



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα  
γιαούρτης  
από την περιοχή της Θεσσαλίας»**

**Μάρθα Αθανασίου Μπίχτα**

*Διοίκηση Επιχειρήσεων & Οργανισμών, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο*

**Λάρισα, Σεπτέμβριος 2017**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα  
γιαούρτης  
από την περιοχή της Θεσσαλίας»**

**Μάρθα Αθανασίου Μπίχτα**

*Διοίκηση Επιχειρήσεων & Οργανισμών, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο*

**Λάρισα, Σεπτέμβριος 2017**

# **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

## **ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:**  
**ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**

### **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα γιαούρτης  
από την περιοχή της Θεσσαλίας»**

**Μάρθα Αθανασίου Μπίχτα**

*Λάρισα, Σεπτέμβριος 2017*

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Νικόλαος Σολωμάκος**, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
- 2. Δρ. Αλέξανδρος Γκόβαρης**, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3. Δρ. Ανδρεάνα Πεξαρά**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στα λατρεμένα μου δίδυμα, Κομνηνό και Κοραλία  
και στον σύζυγό μου Ιωάννη,  
για την πολύτιμη συμπαράστασή τους

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

*Μάρθα Μπίχτα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής 2017*

### **Μελέτη της παρουσίας αφλατοξίνης M1 σε δείγματα γιαούρτης από την περιοχή της Θεσσαλίας.**

**Λέξεις κλειδιά:** αφλατοξίνη M1 (AFM1), αφλατοξίνη B1 (AFB1), μυκοτοξίνες, γιαούρτι, δημόσια υγεία, ELISA, Θεσσαλία

Οι αφλατοξίνες είναι τοξικές, καρκινογόνες και/ή τερατογόνες ουσίες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της παρουσίας της αφλατοξίνης M1 (AFM1) σε γιαούρτι που παρασκευάζεται στην περιφέρεια της Θεσσαλίας.

Συνολικά συλλέχθηκαν 53 δείγματα γιαουρτιού το χρονικό διάστημα Μάιος – Ιούνιος 2017. Τα 35 δείγματα συλλέχθηκαν από σημεία λιανικής πώλησης στην Καρδίτσα, τη Λάρισα, το Βόλο και τα Τρίκαλα και αφορούσαν γιαούρτια που παρασκευάστηκαν στην περιοχή της Θεσσαλίας από μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους βιοτεχνίες και βιομηχανίες. Επίσης, συλλέχθηκαν 18 δείγματα ιδιοπαρασκευής από περιοχές των Τρικάλων, που παρασκευάστηκαν σε οικιακό επίπεδο από μικρούς κτηνοτρόφους και διακινούνται τοπικά σε πολύ μικρό επίπεδο.

Τα 53 δείγματα γιαουρτιού αναλύθηκαν με μια εμπορική ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), όπως προτείνεται από τον παρασκευαστή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κανένα από τα δείγματα γιαουρτιού δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία της AFM1.

Ωστόσο η τήρηση των κανόνων ασφάλειας και ελέγχου των τροφίμων θα πρέπει να είναι συνεχής και συστηματική, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο την επικινδυνότητα έκθεσης των καταναλωτών και συμβάλλοντας στην προστασία της δημόσιας υγείας.

## **ABSTRACT**

### **Occurrence of aflatoxin M1 in yoghurt samples in Thessaly region (Greece)**

**Keywords:** aflatoxin M1, aflatoxin B1, mycotoxins, yoghurt, public health, ELISA, Thessaly (Greece)

Aflatoxins that can be found in milk and milk products are toxic, carcinogenic, and/or teratogenic to humans and animals. The objective of this study was to investigate the occurrence of aflatoxin M1 (AFM1) in yoghurt produced in the region of Thessaly.

In total, 53 samples were collected from May to June 2017. 35 samples were collected from local stores and supermarkets located in the region of Thessaly, Greece. The 35 samples were produced by small, medium and large scale milk industries located also in the region of Thessaly, Greece.

Additionally, 18 samples of homemade yoghurt were collected from small scale producers in the region of Trikala.

All 53 samples were examined using a commercial ELISA method for AFM1 as indicated by the producer. The results showed that all 53 yoghurt samples were negative for the presence of AFM1.

## Περιεχόμενα

|   |            |
|---|------------|
| <b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....</b>  | <b>i</b>   |
| <b>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>  | <b>ii</b>  |
| <b>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>   | <b>iii</b> |
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>   | <b>iv</b>  |
| <b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>   |            |
| <b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> : Ο κλάδος της κτηνοτροφίας και της γαλακτοκομίας .....</b> | <b>1</b>   |
| 1.1 Γενικά στοιχεία του κλάδου της κτηνοτροφίας .....                                 | 1          |
| 1.2 Ο κλάδος της κτηνοτροφίας στην Ευρωπαϊκή Ένωση .....                              | 1          |
| 1.3. Η κτηνοτροφία στην Ελλάδα .....  | 3          |
| 1.4. Ο κλάδος της γαλακτοκομίας στη Θεσσαλία .....                                    | 8          |
| 1.5. Η σημασία του γάλακτος και των προϊόντων του στη διατροφή του ανθρώπου .         | 11         |
| 1.5.1. Χαρακτηριστικά του αγελαδινού γάλακτος.....                                    | 12         |
| 1.5.2. Χαρακτηριστικά του πρόβειου γάλακτος .....                                     | 13         |
| 1.5.3. Χαρακτηριστικά του αίγιου γάλακτος .....                                       | 13         |
| 1.6. Η γιαούρτη ή το γιαούρτι.....  | 14         |
| 1.7. Τεχνολογία παρασκευής γιαούρτης .....  | 14         |
| 1.8. Η θρεπτική αξία του γιαουρτιού .....   | 16         |
| <b>Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> : Μυκοτοξίνες.....</b>                                      | <b>17</b>  |
| 2.2. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες .....  | 18         |
| 2.2.1 Ωχρατοξίνες .....   | 18         |
| 2.2.2. Τριχοθεσίνες .....   | 21         |
| 2.2.3. Φουμονισίνες .....   | 23         |
| 2.2.4. Ζεαραλενόνη .....  | 26         |
| 2.3. Άλλες μυκοτοξίνες που ενδιαφέρουν τη Δημόσια Υγεία .....                         | 27         |
| 2.4. Περιβαλλοντικοί παράγοντες ανάπτυξης των μυκήτων .....                           | 29         |
| 2.5. Η παρουσία των μυκοτοξινών στις ζωοτροφές .....                                  | 31         |
| 2.6. Η παρουσία των μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα .....                            | 32         |
| <b>Κεφάλαιο 3ο : Αφλατοξίνες .....</b>  | <b>34</b>  |
| 3.1. Ιστορική αναδρομή .....  | 34         |
| 3.2 Η προέλευση των αφλατοξινών .....   | 35         |
| 3.3. Χημική δομή και ιδιότητες των αφλατοξινών .....                                  | 37         |
| 3.4. Ο μεταβολισμός των αφλατοξινών και η παραγωγή της AFM1 .....                     | 39         |
| 3.5. Η τοξικότητα των αφλατοξινών .....   | 41         |
| 3.6. Η επίδραση στην υγεία των ζώων .....   | 43         |
| 3.7. Η παρουσία της αφλατοξίνης M1 στο γάλα και στα προϊόντα του .....                | 44         |
| 3.8. Η επίδραση των αφλατοξινών στην υγεία του ανθρώπου .....                         | 47         |
| 3.9. Νομοθεσία .....  | 49         |
| 3.10. Μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού της συγκέντρωσης των αφλατοξινών           | 50         |
| 3.11. Προληπτικές ενέργειες αποφυγής ανάπτυξης μυκήτων στις καλλιέργειες .....        | 56         |
| 3.12. Μέθοδοι απομείωσης των αφλατοξινών.....   | 59         |
| 3.13. Μέθοδοι μείωσης της συγκέντρωσης της AFM1 στο γάλα.....                         | 60         |
| <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>  |            |
| <b>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> : Υλικά και μέθοδος ανάλυσης .....</b>                      | <b>62</b>  |
| 4.1. Συλλογή δειγμάτων.....   | 62         |
| 4.2. Προσδιορισμός της Αφλατοξίνης AFM1 στο γιαούρτι.....                             | 62         |
| <b>Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> : Αποτελέσματα – Συζήτηση.....</b>                          | <b>63</b>  |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.1. Αποτελέσματα ανάλυσης και συζήτηση .....     | 63        |
| <b>Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα .....</b> | <b>66</b> |
| 6.1. Συμπεράσματα .....                           | 66        |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>                         | <b>67</b> |



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νικόλαο Σολωμάκο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τις χρήσιμες συμβουλές και την πολύτιμη καθοδήγησή του στην συγγραφή της παρούσας μελέτης και για την άμεση υποστήριξή του με την άριστη επιστημονική γνώση και εμπειρία του, στην υλοποίηση του πειραματικού μέρους. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την προτροπή του να επιλέξω το συγκεκριμένο ερευνητικό θέμα καθώς η γνώση και η εμπειρία που αποκόμισα είναι μοναδικές.

Ευχαριστίες οφείλονται επίσης στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη και την Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα Ανδρεάνα Πεξαρά, για την καθοδήγηση, επιστημονικότητα και άριστη συνεργασία τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ιδιαίτερη μνεία με θερμές ευχαριστίες οφείλεται στον Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, που με την εμπιστοσύνη και αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, στάθηκε πολύτιμος αρωγός στην επιτυχή ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της οικογένειάς μου, για την υπομονή, κατανόηση, απεριόριστη στήριξη και συμπαράσταση που έδειξαν, επιτρέποντάς μου να πραγματοποιήσω το όνειρό μου...

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

|   |    |
|---|----|
| <b>Πίνακας 1:</b> Πληθυσμός αγροτικών ζώων 2015 (εκατομμύρια κεφαλές). Πηγή: Eurostat 2017 .....  | 2  |
| <b>Πίνακας 2:</b> Συλλογή γάλακτος για το έτος 2015 (σε χιλιάδες τόνους). Πηγή: Eurostat 2017 .....   | 3  |
| <b>Πίνακας 3:</b> Συνολική παραχθείσα ποσότητα αιγοπρόβειου γάλακτος 2016. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017 .....  | 5  |
| <b>Πίνακας 4:</b> Δηλωθείσα ποσότητα σε τόνους πρόβειου γάλακτος για την περίοδο 2002-2016. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017 .....                         | 6  |
| <b>Πίνακας 5:</b> Παραδόσεις αγελαδινού γάλακτος στην Ε.Ε ανά Κράτη- Μέλη σε χιλιάδες τόνους για την περίοδο 2005-2015. Πηγή: Eurostat 2017 ..... | 7  |
| <b>Πίνακας 6:</b> Παραχθείσες ποσότητες αγελαδινού γάλακτος για τη διετία 2015-2016. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017 .....                                | 8  |
| <b>Πίνακας 7:</b> Παραγόμενες ποσότητες τυριών ανά Περιφέρεια. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017 .....  | 9  |
| <b>Πίνακας 8:</b> Είδη μυκήτων και τρόφιμα που επιμολύνουν .....  | 33 |
| <b>Πίνακας 9:</b> Ενδεικτικά νομοθετικά όρια διαφόρων χωρών .....   | 50 |
| <b>Πίνακας 10:</b> Αποτελέσματα της παρουσίας AFM1 σε δείγματα γιαουρτιού .....   | 64 |

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

|   |    |
|---|----|
| <b>Εικόνα 1:</b> Ο παραδοσιακός τρόπος παραγωγής τυροκομικών στο χώρο της θερινής κατοικίας των κτηνοτρόφων ..... | 10 |
| <b>Εικόνα 2:</b> Ενδεικτικό διάγραμμα ροής παραγωγής παραδοσιακής γιαούρτης .....                                 | 15 |
| <b>Εικόνα 3:</b> Ο μύκητας <i>aspergillus ochraceus</i> .....   | 19 |
| <b>Εικόνα 4:</b> Η χημική δομή της ωχρατοξίνης A (Khoury and Atoui, 2010).....                                    | 20 |
| <b>Εικόνα 5:</b> Η βασική χημική δομή των τριχοθεσινών (He et al., 2010).....                                     | 21 |
| <b>Εικόνα 6:</b> Η ομάδα A και B των τριχοθεσινών (Ibanez-Vea et al., 2011).....                                  | 22 |
| <b>Εικόνα 7:</b> Ο μύκητας <i>fusarium verticillioides</i> .....  | 24 |
| <b>Εικόνα 8:</b> Η χημική δομή των φουμονισινών (Pharmaceutica Analytica Acta).....                               | 25 |
| <b>Εικόνα 9:</b> Η χημική δομή της ζεαραλενόνης (Wikipedia).....  | 27 |
| <b>Εικόνα 10:</b> Σκλήρωτιο του μύκητα <i>Claviceps purpurea</i> .....  | 28 |
| <b>Εικόνα 11:</b> Κονίδια του <i>aspergillus flavus</i> στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο .....                         | 36 |
| <b>Εικόνα 12:</b> Οι χημικοί τύποι των αφλατοξινών (Zhang et al., 2014).....                                      | 38 |
| <b>Εικόνα 13:</b> Το μονοπάτι της βιομετατροπής της AFB1 στον οργανισμό (Campagnollo et al., 2016) .....          | 40 |
| <b>Εικόνα 14:</b> Σχηματική απεικόνιση της αναλυτικής χρωματογραφικής τεχνικής HPLC (Global CompliancePanel)..... | 52 |
| <b>Εικόνα 15:</b> Εμπορικό kit ELISA για την ανίχνευση αφλατοξινών στο γάλα και στα προϊόντα του .....            | 55 |
| <b>Εικόνα 16:</b> Καρπός καλαμποκιού επιμολυσμένος με <i>aspergillus flavus</i> .....                             | 57 |

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες μια σειρά διατροφικών σκανδάλων, που έπληξε σημαντικά το κύρος της βιομηχανίας τροφίμων, ενεργοποίησε το ενδιαφέρον των κρατικών θεσμών και ρυθμιστικών αρχών για την υιοθέτηση μηχανισμών που μπορούν να διασφαλίσουν την ασφάλεια του καταναλωτή και να προασπίσουν τη δημόσια υγεία. Επιπρόσθετα, ευρύτερες αλλαγές σε κοινωνικό και οικονομικό επίπεδο, όπως ανάπτυξη του διεθνούς εμπορίου, εισαγωγή νέων ειδών τροφίμων, αλλαγές σε διατροφικές συνήθειες, συνέτειναν στην ανάπτυξη συστημάτων διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων συμβάλλοντας αποφασιστικά στη διαδικασία παραγωγής ασφαλών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ζωοτροφών.

Πρόκειται στην ουσία για υιοθέτηση προληπτικών συστημάτων ελέγχου που βασίζονται στην ανάλυση επικινδυνότητας σε όλα τα στάδια παραγωγής του τροφίμου και όχι μόνο στην εκ των υστέρων εξέταση και έλεγχο του τελικού προϊόντος. Δεδομένου ότι φυσικοί, βιολογικοί, χημικοί παράγοντες δύνανται να επηρεάσουν την ασφάλεια και καταλληλότητα των τροφίμων, η πρωτογενής παραγωγή αποτελεί το πρώτο στάδιο επιμόλυνσης ενός τροφίμου.

Η ασφάλεια των τροφίμων, που διασφαλίζει την επισιτιστική ασφάλεια και την ευζωία, έχει αναδειχθεί σε μείζον θέμα προστασίας της δημόσιας υγείας. Η επιμόλυνση της παγκόσμιας αγοράς γάλακτος και ζωοτροφών με αφλατοξίνες αποτελεί ένα σοβαρό ζήτημα δημόσιας υγείας τόσο για τις αναδυόμενες χώρες όσο και για τον βιομηχανοποιημένο κόσμο (Frazzoli et al., 2017).

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου και ειδικά της μεσογειακής διατροφής καθώς καταναλώνονται σε καθημερινή βάση από όλες τις ηλικιακές ομάδες, βρέφη, παιδιά, ενήλικες, στο πλαίσιο μιας ισορροπημένης διατροφής.

Οι αφλατοξίνες αποτελούν την πιο μελετημένη ομάδα μυκοτοξινών λόγω της επικινδυνότητάς τους για τη δημόσια υγεία. Οι αφλατοξίνες παράγονται από μύκητες της οικογένειας *Aspergillus spp.* και προσβάλλουν τις αγροτικές καλλιέργειες. Τα είδη που απασχολούν ιδιαίτερος την επιστημονική κοινότητα και τη βιομηχανία τροφίμων είναι τα *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε παγκόσμιο επίπεδο όλες οι αφλατοξίνες θεωρούνται εξαιρετικά τοξικές ουσίες με μεταλλαξιογόνο, τερατογόνο, γονοτοξική και καρκινογόνο δράση για τον οργανισμό των ζώων και των ανθρώπων (Prandini et al., 2008).

Ειδικά η αφλατοξίνη B1 επάγει τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο και έχει υπολογιστεί ότι αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα σε περισσότερο από το 30% των καρκίνων του ήπατος σε παγκόσμια κλίμακα ανά έτος (WHO, 2014; Gizachew et al., 2016). Το 1993 οι αφλατοξίνες ταξινομήθηκαν κατά IARC στην κατηγορία I ως καρκινογόνες ουσίες για τον ανθρώπινο οργανισμό (IARC, 2012).

Η αφλατοξίνη M1 αποτελεί την υδροξυλιωμένη μορφή της AFB1 και ανιχνεύεται στο γάλα και το γιαούρτι, όταν τα ζώα καταναλώσουν επιμολυσμένες με αφλατοξίνες

ζωοτροφές. Η AFM1 παρουσιάζει κυρίως μεταλλαξιογόνο και γονοτοξική δράση ενώ έχει καταταχθεί στην κατηγορία 2B κατά IARC ως πιθανά καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο (IARC, 2012).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση της παρουσίας AFM1 σε δείγματα γιαουρτιού που συλλέχθηκαν από γαλακτοβιομηχανίες μικρής, μεσαίας και υψηλής δυναμικότητας της Περιφέρειας Θεσσαλίας καθώς και σε δείγματα γιαούρτης ιδιοπαρασκευής (σπιτικού τύπου) από παραγωγούς που δραστηριοποιούνται στην περιοχή των Τρικάλων.

Ειδικότερα, η μελέτη παρουσιάζει την κατάσταση του κτηνοτροφικού και γαλακτοκομικού κλάδου στη Θεσσαλία (Κεφάλαιο 1) και περιγράφει την έννοια των κυριότερων μυκοτοξινών και την επίδρασή τους στη δημόσια υγεία (Κεφάλαιο 2). Στη συνέχεια αναλύει την κατηγορία και τους τύπους των αφλατοξινών, τη βιομετατροπή της AFB1 σε AFM1 και την ανίχνευσή της στο γάλα και το γιαούρτι, την τοξική επίδρασή της στην υγεία των ζώων και των ανθρώπων και τις μεθόδους ανίχνευσης και απομείωσης των αφλατοξινών στα γαλακτοκομικά προϊόντα και τις ζωοτροφές (Κεφάλαιο 3).

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η διαδικασία της πειραματικής ανάλυσης 53 δειγμάτων γιαούρτης από την περιοχή της Θεσσαλίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της AFM1. Η ανάλυση υλοποιήθηκε με χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> : Ο κλάδος της κτηνοτροφίας και της γαλακτοκομίας

### 1.1 Γενικά στοιχεία του κλάδου της κτηνοτροφίας

Η κτηνοτροφία αποτελεί σημαντικό κλάδο της πρωτογενούς παραγωγής, που αφορά στην εκτροφή και εκμετάλλευση παραγωγικών ζώων όπως βοοειδή, αιγοπρόβατα, χοίροι, πτηνά, μέλισσες. Σε παγκόσμιο επίπεδο η κτηνοτροφία συμβάλλει στον βιοπορισμό, την επισιτιστική ασφάλεια αλλά και την υγεία ενός δισεκατομμυρίου ανθρώπων περίπου. Λόγω της αύξησης του πληθυσμού μέχρι το 2050, αλλά και της ολοκλήρωσης της οικονομικής ανάπτυξης ορισμένων χωρών, η ζήτηση σε τρόφιμα αναμένεται ν' αυξηθεί κατά 60% τα επόμενα έτη (Robinson et al., 2014).

Ο αναπτυσσόμενος λοιπόν τομέας της κτηνοτροφίας για να καλύψει τη ζήτηση σε τρόφιμα, ασκεί με τη σειρά του πίεση σε ζητήματα όπως η περαιτέρω εκμετάλλευση των φυσικών πόρων συμβάλλοντας έτσι στην παγκόσμια περιβαλλοντική αλλαγή. Η αλματώδης ανάπτυξη του κτηνοτροφικού κλάδου και η εντατικοποίηση των συστημάτων παραγωγής της εγείρουν επίσης ζητήματα δημόσιας υγείας αναφορικά με τις πιθανότητες εμφάνισης και εξάπλωσης διαφόρων νόσων στα ζώα αλλά και στους ανθρώπους (Robinson et al., 2014).

### 1.2 Ο κλάδος της κτηνοτροφίας στην Ευρωπαϊκή Ένωση

Παρατηρώντας τα στοιχεία που παρατίθενται στους κάτωθι πίνακες της Eurostat, Πίνακες 1 & 2, διαπιστώνουμε ότι στην Ε.Ε το ζωικό κεφάλαιο αιγοπροβάτων αριθμεί 98 εκατομμύρια κεφαλές και οι χώρες με το μεγαλύτερο αριθμό προβάτων είναι το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ισπανία, η Ρουμανία και η Ελλάδα, ενώ η χώρα μας κατέχει την πρώτη θέση σε αριθμό αιγών ακολουθούμενη από την Ισπανία.

Ο πληθυσμός δε των βοοειδών, αντιστοιχεί στα 89.2 εκατομμύρια κεφαλές, με την πρώτη θέση να κατέχει η Γαλλία, ακολουθούμενη από τη Γερμανία και το Η. Βασίλειο. Αντίστοιχα διαφαίνεται ότι οι χώρες με το μεγαλύτερο ύψος παραγωγής σε πρόβειο γάλα που παραδίδεται στη γαλακτοβιομηχανία είναι η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία και η Γαλλία (Eurostat, 2017).

**Πίνακας 1:Πληθυσμός αγροτικών ζώων 2015 (εκατομμύρια κεφαλές). Πηγή: Eurostat 2017<sup>1</sup>**

|                  | Bovine animals | Pigs         | Sheep       | Goats       |
|------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|
| <b>EU-28</b>     | <b>89.2</b>    | <b>148.7</b> | <b>85.5</b> | <b>12.5</b> |
| Belgium          | 2.5            | 6.4          | :           | :           |
| Bulgaria         | 0.6            | 0.6          | 1.3         | 0.3         |
| Czech Republic   | 1.4            | 1.6          | :           | :           |
| Denmark          | 1.6            | 12.7         | :           | :           |
| Germany          | 12.6           | 27.7         | 1.6         | 0.1         |
| Estonia          | 0.3            | 0.3          | :           | :           |
| Ireland          | 6.4            | 1.5          | 3.3         | :           |
| Greece           | 0.6            | 0.9          | 8.9         | 4.0         |
| Spain            | 6.2            | 28.4         | 16.5        | 3.0         |
| France           | 19.4           | 13.3         | 7.1         | 1.2         |
| Croatia          | 0.5            | 1.2          | 0.6         | 0.1         |
| Italy            | 6.2            | 8.7          | 7.1         | 1.0         |
| Cyprus           | 0.1            | 0.3          | 0.3         | 0.2         |
| Latvia           | 0.4            | 0.3          | 0.1         | 0.0         |
| Lithuania        | 0.7            | 0.7          | 0.1         | 0.0         |
| Luxembourg       | 0.2            | 0.1          | :           | :           |
| Hungary          | 0.8            | 3.1          | 1.2         | 0.1         |
| Malta            | 0.0            | 0.0          | 0.0         | 0.0         |
| Netherlands      | 4.3            | 12.5         | 1.0         | 0.5         |
| Austria          | 2.0            | 2.8          | 0.4         | 0.1         |
| Poland           | 5.8            | 10.6         | :           | :           |
| Portugal         | 1.6            | 2.2          | 2.0         | 0.4         |
| Romania          | 2.1            | 4.9          | 9.8         | 1.4         |
| Slovenia         | 0.5            | 0.3          | :           | :           |
| Slovakia         | 0.5            | 0.6          | 0.4         | 0.0         |
| Finland          | 0.9            | 1.2          | :           | :           |
| Sweden           | 1.4            | 1.4          | 0.6         | :           |
| United Kingdom   | 9.8            | 4.4          | 23.1        | 0.1         |
| Iceland          | 0.1            | 0.0          | :           | :           |
| Montenegro       | 0.1            | 0.0          | 0.2         | 0.0         |
| Serbia           | 0.9            | 3.3          | 1.8         | 0.2         |
| Turkey           | 14.1           | :            | 31.5        | 10.4        |
| FYR of Macedonia | 0.3            | 0.2          | 0.7         | 0.1         |

Σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης η εκτροφή αιγοπροβάτων έχει μικρή σημασία και γίνεται κυρίως για την αξιοποίηση του κρέατός τους, σε αντίθεση με τις νότιες χώρες όπως στην Ελλάδα, όπου εκτός από την κρεατοπαραγωγική κατεύθυνση, το 95% των ζώων οδηγείται σε άλμεξη με σκοπό την εκμετάλλευση του γάλακτος. Παρόμοια τακτική ακολουθείτε κι από την Ιταλία όπου το ποσοστό των ζώων αντιστοιχεί στο 70%.

Η χώρα μας συνεισφέρει το 30% περίπου του συνολικά παραγόμενου αιγοπρόβειου γάλακτος στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ ελάχιστες χώρες σε παγκόσμιο επίπεδο προσεγγίζουν ή υπερβαίνουν τη δική μας παραγωγή (Κεχαγιάς, 2011). Από την ανάλυση της περιόδου των 30 χρόνων της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το 1983 έως το 2013 προκύπτει ότι το 1983 και την τότε Ευρώπη των 10 Κρατών- Μελών, το ποσοστό παράδοσης αιγοπρόβειου γάλακτος ήταν πολύ μικρό μόλις της τάξης του 2.3%. Το 2013 για την Ευρώπη των 28 Κρατών- Μελών πια, το ποσοστό παράδοσης ανήλθε στο 3.5% .

Στην αύξηση αυτή η Ελλάδα διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο, αποτελώντας της κύρια παραγωγό χώρα αιγοπρόβειου γάλακτος, με μερίδιο συμμετοχής της τάξης του 21.4% (2013), ακολουθούμενη από την Ισπανία με ποσοστό 21.1%, την Γαλλία με ποσοστό

<sup>1</sup> ([http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/5/5a/Livestock\\_population%2C\\_2015\\_%28million\\_head%29\\_T1.png](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/5/5a/Livestock_population%2C_2015_%28million_head%29_T1.png))



17%, την Ιταλία με ποσοστό 14.9% και τέλος τη Ρουμανία με ποσοστό 12.8%. (Eurostat, 2015).

**Πίνακας 2: Συλλογή γάλακτος για το έτος 2015 (σε χιλιάδες τόνους). Πηγή: Eurostat 2017<sup>2</sup>**

|                       | Milk collected from cows | Milk collected from other animals |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <b>EU-28</b>          | <b>151 588</b>           | <b>3 526</b>                      |
| <b>Belgium</b>        | 3 988                    | 17                                |
| <b>Bulgaria</b>       | 489                      | 31                                |
| <b>Czech Republic</b> | 2 482                    | 0                                 |
| <b>Denmark</b>        | 5 278                    | 0                                 |
| <b>Germany</b>        | 31 879                   | 13                                |
| <b>Estonia</b>        | 720                      | 0                                 |
| <b>Ireland</b>        | 6 585                    | 0                                 |
| <b>Greece</b>         | 603                      | 678                               |
| <b>Spain</b>          | 6 800                    | 1 004                             |
| <b>France</b>         | 25 323                   | 746                               |
| <b>Croatia</b>        | 513                      | 7                                 |
| <b>Italy</b>          | 10 500                   | 626                               |
| <b>Cyprus</b>         | 173                      | 47                                |
| <b>Latvia</b>         | 808                      | 0                                 |
| <b>Lithuania</b>      | 1 438                    | 0                                 |
| <b>Luxembourg</b>     | 333                      | 0                                 |
| <b>Hungary</b>        | 1 536                    | 0                                 |
| <b>Malta</b>          | 42                       | 0                                 |
| <b>Netherlands</b>    | 13 331                   | 241                               |
| <b>Austria</b>        | 3 103                    | 18                                |
| <b>Poland</b>         | 10 874                   | 2                                 |
| <b>Portugal</b>       | 1 935                    | 42                                |
| <b>Romania</b>        | 919                      | 48                                |
| <b>Slovenia</b>       | 554                      | 0                                 |
| <b>Slovakia</b>       | 865                      | 7                                 |
| <b>Finland</b>        | 2 394                    | 0                                 |
| <b>Sweden</b>         | 2 933                    | 0                                 |
| <b>United Kingdom</b> | 15 191                   | 0                                 |
| <b>Norway</b>         | 1 570                    | 21                                |
| <b>Switzerland</b>    | 3 457                    | 0                                 |
| <b>Serbia</b>         | 862                      | 0                                 |
| <b>Turkey</b>         | 8 934                    | 99                                |

### 1.3. Η κτηνοτροφία στην Ελλάδα

Η Ελλάδα έχει μεγάλη παράδοση στην κτηνοτροφία από τους αρχαίους ακόμη χρόνους όπως τεκμηριώνεται και από αναφορές του Ομήρου. Οι κλιματολογικές συνθήκες και η γεωμορφολογία του εδάφους της Ελλάδας αποτέλεσαν καθοριστικούς ευνοϊκούς παράγοντες για την ανάπτυξη της αιγοπροβατοτροφίας από το παρελθόν έως και τις μέρες μας, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην περιφερειακή αγροτική ανάπτυξη και στη διατήρηση του κοινωνικού ιστού στο ύπαιθρο. Σε πολλές ορεινές αλλά και νησιωτικές περιοχές αποτελεί μέχρι και σήμερα την κύρια οικονομική δραστηριότητα των κατοίκων τους.

<sup>2</sup> ([http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/d/dd/T2\\_Collection\\_of\\_milk\\_by\\_dairies%2C\\_2015v1.png](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/d/dd/T2_Collection_of_milk_by_dairies%2C_2015v1.png))



Η αιγοπροβατοτροφία αποτελεί παραδοσιακά έναν από τους δυναμικότερους κλάδους του πρωτογενούς τομέα στη χώρα μας, καθώς καλύπτει το 27 % της ακαθάριστης αξίας της ζωικής παραγωγής, το 7.2% της ακαθάριστης γεωργικής αξίας, το 6.5% του ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος, ενώ απασχολεί το 17% του εργατικού δυναμικού (Tzouramani et al., 2011).

Ο βασικός όγκος των εκτροφών, περίπου 85% του συνολικού ζωικού κεφαλαίου απαντάται συνήθως σε ορεινές, ημιορεινές περιοχές και εν γένει μειονεκτικές περιοχές της Ελλάδας. Αφορούν ως επί των πλείστων σε οικογενειακού τύπου εκμεταλλεύσεις, με υψηλό βαθμό διαφοροποίησης αναφορικά με το μέγεθος του κοπαδιού, το επενδεδυμένο κεφάλαιο, (υποδομές και μηχανήματα) αλλά και την παραγωγικότητα, διαδραματίζοντας με τον τρόπο αυτό σημαντικό κοινωνικό, οικονομικό αλλά και οικολογικό ρόλο στις περιοχές αυτές (Tzouramani et al., 2011; Sossidou et al., 2013).

Τα πιο συνηθισμένα συστήματα διαχείρισης που παραδοσιακά ακολουθούνται στην Ελλάδα είναι το εκτατικό-ποιμενικό και το ημι-εκτατικό σύστημα, ενώ τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια τάση μετάβασης στο ημι-εντατικό σύστημα ή εντατικό ενσταβλισμένο σύστημα εκτροφής, το οποίο αναμένεται να δημιουργήσει νέες ευκαιρίες οικονομικής ανάπτυξης στον κλάδο. Το εντατικό ή ημι-εντατικό σύστημα εκτροφής ντόπιων φυλών αιγοπροβάτων σε συνδυασμό με τις γεωκλιματικές συνθήκες που επικρατούν στη χώρα μας, μπορούν να προδιαθέσουν την παραγωγή της AFB<sub>1</sub> στις ζωοτροφές και συνεπώς η παρουσία της AFM<sub>1</sub> στο γάλα θεωρείται πιθανή, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί στο παρελθόν από σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα (Roussi et al., 2002).

Τα δύο πρώτα συστήματα εκτροφής στηρίζονται στη μετακίνηση των ζώων για την εξεύρεση τροφής σε φυσικούς βοσκότοπους, οι οποίοι όπως είναι αυτονόητο δεν έχουν δεχθεί καλλιεργητική διαχείριση και φυτοπροστατευτικά (Tzouramani et al., 2011; Sossidou et al., 2013).

Ο εκτατικός τρόπος βοσκής σε συνδυασμό με τις εγχώριες φυλές προβάτων, συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων και στη μείωση του κόστους ενώ παράλληλα αξιοποιούνται οι φυσικοί βοσκότοποι, όπου τα ζώα παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και βελτιώνεται η ευζωία τους και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα διατηρείται χαμηλό. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εκτατική μορφή εκτροφής δε διαφέρει σημαντικά από τη βιολογική προβατοτροφία (Τζουραμάνη και συν., 2008; Κεχαγιάς, 2011).

Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία της Ελληνικής Στατιστικής Αρχής (ΕΛΣΤΑΤ, 2017), οι κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις και ο αριθμός των ζώων στο σύνολο της χώρας κυμαίνεται ως εξής: α) αριθμός εκμεταλλεύσεων προβάτων 94.448 και αριθμός ζώων 8.686.117 κεφαλές β) αριθμός εκμεταλλεύσεων αιγών 68.274 και αριθμός ζώων 3.654.793 κεφαλές.

Σε αντίθεση με το αγελαδινό γάλα που προορίζεται για άμεση κατανάλωση (έπειτα από παστερίωση), η παραγωγή του αιγοπρόβειου γάλακτος προορίζεται κατά κύριο λόγο για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων, συνήθως σε μικρές βιοτεχνίες (τυροκομεία) κυρίως για την παραγωγή Φέτας, γιαουρτιού και άλλων τυροκομικών

προϊόντων, όπως κασέρι, γραβιέρα, ανθότυρο, τσαλαφούτι, κ.α., καθώς το 90% περίπου των προϊόντων αυτών παρασκευάζονται από μίγμα πρόβειου και γίδινου γάλακτος.

Τα προϊόντα αυτά κατέχουν εξέχουσα θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών και χαρακτηρίζονται από υψηλή προστιθέμενη αξία, ενώ τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν μια συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση από τις αγορές του εξωτερικού, Ευρώπη, Αμερική, Αυστραλία, Καναδά, διότι πρόκειται για προϊόντα στενά συνδεδεμένα με τη μεσογειακή διατροφή, που οι καταναλωτές έχουν αναγνωρίσει την ιδιότυπη ποιότητά τους και την ευεργετική επίδρασή τους στην υγεία.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος της πλήρους αξιοποίησης του αίγειου γάλακτος τα τελευταία χρόνια άρχισαν να παρασκευάζονται προϊόντα αποκλειστικά από γίδινο γάλα, όπως γάλα κατανάλωσης και ειδικά τυριά (Κεχαγιάς, 2011).

Σύμφωνα με τα επικαιροποιημένα στοιχεία του ΕΛΓΟ- ΔΗΜΗΤΡΑ 2017, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3, για το ημερολογιακό έτος 2016 οι συνολικές παραγόμενες ποσότητες πρόβειου και αίγειου γάλακτος στην επικράτεια αναλογούν σε 604.160.703 και 141.717.824 τόνους αντίστοιχα, ενώ σε επίπεδο Περιφέρειας Θεσσαλίας παραδόθηκαν 123.554.716 τόνοι πρόβειου γάλακτος κατακτώντας την 1<sup>η</sup> θέση και 24.366.086 τόνοι αίγειου γάλακτος καταλαμβάνοντας την 2<sup>η</sup> θέση μετά την Κεντρική Μακεδονία.

