόνηση των ζώων στις

κτηνοτροφικές μονάδες. Ακόμα παίζει ρόλο και το είδος ζωτροφής που χορηγείται στα ζώα. Σε περιοχές με ιδανικό κλίμα όπου αναπτύσσεται βλάστηση και τα ζώα μπορούν να βοσκήσουν αναμένονται χαμηλότερες τιμές AFM1, αντίθετα με τις περιοχές όπου δεν υπάρχει η δυνατότητα ελεύθερης βοσκής και στα ζώα χορηγούνται κυρίως ζωτροφές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γιαγκίνης Κ., Καραντώνης Χ., Θεοχάρης Σ., (2015) : Τοξικολογία Τροφίμων , Εκδόσεις ΖΗΤΗ.

Κεχαγιάς, Χ., & Τσάκαλη, Ε., (2017). Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων. Αθήνα: Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abrar, M., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., Randhawa, M. A., Saeed, F., & Waqas, K. (2013). Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 862–874. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>

Alshannaq, A., & Yu, J. (2021a). Aflatoxins in Exported U . S . Food and Feed Products for 2010 – 2019. *Toxins*, 13(2), 90.

Alshannaq, A., & Yu, J. (2021b). Aflatoxins in Exported U . S . Food and Feed Products for 2010 – 2019. *Toxins*, 13(2), 90.

Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>

Altafini, A., Tassinari, M., Guerrini, A., & Roncada, P. (2020). Occurrence of aflatoxin m1 (Afm1) in donkey milk collected in northern italy. *Veterinary Sciences*, 7(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040176>

Batrinou, A., Houhoula, D., & Papageorgiou, E. (2020). Rapid detection of mycotoxins on foods and beverages with enzyme-linked immunosorbent assay. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 12(1), 40–49. <https://doi.org/10.15586/QAS2019.654>

Campagnollo, F. B., Ganev, K. C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A. G., Granato, D., Corassin, C. H., Oliveira, C. A. F., & Sant’Ana, A. S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, 68, 310–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.007>

Chiewchan, N., Mujumdar, A. S., & Devahastin, S. (2015). Application of Drying Technology to Control Aflatoxins in Foods and Feeds: A Review. *Drying Technology*, 33(14), 1700–1707. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1068795>

Drive, S. (2017). *HHS Public Access*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>.Metabolomics

Elsanhoty, R. M., Salam, S. A., Ramadan, M. F., & Badr, F. H. (2014). Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food*

- Control*, 43, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.002>
- Fallah, A. A., Jafari, T., Fallah, A., & Rahnama, M. (2009). Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1872–1875. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.042>
- Fan, J., Yuan, X., Li, W., Zhou, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Shi, L., & Zhou, B. (2020). Rapid and ultrasensitive method for determination of aflatoxin M1 in milk. *Food and Agricultural Immunology*, 31(1), 832–841. <https://doi.org/10.1080/09540105.2020.1780418>
- Flores-Flores, M. E., Lizarraga, E., López de Cerain, A., & González-Peñas, E. (2015). Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.020>
- Ghiasain, S. A., & Maghsood, A. H. (2012). Infants' exposure to aflatoxin M1 from Mother's breast milk in Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 41(3), 119–126.
- Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P. A., & Botsoglou, N. A. (2002). Distribution and stability of aflatoxin M 1 during production and storage of yoghurt. *Food Additives and Contaminants*, 19(11), 1043–1050. <https://doi.org/10.1080/0265203021000007831>
- Horvatovic, M. P., Glamocic, D., Jajic, I., & Krstovic, S. (2018). Aflatoxin M1 in Serbia and the region, past and future. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(4), 13736–13743. <https://doi.org/10.26327/RBL2018.165>
- Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A., & Ahmad Faizal, A. R. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 46(1), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>
- Ishikawa, A. T., Takabayashi-Yamashita, C. R., Ono, E. Y. S., Bagatin, A. K., Rigobello, F. F., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., & Itano, E. N. (2016). Exposure assessment of infants to aflatoxin M1 through consumption of breast milk and infant powdered milk in Brazil. *Toxins*, 8(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/toxins8090246>
- Kamala, A., Shirima, C., Jani, B., Bakari, M., Sillo, H., Rusibamayila, N., De Saeger, S., Kimanya, M., Gong, Y. Y., Simba, A., Wigenge, R., Justin, I., Kyombo, F., Tarimo, V., Hipolite, D., Mziray, R., Kaiz, K., Mutabuzi, C., Muita, M., ... Mengele, I. (2018). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Tanzania during 2016. *World Mycotoxin Journal*, 11(3), 311–320. <https://doi.org/10.3920/WMJ2018.2344>
- Ketney, O., Santini, A., & Oancea, S. (2017). Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 70(3), 320–331. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12382>
- Kitagawa, S. (2019). Liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 35(9), 949–950. <https://doi.org/10.2116/analsci.highlights1909>
- Klingelhöfer, D., Zhu, Y., Braun, M., Bendels, M. H. K., Brüggmann, D., &

