

# Oktratoksin A u grožđu i vinu

---

Pešić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:021646>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Jelena Pešić**

**6316**

**Okratoksin A u grožđu i vinu**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija vina

**Mentor:** Prof.dr.sc. Mara Banović

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

### **OKRATOKSIN A U GROŽĐU I VINU**

**Jelena Pešić, 0058199233**

**Sažetak:** U ovom radu izneseni su rezultati različitih istraživanja o prisutnosti okratoksina A u grožđu i vinu. Okratoksin A je mikotoksin kojeg proizvode neke plijesni roda *Aspergillus* (*A. ochraceus* i *A. carbonarius*) i *Penicillium* (*P. verrucosum*). Konzumacija ovog mikotoksina može biti uzrok različitim patologijama kod ljudi i životinja. Najčešći uzročnik kontaminacije vina okratoksinom A su plijesni roda *Aspergillus*. Prilikom primarne prerade grožđa, tijekom muljanja, okratoksin A iz micelija plijesni prelazi u mošt. Upravo zbog razlike u procesu prerade vina, tj. dužem trajanju kontakta bobice s moštom rizik kontaminacije okratoksinom A znatno je veći u crnim nego u bijelim vinima. Sva dosadašnja istraživanja pokazala su da su vina južnih, toplijih krajeva bitno izloženija riziku kontaminacije. U Europi je u mediteranskom području kontaminacija okratoksinom A česta, dok je u vinima sjevernijih dijelova rjeđe zabilježena.

**Ključne riječi:** grožđe, mikotoksini, okratoksin A, plijesni, vino,

**Rad sadrži:** 33 stranice, 6 slika, 6 tablica, 60 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof.dr.sc. Mara Banović

**Pomoć pri izradi:** Prof.dr.sc. Mara Banović

**Datum obrane:** 8 rujna, 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of food engineering**  
**Laboratory for Technology and Analysis of Wine**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food technology**

### **Ochratoxin A in grapes and wine**

**Jelena Pešić, 0058199233**

**Abstract:** This paper presents the results of various studies on the presence of ochratoxin A in grapes and wine. Ochratoxin A is a mycotoxin produced by some *Aspergillus* (*A. ochraceus* and *A. carbonarius*) and *Penicillium* (*P. verrucosum*) mold. Consumption of this mycotoxin may be the cause of various pathologies in humans and animals. The most common cause of wine contamination with ochratoxin A is the *Aspergillus* mold. During primary grape processing, pressing of the grapes, ochratoxin transfers from mold mycelia into grape juice. Because of the difference in the wine processing, the longer duration of the contact with berries, the risk of contamination with ochratoxin A is considerably higher in red than in white wines. All previous studies have shown that wines from southern, warmer regions are significantly more exposed to risk of contamination. In Europe, contamination with ochratoxin A is common in the Mediterranean area, while it is rarely found in the vineyards in the northern parts.

**Keywords:** grapes, mycotoxins , mold, ochratoxin A, wine,

**Thesis contains:** 33 pages, 6 figures, 6 tables, 60 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD. Mara Banović

**Technical support and assistance:** Ph. D. Mara Banović

**Defence date:** September 8<sup>th</sup> 2017.

## **1 Sadržaj**

|       |                                                                                   |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2     | UVOD .....                                                                        | 1  |
| 3     | TEORIJSKI DIO .....                                                               | 2  |
| 3.1   | Okratoksin A .....                                                                | 2  |
|       | Analozi okratoksina A .....                                                       | 4  |
|       | Biosinteza OTA .....                                                              | 5  |
| 3.2   | Utjecaj na zdravlje.....                                                          | 6  |
| 3.2.1 | Toksikološki profil .....                                                         | 6  |
| 3.2.2 | Hrana kao izvor zaraze s OTA .....                                                | 7  |
| 3.3   | Izvori OTA u grožđu .....                                                         | 9  |
| 3.4   | OTA u vinu .....                                                                  | 13 |
| 3.5   | Rasprostranjenost OTA kontaminacije vina s obzirom na zemljopisno porijeklo ..... | 15 |
| 3.6   | Kontrola i prevencija razvoja mikotoksina (OTA) .....                             | 18 |
| 3.6.1 | Mjere kontrole i prevencije u vinogradu .....                                     | 18 |
| 3.7   | Uklanjanje OTA iz vina.....                                                       | 23 |
| 4     | Zaključak .....                                                                   | 28 |
| 5     | Literatura .....                                                                  | 29 |

## 2 UVOD

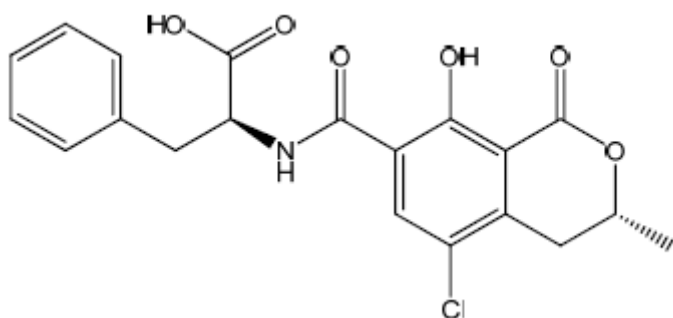
Okratoksini su grupa mikotoksina koji nastaju kao sekundarni metaboliti nekoliko plijesni roda *Aspergillus* ili *Penicillium* i slabe su organske kiseline koje se sastoje od derivata izokumarina. Ovu skupinu mikotoksina predstavljaju tri okratoksina: A, B i C, od kojih se svaki razlikuje po kemijskoj strukturi. Okratoksin A je najtoksičniji predstavnik skupine okratoksina. Okratoksin A je nefrotoksičan mikotoksin koji također djeluje kancerogeno, teratogeno, neurotoksično te imunosupresivno. Internacionalna agencija za istraživanje raka (IARC 1993) klasificirala je OTA kao mogući uzročnik karcinoma kod ljudi (grupa 2B). OTA može kontaminirati široku paletu hrane kao posljedica infekcije usjeva plijesnima, na polju tijekom rasta, prilikom berbe, u skladištu te transportu u povoljnim uvjetima okoline za razvoj i kontaminaciju mikotoksina (Lasram i sur., 2012). Otkriven je u širokom rasponu sirovina, uključujući žitarice, kavu, grožđe, groždice, mošt i vino. Unutar proizvoda od grožđa i groždica, crna vina i slatka vina kontaminirana su najvišom razinom OTA. Grožđe je podložno napadu insekata i plijesni tijekom zrenja i nakon berbe (Valero, 2007). Plijesni koje proizvode okratoksin A u većini slučajeva ne mogu prodrijeti u bobicu grožđa, već se zadržavaju oko peteljke. Prilikom oštećenja bobice, uvjetovanog biološkim ili fizičkim faktorima kao što su npr. insekti i primarna prerada grožđa, micelij plijesni kolonizira bobicu i ispušta okratoksin A u mošt. Kontaminacija okratoksinom A puno je veća kod crnih vina nego kod bijelih zbog razlike u procesu proizvodnje vina, kod crnih vina duže je trajanje kontakta bobice s moštom. Klimatski uvjeti su bitan faktor koji utječe na kontaminaciju. Za razvoj plijesni koje proizvode okratoksin A pogoduju visoka vlaga, temperatura i zemljopisni položaj.

Cilj ovog rada je bio opisati okratoksin A (njegovu strukturu, biosintezu i toksičnost), s posebnim naglaskom na njegovu prisutnost u grožđu i vinu te mogućnosti njegove prevencije i redukcije.

## 3 TEORIJSKI DIO

### 3.1 Okratoksin A

Okratoksin A (OTA) je mikotoksin koji nastaje kao produkt u sekundarnom metabolizmu mnogih nitastih vrsta iz rodova plijesni *Aspergillus* i *Penicillium* i potječe od 3,4-dihidroizokumarina vezanog amidnim vezama na amino grupe L-β-fenilalanina (Russo i sur., 2016). Kemijska struktura Okratoksina A je 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-(3R)-metil izokumarin, amidno vezan s L-β-fenilalaninom (slika1) (Valero, 2007).



Slika 1. Kemijska struktura okratoksina A (Šošo i sur., 2012).

Prvi put je izoliran 1965. godine kao stabilan sekundarni metabolit *Aspergillus ochraceus*, tijekom opsežnog istraživanja na metabolitima plijesni radi pronalaska novih mikotoksina. Nedugo nakon toga, OTA je pronađen u uzorku kukuruza u SAD-u. Međunarodna agencija za istraživanje raka IARC (IARC, 1993) definirala je OTA kao potencijalni kancerogeni agens za osobe te ga svrstala u skupinu kancerogenih tvari 2B. OTA pokazuje potencijalno nefrotoksično, kancerogeno, imunotoksično, teratogeno i mutageno djelovanje, te također smeta fiziološkom stanju stanice na različite načine (Šošo i sur., 2012) prije svega inhibirajući enzime odgovorne za sintezu fenilalanin tRNA kompleksa. Osim toga, inhibira proizvodnju mitohondrijske ATP te potiče lipidnu peroksidaciju (Bennet i Klich, 2003). Postoji mišljenje da je OTA uzročnik bolesti pod nazivom Balkan Endemic Nephropathy (BEN) (endemska nefropatija) i može promicati rak mokraćnog trakta. BEN je kronični nefritis koji se često pojavljuje kod populacija koje žive na područjima koje graniče s Dunavom i rijekom Savom u dijelovima Rumunjske, Bugarske, Srbije i Hrvatske (Delaš, 2010). Pronađen je u mnogim prehrambenim sirovinama, uključujući žitarice, grožđe, kakao, kavu te začine i začinsko bilje.

Njegova prisutnost u alkoholnim napitcima je najčešća u crnim i bijelim vinima (Russo i sur., 2016).

Zbog svoje kemijske strukture, fenilalanin-dihidroizokumarin derivat, OTA je vrlo otporan na grijanje i hidrolizu (Bennet i Klich, 2003). OTA može biti potpuno hidroliziran jedino grijanjem pod refluksom iznad 48 h u 6 mol L<sup>-1</sup> octenoj kiselini. Enzim karboksipeptidaza A, prisutan kod sisavaca hidrolizira ga u fenilalanin i netoksični okratoksin. Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, OTA se lako apsorbira iz gastrointestinalnog trakta, a njegova bioraspoloživost je iznad 50% u svim ispitivanim sisavcima. OTA pokazuje visok afinitet prema plazmatskim proteinima, što podrazumijeva dugu postojanost unutar organizma. Toksin se može ukloniti bubrežnim i hepatocelularnim putem, kao i kroz lučnu sekreciju. Kronično gutanje OTA uzrokuje bubrežni toksični učinak kod svih testiranih monogastričnih sisavaca (Valero, 2007).

### **Fizikalno-kemijska svojstva OTA**

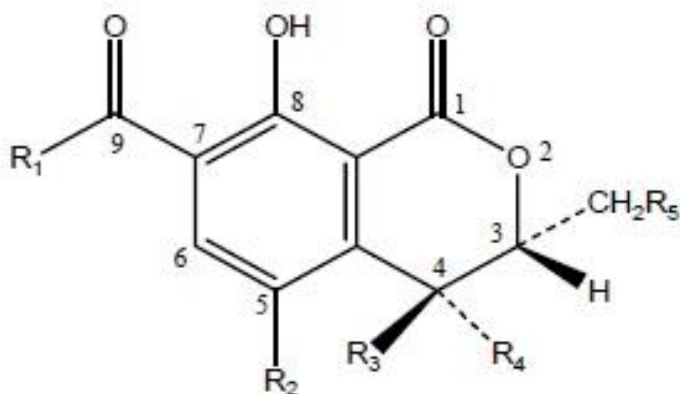
Okratoksin A je molekula kristalne strukture koja varira od bezbojne do bijele boje, molekulske formule C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>6</sub>. Slaba je organska kiselina čiji pK<sub>a</sub> iznosi 7.1, a molarna masa 403,8 g mol<sup>-1</sup>. Također molekule OTA posjeduju intenzivnu fluorescenciju pod UV svjetlom u kiselom mediju i plavu fluorescenciju u alkalnim uvjetima (Bredenkamp i sur., 1989; El Khouri i Atoui, 2010; Miller i Trenholm, 1994).