**Πίνακας 3: Συνολική παραχθείσα ποσότητα αγοπρόβειου γάλακτος 2016. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017<sup>3</sup>**

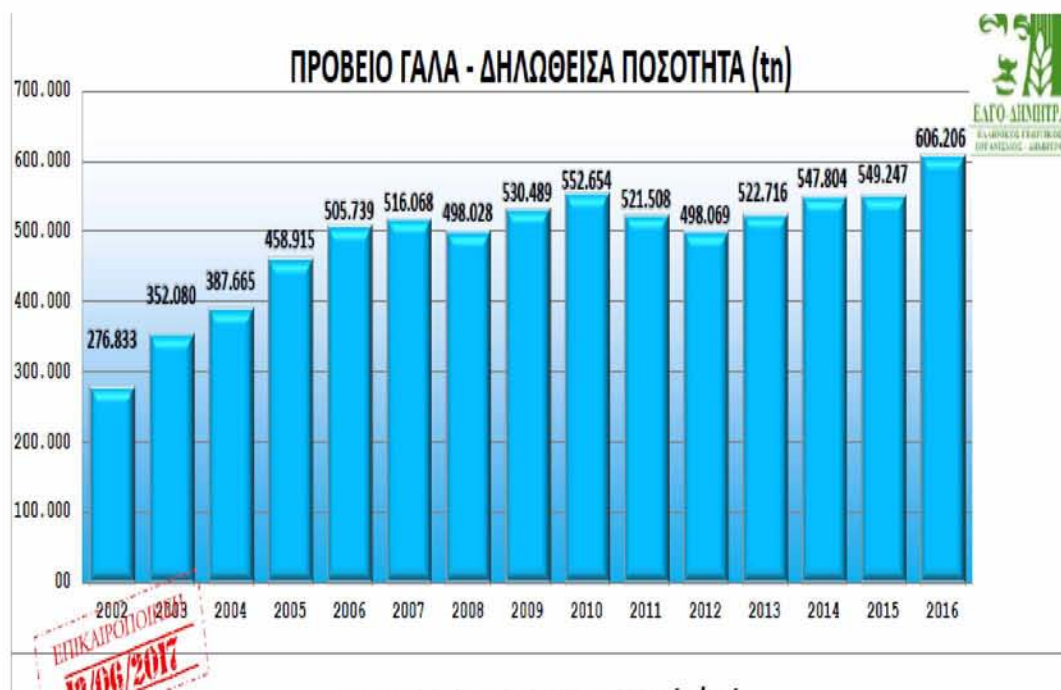
| ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΙΣΧΥΟΥΣΑΣ ΤΟΠΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ - ΚΟΜΜΟ 2.ΜΕ.ΕΠ.ΤΟΠ.ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ |                   |         |             |           |            |             |           |           |           |                           |
|---|-------------------|---------|-------------|-----------|------------|-------------|-----------|-----------|-----------|---------------------------|
| ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΙΣΧΥΟΥΣΑΣ ΤΟΠΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ - ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΑΚΟ ΕΤΟΣ 2016      |                   |         |             |           |            |             |           |           |           |                           |
| ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ  | ΠΕΡΙΟΧΗ           | ΠΡΟΒΕΙΟ | ΑΙΓΕΙΟ      | ΣΥΝΟΛΟ    | ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ | ΠΕΡΙΟΧΗ     | ΠΡΟΒΕΙΟ   | ΑΙΓΕΙΟ    | ΣΥΝΟΛΟ    | ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ (ΤΟΝΟΙ) |
| ΑΤΤΙΚΗΣ   | ΑΤΤΙΚΗΣ           | 412     | 0.576.500   | 0.576.500 | 118        | 0.597.700   | 0.597.700 | 0.597.700 | 0.597.700 | 6.067.627                 |
|   | ΠΕΛΑΓΟΣ           | 37      | 4.107.336   | 0.500.2   | 18         | 102.396     | 0.560.0   | 0.560.0   | 0.560.0   | 1.088.334                 |
| ΒΟΡΕΙΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ   | ΒΟΡΕΙΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ   | 2.442   | 27.267.027  | 0.952.09  | 741        | 3.852.484   | 0.540.0   | 0.540.0   | 0.540.0   | 37.269.390                |
|   | ΛΕΣΒΟΣ            | 4       | 42.102      | 0.500.0   | 8          | 10.316      | 0.575.0   | 0.575.0   | 0.575.0   | 4.105.390                 |
| ΒΟΤΡΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ  | ΒΟΤΡΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ    | 20      | 113.472     | 1.052.2   | 30         | 88.182      | 0.590.0   | 0.590.0   | 0.590.0   | 1.084.322                 |
|   | ΕΥΒΟΙΑ            | 172     | 2.713.011   | 0.767.9   | 130        | 1.198.056   | 0.497.0   | 0.497.0   | 0.497.0   | 1.350.692                 |
| ΑΥΤΟΝΟΜΟΝ ΕΛΛΑΔΑΣ   | ΑΥΤΟΝΟΜΟΝ ΕΛΛΑΔΑΣ | 4.756   | 56.881.272  | 0.955.0   | 1.132      | 4.894.028   | 0.555.1   | 0.555.1   | 0.555.1   | 115.819.368               |
|   | ΑΛΛΑΔΑΣ           | 2.541   | 31.027.404  | 0.909.0   | 1.130      | 8.480.051   | 0.575.3   | 0.575.3   | 0.575.3   | 16.928.630                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 2.081   | 27.930.463  | 0.526.0   | 403        | 3.033.703   | 0.553.0   | 0.553.0   | 0.553.0   | 35.080.494                |
|   | ΑΡΓΟΛΙΔΑΣ         | 872     | 6.318.488   | 0.541.2   | 318        | 3.488.076   | 0.508.0   | 0.508.0   | 0.508.0   | 20.610.400                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΑΡΓΟΛΙΔΑΣ         | 895     | 10.369.815  | 0.502.3   | 445        | 5.430.484   | 0.600.0   | 0.600.0   | 0.600.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΟΡΕΙΟΥ           | 432     | 6.254.368   | 0.547.7   | 247        | 2.979.067   | 0.593.4   | 0.593.4   | 0.593.4   | 20.610.400                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΟΡΕΙΟΥ           | 510     | 6.028.432   | 0.567.0   | 481        | 8.090.006   | 0.594.3   | 0.594.3   | 0.594.3   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 473     | 6.411.038   | 0.511.7   | 33         | 700.029     | 0.554.0   | 0.554.0   | 0.554.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.082   | 6.718.087   | 0.536.0   | 290        | 973.477     | 0.558.0   | 0.558.0   | 0.558.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.084   | 11.084.021  | 0.559.0   | 340        | 1.080.310   | 0.576.3   | 0.576.3   | 0.576.3   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 2.083   | 18.881.740  | 0.902.7   | 802        | 2.081.039   | 0.570.0   | 0.570.0   | 0.570.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.133   | 13.360.024  | 0.554.0   | 417        | 2.477.028   | 0.566.0   | 0.566.0   | 0.566.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 19      | 19.205      | 0.512.0   | 8          | 10.107      | 0.440.0   | 0.440.0   | 0.440.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 13      | 78.305      | 0.500.0   | 4          | 25.002      | 0.600.0   | 0.600.0   | 0.600.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 394     | 4.518.102   | 0.597.0   | 138        | 1.514.219   | 0.686.0   | 0.686.0   | 0.686.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 33      | 383.305     | 0.500.0   | 18         | 84.706      | 0.520.0   | 0.520.0   | 0.520.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 280     | 6.014.136   | 0.502.0   | 93         | 867.848     | 0.547.1   | 0.547.1   | 0.547.1   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 871     | 4.758.080   | 0.522.0   | 293        | 1.588.801   | 0.543.3   | 0.543.3   | 0.543.3   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 142     | 1.039.011   | 0.546.0   | 59         | 228.002     | 0.535.0   | 0.535.0   | 0.535.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 890     | 11.474.038  | 0.550.0   | 363        | 1.201.818   | 0.544.0   | 0.544.0   | 0.544.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 180     | 2.005.005   | 0.547.0   | 90         | 800.006     | 0.584.0   | 0.584.0   | 0.584.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 267     | 7.478.362   | 0.500.0   | 181        | 2.077.018   | 0.599.3   | 0.599.3   | 0.599.3   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 450     | 3.057.440   | 0.590.0   | 286        | 3.008.158   | 0.509.3   | 0.509.3   | 0.509.3   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 367     | 8.868.084   | 0.502.3   | 246        | 3.137.068   | 0.583.8   | 0.583.8   | 0.583.8   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 828     | 8.229.537   | 0.535.4   | 294        | 2.488.124   | 0.559.0   | 0.559.0   | 0.559.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 820     | 8.483.239   | 0.514.0   | 108        | 1.108.703   | 0.554.0   | 0.554.0   | 0.554.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 541     | 8.290.403   | 0.508.0   | 911        | 9.288.008   | 0.508.0   | 0.508.0   | 0.508.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 338     | 6.487.804   | 0.584.0   | 328        | 1.040.010   | 0.574.1   | 0.574.1   | 0.574.1   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 782     | 17.060.000  | 0.584.0   | 470        | 4.473.833   | 0.593.0   | 0.593.0   | 0.593.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 532     | 8.435.005   | 0.547.3   | 305        | 1.445.008   | 0.567.7   | 0.567.7   | 0.567.7   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 242     | 4.055.876   | 0.525.4   | 134        | 1.042.126   | 0.557.0   | 0.557.0   | 0.557.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 791     | 18.121.081  | 0.525.0   | 863        | 9.736.022   | 0.580.1   | 0.580.1   | 0.580.1   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 812     | 14.253.028  | 0.557.0   | 250        | 4.168.108   | 0.574.0   | 0.574.0   | 0.574.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 805     | 10.784.210  | 0.547.0   | 330        | 2.488.130   | 0.536.0   | 0.536.0   | 0.536.0   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 592     | 12.945.481  | 0.550.0   | 320        | 3.047.440   | 0.570.0   | 0.570.0   | 0.570.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.181   | 16.147.278  | 0.525.3   | 488        | 6.132.108   | 0.537.8   | 0.537.8   | 0.537.8   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 274     | 8.020.039   | 0.505.1   | 290        | 6.004.713   | 0.507.0   | 0.507.0   | 0.507.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.072   | 4.805.022   | 0.504.1   | 173        | 877.491     | 0.606.4   | 0.606.4   | 0.606.4   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 2.708   | 78.802.286  | 1.017.4   | 1.010      | 18.360.422  | 0.629.0   | 0.629.0   | 0.629.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 568     | 11.868.887  | 1.007.1   | 213        | 2.884.767   | 0.645.8   | 0.645.8   | 0.645.8   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.180   | 18.480.232  | 0.577.0   | 500        | 5.100.408   | 0.595.0   | 0.595.0   | 0.595.0   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.340   | 14.273.833  | 0.544.0   | 118        | 440.278     | 0.583.2   | 0.583.2   | 0.583.2   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 343     | 2.731.817   | 0.515.0   | 44         | 208.741     | 0.596.3   | 0.596.3   | 0.596.3   | 35.080.494                |
| ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 1.870   | 21.605.340  | 0.554.1   | 363        | 2.408.208   | 0.570.8   | 0.570.8   | 0.570.8   | 35.080.494                |
|   | ΒΕΛΟΠΟΝΤΙΟΥ       | 930     | 6.703.001   | 0.572.1   | 76         | 700.000     | 0.583.8   | 0.583.8   | 0.583.8   | 35.080.494                |
| ΣΥΝΟΛΟ  |                   | 48.013  | 604.160.703 | 0.577.7   | 10.403     | 141.717.824 | 0.583.3   | 0.583.3   | 0.583.3   | 604.160.703               |

\* ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΙΣΧΥΟΥΣΑΣ ΤΟΠΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΕ ΠΑΡΑΔΟΣΕΙΣ (ΕΛΛΑΔΑ) (ΤΟΝΟΙ)

<sup>3</sup> [http://www.elgo.gr/images/ELOGAK\\_files/Statistics/stats2016/AIGO-Paradoscis-Galaktos-2015.pdf](http://www.elgo.gr/images/ELOGAK_files/Statistics/stats2016/AIGO-Paradoscis-Galaktos-2015.pdf)

Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί καταγράφεται η ανοδική πορεία της παραγωγής πρόβειου γάλακτος στη χώρα μας για την περίοδο 2002-2016.

**Πίνακας 4: Δηλωθείσα ποσότητα σε τόνους πρόβειου γάλακτος για την περίοδο 2002-2016. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017<sup>4</sup>**



Αντίθετα ο κλάδος της αγελαδοτροφίας λόγω της γεωμορφολογίας της χώρας μας, κατέχει δευτερεύουσα θέση στην ελληνική κτηνοτροφία, αν και την τελευταία τριακονταετία έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τον τεχνικό εκσυγχρονισμό των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων, με την εισαγωγή βελτιωμένων φυλών υψηλής απόδοσης και τη διάδοση της τεχνητής σπερματέγχυσης, προκειμένου η χώρα μας να ανταποκριθεί στο καθεστώς των ποσοτώσεων που είχε επιβληθεί το 1984 από την Ευρωπαϊκή Ένωση στα Κράτη –Μέλη της (Κεχαγιάς, 2011).

Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα εκτροφής αγελάδων γαλακτοπαραγωγής στη χώρα μας, έχει εντατικό χαρακτήρα και βασίζεται κυρίως στη χρήση της διεθνούς φυλής Holstein, ενώ η μηχανική άλμεξη έχει καθιερωθεί εδώ και πολλά χρόνια. Η εκτροφή των αγελάδων είναι ενσταβλισμένη ενώ η διατροφή των ζώων βασίζεται στη χρήση κυρίως ενσιρώματος αραβοσίτου και συμπυκνωμένων ζωοτροφών.

Παρά τις βελτιώσεις που έχουν σημειωθεί η Ελλάδα δεν μπορεί να ανταγωνιστεί ακόμη χώρες όπως η Γερμανία, η Γαλλία, η Ολλανδία κ.α., τόσο σε μέγεθος ζωικού κεφαλαίου όσο και σε παραγόμενη ποσότητα αγελαδινού γάλακτος όπως τεκμαίρεται και από τον κάτωθι πίνακα της Eurostat. (Πίνακας 5)

<sup>4</sup> [http://www.elgo.gr/images/ELOGAK\\_files/Statistics/stats2017/AIGO\\_ParadoseisAigo-ana-etos.pdf](http://www.elgo.gr/images/ELOGAK_files/Statistics/stats2017/AIGO_ParadoseisAigo-ana-etos.pdf)



**Πίνακας 5: Παραδόσεις αγελαδινού γάλακτος στην Ε.Ε ανά Κράτη- Μέλη σε χιλιάδες τόνους για την περίοδο 2005-2015. Πηγή: Eurostat 2017<sup>5</sup>**

| Collection of cow's milk<br>1 000 tonnes   |            |            |            |            |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
|--|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Country                                    | 2005       | 2006       | 2007       | 2008       | 2009      | 2010      | 2011      | 2012      | 2013       | 2014       | 2015       | 2016       | 2017       |
| EU (28 countries)                          | 134 124.24 | 133 221.61 | 133 112.08 | 133 251.78 | 146       | 146       | 146       | 146       | 141 247.47 | 147 547.02 | 151 586.44 | 151 586.44 | 151 586.44 |
| EU (28 countries)                          | 134 124.24 | 133 221.61 | 133 112.08 | 133 251.78 | 146       | 146       | 146       | 146       | 141 247.47 | 147 547.02 | 151 586.44 | 151 586.44 | 151 586.44 |
| Belgium                                    | 2 897.41   | 2 896.92   | 2 897.78   | 2 896.78   | 2 896.78  | 2 896.78  | 2 896.78  | 2 896.78  | 2 896.78   | 2 896.78   | 2 896.78   | 2 896.78   | 2 896.78   |
| Bulgaria                                   | 603.1      | 603.4      | 603.5      | 603.4      | 603.4     | 603.4     | 603.4     | 603.4     | 603.4      | 603.4      | 603.4      | 603.4      | 603.4      |
| Czech Republic                             | 2 543.3    | 2 543.5    | 2 543.5    | 2 543.5    | 2 543.5   | 2 543.5   | 2 543.5   | 2 543.5   | 2 543.5    | 2 543.5    | 2 543.5    | 2 543.5    | 2 543.5    |
| Denmark                                    | 4 451.4    | 4 452.2    | 4 452.2    | 4 452.2    | 4 452.2   | 4 452.2   | 4 452.2   | 4 452.2   | 4 452.2    | 4 452.2    | 4 452.2    | 4 452.2    | 4 452.2    |
| Germany                                    | 27 380     | 26 870.95  | 27 320.73  | 27 465.7   | 27 465.7  | 27 465.7  | 27 465.7  | 27 465.7  | 27 465.7   | 27 465.7   | 27 465.7   | 27 465.7   | 27 465.7   |
| Estonia                                    | 471.2      | 465.9      | 465.4      | 465.9      | 465.9     | 465.9     | 465.9     | 465.9     | 465.9      | 465.9      | 465.9      | 465.9      | 465.9      |
| Ireland                                    | 5 051.25   | 5 033.72   | 5 034.97   | 5 034.97   | 5 034.97  | 5 034.97  | 5 034.97  | 5 034.97  | 5 034.97   | 5 034.97   | 5 034.97   | 5 034.97   | 5 034.97   |
| Greece                                     | 685        | 689.7      | 716.2      | 705.9      | 685       | 685       | 685       | 685       | 685        | 685        | 685        | 685        | 685        |
| Spain                                      | 5 850.31   | 5 823.88   | 5 720.02   | 5 824.1    | 5 742.1   | 5 877.1   | 5 838.2   | 5 838.2   | 5 838.2    | 5 838.2    | 5 838.2    | 5 838.2    | 5 838.2    |
| France                                     | 23 588.18  | 22 858.62  | 22 859.16  | 23 752.58  | 22 908.08 | 23 678.31 | 24 837.75 | 24 282.16 | 23 964.45  | 21 275.72  | 21 323.33  | 21 323.33  | 21 323.33  |
| Croatia                                    | 403.01     | 403.0      | 415.47     | 415.47     | 415.47    | 415.47    | 415.47    | 415.47    | 415.47     | 415.47     | 415.47     | 415.47     | 415.47     |
| Italy                                      | 12 216.43  | 12 102.58  | 12 268.23  | 12 452.38  | 12 800    | 12 800    | 12 800    | 12 800    | 12 800     | 12 800     | 12 800     | 12 800     | 12 800     |
| Cyprus                                     | 144.53     | 136.85     | 144.08     | 152.16     | 152.05    | 152.05    | 152.05    | 152.05    | 152.05     | 152.05     | 152.05     | 152.05     | 152.05     |
| Latvia                                     | 921.7      | 892.32     | 892.7      | 892.81     | 892.81    | 892.81    | 892.81    | 892.81    | 892.81     | 892.81     | 892.81     | 892.81     | 892.81     |
| Lithuania                                  | 1 200.86   | 1 246.15   | 1 247.13   | 1 247.62   | 1 247.62  | 1 247.62  | 1 247.62  | 1 247.62  | 1 247.62   | 1 247.62   | 1 247.62   | 1 247.62   | 1 247.62   |
| Luxembourg                                 | 355.23     | 354.54     | 355.3      | 354.7      | 354.7     | 354.7     | 354.7     | 354.7     | 354.7      | 354.7      | 354.7      | 354.7      | 354.7      |
| Hungary                                    | 1 517.77   | 1 448.38   | 1 447.73   | 1 425.27   | 1 427.12  | 1 427.12  | 1 427.12  | 1 427.12  | 1 427.12   | 1 427.12   | 1 427.12   | 1 427.12   | 1 427.12   |
| Malta                                      | 41.5       | 41.02      | 40.58      | 38.91      | 38.91     | 38.91     | 38.91     | 38.91     | 38.91      | 38.91      | 38.91      | 38.91      | 38.91      |
| Netherlands                                | 15 478.53  | 15 056.58  | 15 798.63  | 15 254.57  | 15 488.38 | 15 488.38 | 15 488.38 | 15 488.38 | 15 488.38  | 15 488.38  | 15 488.38  | 15 488.38  | 15 488.38  |
| Austria                                    | 2 021.06   | 2 077.64   | 2 081.35   | 2 077      | 2 075.55  | 2 077.02  | 2 085.82  | 2 084.25  | 2 082.93   | 2 082.13   | 2 081.09   | 2 081.09   | 2 081.09   |
| Poland                                     | 5 022.19   | 5 022.58   | 5 044.59   | 5 044.59   | 5 044.59  | 5 044.59  | 5 044.59  | 5 044.59  | 5 044.59   | 5 044.59   | 5 044.59   | 5 044.59   | 5 044.59   |
| Portugal                                   | 1 222.94   | 1 221.98   | 1 221.98   | 1 221.98   | 1 221.98  | 1 221.98  | 1 221.98  | 1 221.98  | 1 221.98   | 1 221.98   | 1 221.98   | 1 221.98   | 1 221.98   |
| Romania                                    | 1 159      | 1 159      | 1 159.4    | 1 159.4    | 1 159.4   | 1 159.4   | 1 159.4   | 1 159.4   | 1 159.4    | 1 159.4    | 1 159.4    | 1 159.4    | 1 159.4    |
| Slovakia                                   | 506.34     | 511.02     | 510.37     | 514.31     | 514.79    | 514.79    | 514.79    | 514.79    | 514.79     | 514.79     | 514.79     | 514.79     | 514.79     |
| Slovenia                                   | 967.84     | 961.56     | 964.22     | 965.62     | 965.62    | 965.62    | 965.62    | 965.62    | 965.62     | 965.62     | 965.62     | 965.62     | 965.62     |
| Finland                                    | 2 361.8    | 2 347.6    | 2 351.02   | 2 351.02   | 2 351.02  | 2 351.02  | 2 351.02  | 2 351.02  | 2 351.02   | 2 351.02   | 2 351.02   | 2 351.02   | 2 351.02   |
| Sweden                                     | 3 102.96   | 3 101.27   | 3 101.27   | 3 101.27   | 3 101.27  | 3 101.27  | 3 101.27  | 3 101.27  | 3 101.27   | 3 101.27   | 3 101.27   | 3 101.27   | 3 101.27   |
| United Kingdom                             | 14 555.54  | 13 825.15  | 13 846.5   | 13 825.5   | 13 825.5  | 13 825.5  | 13 825.5  | 13 825.5  | 13 825.5   | 13 825.5   | 13 825.5   | 13 825.5   | 13 825.5   |
| Iceland                                    | 112.85     | 112.85     | 112.85     | 112.85     | 112.85    | 112.85    | 112.85    | 112.85    | 112.85     | 112.85     | 112.85     | 112.85     | 112.85     |
| Liechtenstein                              | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| Norway                                     | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| Switzerland                                | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| Montenegro                                 | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| Former Yugoslav Republic of Macedonia, the | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| Albania                                    | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| Serbia                                     | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |
| Turkey                                     | 1          | 1          | 1          | 1          | 1         | 1         | 1         | 1         | 1          | 1          | 1          | 1          | 1          |

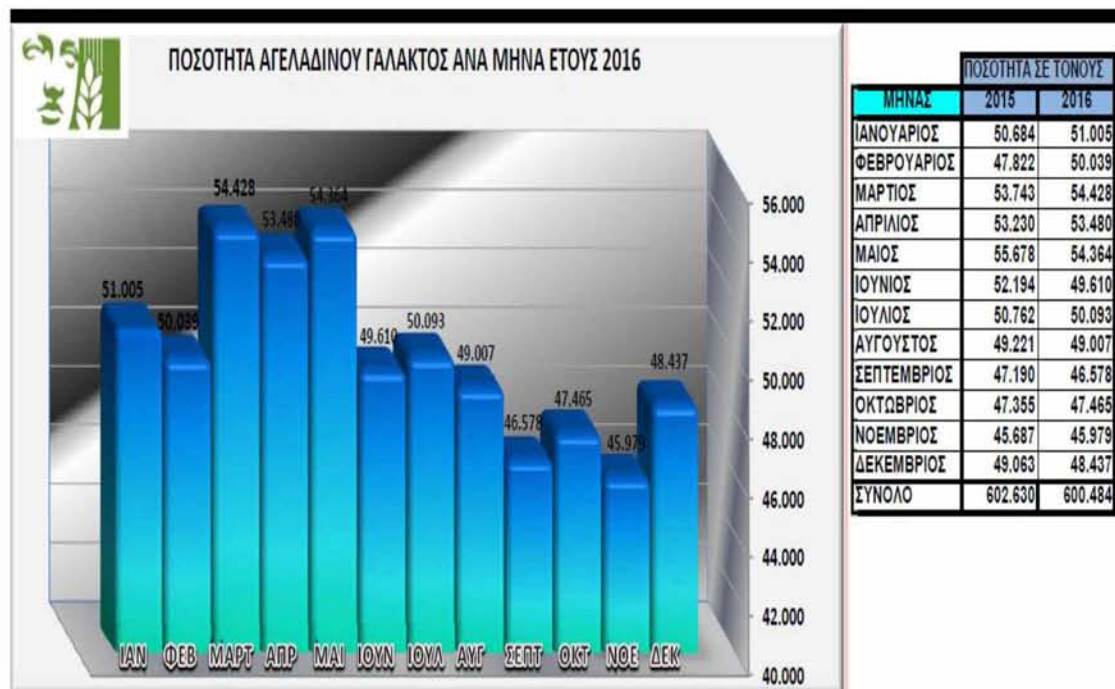
Σήμερα στην Ελλάδα, ο αριθμός των εκμεταλλεύσεων κυμαίνεται στις 15.899 εκμεταλλεύσεις και ο αριθμός των βοοειδών ζώων στις 614.992 κεφαλές, (ΕΛΣΤΑΤ, 2017) ενώ η μέση ετήσια απόδοση σε αγελαδινό γάλα είναι αρκετά μικρή σε σχέση με τις άλλες χώρες σε επίπεδο Ε.Ε. (Κεχαγιάς, 2011).

Κατά μέσο όρο ετησίως παράγονται περίπου 600 με 700 χιλιάδες τόνοι αγελαδινού γάλακτος, (Eurostat 2017, ΕΛΓΟ- ΔΗΜΗΤΡΑ 2017), οι οποίοι προορίζονται για την κατανάλωση κυρίως ως φρέσκου παστεριωμένου γάλακτος κι ένα μικρότερο ποσοστό αυτού χρησιμοποιείται για την παρασκευή άλλων προϊόντων, όπως στραγγιστό γιαούρτι, επιδόρπια γιαουρτιού, άσπρο τυρί τελεμές ή/ και ιδιοκαταναλώνεται από τους παραγωγούς.

Το σύνολο του παραχθέντος αγελαδινού γάλακτος στη Θεσσαλία μεταποιείται, εκτός από μια μικρή ποσότητα που αφορά την αυτοκατανάλωση των παραγωγών όπως προαναφέρθηκε. Το γάλα παραδίδεται στις μεγάλες γαλακτοβιομηχανίες ΟΛΥΜΠΟΣ, ΔΕΛΤΑ, ΦΑΓΕ, στις συνεταιριστικού τύπου επιχειρήσεις, όπως η ΤΡΙΚΚΗ, η ΕΒΟΛ και η εταιρεία ΘΕΣ-γάλα, αλλά επίσης παραδίδεται και σε άλλες μικρότερες θεσσαλικές γαλακτοκομικές και τυροκομικές επιχειρήσεις, όπου το γάλα επεξεργάζεται κυρίως για την παραγωγή παστεριωμένου φρέσκου γάλακτος, καθώς και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως τυριά, γιαούρτια, κρέμες, ρυζόγαλο, βούτυρο, κ.α. (Lactimed 2014).

<sup>5</sup> Date of extraction: 21 Jun 2017 14:34:44 CEST Hyperlink to the table:  
<http://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&init=1&plugin=1&language=en&pcode=tag00037>

**Πίνακας 6: Παραχθείσες ποσότητες αγελαδινού γάλακτος για τη διατία 2015-2016. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017<sup>6</sup>**



Ο τομέας της γαλακτοκομίας κατέχει σημαντική θέση στο σύνολο του αγροδιατροφικού τομέα στην Ελλάδα. Η ιδιαιτερότητα της Ελλάδας σε σχέση με τις χώρες της Ε.Ε. έγκειται στην υπεροχή της αιγοπροβατοτροφίας έναντι της αγελαδοτροφίας, όπου η χώρα παραμένει ελλειμματική παρά την αξιοσημείωτη πρόοδο που έχει σημειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στον εκσυγχρονισμό των κτηνοτροφικών και μεταποιητικών μονάδων.

#### 1.4. Ο κλάδος της γαλακτοκομίας στη Θεσσαλία

Η Θεσσαλία διαθέτει μια αξιόλογη παράδοση και ένα σημαντικό παραγωγικό δυναμικό στον τομέα της γαλακτοκομίας. Σύμφωνα με στοιχεία του ΕΛΟΓΑΚ (2010) καταγράφονται στην ευρύτερη περιοχή περίπου 75 μονάδες, τυροκομεία και βιοτεχνικά γαλακτοκομεία, που συγκεντρώνουν προς μεταποίηση το 90% του παραγόμενου πρόβειου γάλακτος και περίπου το 70% του γίδινου γάλακτος αντίστοιχα. Η παραγωγική αυτή δυναμικότητα αντιστοιχεί στο 13% των μονάδων της χώρας.

Χαρακτηριστικό της περιοχής, αποτελεί το γεγονός, ότι οι 66 μονάδες αυτού του δυναμικού μεταποίησης παράγουν τυριά ΠΟΠ, το οποίο αντιπροσωπεύει το 18% του

<sup>6</sup> [http://www.elgo.gr/images/ELOGAK\\_files/Statistics/stats2016/posot\\_kai\\_axia\\_12mino\\_2016.pdf](http://www.elgo.gr/images/ELOGAK_files/Statistics/stats2016/posot_kai_axia_12mino_2016.pdf)



συνολικά παραγόμενου τυριού της Ελλάδας. Τέλος η γαλακτοκομική αλυσίδα της Θεσσαλίας συνεισφέρει σε σημαντικό βαθμό στην περιφερειακή απασχόληση καθώς απασχολεί το 14% των απασχολούμενων στην κτηνοτροφία της χώρας και το 13% στον μεταποιητικό τομέα αντίστοιχα (Lactimed, 2014).

Στον επικαιροποιημένο από τον ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ Πίνακα 7 που ακολουθεί καταδεικνύεται η παραγωγική δυναμικότητα της Θεσσαλίας, η οποία καταλαμβάνει την 1<sup>η</sup> θέση στην παραγωγή διαφόρων τύπων τυριών (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, 2017).

**Πίνακας 7: Παραγόμενες ποσότητες τυριών ανά Περιφέρεια. Πηγή: ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ 2017**



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗΣ ΑΝΑΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ & ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ  
ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ «ΔΗΜΗΤΡΑ»

**ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (κιλιά) ΤΥΡΙΩΝ ΑΝΑ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΤΟ 2013**

(Σύμφωνα με τις δηλώσεις Ισοζυγίων Γάλακτος)

| Περιφέρεια                     | Σκληρά -<br>Ημίσκληρα | Μαλακά             | Τυριά<br>Τυρογάλακτος |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| ΑΤΤΙΚΗ                         | 1.660.827             | 2.354.206          | 227.257               |
| ΒΟΡΕΙΟ ΑΙΓΑΙΟ                  | 1.904.948             | 3.648.451          | 559.302               |
| ΔΥΤΙΚΗ ΕΛΛΑΔΑ                  | 4.031.766             | 13.817.947         | 2.526.446             |
| ΗΠΕΙΡΟΣ                        | 3.333.279             | 18.603.963         | 2.435.957             |
| ΘΕΣΣΑΛΙΑ                       | 9.559.400             | 46.959.410         | 8.328.558             |
| ΙΟΝΙΟΙ ΝΗΣΟΙ                   | 156.475               | 1.182.466          | 142.744               |
| ΚΡΗΤΗ                          | 4.605.241             | 1.446.119          | 2.480.837             |
| ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ &<br>ΘΡΑΚΗ | 391.631               | 3.395.181          | 413.380               |
| ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ ΔΥΤΙΚΗ               | 572.954               | 1.980.928          | 195.066               |
| ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ ΚΕΝΤΡΙΚΗ             | 5.790.225             | 24.541.228         | 2.286.684             |
| ΝΟΤΙΟ ΑΙΓΑΙΟ                   | 1.427.115             | 109.829            | 54.360                |
| ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ                   | 1.822.852             | 8.549.211          | 2.216.912             |
| ΣΤΕΡΕΑ ΕΛΛΑΔΑ                  | 337.444               | 3.350.957          | 304.584               |
| <b>Σύνολα</b>                  | <b>35.594.156</b>     | <b>129.939.896</b> | <b>22.172.087</b>     |

Ενδεικτικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι στη Θεσσαλία βρίσκεται η έδρα της εθνικής εμβέλειας γαλακτοβιομηχανίας, ΟΛΥΜΠΟΣ, στον όμιλο της οποίας συμπεριλαμβάνεται κι ένα μεγάλο τυροκομείο παραγωγής τυριών από αιγοπρόβριο γάλα, με έδρα τα Τρίκαλα. Η εταιρεία ΦΑΓΕ είναι ιδιοκτήτης ενός μεγάλου τυροκομείου παραγωγής ημίσκληρων τυριών επίσης στα Τρίκαλα και τέλος η εταιρεία ΔΕΛΤΑ διαθέτει ένα μεγάλο τυροκομείο επεξεργασίας αιγοπρόβριου γάλακτος, στην Ελασσόνα Θεσσαλίας.

Επίσης υπάρχουν μεσαίου μεγέθους γαλακτοκομικές επιχειρήσεις, συνεταιριστικού τύπου, όπως η ΤΡΙΚΚΗ, η ΕΒΟΛ, η ΘΕΣ-γάλα αλλά και μικρότερες οικογενειακού τύπου επιχειρήσεις, οι οποίες παρασκευάζουν παστεριωμένο γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα με βάση το αγελαδινό γάλα ή /το αιγοπρόβριο γάλα, όπως γιαούρτια, τυριά, κρέμες, ρυζόγαλο κλπ. συμβάλλοντας τα μέγιστα στη δημιουργία παραδοσιακών προϊόντων τοπικού χαρακτήρα. Οι εταιρείες αυτές αν και υφίστανται ισχυρό ανταγωνισμό από τις εθνικές εμβέλειες γαλακτοβιομηχανίες, διατηρούν ένα σημαντικό μερίδιο της τοπικής και περιφερειακής αγοράς, της τάξης του 20% με 25%, ακριβώς λόγω της εικόνας του επώνυμου τοπικού προϊόντος (Lactimed, 2014).

Στη σημαντική ποσότητα γάλακτος προς μεταποίηση, που διασφαλίζουν οι τοπικές γαλακτοκομικές - τυροκομικές μονάδες, πρέπει επίσης να προστεθεί η ποσότητα που μεταποιείται σε τυρί ή γιαούρτι με τον παραδοσιακό τρόπο από τους ίδιους τους κτηνοτρόφους, η οποία δεν είναι αμελητέα. Η παραγωγή αυτή εκτιμάται σε τουλάχιστον 4.000 τόνους ετησίως, την οποία και διανέμουν οι ίδιοι στους τελικούς καταναλωτές. Διαχρονικά, φαίνεται ότι τα πολύ μικρά και μικρά τυροκομεία και γαλακτοκομεία, διεισδύουν καλύτερα σε τοπικά σημεία πώλησης και διατηρούν μια πιστή πελατεία σε σύγκριση με τις μεγαλύτερες μονάδες τυποποίησης που λειτουργούν στο Θεσσαλικό χώρο (Lactimed, 2014).

Η τέχνη της παρασκευής τυροκομικών προϊόντων μεταφέρεται από γενιά σε γενιά στις μικρές οικογενειακές επιχειρήσεις που λειτουργούν μέχρι και σήμερα στην περιοχή. Η παράδοση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι ένα μεγάλο μέρος των κτηνοτρόφων και των τυροκόμων, είναι ορεσίβιας προέλευσης, νομαδικού χαρακτήρα φυλές, όπως Βλάχοι, Σαρακατσάνοι κ.α, οι οποίοι εγκαταστάθηκαν μόνιμα στη Θεσσαλία από τη δεκαετία του 1960 και έπειτα. Η δραστηριότητα που προκύπτει λοιπόν αλλά και η ποιότητα των προϊόντων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ποιμενική παράδοση και την πολιτιστική ταυτότητα της Θεσσαλίας.



**Εικόνα 1: Ο παραδοσιακός τρόπος παραγωγής τυροκομικών στο χώρο της θερινής κατοικίας των κτηνοτρόφων<sup>7</sup>**

Η Θεσσαλία όπως και άλλες περιοχές της Ελλάδας διαθέτει λοιπόν ένα ευρύ φάσμα γαλακτοκομικών προϊόντων, κυρίως πιστοποιημένων τυριών βάσει του θεσμικού πλαισίου, προκειμένου ν' ανταποκριθεί στις ανάγκες των καταναλωτών που αναζητούν την ποιότητα και την ταυτότητα των τροφίμων. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα που παραδοσιακά παρασκευάζονται στη Θεσσαλία, εκτός από το αγελαδινό και αιγοπρόβειο γάλα, (συμβατικής ή βιολογικής εκτροφής), είναι:

<sup>7</sup> (<http://www.vlahoi.net/images/stories/tiromika/kaseromastores.jpg>)

- τυρί σε άλμη: Φέτα, Τελεμές και Μπάτζος
- διάφορα τυριά: σκληρά (π.χ. κεφαλοτύρι, γραβιέρα, κεφαλογραβιέρα), ημίσκληρα π.χ. κασέρι, και μαλακά τυριά π.χ. γαλοτύρι, τα οποία είτε είναι Π.Ο.Π. είτε συμβατικής παραγωγής. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το τυρί Π.Ο.Π. η «Γραβιέρα Αγράφων» παράγεται αποκλειστικά και μόνο στη Θεσσαλία σε μια περιοχή πλήρως οριοθετημένη σε τμήμα της οροσειράς Πίνδου στη Δυτική Θεσσαλία.
- τυριά τυρογάλακτος: ανθότυρο, μυζήθρα, μανούρι
- βούτυρο, κρέμες, ρυζόγαλο, κ.ά.
- πολλές εκμεταλλεύσεις στο παρελθόν και κάποια γαλακτοκομεία σήμερα εξακολουθούν να παράγουν τοπικά υποπροϊόντα, όπως το Τσαλαφούτι.
- γιαούρτι, το οποίο παράγεται από διάφορα είδη γάλακτος, πρόβειο, γίδινο και αγελαδινό σε δύο τύπους: α) το παραδοσιακό γιαούρτι και β) το ευρωπαϊκού τύπου γιαούρτι το οποίο μπορεί να απαντηθεί σε περισσότερα είδη όπως στραγγιστό, με χαμηλά λιπαρά, με φρούτα, δημητριακά, μέλι κ.ά. (Lactimed, 2014).

Ειδικά το γιαούρτι αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο μερίδιο στο σύνολο της ελληνικής γαλακτοκομικής αλυσίδας. Την τελευταία δεκαετία οι μεγάλες ελληνικές γαλακτοβιομηχανίες κατόρθωσαν να τριπλασιάσουν τις εξαγωγές του γιαουρτιού τους, χάρη στην ταχεία αύξηση της ζήτησης του στραγγιστού γιαουρτιού ειδικά στις Η.Π.Α. όπου για το 2013 οι εξαγωγές υπολογίστηκαν στα 2.2 εκατομμύρια \$, για το έτος 2014 οι εξαγωγές σε γιαούρτι υπολογίστηκαν στο 23%, στα τυριά και κυρίως στο τυρί φέτα οι εξαγωγές αντιστοιχούσαν στο 68%, ενώ για το 2015 οι εξαγωγές του γιαουρτιού αντιστοιχούσαν στο 26%, σύμφωνα με στοιχεία του ΣΕΒΕ- ΙΕΕΣ (2015).

### **1.5. Η σημασία του γάλακτος και των προϊόντων του στη διατροφή του ανθρώπου**

Η χρήση του γάλακτος των γαλακτοπαραγωγών ζώων στη διατροφή του ανθρώπου αναφέρεται από τους προϊστορικούς ακόμη χρόνους και άρχισε σχεδόν συγχρόνως με την εξημέρωσή τους. Από την ίδια ακόμη περίοδο φαίνεται η αξιοποίηση του γάλακτος και η μεταποίησή του σε άλλα προϊόντα όπως τυρί, γιαούρτι, ξυνόγαλα κ.α., που επί χιλιετίες γινόταν με εμπειρικές μεθόδους στο πλαίσιο της οικιακής οικονομίας (Μάντης, 2000; Κεχαγιάς, 2011).

Το γάλα αποτελεί τη μοναδική και πλήρη τροφή για τα πρώτα στάδια της ζωής των βρεφών και εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της διατροφής τους για όλη τους τη ζωή, είτε αυτούσιο είτε με τη μορφή κάποιου άλλου γαλακτοκομικού προϊόντος. Το γάλα και τα προϊόντα του αποτελούν άριστη τροφή και μια από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, ασβεστίου, φωσφόρου και ορισμένων βιταμινών (Μάντης, 2000; Κεχαγιάς, 2011).

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα γενικότερα είναι απαραίτητα στον ανθρώπινο οργανισμό για:



- Τον σχηματισμό, διατήρηση και την καλή υγεία των οστών
- Τη διατήρηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης σε φυσιολογικά επίπεδα
- Τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης διαβήτη τύπου II, κ.α. (Μάντης, 2000; Κεχαγιάς, 2011).

### 1.5.1. Χαρακτηριστικά του αγελαδινού γάλακτος

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία ως γάλα ορίζεται το προϊόν που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες γαλακτοφόρου ζώου, (αγελάδων, προβατίνων, αιγών ή βουβαλίδων), το οποίο δεν έχει θερμανθεί πέραν των 40 °C ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα, είναι απαλλαγμένο από το πρωτόγαλα και είναι προϊόν ολοσχερούς χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς ζώου που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Με τον απλό όρο «γάλα» εννοείται το γάλα που προέρχεται από αγελάδα (ΚΤΠ, 2009 άρθρο 80).

Τα βασικά συστατικά του γάλακτος από τα διάφορα είδη ζώων, που χρησιμοποιείται γι' ανθρώπινη κατανάλωση, είναι ίδια, με κάποιες μικρές ποσοτικές διακυμάνσεις ανά είδος, που οφείλονται στη φυλή, στην ηλικία, στην υγεία του ζώου, στην περίοδο γαλακτοπαραγωγής, τον αριθμό των αλμέξεων, στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, κ.α.. Τα κύρια συστατικά του γάλακτος είναι η λακτόζη, οι πρωτεΐνες, και το λίπος. Επίσης περιέχει κι άλλα σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου συστατικά όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, άλατα, ένζυμα, ορμόνες και αντιμικροβιακές ουσίες. Το χρώμα του κυμαίνεται από λευκό έως ελαφρά κιτρινωπό, ανάλογα με το είδος του ζώου, τη φυλή και το είδος της διατροφής (καροτένια, ριβοφλαβίνη), ενώ η οσμή του είναι ιδιόζουσα και η γεύση του ευχάριστη, ελαφρώς υπόγλυκη εξ αιτίας της λακτόζης (Κεχαγιάς, 2011).

Η περιεκτικότητα των κύριων συστατικών του γάλακτος ενδεικτικά είναι : 85% με 87% νερό, λίπος με τη μορφή λιποσφαιρίων, που στο μεγαλύτερο μέρος τους αποτελούνται από τριγλυκερίδια, των οποίων η περιεκτικότητα κυμαίνεται από 2.5% - 6% με κατώτερα αποδεκτά όρια από τον ΚΠΤ το 3,5%. Επίσης σε μεγάλη αναλογία περιέχει ακόρεστα λιπαρά οξέα και μάλιστα δυο εκ των απαραίτητων για τον ανθρώπινο οργανισμό, το λινελαϊκό και λινολενικό οξύ. Καζεΐνη σε αναλογία 2.8%, πρόκειται για φωσφοροπρωτεΐνες οι οποίες καθιζάνουν με την οξύνιση του γάλακτος σε pH 4.6 και θερμοκρασία 20 °C, πρωτεΐνες ορού 0.6 %, λακτόζη 4.9% και ανόργανα άλατα 0.7% (Μάντης, 2000).

Το γάλα χαρακτηρίζεται ως τρόφιμο υψηλής διατροφικής αξίας καθώς αποτελεί μια από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας, ασβεστίου, φωσφόρου και ορισμένων βιταμινών. Θεωρείται επίσης καλή πηγή για τις βιταμίνες A, B<sub>1</sub> B<sub>2</sub>, νιασίνη και παντοθενικό οξύ (Μάντης, 2000).

### **1.5.2. Χαρακτηριστικά του πρόβειου γάλακτος**

Σε ότι αφορά το πρόβειο γάλα, σε σύγκριση με το αγελαδινό και της αίγας, είναι σημαντικά πλουσιότερο τόσο σε λίπος όσο και σε πρωτεΐνες. Η υψηλή περιεκτικότητά του σε λιπαρά είναι υπεύθυνη για τη μοναδική του γεύση και το άρωμα των τυριών κατά την τυροκόμηση. Επίσης η γιαούρτη από πρόβειο γάλα έχει μεγαλύτερο ιξώδες, στερεή και κρεμμώδη υφή ενώ διαθέτει μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ευχάριστο άρωμα και γεύση. Υπερτερεί επίσης και σε άλατα, ενώ η περιεκτικότητά του σε λακτόζη βρίσκεται στα ίδια περίπου επίπεδα με τα υπόλοιπα.

Το χρώμα του πρόβειου γάλακτος είναι λευκό, ανεξάρτητα αν τα ζώα λαμβάνουν χλωρή βοσκή ή όχι, γιατί το λίπος δεν απορροφά σε μεγάλο βαθμό τα καροτινοειδή, σε αντίθεση με το αγελαδινό γάλα, το οποίο είναι κιτρινωπό λόγω της παρουσίας καροτίνης (Μάντης, 2000; Κεχαγιάς, 2011).

### **1.5.3. Χαρακτηριστικά του αίγειου γάλακτος**

Αναφορικά με τη χημική σύνθεση του αίγειου γάλακτος, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι η περιεκτικότητά του λίπους του είναι πλουσιότερη σε σχέση με το αγελαδινό αλλά φτωχότερη σε σύγκριση με το πρόβειο. Η ίδια παραδοχή ισχύει και για τα υπόλοιπα στερεά συστατικά του. Επίσης παρατηρούνται διαφορές στα αμινοξέα των καζεϊνών σε σχέση με το αγελαδινό γάλα. Τέλος, οι πρωτεΐνες του ορού του είναι πιο ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με τις αντίστοιχες του αγελαδινού (Μάντης, 2000).

