

# Preventivne mjere i postupci redukcije okratoksina A u vinu

---

Šarić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:274131>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**SARA ŠARIĆ**

7106/PT

**PREVENTIVNE MJERE I POSTUPCI REDUKCIJE  
OKRATOKSINA A U VINU**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija vina

**Mentor:** Prof. dr. sc. Mara Banović

**Zagreb, 2019.**

# 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**

## **Preventivne mjere i postupci redukcije okratoksina A u vinu**

**Sara Šarić, 00582071433**

**Sažetak:** Jedan od najprisutnijih i najviše istraženih mikotoksina u vinu je okratoksin A. Zbog njegove toksičnosti, koncentracija okratoksina A u vinu je ograničena zakonskim propisima. Sa ciljem njegove redukcije, razvijeni su postupci koji se primjenjuju već u vinogradu ili tijekom tehnološkog procesa. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se primjenom određenih strategija može utjecati na udio okratoksina A u vinu, te dovesti njegovu koncentraciju na vrijednost koja ne predstavlja opasnost za zdravlje potrošača.

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

**Rad sadrži:** 28 stranica, 2 slike, 2 tablice, 75 literaturnih navoda i 0 priloga

**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:** rujan 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Undergraduate studies Food Technology**

**Department of Food Engineering**

**Laboratory for Technology and Analysis of Wine**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

### **Preventive actions and ochratoxin A reduction procedures in wine**

**Sara Šarić, 00582071433**

**Abstract:** One of the most common and most studied mycotoxins that can be found in wine is ochratoxin A. Due to its toxicity, the concentration of ochratoxin A in wine is restricted by law. With the aim of reducing it, procedures have been developed and are being applied already in the vineyard or during the technological process. The results of this study have shown that the use of certain strategies can affect the proportion of ochratoxin A in wine and bring its concentration to a value that does not pose a threat to consumer health.

**Key words:** wine, mycotoxins, ochratoxin A

**Thesis contains:** 28 pages, 2 figures, 2 tables, 75 references and 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Mara Banović, Professor

**Technical support and assistance:** PhD Mara Banović, Professor

**Defence date:** September 2019

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 MIKOTOKSINI.....	2
2.2 OKRATOKSIN A .....	3
2.2.1  Kemijaska struktura i fizikalno-kemijaska svojstva okratoksina A .....	3
2.2.2  Toksičnost i mehanizam djelovanja okratoksina A.....	4
2.3  IZVORI OKRATOKSINA A U VINU.....	5
2.4  FAKTORI KOJI UTJEČU NA KOLIČINU OKRATOKSINA A U VINU.....	6
2.5  OKRATOKSIN A U HRVATSKIM VINIMA .....	8
2.6  PREVENTIVNE MJERE I METODE REDUKCIJE OKRATOKSINA A U GROŽĐU I VINU .	9
2.6.1  Pesticidi i antioksidansi.....	11
2.6.2  Biološka kontrola .....	13
2.7  UKLANJANJE OKRATOKSINA A IZ VINA .....	15
2.7.1  Fizikalne metode uklanjanja okratoksina A iz vina.....	15
2.7.2  Kemijaska metode uklanjanja okratoksina A iz vina .....	17
2.7.3  Mikrobiološke metode uklanjanja okratoksina A iz vina .....	19
3. ZAKLJUČAK.....	21
4. LITERATURA .....	22

## 1. UVOD

Vino koje se stavlja na tržište mora zadovoljavati propisane kriterije kvalitete, te mora biti sigurno za potrošače. S kemijskog aspekta ono predstavlja kompleksnu otopinu koja se sastoji pretežito od vode i u njoj otopljenih različitih spojeva iz grupa alkohola, šećera, estera, spojeva sa dušikom, polifenola te anorganskih i organskih tvari (Batnariu i Butu, 2019). Među komponentama koje imaju pozitivan utjecaj na kvalitetu vina, mogu biti prisutne i one koje ga čine štetnim i nesigurnim za konzumiranje. Takve komponente su npr. metali, biogeni amini, sulfiti, razni alergeni, mikotoksini i slično (Žurga i sur., 2019).

Okratoksini su posebna skupina mikotoksina. Proizvode ih plijesni roda *Aspergillus* ili *Penicillium*, kao svoje sekundarne metabolite. Tri su vrste mikotoksina u toj skupini; okratoksin A, B i C, od kojih je najtoksičniji predstavnik skupine okratoksin A. Ovaj mikotoksin ističe se zbog svoje kancerogenosti, nefrotoksičnosti, genotoksičnosti i teratogenih svojstava, zbog čega predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. OTA je pronađen kao kontaminant u mnogim vrstama hrane kao što su žitarice, kava, grožđe, groždice i vino. Nakon žitarica, vino je drugi po redu izvor izloženosti čovjeka okratoksinu A u europskoj populaciji (Rotaru i sur., 2011). Stoga, pažnja je posebno usmjerena na njegove koncentracije u vinu, u kojeg dospijeva zahvaljujući plijesnima koje su prisutne na grožđu već u ranim fazama razvoja bobica. Kontaminacija okratoksinom A je veća kod crnih nego kod bijelih vina zbog različitih procesa proizvodnje vina, jer kod crnih vina kontakt bobice s moštom traje duže. Razvoj plijesni na grožđu uvjetovan je od strane više faktora, a na njega je poželjno utjecati zbog prevencije visokih koncentracija OTA u vinu.