U kiselom i neutralnom pH, OTA je topljiv u polarnim organskim otapalima (alkoholi, ketoni, kloroform), slabo topiv u vodi, naftnim eterima i zasićenim ugljikovodicima, a netopljiv je u petroleteru. Dok je u lužnatoj sredini molekula topljiva u vodenoj otopini natrijevog hidrogenkarbonata i općenito u svim alkalnim otopinama. Ima talište od oko 90 °C kada kristalizira iz benzena kao otopine. Međutim, ne otopljeni kristali imaju talište od 169 °C i dobiveni su iz ksilena koji su pogodni za rendgensku strukturnu analizu. Posebnost OTA je njegova visoka stabilnost. Dokazano je da posjeduje otpornost na pH i visoke temperature. Dakle, kad je hrana kontaminirana OTA, vrlo je teško potpuno ukloniti ovu molekulu (El Khouri i Atoui, 2010). Dokazana je samo djelomična razgradnja OTA pri normalnim uvjetima kuhanja. Osim toga, ovaj spoj može izdržati tri sata pod visokim tlakom pare prilikom sterilizacije pri 121 °C (Triverdi i sur., 1992) pa čak i pri 250 °C njegova razgradnja nije dovršena (Boudra i sur., 1995).



## Analози okratoksina A

Identificirano je nekoliko metabolita povezanih s OTA, posebno, okratoksin B (OTB) besklorni analog OTA, okratoksin C (OTC) koji je etil ester, te okratoksin  $\alpha$  kao izokumarinski derivat OTA ( $OT\alpha$ ) i njegov besklorni analog okratoksin  $\beta$  ( $OT\beta$ ). Slika 2 prikazuje opću strukturu koja je zajednička ovim različitim metabolitima, a Tablica 1 prikazuje karakteristični sastav svake od njih. Nedavno su karakterizirani novi derivati metabolita izvedeni iz OTA, koji uključuju besklorni derivat okratoksina A identificiranog s nono-ESI-IT-MS i metabolit kinon/ hidrokinon koji pokazuju toksikološka svojstva. Osim toga, predviđeno je da će OTA formirati benzokinon elektrofil nakon aktivacije enzimima citokroma P450, i radikalne vrste nakon aktiviranja enzimima s aktivnosti peroksidaze (El Khouri i Atoui, 2010).



Slika 2. Opća struktura analoga metabolita okratoksina A (El Khouri i Atoui, 2010).

Tablica 1. Karakteristična kompozicija analoga okratoksina A (El Khouri i Atoui, 2010).

| IME                       | R1                                    | R2 | R3 | R4 | R5 |
|---------------------------|---------------------------------------|----|----|----|----|
| Prirodni okratoksini      |                                       |    |    |    |    |
| Okratoksin A              | Fenilalanin                           | Cl | H  | H  | H  |
| Okratoksin B              | Fenilalanin                           | H  | H  | H  | H  |
| Okratoksin C              | Etil-ester, Fenilalanin               | Cl | H  | H  | H  |
| Okratoksin A Metil-ester  | Metil-ester, Fenilalanin              | Cl | H  | H  | H  |
| Okratoksin B Metil-ester  | Metil-ester, Fenilalanin              | H  | H  | H  | H  |
| Okratoksin B Etil-ester   | Etil-ester, Fenilalanin               | H  | H  | H  | H  |
| Okratoksin $\alpha$       | OH                                    | Cl | H  | H  | H  |
| Okratoksin $\beta$        | OH                                    | H  | H  | H  | H  |
| 4-R-Hidroksiokreatoksin   | Fenilalanin                           | Cl | H  | OH | H  |
| 4-S-Hidroksiokreatoksin A | Fenilalanin                           | Cl | OH | H  | H  |
| 10-Hidroksiokreatoksin A  | Fenilalanin                           | Cl | H  | H  | H  |
| Tirozin analog OTA        | Tirozin                               | Cl | H  | H  | OH |
| Serin analog OTA          | Serin                                 | Cl | H  | H  | H  |
| Hidroksiprolin analog OTA | Hidroksiprolin                        | Cl | H  | H  | H  |
| Lizin analog OTA          | Lizin                                 | Cl | H  | H  | H  |
| Sintetski okratoksini     |                                       |    |    |    |    |
| d-okratoksin A            | d-fenilalanin                         | Cl | H  | H  | H  |
| Okratoksin A etil amid    | Etil amid, Fenilalanin                | Cl | H  | H  | H  |
| O-metil okratoksin A      | Fenilalanin, OHCH <sub>3</sub> na C-8 | Cl | H  | H  | H  |

## Biosinteza OTA

Iako je mnogo informacija koje se odnose na različita toksikološka svojstva OTA, za razliku od drugih važnih mikotoksina, put biosinteze OTA nije toliko poznat u nijednoj od vrsta plijesni. Općenito se smatra da je izokumarinska skupina pentaketid formirana od poliketid acetata i malonata preko poliketid sintaze. Stoga se poliketid sintaza (PKS) smatra ključnim enzimom uključenim u biosintezu OTA. Heterolitički dio OTA strukturno je sličan meleinu, sekundarnom metabolitu kojeg proizvode mnoge vrste plijesni koje proizvode i OTA. Tri različita koraka pojavljuju se u procesu biosinteze OTA (El Khouri i Atoui, 2010).

Prvi korak je sinteza poliketidnog okratoksina A preko meleina koji uključuje PKS.

Drugi korak uključuje aktivaciju acilne skupine: melein se metilira i oksidira do 7-karboksi-melein (=O $\beta$ ). Kloriranje kloroperoksidazom dovodi do nastajanja O $\alpha$ . Ova komponenta se zatim pretvara u miješani anhidrid reakcijom aktiviranja pomoću ATP-a. Drugi prekursor fenilalanin se sintetizira preko puta šikiminske kiseline, nakon čega slijedi etil-ester aktivacija tako da može sudjelovati u kasnijoj reakciji pomaka acilne skupine.

U trećem koraku, povezivanjem ovih aktiviranih prekursora pomoću enzima sintetaze dolazi do generiranja OTC, etil estera OTA: de- esterifikacija pomoću esteraza ili transesterifikacija posljednji je korak na putu biosinteze OTA (Huff i Hamilton, 1979; El Khouri i Atoui, 2010).

## **3.2 Utjecaj na zdravlje**

### **3.2.1 Toksikološki profil**

Toksikološki status OTA je ispitan mnogo puta i bio je predmet cjelovite monografije od strane IARC-a (Međunarodna agencija za istraživanje raka) (IARC, 1993). OTA je najviše toksičan i relevantan za poznate okratoksine. Međutim, neki smatraju da je OTC jednako toksičan kao i OTA jer, kada se proguta, brzo se pretvara u OTA, koji ostaje kod odraslih preživača i čini se kao da je to uzrok svinjske nefropatije, humane balkanske endemske nefropatije (BEN) i kronične intersticijalne nefropatije (CIN) u Sjevernoj Africi. OTA je također klasificiran kao mogući kancerogen na ljude (skupina 2B) jer postoje dokazi za pokusne životinje, ali ne i za ljude (Abrunhosa i sur., 2010). Zapažena je koincidencija i smrtnost od tumora mokraćnog sustava u korelaciji sa zemljopisnom distribucijom BEN u Bugarskoj i bivšoj Jugoslaviji (Feier i sur., 2009). Nakon otkrića ljudskih i životinjskih spontanijih nefropatija mnoga eksperimentalna istraživanja provedena su kako bi se dokazala mogućnost zaraze okratoksinom A kod ovih bolesti. Ova istraživanja pokazala su da ta molekula može imati nekoliko učinaka kao što su nefrotoksični, hepatotoksični, neurotoksični, teratogeni, neurotoksični i imunosupresivni učinak na nekoliko vrsta životinja, a može izazvati i bubrežne i jetrene tumore kod miševa i štakora. Dokazano je da primjena OTA kod štakora inducira brojne malformacije u središnjem i živčanom sustavu (El Khoury i Atoui, 2010). Na isti se način, OTA, može smatrati kao mogući uzrok nekih lezija kao oštećenja na moždanoj razini (Soleas i sur., 2001). Pod određenim uvjetima, OTA predstavlja snažan imunosupresivni učinak, koji je primijećen pri niskim ili visokim koncentracijama. OTA se smatra kumulativnim toksičnim spojem, jer se lako apsorbira kroz želudac i tanko crijevo, te se gotovo jedva eliminira putem žučnih i mokraćnih puteva. Njegova toksičnost ovisi o spolu, vrsti i staničnom tipu ispitivanih životinja. Genotoksični status OTA je još uvijek kontroverzan, zbog kontradiktornih rezultata dobivenih različitim testovima na mikroorganizmima i sisavcima (El Khoury i Atoui, 2010). Na temelju dostupnih znanstvenih toksikoloških podataka i podataka o izloženosti, Europska Unija je uredbom Commission Regulation (EC) No. 123/2005 utvrdila najveće dopuštene količine okratoksina A od 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za vino, groždani sok, groždani nektar i mošt te 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za groždice (EC, 2005). Znanstveno vijeće za kontaminante u prehrambenom lancu iz EFSA (European Food Safety Authority) je

2006. godine utvrdilo prihvatljiv tjedni unos OTA od 120 ng kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, uzimajući u obzir dostupne toksikološke podatke (EFSA, 2006). Brojna istraživanja su zabilježila visoku učestalost prisutnosti OTA u vinu, međutim količine su u rijetkim slučajevima bile tolike da bi predstavljale zdravstveni rizik (Dachery, 2016).

### 3.2.2 Hrana kao izvor zaraze s OTA

Prema FAO (Food and Agriculture organisation) više od 25% hrane proizvedene diljem svijeta kontaminirano je do neke mjere mikotoksinima. Međutim, koincidencija njihove kontaminacije i koncentracije varira ovisno o dobu godine i geografskom području. OTA je mikotoksin koji kontaminira širok spektar različite hrane kao što su žitarice, pivo, vino, kava, kakao, grožđe, začini, riža, kukuruz, što nema samo posljedice na ljude već i na životinje. Primjeri različitih mikotoksina i najčešće zahvaćenih namirnica prikazane su u Tablici 2 (Lerda i sur., 2017; Kontaxakis, 2013). Prehrambeni proizvodi sa najvećom prisutnosti OTA su raž i drugi pripadnici žitarica te proizvodi od kakaa (između 50-80%), a slijedi ih suho voće (73%). Otprilike pola od ukupnih komercijaliziranih vina kontaminirano je OTA. Prisutnost OTA u nekim prehrambenim proizvodima Europske Unije prikazana je u tablici 3 (Valero, 2007).

Tablica 2. Glavni mikotoksini i najčešće zahvaćene sirovine (Kontaxakis i sur., 2013)

| MIKOTOKSINI         | ZAHVAĆENE SIROVINE                                                                                                                                    |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AFLATOKSINI         | Žitarice, začini, sjeme pamuka, kopra, suho voće i orašasti plodovi, polupreradena hrana, jaja, tjestenina, kruh, mlijeko, sir                        |
| <b>OKRATOKSIN A</b> | Žitarice, grožđe, vino, suho voće, orašasti plodovi, začini, kava, kakao, meso, masline, maslinovo ulje, čajno bilje, medicinske biljke, sladić, ocat |
| TRIHOTOKSIN         | Kukuruz, pšenica, ječam, zob, riža, raž                                                                                                               |
| ZGARALENON          | Kukuruz, pšenica, ječam, šećerna trska, raž                                                                                                           |
| FUMONIZINI          | Kukuruz, šećerna trska i riža                                                                                                                         |
| PATULIN             | Svježe voće, sok od jabuke, sok od kruške, sok od grožđa, jabukovača, pire, hrana za dojenčad, rajčice                                                |

Brojna istraživanja izvještavaju o velikoj rasprostranjenosti OTA u različitim prehrambenim proizvodima, pa tako i izloženost ljudi tom mikotoksinu, uslijed konzumiranja namirnica kontaminirane s OTA. Prema pokazateljima Europske komisije procjena prehrambenog unosa OTA u ljudskoj prehrani najčešća je iz žitarica i proizvoda od žitarica (Visconti i sur., 2008). Žitarice su najvažniji izvor ljudske prehrane. Godišnji svjetski prinos žitarica premašuje 2.000

milijuna tona, što znači više od 160 kg po stanovniku, a proizvodnja još uvijek raste (El Khoury i Atoui, 2010). U istraživanjima koje je proveo Pittet (1998) na svjetskoj razini oko 25-40% žitarica kontaminirano je mikotoksinima.