- Groneberg, D. A. (2018). Aflatoxin – Publication analysis of a global health threat. *Food Control*, 89, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.017>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Mahato, D. K., Lee, K. E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K. N., Kumar, P., & Kang, S. G. (2019). Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 10(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>
- Maleki, F., Abdi, S., Davodian, E., Haghani, K., & Bakhtiyari, S. (2015). Exposure of Infants to Aflatoxin M1 from Mother's Breast Milk in Ilam, Western Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 6(5), 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.10.001>
- Min, L., Fink-Gremmels, J., Li, D., Tong, X., Tang, J., Nan, X., Yu, Z., Chen, W., & Wang, G. (2021). An overview of aflatoxin B1 biotransformation and aflatoxin M1 secretion in lactating dairy cows. *Animal Nutrition*, 7(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.002>
- Min, L., Li, D., Tong, X., Sun, H., Chen, W., Wang, G., Zheng, N., & Wang, J. (2020). The challenges of global occurrence of aflatoxin M1 contamination and the reduction of aflatoxin M1 in milk over the past decade. *Food Control*, 117(March), 107352. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107352>
- Mollayusefian, I., Ranaei, V., Pilevar, Z., Cabral-Pinto, M. M. S., Rostami, A., Nematollahi, A., Khedher, K. M., Thai, V. N., Fakhri, Y., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). The concentration of aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk: A worldwide systematic review and meta-analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 115(April), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.033>
- Pandey, A. K., Shakya, S., Patyal, A., Ali, S. L., Bhonsle, D., Chandrakar, C., Kumar, A., Khan, R., & Hattimare, D. (2021). Detection of aflatoxin M1 in bovine milk from different agro-climatic zones of Chhattisgarh, India, using HPLC-FLD and assessment of human health risks. *Mycotoxin Research*, 37(3), 265–273. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00437-9>
- Pecorelli, I., Branciarri, R., Roila, R., Ranucci, D., Bibi, R., van Asselt, M., & Valiani, A. (2020). Evaluation of aflatoxin M1 enrichment factor in different cow milk cheese hardness category. *Italian Journal of Food Safety*, 9(1), 5–8. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8419>
- Piğowski, M. (2019). Comparative analysis of notifications regarding mycotoxins in the rapid alert system for food and feed (RASFF). *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 11(8), 725–735. <https://doi.org/10.3920/QAS2018.1398>
- POSTOLACHE, A. N., CHELMU, S. S., ARITON, A. M., CIORPAC, M., POP, C., CIOBANU, M. M., & CREANGĂ, ȘTEOFIL. (2020). Analysis of RASFF notifications on contaminated dairy products from the last two decades: 2000-

2020. *Romanian Biotechnological Letters*, 25(2), 1396–1406.
<https://doi.org/10.25083/rbl/25.2/1396.1406>
- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 984–991. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.005>
- Products, M., & Mohammadi, H. (2011). A Review of Aflatoxin M 1 ., *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*, 1, 397–414.
- Pyka, A. (2014). Detection progress of selected drugs in TLC. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/732078>
- RASFF. (2020). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2020. In *Office of the European Union, 2021*.
<http://www.ssrn.com/abstract=1152122>
- Reddy, B. N., & Raghavender, C. R. (2007). Outbreaks of aflatoxicosis in India. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 7(5), 1–15.
<https://www.ajol.info/index.php/ajfand/article/view/136173>
- Rodríguez-Blanco, M., Ramos, A. J., Prim, M., Sanchis, V., & Marín, S. (2020). Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M1 in milk. *Mycotoxin Research*, 36(1), 11–22.
<https://doi.org/10.1007/s12550-019-00362-y>
- Saha Turna, N., & Wu, F. (2021). Aflatoxin M1 in milk: A global occurrence, intake, & exposure assessment. *Trends in Food Science and Technology*, 110(January), 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.093>
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 72(1), 32–42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>
- Sarmast, E., Fallah, A. A., Jafari, T., & Mousavi Khaneghah, A. (2021). Impacts of unit operation of cheese manufacturing on the aflatoxin M1 level: A global systematic review and meta-analysis. *Lwt*, 148(March), 111772.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111772>
- Shokri, H., & Torabi, S. (2017). The effect of milk composition, yeast-mould numbers and seasons on aflatoxin M1 amounts in camel milk. *Journal of Food Safety*, 37(2). <https://doi.org/10.1111/jfs.12300>
- Sneddon, J., Masuram, S., & Richert, J. C. (2007). Gas chromatography-mass spectrometry-basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. *Analytical Letters*, 40(6), 1003–1012.
<https://doi.org/10.1080/00032710701300648>
- Speijers, D. G. (2003). Mycotoxins and Food Safety. In *Trends in Food Science & Technology* (Vol. 14, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(03\)00025-6](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(03)00025-6)
- Tan, K. (2020). Aflatoxin and Its Toxic Tragedies in Kenya. *Journal of Young Investigators*, 38(2), 10–12. <https://doi.org/10.22186/jyi.38.2.10-12>

- Tozzi, B., Liponi, G. B., Meucci, V., Casini, L., Dall'Asta, C., Intorre, L., & Gatta, D. (2016). Aflatoxins M1 and M2 in the milk of donkeys fed with naturally contaminated diet. *Dairy Science and Technology*, 96(4), 513–523. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0285-2>
- Tsakiris, I. N., Tzatzarakis, M. N., Alegakis, A. K., Vlachou, M. I., Renieri, E. A., & Tsatsakis, A. M. (2013). Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.024>
- Urban, P. L. (2016). Quantitative mass spectrometry: An overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079). <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0382>
- Vaz, A., Cabral Silva, A. C., Rodrigues, P., & Venâncio, A. (2020). Detection methods for aflatoxin m1 in dairy products. *Microorganisms*, 8(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020246>