Široku primjenu u vinogradu pronalaze i razni pesticidi te antioksidansi, no njihovo ispravno doziranje je od izuzetne važnosti jer visoke doze mogu narušiti organoleptička svojstva zrna i njegovih proizvoda, dok preniske doze mogu čak i pospješiti produkciju OTA (Lo Curto i sur., 2004). Ekološki prihvatljivije rješenje predstavlja biološka kontrola koja podrazumijeva primjenu bakterija, kvasaca i plijesni koji djeluju kao biofungicidi (Chulze i sur., 2015). Znanost je razvila više različitih metoda kojima je moguće umanjiti količinu OTA u vinu. Te metode temelje se na fizikalnim, kemijskim i mikrobiološkim procesima (Somma i sur., 2012).

Cilj ovog rada je razmotriti mikotoksin okratoksin A, njegovo djelovanje na ljudsko zdravlje, uzrok njegove pojave u vinu te čimbenike koji uvjetuju njegovu količinu, s posebnim naglaskom na metode prevencije njegove produkcije i njegova uklanjanja iz vina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 MIKOTOKSINI

Plijesni su vrlo rašireni organizmi koji imaju važnu ulogu u razgradnji organskih tvari u prirodi. Neke plijesni su korisne jer sintetiziraju spojeve koji sudjeluju u obrani organizma od raznih bolesti. Također mogu biti korisne u proizvodnji hrane i biotehnologiji. S druge strane, postoje i plijesni koje mogu sintetizirati toksične spojeve. Plijesni proizvode primarne i sekundarne metabolite. Primarne metabolite plijesni sintetiziraju za svoj rast i razvoj, dok sekundarne metabolite koriste u svrhu obrane od drugih mikroorganizama. Osim za druge mikroorganizme, sekundarni metaboliti mogu biti toksični i za ljude i životinje.

Ekstracelularni sekundarni metaboliti plijesni nazivaju se mikotoksini. Poznato je preko 100 strukturno okarakteriziranih mikotoksina, od kojih snažan utjecaj na ljudsko zdravlje imaju aflatoksini, okratoksin A, trihoteceni, zearalenon te fumonizini. Radi se o termostabilnim toksičnim tvarima, koje mogu zaostati na usjevima čak i kada nestanu svi znakovi zaraženosti plijesnima (Petruzzi i sur., 2014). Oni se međusobno razlikuju po biosintetskom podrijetlu, biološkoj aktivnosti i kemijskoj strukturi. Izloženost čovjeka mikotoksinima najčešća je konzumacijom hrane, a rjeđi slučajevi su njihovo udisanje ili prolazak kroz kožu. Obilježje mikotoksina koje ih čini opasnim je to što su visoko toksični u malim količinama. Također, pri konzumaciji hrane kontaminirane mikotoksinima, odsutna su bilo kakva senzorska upozorenja (promjena okusa/mirisa i slično). Akutne i kronične bolesti izazvane mikotoksinima nazivaju se mikotoksikoze. Mikotoksikoze nisu uobičajene kod čovjeka (Marriott i Gravani, 2006). Jedna plijesan može proizvesti više mikotoksina, no isto tako više vrsta ali i rodova plijesni mogu proizvesti isti mikotoksin. Rastu plijesni pogoduju povišena temperatura i vlaga te oštećenje biljke. Razne žitarice, uljarice te voće i povrće mogu biti podloga za rast plijesni tijekom uzgoja, prerade ili skladištenja. Konzumacija hrane kontaminirane mikotoksinima može dovesti do pojave i razvoja ozbiljnih zdravstvenih problema. Nadalje, kontaminacija hrane i stočne hrane mikotoksinima kao posljedicu donosi i ekonomske gubitke (Šegvić Klarić, 2012). Mikotoksini su uglavnom citotoksični te uništavaju stanične strukture. Nadalje, oni interferiraju s vitalnim staničnim procesima (sinteza proteina te DNA i RNA). S obzirom da je riječ o izrazito stabilnim spojevima, mikotoksini se nerijetko nalaze i u gotovom proizvodu koji je prošao tehnološku obradu, jer ih uobičajeni postupci proizvodnje i prerade hrane ne inaktiviraju. Mikotoksini u namirnice mogu dospjeti direktnom i indirektnom kontaminacijom. Direktna kontaminacija uzrokovana je razvojem plijesni na hrani, dok je indirektna uzrokovana korištenjem kontaminiranih sastojaka pri obradi hrane ili konzumacijom hrane koja sadrži ostatke mikotoksina (Marriott i Gravani, 2006).