Tablica 3. Prisutnost OTA u nekim prehrambenim proizvodima Europske Unije (Valero, 2007).

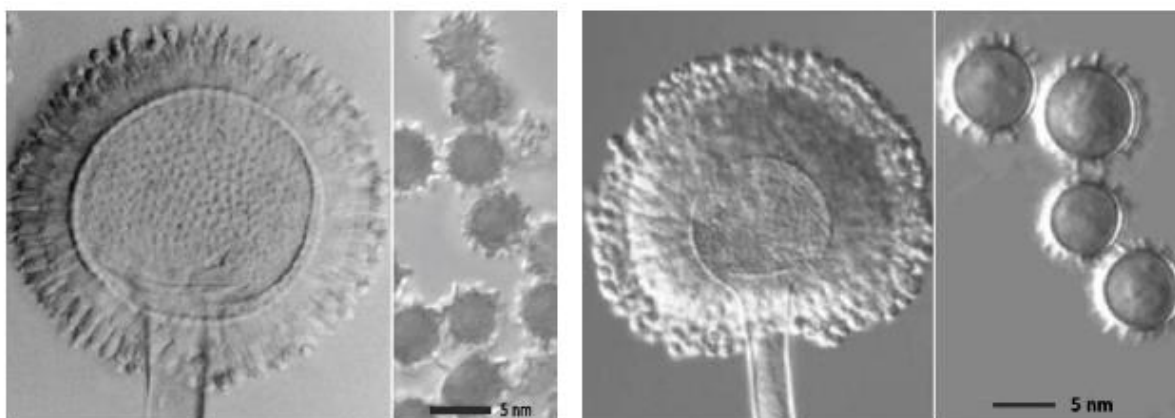
| <b>NAMIRNICE</b>                 | <b>UKUPNI UZORCI</b> | <b>% POZITIVNIH UZORAKA</b> |
|----------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| maslinovo ulje                   | 12                   | 8,3                         |
| hrana za dojenčad                | 103                  | 67,0                        |
| riža                             | 68                   | 13,2                        |
| zob                              | 165                  | 30,3                        |
| kakao i proizvodi od kakaa       | 547                  | 81,4                        |
| kava                             | 1205                 | 47,3                        |
| zelena kava                      | 1761                 | 36,7                        |
| meso i mesni proizvodi           | 1828                 | 18,2                        |
| ječam                            | 142                  | 23,9                        |
| raž                              | 444                  | 53,2                        |
| raž i derivati                   | 242                  | 88,0                        |
| žitarice i proizvodi od žitarica | 2212                 | 69,8                        |
| pivo                             | 496                  | 32,7                        |
| <b>suho voće</b>                 | <b>800</b>           | <b>72,8</b>                 |
| mlijeko i mliječni proizvodi     | 565                  | 9,2                         |
| kukuruz                          | 139                  | 8,6                         |
| slad                             | 9                    | 0,0                         |
| proso                            | 34                   | 70,6                        |
| proso i derivati                 | 81                   | 8,6                         |
| voćni proizvodi                  | 353                  | 41,6                        |
| mekinje                          | 53                   | 35,8                        |
| pšenica                          | 867                  | 31,7                        |
| pšenični proizvodi               | 608                  | 61,0                        |
| <b>vino</b>                      | <b>1680</b>          | <b>52,1</b>                 |
| <b>UKUPNO</b>                    | <b>18599</b>         | <b>48,8</b>                 |

Žitarice se smatraju glavnim izvorom kontaminacije OTA te se preko njih ostvaruje oko 50 % dnevnog unosa OTA u ljudski organizam (Vega i sur., 2009). Kao drugi najčešći izvor OTA u ljudskoj prehrani smatra se vino sa oko 10-15% od ukupnog dnevnog unosa. Kontaminacija OTA zabilježena je u raznovrsnoj hrani kao što su: kava, mahunarke, začini, meso, proizvodi od sira, kao i neka pića od kojih se može izdvojiti pivo, već spomenuto vino, voćni sokovi, kao rezultat upotrebe kontaminirane sirovine za njihovu proizvodnju (El Khoury i Atoui, 2010; Rubert i sur. 2011). Pivo je proizvod dobiven alkoholnom fermentacijom, uglavnom se proizvodi od ječma, isključivo ili pomiješan s drugim žitaricama, škrobnih tvari, kvasca i vode. Pivo je treći po redu od najviše konzumiranih pića diljem svijeta, nakon vode i čaja (Bellver i sur., 2014). Budući da sok od grožđa konzumiraju prvenstveno djeca, razina OTA u ovom

proizvodu također se istražuje i često se pokazala većom od dopuštene (Miraglia i Brera, 2002; Chulze i sur., 2006). Također je primijećena i OTA kontaminacija octa. Zabilježene su veće koncentracije u crvenom octu nego u bijelom (Varga i Kozakiewicz, 2006).

### 3.3 Izvori OTA u grožđu

OTA je izvorno opisan kao metabolit *Aspergillus ochraceus*, a provedena istraživanja pokazala su da je više različitih vrsta plijesni uključeno u rodove *Aspergillus* i *Penicillium*, sposobno proizvesti okratoksin A. Naime, *Aspergillus* i *Penicillium verrucosum* vrste smatraju se kao glavne vrste koje proizvode OTA. *P. verrucosum* proizvodi OTA u umjerenim i hladnim klimama te se gotovo isključivo javlja u žitaricama i proizvodima od žitarica dok je *A. ochraceus* češće povezan sa toplijim i tropskim klimama, uglavnom u uskladištenoj hrani (Cabanes i sur., 2002). Plijesni *Aspergillus*, vrste *Aspergillus Nigri* i *Aspergillus carbonarius* su glavni proizvođači OTA (slika 3). Često se nalaze na grožđu te proizvode OTA u proizvodima od grožđa, uključujući sok od grožđa, vina i suhog voća, a ponekad i kave (El Khoury i Atoui, 2010).



Slika 3. *A. niger* (lijevo) i *A. carbonarius* (desno) (Pitt i Hocking, 2009).

Druge *Aspergilli* vrste mogu proizvesti OTA u velikim količinama, ali čini se da su relativno rijetke. Od *Aspergillus* plijesni vrste *Circumdati* (bivša *Aspergillus ochraceus* skupina), sljedeće vrste mogu proizvoditi OTA: *Aspergillus cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus* i *Neopetromyces muricatus* (Frisvad i sur., 2004). Prema nekim istraživanjima *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. petrakii* mogu proizvesti OTA u tragovima, ali to nije potvrđeno. U rodu *Penicillium*, *P. verrucosum* se smatra jedinom vrstom roda *Penicillium* koja ima svojstvo sinteze OTA. Međutim, pokazalo se da dvije vrste iz

roda *Penicillium* imaju tu sposobnost: *P. verrucosum* i *P. nordicum*. *Penicillium nordicum* je glavni proizvođač OTA pronađen u mesnim proizvodima, kao što su salame i šunke (El Khoury i Atoui, 2010).

Toksični sojevi *A. ochraceus* samo su povremeno izolirani iz grožđa. Neka istraživanja na području Mediterana, Južne Amerike i Afrike pokazala su da je glavni izvor okratoksina A u vinu prisustvo takozvane „crne plijesni“ koja se javlja na određenom vinogradarskom području. „Crna plijesan“ uključuje vrste iz roda *Aspergillus*: *Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*, koje su izolirane na bobicama grožđa ovisno o oštećenju bobice u zrenju, i do berbe mogu proizvesti OTA na grožđu (Visconti i sur., 2008). Plijesni vrste *Aspergillus Nigri*, također su poznate kao „crne plijesni“ i raširene su u tlu diljem svijeta. *Aspergillus spp.* mogu biti pronađene u širokom spektru u hrani i tlu pa tako i u vinogradarskim proizvodima (grožđe, vino, suho voće i ocat), gdje je *A. carbonarius* (slika 4) pretežno zaslužan za kontaminaciju OTA (Kontaxakis, 2013). Prisutnost OTA u grožđu i vinu uglavnom je povezana sa kontaminacijom u vinogradu vrstama koje pripadaju plijesni *Aspergillus* vrste *Nigri* („crni aspergilli“). Najveći proizvođač OTA u grožđu je *A. carbonarius*, iako su pronađene i druge vrste, *Nigri* i *Circumdati* koje proizvode toksin u različitim mediteranskim zemljama, kao što su Španjolska, Italija, Portugal, Australija i Južna Amerika (Lucchetta i sur., 2010). Grožđe se kontaminira s OTA najčešće kad *Aspergillus carbonarius* zarazi plod bobica prije berbe (Leong i sur, 2007).



Slika 4. Rast *Aspergillus carbonarius* na bobicama grožđa, gdje su vidljive konidiospore i crne spore (Kontaxakis i sur., 2013)

U vinogradima mnoge gljivice mogu uzrokovati infekciju bobica, ovisno o klimatskim uvjetima. Kad je vlažnost grožđa visoka i kad temperature iznose između 20-30 °C, najčešće plijesni koje se pojavljuju na grožđu su *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Cladosporium* i *Rhizopus* (Somma i sur., 2012). Tijekom sazrijevanja uzročnici kvarenja, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* i *Rhizopus*, povećavaju svoju učestalost. Kad su temperature veće od 37 °C, vrste *Aspergillus* soja *Nigri*, „crne plijesni“ dominiraju (Valero i sur., 2005). Za vrijeme berbe uvjeti za invaziju plijesni su optimalni posebno ako je prisutno fizičko oštećenje bobica. Nakon berbe, grožđe se može obraditi različitim procesima, ovisno o daljnjoj namjeni. Grožđe se može jesti svježe, prešati za proizvodnju vina, iscijediti za sok od grožđa ili sušiti na suncu za groždice ili slatke vinske proizvode. Svi ovi procesi karakterizirani su kontaminacijom različitih vrsta plijesni. Vinova loza, bilo za stolnu konzumaciju ili proizvodnju vina, uglavnom je kontaminirana na polju vrstama *Aspergillus*, *Botrytis* i *Penicillium*, koje najčešće mogu biti izolirane iz bobica bez simptoma, i sukcesivno vrstama crnih aspergilla i *Botrytis cinerea* nakon berbe u hladnim skladištima. Na suhom voću prisutne vrste koje ih kontaminiraju su najčešće *Aspergillus* i *Penicillium* (Somma i sur., 2012). Temperatura, vlažnost, prozračivanje, period infekcije i interakcija između različitih plijesni su čimbenici koji utječu na razvoj mikotoksina (Jiang i sur., 2014). Plijesni koje obično inficiraju bobice uključuju patogene plijesni *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*) i *Plasmopara viticola*, kao i *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.* i *Rhizopus spp.* (Hocking i sur., 2007).

Crna trulež grožđa je jedna od mnogih truleži koja se pojavljuje na grožđu uzrokovana sojevima *Aspergillus*. Bolest se pojavljuje na bobicama kao crna trulež zbog sporulacije plijesni nakon što napadnu i kontaminiraju bobice koje izgledaju potpuno prazne i suhe (slika 5). Glavni put infekcije „crnih plijesni“ je uništavanje pokožice bobica, uzrokovana mnogim čimbenicima uključujući bolesti plijesni (pahuljaste plijesni, praškaste plijesni), štetočine (moljci, grinje), i okolišne čimbenike (vjetar, tuča, kiša ili prejako sunce, cvjetanje bobica) (Somma i sur., 2012).