Δύο όμως χαρακτηριστικά του λίπους του αίγειου γάλακτος έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη βιομηχανία. Το ένα είναι το μικρότερο μέγεθος των λιποσφαιρίων, σε σύγκριση με το αγελαδινό. Το μέγεθος των λιποσφαιρίων και στα δύο είδη κυμαίνεται από 1 μm έως 10 μm, αλλά η αναλογία των λιποσφαιρίων που έχουν μέγεθος μικρότερο από 5 μm είναι 60% στο αγελαδινό γάλα, σε αντίθεση με το αίγιο, που φθάνει στο 80%. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δυσκολότερη βιομηχανική αφαίρεση της κρέμας από το αίγιο γάλα. Το δεύτερο χαρακτηριστικό έχει σχέση με τη σύσταση των λιπαρών οξέων στο αίγιο γάλα, καθώς περιέχει μεγαλύτερη αναλογία λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσού, όπως το καπροϊκό, το καπρυλικό και το καπρικό, τα οποία άλλωστε είναι υπεύθυνα και για τη χαρακτηριστική οσμή του αίγειου γάλακτος (Κεχαγιάς, 2011).

Η ανθεκτικότητα των αιγών να διαβιούν σε ακραία περιβάλλοντα και κάτω από αντίξοες κλιματικές συνθήκες είναι εξαιρετική, αυτό όμως που είναι αξιέπαινο, είναι η ικανότητά τους υπό τις συνθήκες αυτές να προσφέρουν προϊόν με μοναδικά χαρακτηριστικά σύνθεσης όπως το αίγιο γάλα (Haenlein, 2004).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα από αίγιο γάλα χαρακτηρίζονται ως προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας και η κατανάλωσή τους παρουσιάζει πλεονεκτήματα. Κι αυτό, λόγω της ειδικής σύνθεσης του αίγειου γάλακτος όπως λιγότερη περιεκτικότητα λακτόζης, περισσότερη ινοσιτόλη και διαφορετική δομή γαλακτοαλβουμίνης που το κάνει πιο

εύπεπτο, αποτελώντας άριστη εναλλακτική λύση για τους καταναλωτές που έχουν δυσανεξία στο αγελαδινό γάλα ή στο γάλα σόγιας. Επίσης είναι ιδανικό για διάφορες μορφές αλλεργίας καθώς περιέχει μικρότερο αριθμό αλλεργιογόνων αλλά και ιδιαίτερα ευεργετικό σε περιπτώσεις σιδηροπενίας (Bellioni-Businco et al., 1999).

Επίσης, το αίγαιο γάλα περιέχει υψηλότερες συγκεντρώσεις βιταμινών A, D, B1, B2, C και νικοτινικού οξέος, σε σύγκριση με το αγελαδινό, γεγονός που το καθιστά ως τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας (Pandya and Ghodke, 2007).

## 1.6. Η γιαούρτη ή το γιαούρτι

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία ως γιαούρτι χαρακτηρίζεται το προϊόν το οποίο προκύπτει μετά από πήξη αποκλειστικά και μόνο νωπού γάλακτος της αντίστοιχης προς την ονομασία φύσης και προέλευσης με την επίδραση καλλιέργειας ζύμης που προκαλεί ειδική γι' αυτό ζύμωση. Το γιαούρτι πρέπει να περιέχει λίπος και στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) σε ποσοστό ανώτερο κατά 10% τουλάχιστον από τα όρια που καθορίζονται στο άρθρο 80 παρ.3. του ΚΤΠ των αντίστοιχων ειδών γάλακτος από τα οποία παρασκευάστηκε αυτό (ΚΤΠ, 2009). Με τη νέα προσθήκη στο άρθρο 82<sup>1</sup> (ΚΤΠ, 2016), προσδιορίζονται και οι χρησιμοποιούμενες καλλιέργειες, συγκεκριμένα: «γιαούρτι χαρακτηρίζεται το γαλακτοκομικό προϊόν το οποίο παράγεται από τη ζύμωση και πήξη του γάλακτος, με τη χρήση υποχρεωτικά των καλλιεργειών - εκκινητών *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, ώστε το τελικό ζυμωμένο προϊόν να περιέχει τουλάχιστον 10<sup>7</sup> cfu/g προϊόντος μέχρι την ημερομηνία ανάλωσής του». Στην ουσία αποτελεί ενσωμάτωση του Codex Alimentarius.

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (FAO/WHO, 1977a) η γιαούρτη ορίζεται ως: «πηγμένο γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται με γαλακτική ζύμωση του γάλακτος με τη δράση του *Lactobacillus bulgaricus* και του *Streptococcus thermophilus*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί πρέπει να είναι στο τελικό προϊόν άφθονοι και ζωντανοί».

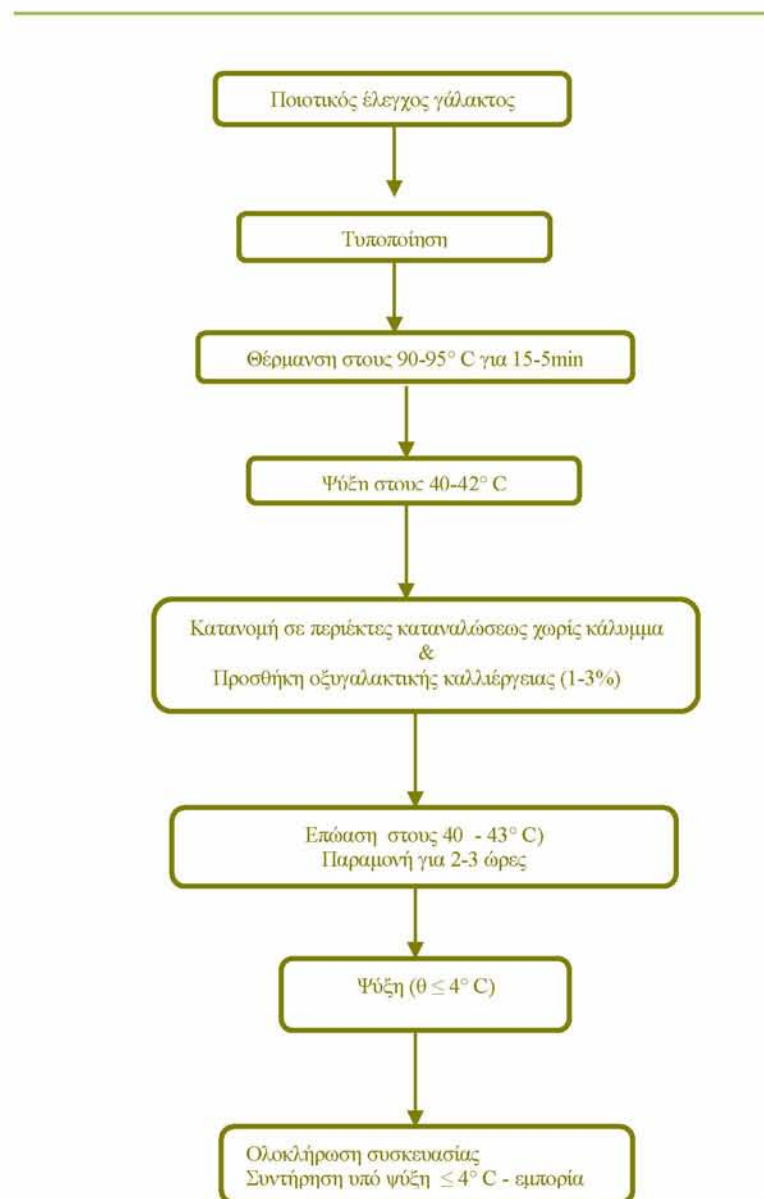
Οι βασικές πρώτες ύλες είναι το γάλα κυρίως το γάλα αγελάδας, προβάτου, αίγαιο ή μίγματα αυτών πλήρες, αποβουτυρωμένο ή συμπυκνωμένο και η καλλιέργεια εκκίνησης, που είναι μίγμα οξυγαλακτικών θερμοφίλων βακτηρίων (*Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*) που ζουν συμβιωτικά μεταξύ τους. Δεν επιτρέπεται η χρήση πρόσθετων υλών όπως: φρούτα, αρωματικές ύλες, χρωστικές, σάκχαρα, σταθεροποιητές, κακάο, σοκολάτα, σκόνη γάλακτος ή τυρογάλακτος ή συμπυκνώματα πρωτεϊνών γάλακτος. Τα σκευάσματα που περιέχουν πρόσθετες ύλες χαρακτηρίζονται ως επιδόρπια γιαουρτιού και όχι ως γιαούρτι (Ζερφυρίδης, 2001).

## 1.7. Τεχνολογία παρασκευής γιαούρτης

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο και τυποποίηση του γάλακτος ακολουθεί η θέρμανσή του στους 90<sup>0</sup>C με 95<sup>0</sup>C για 5 έως 15 λεπτά και στη συνέχεια η ψύξη του στους 40<sup>0</sup>C έως

42<sup>0</sup>C. Κατόπιν, πλήρωση των περιεκτών και προσθήκη της οξυγαλακτικής καλλιέργειας 1% έως 3%. Ακολουθώς επώαση στους 42<sup>0</sup>C έως 45<sup>0</sup>C για 2 με 3 ώρες, ψύξη σε θερμοκρασία ≤ 4°C, ολοκλήρωση της συσκευασίας, συντήρηση και εμπορία υπό ψύξη ≤ 4°C.

Το γιαούρτι λοιπόν είναι το αποτέλεσμα της γαλακτικής ζύμωσης της λακτόζης του γάλακτος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Από τη ζύμωση παράγεται γαλακτικό οξύ που στο τελικό προϊόν η περιεκτικότητά του κυμαίνεται στο 0.7% με 1.1%, ενώ η τιμή του αρχικού pH αποβαίνει διαρκώς μειούμενη έως την τιμή pH του ισοηλεκτρικού σημείου των καζεϊνών του γάλακτος (pH=4.6) όπου προκαλείται όξινη πήξη και δημιουργείται το πήγμα του γιαουρτιού. Στο τελικό προϊόν το pH έχει τιμή γύρω στο pH= 4.0- 4.2. Η βιοχημική δραστηριότητα των οξυγαλακτικών είναι υπεύθυνη για τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της γιαούρτης.



**Εικόνα 2: Ενδεικτικό διάγραμμα ροής παραγωγής παραδοσιακής γιαούρτης**

Το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση του γιαουρτιού διαμορφώνονται από τα ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, όπου παράγεται κυρίως γαλακτικό οξύ, διάφορες καρβονυλικές ενώσεις όπως, αλδεΐδη, διακετύλιο, ακετόνη, 2-βουτενόνη από την αποδόμηση της λακτόζης και ελεύθερα αμινοξέα από την αποδόμηση των πρωτεϊνών και πτητικά λιπαρά οξέα όπως, καπρονικό, καπρυλικό, καπροϊκό από την αποδόμηση των λιπών (Belitz et al., 2015).

Οι κυριότεροι τύποι γιαούρτης που παρασκευάζονται σήμερα είναι: α) το παραδοσιακό γιαούρτι, β) η συνεκτική γιαούρτη, γ) η αναμιγμένη γιαούρτη και δ) το στραγγιστό γιαούρτι. Άλλοι τύποι γιαούρτης είναι: α) το γιαούρτι με προβιοτικά με την προσθήκη επιπλέον οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως βακτήρια του γένους *Bifidobacterium spp.*, *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*. Τα βακτήρια αυτά διακρίνονται για την ευεργετική τους δράση στην υγεία του ανθρώπου β) η ρευστή γιαούρτη που αναμιγνύεται με νερό και εμφιαλώνεται π.χ. αριάνη γ) η καταψυγμένη γιαούρτη που μπορεί να συντηρηθεί έως 12 μήνες, κ.α. (Ζερφυρίδης, 2001).

### 1.8. Η θρεπτική αξία του γιαουρτιού

Το γιαούρτι όπως και όλα τα ζυμούμενα γάλατα έχουν διάφορες ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, από τις οποίες οι σημαντικότερες είναι:

- α) τόνωση της κινητικότητας του εντέρου λόγω του περιεχόμενου γαλακτικού οξέως που προκαλεί αύξηση των γαστρικών υγρών, προκαλώντας αύξηση της πεπτικότητας της καζεΐνης και βοηθώντας στην απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο
- β) αντιμικροβιακή δράση έναντι των βακτηρίων που προκαλούν εντερικές λοιμώξεις όπως *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*. Η δράση αυτή οφείλεται στον μικροβιακό ανταγωνισμό που αναπτύσσεται από τα βακτήρια της γιαούρτης στο υπεροξειδίο του υδρογόνου ή την παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών
- γ) διατήρηση της ισορροπίας ή αναγέννηση της φυσικής μικροχλωρίδας του εντέρου ειδικά μετά τη χορήγηση αντιβίωσης
- δ) αντιχοληστερινικές ιδιότητες
- ε) αντικαρκινικές ιδιότητες
- στ) ύπαρξη ενδείξεων ότι το χαμηλό pH διευκολύνει την απορρόφηση του ασβεστίου απ' τον οργανισμό
- ζ) η μείωση της λακτόζης κατά περίπου 30% από την αρχική συγκέντρωση στο γάλα λόγω της ζύμωσης, το καθιστά ευεργετικό για κατανάλωση από άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη (Μάντης, 2000; Ζερφυρίδης, 2001; Κεχαγιάς, 2011).

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> : Μυκοτοξίνες

### 2.1. Γενικά περί μυκοτοξινών

Η λέξη μυκοτοξίνη είναι σύνθετη λέξη και προέρχεται από τη ελληνική λέξη «μύκης» που σημαίνει μύκητας και τη λατινική «toxicum» που σημαίνει δηλητήριο. Οι μυκοτοξίνες είναι προϊόντα μεταβολισμού των μυκήτων κυρίως του γένους *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, (Berry, 1998; Oswald et al., 2005; Μπαλατσούρας, 2006), που προσβάλλουν τρόφιμα και ζωοτροφές και εξακολουθούν να απασχολούν την επιστημονική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες για τις επιπτώσεις τους στη Δημόσια Υγεία. Ταυτόχρονα αποτελούν σημαντική πληγή για τον κλάδο της Βιομηχανίας Τροφίμων, λόγω των οικονομικών απωλειών που επιφέρει η παρουσία τους στα τρόφιμα. Αν και η έρευνα σχετικά με τις επιδράσεις τους αφορά στις τελευταίες δεκαετίες, η παρουσία τους χρονολογείται χιλιετίες πριν. Αναφορά τους γίνεται ακόμη και στη Βίβλο στην αρχαία Αίγυπτο, όπου αποθηκευμένοι καρποί επιμολύνθηκαν με μυκοτοξίνες που παρήχθησαν από μύκητες των γενών *aspergillus* και *penicillium* προκαλώντας τον θάνατο.

Υπολογίζεται ότι υπάρχουν πάνω από 100.000 είδη μυκήτων, από τα οποία 200 περίπου παράγουν τοξίνες. Έχουν αναγνωριστεί περίπου 300 με 400 μυκοτοξίνες με διαφορετική δομή και φυσιοχημικές ιδιότητες, ενώ σε εργαστηριακό επίπεδο έχουν παραχθεί περίπου 300 μυκοτοξίνες από καλλιέργειες μυκήτων (Bennett and Klich, 2003).

Οι πιο συνηθισμένες μυκοτοξίνες, λόγω της συχνής τους εμφάνισης στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές αλλά και λόγω της σοβαρότητας των ασθενειών που προκαλούν στους ζώντες οργανισμούς είναι: οι αφλατοξίνες και οι ωχρατοξίνες προερχόμενες από τον μύκητα *aspergillus spp.*, η ζεαραλενόνη, οι φουμονισίνες και οι τριχοθεσίνες κυρίως από τον μύκητα *fusarium spp.*, η πατουλίνη από τον μύκητα *penicillium spp.* κ.α..

Οι μύκητες προσβάλλουν τα φυτά τόσο στο στάδιο της καλλιέργειάς τους στον αγρό όσο και στο στάδιο της αποθήκευσής τους και κάτω από ειδικές συνθήκες περιβάλλοντος – όπως υψηλή θερμοκρασία και υψηλή υγρασία - μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν. Έτσι ανιχνεύονται συχνά τόσο σε τρόφιμα ανθρώπινης κατανάλωσης όσο και σε ζωοτροφές. Η πρόσληψη μυκοτοξινών από τον άνθρωπο γίνεται φυσικά μέσω της διατροφής του με την κατανάλωση φυτικών προϊόντων που περιέχουν μυκοτοξίνες και με την κατανάλωση ζωικών προϊόντων στα οποία ευρίσκονται οι μεταβολίτες τους π.χ. αφλατοξίνη AFM1 στο γάλα.

Πρόκειται για επικίνδυνες οργανικές χημικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές επιπτώσεις τόσο στην υγεία των ανθρώπων όσο και στην υγεία των ζώων όταν εκείνα καταναλώνουν ζωοτροφές επιμολυσμένες με μύκητες.

Τα τρόφιμα που συνήθως προσβάλλονται είναι το καλαμπόκι, το σιτάρι, τα δημητριακά, το ρύζι, ο καφές, η σόγια καθώς και διάφοροι καρποί όπως φιστίκια, αμύγδαλα,

φουντούκια, διάφορα αποξηραμένα φρούτα, χυμοί φρούτων, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, σταφίδες και κρασί.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μυκοτοξίνες παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα δραστικές ακόμη κι όταν καταστραφεί ο μύκητας από τον οποίο προήλθαν. Επίσης είναι εξαιρετικά θερμοάντοχες ενώσεις και δεν καταστρέφονται κατά τη συνήθη θερμική επεξεργασία των τροφίμων, ακόμη και κατά την παστερίωση UHT, αλλά ούτε και με την κατάψυξη αυτών.

Οι μυκοτοξίνες αναπτύσσουν ηπατοτοξική, νεφροτοξική, νευροτοξική μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση στους ζώντες οργανισμούς. Η επικινδυνότητα των μυκοτοξινών και ειδικά της AFB1 αφλατοξίνης είναι περισσότερο αυξημένη σε άτομα με παθήσεις του ήπατος και ιδίως σε ασθενείς που πάσχουν από ηπατίτιδα Β. Επίσης έχουν αναφερθεί και τερατογενέσεις ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν θάνατο. Μέσω της επιμόλυνσης των ζωοτροφών οι μυκοτοξίνες διαχέονται/διασπείρονται στον οργανισμό των ζώων και στα προϊόντα τους (γάλα, κρέας, αυγά). Οι οικονομικές επιπτώσεις από την απώλεια σε ζωικό κεφάλαιο όσο και από την απώλεια επιμολυσμένων ζωικών προϊόντων είναι τεράστιες.

Οι πιο σημαντικές λόγω της μεγαλύτερης συχνότητας εμφάνισης και των επιδράσεων σε ανθρώπους και ζώα είναι οι αφλατοξίνες AFs, οι φουμονισίνες (FMn) οι τριχοθεσίνες (DON, DAS, T2), η ωχρατοξίνη (OTA), η κιτρινίνη, η ζεαραλενόνη (ZEN) η εργοτοξίνη κ.α.. Από αυτές η DON, οι AFs και τα αλκαλοειδή του εργοτισμού συνήθως παράγονται στο στάδιο προ συγκομιδής ενώ η FMn και OTA κυρίως παράγονται στη φάση μετά τη συγκομιδή (Bhat et al., 2010; Afsah-Hejri et al., 2013).

## 2.2. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες

### 2.2.1 Ωχρατοξίνες

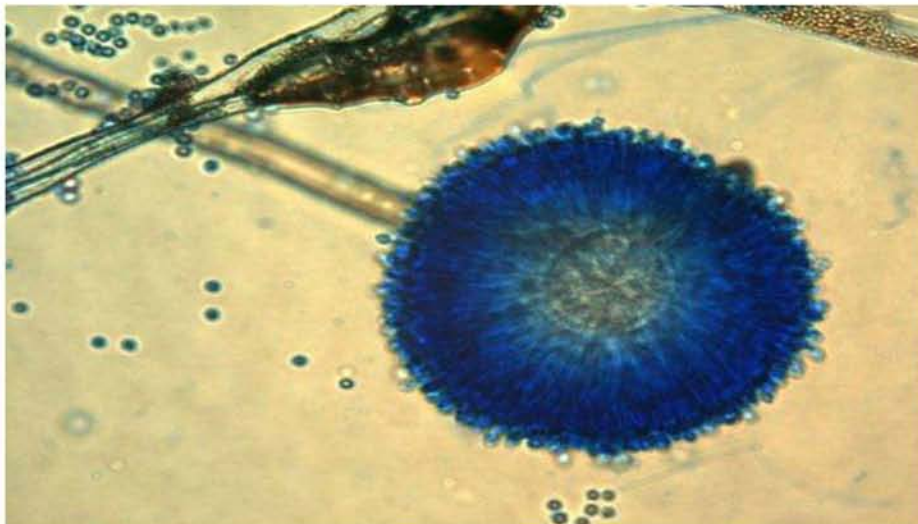
Η παραγωγή των ωχρατοξινών προκύπτει από τούς μύκητες *Aspergillus spp.* και *Penicillium spp.*. Οι πιο γνωστές μυκοτοξίνες της κατηγορίας αυτής, είναι η ωχρατοξίνες A,B,C, η πατουλίνη, η κιτρινίνη, το πενικιλικό οξύ, το κυκλοπιαζονικό οξύ, κ.α. Οι ωχρατοξίνες A,B,C, έχουν παρόμοια χημική δομή αλλά διαφορετική τοξική δράση. Ως πιο τοξική θεωρείται η A, ακολουθεί η B που είναι κατά 10 με 20 φορές λιγότερο τοξική έναντι της A και τέλος η C θεωρείται πως δεν παρουσιάζει κάποια τοξική δράση, αν και έρευνα των Lombaert et al., 2003, ισχυρίζεται ότι η C παρουσιάζει πιο τοξική επίδραση στην κυτταρική σειρά THP-1 έναντι των υπολοίπων δυο ωχρατοξινών.

Από τη συγκεκριμένη κατηγορία μυκοτοξινών σημαντικότερος εκπρόσωπος είναι η ωχρατοξίνη A η οποία είναι και η πιο διαδεδομένη και μελετημένη. Αποτελεί μεταβολίτη του *A.Ochraceus* από τον οποίο έχει λάβει και το όνομά της και ανακαλύφθηκε στη Νότιο Αφρική το 1965 (Van de Merwe et al., 1965) καθώς και του *Penicillium verrucosum* (Pitt, 1987; Varga et al., 1996).



Δομικά πρόκειται για ένα ασθενές οργανικό οξύ, το οποίο αποτελείται από μια ομάδα διυδρο-ισοκουμαρίνης που συνδέεται με πεπτιδικό δεσμό με την L-φαινυλαλανίνη. Είναι μια χλωριωμένη ισοκουμαρινική ένωση και στη στερεή της μορφή είναι άχρωμη και κρυσταλλική. Είναι αδιάλυτη στο νερό, ενώ ως οξύ εμφανίζει εξαιρετική διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες. Σε υπεριώδη ακτινοβολία εμφανίζει μπλε και πράσινο φθορισμό ενώ παρουσιάζει εξαιρετική αντοχή στην επίδραση των οξέων, στις υψηλές θερμοκρασίες και στη μηχανική επεξεργασία (Krogh, 1992; Gupta, 2007). Ως κοσμοπολίτικα γένη μυκήτων, παρουσιάζουν παγκόσμια γεωγραφική διασπορά σε μεγάλο εύρος τροφίμων, με επικρατέστερα εκείνα των: δημητριακών-ρύζι, σιτάρι, κριθάρι βρώμη- τους ξηρούς καρπούς, την σταφίδα, τα σταφύλια και το κόκκινο κρασί, τον καφέ, το κακάο, τα μπαχαρικά, τις ελιές κ.α.

Επίσης έχει ανιχνευτεί και σε αποθηκευμένες ζωοτροφές με τιμές που πλησιάζουν τα 1000 µg/kg (Jelinek et al., 1989) αλλά και σε διάφορα ζωικά προϊόντα όπως: γαλακτοκομικά προϊόντα, χοιρινό κρέας, χοιρινό λουκάνικο, κρεατοσκευάσματα από αίμα, νεφροί χοίρου.



**Εικόνα 3: Ο μύκητας *aspergillus ochraceus*<sup>8</sup>**

Η παρουσία της στα προϊόντα ζωικής προέλευσης οφείλεται στην κατανάλωση από τα ζώα επιμολυσμένων ζωοτροφών. Παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση στο χρόνο ημιζωής στο πλάσμα των ζωικών οργανισμών, ανάλογα με το είδος που μελετάται. Μέσω της γαστρεντερικής οδού όπου αρχικά απορροφάται, περνά στην κυκλοφορία του αίματος και λόγω προσκόλλησής της με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, διαχέεται σε ολόκληρο τον οργανισμό. Έτσι επιτυγχάνεται η συσσώρευσή της κυρίως σε όργανα όπως το ήπαρ και τους νεφρούς αλλά και στον λιπώδη ιστό (Hussein and Brasel, 2001; Gupta, 2007). Στα βοοειδή και αιγοπρόβατα ένα μέρος αυτής μεταβολίζεται. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον μεταβολισμό / αποδόμηση της ωχρατοξίνης από τη μικροβιακή χλωρίδα (βακτήρια, πρωτόζωα) της μεγάλης κοιλίας (Creppy, 2002). Έτσι τα μηρυκαστικά

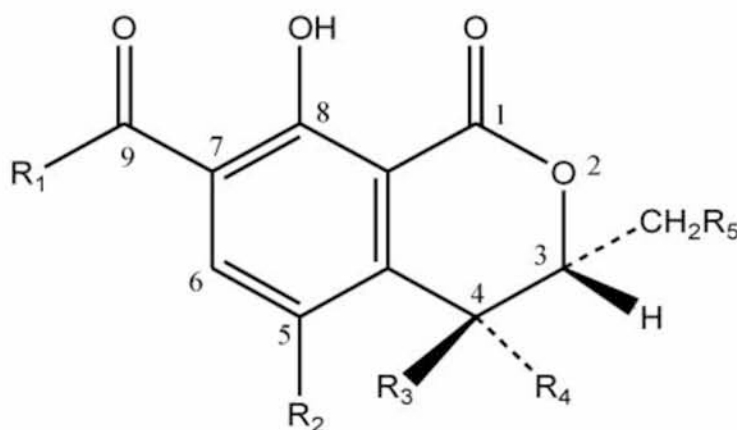
<sup>8</sup> (<https://alchetron.com/Aspergillus-ochraceus-1768600-W>)



(βοοειδή, αιγοπρόβατα) παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στις τοξικές επιδράσεις κατά τον μεταβολισμό της ωχρατοξίνης Α, όχι όμως και τα νεαρά μηρυκαστικά, όταν αυτά βρίσκονται στη φάση της γαλουχίας, τα οποία παρουσιάζουν εξαιρετική ευαισθησία διότι ότι στο συγκεκριμένο στάδιο της ζωής τους λειτουργούν ως μονογαστρικά (Krogh, 1992).

Αντίθετα ο χοίρος ως μονογαστρικό ζώο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στις τοξικές επιδράσεις της OTA διότι στερείται της δυνατότητας υδρόλησής της όπως γίνεται από τα μηρυκαστικά. Έτσι έχουμε συσσώρευσή της στον λιπώδη ιστό του ζώου (Gupta, 2007; Bhat et al., 2010). Σε ήπια περιστατικά προκαλεί καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος ορισμένων ζώων, γεγονός που συμβάλλει στη μείωση της παραγωγικότητάς τους.

Επίσης έχει ανιχνευτεί στο γάλα του ανθρώπου, του κονίκλου, του μυός (Bhat et al., 2010; Gupta, 2007; Afsah-Hejri et al., 2013; Abdallah et al., 2015) και φυσικά στο γάλα των μηρυκαστικών σε μικρά ποσοστά (El-Sayed Abd Alla et al., 2000) γεγονός που δημιουργεί προβλήματα δημόσιας υγείας, μιας και το γάλα αποτελεί τρόφιμο ευρείας κατανάλωσης. Μέσω της τροφικής αλυσίδας προσβάλλει και τον άνθρωπο, όταν η διατροφή του περιλαμβάνει επιμολυσμένο με OTA κρέας χοίρου ή πουλερικών (Bullerman, 2000) και γενικώς φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με την κατανάλωση επιμολυσμένων τροφίμων, καθώς έχει ανευρεθεί ακόμη και στο μητρικό γάλα (Bhat et al., 2010; Afsah-Hejri et al., 2013) και στα ούρα των ανθρώπων (Pascale and Visconti, 2001; Fazekas et al., 2005; Pena et al., 2006; Manique et al., 2008).



Εικόνα 4: Η χημική δομή της ωχρατοξίνης Α (Khoury and Atoui, 2010)<sup>9</sup>

Το 1993 ταξινομήθηκε κατά IARC στην κατηγορία 2B (πιθανώς καρκινογόνο) ως προς την καρκινογενετική της ικανότητα. Γενικά εμφανίζει νεφροτοξική, ηπατοτοξική, ανοσοκατασταλτική και καρκινογόνο δράση τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα

<sup>9</sup> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153212/>)

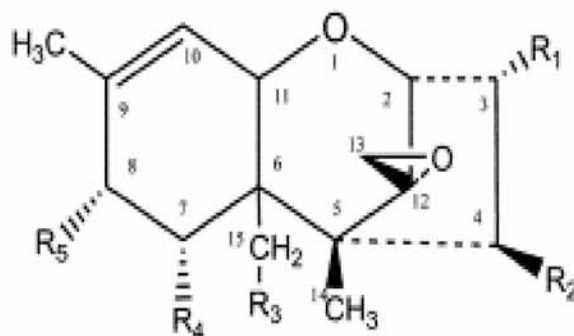
(Schlatter et al., 1996 ; Petzinger and Zieger, 2000; Khoury and Atoui, 2010; Abdallah et al., 2015).

Θεωρείται πως αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες της θανατηφόρας χρόνιας νεφρικής ασθένειας γνωστής ως Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια σε περιοχές των Βαλκανίων, όπως Βουλγαρία, Σκόπια, Ρουμανία (Bullerman, 2000; Chu, 2006). Αρχικά τα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, κόπωση, απώλεια σωματικού βάρους και ωχρή επιδερμίδα.

Σε χρόνιες καταστάσεις παρατηρούνται τόσο αλλοιώσεις στο φλοιό των νεφρών όσο και μείωση του βάρους (Esser and Lemke, 1996; Petzinger and Zieger, 2000). Επίσης παρουσιάζεται αυξημένο ποσοστό νεοπλασματικών όγκων στις ανώτερες ουροφόρες οδούς (Petkova- Bocharova et.al., 1988).

### 2.2.2. Τριχοθεσίνες

Οι τριχοθεσίνες είναι μυκοτοξίνες που προκύπτουν από τους μύκητες του γένους *Fusarium spp.* και προσβάλλουν κυρίως τα σιτηρά. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 150 τριχοθεσίνες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία λόγω των παθολογικών καταστάσεων που προκαλούν. Μπορεί να επιφέρουν οξεία ή χρόνια τοξικότητα αλλά και να προκαλέσουν ανοσοκατασταλτικές καταστάσεις σε άνθρωπο και ζώα, όταν γίνεται μακροχρόνια λήψη μολυσμένης τροφής (Beasley, 1993; MacRae et al., 1993).



Εικόνα 5: Η βασική χημική δομή των τριχοθεσινών (He et al., 2010)

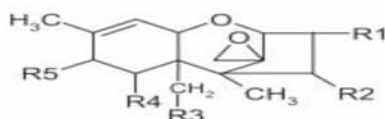
Οι τριχοθεσίνες διακρίνονται σε δυο βασικές ομάδες :

- ΟΜΑΔΑ Α: T-2, HT<sub>2</sub>, DAS διακετοξυσκιπενόλη
- ΟΜΑΔΑ Β: δεοξυνιβαλενόλη DON και νιβαλενόλη.

Η τοξίνη T-2 παράγεται από τον μύκητα *f.sporotrichioides* ακόμη και σε θερμοκρασίες από -2°C έως και -35°C καθώς και από άλλα είδη όπως: *f.heterosporium*, *f. Acuminatum*,

*f. Poae*, κ.α. Η HT<sub>2</sub> αποτελεί μεταβολίτη της T-2, γι' αυτό και συνήθως συνυπάρχουν στους διάφορους καρπούς, ενώ λόγω της συνέργειάς τους δεν δύναται να διαφοροποιηθεί η τοξική τους δράση έναντι των οργανισμών (Cserpy, 2002). Απαντάται με μεγάλη συχνότητα σε δημητριακούς καρπούς όπως σιτάρι, καλαμπόκι, βρώμη, κριθάρι (Rotter et al., 1996). Θεωρείται εξαιρετικά τοξική για τους υδρόβιους οργανισμούς π.χ. πέστροφα, αρουραίους και βοοειδή ενώ χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων T-2 μυκοτοξίνης σε όρνιθες είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οιδήματος, αιμορραγία εντέρου, νέκρωση της στοματικής κοιλότητας και πρόκληση νευρικών διαταραχών που οδήγησαν έως το θάνατο (MacRae et al., 1993).

Η δεοξυνιβαλενόνη (DON) παράγεται κυρίως από τους μύκητες *f.graminearum* και *f.Culmorum* (Chu, 2006) και προσβάλλει αγροτικά προϊόντα όπως καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι κ.α., στα οποία ανευρίσκεται συνήθως σε υψηλές συγκεντρώσεις δημιουργώντας προβλήματα στην αγροτική παραγωγή και εν γένει στην ασφάλεια των τροφίμων αλλά και των ζωοτροφών. Συνήθως παρουσιάζει συνεργική δράση με τη νιβαλενόλη.



| TRICOTHECENES |                                   | R1  | R2  | R3  | R4 | R5   |
|---------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|----|--|
| Type-A        | T-2 toxin (T-2)                   | OH  | OAc | OAc | H  | OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
|               | HT-2 toxin (HT-2)                 | OH  | OH  | OAc | H  | OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
|               | Diacetoxyscirpenol (DAS)          | OH  | OAc | OAc | H  | H  |
|               | Neosolaniol (NEO)                 | OH  | OAc | OAc | H  | OH   |
| Type-B        | Deoxynivalenol (DON)              | OH  | H   | OH  | OH | =O   |
|               | 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON)   | OAc | H   | OH  | OH | =O   |
|               | 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON) | OH  | H   | OAc | OH | =O   |
|               | Nivalenol (NIV)                   | OH  | OH  | OH  | OH | =O   |
|               | Fusarenon X (FUS-X)               | OH  | OAc | OH  | OH | =O   |

Εικόνα 6: Η ομάδα A και B των τριχοθεσινών (Ibanez-Vea et al., 2011)<sup>10</sup>

Λόγω της ικανότητας πρόκλησης εμετού μετά τη λήψη της, ονομάζεται και βομιτοξίνη (vomitoxin) δηλαδή εμετική τοξίνη. Υψηλές συγκεντρώσεις της DON στο σιτηρέσιο των χοίρων προκαλούν διαταραχές στο ρυθμό κατανάλωσης της τροφής ή ακόμη και πλήρη άρνηση λήψης της τροφής, το αποκαλούμενο και ως σύνδρομο «άρνησης της τροφής» (Patterson and Young, 1992; Rotter et al., 1996).

Οι Eriksen and Pettersson, (2004) με έρευνά τους για την εκτίμηση του τοξικολογικού κινδύνου στις ζωοτροφές απέδειξαν ότι στο σύνολό τους όλες οι τριχοθεσίνες είναι τοξικές, με την τοξικότητα να μεταβάλεται ανάλογα με το είδος του ζώου.

Τα πουλερικά είναι φυσικά πιο ευαίσθητα από τα μηρυκαστικά, ενώ οι χοίροι αποτελούν την πλέον ευπαθή ομάδα προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες

<sup>10</sup> (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511000879#fig>)

στον κλάδο της χοιροτροφίας παγκοσμίως (Hietaniemi and Kumpulainen, 1991; Awad et al., 2008).

Η νιβαλενόλη αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση αλλά και τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Η κυτταροτοξική της επίδραση μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια ενώ παρουσιάζει αθροιστική δράση όταν συνυπάρξει με άλλες τριχοθεσίνες (DON, DAS, και T<sub>2</sub>). Οι τριχοθεσίνες γενικά επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA και του RNA επιδρώντας στην 60S ριβοσωμική ομάδα των ευκαριωτικών κυττάρων και διακόπτοντας τη δραστηριότητα της πεπτιδικής τρानσφεράσης. Αυτό προκαλεί ριβοσωμικό στρες, που με τη σειρά του οδηγεί στην μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Awad et al., 2008; da Rocha et al., 2014).

Η DAS και η T<sub>2</sub> έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο της Τροφικής Τοξικής Αλευκίας που εκδηλώθηκε στην περιοχή Όρενμπουργκ της Ρωσίας κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> Παγκοσμίου Πολέμου και ασθένησε χιλιάδες άτομα που κατανάλωσαν αγροτικά προϊόντα επιμολυσμένα με μύκητες *f.sporotrichioides* και *f.poae* (da Rocha et al., 2014).

Εν κατακλείδι όλες οι τριχοθεσίνες προκαλούν διαταραχές και προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα του ζώου, καθυστέρηση ανάπτυξης καθώς και ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο (Pestka, 2007; Bimezoka et al., 2007; Wan et al., 2013).

### 2.2.3. Φουμονισίνες

Οι φουμονισίνες είναι τοξίνες που παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium* και παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για την επιστημονική κοινότητα από τη δεκαετία του '80 και έπειτα.

Τα σημαντικότερα είδη είναι τα *f. proliferatum* και *f. verticillioides* ή *f. moniliforme* όπως πρόσφατα ταξινομήθηκε (Frisvad et al., 2007). Αρχικά απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ο *f.verticillioides*, το 1988 στη Νότιο Αφρική σε καλλιέργειες καλαμποκιού. Παρουσιάζει παγκόσμια γεωγραφική διασπορά και προσβάλλει κυρίως αγροτικές καλλιέργειες καλαμποκιού, τόσο κατά τη φάση ανάπτυξής του στον αγρό, όσο και κατά τη συγκομιδή και αποθήκευσή του (Gelderblom et al., 1988 ; Shephard, 1996; Lazzaro et al., 2013; da Rocha et al., 2014). Οι φουμονισίνες ανευρίσκονται και σε άλλα είδη τροφίμων όπως ρύζι, μύρα, σπαράγγια, σόργο (Creppy et al., 2002).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 28 φουμονισίνες και έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 4 βασικές ομάδες, (A,B,C,P). Στην ομάδα B ανήκουν οι πιο σημαντικές από άποψη τοξικότητας και οι πιο συχνά ευρισκόμενες στη φύση φουμονισίνες, οι οποίες είναι οι: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, και B<sub>3</sub>. Από τις συνολικά παραγόμενες φουμονισίνες, η επικρατέστερη είναι η B<sub>1</sub>, η οποία και απαντάται σε ποσοστά της τάξης του 70% έως 80% (Rheeder et al., 2002; Yazar and Omurtag, 2008; Wan et al., 2013).



**Εικόνα 7: Ο μύκητας *fusarium verticillioides*<sup>11</sup>**

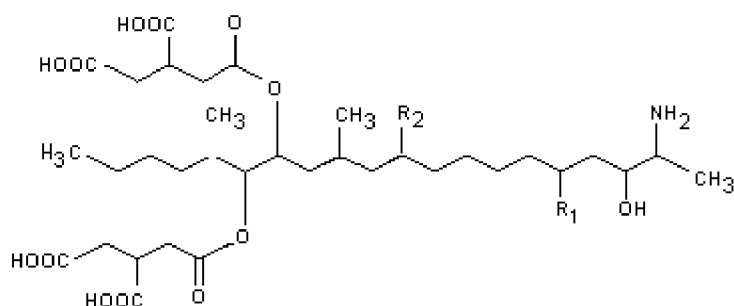
Από χημικής άποψης είναι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, ευδιάλυτοι σε υδατικά διαλύματα και πολικούς διαλύτες, παρουσιάζουν αντοχή τόσο σε χαμηλό όσο και σε υψηλό pH, παρουσιάζουν θερμική σταθερότητα σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών έως και 200°C, ανάλογα με το τρόφιμο στο οποίο ευρίσκεται, ενώ τόσο σε αλκαλικό όσο και σε όξινο περιβάλλον υδρολύονται σε άλλους μεταβολίτες (Steyn, 1995; Humpf and Voss, 2004)

Εκτεταμένες έρευνες δείχνουν την επίδρασή τους στο ένζυμο ceramide synthase, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση και τον μεταβολισμό των σφινγολιπιδίων, αναστέλλοντας έτσι τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και διαταράσσοντας διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως: τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης, τη διαφοροποίηση του κυττάρου, την ανάπτυξη, τη μορφολογία, την κυτταρική βλάβη και απόπτωση. Η αναστολή της βιοσύνθεσης των σφινγολιπιδίων έχει μελετηθεί σε όλα τα είδη ιστών για όλους τους οργανισμούς εκτός του εγκεφάλου (Creppy, 2002; Voss et al., 2007).