**Tablica 1.** Bolesti ljudi koje se povezuju s unošenjem toksičnih količina mikotoksina (Katalenić, 2004)

<b>Sustav</b>	<b>Zdravstveni problemi</b>	<b>Mikotoksini</b>
krvotok	smanjena elastičnost krvnih žila, unutarnja krvarenja	aflatoksini, satratoksini, roridini
digestivni sustav	proljev, povraćanje, krvarenje crijeva, oštećenje jetre, nekroze, rane na mukoznim membranama, anoreksija	aflatoksini, T-2 toksini, deoksinivalenol (vomitoksin)
respiratorni sustav	ozbiljne poteškoće s disanjem, krvarenje pluća	trikotehekeni
živčani sustav	drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja	tremogeni, trikotehekeni
Koža	osip, fotosenzitivnost	trikotehekeni
urinarni sustav	oštećenje bubrega	ohratoksin, citrinin
reproduktivni sustav	sterilnost, promijene u reproduktivnim ciklusima	T-2 toksin, zearalenon

## 2.2 OKRATOKSIN A

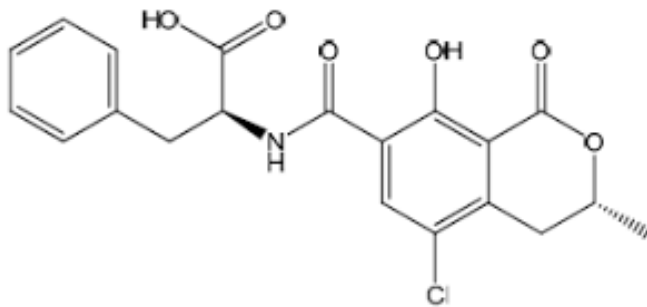
Okratoksine čini skupina kemijskih spojeva sintetiziranih od strane toksikotvornih plijesni *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium viridicatum* (Betina, 1989). Okratoksin A (OTA) je najtoksičniji predstavnik ove skupine. Izoliran je iz plijesni *Aspergillus ochraceus* (Delaš, 2010), te je identificiran u Južnoj Africi 1965. godine (Duraković i Duraković, 2003). IARC (International Agency for Research on Cancer) ga je svrstao u 2 B skupinu karcinogena (IARC, 1993).

### 2.2.1 Kemijska struktura i fizikalno-kemijska svojstva okratoksina A

Molekula okratoksina A sastoji se od 3,4-dihidroizokumarinai L-β-fenilalanina (Russo i sur., 2016). OTA je po kemijskoj strukturi 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-(3R)-metil izokumarin, amidno vezan s L-β-fenilalaninom (Valero, 2008). Uz to što je najtoksičniji iz skupine, OTA je ujedno i najbolje istraženi okratoksin. Okratoksin A je bezbojan do bijeli prah kristalinične strukture. Njegova relativna molekulska masa iznosi 403 g/mol, a njegova molekulska formula je C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>6</sub>. U kiselom mediju pod UV svjetlom pokazuje intenzivnu zelenu fluorescenciju, a u alkalnom mediju pokazuje plavu fluorescenciju. Slabo je topljiv u vodi, a u kiselom i neutralnom pH području je topljiv u organskim otapalima. U alkalnim



uvjetima pokazuje topljivost tj. topljiv je u vodenoj otopini natrijeva hidrogenkarbonata. Značajna osobina OTA je njegova stabilnost pri visokim temperaturama, što uzrokuje njegovo teško uklanjanje iz kontaminiranih namirnica (Khoury i Atoui, 2010). Dokazano je da se OTA samo djelomično razgrađuje pri normalnim uvjetima kuhanja. Uz to, OTA može izdržati tri sata pod visokim tlakom pare prilikom sterilizacije pri 121 °C pa čak niti pri 250 °C njegova razgradnja nije potpuna (Boudra i sur., 1995).