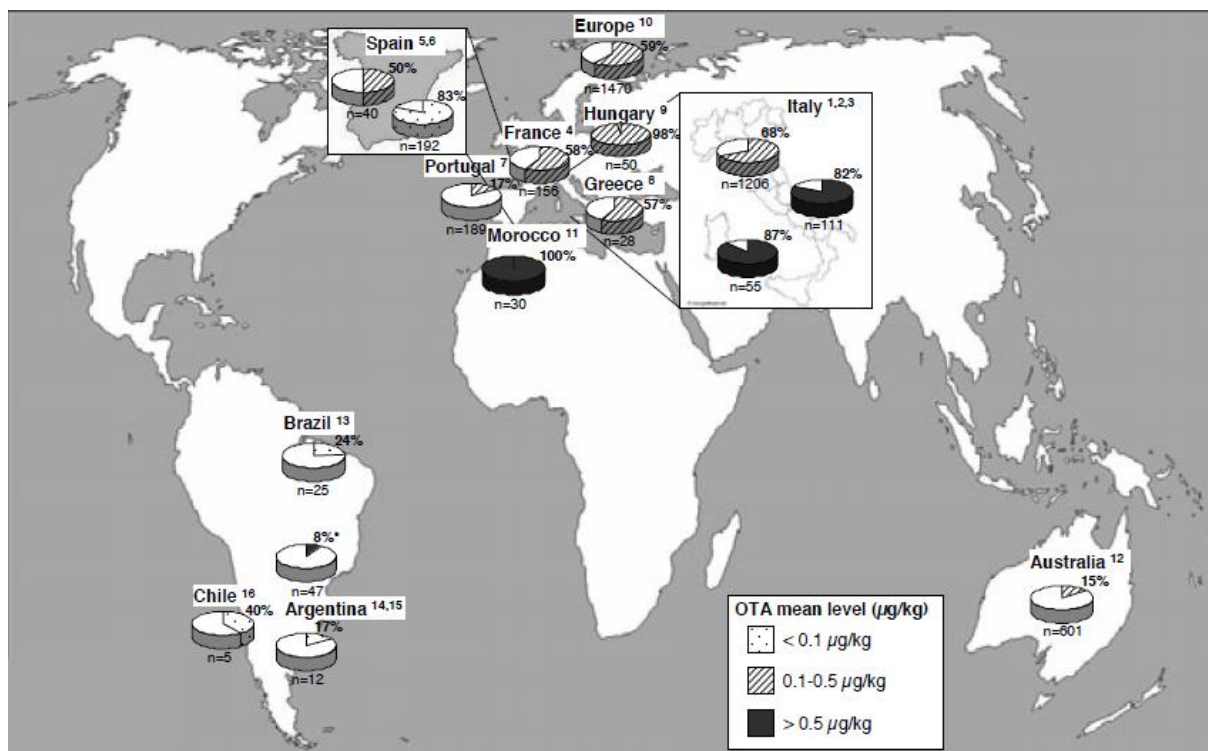
Slika 5. Crne Aspergille na grožđu, crna trulež bobica uzrokovana crnim *Aspergillama* (Somma i sur., 2012).

Višestanične vrste, *Aspergillus carbonarius* i *Aspergillus niger*, i jednostanične vrste *A. aculeatus*, su primarne *Aspergillus* vrste izolirane iz grožđa (proučavanja provedena u Australiji). Od ovih vrsta, *A. niger* je najčešće izoliran u vinogradima. Sojevi *A. carbonarius* izolirani iz vode kojom je vinova loza i grožđe isprano bili su sposobni za proizvodnju OTA, kao i sojevi iz tla vinograda koji su također bili toksigeni. Tako je proizvodnja OTA demonstrirana na preko 300 sojeva *A. carbonarius* izoliranih u Australiji. U istraživanju 6 vinograda, tla i ostataka na tlu primarni izvori bili su plijesan *Aspergillus* vrste *Nigri*. Ove plijesni su također izolirane, najčešće iz suhih bobica i propalog usjeva, ali rijetko su izolirani iz lišća (zelenog ili osušenog), vitica i zelenog pokrova biljaka. Nadalje, proučavanja u vinogradima zabilježila su porast koncentracije spora *A. carbonarius* na površini tla (0-1 cm) u usporedbi sa dubljim tlom. Koncentracije su također porasle u tlu direktno ispod vinove loze u usporedbi sa područjem između redova vinove loze. Pretpostavlja se da se spore kreću zrakom sa tla na površinu bobica zbog utjecaja spora *A. carbonarius* u uzorcima zraka koje su se povećavale približavanjem tlu. Nakon povećavanja prašine zbog jačeg strujanja zraka spore su povećavale prisutnost *A. carbonarius* na bobicama (Leong i sur., 2006).

### 3.4 OTA u vinu

Utjecaj količine nitastih plijesni i toksina u vrstama grožđa i vina varira ovisno o vrsti grožđa, vinskoj regiji, poljoprivrednoj praksi, vremenskim uvjetima, berbi i procesu proizvodnje vina (Freire i sur., 2017). OTA je prvi put otkriven u grožđanom soku i vinu 1995. godine u istraživanju koje su proveli Zimmerli i Dick. Od tada postoje brojni izvještaji o prisutnosti OTA u vinima Mediteranskih zemalja kao što su Francuska, Portugal, Grčka i Italija (Petruzzi i sur., 2014). OTA može se nakupljati u grožđu tijekom uzgoja vinove loze i proizvodnje grožđa, te u procesu proizvodnje dopijeva i u vino (Visconti i sur., 2008). Prva pojava OTA u vinu zabilježena je u Španjolskoj. Prema procjeni koju je proveo Wine and Vineyard International Organization (OIV) svjetskog vina proizvodnja u 2011. godini dosegla je 265.8 milijuna hektolitara (ne računajući sok od grožđa ili mošta), 600,000 hektolitara više nego u 2010. godini. Španjolska je doprinijela sa 12,9% proizvodnje sa 34.3 milijuna hektolitara. Prisutnost OTA može se premjestiti iz zrna grožđa do vina tijekom proizvodnje. Razine OTA u vinu ovise o različitim faktorima kao što su lokacija vinograda (zemljopisna širina), vrijeme (kiša, temperatura, relativna vlažnost u vinogradima), vrijeme berbe, tretiranje pesticidima i tehnika proizvodnje vina (Bellver i sur., 2014). Jako je bitno zaustaviti akumulaciju OTA u vinskim proizvodima. Prisutnost OTA u moštu i vinu javlja se zbog kontaminacije grožđa plijesnima koje se mogu razviti prije ili nakon berbe, ili tijekom faze prije procesa proizvodnje vina (Jiang i sur., 2014).

Prisutnost OTA u vinu potvrđena je u nekoliko istraživanja u svijetu. Na slici 6 vidljiv je postotak uzoraka vina kontaminiranih s OTA, iz mediteranskog područja, Južne Amerike i Australije. Rizik kontaminacije s OTA najviši je u mediteranskom području, te je utvrđen relativno visok postotak kontaminiranih uzoraka određivanjem srednje razine OTA. U Australiji i Južnoj Americi, niži je postotak pojave OTA kao i razine kontaminacije analiziranih uzoraka vina (Ponsone i sur., 2010). Visconti i sur. (2008) istaknuli su veću učestalost i razinu kontaminacije OTA u vinima južnih i toplijih krajeva Europe nego kod vina sjevernog europskog područja. Isti trend zabilježen je i u vinima iz južne Italije u kojima se pokazala veća učestalost i razina kontaminacije OTA nego kod vina proizvedenih u sjevernoj i srednjoj Italiji (Pietri i sur., 2001; Lucchetta i sur., 2010).



Slika 6. Okratoksina A i kontaminacija vina u svijetu. Grafovi prikazuju postotak onečišćenih uzoraka od ukupno analiziranih (n-broj analiziranih uzoraka) i utvrđenu srednju razinu okratoksina A (Somma i sur., 2012).

Sokovi od grožđa sadrže više OTA nego neka stolna vina, a to je zabrinjavajuće jer bi oni mogli biti glavni prijenosnici OTA kod djece (Cabanès i sur., 2002). U većini istraživanja pokazalo se da je razina OTA veća u crnim nego u rose vinima, a najmanje ga sadrže bijela vina, što je najvjerojatnije posljedica maceracije masulja s pokožicom grožđa kod crnih vina koja pospješuje ekstrakciju OTA iz pokožice (Esti i sur., 2012; Quintela i sur., 2013). Kod proizvodnje desertnih vina u koja se ne dodaje alkohol, grožđe se suši na suncu ili u komorama sve dok se ne postigne izrazito visoka razina šećera zbog čega je podložno povećanom razvoju plijesni. Osim toga ova vina se dobivaju nedovoljnom fermentacijom šećera pa su često kontaminirana visokim koncentracijama okratoksina A (Covarelli, 2012).

### 3.5 Rasprostranjenost OTA kontaminacije vina s obzirom na zemljopisno porijeklo

Nekoliko istraživanja utvrdila su veće koncentracije OTA u toplijim podnebljima (Lucchetta i sur., 2010). Najveći broj kontaminacije vina okratoksinom A zabilježen je u Europskim regijama. Rezultati istraživanja Europske komisije na 1470 uzoraka vina OTA pokazali su da vina sadrže prosječno  $0.36 \mu\text{g L}^{-1}$  OTA, a najveća kontaminacija je zabilježena i u vinima iz Južne Europe ( $15.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Petruzzi i sur., 2014). Od Europskih zemalja s vodećom proizvodnjom Portugal ima najbolje uvjete za rast *Aspergillus* i *Penicillium* plijesni i za proizvodnju OTA (Esti i sur., 2012). Istraživanja su pokazala da su izvori OTA u Portugalskim vinima plijesni *Aspergillus carbonarius* i najčešće *A. niger*, od čega predstavljaju 88% i 12% crnih aspergilla od izoliranih sojeva. U svim spomenutim vrstama, 4% i 89% sojeva bili su pozitivni na OTA. Međutim, u jednom od proučavanih *A. carbonarius* sojeva, OTA nije otkriven, te se taj soj smatra novom vrstom, *Aspergillus ibericus* (Serra i sur., 2006). Iz analiza vina iz različitih predjela Portugala (35 crnih i 25 bijelih vina), 26% crnih vina i 12% bijelih vina pozitivno je na prisutnost OTA, a samo jedan uzorak bijelog vina je premašio dozvoljenu granicu od  $2 \text{ ng g}^{-1}$  (Bellver i sur., 2014). U istraživanju koje je provedeno u 4 vinogradarske regije gdje je proučavano 11 vinograda, Vhinos Verdes (3 vinograda), Douro (3 vinograda), Ribatejo (3 vinograda) i Alentejo (2 vinograda), prikupljane su informacije o razvoju OTA iz različitih vrsta plijesni tokom 3 godine (2001., 2002., 2003.) u tri stadija sazrijevanja. Dobiveni rezultati pokazali su da stupanj sazrijevanja grožđa ima utjecaj na učestalost plijesni proizvođača OTA, te je utvrđeno da oko 96% OTA nastaje za vrijeme berbe. *A. carbonarius* proizvodila je OTA i bila obilno rasprostranjena u vinogradima, dok su *A. niger* skupine pronađene u jednom vinogradu. Štoviše, sinteza OTA je otkrivena u svim stadijima sazrijevanja grožđa od rane faze sazrijevanja do završne faze sazrijevanja. Sastav grožđa u različitim fazama sazrijevanja visoko je utjecao na proizvodnu OTA testiranih na soj *A. carbonarius*, te je sa proizvodnjom OTA rasla i koncentracija organskih kiselina, a smanjivala se koncentracija reducirajućih šećera. Stoga navode da je važno minimizirati oštećenje bobica grožđa od ranih faza sazrijevanja do berbe te transportirati grožđe u pogon za proizvodnju odmah nakon zrenja. Razine OTA otkrivene u portugalskom grožđu u svim istraživanjima bile su uvijek iznad maksimalnog limita od  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  za OTA u vinu, što prema Europskoj procjeni unosa OTA, navodi na zaključak da mikotoksini pronađeni u portugalskim vinima ne predstavljaju značajnu opasnost za potrošače (Serra i sur., 2006).