Επίσης σε άλλες μελέτες έκθεσης με υψηλές συγκεντρώσεις φουμονισίνης B1 των 50 ppm έως 500 ppm παρατηρήθηκαν διάφορες τοξικές δράσεις, όπως:

α) λευκοεγκεφαλομαλακία στους ίππους β) πνευμονικό οίδημα σε χοίρους γ) νεφροτοξικότητα σε ποντίκια, κουνέλια, πρόβατα και μοσχάρια (Dutton, 1996; Norred et al., 1996; Oswald et al., 2003; Lazzaro et al., 2013; da Rocha et al., 2014).

<sup>11</sup> (<http://www.ls9.it/2013/09/24/fumosinins-from-fusarium-verticillioides-and-f-proliferatum/>)



|                          | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Formula  | CAS Number  | Molecular mass |
|--------------------------|----------------|----------------|--|-------------|----------------|
| Fumonisin B <sub>1</sub> | OH             | OH             | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub> | 116355-83-0 | 721.838        |
| Fumonisin B <sub>2</sub> | OH             | H              | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub> | 116355-84-1 | 705.839        |
| Fumonisin B <sub>3</sub> | H              | OH             | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub> | 136379-59-4 | 705.839        |
| Fumonisin B <sub>4</sub> | H              | H              | C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>13</sub> | 136379-60-7 | 689.840        |

**Figure 1. Chemical structures of fumonisins**

**Εικόνα 8: Η χημική δομή των φουμονισινών (Pharmaceutica Analytica Acta)<sup>12</sup>**

Για την επίδρασή τους στον άνθρωπο από έρευνες προέκυψε συσχέτιση μεταξύ της B<sub>1</sub> και καρκίνου του οισοφάγου έπειτα από επιδημιολογική διερεύνηση περιστατικών τόσο στην περιοχή Transkei της Νοτίου Αφρικής αλλά και περιστατικά τοξίκωσης σε επαρχίες της Δημοκρατίας της Κίνας, όπου συλλέχθηκαν επιμολυσμένες καλλιέργειες αραβόσιτου με υψηλές συγκεντρώσεις B<sub>1</sub> (Li et al., 1980; Rheeder et al., 1992; Chu, 1994; Yazar and Omurtag, 2008; Paterson and Lima, 2010).

Στην Ινδία περιστατικό με γαστρεντερικά συμπτώματα σχετίστηκε με την κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού και σόργο, το οποίο περιείχε 64 mg/kg φουμονισίνη B<sub>1</sub> (Creppy, 2002). Σε άλλη μελέτη με χοίρους, η χορήγηση της B<sub>1</sub> σε υψηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των 0.5 mg/kg βάρους σώματος, αντίστοιχο με 5 ppm έως 8 ppm σε σιτηρέσιο, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του βακτηριακού αποικισμού του εντέρου τους από στέλεχος της *Escherichia Coli*, που υπό φυσιολογικές συνθήκες ανευρίσκονται στο εντερικό σύστημα του ζώου. Το γεγονός αυτό συσχετίζεται άμεσα με θέματα Δημόσιας Υγείας για προβλήματα που πιθανόν να ανακύψουν μέσω της τροφικής αλυσίδας, σε περίπτωση αύξησης των νοσημάτων με *E.coli* (Oswald et al., 2003).

Το FDA (2001) έκρινε αναγκαίο να θεσπίσει ως ανώτατα επιτρεπτά όρια της συνολικά περιεχομένης φουμονισίνης στο καλαμπόκι στα 2 ppm έως 4 ppm και για τις τροφές στα 5 ppm έως 100 ppm. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2003) πρότεινε ως μέγιστη ανεκτή

<sup>12</sup> (Pharmaceutica Analytica Acta, Mycotoxin Strategies: Impact on Global Health and Wealth <https://www.omicsonline.org/articles-images/pharmaceutica-analytica-acta-structure-fumonisin-7-498-g006.png>)



συνολική προσλαμβανόμενη φουμονισίνη από τον ανθρώπινο οργανισμό τα 2 g/kg σωματικού βάρους.

Τέλος από μακροχρόνιες μελέτες έχει προκύψει ότι οι φουμονισίνες παρουσιάζουν ηπατοτοξική, νεφροτοξική και καρκινογόνο δράση, τόσο για περιστατικά οξείας όσο και για περιστατικά χρόνιας έκθεσης, γι' αυτό και το 1993 κατατάχθηκαν κατά IARC στην κατηγορία 2B ως πιθανά καρκινογόνα για τον άνθρωπο.

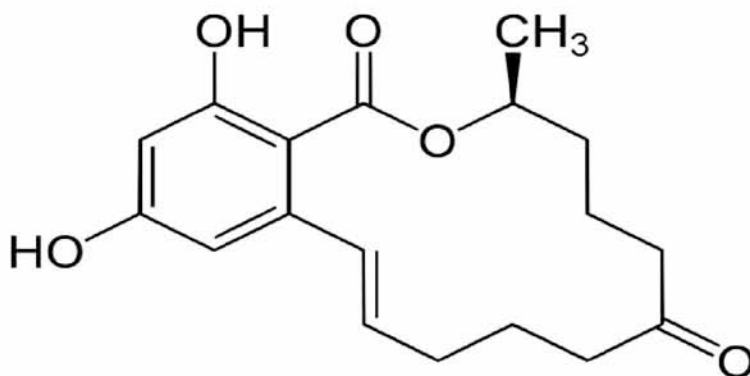
#### 2.2.4. Ζεαραλενόνη

Η Ζεαραλενόνη (ZEN) αν και παράγεται από μύκητες του γένους *Fusarium* δεν ανήκει στις τριχοθεσίνες αλλά αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία μυκοτοξινών. Τις περισσότερες φορές συνυπάρχει μ' αυτές (Diekman and Green, 1992). Πλήττει κυρίως τις αγροτικές καλλιέργειες αραβόσιτου και δημητριακών καρπών όπως σιτάρι, κριθάρι και βρώμη. Ειδικά όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές για τους μύκητες, με ποσοστό υγρασίας 45% και θερμοκρασία 20°C έως 25°C, παρατηρούμε και τα μεγαλύτερα ποσοστά παραγωγής της, ενώ ευνοείται και από τις εναλλαγές θερμοκρασιών του περιβάλλοντος (Cheeke, 1998).

Τα είδη που εμπλέκονται κυρίως στην παραγωγή της είναι το *f.graminearum*, *f. culmorum* και *f.equiseti* (Bennett and Klich, 2003) επιμολύνοντας τις αγροτικές καλλιέργειες και έμμεσα τις ζωοτροφές.

Πρόκειται για μια μυκοτοξίνη με οιστρογόνο δράση στα ζώα, με πιο ευπαθή ομάδα εκείνη των χοίρων. Οι βασικοί της μεταβολίτες είναι η α-ζεαραλανόλη (ζερανόλη) και η β-ζεαραλανόλη (ταλερανόλη), οι οποίοι συνδέονται με το γλουκορονικό οξύ και σχηματίζουν διάφορες γλουκορονικές χημικές ενώσεις, που προκαλούν διαταραχές στην αναπαραγωγική δραστηριότητα των παραγωγικών ζώων καταλαμβάνοντας τους ελεύθερους υποδοχείς στα κύτταρα των ιστών στόχων, μιμούμενοι τα φυσικά οιστρογόνα. Η ZEA έχει παρόμοια δομή με τη θηλυκή ορμόνη εστραδιόλη με την οποία και ανταγωνίζεται για τη δέσμευση των υποδοχέων (Osweiler, 1986; Brase et al., 2009; Wan et al., 2013).

Γενικώς απορροφάται σύντομα από τον οργανισμό, επί παραδείγματι έχει ανιχνευτεί στο πλάσμα του αίματος των χοίρων εντός 30 λεπτών μετά τη χορήγηση της επιμολυσμένης τροφής (Olsen et al., 1991; Biehl et al., 1993). Μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ και δευτερευόντως στο έντερο. Ειδικά για την κατηγορία των χοίρων που είναι και η πιο μελετημένη πειραματικά, αποδείχθηκε ότι στο μεταβολισμό της ZEN εκτός από το ήπαρ συμμετέχουν καθοριστικά η χολή και η εντεροηπατική κυκλοφορία του ζώου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων ZEN και μεταβολιτών στο πλάσμα αίματος, γεγονός που δικαιολογεί τον αυξημένο χρόνο ημιζωής τους στους χοίρους (Biehl et al., 1993). Η απέκκριση για τα περισσότερα είδη ζώων γίνεται κυρίως με τη χολή με εξαίρεση το κουνέλι όπου η απέκκριση γίνεται με τα ούρα.



**Εικόνα 9: Η χημική δομή της ζεαραλενόνης (Wikipedia)<sup>13</sup>**

Εν κατακλείδι η συγκεκριμένη μυκοτοξίνη δημιουργεί διάφορες αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες στους πληθυσμούς των σιών και σε διάφορα άλλα οικόσιτα ζώα (αγελάδες, πρόβατα), όπως: τοξικές επιδράσεις στα ωοκύτταρα και εκφύλισή τους, αποβολές, προβλήματα ανάπτυξης των εμβρύων κατά τα πρώτα στάδια της κύησης, κ.α. (Kuiper-Goodman et al., 1987; Hussein and Brasel, 2001; Zinedine et al., 2007). Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να μεταφερθεί στο γάλα των ζώων προκαλώντας σημαντικά προβλήματα στα νεογέννητά τους ( Bullerman, 2000).

Στον άνθρωπο η παρουσία της ZEN έχει συνδεθεί με διάφορα οιστρογονικά σύνδρομα, όπως υπερπλασία του ενδομητρίου και αδenoκαρκίνωμα (Tomaszewski et al., 1998; Creppy, 2002). Περιστατικά στο Πουέρτο Ρίκο και τη Ν.Α. Ουγγαρία εμφάνισης πρώιμης εφηβείας σε υψηλό ποσοστό, σχετίστηκε με την οιστρογονική δράση της ZEN, η οποία και ανιχνεύτηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις 19 µg/ml έως 100 µg/ml τόσο στον ορό του αίματος όσο και στα τρόφιμα του πληθυσμού στόχου (Schoental, 1983; Saenz et al., 1985; Szuetz, 1997). Η τοξική της επίδραση στους ανθρώπινους οργανισμούς, αφορά κυρίως σε ορμονικές διαταραχές που οδηγούν στην πρώιμη ανάπτυξη των μαστών σε νεαρά κορίτσια και γενικά πρώιμη ωρίμανση του ενδοκρινολογικού συστήματος, ανισορροπία της έκκρισης ορμονών που σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού και του τραχήλου της μήτρας (Azizi et al., 2012; Wan et al., 2013). Από τα μέχρι στιγμής ερευνητικά δεδομένα δεν στοιχειοθετείται η ZEN ως παράγοντας κινδύνου για την πρόκληση καρκίνου στον άνθρωπο, γι' αυτό κι έχει ταξινομηθεί κατά IARC στην κατηγορία 3 (IARC, 1993; EFSA, 2004).

### **2.3. Άλλες μυκοτοξίνες που ενδιαφέρουν τη Δημόσια Υγεία**

#### **A) Εργοτοξίνη**

<sup>13</sup> (<https://en.wikipedia.org/wiki/Zearalenone>)



Η ερυσιβώδεις όλυρα (ergot) ή εργοτίαση των σιτηρών, όπως είναι περισσότερο γνωστή, αποτελεί ασθένεια των δημητριακών και κυρίως της σίκαλης, όταν εκείνα προσβάλλονται από τον μύκητα *Claviceps purpurea*. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο όταν επικρατούν υψηλά ποσοστά υγρασίας. Από το σκληρώτιο του συγκεκριμένου ασκομύκητα παράγονται τα αλκαλοειδή: λυσεργικό οξύ, εργοταμίνη, εργοκριστίνη, εργομετρίνη κ.α. με εξαιρετικά ισχυρή για τον ανθρώπινο οργανισμό και τα ζώα επίδραση (Lapinskas, 2007).

Ο εργοτισμός θεωρείται από τις γνωστότερες και παλαιότερες μυκοτοξικές. Από την αρχαιότητα ακόμη γίνεται αναφορά για τα χαλασμένα δημητριακά, ενώ ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε τον συγκεκριμένο μύκητα για τη θεραπεία των αιμορραγιών μετά τον τοκετό. Το 944-945 μ.Χ. στην Ακουιτάνια της Γαλλίας μια παράξενη για τα δεδομένα της εποχής επιδημία κόστισε τη ζωή σε 20.000 περίπου άτομα. Αντίστοιχα περιστατικά επιδημίας αναφέρονται και μετέπειτα στη Γερμανία κατά τα έτη 1581, 1587, 1596 (Schiff, 2006).

Παρόμοιο περιστατικό επιδημίας με 11.319 αναφορές ασθενών αναφέρθηκε το 1926-1927 στην περιοχή Σαραπολ κοντά στα Ουράλια όρη της Ν. Ρωσίας. Το 1927 στο Μάντσεστερ της Αγγλίας καταγράφηκε περιστατικό με 200 Εβραίους πρόσφυγες που διατράφηκαν με επιμολυσμένο από τον μύκητα ψωμί και το 1951 σε τουριστική περιοχή της Γαλλίας αναφέρεται περιστατικό με 230 ασθενείς που κατανάλωσαν προϊόντα από τοπικό αρτοποιείο (Schiff, 2006).



**Εικόνα 10: Σκληρώτιο του μύκητα *Claviceps purpurea*<sup>14</sup>**

Η νόσος εκδηλώνεται με δυο μορφές: α) εμετός, κεφαλαλγίες, ρινορραγίες και γαγγραινώδεις εξελκώσεις και β) με νευρολογικές διαταραχές, όπως κρίσεις επιληψίας, σπασμούς και παραισθήσεις (Peraica et al., 1999; Schiff, 2006). Τα πιο συνηθισμένα κλινικά συμπτώματα που παρατηρούνται στα ζώα είναι γαγγραινώδη άκρα, νευρολογικές διαταραχές, αταξία, αποβολές, απώλεια αυτιών, ουράς, νυχιών και αγγαλξία (Richard, 2007; Düringer et al., 2012; Craig et al., 2015).

<sup>14</sup> ([http://www.wildaboutbritain.co.uk/pictures/data/8/03\\_Ergot\\_-\\_Claviceps\\_purpurea.jpg](http://www.wildaboutbritain.co.uk/pictures/data/8/03_Ergot_-_Claviceps_purpurea.jpg))

Τα αλκαλοειδή της εργοτοξίνης χρησιμοποιούνται ευρέως στη φαρμακολογία, λόγω της αγγειοσταλτικής τους ικανότητας, ενώ αποτελούν το δομικό στοιχείο και συγκεκριμένα το λυσεργικό οξύ, για την παραγωγή του γνωστού παραισθησιογόνου ναρκωτικού LSD. Μέχρι και σήμερα στην Αμερική δεν έχουν θεσμοθετηθεί όρια ανίχνευσης για τα δημητριακά, ενώ για την Ευρώπη η EFSA (2012) προτείνει το όριο των 0.03 µg/kg έως 3.6 µg/kg σωματικού βάρους /ημέρα και 0.6 µg/kg σ.β/ημέρα για παιδιά και ενήλικες αντίστοιχα (Craig et al., 2015).

## B) Κιτρινίνη

Η κιτρινίνη προσβάλλει κυρίως αποθηκευμένα δημητριακά και καρπούς αλλά ανευρίσκεται επίσης σε διάφορα φρούτα, λαχανικά, φασόλια, βότανα και μπαχαρικά. Πρόκειται για κρυσταλλική ουσία με κίτρινο χρώμα, διαλυτή σε πολικούς οργανικούς διαλύτες και σε θερμά υδατικά διαλύματα (Xu et al., 2006).

Αποτελεί δευτερεύοντα μεταβολίτη των μυκήτων *Aspergillus* (*A. niveus*, *A. terreus*), *Penicillium* και *Monascus spp.* Απομονώθηκε το 1931 από καλλιέργεια του μύκητα *penicillium citrinum* (Hetherington and Raistrick, 1931; EFSA 2012; da Rocha et al., 2014).

Η κιτρινίνη συνδέθηκε επιδημιολογικά με το σύνδρομο «του κίτρινου ρυζιού», που καταγράφηκε στην Ιαπωνία το 1971, αλλά και με προϊόντα ζύμωσης που παραδοσιακά παρασκευάζονται σε χώρες της Ανατολής με τη χρήση του μύκητα *Monascus purpureus* για το χρωματισμό των προϊόντων, την ενίσχυση της γεύσης, ως συντηρητικό κρέατος, για το βρασμό του κρασιού κ.α. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το «κόκκινο μουχλιασμένο ρύζι» (RMR) στην Ασία που παράγεται με τη βοήθεια του μύκητα *Monascus spp.*

Η κιτρινίνη εμφανίζει νεφροτοξική δράση για διάφορα είδη ζώων, αλλά και για τους ανθρώπους, ειδικά όταν συνυπάρχει με την ωχρατοξίνη Α ή με την πατουλίνη στους χυμούς φρούτων (EFSA 2012; da Rocha et al., 2014) ενώ οι περιπτώσεις χρόνιας έκθεσης έχουν συνδεθεί με τη Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια (Gupta, 2007).

Δεδομένου ότι ο αριθμός των ερευνητικών μελετών για την κιτρινίνη είναι σχετικά περιορισμένος συγκριτικά με τις άλλες μυκοτοξίνες, η νομοθετική θέσπιση ανώτατων επιτρεπτών ορίων σε τρόφιμα και ζωοτροφές δεν έχει ολοκληρωθεί έως σήμερα. Ο FAO (Food and Agriculture Organization) δεν έχει θεσπίσει επίσημα όρια ML's της κιτρινίνης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Ομοίως και η EFSA δεν την έχει συμπεριλάβει στον ΕΚ 1881/2006 (EFSA, 2012).

## 2.4. Περιβαλλοντικοί παράγοντες ανάπτυξης των μυκήτων

Οι μύκητες είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι ευκαριωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι διαβιούν ως παράσιτα ή σαπρόφυτα και φέρουν χαρακτηριστικό σχηματισμό το μυκητόλλιο ή μυκήλιο. Η αναπαραγωγή τους γίνεται αγενώς ή εγγενώς και οδηγεί στο

σχηματισμό σπορίων ή κονιδίων, που όταν βρεθούν σε βέλτιστες συνθήκες περιβάλλοντος προκαλείται εκβλάστηση των σπορίων και επέκταση των υφών που τελικά σχηματίζουν το μυκήλιο (Μπεζιρτζόγλου, 2005). Για κάθε κονίδιο που εκβλαστάνει μελλοντικά μπορεί να προκύψει μια νέα αποικία (Gougouli et al., 2012).

Οι μύκητες που απαντώνται στις αγροτικές καλλιέργειες έχουν διαχωριστεί σε δυο βασικές κατηγορίες. Εκείνοι που προσβάλλουν τα φυτά και παράγουν τις τοξίνες τους πριν τη συγκομιδή (π.χ. φουμονισίνες, αφλατοξίνη) και εκείνοι που παράγουν τις τοξίνες τους κατά τη φάση αποθήκευσης της σοδειάς (π.χ. ωχρατοξίνη). Σε κάθε περίπτωση η πηγή είναι κοινή και είναι ο αγρός.

Έχουν ταυτοποιηθεί 4 τύποι τοξιγενών μυκήτων α) οι φυτοπαθογόνοι, όπως ο *f.graminearum* β) μύκητες που παράγουν τοξίνες σε υπερώριμα ή στρεσαρισμένα φυτά, όπως ο *f.verticillioideis* και ο *a.flavus* π.χ. στον αραβόσιτο και ο *a.carbonarius* στα σταφύλια, γ) μύκητες που έχουν αποικιστεί στο φυτό αλλά η παραγωγή των τοξινών γίνεται μετά τη συγκομιδή, όπως ο *a.flavus* στον αραβόσιτο που προέρχεται από τροπικές περιοχές δ) μύκητες που προέρχονται από υλικά του εδάφους ή έχουν προσβάλλει μέρη του φυτού και αναπτύσσονται κατά τη φάση αποθήκευσης των καρπών εάν υπάρξουν ευνοϊκές συνθήκες, όπως ο *penicillium verrucosum* στα σιτηρά και ο *a.flavus* σε διάφορους καρπούς (Miller, 1995; Miller, 2008; Binder et al., 2007).

Διάφοροι παράγοντες ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων και κατ' επέκταση την παραγωγή μυκοτοξινών, όπως η θερμοκρασία, το υπόστρωμα, το pH, η ενεργότητα ύδατος  $a_w$ , η σχετική υγρασία, το διαθέσιμο οξυγόνο, το φως και η διάρκειά του, οι χρησιμοποιούμενες καλλιεργητικές τεχνικές, όπως η χρήση εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων και η μη παρουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας. Οι παράγοντες αυτοί επιδρούν διαφορετικά, ανάλογα με το γένος και το είδος του μύκητα *aspergillus*, *penicillium*, *fusarium*, στο οποίο αναφερόμαστε, ενώ θα πρέπει να σημειωθεί πως υπάρχουν διακυμάνσεις και μεταξύ στελεχών του ίδιου γένους (Fitendorg et al., 1996; Popovski and Celar, 2013).

Οι προαναφερόμενοι μύκητες αναπτύσσονται σε εύκρατα, τροπικά και ημιτροπικά κλίματα και σ' ένα εύρος θερμοκρασιών που ποικίλλει ανάλογα με το γένος και το είδος, που συνήθως κυμαίνεται από 10°C έως 35°C. Η σχετική υγρασία περιβάλλοντος, που ευνοεί την ανάπτυξη των μυκήτων, πρέπει να είναι ίση ή και μεγαλύτερη του 75%. (Kuhn and Ghannoum, 2003; Xu et al., 2007).

Η ενεργότητα ύδατος  $a_w$ , εκφράζει το μη δεσμευμένο νερό, που λαμβάνει τιμές από 0-1 και η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η επικρατέστερη τιμή για μεγάλη κατηγορία μυκήτων είναι η  $a_w = 0.86$  (Magan et al., 2010; Mousa et al., 2011). Ξεχωριστή περίπτωση αποτελεί ο *a.flavus*, που ως εξαιρετικά ξηροάντοχος, μπορεί να αναπτυχθεί και σε τιμές  $a_w = 0.73$  ενώ παράγει αφλατοξίνη σε  $a_w = 0.85$  (Sanchis and Magan, 2004; Μπαλατσούρας, 2006).

Σημαντικό ρόλο επίσης διαδραματίζει και το υπόστρωμα ανάπτυξης τους. Συνήθως προτιμούν υποστρώματα πλούσια σε υδρογονάνθρακες, ξυλόζη, δεξτρόζη, με υψηλή περιεκτικότητα σε νιτρικά και νιτρώδη άλατα, όπως όλα τα φυτικής προέλευσης προϊόντα/ τρόφιμα, όπως: σιτηρά, αραβόσιτος, βρώμη, φρούτα, ξηροί καρποί κ.α.

Ανασταλτικός παράγοντας ανάπτυξης των μυκήτων θεωρείται η παρουσία μικροβίων στο περιβάλλον τους, όπως οι *bacillus subtilis*, οι *lactobacilli spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia spp.*, *Burkholderia spp.*, οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά έναντι των μυκήτων και των τοξινών τους (Yin et al., 2008; Kumar et al., 2017). Όμοια δράση παρουσιάζουν και ορισμένα είδη ζυμών όπως η *Debaryomyces* και *candida spp.* (Virgili et al., 2012).

Αν και δεν έχει διευκρινιστεί σε ποια φάση ανάπτυξης, λογαριθμική ή στατική, λαμβάνει χώρα η παραγωγή των μυκοτοξινών, είναι βέβαιο ότι η παραγωγή τους γίνεται σε θερμοκρασία υψηλότερη της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης του μύκητα π.χ. η optimum θερμοκρασία ανάπτυξης του μύκητα *a.flavus* είναι περίπου 37°C, ενώ η παραγωγή της αφλατοξίνης γίνεται στους 28°C έως 30 °C (Sanchis and Magan, 2004). Θα πρέπει να επισημανθεί πως η παρουσία μυκήτων στα φυτά δεν προϋποθέτει απαραίτητα και την παρουσία μυκοτοξινών (Binder et al., 2007).

Μεγάλη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα προκαλεί η επικείμενη κλιματική αλλαγή και οι επιπτώσεις της, που φαίνεται να επηρεάζουν άμεσα την καλλιέργεια και την αποθήκευση των αγροτικών προϊόντων είτε προορίζονται απευθείας για ανθρώπινη κατανάλωση είτε για ζωοτροφές. Αύξηση της συγκέντρωσης του αερίου του θερμοκηπίου δηλ. του CO<sub>2</sub>, απότομες θερμοκρασιακές μεταβολές, υψηλή συχνότητα βροχοπτώσεων ή μεγάλα διαστήματα ανυδρίας αποτελούν στρεσογόνους παράγοντες για τους μύκητες και συμβάλλουν στην αυξημένη παραγωγή μυκοτοξινών (Paterson and Lima, 2010; Magan et al., 2011; Medina et al., 2014).

## 2.5. Η παρουσία των μυκοτοξινών στις ζωοτροφές

Τις τελευταίες δεκαετίες η εντατικοποίηση της κτηνοτροφίας, στο πλαίσιο επίτευξης υψηλότερων αποδόσεων και μεγιστοποίησης του κέρδους, έχει αλλάξει δραματικά τη δομή της διατροφής των ζώων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το 25% της παγκόσμιας παραγωγής δημητριακών ετησίως είναι επιμολυσμένο ήδη με μυκοτοξίνες σύμφωνα με στοιχεία του FAO (2013) και συνδυαστικά το γεγονός ότι η κλιματική αλλαγή φαίνεται να συμβάλει στον επιπολασμό της μόλυνσης από μυκοτοξίνες, θα πρέπει να ληφθεί η ανάλογη μέριμνα για την αποτροπή της επιμόλυνσης των ζωοτροφών.

Υπεύθυνοι για την παραγωγή αυτών των ουσιών είναι οι μύκητες των γενών *aspergillus*, *penicillium*, *fusarium*. Πρόκειται για ουσίες με εξαιρετική αντοχή σε μηχανικές καταπονήσεις και συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, υγρασία), που επιφέρουν κάθε χρόνο τεράστιες οικονομικές απώλειες στον κλάδο της κτηνοτροφίας. Οι συχνότερα απαντώμενες τοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, οι φουμονισίνες, η ωχρατοξίνη, οι τριχοθεσίνες και η ζεαραλενόνη. Παράλληλα η επιμόλυνση των δημητριακών καρπών, αραβόσιτος, κριθάρι, βρώμη, σόγια, βαμβακόσπορος κ.α. πριν τη συγκομιδή, που προορίζονται για ζωοτροφές σε ενσιρωμένη ή ακατέργαστη μορφή, αποτελεί σημαντικό κίνδυνο τόσο για την υγεία των ζώων όσο και για τον άνθρωπο μέσω της διατροφής του, όταν καταναλώνει επιμολυσμένα προϊόντα ζωικής προέλευσης.

Έμφαση πρέπει να δίνεται: α) στη διαδικασία ξήρανσης των καρπών που προορίζονται για ζωοτροφές, πριν την αποθήκευσή τους, ώστε να επιτυγχάνεται το επιθυμητό ποσοστό υγρασίας καθώς και στις γενικότερες διαδικασίες επεξεργασίας και

συσκευασίας τους και β) να λαμβάνεται μέριμνα για τη διατήρηση χαμηλών τιμών θερμοκρασίας και υγρασίας στο χώρο αποθήκευσης, ώστε ν' αποφευχθεί επιπρόσθετη μόλυνση (Bhat et al., 2010).

Επί παραδείγματι για την επίτευξη καλής ποιότητας αραβόσιτου η συγκομιδή συνήθως γίνεται όταν τα επίπεδα υγρασίας στον καρπό είναι 20% έως 22%. Ως βέλτιστη υγρασία ανάπτυξης για τον *A.flavus* θεωρείται το 18% αν και δύναται ν' αναπτυχθεί και σε ποσοστό υγρασίας 13%. Για να ελαχιστοποιηθεί λοιπόν ο κίνδυνος παραγωγής μυκοτοξινών πριν την αποθήκευσή του, επιβάλλεται η σωστή ξήρανσή του και η διατήρηση της σχετικής υγρασίας σε χαμηλά επίπεδα (Marin et al., 2012). Γενικά οι μύκητες *aspergillus* και *penicillium* μπορούν να αναπτυχθούν σε χαμηλότερη ενεργότητα ύδατος και υψηλότερη θερμοκρασία έναντι του μύκητα *fusarium* που απαιτεί υψηλή  $a_w$  και χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Τέλος στο πλαίσιο του διεθνούς εμπορίου, η διακίνηση μεγάλων ποσοτήτων ζωοτροφών φαίνεται να συμβάλει στη διασπορά και την αύξηση του κινδύνου επιμόλυνσης με μυκοτοξίνες. Κι αυτό διότι ευνοείται η μεταφορά ειδών μυκήτων που αναπτύσσονται υπό ορισμένες γεωγραφικές και κλιματικές συνθήκες σε συνδυασμό με την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Bhat et al., 2010; Afsah-Hejri et al., 2013).

## 2.6. Η παρουσία των μυκοτοξινών στην τροφική αλυσίδα

Οι μυκοτοξικώσεις αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο τόσο για τις αναπτυσσόμενες όσο και για τις ανεπτυγμένες χώρες, επιφέροντας σημαντικές οικονομικές απώλειες σε ετήσια βάση. Μέχρι και σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 400 περίπου διαφορετικές μυκοτοξίνες για αρκετές απ' τις οποίες όμως δεν είναι ακόμη γνωστό το μονοπάτι σύνθεσής τους (Bhat et al., 2010). Οι μυκοτοξίνες που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην τροφική αλυσίδα και απαντώνται σε μεγάλη γκάμα τροφίμων είναι οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες, οι φουμονισίνες, οι τριχοθεσίνες, η ζεαραλενόνη, η κιτρινίνη, η εργοτοξίνη κ.α. και αποτελούν πλέον αντικείμενο διεθνούς και ευρωπαϊκής νομοθεσίας.

Οι μυκοτοξίνες αυτές μπορούν να προσβάλουν τα προϊόντα (δημητριακοί καρποί, φρούτα, λαχανικά) κατά τη φάση της καλλιέργειας τους στον αγρό, δηλαδή προ συγκομιδής, όπως π.χ. οι αφλατοξίνες και οι φουμονισίνες, ενώ άλλες παράγονται στη φάση της συγκομιδής, μεταφοράς και αποθήκευσής τους, όπως π.χ. οι ωχρατοξίνες. Πολλά από αυτά τα αγροτικά προϊόντα προορίζονται για την παραγωγή ζωοτροφών. Λόγω της εξαιρετικής σταθερότητας και αντοχής των μυκοτοξινών στις διάφορες επεξεργασίες, παραμένουν ανέπαφες για μεγάλα χρονικά διαστήματα, επιμολύνοντας τους ζωικούς οργανισμούς που τις καταναλώνουν, καθώς και τα προϊόντα που αυτά παράγουν. Επομένως, ο άνθρωπος μπορεί να προσβληθεί μέσω της διατροφής του είτε άμεσα με την κατανάλωση φυτικής προέλευσης τροφίμων είτε έμμεσα από την κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης.

Ο βαθμός επίδρασης στον ανθρώπινο οργανισμό, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση της τοξίνης, η διάρκεια της έκθεσης, οξεία ή χρόνια, τα



φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ουσίας, η ηλικία, το φύλο, το βάρος σώματος, η φυσική κατάσταση, η διατροφή, περιβαλλοντικοί παράγοντες κ.α. (Bryden, 2007). Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται ενδεικτικά οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες, οι μύκητες που τις παράγουν καθώς και τα τρόφιμα που επιμολύνουν.

**Πίνακας 8: Είδη μυκήτων και τρόφιμα που επιμολύνουν**

| ΕΙΔΟΣ ΜΥΚΗΤΑ   | ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΗ  | ΤΡΟΦΙΜΑ   |
|--|---|---|
| Aspergillus flavus<br>Aspergillus paraciticus<br>A. nomius   | Αφλατοξίνες<br>B <sub>1</sub> B <sub>2</sub><br>G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> | Καλαμπόκι, αραχίδες (φιστίκια)<br>δημητριακοί καρποί (σιτάρι, κριθάρι),<br>βαμβάκι, σύκα  |
| Μεταβολίτες αφλατοξινών<br>B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>   | Αφλατοξίνη<br>M <sub>1</sub> και M <sub>2</sub>                               | Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα   |
| Aspergillus ochraceus<br>A. carbonarius<br>Penicillium verrucosum  | Ωχρατοξίνη A  | Κόκκοι δημητριακών (σιτάρι, βρώμη, κριθάρι, καλαμπόκι) φασόλια, μπαχαρικά, σταφύλια, σταφίδες, κρασί, καφές, ελιές, χοιρινό κρέας και κρεατοσκευάσματα π.χ. αλλαντικά |
| Aspergillus citrinum<br>A. niveum,<br>A. terreus, Monascus spp   | Κιτρινίνη   | Ρύζι καλαμπόκι σιτάρι κριθάρι   |
| Fusarium sporotrichioides<br>F. heterosporium<br>F. acuminatum<br>F. poae<br>F. Graminearum<br>F. Culmorum | Τριχοθεσίνες  | Καρποί δημητριακών<br>ξηροί καρποί, ρύζι, καλαμπόκι, σόργο και γενικά ζωοτροφές   |
| Fusarium verticillioides ή<br>F. moniliforme<br>F. proliferatum  | Φουμονισίνες  | Καλαμπόκι, ρύζι<br>δημητριακά, μύρα<br>Σπαράγγια, σόργο   |
| Γενικώς Fusarium spp.<br>F. graminearum,<br>F. culmorum, F. equiseti.                                      | Ζεαραλενόνη   | Καλαμπόκι, ρύζι δημητριακοί καρποί, σόργο   |
| Claviceps spp  | Εργοτοξίνη  | Σιτηρά, σίκαλη, καλαμπόκι   |



## Κεφάλαιο 3ο : Αφλατοξίνες

### 3.1. Ιστορική αναδρομή

Οι αφλατοξίνες έγιναν γνωστές στο ευρύ κοινό το 1960 στη Μεγάλη Βρετανία, όπου και καταγράφηκε ο θάνατος 100.000 ινδικών ορνίθων, αποτελώντας το πρώτο κρούσμα αφλατοξίκωσης. Αρχικά η επιδημία χαρακτηρίστηκε ως νόσος «Turkey X». Έπειτα από διερεύνηση αποδείχθηκε πως τα πτηνά απεβίωσαν από οξεία νέκρωση του ήπατος και μετά από κατανάλωση τροφής, η οποία περιείχε βραζιλιάνικα φιστίκια-αραχίδες επιμολυσμένες από στελέχη του μύκητα *aspergillus flavus*, του οποίου η τοξίνη ονομάστηκε στη συνέχεια αφλατοξίνη (Kumar et.al., 2017).

Ακολούθησαν κι άλλα περιστατικά με πιο σημαντικά το 1974 σε διάφορες αγροτικές περιοχές της Ινδίας που διήρκησαν δυο μήνες, όπου καταγράφηκαν συνολικά 397 περιστατικά ηπατίτιδας και 106 θάνατοι, τα οποία αποδόθηκαν στην κατανάλωση αραβόσιτου επιμολυσμένου με αφλατοξίνες. Από το 1981 μέχρι και το 2004 έχουν καταγραφεί στην Κένυα τουλάχιστον 500 περιστατικά αφλατοξίκωσης με 200 θανάτους, που προκλήθηκαν από κατανάλωση επιμολυσμένου με αφλατοξίνες καλαμποκιού, σόργο κ.α. ενώ μόλις το 2004 και 2005 καταγράφηκαν 317 περιστατικά οξείας αφλατοξίκωσης με 125 θανάτους (CDCP 2004; Kumar et al., 2017). Άλλη κλασσική περίπτωση οξείας αφλατοξίκωσης συνέβη το 1990 στη Μαλαισία, όπου 40 άνθρωποι προσβλήθηκαν και 13 παιδιά πέθαναν μετά από κατανάλωση ζυμαρικών προσβεβλημένα με αφλατοξίνες (Gonaris, 2009).

Εκτός από τις χώρες της Μέσης Ανατολής, της Μεσογείου και της υποσαχάριας Αφρικής, την Ασία και την Κίνα, όπου παραδοσιακά αναφέρονται τέτοια κρούσματα, σήμερα πλέον αντίστοιχα προβλήματα αντιμετωπίζουν ακόμη και χώρες της Κεντρικής Ευρώπης όπως Ρουμανία, Ουγγαρία, Σερβία, ως αποτέλεσμα της κλιματικής αλλαγής (Paterson and Lima, 2010; Magan et al., 2011; Baranyi et al., 2013; Medina et al., 2014; Kumar et al., 2017).

Οι αφλατοξίνες αποτελούν την πιο μελετημένη ομάδα μυκοτοξινών λόγω της σπουδαιότητας και επικινδυνότητας για τη δημόσια υγεία, γι' αυτό έχουν διεξαχθεί πλήθος ερευνητικών μελετών από όλους τους επιστημονικούς κλάδους έως και σήμερα.

Ακολούθως αναφέρονται ορισμένες χρονολογίες ορόσημα για τη συγκεκριμένη κατηγορία μυκοτοξινών. Η διαλεύκανση της δομής και της σύνθεσης της B1 αφλατοξίνης το 1963 οδήγησε σε πλήθος τοξικολογικών μελετών με στόχο την ταυτοποίησή της έως το 1977. Το 1981 ανιχνεύτηκε σε προϊόντα απέκκρισης (ούρα) του ανθρώπινου οργανισμού. Την περίοδο 1968-1985 δόθηκε έμφαση στη διεξαγωγή επιδημιολογικών μελετών προκειμένου να αξιολογηθεί η συσχέτιση της πρόσληψης αφλατοξίνης και της συχνότητας εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στους ανθρώπινους πληθυσμούς (Kensler et al., 2011).

Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών με τις συσσωρευμένες πειραματικές αποδείξεις αποτέλεσαν τη βάση για την ταξινόμηση των αφλατοξινών το 1993 κατά IARC στην

κατηγορία I των καρκινογόνων ουσιών. Από τις τέσσερις κύριες αφλατοξίνες που παράγονται η B1 θεωρείται η πιο τοξική όλων και η κατάταξή τους γίνεται με την εξής σειρά B1>G1>B2>G2 (IARC, 2012; Bdos et al., 2013).

### 3.2 Η προέλευση των αφλατοξινών

Οι αφλατοξίνες παράγονται κυρίως από τα είδη μυκήτων της οικογένειας *Aspergillus spp.*. Πρόκειται για σαπροφυτικό μύκητα που αρχικά περιγράφηκε από τον Φλωρεντιανό ιερέα και μυκητιολόγο P.A. Micheli το 1729. Πρόκειται για κοινό γένος που έχει ταξινομηθεί με βάση τη μορφολογία του πολλές φορές μέχρι και σήμερα, ενώ διαθέτει πάνω από 200 είδη. Εν συνεχεία περιγράφηκε το 1809 από τον Link και έγινε ευρέως γνωστό ως το ασεξουαλικό είδος μυκήτων που παράγει αγενή σπόρια και κονίδια (Amaiike and Keller, 2011).

Ως σαπροφυτικός μύκητας κατανέμεται γεωγραφικά σε όλα τα εδάφη ανά τον κόσμο με τη μορφή μυκηλίων και κονιδίων είτε με την ανθεκτική δομή των σκληρωτίων, προκαλώντας ασθένειες σε σημαντικές αγροτικές καλλιέργειες τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή τους. Εκτός από το έδαφος επιβιώνει και στον αέρα, στο νερό και στους ιστούς των φυτών (Amaiike and Keller, 2011).

Οι ασπέργιλλοι λοιπόν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη μικροβιολογία τροφίμων, μιας και αποτελούν κοσμοπολίτικο γένος με μεγάλο αριθμό ειδών και ιδιαίτερη ικανότητα ανάπτυξης σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες ανά την υφήλιο και επί διαφόρων οργανικών υποστρωμάτων (Μπαλατσούρας, 2006).

Τα είδη που παράγουν τοξίνες και ενδιαφέρουν είναι: ο *A. Flavus*, *A. Parasiticus*, *A. nomius*, *A. Tamari*, *A. pseudotamarii*, *A. Ochraceoroseus*, ενώ εκείνα τα είδη με τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα για την επιστημονική κοινότητα καθώς και για τη βιομηχανία τροφίμων είναι τα: *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*, τα οποία και έχουν μελετηθεί εκτενώς μέχρι σήμερα.

Ο *Aspergillus flavus* είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μύκητας των αγροτικών προϊόντων, κυρίαρχος ειδικά σε καρπούς ελαιώδους σύστασης, όπως το καλαμπόκι, ο βαμβακόσπορος, ο ηλιόσπορος, σε καρπούς με κέλυφος π.χ. αμύγδαλα, φιστίκια, σε δημητριακούς καρπούς, όπως σιτηρά, κριθάρι, βρώμη, αποξηραμένα φρούτα κ.α. Ο *a. flavus* παράγει τις AFB1 και AFB2 αφλατοξίνες, των οποίων υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες είναι οι AFM1 και AFM2 που απαντώνται στα ζωικής προέλευσης τρόφιμα. Επίσης παράγει και άλλες τοξικές ουσίες, μεταβολίτες, όπως το κυκλοπιαζονικό οξύ (CPA), το κοδικό οξύ, το ασπεργιλλικό οξύ, η στεριγματοκυστίνη και το β\_νιτροπροπιονικό οξύ (Hedayati et al., 2007; Frisval et al., 2007; Baranyi et al., 2013).