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

### 2.2.2 Toksičnost i mehanizam djelovanja okratoksina A

Okratoksin A u organizam ulazi putem hrane, preko probavnog sustava. Apsorpcija se odvija u tankom crijevu, najvećim dijelom u proksimalnom dijelu jejunuma (Kumagai i Aibara, 1982). Difundira u nedisociranom obliku preko lipidne membrane te portalnim krvotokom dolazi u jetru (Kumagai, 1985). U krvi se veže na albumine i druge makromolekule. OTA ima potencijalno nefrotoksično, kancerogeno i citotoksično djelovanje. Njegova toksičnost široko varira ovisno o vrsti, spolu i načinu primjene. Dokazana je u svim životinjskim vrstama, posebice u bubrezima, jetri i krvožilnom sustavu (Delaš, 2010). S obzirom na nefrotoksično djelovanje, OTA se smatrao jedinim uzročnikom odgovornim za bolest Balkanske endemske nefropatije (BEN); teške kronične, obostrane bolesti bubrega, te tumora urinarnog trakta. Ova bolest pojavila se u nekim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Srbije, Rumunjske i Bugarske (Leszkowicz i Manderville, 2007). OTA se smatra odgovornim i za svinjsku nefropatiju u sjevernoj Europi, bolest po mnogočemu sličnu BEN-u, zbog čega se smatra da te dvije bolesti mogu imati zajedničku etiologiju. OTA se kod ljudi i životinja akumulira u tjelesnim tekućinama, te se vrlo polako eliminira iz organizma (Richard, 2007). Može proći i kroz posteljicu i akumulirati se u fetalnim tkivima, te izazvati malformacije centralnog živčanog sustava (Leszkowicz i Manderville, 2007).

U većini slučajeva, osjetljivost stanica na OTA ovisi o koncentraciji mikotoksina, vremenu izlaganja te o unutarstaničnom molekularnom i genetičkom sastavu. Okratoksin A inhibira biosintezu makromolekula (proteina, DNA i RNA). Do inhibicije sinteze proteina dolazi uslijed kompeticije sa aminokiselinom fenilalanin (Phe) u reakciji aminoacilacije fenilalanina na RNA (Creppy i sur., 1984).

OTA također pospješuje lipidnu peroksidaciju, te ima nepovoljan utjecaj na metabolizam glukoze i homeostazu kalcija u biološkom sustavu (Braunberg i sur., 1992).

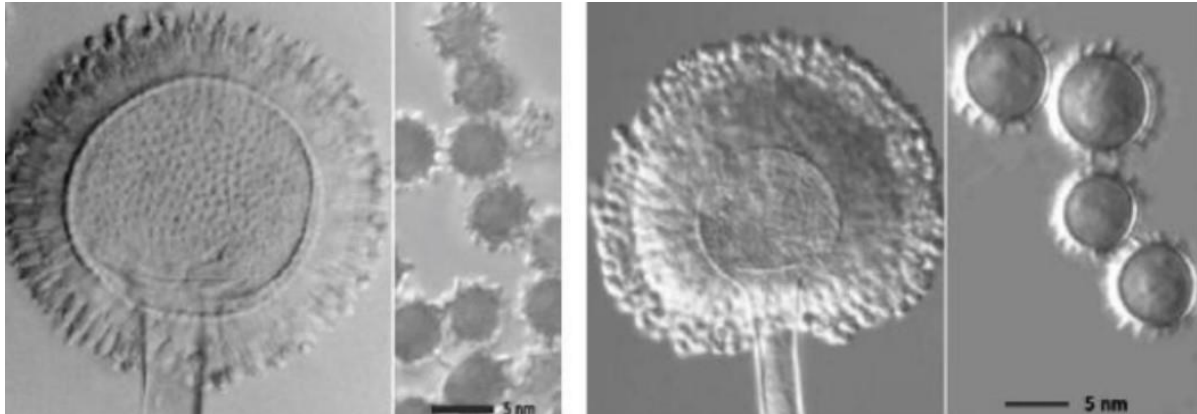
Većina zemalja ima zakonodavstvo koje propisuje maksimalne dopuštene koncentracije mikotoksina u određenim vrstama hrane, no ti propisi pojedinačnih zemalja se značajno razlikuju. Republika Hrvatska je uskladila svoje propise o mikotoksinima u hrani sa propisima Europske unije (Šegvić Klarić, 2012). Zemlje članice EU uskladile su zakonsku regulativu o maksimalnim dopuštenim koncentracijama mikotoksina u hrani za ljude i životinje (EZ/1881, 2006). Maksimalna dopuštena koncentracija okratoksina A za kategoriju „Vino (uključujući pjenušavo vino, osim likerskih vina i vina s volumnim udjelom alkohola ne manjim od 15 vol. %) i voćno vino“ i za kategoriju „Aromatizirana vina, aromatizirana pića na bazi vina i aromatizirani kokteli na bazi vina“ iznosi 2.0 µg/kg, s time da se najveća dopuštena količina primjenjuje na proizvode proizvedene od berbe iz 2005. godine nadalje.