Prisutnost OTA u slatkim muscatel vinima i vinima Pedro Ximénez iz Španjolske kreće se od 75 do 100 % (Tablica 4). U drugom istraživanju je uspoređen sadržaj OTA u specijalnim vinima proizvedenim različitim tehnikama te se 50% uzoraka pokazalo pozitivnim, sa srednjom vrijednošću od 1.49 ng L<sup>-1</sup> (Tablica 4). Vina sa najvećom koncentracijom OTA potjecala su od obogaćenog mošta (mistela i muscatel) s vrijednostima do 27.79 ng ml<sup>-1</sup> OTA i vina kod kojih su grozdovi dozrijevali na suncu s vrijednostima do 15.62 ng ml<sup>-1</sup> OTA (Bellver i sur., 2014). Većina talijanskih vina je kontaminirana okratoksinom A ( 51 do 77% ispitanih uzorka) iako su detektirane razine vrlo niske. OTA je detektiran u svim uzorcima crnog vina te u 92% rose vina. U samo 0,01% uzoraka vina je pronađen OTA na razini većoj od dopuštene. Srednje vrijednosti OTA su najmanje u sjevernoj (0,01 ng ml<sup>-1</sup>) i najveće u južnoj Italiji (0,54 ng ml<sup>-1</sup>) (Tablica 4). Grčka vina pokazuju vrlo čestu pojavu OTA (69%), ali razine kontaminacije su niske (0,26 ng ml<sup>-1</sup>). Samo jedan uzorak nije zadovoljavao regulativu o najvećoj dozvoljenoj razini OTA dopuštenoj u EU (Tablica 4). Analiza vina u Turskoj pokazala je da svi uzorci sadrže OTA na razinama nižim od utvrđenog limita. S druge strane, ni jedan od 87 uzoraka vina iz Mađarske nije sadržavao ostatke OTA, što se može i očekivati jer vina iz sjevernijih krajeva sadrže manje koncentracije OTA (Tablica 4) (Chiodini i sur., 2006; Bellver i sur., 2014).

Na području Hrvatske provedena su istraživanja o prisutnosti OTA i pojedinim sojevima toksičnih plijesni u vinima prikupljenim uglavnom sa obale Hrvatske. Ispitano je šest moštova, šest uzoraka vina dobivenih od tih moštova i četiri uzorka flaširanog vina iz 2007. godine. Uočeno je da su svi uzorci mošta sadržavali OTA što se povezuje s kontaminacijom grožđa tijekom prešanja i maceracije, a njegov sadržaj se smanjuje tijekom fermentacije, iako se ne uklanja u potpunosti. U moštu i vinu nisu pronađeni sojevi najvećeg proizvođača mikotoksina *Aspergillus carbonarius spp.*, vjerojatno zbog prisutnosti drugih plijesni koje proizvode OTA poput *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus ochraceus* ili *Aspergillus niger spp.* (Flajs i sur., 2009).

Tablica 4. Koncentracije OTA u vinima iz Europskih zemalja (Bellver i sur., 2014)

| Zemlja     | Crna vina |                                  |                            | Rose vina |                                  |                            | Bijela vina |                                  |                            |
|------------|-----------|----------------------------------|----------------------------|-----------|----------------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------------|----------------------------|
|            | OTA (%)   | $\bar{x}$ (ng mL <sup>-1</sup> ) | Max (ng mL <sup>-1</sup> ) | OTA (%)   | $\bar{x}$ (ng mL <sup>-1</sup> ) | Max (ng mL <sup>-1</sup> ) | OTA (%)     | $\bar{x}$ (ng mL <sup>-1</sup> ) | Max (ng mL <sup>-1</sup> ) |
| Španjolska |           |                                  |                            |           |                                  |                            | 75          | 1.81                             | 3.42                       |
|            |           |                                  |                            |           |                                  |                            | 100         | 2.86                             | 7.30                       |
|            |           |                                  |                            |           |                                  |                            | 97          | 0.5                              |                            |
|            |           |                                  |                            |           |                                  |                            | 99          | 0.65                             | 4.63                       |
|            |           |                                  |                            |           |                                  |                            | 50          | 1.49                             | 27.79                      |
|            |           |                                  |                            |           |                                  |                            | 80          | 0.138                            | 0.642                      |
|            |           |                                  |                            |           |                                  |                            |             |                                  |                            |
| Italija    | 82        | 0.29                             | 1.4                        | 71.4      | 0.32                             | 0.82                       | 62          | 0.16                             | 0.42                       |
|            | 100       | 0.33                             | 0.87                       |           |                                  |                            | 66          | 0.14                             | 0.17                       |
|            | 84        | nn                               | 4.0                        | 56        | nn                               | 1.04                       | 19          | nn                               | 0.21                       |
|            | 55        | 0.72                             | 2.9                        | 50        | 0.34                             | 0.40                       | 40          | 0.9                              | 1.95                       |
|            | nn        | 0.18                             | 0.75                       | nn        | nd                               | nn                         | nn          | 0.06                             | 0.18                       |
|            |           | 0.16                             | 0.72                       |           | 0.09                             |                            |             | 0.08                             | 0.22                       |
|            | 69        | 0.34                             | 7.5                        | 92        | 0.5                              | 4.07                       | 44.3        | 0.08                             | 1.95                       |
|            | 69        | 0.12                             | 2.630                      |           |                                  |                            | 61.3        | 0.08                             | 1.36                       |
| Grčka      | 66.7      | 0.23                             | nn                         |           |                                  |                            |             |                                  |                            |
|            |           | 0.17                             | 1.5                        |           |                                  |                            | 81.5        | 0.57                             | 2                          |
| Turska     | 86        | 0.11                             | 0.82                       | 90        | 0.052                            | 0.16                       | 85          | 0.108                            | 0.62                       |
| Mađarska   | 0         | nd                               |                            |           |                                  |                            |             |                                  |                            |
|            | 97.7      | 0.01                             | 0.53                       |           |                                  |                            |             |                                  |                            |
| Hrvatska   | 80        | ni                               | 0.02                       |           |                                  |                            |             |                                  |                            |
|            | 80        |                                  | 0.05                       |           |                                  |                            |             |                                  |                            |

**OTA(%)** – uzorci u kojima je detektirana prisutnost OTA (%)

$\bar{x}$  (ng mL<sup>-1</sup>)- srednja vrijednost prisutnog OTA (ng mL<sup>-1</sup>)

**Max (ng mL<sup>-1</sup>)-** maksimalna vrijednost prisutnog OTA ( ng mL<sup>-1</sup>)

## 3.6 Kontrola i prevencija razvoja mikotoksina (OTA)

Razvoj plijesni i proizvodnja OTA ovise o brojnim čimbenicima poput klimatskih uvjeta tijekom dozrijevanja, periodu branja, količini i vremenu primjene fungicida, uvjetima skladištenja ubranog grožđa i tehnikama koje se primjenjuju tijekom proizvodnje vina (Bellver i sur., 2014). Period između rane faze zrenja i branja kritičan je za rast plijesni i tada je vrlo važna dobra vinogradarska praksa (Battiliani i sur., 2006).

### 3.6.1 Mjere kontrole i prevencije u vinogradu

U vinogradarstvu, najefektivniji put pri kontroli i redukciji kontaminacije OTA u vinogradarskim proizvodima je kontrola okratoksičnih vrsta plijesni, posebno, *Aspergillus carbonarius*, kao najdominantnijeg proizvođača okratoksina A u ovim proizvodima. Prilikom jednog proučavanja u Grčkoj, istraživao je utjecaj različitih sistema uzgoja u Kretskim vinogradima, na razvoj *A. carbonarius* na grožđu i tlu. Kontaminacija vinogradarskih proizvoda okratoksinom A ovisila je o različitim karakteristikama i tehnikama uzgoja (sustav navodnjavanja, hranjive tvari, fungicidni tretmani...) te o području uzgoja koje je bilo ispitivano. Rezultati su ukazali da pravilan izbor navedenih čimbenika pruža mogućnost prevencije/redukcije pojave *A. carbonarius* i OTA u vinogradarskim proizvodima (Kontaxakis, 2013).

Moguće je modelirati utjecaj *A. carbonarius* u tlu tijekom obrađivanja vinograda. Vinogradi čije je tlo redovito obrađivano, pokazali su veću prisutnost *A. carbonarius* u tlu nego vinogradi sa minimalnom obradom. Slično tome, grožđe iz vinograda sa čestom obradom zemlje pokazuje veću prisutnost crnih *Aspergillus spp.* nego grožđe iz vinograda sa minimalnom obradom. Razvoj mikotoksina ovisi i o temperaturi zraka, pri čemu je najveća proizvodnja OTA pri 15-20 °C kod *A. carbonarius* i 20-25 °C kod *A. niger*. Također rast plijesni ovisi i o aktivitetu vode grožđa pri čemu je optimalna vrijednost  $a_w$  0.930-0.987 (Covarelli i sur., 2012). Obrada tla, navodnjavanje i obrada tla može pridonijeti potencijalu za smanjenje populacije *A. carbonarius* u tlu vinograda. Neka prijašnja proučavanja pokazala su kako se ove vrste smanjuju na vlažnom tlu, nakon navodnjavanja. Sušenje tla pogoduje razvoju plijesni *A. carbonarius* (Leong i sur., 2006).

Za prevenciju razvoja i formiranja plijesni i mikotoksina važne su strateške kontrole koje uključuju kontrole prije berbe (npr. upravljanje poljem, korištenje bioloških i kemijskih materijala), upravljanje berbom, kontrola nakon berbe (npr. unaprjeđenje uvjeta sušenja i skladištenja) (Ciconova, i sur., 2010). Zdravlje grožđa je najvažniji čimbenik u kontaminaciji OTA. Trule i oštećene bobice sadrže više OTA u odnosu na zdrave. Plijesan je pritom češće

izolirana iz obrađene nego iz slabije obrađene zemlje. Osim toga, uočen je veći broj plijesni u zemlji ispod trsa nego između trsa. Prisutnost OTA u vinu može se smanjiti i do 80% ukoliko se koristi odgovarajuća vinogradarska praksa (Varga i Kozakiewicz, 2006). Okolišni uvjeti presudni su pojavi *Aspergillus spp.* i nakupljanju OTA međutim kontrola biotičkih i abiotičkih agenasa može značajno smanjiti konačnu koncentraciju mikotoksina u grožđu. Također se mogu provesti i preliminarne strategije u kontroli *A. carbonarius* u vinogradima koje uključuju proizvodnju malih slobodnih grozdova koji su dobro raspršeni kroz prozirne krošnje, čišćenje trsa i navodnjavanje, sprječavanje oštećenja bobica od štetočina, osobito u periodu između dozrijevanja i branja te smanjenje mehaničkih i okolišnih oštećenja (poput oštećenja od kiše ili sunca) (Covarelli, 2012). Također se pokazalo da sušenje grožđa doprinosi povećanju kontaminacije vina OTA, pri čemu se razine kontaminacije razlikuju kod različitih metoda sušenja. Komore za sušenje grožđa s kontroliranim uvjetima vlažnosti i temperature pokazale su prednosti u odnosu na tradicionalan proces sušenja na suncu kod kojeg je grožđe izloženo okolišu, toplom sušenju tijekom dana i hladnim i vlažnim noćima, zbog čega je veći broj oštećenih bobica i stvaraju se pogodni uvjeti za rast plijesni. Prilikom uspoređivanja procesa sušenja u posebno kondicioniranim komorama, vina proizvedena od grožđa sušenog u hladnim komorama sadrže veće razine OTA (prosječno  $1.35 \mu\text{g L}^{-1}$ ) od onih dobivenih od bobica sušenih u toplim komorama (prosječno  $0.58 \mu\text{g L}^{-1}$ ), što je vjerojatno posljedica duljeg vremena sušenja pri nižim temperaturama (2-6 mjeseci) i okolišnih uvjeta koji pogoduju rastu plijesni (Covarelli i sur., 2012; Petruzzi i sur., 2014). Stoga je u svrhu smanjenja razine OTA važno i ispravno sušenje grožđa primjenom kontroliranih uvjeta atmosfere i primjenom enoloških postupaka koji smanjuju razinu OTA u vinima. Postoji nekoliko različitih strategija u smanjenju razine OTA u vinima i detoksikaciji ovog mikotoksina, a klasificiraju se kao fizikalni, kemijski i mikrobiološki postupci (Quintela i sur., 2013).