Το κυκλοπιαζονικό οξύ είναι επίσης επιβλαβής μυκοτοξίνη για την οποία δεν έχουν θεσπιστεί ανώτερα επιτρεπτά όρια, ενώ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ελλείψει εργαστηριακών τεχνολογικών εφαρμογών και αστάθειάς του στο περιβάλλον κατά τη μεταχείρισή του (παρουσία οξυγόνου) (Abbas et al., 2011).

Η ακριβής ταυτοποίηση των στελεχών μεταξύ του είδους *a.flavus* παραμένει δυσχερής λόγω επικάλυψης των μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών ακόμη και μεταξύ των ίδιων στελεχών. Υπάρχουν δυο φαινοτυπικές μορφές του, το S και L στέλεχος (strain) με τις οποίες συνήθως ανευρίσκεται. Εντός του στελέχους S έχουν απομονωθεί μορφές που παράγουν μόνο τις B αφλατοξίνες, ενώ άλλες παράγουν τόσο τις B όσο και τις G αφλατοξίνες (Hedayati et al., 2007).

Ο *Aspergillus parasiticus* είναι κυρίαρχος παράγοντας σε καλλιέργειες αραχίδων και παράγει όλες τις κύριες AFB1, AFB2 AFG1, AFG1 αφλατοξίνες καθώς και κοδικό οξύ αλλά δεν παράγει κυκλοπιαζονικό οξύ (Hedayati et al., 2007; Fakruddin et al., 2015). Υπάρχουν δυο άλλα είδη στενά συνδεδεμένα με τον *aspergillus parasiticus*, τα *a.toxicarius* και *a.parvisclerotigenus* που παράγουν τις B και G αφλατοξίνες (Frisval et al., 2007).

Ο *Aspergillus nomius*, που μορφολογικά προσομοιάζει με τον *Aspergillus flavus*, παράγει και τις τέσσερις κύριες αφλατοξίνες καθώς και κοδικό οξύ (Hedayati et al., 2007; Frisval et al., 2007; Baranyi et al., 2013).



**Εικόνα 11: Κονίδια του *aspergillus flavous* στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο<sup>15</sup>**

Η θερμοκρασία ανάπτυξης των ανωτέρω μυκήτων κυμαίνεται από 12 °C έως 48 °C με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C περίπου και ενεργότητα ύδατος  $a_w$  0.86 έως  $a_w$  0.96 ενώ η μεγαλύτερη παραγωγή αφλατοξίνης AFB1 έχει παρατηρηθεί σε θερμοκρασία 28°C και ενεργότητα ύδατος  $a_w$  0.96 (Hedayati et al., 2007; Bhat et al., 2010; Kumar et al., 2017). Άλλοι παράγοντες ανάπτυξης των μυκήτων εκτός από τη θερμοκρασία και ενεργότητα ύδατος είναι η υγρασία του περιβάλλοντος, το φως καθώς

<sup>15</sup>( <https://gr.pinterest.com/melyssafernanda/micologia/>)

γενικά οι μύκητες παράγουν περισσότερες τοξίνες απουσία φωτός, το διαθέσιμο οξυγόνο σε αναλογία 1% έως 2% τουλάχιστον, καθώς δεν μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς την παρουσία οξυγόνου, η τιμή του pH, ιδανικά όταν κυμαίνεται από pH 4.0 έως pH 4.6 και τέλος το φυτικής προέλευσης υποστρώμα έναντι των ζωικής προέλευσης υποστρωμάτων που είναι λιγότερο επικίνδυνα.

Η παρουσία επίσης διαφόρων χημικών ουσιών, όπως το NaCl, το sorβικό οξύ, η καφεΐνη, κ.ά. εμφανίζουν μυκοστατική δράση και εμποδίζουν επομένως την παραγωγή αφλατοξίνης αλλά και την ανάπτυξη του μύκητα. Επίσης, αιθέρια έλαια βοτάνων και μπαχαρικών, όπως το θυμάρι, το κύμινο, το αγριοκύμινο, το φασκόμηλο, η κανέλλα και το γαρύφαλλο αναφέρεται ότι εμποδίζουν την ανάπτυξη των μυκήτων (Βάσσοι, 2004; Μπαλατσούρας, 2006; Razzaghi- Abyaneh et al., 2011).

Επιπρόσθετα, η παραγωγή αφλατοξινών φαίνεται να αναστέλεται από την παρουσία οξεογαλακτικών βακτηρίων ή/ και ορισμένων μυκήτων. Το φαινόμενο αποδίδεται στον μικροβιακό ανταγωνισμό που αναπτύσσεται μεταξύ τους ως προς τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και συνεπώς την επιβίωσή τους (Ruiquian et al., 2005; Yin et al., 2008; Kumar et al., 2017).

### 3.3. Χημική δομή και ιδιότητες των αφλατοξινών

Η ομάδα των αφλατοξινών περιλαμβάνει 18 διαφορετικούς τύπους, εκ των οποίων τέσσερις είναι εκείνες που έχουν εκτενώς μελετηθεί λόγω της εξαιρετικής τους σπουδαιότητας για τη δημόσια υγεία και την υγεία των ζώων. Χαρακτηριστική ιδιότητα των ουσιών αυτών είναι ο έντονος φθορισμός τους υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας UV ( $\lambda=365\text{nm}$ ). Στην ιδιότητά τους αυτή βασίστηκε και η ονομασία τους, AFB1, AFB2 AFG1, AFG2, λόγω του χρώματος φθορισμού που παράγεται κατά την ανίχνευσή τους και συγκεκριμένα B για το μπλε φθορισμό blue ( $\lambda=425\text{nm}$ ) και G green για το πράσινο φθορισμό ( $\lambda=450\text{nm}$ ), ενώ οι δείκτες 1 και 2 αφορούν στις θέσεις που λαμβάνουν κατά τον διαχωρισμό τους στις πλάκες της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας TLC (Baranyi et al., 2013; Kumar et al., 2017).

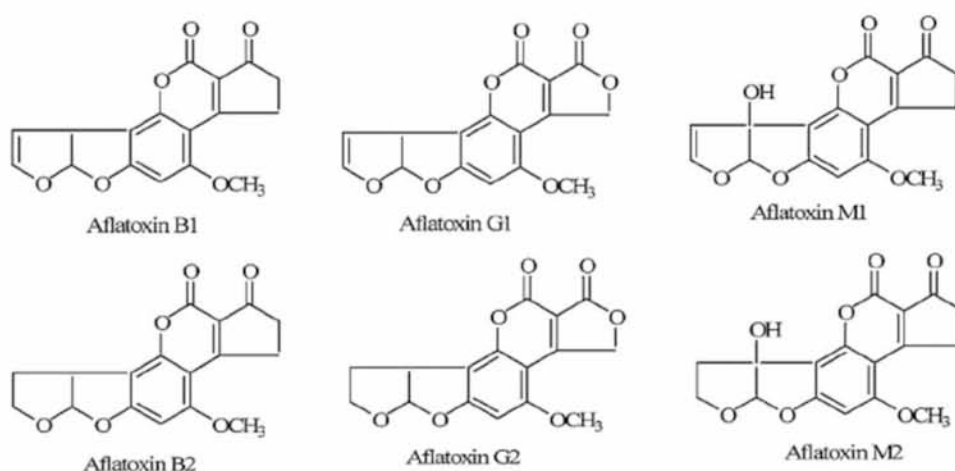
Με βάση τη χημική τους δομή οι τέσσερις κύριες αφλατοξίνες AFB1, AFB2 AFG1, AFG2 είναι φθορίζουσες ετεροκυκλικές ενώσεις, που κατατάσσονται στις διφουροκουμαρολακτόνες και είναι παράγωγα των διφουροκουμαρινών. Συγκεκριμένα στο μόριό τους περιλαμβάνεται ένας διφουρανικός δακτύλιος προσκολλημένος σ' έναν πυρήνα κουμαρίνης, με ένα δακτύλιο πεντόζης για τις B και M αφλατοξίνες ή σε έναν λακτονικό δακτύλιο για τις G αφλατοξίνες. (Dhanasekaran et al., 2011; Bdosa et al., 2013).

Οι M1 και M2 αφλατοξίνες είναι μεταβολίτες των B1 και B2 αφλατοξινών αντίστοιχα οι οποίες ανευρίσκονται στο γάλα (M=milk) ανθρώπων και ζώων που έχουν διατραφεί με επιμολυσμένες τροφές. Οι τοξίνες αυτές έχουν καταταχθεί στην κατηγορία 2B κατά IARC ως πιθανά καρκινογόνες για τον άνθρωπο (IARC, 2012).

Το χρώμα τους κυμαίνεται από υποκίτρινο έως κίτρινο, έχουν κρυσταλλική μορφή, είναι άοσμες και άγευστες και παρουσιάζουν φωτοευαισθησία. Στο νερό παρουσιάζουν πολύ

μικρή διαλυτότητα της τάξης των 10 έως 30  $\mu\text{g/mL}$ , παραμένουν αδιάλυτες σε μη πολικούς διαλύτες και ευδιάλυτες σε μέτριας πολικότητας οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, ακετόνη, ακετονιτρίλιο (IARC, 2012).

Η αποσύνθεση των αφλατοξινών πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών από  $237^{\circ}\text{C}$  έως  $306^{\circ}\text{C}$ , λόγω των υψηλών σημείων τήξης τους π.χ.: η B1 με σ.τ.  $\sim 269^{\circ}\text{C}$ , η B2 με σ.τ.  $\sim 286\text{--}289^{\circ}\text{C}$ , η M1 με σ.τ.  $299^{\circ}\text{C}$  (Iqbal et al., 2017), γεγονός που τους προσδίδει μεγάλη σταθερότητα κατά την επεξεργασία τους, ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως η UHT παστερίωση. Γι' αυτό και η παστερίωση δεν μπορεί να αποτρέψει την μόλυνση από την M1 αφλατοξίνη ενώ φυσικά είναι σταθερές σε θερμοκρασία ψύξης και κατάψυξης (Kumar et al., 2017).



**Εικόνα 12: Οι χημικοί τύποι των αφλατοξινών (Zhang et al., 2014)<sup>16</sup>**

Η επίδραση των οξειδωτικών μέσων, όπως το χλώριο, το υποχλωριώδες νάτριο, το υπερμαγγανικό κάλιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υπερβορικό νάτριο φαίνεται να αλλοιώνουν τα μόρια, γεγονός που καταδεικνύεται από την απώλεια της ικανότητας φθορισμού τους, ενώ η παρουσία του δακτυλίου λακτόνης καθιστά την ένωση ασταθή σε αλκαλική υδρόλυση. Επίσης, οι τοξίνες φαίνεται να αποσυντίθενται κατά την παραμονή τους σε μεθανολικό διάλυμα και η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την παρουσία φωτός ή θερμότητας (Dhanasekaran et al., 2011).

<sup>16</sup> *Military potential of biological toxins (PDF Download Available)*. Available from:

[https://www.researchgate.net/publication/262878341\\_Military\\_potential\\_of\\_biological\\_toxins](https://www.researchgate.net/publication/262878341_Military_potential_of_biological_toxins) [accessed Jul 3, 2017].

### 3.4. Ο μεταβολισμός των αφλατοξινών και η παραγωγή της AFM1

Οι αφλατοξίνες AFM1 και AFM2 είναι οι θερμοανθεκτικοί και υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες των κύριων αφλατοξινών AFB1 και AFB2 αντίστοιχα, που παράγονται από τα γαλακτοπαραγωγά ζώα, βοοειδή, πρόβατα, αίγες, βουβάλια, καμήλες, όταν εκείνα καταναλώσουν επιμολυσμένες ζωοτροφές (Rahimi, 2010; Frazzoli et al., 2017). Έτσι η AFM1 ανιχνεύεται στο γάλα και στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και στο κρέας ή στα αυγά των ωοπαραγωγικών ζώων. Έχει επίσης ανευρεθεί και στο γάλα θηλαζουσών γυναικών και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις, κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, λόγω διατροφικής έκθεσής τους σε αφλατοξίνες (Galvano et al., 1996; Battacone et al., 2003; Afsah – Hejri et al., 2013).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες αναφορές γίνονται για τη AFM1, η οποία ανευρίσκεται πιο συχνά στο γάλα και τα προϊόντα του και είναι πιο τοξική συγκρινόμενη με τη AFM2 (Κανίου-Grigoriadou et al., 2005) ενώ είναι κατά δέκα (10) φορές λιγότερο τοξική από τη μητρικής προέλευσης AFB1. Το 1993 οι AFM1 και AFM2, κατετάγησαν στην κατηγορία 2B ως πιθανά καρκινογόνες ουσίες για τον άνθρωπο από τον διεθνή οργανισμό έρευνας κατά του καρκίνου IARC (IARC, 2012).

Οι αφλατοξίνες ως εξαιρετικά λιποδιαλυτές ενώσεις απορροφώνται εύκολα από τον οργανισμό και μέσω της γαστρεντερικής οδού διέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος κι από εκεί διανέμονται στους διάφορους ιστούς και στο ήπαρ, που είναι το κύριο όργανο μεταβολισμού. Η βιομετατροπή λοιπόν της AFB1 στον κύριο μεταβολίτη της, την AFM1, λαμβάνει χώρα στο ήπαρ με τη δράση των ενζύμων του κυτοχρώματος CYP450, όπου υδροξυλιώνεται και τα προϊόντα του μεταβολισμού ανιχνεύονται στα ούρα, κόπρανα και αίμα.

Στον ανθρώπινο οργανισμό, στο ήπαρ, το κυτόχρωμα CYP450 εμφανίζεται με δυο κυρίαρχες ισομορφές ενζύμων, το CYP3A4 και CYP1A2, τα οποία καταλύουν την βιομετατροπή της AFB1. Εκτός από τον σχηματισμό της AFM1, έχουμε επίσης και το σχηματισμό ενδιάμεσων τοξικών εποξειδίων των *exo AFB1 8,9-epoxid* και *endo\_AFB1 8,9-epoxid* (Abdallah et al., 2015; Smith et al., 2017).

Το εποξείδιο *exo AFB1 8,9-epoxid*, που είναι και το περισσότερο τοξικό, δεσμεύεται στη συνέχεια από την αλβουμίνη του ορού του αίματος, δημιουργώντας σύμπλοκα AFB1-alb, που διασπείρονται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, επιδρώντας στις πρωτεΐνες του ήπατος και προκαλώντας οξεία αφλατοξίκωση (Kew, 2013; Peraica et al., 2014).

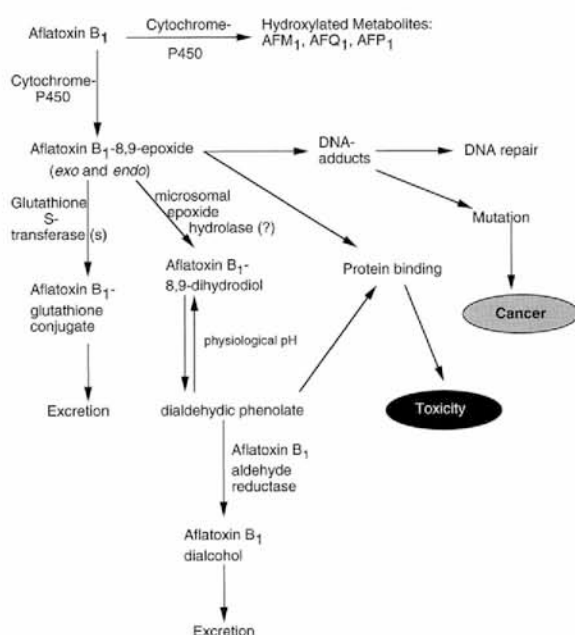
Αν και ο χρόνος ημίσειας ζωής του *exo AFB1 8,9-epoxide* σε υδατικό διάλυμα, υπολογίζεται μόλις στο 1 δευτερόλεπτο, είναι αρκετός για να επιδράσει στο DNA, προκαλώντας δομικές μεταλλάξεις σε διάφορα κωδικόνια του γονιδίου P53 και σχηματίζοντας σύμπλοκα (AFB1-N7-Gua), με τη μετάθεση της βάσης γουανίνης (G) σε θυμίνη (T) (Peraica et al., 2014).

Το γονίδιο P53, με την πρωτεΐνη που κωδικογραφεί, ελέγχει στον πυρήνα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στη φάση G1 καθώς και την έναρξη της σύνθεσης DNA. Επίσης, διεγείρει τη μεταγραφή του DNA σε αγγελιοφόρο RNA, ανταγωνίζεται



τα ογκογονίδια και την έναρξη της απόπτωσης. Οι μεταλλαγές στο P53 γονίδιο σε 30 τουλάχιστον διαφορετικά κωδικόνια συσχετίζονται με την ανάπτυξη διαφόρων όγκων (Vasilieva and Durakis, 2015).

Η εποξειδωση της AFB1 σε AFM1 και στα *AFB1\_8,9-epoxides*, αποτελεί το κρίσιμο σημείο στο μονοπάτι της γονοτοξικής καρκινογένεσης. Τα σύμπλοκα αυτά AFB1-alb και AFB1-N7-Gua αποτελούν αξιόπιστους βιοδείκτες χρόνιας έκθεσης σε αφλατοξίνες (Kew, 2013; Peraica et.al., 2014).



**Εικόνα 13: Το μονοπάτι της βιομετατροπής της AFB1 στον οργανισμό (Campagnollo et al., 2016)**

Η ανίχνευση των μεταβολιτών στα ούρα υποδηλώνουν πρόσφατη διατροφική έκθεση 1 έως 2 ημερών, ενώ η ανίχνευση του συμπλόκου AFB1-alb στο αίμα, υποδηλώνει μακροχρόνια διατροφική έκθεση μεγαλύτερη των 2 έως 3 μηνών (Lizárraga-Paulín et al., 2011; Smith et al., 2017). Τα εποξείδια πριν την ουρική απέκκριση μπορούν να αποτοξινωθούν από S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης \_GST σε άλλα σύμπλοκα. Επίσης μπορούν αρχικώς να υδρολυθούν ενζυματικά και στη συνέχεια να αποτοξινωθούν σε AFB1\_dialcohol (Smith et al., 2017).

Στα ζώα, η AFM1 μέσω της αιματικής κυκλοφορίας φτάνει στο μαστό και απεκκρίνεται στο γάλα, αλλά ανιχνεύεται επίσης στα ούρα και στα κόπρανα, όπως και στον άνθρωπο. Σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύονται κι άλλοι ενδιάμεσοι μεταβολίτες λιγότερο τοξικοί, όπως οι AFQ1, AFP1 και η αφλατοξικόλη (Bbosa et al., 2013; Afsah – Hejri et al., 2013). Στον οργανισμό των ζώων, η απορρόφηση και βιομετατροπή της AFB1 σε AFM1, επιτυγχάνεται εντός 12 έως 24 ωρών από τη λήψη της επιμολυσμένης

ζωοτροφής (Diaz et al., 2004; Campagnollo et al., 2016). Ακόμη και έξι (6) ώρες μετά την πρόσληψη της τροφής, υπολείμματα της AFB1 μπορεί ν' ανιχνεύονται στο γάλα και τα υψηλότερα επίπεδα της συγκέντρωσής της επιτυγχάνονται εντός τριών ημερών (Prandini et al., 2008).

Όταν η πρόσληψη της AFB1 διακοπεί, η συγκέντρωση της AFB1 μειώνεται σ' ένα μη ανιχνεύσιμο επίπεδο μετά από 72 ώρες, αλλά εξακολουθεί να υφίσταται στο γάλα αγελάδας έως και 6 ημέρες συνολικά, ενώ στο πρόβειο γάλα έως 4 ημέρες (Battacone et al., 2003; Lizárraga-Paulín et al., 2011). Υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ προσλαμβανόμενης ποσότητας AFB1 και βιομετατροπής της σε AFM1 στο ήπαρ (Dragacci et al., 1995).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον βαθμό βιομετατροπής της AFB1 σε AFM1 στον οργανισμό των ζώων και της παρουσίας της στο γάλα, είναι μεταξύ άλλων:

α) η φυλή του ζώου

β) το είδος της διατροφής, η αρχική συγκέντρωση της AFB1 στο σιτηρέσιο και η διάρκεια κατανάλωσης των επιμολυσμένων ζωοτροφών (Prandini et al., 2008)

γ) η υγεία του ζώου π.χ. η ύπαρξη παθολογικών καταστάσεων, όπως η μαστίτιδα

δ) εποχικοί και γεωμορφολογικοί παράγοντες, καθώς η επιμόλυνση του γάλακτος με AFB1 παρουσιάζει έντονη εποχιακή διακύμανση, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όπου τα ζώα ενσταβλίζονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και η διατροφή τους βασίζεται ως επί το πλείστον σε συμπυκνωμένου τύπου ζωοτροφές, οι οποίες έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να προσβληθούν από μύκητες είτε στη φάση παραγωγής τους είτε στη φάση αποθήκευσής τους (Celik et al., 2005).

ε) ατομικοί παράγοντες του ζώου, όπως ο ρυθμός κατανάλωσης της τροφής, ο ρυθμός πέψης, η ημερήσια παραγωγή γάλακτος, οι αλμέξεις, η φάση της γαλακτικής περιόδου, όπου παρατηρείται η έκκριση της AFM1 να είναι μεγαλύτερη κατά 3 έως 3.5 φορές στην αρχή της περιόδου κ.α. (Prandini et al., 2008). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν διακυμάνσεις στην παρουσία της AFM1, ακόμη και εντός της ίδιας αγέλης (Martins and Martins, 2000; Lizárraga-Paulín et al., 2011).

Ποσοστό της τάξης του 0,3% έως 6,2% της AFB1 που προσλαμβάνεται από τα μηρυκαστικά, μετατρέπεται σε AFM1 και εκκρίνεται στο γάλα (Cserpy, 2002). Η εκτιμώμενη αναλογία μετατροπής μεταξύ AFB1 και AFM1 στις αγελάδες υπολογίζεται στο 1% έως 3% (Lizárraga-Paulín et al., 2011). Σε ότι αφορά τα πρόβατα, φαίνεται ότι το ποσοστό της AFB1 που απεκκρίνεται στο γάλα ως AFM1, είναι μικρότερο συγκριτικά με τα βοοειδή και τις αίγες (Battacone et al., 2003).

### **3.5. Η τοξικότητα των αφλατοξινών**

Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, που τεκμηριώνουν την τοξική δράση των αφλατοξινών για τον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και των οργανισμό των ζώων. Όλες οι αφλατοξίνες θεωρούνται εξαιρετικά τοξικές ουσίες με μεταλλαξιογόνο,

τερατογόνο, γονοτοξική και καρκινογόνο δράση για τον οργανισμό των ζώων και των ανθρώπων (Prandini et al., 2008). Μελέτες έδειξαν ότι έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον πλακούντα, προκαλώντας αρνητικές επιπτώσεις στο έμβρυο (Bbosa et al., 2013).

Όλες οι αφλατοξίνες μεταβολίζονται στο ήπαρ, που αποτελεί και το όργανο που επηρεάζεται περισσότερο στον οργανισμό, επιδρούν όμως βλαπτικά και σε άλλα όργανα όπως οι νεφροί, η καρδιά, οι πνεύμονες κ.α. Ειδικά η AFB1 επάγει τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, ενώ ο μεταβολίτης της η AFM1, παρουσιάζει κυρίως μεταλλαξιογόνο και γονοτοξική δράση, λόγω της ικανότητάς της να επιδρά στο DNA, γι' αυτό και έχει καταταχθεί στην κατηγορία 2B κατά IARC, ως πιθανά καρκινογόνος ουσία για τον ανθρώπινο οργανισμό (IARC, 2012). Η αφλατοξίκωση στον άνθρωπο και τα ζώα, μπορεί να εμφανιστεί είτε με τη μορφή της οξείας αφλατοξίκωσης είτε με τη μορφή της χρόνιας αφλατοξίκωσης.

Η AFB1 έχει ενοχοποιηθεί για τερατογόνο δράση σε διάφορα είδη ζώων, διότι παρεμποδίζει τη σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών κυττάρων, γεγονός που συμβάλλει στη διαταραχή της διαφοροποίησης των ευαίσθητων αρχέγονων κυττάρων (Labbe and Garcia, 2001).

Από μελέτες φαίνεται ότι μια από τις κυτταροτοξικές επιδράσεις των αφλατοξινών αναφέρεται στην πρωτεϊνοσύνθεση, μέσω της επίδρασής τους στο RNA και DNA των οργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, η δημιουργία συμπλόκου της AFB1 με το t-RNA, αναστέλλουν τη δέσμευση των απαραίτητων αμινοξέων όπως λυσίνη, αργινίνη, λευκίνη, παρεμβαίνοντας στη διεργασία της μεταγραφής του κώδικα για τον σχηματισμό του αγγελιαφόρου m-RNA και στη διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αυτό προκαλεί αλυσιδωτές διαταραχές στις δομικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα, τα οποία είναι απαραίτητα για τον ενεργειακό μεταβολισμό και το μεταβολισμό του λίπους. Εν συνεχεία, η διαταραχή της μείωσης των ενζύμων συμβάλλει σε έναν μειωμένο σχηματισμό δομικών πρωτεϊνών, σε ακατάλληλο σχηματισμό αντισωμάτων, στη μείωση της πέψης του λίπους, σε νέκρωση και μη ολοκληρωμένη σύνθεση θρομβοποιητικών παραγόντων, προκαλώντας εν τέλει μια συστημική βλάβη στον οργανισμό των ζώων (Osweiler, 1996, Dhanasekaran et al., 2011).

Κατά τη βιομετατροπή της AFB1 προς AFM1 στον οργανισμό, παράγεται ένας ενδιάμεσος μεταβολίτης, εξαιρετικά τοξικός, το εποξειδίο AFB1<sub>8,9</sub>-epoxide. Το AFB1<sub>8,9</sub>- εποξειδίο έχει την ικανότητα να συνδέεται ομοιοπολικά με την αλβουμίνη του ορού σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης λυσίνης. Επίσης μπορεί να συνδεθεί με το DNA σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης AFB-N7-γουανίνης. Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί τον πρόδρομο των μεταλλάξεων που προκαλούνται από τις αφλατοξίνες και που επάγουν την καρκινογένεση του ήπατος. Η εποξειδωση της AFB1 σε AFB1<sub>8,9</sub>-epoxide αποτελεί το κρίσιμο σημείο στο μονοπάτι της γονοτοξικής καρκινογένεσης. (Groopman and Kensler, 2005).

Σε αντίθεση με την πρόδρομή της, η AFM1 έχει άμεση τοξική δράση, χωρίς να απαιτείται ο μεταβολισμός της σε άλλες ενδιάμεσες τοξικές ενώσεις. Προκαλεί ηπατοτοξικότητα, ηπατοκαρκινογέννηση, βλάβες στο DNA, γονιδιακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές ανωμαλίες και κυτταρικό μετασχηματισμό σε κύτταρα θηλαστικών in

vitro, σε έντομα, κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα και βακτήρια, η τοξικότητά της όμως είναι χαμηλότερη από αυτή της AFB1 (Dragacci et al., 1995, Frazzoli et al., 2017). Άλλοι λιγότερο τοξικοί ενδιάμεσοι μεταβολίτες της AFB1 είναι η AFQ1, η AFP1 και η αφλατοξικόλη, που απεκκρίνονται με το γάλα αλλά σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με την AFM1 (Helferich et al., 1986; Bbosa et al., 2013; Afsah – Hejri et al., 2013).

Η αφλατοξικόλη, εκτός από τη συνήθη τοξική της δράση, βρέθηκε ότι δεσμεύει σε πολύ μικρό ποσοστό τους υποδοχείς οιστρογόνων στη μήτρα (Blankenship et al., 1982). Η τοξικότητα της έχει κάπως αγνοηθεί δεδομένου ότι δεν συμπεριλαμβάνεται στην επιστημονική γνωμοδότηση της EFSA για τις αφλατοξίνες στις ζωοτροφές. Ωστόσο είναι ύποπτο ότι αυτός ο μεταβολίτης αποτελεί ενδογενή δεξαμενή της AFB1 στον οργανισμό. Πράγματι στα πουλερικά η αφλατοξικόλη αποτελεί το κύριο συστατικό των καταλοίπων αφλατοξινών που εντοπίζονται, ενώ η μεγαλύτερη περιεκτικότητα αυτής ανιχνεύεται στο ήπαρ (Frazzoli et al., 2017).

### **3.6. Η επίδραση στην υγεία των ζώων**

Σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα των αφλατοξινών για την υγεία των ζώων αποτελούν οι εξής παράγοντες: το είδος του ζώου, η ηλικία και το φύλο του, η συνολική θρεπτική του κατάσταση, η συγκέντρωση της δόσης και η συχνότητα πρόσληψης της επιμολυσμένης τροφής (Diekman and Green, 1992; Hui et al., 2001; Osweiler, 2005). Τα μονογαστρικά ζώα, όπως τα πτηνά και οι χοίροι, είναι πιο ευπαθή στη βλαβερή επίδραση των αφλατοξινών έναντι των μηρυκαστικών (βοοειδή, πρόβατα, αίγες), διότι το στομάχι τους στερείται της μικροβιακής χλωρίδας που διαθέτει η μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών. Τα μηρυκαστικά λοιπόν έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν την AFB1 στον λιγότερο καρκινογενή μεταβολίτη της δηλαδή την AFM1 (Afsah – Hejri et al., 2013).

Έχει αναφερθεί ότι ενίσχυση του διατροφολογίου των ζώων με θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνη, σελήνιο και βιταμίνη E, αυξάνουν την αντίσταση τους στις αφλατοξίνες (Osweiler, 2005; Bryden, 2011), ενώ πολλές άλλες ουσίες, όπως η γκοσυπόλη και η 3-μεθυλοκουμαρίνη, εμφανίζουν συνεργική δράση με αυτές ως προς την καρκινογένεση (Weidenborner, 2001).

Η μέση θανατηφόρος δόση LD<sub>50</sub> της AFB1 για τα περισσότερα ζώα έχει υπολογιστεί στα 0.3 mg/kg έως 18 mg/kg με σειρά κατάταξης ως προς την ευπάθεια τα πτηνά, όπως πάπιες, γαλοπούλες, κοτόπουλα, και τα ψάρια, ενώ στα οικόσιτα ζώα εμφανίζεται η εξής κατάταξη: σκυλιά, χοίροι, βοοειδή, πρόβατα. Φυσικά τα ενήλικα ζώα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση έναντι των νεαρών (Abdallah et al., 2015).

Το σύνδρομο της αφλατοξίκωσης έπεται από χρόνια έκθεση των ζώων στις αφλατοξίνες παρουσιάζει διάφορα κλινικά συμπτώματα, όπως η πρόκληση ανοσοκαταστολής, που σχετίζεται με την παρεμβολή των αφλατοξινών στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και των θρεπτικών συστατικών που είναι κρίσιμης σημασίας για την καλή υγεία των ζώων, βλάβη στους πνεύμονες, βλάβες στο συκώτι, μεταλλάξεις και γενικότερα γενετικού

τύπου ανωμαλίες, μείωση πρόσληψης της τροφής ή/και ανορεξία με συνεπαγόμενη την απώλεια βάρους και μείωση της παραγωγής τους (γάλα, αυγά). Τέλος το σύνδρομο μπορεί να χαρακτηρίζεται από εμετούς, κοιλιακό άλγος, πνευμονικό οίδημα, σπασμούς και κώμα (Bbosa et al., 2013).

Σε υψηλά επίπεδα έκθεσης, οι αφλατοξίνες μπορούν να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα και ενδεχομένως το θάνατο σε ευαίσθητα θηλαστικά, πτηνά και ψάρια. Ορισμένα από τα συμπτώματα από την οξεία αφλατοξίκωση των ζώων που έχουν αναφερθεί είναι: ανορεξία, κατάθλιψη, δραματική μείωση της παραγωγής γάλακτος, απώλεια βάρους, λήθαργος, γαστρεντερικές δυσλειτουργίες όπως διάρροια με αίμα, εμετούς, εμφάνιση ασκίτη, ίκτερος, αιμορραγίες, αποβολές, φωτοευαισθησία, τύφλωση, κ.α. (Osweiler, 2005; Bbosa et al., 2013).

Συμπερασματικά, η AFB1 είναι εξαιρετικά δραστική ηπατοτοξίνη, ικανή να εκδηλώνει μία ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως η καρκινογενετικότητα, η τερατογόνος δράση και η μεταλλαξιογόνος ικανότητα για διάφορα αγροτικά ζώα. Η AFM1 θεωρείται πως είναι περίπου 10 φορές λιγότερο καρκινογόνος από την AFB1, έχει όμως ισχυρή γενοτοξική δράση (Applebaum et al., 1982).

### **3.7. Η παρουσία της αφλατοξίνης M1 στο γάλα και στα προϊόντα του**

Το γάλα και τα προϊόντα του αποτελούν βασικό κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου, λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας του, και καθημερινά πρέπει να προσλαμβάνει αρκετές μερίδες γαλακτοκομικών στο πλαίσιο μιας ισορροπημένης διατροφής. Η παρουσία λοιπόν της AFM1 στα τρόφιμα, εγείρει σημαντικά ζητήματα δημόσιας υγείας, ειδικά για την ευπαθή κατηγορία των παιδιών. Λόγω της εξαιρετικής αντοχής που παρουσιάζει η AFM1 κατά τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος, παστερίωση, αποστείρωση, κονιοποίηση (150ο C) και στις τεχνολογίες παρασκευής, εντοπίζεται συχνά σε διάφορα προϊόντα ευρείας κατανάλωσης.

Από τα γαλακτοκομικά προϊόντα τα τυριά αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή πρόσληψης αφλατοξινών για τον άνθρωπο. Κατά την τυροκόμηση του γάλακτος προκύπτουν δύο φάσεις, το τυρόπηγμα και το τυρόγαλα. Το τυρόπηγμα αποτελεί περίπου το 10% έως 25% του αρχικού βάρους του γάλακτος και το υπόλοιπο 75% με 90% είναι το τυρόγαλα. Στο τυρί που παρασκευάζεται από επιμολυσμένο γάλα, η AFM1, συνδέεται με τις κ-καζεΐνες του γάλακτος με υδροφοβικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται στο τελικό προϊόν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ό,τι στην αρχική πρώτη ύλη (Frazzoli et al., 2017).

Η συγκέντρωση της AFM1 που κατανέμεται μεταξύ τυροπήγματος και τυρογάλακτος παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση. Η διακύμανση αυτή μπορεί να οφείλεται στο είδος του γάλακτος, τον τύπο του τυριού, την περιεκτικότητα του σε νερό, στην τεχνολογία παρασκευής του τυριού (Govaris, 2009; Iha et al., 2013), και για αυτούς τους λόγους η παρουσία της τοξίνης φαίνεται να είναι 3 φορές μεγαλύτερη στα μαλακά τυριά και κατά 5 φορές μεγαλύτερη στα σκληρά τυριά (Govaris, 2009; Dhanasekaran et al., 2011). Το

αξιοπερίεργο αναφορικά με την AFM1 είναι το γεγονός ότι η συγκεκριμένη ουσία είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτή, κι ως εκ τούτου θα έπρεπε να κατανέμεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο τυρόγαλα κι όχι στο τυρόπηγμα, όπως συμβαίνει. Η διανομή της AFM1 στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα κυμαίνεται περίπου ως εξής 40-60% στο τυρί, 10% στο λίπος βουτύρου και λιγότερο από 2% στο βουτυρόγαλα ( Lizarraga- Paulín et al., 2011; Campagnollo et al., 2016).

Η κατάσταση φαίνεται να είναι διαφορετική για τα τυριά τυρογάλακτος λόγω της τεχνολογίας παρασκευής τους, που περιλαμβάνει θέρμανση με ταυτόχρονη οξύνιση του μείγματος που οδηγεί σε μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος και αδυναμία συγκράτησης της AFM1 (Barbiroli et al., 2007).

Για το τυρί τελεμές οι Govaris και συν. (2001) ανακάλυψαν ότι η συγκέντρωση της AFM1 ήταν υψηλότερη στην αρχή, παρά στο τέλος της περιόδου παραγωγής του. Γενικά πιστεύεται ότι η συγκέντρωση της AFM1 στο τυρί ποικίλλει και εξαρτάται από τον τύπο του τυριού, το περιεχόμενο νερό και την τεχνολογία παραγωγής του (Bakirci, 2001; Lopez et al., 2001), έτσι στα τυριά ωρίμανσης η παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων λόγω οξείδωσης φαίνεται να συμβάλει στην απελευθέρωση της AFM1 σε αντίθεση με τα τυριά άλμης, όπως η φέτα, στα οποία είναι σχετικά σταθερή (Govaris, 2009).

Έρευνες έδειξαν ότι υπάρχει μία σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της AFM1 σε ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το κεφίρ και το γιαούρτι. Μετά από τη διαδικασία ζύμωσης αγελαδινού γάλακτος η AFM1 μειώθηκε σε ποσοστό 17% έως 22% σε σχέση με το αρχικό ποσοστό. Η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων, η παραγωγή γαλακτικού οξέος και άλλων παραπροϊόντων της ζύμωσης, φαίνεται να επηρεάζει την σταθερότητα της AFM1 στα ζυμούμενα προϊόντα (Govaris et al., 2002).

Οι Roussi et al., (2002) σε έρευνα που διεξήγαγαν στην Ελλάδα την περίοδο 2000-2001, ανέλυσαν 297 δείγματα παστεριωμένου, συμπυκνωμένου και UHT γάλακτος του εμπορίου καθώς και δείγματα νωπού αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, η συχνότητα εμφάνισης της AFM1 στα νωπά δείγματα πρόβειου και αίγειου γάλακτος, που ελήφθησαν από διαφορετικούς παραγωγούς γάλακτος ήταν 73,3% και 76,7% αντίστοιχα με ποσοστό 1,79% να ξεπερνά το νομοθετικό όριο.

Οι Kaniou-Grigoriadou et al., σε έρευνά τους το 2005, πραγματοποίησαν έλεγχο για την παρουσία AFM1 σε 162 συνολικά δείγματα πρόβειου γάλακτος και τυριού, εκ των οποίων τα 54 ήταν τυρί φέτα, που παρασκευάστηκε με τον παραδοσιακό τρόπο σε τυροκομεία της περιοχής Θεσσαλονίκης. Μετά την πάροδο δύο μηνών ωρίμανσης της φέτας και κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, δεν ανιχνεύθηκε αφλατοξίνη σε κανένα δείγμα τυριών που εξετάστηκαν πάνω του επιτρεπτού ορίου.

Στον ελλαδικό χώρο πρόσφατη έρευνα των Tsakiris et al., 2013 στη Βόρειο Ελλάδα ανέλυσε 196 συνολικά δείγματα φρέσκου εμπορικού γάλακτος για παιδιά ηλικίας μεγαλύτερης των 12 μηνών και UHT γάλακτος συμβατικής και βιολογικής προέλευσης από διάφορα σημεία της αγοράς. Στο 46.5% των δειγμάτων (91 δείγματα) ανιχνεύτηκε η AFM1 με μέση τιμή 10ng/l, ενώ μόνο 2 δείγματα υπερέβαιναν το όριο των 50 ng/l.



Αντίστοιχη έρευνα των Malissiova et al., 2013 στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, εξέτασε 234 δείγματα αιγοπρόβειου νοπού γάλακτος συμβατικής και βιολογικής εκτροφής για AFM1, εκ των οποίων μόνο 4 δείγματα (1,7%) εντοπίστηκε να υπερβαίνουν το όριο των 50 ng/l σε AFM1.

Επίσης οι Virdis et al., (2008) σε έρευνά τους μελέτησαν τη συγκέντρωση της AFM1 σε 41 δείγματα ώριμου σκληρού αίγειου τυριού που συνέλεξαν από 12 εργοστάσια της Σαρδηνίας στην Ιταλία. Η AFM1 ανιχνεύτηκε στα 4 από τα 41 δείγματα, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 9,8% επί του συνόλου, ενώ η συγκέντρωσή της κυμάνθηκε από 79,5 ng/kg έως 389 ng/kg. Το τελικό συμπέρασμα της συγκεκριμένης έρευνας ήταν ότι στα τυριά που παρασκευάστηκαν από γάλα ζώων εκτατικής εκτροφής δεν ανιχνεύθηκε AFM1, αντίθετα σε τυριά προερχόμενα από γάλα ζώων εντατικής εκτροφής εμφανίστηκαν θετικά δείγματα.

Σε έρευνα των Panahi et al., 2011 σε 100 δείγματα νοπού αγελαδινού γάλακτος που συλλέχθηκαν τυχαία από φάρμες στην περιοχή Urmia του Ιράν, ανιχνεύτηκε η αφλατοξίνη AFM1 και στα 100 δείγματα σε συγκεντρώσεις κατά πολύ υψηλότερες των θεσπισμένων ορίων (60 - 90 ng/l).