### 2.3 IZVORI OKRATOKSINA A U VINU

Svježe voće sadrži visoku koncentraciju šećera. Vrijednosti aktiviteta vode ( $a_w$ ) u tkivu svježeg voća također su visoke, dok je pH niži zbog sadržaja organskih kiselina. To podržava rast svih, ali najviše kserofilnih ili osmofilnih plijesni, pa se smatra da su plijesni najčešći uzročnici kvarenja voća. Različite vrste plijesni mogu kontaminirati grožđe, najčešće iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Istraživanjima je dokazano da upravo grožđice, sokovi od grožđa, pekmezi od grožđa te vino sadrže velike koncentracije OTA (Covarelli i sur., 2012).

Rast plijesni na grožđu rezultira pojavom okratoksina A u vinu. Plijesni *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus ochraceus* smatraju se glavnim proizvođačima OTA. Ipak, plijesan *Aspergillus carbonarius* je glavni kontaminant vinove loze i izvor OTA u vinu (Battilani i sur., 2006). *A. carbonarius* ima crne spore izuzetno otporne na sunčevu svjetlost i sušenje, čija je posljedica dobar rast pri visokim temperaturama. Kao jedan od glavnih proizvođača okratoksina, prisutna je na grožđu, soku od grožđa, vinima i grožđicama, budući da se kontaminacija grožđa plijesnima može dogoditi prije berbe, za vrijeme berebe i tijekom

procesiranja grožđa. Okratoksin se primarno stvara u vrijeme prije berbe jer *A. carbonarius* inficira bobicu grožđa. Porast količine šećera i omekšavanje kože bobe do berbe pospješuju daljnje širenje plijesni (Samson i sur., 2004).



Slika 2. *A. niger* (lijevo) i *A. carbonarius* (desno) (Pitt i Hocking, 2009)

Više istraživanja provedenih na području Mediterana, Južne Amerike i Afrike pokazalo je da je glavni izvor OTA u vinu prisustvo takozvane „crne plijesni“, čija je pojava uočena samo na određenom vinogradarskom području. Okratoksin A nakuplja se u grožđu tijekom uzgoja vinove loze i proizvodnje grožđa, te u procesu proizvodnje dopijeva i u vino.

Naziv „crna plijesan“ podrazumijeva vrste iz roda *Aspergillus* : *A. carbonarius*, *A. niger* i *A. tubingensis*, koje su izolirane s bobica grožđa, iz tla te iz zraka na površinama vinograda. Plijesni iz roda *Aspergillus* razvijaju se na bobicama grožđa ovisno o stupnju oštećenja bobice u zrenju, a do same berbe mogu proizvesti okratoksin A na grožđu (Visconti i sur., 2008).

Prisustvo okratoksikogene plijesni nije uvjet za dokazivanje OTA, što se može dogoditi u slučaju kad kemijski procesi i uvjeti okoliša dovode do inaktivacije spora plijesni, ali ne utječu na udio OTA prisutan u supstratu (Amézqueta i sur., 2009).

## 2.4 FAKTORI KOJI UTJEČU NA KOLIČINU OKRATOKSINA A U VINU

Prisutnost OTA u moštu i vinu posljedica je kontaminacije grožđa plijesnima. Kontaminacija može nastati prije ili poslije berbe, te tijekom različitih faza koje prethode proizvodnji vina (Piotrowska i sur., 2013). Daljnji razvoj plijesni, a time i proizvodnja okratoksina A ovise o više faktora kao što su klimatski uvjeti tijekom dozrijevanja, vrijeme branja, količina i vrijeme korištenja fungicida, uvjeti skladištenja grožđa i tehnike primijenjene tijekom proizvodnje vina (Bellver i sur., 2014). Za rast plijesni kritičan je period između rane faze zrenja i branja.

Klima i geografski položaj imaju važan utjecaj na stupanj kontaminacije grožđa okratoksinom A. Okratoksikogene „crne plijesni“ učestalije se javljaju u vinogradima u vrućim i suhim klimatskim područjima (Blesa i sur., 2006). U svrhu utvrđivanja osnovnih podataka o mogućem uspješnom uzgoju neke sorte u određenim klimatskim uvjetima, predložen je način razvrstavanja vinogradarskih područja. Razvrstavanje se temelji na izračunu sume efektivnih temperatura.