### **Pesticidi i antioksidansi**

Osim ispravne agronomske prakse kontaminacija OTA se može smanjiti i pravovremenom primjenom fungicida koji djeluju na vrste *Aspergillus* (Covarelli, 2012). U slučaju pesticida, treba razmotriti implikaciju za proizvodnju mikotoksina. Utvrđeno je da neki fungicidi djeluju pozitivno ili negativno na proizvodnju OTA. Primijećeno je da korištenje nekih pesticida kao što je Azoksistrobina (derivat strobilurina) ili Dinokapa (dinitrofenilni derivat) u kombinaciji sa sumporom učinkovito smanjuje koncentraciju OTA u vinima. Nasuprot tome, primijećeno je da pesticidi kao što su Karbendazim i Chorus nisu bili učinkoviti u kontroli truljenja uzrokovanog plijesni *Aspergillus* vrste *Nigri*. Međutim, primjena drugih pesticida, Switch, dovela je do značajne redukcije učestalih crnih aspergilla na grožđu. Fungicid Switch sadrži ciprodinil i



fludioksinil koji pripada pirimidin i pirolnitrin klasi fungicida. Budući da fungicid Chorus sadrži ciprodinil i bio je neučinkovit protiv aspergilla, zaključeno je da je fludioksinil aktivni sastojak Switch pesticida. Zapažanje da se fludioksinil može koristiti protiv crnih aspergilla nije iznenađujuća budući da je pirolnitrin prije bio upotrebljavan kao efektivan protiv crnih aspergilla. U drugim proučavanjima u Francuskoj, tretiranje fungicidima Switch, Scala (koji sadrže pirimidin fungicid pirimetanil) i Mikal (koji sadrži fosetil-Al i dikarboksimid folpet) rezultiralo je značajnim smanjenjem kolonizacije plijesnima i sadržaja OTA u vinu (Ponsone i sur., 2012). Fungicidi Switch, Scala i Mikal pokazali su se kao najefektniji pri smanjenju kolonizacije plijesni i smanjenju sadržaja OTA u vinima (Varga i Kozakiewicz, 2006). Općenito, fungicidi koji sadrže bakar ili strobilurine smanjili su i rast i proizvodnju OTA, suprotno sumpornim fungicidima. Među fungicidima koji su inhibirali rast *A. carbonarius* u sintetičkom mediju, činilo se da je najučinkovitiji aktivni sastojak za zaustavljanje rasta plijesni pri smanjenim dozama (prilikom testiranja), ciprodinil. Kad su se ti fungicidi testirali na grožđu opažen je učinak sličan onom na sintetičkom mediju (Belli i sur., 2006). Važno je napomenuti da se fungicidi moraju pažljivo primjenjivati jer su neki od njih, kao što je Karbendazim, smanjili floru plijesni, ali stimulirali proizvodnju OTA (Lo Curto i sur., 2004),

Druga strategija za smanjenje rasta plijesni i proizvodnju mikotoksina je korištenje antioksidanasa kao što je vanilična kiselina ili 4-hidroksibenzojeva kiselina i esencijalna ulja ekstrahirana iz biljaka kao što je *Thymus Vulgaris* ili *Aframomum danielli*, što je utjecalo i na rast plijesni i sintezu OTA (Palumbo i sur., 2007; Ponsone i sur., 2012). Iz perspektive ljudskog zdravlja, upotreba antioksidanasa kao antimikrobnih sredstava dopuštena je od US Food and Drug Administration (FDA) i proglašena sigurnim (GRAS) kemikalijama. Iako ti antioksidansi nisu testirani na suhom voću, neka istraživanja pokazala su da imaju zaštitni učinak u hrani jer mogu pogodovati pozitivnim organoleptičkim svojstvima hrane. To bi moglo biti uvelike zanimljivo kao opcija za sirovinu koja zahtijeva dugo razdoblje skladištenja, kao što je sušeno voće. Trans-resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben) je antioksidativni spoj proizveden prirodnim putem u velikom broju biljaka, uključujući grožđe, te je glavna komponenta odgovorna za fitoaleksin kod biljaka. Akumulira se u listovima vinove loze i pokožici grožđa kao odgovor na različite infekcije plijesni, UV zračenje ili kemikalije, a pronađen je u vinima u različitim koncentracijama ovisno o vinogradarskoj ili enološkoj praksi. Analitički interes za trans-resveratrol pripisuje se prirodnim svojstvima pesticida. Također je dokazano da trans-resveratrol poboljšava otpor vinove loze na druge patogene kao što su, *Plasmopara viticola*, *Phomopsis viticola*, ili , *Rhizopus Stonifer*. Trans-resveratrol prirodni je pesticid protiv napada patogena te djeluje na prirodno poboljšanje otpornosti grožđa na infekcije plijesni. Također, može imati i pozitivne učinke na konzerviranje voća tijekom skladištenja, te se može koristiti i

za smanjenje kvarenja grožđa (Ponsone i sur., 2012). Osim toga, dokazane su biljne supstance kako bi spriječile rast i razvoj OTA. Npr., eterična ulja timijana i anisa ( 500 ppm), cimeta (1000 ppm) i zelena metvica (2000 ppm) inhibiraju rast *A. ochraceus*. 1% ulja timijana i anisa i 2% ulja cimeta kompletno inhibiraju proizvodnju OTA u pšenici (Ciconova i sur., 2010). Fungicidno djelovanje eteričnog ulja timijana protiv *A. ochraceus* i *P. verrucosum* utvrdili su Nguefack i sur. (2009). Eterično ulje cimeta je visoko djelotvorno protiv *A. niger*. Reddy i sur. (2007) utvrdili su da ekstrakt gomolja češnjaka kompletno inhibira rast *A. ochraceus*. Vrlo je važno uzeti u obzir određivanje optimalnih doza aplikacije antifungalnih tvari, jer visoke razine mogu proizvesti neželjene učinke na zrnju, kao što su organoleptička svojstva, i njegovim proizvodima, što uzrokuje negativan ekonomski i gospodarski učinak. S druge strane, sub-inhibitorne doze skupa sa neadekvatnom raspodjelom kemikalija, posebno pri niskim razinama  $a_w$ , mogu uzrokovati povećanje sporulacije plijesni i stimulaciju sekundarnih metabolita, povećavajući proizvodnju mikotoksina. Iako su kemikalije najčešće korištene za sprječavanje rasta plijesni i mikotoksina, danas su utvrđeni strogi propisi od strane Europske unije, zbog sve većeg broja otpornih sojeva plijesni i utjecaja fungicida na okoliš te ljudsko zdravlje (Ponsone i sur., 2012). Maksimalne koncentracije ostataka pesticida regulirane su u mnogim proizvodima, uključujući i grožđe (EC, 2005). Danas su neophodne alternativne metode koje bi mogle zamijeniti ili dopuniti fungicidne tretmane za kontrolu toksigeničnih plijesni prije i nakon berbe (Ponsone i sur., 2012).

## **Biološka kontrola**

Biološka kontrola pomoću antagonističkih mikroorganizama dugo je predlagana kao dobra metoda u mogućnosti kontrole biljnih patogena. Jedna od prednosti biološke kontrole je ta da se može koristiti zajedno sa fungicidima koji smanjuju njihovu razinu u cilju smanjenja rasta plijesni. Kvasci se smatraju jednim od najmoćnijih biokontrolnih sredstava zbog njihove biologije svojstava netoksičnosti. Mehanizam koji je najvjerojatnije uključen u biokontrolu vlaknastih plijesni pomoću kvasaca je način konkurencije. Konkurencija među mikroorganizmima za bitne čimbenike, kao što su hranjive tvari i prostor, očekuje se kao dramatični učinak na sekundarni metabolizam vlaknastih gljivica. Danas se razmatra nekoliko vrsta kvasaca, uključenih u različite rodove, kao potencijalni biokontrolni agensi prema okratoksičnim gljivicama *Aspergillus*. Kvasci zaista mogu biti učinkoviti biokontrolni agensi zbog svojih sposobnosti koloniziranja grožđa i konkurencije za prostor i hranjive tvari s drugim

mikroorganizmima (Ponsone i sur., 2012). Blevé i sur., (2006) pokazali su da kvasci izolirani iz grožđa *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Isatchenkia terricola*, i *Candida incommunis* reduciraju *A. carbonarius* i *A. Niger* kolonizaciju na vinovoj lozi. Najbolja antagonistička aktivnost pokazala se na *I. orientalis* izolatima (Ciconova i sur.,2010). Nedavno su Ponsone i sur., 2012. opisali dva epifitička soja *Lachancea thermotolerans* koji su bili u stanju kontrolirati rast i akumulaciju OTA. Podaci do sada pokazuju da kvasci koji se prirodno pojavljuju na grožđu mogu biti obećavajući ekološki fungicidi jer mogu preživjeti i kolonizirati vinovu lozu i održati ravnotežu prirodnog okoliša. Kako bi spriječili nastanak patogenih na biljci, važno je provesti biološku kontrolu agensima na voćnoj površini prije nastanka spora patogena. To se može postići kroz česte aplikacije ili pomoću sojeva koji mogu preživjeti na polju. Buduća upotreba bioloških kontrolnih sredstava za kontrolu okratoksičnih gljivica i proizvodnju okratoksina ovisit će o troškovima proizvodnje i učinkovitosti na polju formuliranog proizvoda. Stoga, optimizacija učinkovitosti biokontrole ovisi i o izdržljivosti sredstava za biološku kontrolu u prisutnosti niskih količina fungicida ili u kombinaciji sa mikrobnim antagonistima. Rasprostranjenost i difuzija patogena plijesni otpornih na fungicide koji se dugo koriste u polju i/ili u pakiranju (npr. benzimidazoli), dovela je do potrebe za procjenom kompatibilnosti i učinkovitosti sredstava za biološku kontrolu s novim i nedavno razvijenim fungicidima. Primjena biokontrole tijekom berbe ne bi trebala utjecati na organoleptička svojstva grožđa (Ponsone i sur., 2012).

### 3.7 Uklanjanje OTA iz vina

Grožđe i proizvodi od grožđa imaju značajnu ulogu u svjetskoj proizvodnji hrane. Prema podacima FAO (Food and Agriculture Organisation) proizvodnja grožđa ima monetarnu vrijednost od 55 milijuna dolara. 71% grožđa koristi se u vinarstvu, 27 % proizvedenog grožđa konzumira se svježe, a manji dio (2%) konzumira se kao suho voće, grožđice. U svrhu smanjenja rizika pojavljivanja OTA u vinu i njegovog uklanjanja iz vina razvijene su metode koje se temelje na fizikalnim, kemijskim i mikrobiološkim procesima (Somma i sur., 2012).

#### Fizikalne metode redukcije OTA u vinima

Fizikalna dekontaminacija uključuje prvenstveno uklanjanje pljesnivog grožđa prije nego uđe u proces vinifikacije. Iako ovaj postupak smanjuje pojavu OTA i do 98%, ekonomski je neprihvatljiv za vinarsku industriju (Varga i Kozakiewicz, 2006). Primjenom manjeg pritiska na komini tijekom proizvodnje vina u vino prelazi manja količina OTA ( koncentracija OTA u vinu je i do četiri puta manja kad se komina preša pod pritiskom od oko 8 atm umjesto 80 atm). U svrhu redukcije OTA vino se može i filtrirati te se filtracijom vina kroz 0,45 µm membranu smanjuje razina OTA i za 80% dok se filtracijom kroz 10 µm membranu ne odvija značajna redukcija. Toplinski tretmani ne utječu na razinu OTA u vinima (Leong i sur., 2006; Quintela i sur., 2013). Neke od fizikalnih metoda redukcije OTA tijekom postupka proizvodnje vina prikazane su u tablici 5 (Quintela i sur., 2013) .