Στην Ιταλία σε έρευνα των Bellio et al., 2016, στο πλαίσιο επίσημου ελέγχου, συλλέχθηκαν 1668 δείγματα γάλακτος κατά την περίοδο 2012-2014 από περιοχές της βορειοδυτικής Ιταλίας, απ' τα οποία τα 36 (2.2%) βρέθηκαν θετικά για AFM1, εκ των οποίων μόνο 8 (0.5%) βρέθηκαν να ξεπερνούν τα νομοθετικά όρια, και με εύρος συγκέντρωσης μεταξύ  $74 \pm 10$  έως  $208 \pm 27$  ppt.

Στην Σερβία το 2009 σε έρευνα των Polovinski - Horvatovic et al., 2009 το 30.4% των δειγμάτων γάλακτος που συλλέχθηκαν από μικρές φάρμες εντοπίστηκαν επιμολυσμένα με AFM1 σε ποσοστά που ξεπερνούν το θεσμοθετημένο όριο. Ομοίως οι Torkar and Vengust (2007) στη Σλοβενία ανίχνευσαν τη AFM1 σε ανώτερο ποσοστό από το επιτρεπόμενο όριο της Ε.Ε. στο 10% των συνολικών δειγμάτων τους (Kocsu et al., 2013).

Επομένως, είναι έκδηλο ότι το πρόβλημα της παρουσίας AFM1 στα τρόφιμα παρουσιάζει διεθνείς διαστάσεις, παραμένει επίκαιρο και αποτελεί ζήτημα δημόσιας υγείας όχι μόνο για τις «ενδημικές» περιοχές, όπως οι χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της Μεσογείου, αλλά πλέον και για χώρες της Κεντρικής Ευρώπης γεγονός που αποδίδεται στην κλιματική αλλαγή.

Ενώ υπάρχουν πολλές μελέτες και συνεχώς διεξάγονται νέες, αναφορικά με την παρουσία της AFM1 στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα, δυστυχώς είναι λιγότερες οι μελέτες που αφορούν σε άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως τα αυγά και το κρέας (Dhanasekaran et al., 2011; Afsah – Hejri et al., 2013). Οι όρνιθες ως μονογαστρικά ζώα είναι πιο ευπαθείς στη βλαβερή επίδραση των αφλατοξινών, αφενός διότι το στομάχι τους στερείται της μικροβιακής χλωρίδας που διαθέτει η κοιλία των μηρυκαστικών και αφετέρου διότι οι δημητριακοί καρποί αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της βασικής διατροφής τους και συνεπώς είναι περισσότερο εκτεθειμένες σε επιμολυσμένες ζωοτροφές.

Τα μηρυκαστικά έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν την AFB1 στον λιγότερο καρκινογενή μεταβολίτη που είναι η AFM1. Η βιομετατροπή της AFB1 σε άλλους μεταβολίτες γίνεται απευθείας στο ήπαρ της όρνιθας και έτσι μεταφέρεται στ' αυγά (Afsah – Hejri et al., 2013). Σε σχετικά πρόσφατη έρευνα του Herzallah, 2009 που έγινε στην Ιορδανία σε 80 δείγματα κρέατος και 40 δείγματα αυγών, η AFM1 ανιχνεύτηκε στα προϊόντα αυτά και σε ποσοστά 30% και 20% αντίστοιχα με τιμές συγκέντρωσης μεταξύ 0,031 µg/Kg και 0,828 µg/Kg.

### **3.8. Η επίδραση των αφλατοξινών στην υγεία του ανθρώπου**

Υπολογίζεται ότι 0.5 δισεκατομμύριο άνθρωποι, κυρίως εκείνοι που ζούνε σε αναπτυσσόμενες χώρες, διατρέχουν σημαντικό κίνδυνο έκθεσης στις αφλατοξίνες μέσω της διατροφής με πολλούς από αυτούς να βρίσκονται σε χρόνια έκθεση (Smith et al., 2017). Η κατανάλωση από τον άνθρωπο τροφίμων επιμολυσμένων με αφλατοξίνες έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση αφλατοξίκωσης, η οποία παρουσιάζεται με 2 κλινικές μορφές: α) την οξεία αφλατοξίκωση, μια σοβαρή δηλητηρίαση που μπορεί να καταλήξει και στο θάνατο, ενώ τα συνήθη συμπτώματα περιλαμβάνουν ηπατοτοξικότητα, έντονο κοιλιακό άλγος, εμετό, ίκτερο, κατάρπτωση, ανορεξία β) τη χρόνια αφλατοξίκωση που χαρακτηρίζεται από ανοσοκαταστολή, ανορεξία, χαμηλό πυρετό, κακή θρεπτική κατάσταση, αναιμία, γονιδιακές μεταλλάξεις που επάγουν την πρόκληση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Peraica et al., 2014; Udomkun et al., 2017).

Η πρόσληψη αφλατοξινών μέσω της διατροφής έχει συσχετισθεί επίσης με το σύνδρομο Reye που παρουσιάζεται με συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας και εκφυλισμού των λιπών στα παιδιά καθώς και με τη νόσο Kwashiorkor που εμφανίζεται κυρίως στα παιδιά της Αφρικής (Udomkun et al., 2017). Παρόλο που η νόσος αυτή αποδίδεται συνήθως στον υποσιτισμό και τις διατροφικές ελλείψεις που υφίστανται τα άτομα αυτά, έχει συσχετιστεί και με την πρόσληψη αφλατοξίνης μέσω της διατροφής (Hendrickse et al., 1982), διότι η προκαλούμενη καταστροφή του ήπατος από τις αφλατοξίνες καθιστά τα παιδιά αυτά λιγότερο ικανά να αφομοιώνουν τα πρωτεϊνούχα γεύματα, που συνήθως συνιστώνται στο πλαίσιο της θεραπείας τους (Newell, 1983; Jalili and Scotter, 2015).

Τα παιδιά που εκτίθενται σε αφλατοξίνες είναι καχεκτικά, ελλειποβαρή και πιο επιρρεπή σε μολυσματικές ασθένειες τόσο στην παιδική ηλικία όσο και στη μετέπειτα ζωή τους (Jalili and Scotter, 2015). Παρουσιάζουν επίσης προβλήματα ανάπτυξης και αναιμία (Smith et al., 2017).

Έχει υπολογιστεί ότι οι αφλατοξίνες αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα σε περισσότερο από το 30% των καρκίνων του ήπατος σε παγκόσμια κλίμακα ανά έτος (WHO, 2014; Gizachew et al., 2016). Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) αποτελεί την 5<sup>η</sup> πιο συχνή/κοινή εκδήλωση καρκινώματος στους άνδρες και την 7<sup>η</sup> για τις γυναίκες παγκοσμίως (Wu and Santella, 2012).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τις περισσότερες μυκοτοξίνες δεν υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα για καρκινογένεση στους ανθρώπους, ωστόσο για την αφλατοξίνη AFB1 υπάρχουν ικανά αποδεικτικά στοιχεία που τη συσχετίζουν με το

ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) (Peraica et al., 2014). Παράγοντες που προδιαθέτουν την ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος αποτελούν η κίρρωση του ήπατος ανεξαρτήτως αιτιολογίας, η χρόνια λοίμωξη από τους ιούς ηπατίτιδας B, C και D (HBV, HCV, HDV), η έκθεση σε καρκινογόνα με κυριότερο εκπρόσωπο την αφλατοξίνη B1, το ανδρικό φύλο, το αλκοόλ, το κάπνισμα, το αυξημένο σωματικό βάρος και η γενετική προδιάθεση (Wu and Santella, 2012; Dimitropoulou et al., 2011).

Η γεωγραφική κατανομή των ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) συσχετίζεται με τον επιπολασμό της χρόνιας ηπατίτιδας B (HBV) στην ίδια περιοχή. Τέτοιες περιοχές είναι η Ασία, η Κίνα, η υποσαχάρια Αφρική (χώρες με επιπολασμό του HBsAg 10–15%), καθώς στις χώρες αυτές επίσης έχουν καταγραφεί και πολλά περιστατικά αφλατοξίκωσης. Το σύμπλοκο με το DNA (AFB1-N7-Gua), που δημιουργείται κατά τον μεταβολισμό των αφλατοξινών στον οργανισμό, θεωρείται υπεύθυνο για τις μεταλλάξεις του γονιδίου P53, γεγονός που επάγεται την ανάπτυξη όγκων, όπως προαναφέρθηκε. Μελέτες του γονιδίου P53 σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεΐνης κατέδειξε ανώμαλη δομή και έκφρασή του σε κυτταρικές σειρές με ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) (Vasilieva and Durakis, 2015).

Τροποποιημένη έκφραση του γονιδίου P53 διαπιστώθηκε σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) από την Κίνα και τη Νότια Αφρική, που η έκθεση στον HBV και στην αφλατοξίνη AFB1 θεωρούνται παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC). Η μεταλλαγή αυτή δεν παρατηρήθηκε σε ηπατοκυτταρικούς καρκίνους (HCC) που προέρχονται από άλλες γεωγραφικές περιοχές (Vasilieva and Durakis, 2015).

Ομοίως, σε μελέτη που διεξήχθη στην Ταϊβάν και Γκάμπια σε ασθενείς, παιδιά και εφήβους χρόνιους φορείς της ηπατίτιδας HBV, ανευρέθησαν υψηλές συγκεντρώσεις του συμπλόκου DNA (AFB1-N7-Gua) και μεταλλάξεις στη σειρά 249 του γονιδίου P53 της τάξης του 36.3% έως 66%. Ο σχετικός κίνδυνος (RR) μεταξύ των δυο αιτιολογικών παραγόντων ήταν πολύ υψηλός, που αποδεικνύει την υψηλή συσχέτισή τους (Kew, 2013). Σε μια ποσοτική αξιολόγηση κινδύνου για τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) σε παγκόσμιο επίπεδο, η συνεισφορά των αφλατοξινών ως αιτιολογικού παράγοντα υπολογίστηκε στο 4.6–28.2% (Wu and Santella, 2012).

Μελέτες κατέδειξαν ακόμη ότι οι αφλατοξίνες έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον πλακούντα, προκαλώντας αρνητικές επιπτώσεις στο έμβρυο (Bbosa et al., 2013). Αυτό σημαίνει ότι η υγεία του εμβρύου μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από την έκθεση σε αφλατοξίνες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με δυσμενή έκβαση, όπως ενδομήτριο, περιορισμό ανάπτυξης, πρόωρο τοκετό, αποβολές, κ.α. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ζήτημα δημόσιας υγείας ειδικά εάν ληφθεί υπόψη ότι κάθε χρόνο σε παγκόσμιο επίπεδο καταγράφονται 2.650.000 βρεφικοί θάνατοι και 15 εκατομμύρια πρόωροι τοκετοί. Οι τεκμηριωμένοι παράγοντες κινδύνου για τη δυσμενή έκβαση των γεννήσεων, όπως προχωρημένη ηλικία μητέρας, κάπνισμα, μόλυνση μητέρας, δεν δικαιολογούν το μεγάλο ποσοστό των απωλειών αυτών (Smith et al., 2017).

Υπολογίζεται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 0.43% των αφλατοξινών που καταναλώνονται μέσω της διατροφής, εκκρίνεται στο μητρικό γάλα γεγονός που αποτελεί σοβαρό ζήτημα δημόσιας υγείας αναφορικά με την εξέλιξη της υγείας των βρεφών. Το πρόβλημα όπως έχει καταγραφεί είναι πιο έντονο στις υποανάπτυκτες

χώρες, όπως χώρες της υποσαχάριας Αφρικής Γκάμπια, Κένυα, Ενωμένα Αραβικά Εμιράτα, Τουρκία, Ιράν, Αίγυπτος, όπου η συχνότητα ανεύρεσης επιμολυσμένου με AFM1 μητρικού γάλακτος είναι πολύ μεγάλη και με υψηλή συγκέντρωση ανάλογα πάντα με τις κλιματολογικές / περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή. Αντίθετα στην Ευρώπη η ανεύρεση AFM1 θετικών δειγμάτων μητρικού γάλακτος δεν υπερβαίνει το 5% (Peraica et al., 2014; Jalili and Scotter, 2015).

### 3.9. Νομοθεσία

Στο πλαίσιο της προστασίας της δημόσιας υγείας από την επιμόλυνση των τροφίμων με ουσίες επιβλαβείς για τον ανθρώπινο οργανισμό, θεσπίστηκαν ανώτερα επιτρεπτά όρια MRLs σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1831/2003 και συγκεκριμένα για τις αφλατοξίνες στο νωπό γάλα, το γάλα που υφίσταται θερμική επεξεργασία και το γάλα για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων στα 0,050 μg/kg ή 50 ng/kg ενώ για το βρεφικό γάλα το όριο έχει προσδιοριστεί στα 0.025 μg/kg.

Θεσμικά νομοθετημένα όρια για τις μυκοτοξίνες υπάρχουν μέχρι σήμερα σε περισσότερες από 100 χώρες. Θα πρέπει να επισημανθεί όμως ότι υπάρχουν αποκλίσεις στις τιμές των MRLs μεταξύ των χωρών σε παγκόσμιο επίπεδο, γεγονός που δημιουργεί δυσκολίες στη διακίνηση των εμπορευμάτων διεθνώς αλλά και σύγχυση στο καταναλωτικό κοινό. Η διακύμανση αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική οικονομική θεώρηση μεταξύ των χωρών (Stoloff et al., 1991). Επί παραδείγματι το θεσμοθετημένο όριο των αφλατοξινών στις ΗΠΑ για το γάλα είναι στα 0.50 μg/kg, στην Ε.Ε στα 0,050 μg/kg ενώ στην Αίγυπτο είναι θεσμοθετημένη η απουσία αφλατοξίνης στο γάλα και τα προϊόντα του με σκοπό τη βέλτιστη προστασία της δημόσιας υγείας. (Amer and Ibrahim, 2010).

Στις αναπτυγμένες χώρες όπου το βιοτικό επίπεδο είναι υψηλό, και σε συνάρτηση με την επιστημονική γνώση και πληροφόρηση των καταναλωτών για τις επιπτώσεις στη δημόσια υγεία από την κατανάλωση τροφίμων επιμολυσμένων με αφλατοξίνες, τα όρια είναι πιο αυστηρά και οι προληπτικοί έλεγχοι είναι επίσης θεσμοθετημένοι τόσο σε επίπεδο αυτοελέγχου για της βιομηχανίες γάλακτος όσο και σε επίπεδο επίσημων ελέγχων από τις αρμόδιες κρατικές αρχές για τη συμμόρφωση με τη νομοθεσία.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα όμως εντοπίζεται στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου παρατηρείται ελλιπής θέσπιση ορίων ενώ σε κάποιες χώρες ακόμη και πλήρη απουσία τους, όπως σε χώρες της Αφρικής. Αυτό συμβαίνει όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό διότι στις χώρες αυτές η καταπολέμηση της πείνας και εν γένει της φτώχειας και των ασθενειών αποτελεί πρωταρχικό στόχο.

Για τον προσδιορισμό των μέγιστων επιτρεπτών συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και συνεκτίμηση πολλών παραγόντων, όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η συνολική συγκέντρωση στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές, η οξεία και χρόνια τοξικότητα που προκαλούν. Το 1990 ο Kuiper-Goodman υπολόγισε ότι η ημερήσια πρόσληψη (TDI) αφλατοξίνης στα 0.2 ng/kg (ή 14 ng/άτομο<sub>70kg</sub>) είναι ικανή δόση ώστε να κατηγοριοποιηθεί ως καρκινογόνος ουσία κατά IARC. Επομένως, η πρόσληψη 15 ng/άτομο<sub>70kg</sub> αφλατοξίνης μέσω της

κατανάλωσης γάλακτος και των προϊόντων του, όπως υπολογίστηκε σε επίπεδο Ε.Ε., αποτελεί μια αξιοσημείωτη δόση (Caggioni and Pietri, 1999, Prandini et al., 2008).

**Πίνακας 9: Ενδεικτικά νομοθετικά όρια διαφόρων χωρών**

| Ενδεικτικά θεσμοθετημένα όρια συγκέντρωσης AFM1 στο γάλα και στα προϊόντα του, σε διάφορες χώρες (Creppy, 2002; Celik et al., 2005; Καν.1881/2006; Iha et al., 2013; Darsanaki and Miri 2013; Abdallah et al., 2015; Udomkun et al., 2017) |                             |                                |
|--|-----------------------------|--------------------------------|
| Χώρα   | Γάλα (μg/kg)                | Γαλακτοκομικά προϊόντα (μg/kg) |
| Ευρωπαϊκή Ένωση Ελλάδα   | <b>0,05</b><br><b>0,025</b> | Βρεφικό γάλα                   |
| Ελβετία  | 0,05<br>0,02<br>0,25        | Βρεφικό γάλα, βούτυρο τυρί     |
| Τουρκία  | 0,05<br>0,25                | τυρί                           |
| Βραζιλία   | 0,5                         | 5,00 σκόνη γάλακτος            |
| Αργεντινή  | 0,05<br>0,50                | Προϊόντα γάλακτος              |
| Αμερική  | 0,50                        |                                |
| Αίγυπτος   | 0,00                        | 0,00                           |
| Νιγηρία  | 1,00                        |                                |
| Ολλανδία   | 0,050<br>0,020<br>0,200     | Βούτυρο τυρί                   |
| Τσεχία   | 0,5<br>0,1                  | Γάλα για παιδιά                |
| Αυστραλία  | 0,05<br>0,02<br>0,25        | Βούτυρο Τυρί                   |
| Νότιος Αφρική  | 0,05                        | άλλα γαλακτοκομικά             |

### 3.10. Μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού της συγκέντρωσης των αφλατοξινών

Οι επίσημοι έλεγχοι για την ανίχνευση αφλατοξινών, που διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των παραγόμενων προϊόντων με τη νομοθεσία, είναι ζωτικής σημασίας για την εξασφάλιση της δημόσιας υγείας των καταναλωτών και την ανάπτυξη της οικονομίας και του εμπορίου καθώς και για τη λήψη ορθών αποφάσεων για την αποδοχή ή την απόρριψη παρτίδων προϊόντων.

Το τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα βάση του οποίου θα γίνει η λήψη απόφασης δεν θα πρέπει να έχει σημαντικές αποκλίσεις από την πραγματική τιμή. Αυτό σημαίνει ότι οι μέθοδοι ανάλυσης, που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό, πρέπει να είναι ακριβείς, αξιόπιστες και επικυρωμένες. Διάφορες αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναφερθεί και χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό εν γένει των μυκοτοξινών και εν προκειμένω των αφλατοξινών στο γάλα και τα προϊόντα του (Tajik et al., 2007).

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός ΕΚ 882/2004 για τη διενέργεια των επίσημων ελέγχων συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων δίνει ιδιαίτερη έμφαση στην ποιότητα και ομοιομορφία των αποτελεσμάτων των αναλύσεων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή επικυρωμένων μεθόδων ανάλυσης βάσει διεθνών προτύπων όπως ISO, IUPAC, AOAC (Gilbert and Anklam, 2002). Στο Παράρτημα ΙΙΙ του ιδίου Κανονισμού αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια: α) ορθότητα, β) ευκολία εφαρμογής, γ) όριο ανίχνευσης, δ) όριο προσδιορισμού, ε) ακρίβεια (μέσω διεργαστηριακής δοκιμής), στ) επαναληψιμότητα, ζ) αναπαραγωγιμότητα, η) ανάκτηση, θ) επιλεκτικότητα, ι) ευαισθησία, ια) γραμμικότητα, ιβ) θέματα αβεβαιότητας των μετρήσεων, ιγ) άλλα κριτήρια που μπορούν να επιλέγονται ανάλογα με τις ανάγκες.

Οι μέθοδοι ανάλυσης διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες: Α) στις τεχνικές ενόργανης χημικής ανάλυσης και Β) στις ανοσοχημικές τεχνικές.

**Α) Οι τεχνικές ενόργανης ανάλυσης**, αποτελούν μια μεγάλη ομάδα μεθόδων εξαιρετικά διαδεδομένες στο χώρο των τροφίμων με σημαντικότερη τη χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών. Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε το 1903 από τον Ρώσο βοτανολόγο Tsweet, όταν προσπάθησε να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι βασίζονται στον διαχωρισμό και την κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δυο μη αναμειγνυόμενων φάσεων, της στατικής και κινητής φάσης. Η κινητή φάση μπορεί να είναι αέριο ή υγρό ενώ η στατική στερεό ή υγρό. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές τεχνικές για την ανίχνευση αφλατοξίνης είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η υγρή χρωματογραφία (LC)-MS και η αέρια χρωματογραφία (GC). Πρόκειται για ευαίσθητες τεχνικές που προϋποθέτουν την προεπεξεργασία του δείγματος, κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό και δαπανηρό εξοπλισμό (Wacoo et al., 2014).

Ειδικότερα:

1) Η αέρια χρωματογραφία (GC) όπου η κινητή φάση είναι αέριο, (φέρων-αέριο) συνήθως άζωτο, υδρογόνο, ήλιο. Η προς ανάλυση ουσία διέρχεται την στερεή στατική φάση (μπορεί να είναι και υγρή), με τη βοήθεια του φέροντος αερίου και αναλόγως κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων. Μετά τον διαχωρισμό των συστατικών ακολουθεί ανίχνευση του εξεραωμένου υλικού, με κάποιον από τους κάτωθι ανιχνευτές: ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID), ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (ECD) και φασματοσκοπία μάζας (MS). Η χρήση της αέριας χρωματογραφίας είναι σήμερα ελαφρώς περιορισμένη λόγω άλλων φθηνότερων χρωματογραφικών μεθόδων. Βασικό μειονεκτήματα της μεθόδου θεωρείται το γεγονός ότι παρουσιάζει υψηλή διακύμανση στην αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της (Wacoo et al., 2014).

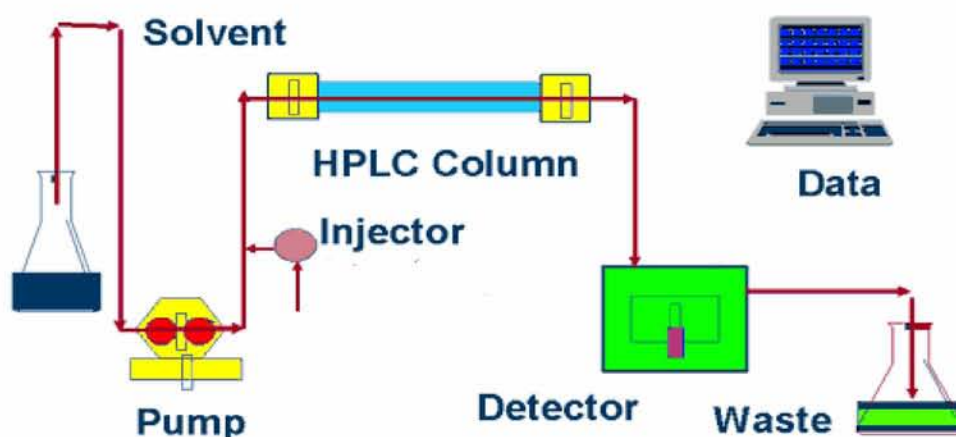


2) Η υγρή χρωματογραφία (LC)-MS, παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα, υψηλού βαθμού επιβεβαίωση και χαμηλά όρια ανίχνευσης LOD. Ως μειονέκτημα της μεθόδου θεωρείται η μικρή ποσότητα του αρχικού προπαρασκευαστικού δείγματος που απαιτείται ενώ υπάρχει κίνδυνος μείωσης της ακρίβειας της μεθόδου εξαιτίας αλληλεπίδρασης της αναλυόμενης ουσίας με συστατικά του υποστρώματος ( Zollner and Mayer-Helm, 2006; Sforza et al., 2006).

3) Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) κανονικής φάσης (normal phase) HPLC-NP ή αντίστροφης φάσης (reverse phase) HPLC-RP είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος διαχωρισμού και προσδιορισμού οργανικών συστατικών και χρησιμοποιείται σε παγκόσμιο επίπεδο σε ποσοστό 80%. Η HPLC-RP είναι σήμερα η πιο διαδεδομένη μέθοδος εκ των δυο, λόγω ευκολίας χειρισμού και μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση. Αποτελείται από μία μη πολική στατική φάση στήλης silica C18 ή C8 και μια κινητή πολική φάση συνήθως ακετονιτρίλιο ή νερό. Η προς ανίχνευση ουσία, στην περίπτωση μας οι αφλατοξίνες, ως εξαιρετικά φθορίζουσες ουσίες, ανιχνεύονται και ταυτοποιούνται στη συνέχεια με την βοήθεια ανιχνευτή.

Η HPLC μπορεί να συνδυαστεί με ανιχνευτές φθορισμού (FLD), υπεριώδους φωτός (UV) και φασματοσκοπία μάζας (MS). Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, ταχύτητα και ακρίβεια, απαιτεί μικρές ποσότητες δειγμάτων, έχει εξαιρετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης LOD και δύναται να αυτοματοποιηθεί, όμως απαιτεί ογκώδη και ακριβό εξοπλισμό, είναι χρονοβόρα και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό γεγονός που την περιορίζει σε εργαστηριακή χρήση και όχι για αναλύσεις πεδίου, λόγω υψηλού κόστους. Η μέθοδος ανάλυσης με HPLC έχει εφαρμοστεί σε διάφορα υποστρώματα για τον έλεγχο της παρουσίας σε αφλατοξίνες, όπως σιτηρά, μυκηλιακά εκχυλίσματα, βαμβακόσπορο, κρασί, αραβόσιτο, ξηροί καρποί, μπαχαρικά κ.α. (Wang, 2010; Wacoo et al., 2014).

## HPLC System



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της αναλυτικής χρωματογραφικής τεχνικής HPLC (Global CompliancePanel)<sup>17</sup>

<sup>17</sup> (<https://www.globalcompliancepanel.com/control/hplc-system>)

4) Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο διαχωρισμού των αφλατοξινών. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1964 από τους de Jongh et al., (1964) σε έρευνά τους και το 1990 θεωρήθηκε ως μέθοδος επιλογής κατά AOAC (Association of Official Analytical Chemist). Η στατική της φάση αποτελείται από προσροφητικό υλικό, όπως silica ή αλουμίνα ή κυτταρίνη ακινητοποιημένο πάνω σε μια πλάκα από πλαστικό ή γυαλί ενώ η κινητή της φάση μπορεί να είναι μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, νερό ή μείγματά τους. Θεωρείται αποτελεσματική και ακριβής μέθοδος ανάλυσης των αφλατοξινών αλλά απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, εκτενή προεπεξεργασία των δειγμάτων και ακριβό εξοπλισμό (Wacoo et al., 2014, Wang, 2010).

Σε κάθε περίπτωση η HPLC και η TLC θεωρούνται τα gold standard της αναλυτικής χημείας για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αφλατοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές, δυστυχώς όμως δεν ενδείκνυνται για χρήση ρουτίνας, λόγω του υψηλού κόστους και της εξειδίκευσης που απαιτούν.

Όπως ορίζεται από τον ΕΚ 401/2006 για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα, τα εργαστήρια πρέπει να χρησιμοποιούν μεθόδους ανάλυσης με συγκεκριμένα ποσοστά απόδοσης. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα προσδιορισμού, που εξασφαλίζουν την ακρίβεια και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, η χρήση των οποίων εξαρτάται από την υλικοτεχνική υποδομή των εργαστηρίων, τις οικονομικές τους δυνατότητες, τον χρόνο και την ευαισθησία της ανάλυσης.

Πριν την έναρξη της αναλυτικής διαδικασίας βασικό στάδιο αποτελεί η προκατεργασία, όπως:

α) Δειγματοληψία κατάλληλης ποσότητας με την προτεινόμενη μέθοδο και λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο της παρτίδας προς αποφυγή σφαλμάτων. Η ορθή δειγματοληψία αποτελεί σημαντικότερη διαδικασία που συνεισφέρει στην εξαγωγή ορθών αποτελεσμάτων, δεδομένου ότι οι αφλατοξίνες δεν δύναται να ανευρίσκονται ομοιόμορφα κατανεμημένες σε μια παρτίδα. Η διαδικασία είναι πιο απλή για προϊόντα που έχουν ομοιογενή μορφή, όπως το γάλα και το γιαούρτι (Hajslova et al., 2011).

β) Η προετοιμασία του δείγματος αποσκοπεί στην αύξηση της επιφάνειάς του μέσω της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων των τροφίμων, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη έκλυση από τον διαλύτη που συνεπάγεται πιο πλούσιο εκχύλισμα. Η άλεση του δείγματος και η δημιουργία μικρών σωματιδίων έχει ως στόχο την ομογενοποίηση του δείγματος, στάδιο το οποίο είναι μεν χρονοβόρο αλλά απολύτως απαραίτητο για την ανάλυση.

γ) Η εκχύλιση των αφλατοξινών από το δείγμα, ώστε να παραλάβουμε τις AFs από το υπόστρωμα που μας ενδιαφέρει με τη βοήθεια κατάλληλων διαλυτών. Οι αφλατοξίνες είναι πολικές ενώσεις και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες μέτριας ή ελαφριάς πολικότητας, όπως μεθανόλη, ακετόνη, ακετονιτρίλιο, οξικός αιθυλεστέρας, ενώ το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι μίγμα ακετονιτρίλιου- νερού. Για τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα λίπους όπως πχ. φιστίκια χρησιμοποιούνται μη

πολικοί διαλύτες, όπως το εξάνιο. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση ή φυγοκέντρηση και παραλαβή του εκχυλίσματος (Hajslova et al., 2011).

δ) ακολουθεί ο καθαρισμός του εκχυλίσματος σημαντική διαδικασία για την επακόλουθη ανάλυση. Οι μέθοδοι που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι συσκευές εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) ή στήλες ανοσοσυγγένειας (Immunoaffinity columns-IACs). Οι στήλες ανοσοσυγγένειας διαθέτουν ακινητοποιημένα αντισώματα αφλατοξινών (και γενικότερα μυκοτοξινών), τις οποίες και δεσμεύουν όταν το εκχύλισμα διέρχεται της στήλης. Έτσι επιτυγχάνεται απομάκρυνση των προσμίξεων και συμπύκνωση των AFs. Ο καθαρισμός με χρήση IACs έχει εφαρμοσιμότητα σε σύνθετα υποστρώματα/μήτρες ενώ οδηγεί σε μείωση των χρησιμοποιούμενων οργανικών διαλυτών (Hajslova et al., 2011; Zheng et al., 2006).

Σε έρευνα των Biancardi et al., (2013) χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική λύση έναντι της IACs, για τον καθαρισμό και την ανίχνευση των AFs, η εκχύλιση υγρού- υγρού αποβουτυρωμένου γάλακτος με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα και εν συνεχεία μέτρηση με LC-MS. Η μέθοδος συγκρίθηκε με την επίσημη μέθοδο ISO 14501 και προτάθηκε ως εναλλακτική της IACs (Berthiller et al., 2013). Τέλος ακολουθεί η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός με κάποια από τις προαναφερόμενες μεθόδους.

**Β) Ανοσοχημικές τεχνικές.** Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην ειδικότητα σύνδεσης των αντισωμάτων και των αντιγόνων που οδηγεί σε σχηματισμό συμπλόκου, το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί φασματοφωτομετρικά από την ενέργεια απορρόφησής του. Από τη δεκαετία του 1990 κι έπειτα, έχουν αναπτυχθεί μια σειρά τεχνικών που εκμεταλλεύονται αυτή την υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση των αντισωμάτων για αντιγόνα και εφαρμόζονται σε ευρύ φάσμα πεδίων-κλάδων, όπως η φαρμακοβιομηχανία και οι αναλύσεις των τροφίμων (Wacoo et al., 2014).

Το γεγονός ότι οι μέθοδοι αυτές δεν απαιτούν εξειδικευμένο και άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό για τον χειρισμό τους και σε συνδυασμό με το σύντομο χρόνο διεκπεραίωσής τους, τις κάνει όλο και περισσότερο ελκυστικές. Για όλους αυτούς τους λόγους, προτιμώνται περισσότερο τόσο σε επίπεδο ρουτίνας/ καθημερινής πράξης, όσο και σε ερευνητικό επίπεδο έναντι των χρωματογραφικών μεθόδων (Wacoo et al., 2014).

Οι σημαντικότερες ανοσοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των αφλατοξινών είναι:

α) Οι στήλες ανοσοσυγγένειας ICA (immunoaffinity column assay)

β) Η μέθοδος ραδιοανοσοπροσδιορισμού RIA (radioimmunoassay), η οποία βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ ενός ραδιενεργού - σημασμένου αντιγόνου και ενός μη ραδιενεργού αντιγόνου για τη δέσμευση σταθερού αριθμού αντισωμάτων ή θέσεων επί του ιδίου αντισώματος. Το βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί ταυτόχρονα να εκτελεί πολλαπλές αναλύσεις με υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας. Ωστόσο η χρήση ραδιενεργών ισοτόπων παρουσιάζει και μειονεκτήματα όπως i) το αντιγόνο που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι σε καθαρή κατάσταση και ii) ζητήματα που ανακύπτουν αναφορικά με θέματα δημόσιας υγείας, καθώς και ζητήματα που αφορούν στη διάθεση και αποθήκευση των ραδιενεργών αποβλήτων. Για τους λόγους αυτούς έχει περιοριστεί η συχνή εφαρμογή της μεθόδου για την ανάλυση των τροφίμων (Wacoo et al., 2014).

γ) Η τεχνική ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση των τροφίμων, εν προκειμένω για την ανίχνευση των αφλατοξινών, από ιατρικά διαγνωστικά εργαστήρια, ερευνητικά κέντρα και κρατικούς φορείς ανάλυσης και ελέγχου (Wacoo et al., 2014). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου εδράζεται στην ικανότητα ενός ειδικού αντισώματος να διακρίνει και να προσδιορίζει ποιοτικά και ποσοτικά την τρισδιάστατη δομή μιας συγκεκριμένης μυκοτοξίνης. Είναι ουσιαστικά ένα ευέλικτο σύστημα ποσοτικού προσδιορισμού αντιγόνων και αντισωμάτων που βασίζεται στην ανάπτυξη και εμφάνιση χρώματος από ένα αντίσωμα ή αντιγόνο που φέρει ένα ένζυμο-δείκτη, το οποίο προκαλεί υδρόλυση ενός χρωμογόνου υποστρώματος (Zheng et al., 2006).

Ο συνδυασμός της υψηλής ειδίκευσης της ένωσης των αντιγόνων με τα ειδικά για αυτά αντισώματα, καθώς και η χαρακτηριστική ευαισθησία της ανίχνευσης ενός ενζύμου, καθιστούν τη συγκεκριμένη μέθοδο ιδανική για τον προσδιορισμό της AFM1 σε σύνθετα μείγματα πολλαπλών συστατικών, χωρίς να απαιτείται προηγουμένως ιδιαίτερη προεπεξεργασία, όπως διαχωρισμός ή απομάκρυνση άλλων προσμειξέων, ενώ παράλληλα απαιτεί μικρούς όγκους δείγματος (Goryacheva et al., 2009; Zheng et al., 2006).



**Εικόνα 15: Εμπορικό kit ELISA για την ανίχνευση αφλατοξινών στο γάλα και στα προϊόντα του<sup>18</sup>**

Χάρη στα πολλαπλά πλεονεκτήματά της, όπως η ταχύτητα λήψης των αποτελεσμάτων, η ευκολία στη χρήση, το χαμηλό κόστος εφαρμογής έναντι των υπολοίπων τεχνικών, η ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα, η ELISA χρησιμοποιείται ευρέως σε επίπεδο ελέγχου διαλογής από τη βιομηχανία γάλακτος αλλά και από τα εργαστήρια ελέγχου

<sup>18</sup> (<http://biosymcorp.com/index.php/products/item/18-elisa-ridascreen>)



(Cigic and Prosen, 2009; Fazeli et al., 2011). Στο εμπόριο τα διαθέσιμα kit ELISA για την ανίχνευση της M1 είναι τα εξής: η άμεση ELISA, η έμμεση ELISA και η διπλή sandwich ELISA.

Η ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται από τη φύση της υπό ανάλυσης μυκοτοξίνης, την τεχνική προετοιμασίας του δείγματος και τη φύση του υλικού, ενώ ο διαχωρισμός που προηγείται επιτρέπει τη βελτίωση της ακρίβειας και της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου (Goryacheva et al., 2009).

Τα θετικά ευρήματα που λαμβάνονται από την ανάλυση με οποιαδήποτε μέθοδο/τύπο ELISA για την ανίχνευση της M1 στο γάλα και στα προϊόντα του, θα πρέπει στη συνέχεια να επαληθεύονται με τη χρήση τεχνικής HPLC (Udomkun et al., 2017). Σύμφωνα με τους Shephard et al., 2012 η ELISA παραμένει η πρώτη σε χρήση μέθοδος ανάλυσης στις έρευνες για την ανίχνευση της M1 στο γάλα και στα προϊόντα του, ακολουθούμενη από την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC και τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC.

### 3.11. Προληπτικές ενέργειες αποφυγής ανάπτυξης μυκήτων στις καλλιέργειες

Η ανάπτυξη των μυκήτων στα αγροτικά προϊόντα και η παραγωγή αφλατοξίνης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το κλίμα, οι αγροτικές πρακτικές, η μεταχείριση και αποθήκευση αυτών. Στο πλαίσιο απομείωσης των οικονομικών επιπτώσεων από την επιμόλυνση των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ζωοτροφών αλλά και των επιπτώσεων στην υγεία ζώων και ανθρώπων, διάφορες αγροτικές πρακτικές λαμβάνουν χώρα, με στόχο τη μείωση του φορτίου των μυκητιάσεων τόσο στο στάδιο της ανάπτυξης των φυτών στον αγρό όσο και στο στάδιο συγκομιδής και αποθήκευσής τους.

Ο *aspergillus flavus* είναι ο πιο σημαντικός παθογόνος μύκητας για διάφορες ποικιλίες φυτών, όπως ο βαμβακόσπορος, τα φιστίκια, το καλαμπόκι κ.α. Το καλαμπόκι που αποτελεί την πιο συνήθη ζωοτροφή είναι εξαιρετικά ευάλωτο στον μύκητα *aspergillus flavus* και *aspergillus paraciticus* τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή του. Στο πλαίσιο εφαρμογής Ορθών Γεωργικών Πρακτικών συστήνεται η φύτευση ποικιλιών που είναι ανθεκτικές στους μύκητες αυτούς. Ανάλογη μέριμνα πρέπει να λαμβάνεται για τη σωστή και επαρκή λίπανση του εδάφους, η οποία πρέπει να είναι πλούσια σε φώσφορο και άζωτο, και τη σωστή άρδευσή του, ώστε ν' αποφευχθεί η πρόκληση στρες στα φυτά καθώς το στρες από τη ξηρασία αυξάνει την παραγωγή της αφλατοξίνης (Prandini et al., 2008).

Οι μύκητες μπορούν να επιβιώσουν στα υπολείμματα των καλλιεργειών και στο έδαφος και να παράγουν άφθονα σπόρια καθ' όλη την καλλιεργητική περίοδο. Το μεγαλύτερο πρόβλημα εντοπίζεται στα σπασμένα ή με ρωγμές σπόρια του καλαμποκιού, που έχουν προκληθεί είτε από έντομα είτε από πουλιά που αποτελούν την οδό της μόλυνσης. Η σήψη που προκαλούν στον αραβόσιτο διακρίνεται εύκολα από τις γκριζοπράσινες ή πρασινοκίτρινες αποικίες που σχηματίζονται στα σπόρια και στο αυτί του φυτού.

Σημαντικό ρόλο στη διασπορά και την περαιτέρω επιμόλυνση έχουν τα έντομα ως μηχανικοί διαβιβαστές μεταξύ των σπορίων (Abdallah et al., 2015). Η χρήση εντομοκτόνων ως αγρονομική στρατηγική κρίνεται απαραίτητη καθώς τα έντομα συμβάλλουν στη μετάδοση των μυκήτων (Marin et al., 2012).

Οι πιο κρίσιμοι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι η υψηλή θερμοκρασία και υγρασία, που ευνοούν την ανάπτυξή τους. Ως βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης για τους *aspergillus flavus* και *aspergillus paraciticus* είναι 28-30 °C και 25-35 °C αντίστοιχα (Bhat et al., 2010).

Η παραγωγή τοξίνης εξαρτάται από την υγρασία και θερμοκρασία του πυρήνα των σπορίων και η παραγωγή της αυξάνεται όσο μειώνεται η υγρασία του πυρήνα. Ο *a.flavus* είναι εξαιρετικά ξηροάντοχος και μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές  $a_w = 0.73$  ενώ παράγει αφλατοξίνη σε  $a_w = 0.85$ . Ως βέλτιστη υγρασία ανάπτυξης θεωρείται το 18% αν και δύναται ν' αναπτυχθεί και σε ποσοστό υγρασίας 13%. Για εμπορικούς λόγους, ο καλής ποιότητας αραβόσιτος πρέπει να συγκομίζεται όταν το επίπεδο υγρασίας στον καρπό είναι 20-22% (Sanchis and Magan, 2004).

Οι παράμετροι αυτές είναι καθοριστικής σημασίας για τις περαιτέρω διαδικασίες επεξεργασίας και αποθήκευσης των καρπών καθώς επιβάλλεται ενωρίτερα η σωστή ξήρανσή τους και η διατήρηση της σχετικής υγρασίας στο χώρο αποθήκευσης σε χαμηλά επίπεδα (Marin et al., 2012).

Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει επίσης η κλιματική αλλαγή, οι επιπτώσεις της οποίας είναι πλέον εμφανείς, όχι μόνο στις χώρες με τροπικό κλίμα και στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου, Γαλλία, Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Κύπρος, Πορτογαλία, Τουρκία Αίγυπτος, Μαρόκο αλλά και στις χώρες της Κεντρικής Ευρώπης π.χ. Σερβία, Ρουμανία και Ουγγαρία (Paterson and Lima, 2010; Magan et al., 2011; Medina et al., 2014). Στις χώρες αυτές καταγράφηκαν τα τελευταία χρόνια πολλά περιστατικά επιμόλυνσης των καλλιεργειών που προκάλεσαν τεράστια προβλήματα (Vagra et al., 2009; Marin et al., 2012; Kocsu-bé et al., 2013; Baranyi et al., 2014).



**Εικόνα 16: Καρπός καλαμποκιού επιμολυσμένος με *aspergillus flavus*<sup>19</sup>**

<sup>19</sup> [http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson\\_r/A\\_flavus3.html](http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/A_flavus3.html)



Άλλες τεχνικές μείωσης του κινδύνου από τους μύκητες προτείνουν την αμειψισπορά, τη χρήση μυκητοκτόνων και τις μεταβολές στο χρόνο φύτευσης. Τις τελευταίες δυο δεκαετίες περίπου, έχει δοθεί έμφαση στην ανάπτυξη στρατηγικών βιοελέγχου του *aspergillus flavus* με τη χρήση διάφορων δραστικών στελεχών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριδίων, ζυμομυκήτων, νηματοειδών μυκήτων, με απώτερο στόχο την αναστολή ή τον περιορισμό της βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης στο στάδιο της προσυγκομιδής. Μεταξύ αυτών των δραστικών στελεχών, τα ατοξικογενή στελέχη του *a.flavus* έχουν αποδειχθεί ως τα πιο αποτελεσματικά (Amaiike and Keller, 2011). Δυο μη τοξινογόνα στελέχη του *a.flavus* (AF36, Alfa Guard), που απομονώθηκαν από περιοχές της Βόρειας Αμερικής, έχουν καταχωρηθεί ως συστατικά βιολογικών παρασιτοκτόνων αγροτικών καλλιεργειών λόγω ασφαλούς χρήσης τους από την EPA, Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (Probst et al., 2011; Bandyopadhyay et al., 2016).

Αρχικώς τα ατοξικογενή στελέχη χρησιμοποιήθηκαν σε καλλιέργειες αραβόσιτου, βαμβακιού και φιστικιών. Από τη χρήση των ευεργετικών αυτών μυκήτων προκύπτουν σημαντικά οφέλη καθώς παρέχουν προστασία για πολλά χρόνια και σε ποικίλες καλλιέργειες (Bandyopadhyay et al., 2016).

Η χρησιμοποίηση ενδημικών για την περιοχή ατοξικογενών στελεχών ως παραγόντων βιοελέγχου θεωρείται ακόμη πιο ασφαλής λύση και μειώνει σημαντικά τις ανησυχίες για τις πιθανές επιδράσεις στο περιβάλλον από τη μέχρι τώρα χρήση εξωτικών στελεχών. Πρόσφατο παράδειγμα αποτελεί η χρήση τεσσάρων ατοξιγενών ενδημικών στελεχών του *a.flavus* (Aflasafe products) σε συνθήκες πεδίου στην περιοχή της Νιγηρίας με πολύ καλά ποσοστά μείωσης της παραγωγής αφλατοξίνης, (Atehnkeng et al., 2014), ενώ όμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και σε περιοχή της Ιταλίας (Mauro et al., 2014).

Ως ανασταλτικός παράγοντας ανάπτυξης του μύκητα *a.flavus* θεωρείται και η παρουσία βακτηρίων στο περιβάλλον τους, όπως οι *Bacillus subtilis*, οι *Lactobacilli spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia spp.*, και *Burkholderia spp.*, οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά έναντι των μυκήτων και των τοξινών τους ως παράγοντες βιοελέγχου (Yin et al., 2008; Kumar et al., 2017). Επίσης και άλλα συστατικά ή εκχυλίσματα φυτών, βοτάνων, βακτηριδίων, μικροαλγών, ακτινομυκήτων, έχουν αναφερθεί ως ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή της αφλατοξίνης (Razzaghi- Abyaneh et al., 2011).

Δεδομένου ότι οι αφλατοξίνες είναι πολύ σταθερές ενώσεις, απαιτείται εξίσου προσοχή στον περαιτέρω χειρισμό, επεξεργασία και αποθήκευση των καρπών. Επί παραδείγματι, το καλαμπόκι που θα οδηγηθεί για την παρασκευή ενσιρώματος, θα πρέπει να έχει υψηλή υγρασία στη φάση αυτή, το μήκος κοπής να είναι κοντό (0,8-1,5 cm) και η διαδικασία της ζύμωσης να είναι σύντομη. Ακόμη, η χρήση οργανικών οξέων με μυκοστατική δράση, όπως π.χ. το προπιονικό οξύ, έχει φανεί αποτελεσματική στην αναστολή ανάπτυξης των μυκήτων και την παραγωγή τοξίνης.

Επιπρόσθετα, στον χώρο αποθήκευσης των αγροτικών προϊόντων θα πρέπει η υγρασία και η θερμοκρασία να τηρούνται σε χαμηλά επίπεδα, η μεν υγρασία να είναι χαμηλότερη του 65% η δε θερμοκρασία κατά 10 βαθμούς τουλάχιστον χαμηλότερη από την εξωτερική και να υπάρχει επαρκής αερισμός και συστηματική απεντόμωση (Prandini et al., 2008).

### 3.12. Μέθοδοι απομείωσης των αφλατοξινών

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση των αφλατοξινών από τις πρώτες ύλες αγροτικών προϊόντων διακρίνονται σε φυσικές, χημικές και βιολογικές.

Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν διαχωρισμό του προσβεβλημένου καρπού από το μη προσβεβλημένο, καθαρισμό, πλύσιμο και θερμική επεξεργασία των προσβεβλημένων καρπών. Επίσης περιλαμβάνουν μικροκύματα, ακτινοβολία με ακτίνες γ και χ, και UV ακτινοβολία. (Creppy, 2002).

Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση χημικών ουσιών, όπως το όξινο θειώδες νάτριο, το όζον O<sub>3</sub> και την αμμωνία (Bryden, 2007). Το όζον θεωρείται το πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό το οποίο έχει εγκριθεί και ως GRAS (Generally Recognized as Safe), που σημαίνει πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια από τη βιομηχανία τροφίμων απευθείας στα τρόφιμα (Udomkun et al., 2017). Μάλιστα οι AFB<sub>2</sub> και AFG<sub>2</sub> αφλατοξίνες, δεδομένου ότι δεν έχουν διπλό δεσμό στους άνθρακες C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> στη δομή τους, είναι πιο ανθεκτικές στο όζον έναντι των AFB<sub>1</sub> και AFG<sub>1</sub>. (Agriopoulou et al., 2016). Η αμμωνία προκαλεί διάσπαση του δακτυλίου της αφλατοξίνης με συνέπεια την ελαχιστοποίηση της συγκέντρωσής της στο αρχικό δείγμα. Κατά τον Creppy (2002), η εφαρμογή αμμωνίας θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος αποσύνθεσης των αφλατοξινών και μάλιστα σε ποσοστό 95-98%.

Σύμφωνα με τις ρυθμιστικές οδηγίες του FDA, η εφαρμογή αμμωνίας θεωρείται ενδεδειγμένη μέθοδος μόνο για τον βαμβακόσπορο ενώ απαγορεύεται η μέθοδος της ανάμειξης μολυσμένου με μη μολυσμένου με αφλατοξίνες δείγματος με σκοπό τη μείωση της τελικής συγκέντρωσης της αφλατοξίνης (FDA 2011).

Στις βιολογικές μεθόδους έχουμε προσθήκη ουσιών που δρουν ανασταλτικά έναντι των μυκήτων και έχουν την ικανότητα να δημιουργούν σύμπλοκο με τις αφλατοξίνες αποτρέποντας έτσι την απορρόφησή τους από το γαστρεντερικό σύστημα. Τέτοιες ουσίες είναι ο μπετονίτης, ο ζεόλιθος και το HSCAS (Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate, ενυδατωμένο αργιλοπυριτικό ασβεστούχο νάτριο). Το HSCAS είναι ένα προσροφητικό υψηλής συγγένειας με την αφλατοξίνη με την οποία σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά της (Bryden, 2007). Η χρήση αυτών των προσροφητικών, που περιορίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των AFs, έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει βρεθεί ότι μπορεί να είναι αναποτελεσματική για κάποιες άλλες μυκοτοξίνες καθώς και να επηρεάζει την απορρόφηση ορισμένων θρεπτικών ουσιών (Firmin et al., 2011).

Ως εναλλακτική τεχνολογική λύση θεωρείται η χρήση οργανικών πρόσθετων, όπως το τροποποιημένο κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* (YCW), το οποίο έχει επιβεβαιωθεί (in vitro) ότι προσροφά επιλεγμένες κύριες μυκοτοξίνες, ελαχιστοποιώντας μ' αυτό τον τρόπο τη διαιτητική έκθεση διαφόρων ζώων. Από έρευνες για τη χρήση της ως πρόσθετο στις ζωοτροφές προκύπτει ότι μειώνει την συγκέντρωση της AFB<sub>1</sub> στο σκύωτο ορνίθων ωοπαραγωγής και την έκκριση στο γάλα αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Όλες οι αναφερόμενες τεχνικές δυστυχώς δεν εφαρμόζονται ευρέως στην πράξη λόγω υψηλού κόστους (Firmin et al., 2011).

### 3.13. Μέθοδοι μείωσης της συγκέντρωσης της AFM1 στο γάλα

Ο Aman σε πείραμά του το 1992 ανέφερε ότι η συγκέντρωση της AFM1 στο γάλα μπορεί να μειωθεί με την επεξεργασία του με υπεροξείδιο του υδρογόνου  $H_2O_2$  και σε διάφορους συνδυασμούς θερμοκρασίας. Δεν υπάρχουν όμως επιπλέον έρευνες που να τεκμηριώνουν την άποψη αυτή.

Επίσης, σε έρευνα των Pierides και συν. (2000) υποστηρίχθηκε η άποψη ότι ορισμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσιάζουν την ικανότητα να δεσμεύουν την AFM1 στο γάλα, γεγονός που συνεπάγεται τη μείωση της συγκέντρωσής της ακολούθως στα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ακολούθησαν κι άλλες έρευνες προς την κατεύθυνση αυτή, όπως η έρευνα των Kabak and Var (2008), με τη χρήση ορισμένων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, που έδειξαν απομείωση της AFM1 της τάξης του 10.22% έως 26.62%, και ομοίως άλλη έρευνα των Serrano-Nino (et al 2013) με προβιοτικά στελέχη *Lactobacillus spp.* και απομείωση της AFM1 της τάξης του 19,95% έως 25,43%.

Σε κάθε περίπτωση, στη μείωση της συγκέντρωσης της AFM1 φαίνεται να επιδρούν και άλλοι παράγοντες όπως είναι το pH, το στέλεχος του βακτηρίου που χρησιμοποιείται, η θερμοκρασία, ο χρόνος επώασης και ο πληθυσμός των βακτηρίων (Ahmadzadeh et al., 2015). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ανωτέρω ευρήματα αναφέρονται σε in vitro μελέτες και για το λόγο αυτό χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, προκειμένου να τεκμηριωθεί η θετική τους επίδραση και μέσω in vivo ερευνών.

Σε έρευνα των Govaris και συν. (2002) παρατηρήθηκε πως η διαδικασία παρασκευής της γιαούρτης φαίνεται ότι μειώνει την συγκέντρωση της AFM1, σε σύγκριση με αυτή του γάλακτος, εξαιτίας της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ωστόσο δεν την εξαλείφει. Φαίνεται επίσης ότι αυτό το ποσοστό μείωσης εξαρτάται από το pH του προϊόντος. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η AFM1 μειώθηκε περισσότερο κατά την παρασκευή της γιαούρτης σε τιμή pH 4,0 από ότι σε τιμή pH 4,6.

Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν κι από την έρευνα των Elsanhoty et al., 2014, όπου χρησιμοποίησαν προβιοτικά και οξυγαλακτικά στελέχη βακτηρίων για την παρασκευή γιαουρτιού ως καλλιέργειες εκκίνησης, όπως: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium angulatum*, σε τρεις διαφορετικούς συνδυασμούς μεταξύ τους. Κατά την τελευταία μέρα αποθήκευσης των γιαουρτιών (7<sup>η</sup> ημέρα) παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα ποσοστά μείωσης της AFM1 της τάξης του 69,8% έως 72,8% ανάλογα με την κατηγορία των starters και παράλληλα με την πτώση του pH. Η μεγαλύτερη μείωση της AFM1 παρατηρήθηκε στο γιαούρτι που είχε και τη μεγαλύτερη πτώση pH. Αν και δεν έχει ακόμη πλήρως εξακριβωθεί ο μηχανισμός επίδρασης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη μείωση της AFM1, παρόλα αυτά αποτελεί μια δυνητική εφαρμογή μείωσης της περιεχόμενης τοξίνης στο γιαούρτι μέχρι αποδεκτών/ ασφαλών ορίων.

Γίνεται λοιπόν σαφές ότι η απομάκρυνση της περιεχόμενης αφλατοξίνης από τα τρόφιμα δεν μπορεί να εξασφαλιστεί επιτυχώς. Δεδομένης της σοβαρότητας των επιπτώσεων στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων από περιστατικά αφλατοξίκωσης,

θα πρέπει να δοθεί έμφαση στην πρόληψη, μέσω του σωστού σχεδιασμού και την εφαρμογή κατάλληλων μέτρων για την αποφυγή της, όπως:

- Την πρόληψη της μυκητιακής μόλυνσης στο στάδιο πριν τη συγκομιδή των αγροτικών προϊόντων είτε προορίζονται απευθείας για ανθρώπινη κατανάλωση είτε για την παρασκευή ζωοτροφών.
- Τον εντοπισμό μέσω εργαστηριακών ελέγχων επιμολυσμένων ζωοτροφών και την απομάκρυνσή τους όταν πρόκειται για εκτεταμένη επιμόλυνση ή την άμεση εφαρμογή μεθόδων αδρανοποίησής τους.
- Την πραγματοποίηση συχνών ελέγχων στο πλαίσιο εφαρμογής προγραμμάτων HACCP από τις βιομηχανίες τροφίμων αλλά και από τους αρμόδιους κρατικούς φορείς, με στόχο τον αποκλεισμό από την τροφική αλυσίδα προϊόντων μη ασφαλών για τη δημόσια υγεία.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> : Υλικά και μέθοδος ανάλυσης

#### 4.1. Συλλογή δειγμάτων

Από τον Μάιο έως και τον Ιούνιο του 2017 συλλέχθηκαν συνολικά 53 δείγματα γιαουρτιού και των τριών τύπων γάλακτος (αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου) από διάφορα σημεία λιανικής πώλησης στην περιφέρεια Θεσσαλίας καθώς και από ιδιοπαρασκευές.

- Τα 35 δείγματα εκ των 53 συνολικών, αφορούσαν σε βιομηχανικού τύπου γιαούρτι, όλων των μεθόδων παρασκευής, παραδοσιακό ή στραγγιστό, με ολικά ή χαμηλά λιπαρά και συλλέχθηκαν από διάφορα σημεία λιανικής πώλησης στις περιοχές της Καρδίτσας, Λάρισας, Βόλου και Τρικάλων της Περιφέρειας Θεσσαλίας. Τα δείγματα προέρχονταν από μικρού και μεσαίου μεγέθους τοπικές βιοτεχνίες, αλλά και βιομηχανίες γάλακτος.
- Τα υπόλοιπα 18 δείγματα που συλλέχθηκαν αφορούσαν σε πρόβειο γιαούρτι ιδιοπαρασκευής, από διάφορες περιοχές των Τρικάλων, το οποίο παράγεται και διακινείται τοπικά από κτηνοτρόφους - παραγωγούς. Όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της έρευνας μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό συνθήκες ψύξης.

#### 4.2. Προσδιορισμός της Αφλατοξίνης AFM1 στο γιαούρτι

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αφλατοξίνης M1 στα δείγματα του γιαουρτιού πραγματοποιήθηκε με την Ανοσοενζυμική Μέθοδο ELISA στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων, της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σε κάθε δείγμα γιαουρτιού για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης M1 χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη δοκιμή Ridascreen Aflatoxin M1 του οίκου R-Biopharm και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αυτή που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Καθώς οι αφλατοξίνες είναι ευαίσθητες στην παρουσία φωτός, η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες μειωμένης παρουσίας φωτός.

Για την ευχερέστερη μελέτη των αποτελεσμάτων οι συγκεντρώσεις της αφλατοξίνης AFM1 στο γιαούρτι ταξινομήθηκαν στις ακόλουθες 3 κατηγορίες:

- Συγκεντρώσεις <5 ppt, ή απουσία αφλατοξίνης AFM1
- Συγκεντρώσεις αφλατοξίνης AFM1 από 5 έως 50 ppt
- Συγκεντρώσεις αφλατοξίνης AFM1 από 50 έως 80 ppt

Στην ανωτέρω κατηγοριοποίηση το όριο των 50 ppt (50 ng/kg) αποτελεί το ανώτατο αποδεκτό όριο συγκέντρωσης αφλατοξίνης AFM1 στο γιαούρτι, όπως ορίζεται από την

Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΚ) 1831/2003 και την ελληνική νομοθεσία, ενώ τα 5 ppt και τα 80 ppt αποτελούν το κατώτατο και το ανώτατο όριο αντίστοιχα ανίχνευσης της AFM1, που χρησιμοποιεί η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης (ELISA).

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> : Αποτελέσματα – Συζήτηση

### 5.1. Αποτελέσματα ανάλυσης και συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Σε κανένα από τα 53 δείγματα δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία της AFM1.

Η απουσία θετικών δειγμάτων στα 35 δείγματα γιαουρτιού, που συλλέχθηκαν από διάφορα σημεία λιανικής πώλησης της περιφέρειας Θεσσαλίας και αφορούσαν σε προϊόντα από τοπικές βιοτεχνίες και βιομηχανίες γάλακτος, καταδεικνύει τη λήψη μέτρων για ορθή διαχείριση κινδύνου στο πλαίσιο εφαρμογής του σχεδίου HACCP που εφαρμόζουν οι γαλακτοβιομηχανίες. Πιθανότατα η αυξανόμενη γνώση και ενημέρωση για το πρόβλημα των αφλατοξινών τα τελευταία χρόνια έχει συμβάλλει στην εντατικοποίηση των ελέγχων του γάλακτος ως πρώτη ύλη.

Όμοια αποτελέσματα, δηλαδή κανένα θετικό δείγμα στην παρουσία AFM1, προέκυψαν και από την ανάλυση των 18 δειγμάτων πρόβειου γιαουρτιού ιδιοπαρασκευής. Ειδικά για την περίπτωση της ιδιοπαρασκευής, μιας πρακτικής παρασκευής γιαουρτιού εξαιρετικά διαδεδομένης στην επαρχία μέχρι και σήμερα, υπήρχε πιο έντονη ανησυχία σχετικά με την έκβαση των αποτελεσμάτων, αφενός διότι η γνώση και η λήψη μέτρων προστασίας για την ασφάλεια των προϊόντων από τους παρασκευαστές θεωρείται μάλλον περιορισμένη και αφετέρου διότι η κατανάλωση τέτοιων προϊόντων δεν είναι καθόλου αμελητέα, σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία.

Η απουσία της AFM1 στα προϊόντα γιαούρτης ιδιοπαρασκευής είναι πιθανόν να οφείλεται στους εξής παράγοντες:

Α) Όλα τα δείγματα ιδιοπαρασκευής που εξετάστηκαν προέρχονταν από κτηνοτρόφους που πωλούν το γάλα τους στις τοπικές βιοτεχνίες και βιομηχανίες γάλακτος, με αποτέλεσμα η πρώτη ύλη που χρησιμοποιούν να υπόκειται σε σημαντικό επίπεδο ελέγχου.

Β) Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά την εαρινή και θερινή περίοδο που τα ζώα λαμβάνουν κυρίως χλωρή βοσκή σε πεδινές και ημιορεινές περιοχές της Θεσσαλίας και δεν τρέφονται αποκλειστικά με ζωοτροφές. Αντιθέτως, δείγματα που έχουν συλλεχθεί και εξετασθεί κατά την χειμερινή περίοδο, που το σιτηρέσιο των ζώων περιλαμβάνει συμπληρώματα ζωοτροφών, έδειξαν αυξημένη παρουσία σε AFM1, σύμφωνα με έρευνες από την ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία.



**Πίνακας 10: Αποτελέσματα της παρουσίας AFM1 σε δείγματα γιαουρτιού**

| Είδος δείγματος | Αριθμός δειγμάτων | Συγκέντρωση<br>AFM1 | Συγκέντρωση<br>AFM1 |
|-----------------|-------------------|---------------------|---------------------|
|                 |                   | < 50 ng/kg          | > 50 ng/kg          |
| Λιανική πώληση  | 35                | 35 (100%)           | 0 (0%)              |
| Ιδιοπαρασκευή   | 18                | 18 (100%)           | 0 (0%)              |
| Σύνολο          | 53                | 53 (100%)           | 0 (0%)              |

Μελέτες με χαμηλά ποσοστά παρουσίας της AFM1 σε δείγματα γιαουρτιού έχουν δημοσιευτεί και ειδικότερα:

- Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη αναφέρονται σε έρευνα των Cano-Sancho et al., (2010) στην Καταλονία της Ισπανίας, η οποία περιελάμβανε 216 συνολικά δείγματα γάλακτος και γαλακτοκομικών. Συγκεκριμένα 72 δείγματα γάλακτος, 72 δείγματα γιαουρτιού και 72 δείγματα τυριού. Με την τεχνική της ELISA ανιχνεύτηκε η παρουσία της AFM1 στα 2 από τα 72 (2.8%) δείγματα γιαουρτιού με ένα μόνο δείγμα η συγκέντρωση να υπερβαίνει τα επιτρεπτά όρια της Ε.Ε και επίσης στο 94.4% (68/72) των δειγμάτων γάλακτος.
- Σε έρευνα των Barjesteh et al., 2010 στο Βόρειο Ιράν, που αναλύθηκαν με ELISA 50 δείγματα γιαουρτιού, εκ των οποίων 40 τυποποιημένων - παστεριωμένων και 10 παραδοσιακού τύπου, ανιχνεύτηκε η AFM1 σε συγκεντρώσεις: 2.1-61.7 ng/l και 7-53 ng/l, αντίστοιχα ενώ σε ένα δείγμα παστεριωμένου και ένα δείγμα παραδοσιακού γιαουρτιού η συγκέντρωση της AFM1 υπερέβαινε το όριο των 50 ng/l της Ε.Ε.

Σε διάφορες άλλες μελέτες ανιχνεύτηκαν πολύ υψηλότερα ποσοστά παρουσίας της AFM1 σε δείγματα γιαουρτιού όπως:

- ❖ Οι Elsayed and El-Fatah (2015) σε έρευνά τους στην Αίγυπτο, συνέλεξαν από την τοπική αγορά της Sharkia, 80 δείγματα γάλακτος και 80 δείγματα γαλακτοκομικών (γιαούρτι, τυρί, βρεφική σκόνη γάλακτος, UHT γάλα), εκ των οποίων τα 25 αντιστοιχούσαν σε γιαούρτι παραδοσιακής παρασκευής. Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο ELISA και στο 12% (3 δείγματα) των δειγμάτων γιαουρτιού ανιχνεύτηκε η AFM1 σε ποσοστό μεγαλύτερο του εθνικού ορίου.
- ❖ Άλλη ενδιαφέρουσα έρευνα των Ertas et al., 2011 διεξήχθη στην Τουρκία και περιελάμβανε 210 συνολικά δείγματα γάλακτος και γαλακτοκομικών, που αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA για την ανίχνευση της παρουσίας AFM1. Στο 64% (135) των συνολικών δειγμάτων και στο 56% (28) των δειγμάτων του γιαουρτιού ανιχνεύτηκε η παρουσία της AFM1 με εύρος συγκέντρωσης από 2.5 ng/kg έως 78 ng/kg. Σε 7 (14%) δείγματα γιαουρτιού η AFM1 υπερέβαινε το όριο της νομοθεσίας.

- ❖ Έρευνα των Issazadeh et al., 2012 αναλύθηκαν 60 δείγματα γιαουρτιού με ELISA, που συλλέχθηκαν τυχαία από την περιοχή Gilan του Βόρειου Ιράν. Το 98.33% (59) των δειγμάτων ανιχνεύτηκαν θετικά στην παρουσία της AFM1 σε εύρος συγκεντρώσεων από 6.2 ng/l – 87 ng/l. Στο 63.33% (38 δείγματα) των θετικών δειγμάτων η συγκέντρωση ήταν υψηλότερη από το ανώτερο επιτρεπτό όριο των 50 ng/l της Ε.Ε.
- ❖ Σε αντίστοιχη μελέτη των Tavakoli et al., 2012 στο Ιράν αναλύθηκαν 50 δείγματα γιαουρτιού, που αφορούσαν σε δυο εποχικές περιόδους παραγωγής, χειμερινής και καλοκαιρινής, συλλέχθηκαν από δύο βιομηχανίες γαλακτοκομικών της περιοχής και αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA. Το 70% των δειγμάτων βρέθηκε επιμολυσμένο με AFM1 και σε εύρος συγκεντρώσεων από 21.1 ng/l έως 137.6 ng/kg. Το 17.14% αυτών υπερέβαιναν το θεσμοθετημένο εθνικό όριο και το όριο της Ε.Ε ενώ το ποσοστό των επιμολυσμένων ήταν υψηλότερο στα γιαούρτια χειμερινής παραγωγής.
- ❖ Ο Rahimi, σε μεγάλη έρευνα που διεξήγαγε το 2012 για την παρουσία της AFM1 σε γαλακτοκομικά προϊόντα, συνέλεξε 200 συνολικά δείγματα από την αγορά του Ιράν, εκ των οποίων 60 δείγματα γιαουρτιού, 80 δείγματα τυριού και 60 δείγματα παγωτού, τα οποία αναλύθηκαν με την μέθοδο ELISA. Το 75.5% των δειγμάτων του ήταν επιμολυσμένα με AFM1, σε εύρος συγκεντρώσεων από 14.3 ng/l έως 572.1 ng/l. Στα 48 (80%) δείγματα γιαουρτιού η συγκέντρωση της AFM1 κυμαινόταν στα 19.7 ng/l έως 319.4ng/l, ενώ σε τρία δείγματα η συγκέντρωση της AFM1 ήταν υψηλότερη από το ανώτερο επιτρεπτό όριο της Ε.Ε.
- ❖ Οι Sarica et al., 2015 σε έρευνά τους στην Άγκυρα μελέτησαν τη συγκέντρωση της AFM1 σε 70 συνολικά δείγματα, εκ των οποίων 24 UHT γάλα, 27 λευκό τυρί και 19 δείγματα γιαουρτιού, που συνέλεξαν από την αγορά της Τουρκίας για διάστημα έξι μηνών. Το 83% των δειγμάτων γάλακτος, το 92.6% των τυριών και το 89.5% των γιαουρτιών βρέθηκαν επιμολυσμένα με AFM1 και μόνο σε 5 γιαούρτια και 2 τυριά ανιχνεύτηκε συγκέντρωση μεγαλύτερη απ' αυτή που ορίζεται από την Ε.Ε και εντός των ορίων της τουρκικής νομοθεσίας που έχει ορίσει ως ανώτερο όριο για το τυρί τα 250ng/kg.
- ❖ Σε έρευνα των Nikbakht et al., 2016 που διεξήχθη στο Ιράν συλλέχθηκαν 90 δείγματα παραδοσιακού γιαουρτιού και αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA για την παρουσία της AFM1. Το 100% των δειγμάτων βρέθηκε επιμολυσμένο με εύρος συγκεντρώσεων από 5 ng/l έως 83 ng/kg ενώ το 22.22% αυτών (20 δείγματα) υπερέβαιναν το ανώτερο επιτρεπτό όριο της Ε.Ε.

## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> : Συμπεράσματα

### 6.1. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η παρουσία της αφλατοξίνης AFM1 σε 35 δείγματα γιαουρτιού αγελαδινού, πρόβειου και αίγειου γάλακτος που παρήχθησαν από γαλακτοβιομηχανίες μικρής, μεσαίας και υψηλής δυναμικότητας στην περιοχή της Θεσσαλίας και σε 18 δείγματα πρόβειου γιαουρτιού ιδιοπαρασκευής που παρελήφθησαν από τοπικούς κτηνοτρόφους - παραγωγούς. Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία της AFM1.

Η απουσία θετικών δειγμάτων στα 35 δείγματα γιαουρτιού, που συλλέχθηκαν από διάφορα σημεία λιανικής πώλησης της περιφέρειας Θεσσαλίας και αφορούσαν σε προϊόντα από τοπικές βιοτεχνίες και βιομηχανίες γάλακτος, καταδεικνύει τη λήψη μέτρων για ορθή διαχείριση κινδύνου στο πλαίσιο εφαρμογής του σχεδίου HACCP που εφαρμόζουν οι γαλακτοβιομηχανίες. Πιθανότατα η αυξανόμενη γνώση και ενημέρωση για το πρόβλημα των αφλατοξινών τα τελευταία χρόνια έχει συμβάλλει στην εντατικοποίηση των ελέγχων του γάλακτος ως πρώτη ύλη.

Η απουσία της AFM1 στα 18 προϊόντα γιαούρτης ιδιοπαρασκευής είναι πιθανόν να οφείλεται στους εξής παράγοντες:

A) Όλα τα δείγματα ιδιοπαρασκευής που εξετάστηκαν προέρχονταν από κτηνοτρόφους που πωλούν το γάλα τους στις τοπικές βιοτεχνίες και βιομηχανίες γάλακτος, με αποτέλεσμα η πρώτη ύλη που χρησιμοποιούν να υπόκειται σε σημαντικό επίπεδο ελέγχου.

B) Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά την εαρινή και θερινή περίοδο που τα ζώα λαμβάνουν κυρίως χλωρή βοσκή σε πεδινές και ημιορεινές περιοχές της Θεσσαλίας και δεν τρέφονται αποκλειστικά με ζωοτροφές. Αντιθέτως, δείγματα που έχουν συλλεχθεί και εξετασθεί κατά την χειμερινή περίοδο, που το σιτηρέσιο των ζώων περιλαμβάνει συμπληρώματα ζωοτροφών, έδειξαν αυξημένη παρουσία σε AFM1, σύμφωνα με έρευνες από την ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία.

Είναι θετικό το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκαν δείγματα μολυσμένα με αφλατοξίνες, ωστόσο η τήρηση των κανόνων ασφάλειας και ελέγχου των τροφίμων θα πρέπει να είναι συνεχής και συστηματική τόσο σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής και γαλακτοβιομηχανιών όσο και σε επίπεδο τελικών προϊόντων, όπως προβλέπεται και από την εθνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο την επικινδυνότητα έκθεσης των καταναλωτών και συμβάλλοντας στην προστασία της δημόσιας υγείας.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Α) Ελληνική

**Αλεξανδρόπουλος Θ.** (2004), *Θέματα Υγιεινής Τροφίμων και Διατροφής*, Εκδόσεις ΙΩΝ, (σελ. 101-106)

**Βασιλείβα Α., Σ.Π. Ντουράκης** (2015). «Μπορεί η αντι-ική αγωγή σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β να προλάβει την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου;», **Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής** 2015, 32(5):566-575

**Βάσσοι, Α.Β.**, (2004), *Τρόφιμα και υγεία του καταναλωτή (Τροφογενείς διαταραχές)*, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, σελ. 131-136.

**Belitz H.-B., W. Grosch, P. Schieberle**, (2015). *Χημεία Τροφίμων*, 4<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ (σελ. 521-545)

**ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ** (2017). Στατιστικά στοιχεία για την παραγωγή γάλακτος. Επικαιροποίηση 24 Μαρτίου 2017 :

([http://www.elgo.gr/images/ELOGAK\\_files/Statistics/stats2016/AIGO-Paradoseis-Galaktos-2015.pdf](http://www.elgo.gr/images/ELOGAK_files/Statistics/stats2016/AIGO-Paradoseis-Galaktos-2015.pdf))

**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΡΧΗ** ΕΛΣΤΑΤ (2017): ΕΛΛΑΣ ΜΕ ΑΡΙΘΜΟΥΣ. Ιανουάριος \_ Μάρτιος 2017.[ Προσπελάστηκε 12 Ιουνίου 2017]

([http://www.statistics.gr/documents/20181/1515741/GreeceInFigures\\_2017Q1\\_GR.pdf/98616f15-bbbf-437f-aba0-79204e0f18](http://www.statistics.gr/documents/20181/1515741/GreeceInFigures_2017Q1_GR.pdf/98616f15-bbbf-437f-aba0-79204e0f18)).

**Δημητροπούλου Δήμητρα, Ουρανία Κυριακοπούλου, Χαράλαμπος Γώγος**, (2011). «*Ηπατοκυτταρικός Καρκίνος: Παράγοντες Κινδύνου, Νεώτερα Διαγνωστικά Δεδομένα, Θεραπευτικές Προσεγγίσεις*», **ΑΧΑΪΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ**, Τόμος 30ος, τεύχος 1, Απρίλιος 2011.

**Ζερφυρίδης Κ. Γρηγόρης**, (2001). «*Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος*». Εκδόσεις ΓΙΑΧΟΥΔΗ (σελ. 6-134)

**Κεχαγιάς Χρήστος** (2011). *Γάλα. Επιστήμη, Τεχνολογία και Έλεγχοι για τη Διασφάλιση της Ποιότητας*, Εκδοτικός Όμιλος ΙΩΝ. (σελ.17-100, 193-234)

**LACTIMED**, (2014). «Αξιοποίηση των τυπικών γαλακτοκομικών προϊόντων της Θεσσαλίας, Διάγνωση και Τοπική Στρατηγική». Ιανουάριος 2014. ([www.prd.uth.gr/uploads/.../2014/89b545a1372244bafef12dc9e0a2893ff28db386c.pdf](http://www.prd.uth.gr/uploads/.../2014/89b545a1372244bafef12dc9e0a2893ff28db386c.pdf)) [Προσπέλαση την 12/07/2017]

**Μάντη Ι. Αντωνίου**, (2000) . *Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του*, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. (σελ 8-35& 231-254)

**Μπαλατσούρας Γιώργος**. (2006) *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ (σελ.265-270 & 526-534)

**Μπεζιρτζόγλου Ευγενία** (2005) *Γενική Μικροβιολογία*, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε. (σελ.146-148)

**Σ.Ε.Β.Ε.-Ι.Ε.ΕΣ** (2015). Τρόφιμα και στοιχεία εξαγωγών. Οι συνθήκες σήμερα στις Ευρωπαϊκές αγορές και στις αγορές τρίτων χωρών. (Διαθέσιμο: [www.perpdyt.gr/upload/5rep/ris3/agros/vas.pdf](http://www.perpdyt.gr/upload/5rep/ris3/agros/vas.pdf)) [Προσπέλαση την 2/07/2017]

**Τζουραμάνη Ε., Σιντόρη Αλ. Λιοντάκης Αγ., Ναβρούζογλου Π. Παπαευθυμίου Μ. Καρανικόλας Π. Αλεξόπουλος Γ. (2008)**. «Βιολογική Προβατοτροφία». Ινστιτούτο Γεωργοοικονομικών και Κοινωνιολογικών Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας. ([www.agroepiloges.gr/Files/provata/Provata.pdf](http://www.agroepiloges.gr/Files/provata/Provata.pdf)) [Προσπέλαση την 12/06/2017]

## **Νομοθεσία**

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τη διενέργεια επισήμων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων ΕΕ L 191 της 28.5.2004.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 401/2006 της Επιτροπής της 23<sup>ης</sup> Φεβρουαρίου 2006 για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα ΕΕ L 70 της 9.3.2006.

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 της Επιτροπής της 19<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα ΕΕ L 364 της 20.12.2006.

Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, (ΚΤΠ) Έκδοση (2009). Μέρος Α΄, Τρόφιμα και Ποτά, Ελληνική Δημοκρατία, Γενικό Χημείο του Κράτους. Υπουργείο Οικονομίας & Οικονομικών.

Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, (ΚΤΠ) Έκδοση 2/Αύγουστος 2016,( άρθρο 82). Μέρος Α΄, Τρόφιμα και Ποτά, Ελληνική Δημοκρατία, Γενικό Χημείο του Κράτους. Υπουργείο Οικονομίας & Οικονομικών.

## **B) Ξενόγλωση**

**Abdallah M.F. Girgin G. and Baydar T. (2015)** «*Occurrence, prevention and Limitation of Mycotoxins in Feeds*». **Animal Nutrition and Feed Technology** 15:471-490

**Afsah – Hejri L., S. Jinap, P.Hajeb, S. Radu, Sh. Shakibazadeh, (2013)** «*Review on Mycotoxins in Food and Feed: Malaysia Case Study*». **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** Vol. 12 p: 629-651

**Agriopoulou, S., Koliadima, A., Karaiskakis, G., & Kapolos, J. (2016)** «*Kinetic study of aflatoxins' degradation in the presence of ozone*». **Food Control**, 61, p: 221-226.

**Ahmadzadeh Farzad, Maryam Mirlohi, and Golnoush Madani. (2015)** «*Reduction of aflatoxin M1 by Some Lactic Acid Bacteria and the Effect of pH and Temperature in Phosphate Buffer Saline Solution*». **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, Vol.5 No.3 p.2748-2755, Available online at [www.jcbssc.org](http://www.jcbssc.org)

**Amaike Saori and Nancy P. Keller (2011)** «*Aspergillus flavus*». **Annual Review of Phytopathology**, 49: p.107–133

**Aman, I. (1992)** «*Reduction of aflatoxin M1 in milk using hydrogen peroxide plus heat treatment*». **J. Vet. Med, S.B.**,9, p: 692-694

**Amer A. Amr and M.A Ekbal Ibrahim (2010)** «*Determination of flatoxin M1 in raw milk and traditional cheeses retailed in Egyptian markets*». **Journal of Toxicology and Enviromental Health Sciences** Vol 2(4). p. 50-53

**Applebaum R.S., Brackett R.E., Wiseman D.W., Marth E.H. (1982)** «*Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin*». **J Dairy Sci**, 65 p: 1503-1508.

**Atehnkeng J., P.S. Ojiambo, P.J. Cotty, R. Bandyopadhyay (2014)** «*Field efficacy of a mixture of atoxigenic Aspergillus flavus Link: Fr vegetative compatibility groups in preventing aflatoxin contamination in maize (Zea mays L.)*» **Biological Control** 72 p: 62–70

**Awad W.A. Ghareeb, K., Bohm, J., Razzazi E., Hellweg P. Zentek J. (2008)** «*The impact of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on poultry*». **Int.J. Poult. Sci.** 7, p: 827-842

**Azizi I.Gholampour, S.Shateri and M. Mousavizadeh M. (2012)** «*Isolation and identification of the mycotoxigenic and non- mycotoxigenic fungi from foodstuff and feedstuff in Mazandaran Province, Northern Iran*» **African Journal of Microbiology Research** Vol 6 (18) p: 3993-3999



**Bakirci, I. (2001)** «*A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey*». **Food Control**, 12, p: 47-51.

**Bandyopadhyaya R., A. Ortega-Beltran, A. Akande, C. Mutege, J. Atehnkeng, L. Kaptoge, A.L. Senghor, B.N. Adhikari, and P.J. Cotty (2016)** «*Biological control of aflatoxins in Africa: current status and potential challenges in the face of climate change*» **World Mycotoxin Journal** 2016 online SPECIAL ISSUE: Mycotoxins in a changing world. DOI: 10.3920/WMJ2016.2130.

**Baranyi Nikolett, Sándor Kocsubé, Csaba Vágvolgyi, János Varga (2013)** «*Current trends in aflatoxin research*». **Acta Biologica Szegediensis**. Volume 57(2) p: 95-107.

**Baranyi Nikolett, Sándor Kocsubé, Noémi Kiss, Andrea Palágyi, Mónika Varga, Beáta Tóth, János Varga (2014)** «*Identification of potential mycotoxin producing fungi on agricultural products in Hungary and Serbia*» **Acta Biologica Szegediensis**, Volume 58(2) p:167-170

**Barbiroli A., Bonomi F., Benedetti S., Mannino S., Monti L., Cattaneo T. and Lametti S. (2007)** «*Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk*» **J Dairy Sci**, 90 p: 532-540.

**Barjesteh M.H., I. Gholampour Azizi and E. Noshfar (2010)** «*Occurrence of Aflatoxin M in Pasteurized and Local Yogurt in Mazandaran Province (Northern Iran) Using ELISA*» **Global Veterinaria** 4 (5) p: 459-462, 2010 ISSN 1992-6197

**Battacone G., Nudda A., Cannas A., Cappio Borlino A., Bomboi G., Pulina G. (2003)** «*Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1*». **J Dairy Sci**, 86 p: 2667-2675.