Tako se s obzirom na klimatske uvjete, vinogradarska područja dijele u pet zona (A, B, C, CII i CIII) (Winkler i sur., 1974). Neka istraživanja pokazala su da vina iz područja južne Europe i Afrike sadrže veće količine OTA nego vina sa sjevera. Konkretno, vina iz Mediteranskog priobalja (južni dijelovi Francuske i Italije, Grčka i neki dijelovi Portugala i Španjolske), više su kontaminirana od vina iz ostalih dijelova Europe (Quintela i sur., 2013). Ta razlika objašnjava se razlikom u klimi, načinu uzgoja grožđa te uvjetima skladištenja. Istraživanja na području Hrvatske također pokazuju da su u južnim vinogradarskim regijama češće pojave i više razine OTA u vinu (Domijan i Peraica, 2005). Mediteranska vinorodna područja pretežno se ubrajaju u CIII zonu. Spomenutu zonu karakteriziraju vruća i suha ljeta, te tople i vlažne jeseni. Prema rezultatima istraživanja, vina koja su podrijetlom iz vinogradarskih zona A, B i CI, negativna su na prisutnost OTA (Valero i sur., 2008). Druga studija pokazala je da je OTA ipak prisutan u svim vrstama vina iz spomenutih zona, iz čega se može zaključiti da postupak u proizvodnji vina ima veći utjecaj na sadržaj OTA nego podrijetlo vina s obzirom na vinogradarske zone. Količina okratoksina A je ujedno ovisna i o geografskoj širini vinograda: pri nižim geografskim širinama kontaminacija je veća (Berente i sur., 2005). Više je čimbenika koji utječu na kontaminaciju i nakupljanje OTA u grožđu. Od značajne važnosti je vrijeme, a posebice temperatura koja uvelike diktira rast *Aspergillus niger* i utječe na proizvodnju okratoksina A. (Varga i sur., 2006). Razvoj mikotoksina najviše ovisi upravo o temperaturi zraka, pri čemu je najveći rast okratoksina A pri 15-20°C kod *A. carbonarius* i 20-25°C kod *A. niger*. Rast plijesni također ovisi o aktivitetu vode grožđa pri čemu je optimalna vrijednost  $a_w$  0.930-0.987 (Covarelli i sur., 2012).

Čimbenik koji također utječe na kontaminaciju okratoksinom A je zdravlje grožđa. Razvoj plijesni posebice je uspješan na oštećenim bobicama (Varga i sur., 2006). Bobice pucaju zbog prekomjerne vlage, a oštećenje mogu uzrokovati i ptice, insekti ili druge gljivične infekcije (Visconti i sur., 2008).

Kretanje zraka te razni kukci potpomažu prenošenje spora „crne plijesni“ iz tla na površinu bobica grožđa, nakon čega dolazi do razvoja i rasta plijesni, te posljedično i do proizvodnje sekundarnog metabolita plijesni- OTA.

Interakcija između različitih vrsta plijesni također utječe na razvoj OTA u grožđu. Tako plijesan *Eurotium amstelodami* doprinosi nakupljanju OTA kada djeluje u kombinaciji s *Aspergillus* spp. Nasuprot tome, *Penicillium janthinellum* smanjuje kolonizaciju aspergila i proizvodnju OTA tijekom sušenja. Koncentracija OTA također je smanjena kada *Aspergillus niger* raste zajedno s drugim plijesnima. Nakupine *A. carbonarius* i *A. niger* smanjuju razinu OTA, vjerojatno zbog ograničenog rasta sojeva koji proizvode OTA uslijed manjka nutrijenata ili uslijed potencijalne razgradnje OTA djelovanjem kompeticijske plijesni. Sušenje grožđa potpomaže rast kontaminacije vina okratoksinom A, pri čemu se stupanj kontaminacije razlikuje kod različitih metoda sušenja. Tradicionalni proces sušenja na suncu pogoduje rastu plijesni jer je grožđe izloženo okolišu tj. toplom sušenju tijekom dana i hladnim i vlažnim noćima. Takva fluktuacija temperature i vlažnosti rezultira većim brojem oštećenih bobica i na taj način su stvoreni pogodni uvjeti za rast plijesni. Sigurnija varijanta je primjena komora za sušenje grožđa s kontroliranim uvjetima temperature i vlažnosti. Usporedbom količine OTA u vinima nastalima iz grožđa koje je sušeno u različitim vrstama posebno kondicioniranih komora, ustanovljeno je da vina proizvedena od grožđa sušenog u hladnim komorama sadrže veće razine OTA (prosječno 1.35 µg/L) od onih dobivenih od grožđa sušenog u toplim komorama (prosječno 0.58 µg/L), što je vjerojatno posljedica duljeg vremena sušenja pri nižim temperaturama (2-6 mjeseci) i okolišnih uvjeta koji pogoduju rastu plijesni (Covarelli i sur., 2012).