Tablica 5. Uklanjanje OTA iz vina fizikalnim metodama (Quintela i sur., 2013).

| Vrsta postupka                                                                | Udio uklonjenog OTA                |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Prešanje komine pri 80 atm umjesto pri 8 atm.                                 | Četiri puta veća koncentracija OTA |
| Filtracija kroz 0.45 µm membranu.                                             | 80% manje OTA                      |
| Filtracija kroz 10 µm membranu.                                               | Beznačajno smanjenje razine OTA    |
| Toplinski tretman na zagrijanoj ploči na 55°C.                                | 0                                  |
| Uklanjanje pljesnivog grožđa prije maceracije                                 | 98% manje OTA                      |
| Ponovni prolazak kontaminiranog mošta ili vina kroz kominu koja ne sadrži OTA | 50-56% manje OTA                   |

## Kemijske metode redukcije OTA u vinima

Upotreba kemijskih produkata široko je rasprostranjena metoda redukcije OTA u vinima (Valero, 2007). Kemijske metode redukcije OTA iz kontaminiranog vina uključuju primjenu adsorbensa kao što su aluminosilikati, zeolit, bentonit i aktivni ugljen. Ovi adsorbensi imaju kapacitet čvrstog vezanja i imobiliziranja mikotoksina. U tablici 6 su prikazana neka enološka sredstva za bistrenje koja su testirana zbog sposobnosti uklanjanja OTA iz kontaminiranog vina. Rezultati uklanjanja OTA iz vina bili su različiti ovisno o razini kontaminacije OTA te o vrsti i količini (dozi) upotrijebljenog sredstva za bistrenje (Quintela i sur., 2013). Primjena ovih sredstava je ograničena zbog čestog negativnog utjecaja na nutritivna i organoleptička svojstva proizvoda (Piotrowska i sur., 2013).

Upotreba aktivnog ugljena u dozi od 10 mg/L dovoljno je mala doza da se ne uklone antocijani i ostali polifenoli iz vina, a isto tako može ukloniti 50-60% OTA iz crnog vina. Upotrebom iznad 50 mg/L uočavaju se promjene smanjenja razine obojenih polifenola i ključnih aromatičnih tvari vina (Piotrowska i sur., 2013). Bentonit je sljedeće često korišteno sredstvo za uklanjanje proteina na koje se veže OTA (Varga i Kozakiewicz, 2006).

Nedavno su razvijena sredstva za bistrenje koja ne sadrže alergene, što je važno kod osjetljivih potrošača kod kojih primjena sredstava poput kazeina, kalijevog kazeinata i albumina jajeta uzrokuje neželjene reakcije (Quintela i sur., 2013).

Tablica 6. Uklanjanje OTA iz vina kemijskim metodama (Quintela i sur., 2013).

| Sredstvo za bistrenje vina | Vrsta sredstva za bistrenje         | Doza (g/hL) | Uklanjanje OTA (%) | Analizirani parametri kvalitete vina                                                      |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aktivni ugljen             | Aktiviran $H_3PO_4$                 | 1–10        | 25–72              | Ukupni polifenoli, sadržaj pigmenata, OD 420 i 520 nm                                     |
|                            | Aktiviran $ZnCl_2$                  | 1–10        | 21–72              | Ukupni polifenoli, sadržaj pigmenata, OD 420 i 520 nm                                     |
|                            | Aktivni $H_3PO_4$ dekolorans        | 50          | 96                 | -                                                                                         |
|                            | Dezodorans                          | 50          | 68                 | -                                                                                         |
|                            | Aktivni $H_3PO_4$ Snažni dekolorans | 50          | 98                 | -                                                                                         |
|                            | Visoka mezoporoznost                | 50          | 96                 | -                                                                                         |
|                            | Dekolorans                          | 5–30        | 27–73              | Antocijani, tanini, katehini, Folin-Ciocalteu index, intenzitet boje, 49 hlapljivih tvari |
|                            | Aktivacija s $H_3PO_4$              | 20          | 10                 | Indeks ukupnih fenola, intenzitet obojenosti                                              |

|                |                                     |           |        |                                                                     |
|----------------|-------------------------------------|-----------|--------|---------------------------------------------------------------------|
|                | Aktivacija s $\text{ZnCl}_2$        | 20        | 6      | Indeks ukupnih fenola, intenzitet obojenosti                        |
|                | Aktivacija s KOH                    | 20        | <5     | Indeks ukupnih fenola, intenzitet obojenosti                        |
|                | Nije navedeno                       | 20–100    | 73–98  | -                                                                   |
|                | Enološki                            | 10–20     | 80–92  | Folin-Ciocalteu index                                               |
|                | Aktiviran                           | 10–100    | 36–90  | -                                                                   |
| Bentonit       | Kalijev ferocijanid                 | 100       | 8      | -                                                                   |
|                | Jaka aktivacija natrijem            | 50        | 19     | -                                                                   |
|                | Prirodno                            | 1000–4000 | 0–44   | Ukupni polifenoli i ukupni antocijani                               |
|                | Nonilamonijak                       | 1000–4000 | 22–74  | Ukupni polifenoli i ukupni antocijani                               |
|                | Dodecilamonijak                     | 1000–4000 | 14–43  | Ukupni polifenoli i ukupni antocijani                               |
|                | KSF-montmorilonit                   | 1000–4000 | 67–100 | Ukupni polifenoli i ukupni antocijani                               |
|                | Aktivirani natrij                   | 10–60     | 22–33  | pH, intenzitet obojenosti, indeks ukupnih fenola, ukupni antocijani |
|                | Nije navedeno                       | 80        | 34–40  | -                                                                   |
|                | Nije navedeno                       | 20–100    | 6–24   | -                                                                   |
|                | Nije navedeno                       | 10–20     | 1–12   | -                                                                   |
|                |                                     |           |        |                                                                     |
| Hitin          | Nije navedeno                       | 200–500   | 35–67  | -                                                                   |
|                | Nije navedeno                       | 10–500    | 15–29  | pH, intenzitet obojenosti, indeks ukupnih fenola, ukupni antocijani |
| Hitozan        | Nije navedeno                       | 200–500   | 24–83  | -                                                                   |
|                | Nije navedeno                       | 1000–4000 | 59–100 | Ukupni polifenoli i ukupni antocijani                               |
|                | Nije navedeno                       | 10–500    | 3–67   | pH, intenzitet obojenosti, indeks ukupnih fenola, ukupni antocijani |
| Albumin jajeta | Nije navedeno                       | 25–150    | 8–48   | Ukupni polifenoli, sadržaj polimernih pigmenata, OD 420 nm i 520 nm |
|                | Nije navedeno                       | 10–16     | 14–16  | pH, intenzitet obojenosti, indeks ukupnih fenola, ukupni antocijani |
| Želatina       | $\text{AlCl}_3$ aktivirana          | 25–150    | 2–20   | Ukupni polifenoli, sadržaj polimernih pigmenata, OD 420 nm i 520 nm |
|                | Velike molekulske mase, u listićima | 10–16     | 16–39  | pH, intenzitet obojenosti, indeks ukupnih fenola, ukupni antocijani |
|                | Strugotine                          | 100–800   | 20–65  | Fenolni indeksi <sup>a</sup> , Sudraud's indeksi <sup>b</sup>       |

|                          |                                                     |         |       |                                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|---------|-------|---------------------------------------------------------------------|
| Komadići hrastova drveta | Prah                                                | 100–800 | 23–75 | Fenolni indeksi <sup>a</sup> , Sudraud's indeksi <sup>b</sup>       |
| Kalijev kazeinat         | Mikrokristaliničan                                  | 25–150  | 4–24  | Ukupni polifenoli, sadržaj polimernih pigmenata, OD 420 nm i 520 nm |
| PVPP                     | Hidrofilan                                          | 100     | <1–6  | -                                                                   |
|                          | Nije navedeno                                       | 50      | ~15   | -                                                                   |
|                          | Kompleks PVPP, biljnog proteina i amorfnog silicija | 10–50   | 30–40 | pH, intenzitet obojenosti, indeks ukupnih fenola, ukupni antocijani |

<sup>a</sup> Ukupni polifenoli, ukupni flavonoidi, nonantocijanski flavonoidi, ukupni antocijani, monomerni antocijani

<sup>b</sup> OD 420 nm, OD 520 nm, OD 620 nm, intenzitet obojenosti, ukupni antocijani, monomerni antocijani

Sve je češća primjena hitozana, hitina, hitin glukana ili hitin glukan hidrolizata fungalnog porijekla u smanjenju razine OTA u vinu, međutim njihova primjena može negativno utjecati na sadržaj svih ukupnih polifenola i ukupnih antocijana (Petruzzi i sur., 2014). U novijoj enološkoj praksi česta je primjena komadića hrastova drveta u obliku praha ili strugotina koje povećavaju kontaktnu površinu između drveta i vina, a kao posljedica toga dolazi do redukcije razine OTA u suhim crnim vinima i do 75% (Covarelli, 2012).

### Mikrobiološke metode redukcije OTA u vinima

Istraživanja su pokazala da pojedine bakterije (*Streptococcus*, *Bifidobacterium* i *Bacillus*) i plijesni (rodovi *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis* i *Penicillium*) imaju sposobnost razgradnje OTA (Piotrowska i sur., 2013; Petrucci i sur., 2014). No, postavlja se pitanje toksičnosti produkata enzimske razgradnje OTA i neželjenih utjecaja ne nativnih mikroorganizama na kvalitetu vina. Prvi mehanizam mikrobiološke razgradnje podrazumijeva hidrolizu amino veze u netoksične proizvode L-β-fenilalanin i OTα, dok drugi mehanizam rezultira oblikovanjem OTA oblika otvorenom laktonskom formom koji za štakore ima jednaku toksičnost kao i OTA (Quintela i sur., 2013).

Drugi pristup redukcije OTA u vinima je adsorpcija OTA na staničnu površinu mikroorganizama. Adsorpcijske utjecaje pokazuju *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus spp.* (npr. *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis* i *L. sanfranciscensis*) i neke bakterije mliječne kiseline (npr. *Oenococcus oeni*, *L. plantarum* i *L. brevis*) (Quintela i sur., 2013).

Za grožđe koje se koristi za proizvodnju vina koristi se uobičajena praksa postupka vinifikacije, dodavanja sumpornog dioksida (stupanj sulfatiranja), što dovodi do inhibicije autohtonih

kvasaca. Također, tijekom posljednjeg koraka proizvodnje vina, dolazi do uklanjanja čvrstih tvari prisutnih u vinu, uključujući i stanice kvasca. Integrirana strategija koja se temelji na kombinaciji bioloških kontrolnih agenasa s prirodnim spojevima ili smanjenom dozom fungicida čini se kao jedna od najpouzdanijih metoda za veliku upotrebu mikrobnih antagonista u kontroli okratoksičnih plijesni i smanjene unosa OTA u hranidbeni lanac (Ponsone i sur., 2012). Zbog važne uloge kvašćevih stanica u proizvodnji vina, kvasac i inaktivni preparati suhog kvasca također su primijenjeni u biološkom postupku uklanjanja OTA iz sintetskih i prirodnih vrsta sokova od grožđa i vina (Petruzzi i sur., 2014). Redukcija OTA odvija se tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem različitih vrsta kvasaca u sintetskom mediju, moštu i vinu. Pri tom ne dolazi do razgradnje OTA već se razina OTA smanjuje kao rezultat fizikalnog vezanja za kvašćevu biomasu. Razina OTA koja se uklanja tijekom fermentacije uvelike ovisi o soju kvasca koji je uključen u fermentaciju (Quintela i sur., 2013).

Osim toga, mrtve stanice kvasca imaju prednost nad živućim jer imaju bolju sposobnost vezanja OTA i ne mijenjaju organoleptička svojstva gotovog proizvoda. Istraživanja na zagrijanim i zakiseljenim kvašćevim stanicama su pokazala da se u tim tretmanima pospješuje uklanjanje OTA iz groždanog soka i vina jer utječu na promjene u površinskim svojstvima stanica, npr. denaturaciju proteina ili oblikovanje produkata Maillardovih reakcija. S druge strane, kiseli uvjeti utječu na polisaharide otpuštanjem monomera koji se dalje nakon pucanja glikozidnih veza raspadaju na aldehide. Ovi otpušteni produkti posjeduju više adsorpcijskih strana od živućih kvašćevih stanica. Živće kvašćeve stanice vežu do 35% OTA, ovisno o koncentraciji kvasaca, dok tretirane stanice vežu do 90.3% OTA nakon toplinskog tretmana, odnosno do 73% nakon tretmana kiselinom stanica (Petruzzi i sur., 2014).