**Bbosa S. Godfrey , David Kitya, A. Lubega, Jasper Ogwal-Okeng , William W. Anokbonggo and David B. Kyegombe (2013)** «*Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems*» Chapter 12 <http://dx.doi.org/10.5772/51201>

**Beasley V.R. (1993)** *Trichothecenes in Current Veterinary Therapy3 Food Animal Practice*, (3<sup>rd</sup> ed) W.B Saunders, Philadelphia USA p: 332-333

**Bellio Alberto, Daniela Manila Bianchi, Monica Gramaglia, Andrea Loria, Daniele Nucera, Silvia Gallina, Marilena Gili and Lucia Decastelli. (2016)** «*Aflatoxin M1 in Cow's Milk: Method Validation for Milk Sampled in Northern Italy*» **Toxins** 2016, 8, 57; doi: 10.3390/toxins8030057, [www.mdpi.com/journal/toxins](http://www.mdpi.com/journal/toxins)

**Bellioni-Businco, B., Paganelli, R., Lucenti, P., Giampietro, P.G., Perborn, H., Businco, L. (1999)** «*Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy*» **J Allergy and Clinical Immu**, 103 (6) p: 1191-1194.

**Bennett J.W. Klich M. (2003)** «*Mycotoxins*» **Clinical Microbiology Revue** 16 p: 497-516

**Berry (1988)** «*The pathology of mycology*» **J. Pathol**, 154 p: 301-311

**Berthiller F., P.A. Burdaspal, C. Crews, M.H. Iha, R. Krska, V.M.T. Lattanzio, S. MacDonald, R.J. Malone, C. Maragos, M. Solfrizzo, J. Stroka and T.B. Whitaker.** (2013) «*Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013*» **World Mycotoxin Journal**, 7 (1) p: 3-33

**Biancardi, A., Piro, R., Dall'Asta, C. and Galaverna, G.,** (2013) «*A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of aflatoxin M1 in milk*». **Food Additives and Contaminants Part A** 30 p: 381-388.

**Biehl M.L., Prelusky D.B, Koritz G.D., Hartin K.E., Buck W.B., Trenholm H.L.** (1993) «*Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs*». **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 121 p: 152-159.

**Bimezoka D. Doll S. Raua H. Goyarts T. Wundrackd N. Naumann M. Danicke S. Rothkotter H-J.** (2007) «*The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro*» **Immunobiology** 212 p: 655-666.

**Binder E.M., Tan L.M. Chin L.J. Handl J. Richard J.** (2007) «*Worldwide occurrence of Mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients*» **Animal Feed Science and Technology**, 137 p: 265-282

**Bhat R. Rai RV. Karim A.A.** (2010) «*Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns*» **Comprehensive reviews in food science and food safety** vol 9 p: 57-81.

**Blankenship L.T., Dickey J.F., Bodine A.B.** (1982) «*In vitro mycotoxin binding to bovine uterine steroid hormone receptors*» **Theriogenology**, 17 p: 325-329.

**Brase S., Encinas A., Keck J., Nising C.F.** (2009) «*Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites*» **Chem. Rev.** 109 p: 3903- 3990

**Bryden L. Wayne** (2007) «*Mycotoxins in the food chain: human health implications*». **Asia pac J Clin Nutr** 16 (Suppl 1) p: 95-101

**Bryden, W.L.** (2011) «*Mycotoxins: Natural Food Chain Contaminants and Human Health*». University of Queensland, Gatton, QLD, Australia. Elsevier, Burlington, MA, USA.

**Bullenman L.B.** (2000) «*Mycotoxins*» In: Robinson R.K. (Ed in Chief) Batt. CA and Patel P.D. (Eds) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic press, London UK p: 1512-1519

**Caggioni, C., Pietri, A.** (1999) «*Le aflatossine nel latte: dove nasce il problema e come prevenirlo*». **L' Informatore Agrario**. 45 (suppl. 55), p: 35–42.

**Cano-Sancho German, SoniaMarin, Antonio J.Ramos, JuanPeris-Vicenteand and Vicente Sanchis**, (2010) «*Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain)*», **Revista Iberoamericana de Micologia**, 27 (3) p:130–135

**Centers for Disease Control and Prevention CDCP** (2004). «*Outbreak of Aflatoxin Poisoning —Eastern and Central Provinces, Kenya, January–July 2004*». September 3, 2004, Vol. 53 / No. 34, p: 790-792. Available at:

<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5334a4.htm> (accessed July 4, 2017)

**Celik T.H., Sarimehmetoglu B., Kuplulu O.** (2005) «*Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk*», **Veterinarski Arhiv.**, 75(1) p: 57-65.

**Cheeke P.R.**, (1998) «*Natural toxicants infeds forages and poisonous plants*» 2nd Edition. Interstate Publishers Inc, Danville, IL, p: 87-136

**Chu S. Fun and Guo Y. Li**, (1994) «*Simultaneous Occurrence of Fumonisin B<sub>1</sub> and Other Mycotoxins in Moldy Corn Collected from the People's Republic of China in Regions with High Incidents of Esophageal Cancer*». **Applied and Environmental Microbiology**. p:847-852

**Chu F.S.** (2006). «*Mycotoxins and alimentary mycotoxicoses*», In: Riemann H.P. and Cliver D.O. (Eds). Food borne Infections and Intoxications – Third Edition. Academic Press, New York, NY. p: 583-661.

**Cigic I.K., Prosen H.** (2009) «*An Overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins*» **International Journal of Molecular Sciences**, 10 (1) p: 62-115.

**Craig A.M, Klotz L.J, Duringer MJ** (2015) «*Cases of ergotism in livestock and associated ergot alkaloid concentrations in feed*», **Front Chem** vol. 3 p: 8

**Creppy E.E., Baudrimont I., Betbeder AM.** (2002) «*Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant*». **Toxicology Letters**, 83 p: 869-877.

**Creppy E. Edmond** (2002) «*Update of survey, regulation and toxic effects of Mycotoxins in Europe*» **Toxicology Letters**, 127 p: 19-28

**Crowther, J.R.** (2009) «*The ELISA Guidebook*» Houmana Press, New Jersey, 2<sup>nd</sup> Edition

**Darsanaki Kazemi Reza and Marjan Miri.** (2013) «*Aflatoxin M1 Contamination in Dairy Products*», **Journal of Science and today's world**, volume 2, issue 5, p: 500-514.

**Dhanasekaran D., S. Shanmugapriya, N. Thajuddin and A. Panneerselvam** (2011) «*Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals*», Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology, Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-307-395-8,

InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxinsbiochemistry-and-molecular-biology/aflatoxins-and-aflatoxicosis-in-human-and-animals>

**Diaz D.E., Hagler W. M.Jr, Blackwelder J.T., Eve J.A., Hopkins B.A., Anderson K.L., Jones F.T., Whitlow L.W.** (2004) «*Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed*» **Mycopathologia**, 157 (2) p: 233-241.

**Diekman M.A. Green M.L.** (1992) «*Mycotoxins and reproduction in domestic livestock*» **Journal of Animal Science** (70) p: 1615-1627.

**Dragacci S., Gleizes E., Fremi J.M., Candlish A.A.G.** (1995) «*Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses*», **Food Additives & Contaminants**, 12(1) p: 59-65.

**Duringer J.M, Murty L.D. Craig A.M.** (2012) «*Endophyte Mycotoxins in animal health, in Phytochemicals, Plant Growth and the Environment*», ed Gang D.R. editor (New York, NY Springer) p: 37-58

**Dutton M.F.** (1996) «*Fumonisin, Mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects*». **Pharmacol. Ther.** (70) p: 137-161

**EFSA** (European Food Safety Authority) (2004) «*Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed*» **The EFSA Journal** (2204) (89) p: 1-35

**EFSA** (2012) «*Scientific opinion on ergot alkaloids in food and feed EFSA panel on contaminants in the food chain*» (CONTAM). **Eur. Food. Saf. Auth. J.**10, 2798 10.2903/j.efsa.2012.2798

**EFSA** (2012) «*Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed*» **EFSA Journal** 2012, 10(3):2605 p: 82

**El- Sayed Abd Alla A, Neamat -Allah A., Aly SE** (2000) «*Situation of mycotoxins in milk, dairy products and human milk in Egypt*». **Mycotoxin Res.** (16) p: 91-100

**Elsanhoty M. Raffat, Samir Ahmed Salam, Mohamed Fawzy Ramadan, Farid H. Badr.** (2014) «*Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria*» **Food Control** (43),p: 129-134.

**Elsayed, Magdy Sharaf and Eman Nabil Abd El-Fatah,** (2015) «*Prevalence of Aflatoxin M1 in Some Milk Products Widely Consumed by Infants and Children, Marketed in Sharkia, Egypt*», **Global Veterinaria** 14 (4) p: 560-566, 2015 ISSN 1992-6197

**Eriksen G.S., Pettersson H.** (2004). «*Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed*» **Anim.feed Sci. Technol.** 114(1-4) p: 205-239

**Ertas Nurhan, Zafer Gonulalan, Yeliz Yildirim, Fulden Karadal**, (2011) «*A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey*», **Food Control** Volume 22, Issue 12, December 2011, Pages 1956-1959

**Esser K. and Lemke P.A.** (1996) «*The Mycota IV, Human and Animal Relationships*», Springer (<https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-3-642-00286-1%2F1.pdf>)

**European Commission E.C.** (2003): Scientific Committee on Food, Updated opinion of the Scientific Committee, Fumonisin B1, B2 and B3, (2003)

**Eurostat 2015** «*Milk and milk products - 30 years of quotas. Historical data on the milk sector (1983-2013)* » Statistics in focus 4/2015; Author: Pol MARQUER ISSN: 2314-9647 Catalogue number: KS-SF-15-004-EN-N Available at: ([http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk\\_and\\_milk\\_products\\_-\\_30\\_years\\_of\\_quotas](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_products_-_30_years_of_quotas) [Προσπέλαση την 21/06/2017])

**Fakruddin Md, Abhijit Chowdhury, Md Nur Hossain and Monzur Morshed Ahmed.** (2015) «*Characterization of aflatoxin producing Aspergillus flavus from food and feed samples*» **SpringerPlus** 4 p: 159

**FAO/WHO**, (1977a) 'Code of principles concerning milk and milk products. Standard for flavoured yoghurt and products heat-treated after fermentation'. (Standard No a-11b, Step 7)

**Fazekas B, Tar A, Kovacs M.** (2005) «*Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary*», **Acta Veterinaria Hungarica** 53 p: 35-44

**Fazeli H. Mohammad Akbar Pirestani, Seyyed Nouredin Tabatabaei, Mohammad Antikchi, Mehdi Baabaei** ( 2011) «*Comparison of HPLC and Elisa for Determination of Aflatoxin Concentration in the Milk and Feeds of Dairy Cattle*», **Journal of Research in Agricultural Science** Vol. 7, No. 1 p :71-78

**Food and Drug Administration (U.S.)**, (2001) 'Background Paper in Support of Fumonisin Levels in Animal Feed: Executive Summary of this Scientific Support Document'

**FDA**, Mycotoxin Regulatory Guidance 2011. (PDF) (2011) 'A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters'. National Grain and Feed Association, [www.ngfa.org](http://www.ngfa.org)

**Firmin S., Morgavi D. P., A. Yiannikouris, and H. Boudra.** (2011) «*Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes*». **J. Dairy Sci.** 94 p: 5611–5619

**Fitenborg O., Frisvad J.C., Thrane U.** (1996). «*Moulds in food spoilage*» **International Journal of Food Microbiology** 33, p: 85-102

- Frazzoli Chiara, Paola Gherardi, Navneet Saxena, Giancarlo Belluzzi and Alberto Mantovani** (2017) «*The Hotspot for (Global) One Health in Primary Food Production: Aflatoxin M1 in Dairy Products*». **Frontiers in Public Health**. Volume 4, article 294.
- Frisval Jens. C. Thrane Ulf and Robert A. Samson.** (2007): «*Food Mycology, A Multifaceted Approach to Fungi and Food*» Jan Dijksterhuis Robert A. Samson (Eds), CRC Press, Taylor & Francis Group. Chapter 8, Mycotoxin producers: p: 135-139.
- Galvano F., Galofaro V., Galvano G.** (1996) «*Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review*». **J Food Prot**, 59 p: 1079-1090
- Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G. Horak, R.M. Vieggaar, R & Kriek, N.P.** (1988) «*Fumonisin –novel Mycotoxins with cancer-promoting activity produced by Fusarium moniliforme*». **Appl. Environ. Microbiol** 54: p: 1806-1811.
- Gilbert J. and E.Anklam,** (2002) «*Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs*», **Trends in analytical chemistry**, vol. 21, no 6+7, p: 468-486
- Gizachew Dawit, Barbara Szonyi, Azage Tegegne, Jean Hanson, Delia Grace,** (2016) «*Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia*». **Food Control** 59 (2016) p: 773-779.
- Goryacheva I., Rusanova T., Burmistrova N.A and De Saeger S.** (2009) «*Immunochemical Methods for the Determination of Mycotoxins*». **Journal Anal. Chem.** 64 (8) p: 768-785
- Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A.** (2001) «*Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Teleme cheese*». **Food Additives and Contaminants**, 18 p: 437-443.
- Govaris, A., V. Roussi, P.A. Koidis & N. A. Botsoglou** (2002) «*Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt*» **Food Additives and Contaminants**, Vol. 19 (11) p: 1043-50.
- Govaris A.,** (2009) «*Aflatoxins in foods of animal origin*» **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, 60(4) p: 534-543.
- Gougouli M. and Koutsoymanis K.P.** (2010) «*Modelling growth Of Penicillium expansum and Aspergillus niger at constant and fluctuating temperature conditions*». **International Journal of Food Microbiology** 140, p: 254-262
- Groopman D. John, Thomas W. Kensler,** (2005) «*Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer*». **Toxicology and Applied Pharmacology** 206, p: 131 – 137
- Gupta R.S.** (2007) «*Veterinary toxicology: “basic and clinical principles”*», Elsevier Inc, pp: 997-1003.



**Hajslova Jana, Milena Zachariasova, and Tomas Cajka.** (2011) «*Analysis of Multiple Mycotoxins in Food*», Jerry Zweigenbaum (ed.), *Mass Spectrometry in Food Safety: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 747, DOI 10.1007/978-1-61779-136-9\_10, © Springer Science+Business Media, LLC 2011, chapter 10, p:233-259

**He Jianwei , Ting Zhou, J. Christopher Young, Greg J. Boland, Peter M.Scott** (2010) «*Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review*» **Trends in Food Science & Technology** Volume 21, Issue 2, February 2010, Pages 67-76

**Haenlein G.F.W.,** (2004) «*Goat milk in human nutrition*» **Small Ruminant Research**, 51 p: 155-163

**Hedayati M. T., A. C. Pasqualotto, P. A. Warn, P. Bowyer and D. W. Denning** (2007) «*Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer*», **Microbiology** 153, p. 1677–1692

**Helferich W.G., Baldwin R.L., Hsieh D.P.** (1986) «*14C-aflatoxin B1 metabolism in lactating goats and rats*», **Journal of Animal Science**, 62 p: 697-705.

**Hendrickse R.G., Coulter J.B.S., Lamplugh, S.M.** (1982) «*Aflatoxin and Kwashiorkor: A study in Sudanese children*», **British Medical Journal**, 285(6345) p: 843-846

**Herzallah SM.** (2009) «*Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors*» **Food Chem** 114 p: 1141–6.

**Hetherington A. Clement & Raistrick Harold** (1931) «*Studies in the biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by Penicillium citrinum Thom*» **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** 220 p: 269-295

**Hietaniemi V. and Kumpulainen J.** (1991) «*Contents of Fusarium toxins in Finnish and imported grains and feeds*». **Food Additives and Contaminants** 8(2) p: 171-181

**Hui Y.H., Smith R.A., Spoerke D.G.** (2001) «*Foodborne Disease*». Handbook 2nd edition Revised and Expanded, Marcel Dekker Inc, p: 472-474

**Humpf Hans-Urlich, Voss A. Kenneth** (2004) «*Review: Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of Fumonisin Mycotoxins*» **Mol.Nutr. Food Res.** 48 p: 255-269

**Hussein H.S., Brasel J.M.,** (2001) «*Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals*» **Toxicology** 167 p: 101-134.

**IARC Monographs** (2012). «*Chemical agents and related occupations.A review on human Carcinogens*».Vol. 100F

([www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf](http://www.monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf))

**IARC** (2012) Agents classified by IARC Monographs, Vol. 1e104 International Agency for Research on Cancer, Available online at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>

**Ibáñez-Vea María, Elena Lizarraga, and Elena González-Peñas** (2011) «*Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC–MS*» **Food Control** Volume 22, Issue 8, August 2011, p: 1428-1434

**Iha Maria Helena, Cyrana Baltazar Barbosa, Isaura Akemi Okada, Mary W. Trucksess** (2013) «*Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and distribution and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during production and storage of yoghurt and cheese*». **Food Control** 29 p: 1-6

**(de) Iongh H, R. Vles, and P. de Vogel** (1964) «*The occurrence and detection of aflatoxin in food*», in Proceedings of the Symposium on Mycotoxins in Foodstuffs, G. H. Wogan, Ed., p. 235, MIT Press, Cambridge, Mass, USA.

**Issazadeh Khosro , Reza kazemi Darsanaki, Mohammad Reza Majid Khoshkholgh Pahlaviani** (2012) «*Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> levels in local yogurt samples in Gilan Province, Iran*» **Annals of Biological Research**, 2012, 3 (8) p:3853-3855.

**Iqbal Z. Shahzad, Muhammad R. Asi, Agustin Ariño.** (2017) «*Aflatoxins*», DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.06021-0.

**Jelinek C.F., Pohland A.E. and Wood G.E.** (1989) «*Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feed—an update*», **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 72 p:223-230.

**Jalili M., M. Scotter** (2015) «*A review of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid milk*», **Iranian Journal of Health, Safety & Environment**, Vol.2, No.2, p: 283-295.

**Kabak Bulent and Isil Var** (2008) «*Factors affecting the removal of aflatoxin M<sub>1</sub> from food model by Lactobacillus and Bifidobacterium strains*». **Journal of Environmental Science and Health, Part B.** Volume 43, issue 7 p.617-624

**Kaniou - Grigoriadou I, Eleftheriadou A, Mouratidou T. Katikou P.** (2005) «*Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese*» **Food Control**, 16 p:257-261.

**Kensler W. Thomas, Bill D. Roebuck, Gerald N. Wogan, and John D. Groopman** (2011) «*Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology*», **Toxicological Sciences** 120(S1), S28–S48

**Kew C. Michael,** (2013). «*Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma*». **J Gastrointestin Liver Dis**, September 2013 Vol. 22 No 3 p: 305-310.

**Khoury el André and Ali Atoui** (2010) «*Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status*» **Toxins** 2(4) p: 461-493

**Kiessling K.H.** (1986) «*Biochemical mechanism of action of mycotoxins*» **Pure Appl.Chem.**58 p: 327-338.

**Kocsubé Sándor, János Varga, Gyöngyi Szigeti, Nikolett Baranyi, Katalin Suri, Beáta Tóth, Éva Toldi, Tibor Bartók, Akos Mesterházy** (2013) «*ASPERGILLUS SPECIES AS MYCOTOXIN PRODUCERS IN AGRICULTURAL PRODUCTS IN CENTRAL EUROPE*». **Jour. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad**, No 124, p: 13-25.

**Kuhn D.M, Ghannoum M.A.** (2003) «*Indoor Mold, Toxigenic Fungi and Stachydotrys chartarum.Infectious Disease Perspective*» **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWES 2003**, 16, p: 144-172

**Kuiper – Goodman T. Scott P.M. and Watanabe H.** (1987) «*Risk assessment of the Mycotoxin zearalenone*» **Regul. Toxicol. Pharmacol.** Sep; 7(3) p: 253-306

**Kuiper – Goodman T.** (1990) «*Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: Aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone*». **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 68(7) p: 1017-24

**Kumar Pradeep, Dipendra K. Mahato, Madhu Kamle, Tapan K. Mohanta and Sang G. Kang** (2017) «*Review. Aflatoxins: a Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management*» **Journal Frontiers in Microbiology**, volume 7, Article 2170, doi:10.3389/fmicb.2016.02170

**Krogh P.,** (1992) «*Role of ochratoxin in disease causation*». **Food Chem Toxicol**, 30(3): p: 213-224

**Labbe R.G., Garcia, S.** (2001) «*Guide to foodborne pathogens*», John Wiley and Sons Inc, p: 41-45.

**Lapinskas V.,** (2007) «*A brief history of ergotism: from St. Antony's fire and St. Vitu's dance until today*» **Medicinos Teorija irPraktika**, 13(2) p: 202-206

**Lazzaro Irene, Falavigna C., Galaverna G., Dall' Asta C., Battilani P.** (2013) «*Cornmeal and starch influence the dynamic of Fumonisin B, A and C production and masking in Fusarium verticillioides and F. proliferatum*» **International Journal of Food Microbiology** 166, p: 21-27.

**Lewis L, Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Lubner G., Kieszak S., Nyamongo J., Backer L., Dayie AM., Misore A., DeCock K., Rubin C. and the Kenya Aflatoxicosis Investigation Group** (2005) «*Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastrern and central Kenya*». **Environ. Health Perspect** 113 (12) p: 1763-1767

**Li M.H, H.P. Li, and P.J. Li.** (1980) «*Research on esophageal cancer in China*» **Adv. Cancer Res.** 33 p:174-249.

- Lizárraga-Paulín G. Eva, Ernesto Moreno-Martínez and Susana P. Miranda-Castro** (2011) «*Aflatoxins and Their Impact on Human and Animal Health: An Emerging Problem*» Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology, Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-307-395-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/aflatoxins-and-their-impacton-human-and-animal-health-an-emerging-problem>
- Lombaert G.A, Pellaers P., Roscoe V., Mankotia M., Neil R., Scott P.M.** (2003) «*Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market*», **Food Additives & Contaminants: Part A** Volume 20, Number 5, May 2003, p: 494-504
- López, C., Ramos, L. L., Ramadán, S. S., Bulacio, L. C., & Perez, J.** (2001) «*Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated*» **International Journal of Food Microbiology**, 64, p: 211-215.
- Magan N. Aldred D. Mylona K.Lampert R.J.W.** (2010) «*Limiting Mycotoxins in stored wheat*» **Food Additives & Contaminants: Part A** May 2010, vol. 27 issue 5, p: 644-650.
- Magan N. A. Medina, D. Aldred** (2011) «*Possible climate- change effects on mycotoxin contamination of food crops pre – and postharvest*». **Plant Pathology** vol.60 issue 1 p: 150-163.
- Malissiova E., A. Tsakalof , I.S. Arvanitoyannis , A. Katsaflia, A. Katsioulis, P. Tserkezou, M. Koureas , A. Govaris , C. Hadjichristodoulou** (2013) «*Monitoring Aflatoxin M1 levels in ewe's and goat's milk in Thessaly, Greece; potential risk factors under organic and conventional production schemes*», **Food Control** 34, p: 241-248
- Manique R., Pena A., Lino C. Molta J, Manes J.** (2008) «*Ochratoxin A in the morning and afternoon portions of urine from Coimbra and Valencian populations*» **Toxicon** 51, Elsevier p: 1281-7
- Marin Sonia, Ramos J.A, Cano-Sancho G.Sanchis V.** (2012) «*Review\_Reduction of mycotoxins and toxigenic fungi in the Mediterranean basin maize chain*». **Phytopathologia Mediterranea** 51, No1, p: 93-118
- Martins M.L., Martins H.M.** (2004) «*Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal*». **Int J Food Microbiol**, 91 p: 315-317.
- Mauro Antonio, Paola Battilani, Peter J. Cotty.** (2014) «*Atoxigenic Aspergillus flavus endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize*» **BioControl** DOI 10.1007/s10526-014-9624-5.
- Medina Angel, Alicia Rodriguez and Naresh Magan** (2014) «*Effect of climate change on aspergillus flavus and aflatoxin B1 production*». **Frontiers in Microbiology** Vol.5 p: 348

- Miller David J.** (1995) «*Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research*» **Journal of Stored Product Research** 31 p: 1-6
- Miller David J.** (2008). «*Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges*». **Food Additives & Contaminants: Part A**, Feb2008, 25: 2, p: 219-230
- Mac Rae R. Robinson R.K. and Sadler M.J** (Eds) (1993) «*Encyclopaedia of Food Science*» **Food Technology and Nutrition**, vol. 5. Academic Press
- Moss, M.O.** (2002) «*Risk assessment of aflatoxins in foodstuffs*» **International Biodeterioration & Biodegradation** 50 (3) p: 137-142.
- Mousa W. Ghazali F.M. Jinap S. Ghazali H.M. Radu S.** (2011) «*Modeling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy*». **Journal of Applied Microbiology** 2011, 111, p: 1262-1274
- Newell, J.** (1983) «*Treatment for Starvation may kill*», **New Scientist Magazine**, p. 471.
- Nikbakht Mohammad Reza, Shima Lachiniyan, Saeid Rahbar, Farhad Oubari, Zahra Rostami and Ahmad Tajehmiri.** (2016) «*Aflatoxin M1 Contamination in Traditional Yoghurts Produced in Guilan Province, Iran*», **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care**, Vol 8(1), p: 1-3
- Norred W.P., Voss K.A., Riley R.T., Plattner R.D.** (1996) «*Fumonisin toxicity and metabolism studies in the USDA. Fumonisin toxicity and metabolism*» **Adv Exp Med Biol**, 392 p: 225-236.
- Olsen M., Malmlof K., Pettersson H., Grajewski J.,** (1991) «*Influence of dietary fibre on plasma and urinary levels of zearalenone and metabolites in swine*» **Mycotoxin Res.** 7 p: 8-11
- Oswald P.Isabelle, Clarisse Desautels, Joelle laffitte, Sylvie Fournout, Sylvie Y. Peres, Marielle Odin, Pierrette Le Bars, Joseph Le Bars, Jonh M. Fairbrother.,** (2003) «*Mycotoxin Fumonisin B<sub>1</sub> Increases Intestinal Colonization by Pathogenic *Escherichia Coli* in Pigs*», **Applied and Environmental Microbiology**, vol 69,No 10 p.5870-5874
- Oswald P.I, Marin DE, Bouhet S., Pinton P., Taranu I., Assenci F.,** (2005) «*Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals*». **Food Additives & Contaminants**, 22 p: 354-360.
- Oswailer G.D.** (1996) «*Occurrence and clinical manifestations of tricothecene toxicoses and zearalenone toxicoses*». In: Richards JL, Thurston JR (Eds.) *Diagnosis of Mycotoxicoses*, 1st Edition. Martins Nijhoff, Dordrecht, p.31-50
- Oswailer, G.** (2005) «*AFLATOXINS and ANIMAL HEALTH*», Iowa State University, pp. 1-4.

- Panahi Pourdad, Saeed Kasaee, Alireza Mokhtari, Amin Sharifi and Amirhossein Jangjou**, (2011) «*Assessment of Aflatoxin M1 Contamination in Raw Milk by ELISA in Urmia, Iran*» **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences** 3 (4) p: 231-233, 2011 ISSN 2079-2050
- Pandya A.J., Ghodke K.M.**, (2007) «Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt», **Small Ruminant Research**, 68(1) p: 193-206
- Patterson R. & Young L.G.** (1992) «*Using NovasilR to alleviate the effects of vomitoxin in moldy corn diets*» Ontario Swine Research Review, O. A. C. Publication, No 0292: 18.
- Paterson R.M. Robert, Lima Nelson** (2010) «*Toxicology of Mycotoxins*». **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology** Volume 2: Clinical Toxicology Edited by A. Luch, pp:31-63
- Paterson R.R.M., Lima N.** (2010) «*How will climate change affect mycotoxins in food?*» **Food Research International** 43, p: 1902-1914
- Pascale M, Visconti A.**, (2001) «*Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*». **Mycopathologia** 152 p: 91-95
- Pena A, Seifrtova M., Lino C., Silveira I, Solich P.** (2006) «*Estimation of ochratoxin A in Portuguese population: new data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection*». **Food and Chemical Toxicology Journal** 44 p: 1449-1454
- Peraica M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M.**, (1999) «*Toxic effects of Mycotoxins in humans*». Bulletin of the World Health Organization. (WHO) Vol.77 (9) p: 754-766.
- Peraica Maja, Darko Richter and Dubravka Rašić** (2014) «*Mycotoxicoses in children*». **Arh Hig Rada Toksikol** 2014; 65 p: 347-363
- Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M.** (1988) «*Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria*». **Food Additives & Contaminants**, 5 p: 299-301
- Pestka J.J.** (2007) «*Deoxynivalenol toxicity, mechanisms and health risks*» In: Morgavi D.P. Riley. R.T. (Eds). *Fusarium toxins: Presence in Feeds and Toxic Effects in Animals*.p: 211-241.
- Petzinger E, Ziegler K.** (2000) «*Ochratoxin A from a toxicological perspective*» **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** 23 p:91-98.
- Pierides M., El-Nezami H., Peltonen K., Salminen S., Ahokas J.**,(2000) «*Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model*». **Journal of Food Protection** 63 (5) p: 645-650

**Pitt J.I.** (1987) «*Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A» **Applied and Environmental Microbiology**, 53 p: 535-539.

**Polovinski-Horvatovic M., Juric V., Glamocic D.** (2009) «Two year study of incidence of aflatoxin M1 in milk in the region of Serbia». **Biotechnology in Animal Husbandry** 25 p: 713-718.

**Popovski Sasho & Franci Aco Celar** (2013) «The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium psciew* and Mycotoxin production- a review» **Acta agriculturae Slovenica** p: 101-116

**Prandini A., G.Tansini, S. Sigolo, L. Filippi, M. Laporta, G. Piva** (2008) «On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products» **Food and Chemical Toxicology** 47(5), p: 984-991

**Probst C., Bandyopadhyay R., Price L. E., and Cotty P. J.** (2011) «Identification of atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates to reduce aflatoxin contamination of maize in Kenya». **Plant Dis.** 95 p: 212-218

**Rahimi E., Bonyadian M., Rafei M., Kazemeini H.R.** (2010) «Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran» **Food Chem Toxicol.** 48 p: 129-131.

**Rahimi Ebrahim,** (2012) «Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Iran» **Toxicology and Industrial Health.** vol 30, Issue 8, p: 750-754, doi: 10.1177/0748233712462476

**Razzaghi-Abyaneh Mehdi, Masoomeh Shams-Ghahfarokhi and Perng-Kuang Chang** (2011) «Aflatoxins: Mechanisms of Inhibition by Antagonistic Plants and Microorganisms», Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology, Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-307-395-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/aflatoxins-mechanisms-ofinhibition-by-antagonistic-plants-and-microorganisms>

**Rheeder J.P., W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shepard and D.J. van Schalkwyk** (1992) «*Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophagal cancer in Transkei» **Phytopathology** 82 p:353-357

**Rheeder P. John, Walter F.O. Marasas, and Hester F. Vismer** (2002) «Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species» **Applied and Environmental Microbiology** vol.68 No5, p: 2101-2105

**Richard J.L.** (2007) «Some major Mycotoxins and their mycotoxicoses \_an overview» **Int.J.Food Microbiol.** 119 p: 3-10

**da Rocha, Maria Edite, Francisco da Chagas Oliveira Freire, Fabio Erlan Feitosa Maia, Maria Izabel Florindo Guedes, Davide Rondina,** (2014) «Mycotoxins and their effects on human and animal health» Elsevier , **Food Control** 36, p:159-165



**Robinson P. Timothy , G. R. William Wint, Giulia Conchedda Thomas P. Van Boeckel, Valentina Ercoli, Elisa Palamara, Giuseppina Cinardi, Laura D'Aiotti, Simon I. Hay, Marius Gilbert (2014) «Mapping the Global Distribution of Livestock», PLoS ONE 9(5): e96084. doi:10.1371/journal.pone.0096084**

**Rotter B.A., Prelusky D.B. Pestka J.J., (1996) «Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)». Journal of Toxicology Environmental Health, 48 p: 1-34**

**Roussi, V., Govaris, A., Varagouli, A., & Botsoglou, N.A., (2002) «Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece» Food Additives and Contaminants, Vol. 19, (9) p: 863-868.**

**Ruiquian L., Qian Y., Thanaboripat D. and Thansukon P. (2005) «Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production» Sci Tech J 4(1) p: 1-9**

**Sachnis V. Magan N. (2004) «Environmental profiles for growth and mycotoxin production». In: MaganN, OlsenM, eds. Mycotoxins in Food: Detection and Control, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, p: 174-89.**

**Saenz de Rodriguez C.A, A.M.Bongiovanni, L.Conde de Borrego (1985) «An epidemic of precocious development in Puerto Rican children». J Pediatr.107 p: 393-396.**

**Sarica Deniz Yurtsever, Okan Has , Serpil Taşdelen, Üstün Ezer, (2015) «Occurrence of Aflatoxin M1 in Milk, White Cheese and Yoghurt From Ankara, Turkey Markets» Biological and Chemical Research, Volume 2015, p: 36-49 | Science Signpost Publishing.**

**Serrano-Niño J.C., A. Cavazos-Garduño, A. Hernandez-Mendoza, B. Applegate, M.G. Ferruzzi, M.F.San Martin-González, H.S. García (2013) «Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model» Elsevier, Food Control 31 p: 202-207**

**Sforza S., C. Dall'Asta, R. Marchelli (2006) «Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry» Mass Spectrometry Reviews 25, p: 54-76**

**Shephard G.S., Thiel P.G, S. Stockenstrom, and E.W. Sydenham (1996) «Worldwide survey of fumonisin contamination of foods and feeds» J.Assoc. Off.Anal.Chem. 79 p: 671-687**

**Shephard G.S., F. Berthiller, P.A. Burdaspal, C. Crews, M.A. Jonker, R. Krska, S. MacDonald, R.J. Malone, C. Maragos, M. Sabino, M. Solfrizzo, H.P. Van Egmond and T.B. Whitaker (2012) «Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011». World Mycotoxin Journal, 5 (1) p: 3-30**

**Schiff L. Paul** (2006) «*Ergot and its Alkaloids*» **American Journal of Pharmaceutical Education** 70(5) p: 98

**Schlatter C.H. Struder-Rohr J. Rasonyi T.H.** (1996) «*Carcinogenicity and Kinetic aspects of ochratoxin A*», **Food Additives and Contaminants**, 13 p: 43-44

**Schoental R.** (1983) «*Precocious sexual development in Puerto Rico and oestrogenic Mycotoxins (zearalenone)* » **Lancet** i p: 537

**Smith E. Laura, Andrew J. Prendergast, Paul C. Turner, Jean H. Humphrey, and Rebecca J. Stoltzfus.** (2017) «*EFFECT OF AFLATOXIN EXPOSURE DURING PREGNANCY. Aflatoxin Exposure during Pregnancy, Maternal Anemia, and Adverse Birth Outcomes*», **The American journal of tropical medicine and hygiene** · March 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0730

**Sossidou Evangelia, Christina Ligda, Ioannis Mastranestasis, Demetrios Tsiokos, Foteini Samartzi.** (2013) «*Sheep and Goat Farming in Greece: Implications and Challenges for the Sustainable Development of Less Favoured Areas*». **Animal Science and Biotechnologies**, 46 (2) p: 446-449.

**Steyn P.S.** (1995) «*Mycotoxins general view, chemistry and structure*» **Toxicology Letters** vol. 82/3 p: 843-851

**Stoloff L., Egmond HP., Park DL.** (1991) «*Rationales for establishment of limits and regulations for mycotoxins*» **Food Additives Contaminants** 8 p: 213-222

**Szuetz P. Mesterhazy A. Falkay G. Y and Bartok T.** (1997) «*Early telearche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foodstuffs Cereals*» **Res. Commun** 25 p.429-436

**Tajik Hossein, Seyed mehdi Razavi Rohani and Mehran Moradi** (2007) «*Detection of aflatoxin M1 in raw and commercial pasteurized milk in Urmia, Iran*» **Pakistan Journal of Biological Sciences**, vol.10 issue:22 p:4103-4107

**Tavakoli Hamid Reza, Abolfazl Kamkar, Majid Riazipour, Amir Sasan Mozaffari Nejad and Hassan Rafati Shaldehi** (2012) «*Assessment of Aflatoxin M1 Levels by Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Yoghurt Consumed in Tehran, Iran*», **Asian Journal of Chemistry**; Vol. 25, No. 5 (2013), p: 2836-2838

**Tomaszewski, J., Miturski R, Semczuk A., Kotarski J, Jakowicki J.** (1998) «*Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium*» **Ginek Pol.** 69(5) p:363-366

**Tsakiris N.I. , M. N. Tzatzarakis, A. K. Alegakis, V. I. Vlachou, E. A. Renieri, A. M. Tsatsakis** (2013) «*Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market*» **Food Chem Toxicol.** 56, p: 261–265.

**Tzouramani Irene, Alexandra Sintori, Angelos Lontakis, Pavlos Karanikolas, George Alexopoulos** (2011) «*An assessment of the economic performance of organic dairy sheep farming in Greece*» **Livestock Science** 141 p: 136–142.

**Udomkun Patchimaporn, Alexander Nimo Wiredu , Marcus Nagle, Ranajit Bandyopadhyay, Joachim Müller, Bernard Vanlauwe,** (2017) «*Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook*» **Food Control** 72 p:110-122

**Udomkun Patchimaporn, Alexander Nimo Wiredu, Marcus Nagle, Joachim Müller, Bernard Vanlauwe, Ranajit Bandyopadhyay** (2017) «*Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application - A review*» **Food Control** 76 p: 127-138.

**Varga J., Kevei F., Rinyu E. Teren J. Kozakiewicz Z.** (1996) «*Ochratoxin production by aspergillus species*» **Applied and Environmental Microbiology**, 60 p: 4461-4464

**Vagra J., Frisvad JC, Samson RA.** (2009) «*A reappraisal of fungi producing aflatoxins*». **World Mycotoxin Journal** 2 p: 263-277

**Van de Merwe K.J., Steyne P.S., Fourie L.F. Scott D.B., Theron J.J.** (1965) «*Ochratoxin A, a toxin metabolite produced by Aspergillus Ochraceus*» **Wilh. Nature** 205 p: 1112-1113.

**Vasilieva L. and S.P. Durakis** (2015) «*Can antiviral therapies in patients with chronic hepatitis B prevent the development of hepatocellular carcinoma?* » **Archives of Hellenic Medicine** 2015, 32(5) p: 566-575

**Viridis, S., Corgiolu, G., Scarano, C., Pilo, A.L. & De Santis, E.P.L.** (2008) «*Occurrence of Aflatoxin M1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese*» **Food Control**, 19,p: 44-49.

**Virgili R. Simoncini N. Toscani T. Leggieri M.C. Formenti S. Battiliani P.,** (2012) «*Biocontrol of Penicillium nordicum. Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham*» **Toxins**, 4 p: 68-82.

**Voss K.A., Smith G.W., Haschek W.M.,** (2007) «*Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity*» **Animal Feed Science and Technology** 137, p: 299-325

**Xu Bao-jun, Xiao-qin Jia, Li-juan Gu, Chang-keun Sung** (2006) «*Review on the qualitative and quantitative analysis of the Mycotoxin citrinin*», Elsevier **Food Control** 17, p: 271-285

**Xu X-M, Monger W,Ritieni A. Nicholson P.** (2007) «*Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single or combinations of Fusarium species*» **Plant Pathology** 56, p: 943-956.

- Wacoo P. Alex., Deborah Wendi, Peter C. Vuzi, and Joseph F. Hawumba** (2014) «*Review Article, Methods of detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops*» **Journal of Applied Chemistry** Volume 2014, article ID 706291, 15 pages., <http://dx.doi.org/10.1155/2014/706291>
- Wan Lam Yim Murphy, Paul C. Turner, and Hani El- Nezami** (2013) «*Individual and combined cytotoxic effects of fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells*» **Food and Chemical Toxicology** 57 p: 276-283
- Wang, H., Zhou, X. J., Liu, Y.Q., Yang, H.M. & Guo, Q.L.** (2010) «*Determination of aflatoxin M1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry*» **Food Additives & Contaminants**, 27(9) p: 1261-1265
- Weidenborner M.**, (2001) «*Encyclopedia of Food Mycotoxins*», Springer-Verlag, p: 16
- WHO\_World Health Organization.** (2014) «*Food safety: a right or privilege. Understanding the importance of food safety to the food security and nutrition agenda*» In Second international conference on nutrition (ICN2).
- Wu Hui-Chen and Regina Santella**, (2012) «*The Role of Aflatoxins in Hepatocellular Carcinoma*» **Hepatitis Monthly** 2012; 12 (10 HCC): e7238. DOI: 10.5812/hepatmon.7238
- Yazar S., Omurtag G.**, (2008) «*Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals*» **International Journal of Molecular Sciences** 9(11), p: 2062-2090
- Yin Y.N. Yan LY., Jlang J.H. MA Z.H.** (2008) «*Biological control of aflatoxin contamination of crops*» **Journal of Zhejiang University SCIENCE B** 2008. 9, p: 787-792
- Zhang Xiujuan, Kamil Kuča, Vlastimil Dohnal, Lucie Dohnalová, Qinghua Wue, Chu Wua** (2014) «*Military potential of biological toxins*» **Journal of Applied Biomedicine** 12 (2014) p: 63 – 77
- Zheng Z. Michael, John L. Richard and Johann Binder** (2006) «*A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins*» **Mycopathologia** 161 p: 261–273 Springer 2006 DOI 10.1007/s11046-006-0215-6
- Zinedine Abdellah, Jose Miguel Soriano, Juan Carlos Molto, and Jordi Manes** (2007) «*Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone. An oestrogenic Mycotoxin*». **Food and Chemical Toxicology** 45 p.1-18
- Zollner Peter., Bernhard Mayer-Helm** (2006) «*Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry*» **Journal of Chromatography A** Vol. 1136, issue 2 p: 123-169