## 2.5 OKRATOKSIN A U HRVATSKIM VINIMA

U prvom istraživanju kontaminacije hrvatskih vina mikotoksinom OTA, uzeti su uzorci 28 suhih vina, od kojih je 14 crvenih, 13 bijelih te jedno ružičasto. Također, uzeto je 7 slatkih vina, od čega su 3 crvena i 4 bijela. Uzorci su prikupljeni iz različitih vinogradskih područja i sa različito primijenjenom tehnologijom proizvodnje. Pronađene razine okratoksina A kretale su se u rasponu od 0,02 -3,2ng/ml. Ustanovljeno je da slatka vina sadrže više razine OTA od suhih vina. Većina ispitanih vina sadržavala je relativno niske koncentracije okratoksina A (0,02-0,5 ng/ml). Pronađene razine su unutar maksimalne vrijednosti propisane za zemlje članice EU, i ne predstavljaju rizik za zdravlje potrošača. Bez obzira na to što broj ispitanih uzoraka nije reprezentativan, indikativno je da su svi uzorci sa Jadranske obale (južna vinogradarska područja) sadržavali OTA, dok 3 bijela vina iz kontinentalne Hrvatske (sjever) nisu bila kontaminirana s OTA. Ustanovljeno je i da su koncentracije OTA u hrvatskim vinima općenito niže nego u drugim područjima Europe, što ih čini sigurnijima za zdravlje potrošača. Također, istaknuto je i da koncentracije koje su pronađene u hrvatskim crnim i bijelim vinima

ne predstavljaju rizik za svakodnevnu uporabu, ukoliko je ona ograničena na dvije čaše dnevno (Domijan i Peraica, 2005).

U novijem istraživanju, analiziran je širok raspon hrvatskih crnih vina te njihovo onečišćenje okratoksinom A. Korišteni uzorci prikupljeni su sa različitih geografskih područja. Obuhvaćena su vina sa područja istočne kontinentalne Hrvatske te vina iz Istre i Dalmacije, za koje se inače smatra da imaju ugledne klimatske uvjete. Istočna kontinentalna Hrvatska ima kontinentalnu klimu sa vrućim ljetima i hladnim zimama te dovoljno oborina za uspješnu poljoprivredu. Obalno područje Hrvatske ima mediteransku klimu, no u Istri se osjeti i utjecaj Alpa tako da su tamošnja ljeta vruća i vlažna, dok su ljeta u Dalmaciji vruća i suha. Oba područja karakteriziraju i blage zime. Koncentracije OTA u analiziranim vinima kretale su se od ispod granice detekcije do 0,163 g/L, dok su prosječne vrijednosti bile 0,040 odnosno 0,026 g/L, pri čemu je samo 9% vina sadržavalo koncentraciju OTA veću od 0,1 g/L. Rezultati ovog istraživanja opsežno su uspoređivani sa rezultatima dobivenima za različite europske i mediteranske zemlje. Međutim, uspoređivanje rezultata mora biti provedeno sa oprezom, jer se korištene metodologije analitičkih postupaka i izvještavanje o rezultatima bitno razlikuju (Žurga i sur., 2019).

Istraživanja su pokazala da su koncentracije OTA nešto veće u konvencionalno proizvedenim nego u organski proizvedenim hrvatskim vinima (Vitali Čepo i sur., 2018).

Prilikom istraživanja pojave OTA i prisutnosti pojedinih sojeva toksikogenih plijesni u moštu i vinu iz Hrvatske, koncentracija OTA u moštu (raspon 19- 50 ng/L) bila je veća nego u vinu (raspon 0- 21 ng/L). Sojevi *A. carbonarius* nisu pronađeni ni u moštu ni u vinu, vjerojatno zbog prisutnosti drugih plijesni koje proizvode OTA, poput *A. tubingensis*, *A. ochraceus* ili *A. niger* (Flajs i sur., 2009). Nadalje, u 90% uzoraka crnog, bijelog i desertnog vina utvrđena je prisutnost OTA u rasponu koncentracija od 0.02- 0.60 ng/mL za crno vino, 0.05- 0.55 ng/mL za bijelo vino, i 0.20- 0.35 ng/mL za desertno vino (Markov i sur., 2014).

## **2.6 PREVENTIVNE MJERE I METODE REDUKCIJE OKRATOKSINA A U GROŽĐU I VINU**

Važnost grožđa i proizvoda od grožđa je značajna u svjetskoj proizvodnji hrane. 71% ukupne količine grožđa koristi se u vinarstvu, 27% proizvedenog grožđa konzumira se svježe, a tek 2% konzumira se kao suho voće tj. grožđice (Somma i sur., 2012). Vino kao proizvod od grožđa ima najznačajnije mjesto u međunarodnoj trgovini. Gotovo polovica svjetske proizvodnje vina odvija se u tri europske zemlje: Italiji, Francuskoj i Španjolskoj, a u