Novije tehnologije proizvodnje vina su usmjerene na vinifikaciju na vinskim talozima za koje se pokazalo da nakon alkoholne fermentacije sadrže OTA, pa se smatra da imaju kapacitet uklanjanja OTA iz vina (Fernandes i sur., 2007). Pri tom se uklanjanje OTA razlikuje kod bijelih i crnih vina odležanih u vinskom talogu. Nakon 7 dana kontakta (20 g/L taloga), u talogu bijelog vina se smanjio razinu OTA za 70.9%, dok je talog crnog vina smanjio razinu OTA za 51.%. Ova razlika se pripisuje natjecanju za mjesta vezanja OTA i polifenola (Petruzzi i sur., 2014).



## 4 Zaključak

1. OTA često kontaminira vino što značajno doprinosi izloženosti ljudi ovom mikotoksinu. Procijenjeno je da 15% dnevnog unosa OTA dolazi zbog konzumacije vina.
2. OTA je problem koji nastaje još u vinogradu. Stoga je vrlo važno spriječiti proizvodnju OTA, te provesti mjere sigurnosti i prevencije u cilju dovođenja proizvodnje OTA na minimalne vrijednosti.
3. *Aspergillus nigri* je glavna plijesan odgovorna za prisutnost OTA u grožđu. One su prirodno prisutne u vinogradima, a može se izolirati iz grožđa počevši od ranih faza razvoja bobica.
4. Ekološki parametri *Aspergillus* nisu u potpunosti poznati, što predstavlja kritičnu točku predviđanju rizika kontaminacije grožđa s OTA.
5. Klimatski uvjeti i zemljopisni položaj su važni čimbenici koji pogoduju razvoju OTA u grožđu.
6. Oštećenja izazvana abiotским ili biotskim uzročnicima, osiguravaju ulazak *Aspergillus* u bobice grožđa i povećavaju njihovu učinkovitost u proizvodnji OTA.
7. Više razine OTA u crnim vinima nego u bijelim vinima su posljedica razlika u tehnologiji proizvodnje vina.
8. Veća je prisutnost plijesni koje proizvode OTA u grožđu uzgajanom u toplijim vinorodnim krajevima. Međutim, izravna korelacija između tih dvaju parametara još nije sa sigurnošću dokazana.

## 5 Literatura

1. Abrunhosa L., Paterson R.R.M., Venâncio A. (2010) Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. *Toxins* **2**: 1078-1099.
2. Battiliani P. Logrieco A., Magan N. (2006) European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*. **111**: 2-4.
3. Belli N., Marin S., Sanchis V., Ramos A. J., (2006) Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives & Contaminants* **23**: 1021-1029.
4. Bellver Soto J., Fernández-Franzón M., Ruiz M.J., Juan-García A. (2014) Presence of Ochratoxin A (OTA) Mycotoxin in Alcoholic Drinks from Southern European Countries: Wine and Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**: 7643-7651.
5. Bennet J.W., Klich M. (2003) Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 497-516.
6. Blevé G. Grieco F. Cozzi G. Logrieco A., Visconti A. (2006) Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* **108**: 204-209.
7. Boudra H., Le Bars P., Le Bars J. (1995) Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1156-1158.
8. Bredenkamp M.W., Dillen J.L.M., Van Rooyen P. H., Steyn P.S. (1989) Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: Probing the chemical structure causing toxicity. *Journal of the Chemical Society* **2**: 1835-1839.
9. Cabañes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella G., Minguéz S., Pons A. (2002) What is the source of ochratoxin A in wine?. *International Journal of Food Microbiology* **79**: 213-215.
10. Chiodini A. M., Scherpenisse P., Bergwerff A. A. (2006) Ochratoxin A contents in wine: comparison of organically and conventionally produced products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 7399-7404.
11. Chulze S. N., Magnoli C. E., Dalcero A. M. (2006) Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grape and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology* **111**: 5-9.
12. Cicoňová P., Laciaková A., Máté D. (2010) Prevention of Ochratoxin A Contamination of Food and Ochratoxin A Detoxification by Microorganisms. *Czech Journal of Food Science* **28**: 465-474.

13. Covarelli L, Beccari G., Marini A., Tosi L. (2012) A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in Mediterranean area. *Food Control* **26**: 347-356.
14. Dachery, B., Manfroij, V., Berleze, K.J., Welke, J. E. (2016) Occurrence of ochratoxin A in grapes, juices and wines and risk assessment related to this mycotoxin exposure. *Ciência Rural*, 46, 176-183.
15. Delaš, F. (2010) Mikrobni toksini. U: Hrvatska agencija za hranu: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Grafika, Osijek, 31- 49.
16. EC (2005) Commission Regulation (EC) No 123/2005 of January 2005 Amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union L* **25**: 3-5.
17. EFSA (2006) Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal* **365**: 1-56.
18. El Khoury A., Atoui A. (2010) Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* **2**: 461-493.
19. Esti M., Benucci I., Liburdi K. Acciaro G. (2012) Monitoring of ochratoxin A fate during alcoholic fermentation of wine-must. *Food Control* **27**:53-56.
20. Lo Curto R., Pellicano T., Vilasi F. Munafo P., Dugo G. (2004) Ochratoxin A in experimental wines in relationship with different pesticide treatments of grapes. *Food Chemistry* **84**: 71-75.
21. Feier D., Tofana M. (2009) Ochratoxin A-Toxicological Aspects. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca. *Agriculture* **66**: 308-312.
22. Fernandes A., Ratola N., Cerdeira A., Alves A., Venâncio A. (2007) Changes in Ochratoxin A concentration during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* **58**: 92-96.
23. Flajs D., Domijan A. M., Ivić D., Cvjetković B., Peraica M. (2009) ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control* **20**: 590-592.
24. Freire L., Passamani F. R. F., Thomas A. B., Resende Nassur R. C. M., Silva L. M., Paschoal F. N. Pereira G. E., Prado G., Batista L. R. (2017) Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. *International Journal of Food Microbiology* **241**: 181-190.
25. Frisvald J. C., Frank J. M., Houbraken J. A. M. P., Kuijpers A. F. A., Samson R. A. (2004) New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* **50**: 23-43.

26. Hocking A. D., Leong S. L., Kazi B. A., Emmett R. W., Scott E. S. (2007) Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International Journal of Food Microbiology* **119**: 84-88.
27. Huff W.E., Hamilton P.B. (1979) Mycotoxins-Their Biosynthesis in Fungi: Ochratoxins-Metabolites of Combined Pathways. *Journal of Food Protection* **42**: 815-820.
28. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 56, International Agency for Research on Cancer. Lyon, France (1993) pp. 489-521.
29. Jiang C., Junling S., Cheng Y., Liu Y. (2014) Effect of *Aspergillus carbonarius* amounts on winemaking and ochratoxin A contamination. *Food Control* **40**: 85-92.
30. Kontaxakis, E. A. (2013) The influence of farming systems on the incidence of *Aspergillus carbonarius* in viticultural products, PhD Thesis, Cranfield University, Cranfield, Bedford, UK.
31. Lasram S., Barketi A., Mliki A., Ghorbel A. (2012) Growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* at different pHs and grape maturation stages. *Letters in Applied Microbiology* **54**: 418-424.
32. Leong S.L., Hocking A.D., Scot E.S. (2006) *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology* **102**, 124-133.
33. Leong S. L., Hocking A. D., Scott E. S. (2007) *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 123-133.
34. Lerda D., Miotti E., Litterio N. (2017) Detection and Genotoxicity of Ochratoxin A (OTA) in Raisins. *European Scientific Journal (ESJ)* **13**: ISSN: 1857 – 7881.
35. Lucchetta G., Bazzo I., Cortivo D., Stringher L., Belloto D., Borgo M., Angelini E. (2010) Occurrence of Black Aspergilli and Ochratoxin A on Grapes in Italy. *Toxins* **2**: 840-855.
36. Miller J.D., Trenholm H.L. (1994) Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin; Eagan Press: St. Paul, MN, USA.
37. Miraglia M., Brera C. (2002) Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. In: Reports on Tasks for Scientific Cooperation, Directorate-General Health and Consumer Protection, Italy.
38. Nguefack J., Dongmo J. B. I., Dakole C. D., Leth V., Vismer H. F., TOrp J., Guemdjom E. F. N., Mbeffo M., Tamggue O., Fotio D., Zollo P. H. A., Nkengfack A. E. (2009) Food preservative potential of essential oils and fractions from *cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology* **131**: 151-156.

39. Palumbo J. D., O' Keeffe T. I., Mahoney N. E. (2007) Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia* **164**: 241-248.
40. Petruzzi L., Sinnigaglia M., Corbo M. R., Campaniello D., Speranza B., Bevilacqua A. (2014) Decontamination of ochratoxin A by yeasts: possible approaches and factors leading to toxin removal in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 6555-6567.
41. Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., Piva G. (2001) Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives & Contaminants* **18**: 647-654.
42. Pittet A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - An updated review. *Revue de Médecine Vétérinaire* **149**: 479-492.
43. Pitt J. I., Hocking A. D. (2009) Fungi and Food Spoilage; 3<sup>rd</sup> ed. Springer: New York, USA.
44. Piotrowska M., Nowak A., Czyzowska A. (2013) Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *European Food Research and Technology* **236**: 441-447.
45. Ponsone M. L., Chiotta M. L., Combina M., Torres A., Knass P., Dalcero A., Chulze S. (2010) Natural occurrence of ochratoxin A in musts, wines and grape vine fruits from grapes harvested in Argentina. *Toxins* **2**: 1984-1996.
46. Ponsone M. L., Chiotta M. L., Palazzini J. M., Combina M., Chulze S. (2012) Control of Ochratoxin A Production in Grapes. *Toxins* **4**: 364-372.
47. Quintela S., Carmen Villarán M., Lopes de Armentia I., Elejalde E. (2013) Ochratoxin A removal in wine: A review. *Food Control* **30**: 439-445.
48. Reddy K. R. N., Reddy C. S., Muralidharan K. (2007) Exploration of ochratoxin A contamination and its management in rice. *American Journal of Plant Physiology* **2**: 206-213.
49. Rubert J., Sebastià N., Soriano J. M., Soler C., Mañes J. (2011) One-year monitoring of aflatoxins and ochratoxin A in tiger-nuts and their beverages. *Food Chemistry* **2**: 822-826.
50. Russo P., Capozzi V., Spano G., Corbo M.R., Sinigaglia M., Bevilacqua A. (2016) Metabolites of Microbial Origin with an Impact on Health: Ochratoxin A and Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology* **7**: 482.
51. Serra R., Mendonça C., Venâncio A. (2006) Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology* **111**: 35-39.
52. Soleas G. J., Yan J., Goldberg D. M. (2001) Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 2733-2740.

53. Somma S., Perrone G., Logrieco A.F. (2012) Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried fruits. *Phytopathologia Mediterranea* **51**: 131-147.
54. Šošo V.M., Škrinjar M.M., Blagojev N.T. (2012) Influence of ecophysiological factors on the presence of ochratoxin A in dried vine fruits: a review. *APTEFF* **43**: 123-138.
55. Triverdi A.B., Doi E., Kitabatake N. (1992) Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56**: 741-745.
56. Valero A., Marín A. J., Ramos A. J., Sanchis V. (2005) Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. *Letters in Applied Microbiology* **41**: 196-201.
57. Valero A. (2007) Ochratoxin A in overripe grapes, raisins and special vines, PhD Thesis, University of Lleida, Spain.
58. Varga J., Kozakiewicz Z., (2006) Ochratoxin A in grapes and grape derived products. *Trends in Food Science & Technology*. **17**: 72-81.
59. Vega M., Muñoz K., Sepulveda C., Aranda M., Campos V., Villegas R., Villarroel O. (2009) Solid-phase extraction and HPLC determination of ochratoxin A in cereals products on Chilean market. *Food Control* **20**: 631-634.
60. Visconti A., Perrone G., Cozzi G., Solfrizzo M. (2008) Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives & Contaminants* **25**: 193-202.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

A handwritten signature in black ink, reading "Jelena Perić", is written over a horizontal line.

ime i prezime studenta