međunarodnoj trgovini vinom, Europa je izvoznik 70% vina (OIV, 2012). Upravo zbog popularnosti i konzumacije raznih vrsta vina na svjetskoj razini, vrlo je važno osigurati koncentracije OTA čije su vrijednosti unutar propisanih okvira. Prisutnost OTA u vinu može negativno utjecati kako na zdravlje potrošača tako i na gospodarstvo i trgovinu vina. S obzirom da je pojava OTA u vinu gotovo neizbježna, važno je pridržavati se strategija čiji je cilj smanjenje njegova sadržaja. Istraživano je nekoliko strategija smanjivanja njegova sadržaja u poljoprivrednim proizvodima, a te strategije svrstavaju se u tri glavne kategorije: prevencija kontaminacije, detoksikacija ili dekontaminacija kontaminirane hrane i inhibicija apsorpcije OTA u gastrointestinalnom traktu (Varga i sur., 2010). Poduzimanje određenih preventivnih mjera kako bi se pojava OTA u vinu i njegova koncentracija sveli na najmanju moguću mjeru, najbolja je i najučinkovitija zaštita vina od negativnih posljedica koje ovaj mikotoksin može prouzročiti. Tako bi primjena dobre poljoprivredne i proizvođačke prakse te HACCP sustava, kao i upravljanje mogućim rizicima na temelju kritičnih kontrolnih točaka mogli pomoći u kontroli količine i akumulacije okratoksina A u vinu.

### **Preventivne mjere u vinogradu**

S obzirom da je *A.carbonarius* glavna vrsta plijesni odgovorna za akumulaciju OTA u bobicama grožđa od početka zrenja do berbe, objašnjene su preliminarne strategije u kontroli upravo ove plijesni. Ispravnom agronomskom praksom moguće je smanjiti koncentraciju OTA kako u grožđu, tako i u vinu. Prema spomenutim strategijama, poželjna je proizvodnja malih slobodnih grozdova koji su rašireni kroz dovoljno aerirane krošnje, kako bi se izbjegla zbijenost grozdova i nedostatak cirkulacije zraka, što bi pogodovalo razvoju plijesni. Ovakva proizvodnja ostvariva je primjenom rezidbe trsova i navodnjavanja. Također, bobice je potrebno zaštititi od štetočina, posebno u periodu između dozrijevanja i branja, kako bi se izbjegla oštećenja bobica koja pogoduju razvoju plijesni. Iz istog razloga, poželjno je i smanjiti mehanička te okolišna oštećenja bobica i grozdova. Opasnost od mehaničkih oštećenja u ovom slučaju predstavljaju kiša ili sunce. Nadalje, poželjna je i kontrola incidencije pojave *A.carbonarius* ispravnom obradom i održavanjem tla vinograda. Valja spomenuti i vrlo veliku ulogu branja grožđa u odgovarajućoj fazi zrelosti. Potrebno je i u najvećoj mjeri smanjiti razmak između branja i vinifikacije (Corzani, 2007).

Primjenom odgovarajuće vinogradarske prakse, prisutnost OTA u vinu može se smanjiti i do 80%. Presudan čimbenik u pojavi *Aspergillus spp.* i nakupljanju OTA su okolišni uvjeti, no značajno smanjenje konačne koncentracije mikotoksina u grožđu može se postići i kontrolom

biotičkih i abiotičkih agenasa. Dobar sistem uzgoja vinove loze mora omogućiti optimalnu izloženost sunčevoj svjetlosti, fotosintezu te dobru cirkulaciju zraka. Ovi čimbenici pospješuju smanjenje pojave bolesti. Takve vrste uzgoja su, između ostalog, i bilateralna kordunica te peharasti slobodni uzgoj (Rousseau i Blateyron, 2002).

U jednom istraživanju, OTA nije pronađen u Malvaziji crnoj proizvedenoj od grožđa iz gore spomenutih vrsta uzgoja. Nasuprot tome, u kultivaru Negroamaro uočena je viša koncentracija OTA u slučaju primjene peharastog sistema. Razlog tome je mala udaljenost između grozdova i tla, što pogoduje kontaminaciji plijesnima. Također, zabilježena je i značajna kontaminacija plijesnima iz roda *Aspergillus* kod grozdova razvijenih na trsu bliže tlu i kod grozdova koji su izloženi izravnoj sunčevoj svjetlosti, za razliku od grozdova koji rastu dalje od zemlje i koji su zaštićeni od izravne sunčeve svjetlosti (Battilani i sur., 2004).

### **2.6.1 Pesticidi i antioksidansi**

Koncentracija OTA u grožđu i vinu može se smanjiti i pravovremenom primjenom fungicida koji djeluju na vrste roda *Aspergillus* (Covarelli, 2012). Prije primjene pesticida, nužno je razmotriti kako će se sama primjena odraziti na koncentraciju OTA, budući da neki fungicidi djeluju pozitivno ili negativno na proizvodnju OTA.

Dokazano je da u kombinaciji sa sumporom, neki pesticidi poput Azoksistrobina (derivat strobilurina) ili Dinokapa (dinitrofenilni derivat) učinkovito umanjuju koncentraciju OTA u vinima. Nasuprot tome, pesticidi kao što su Karbendazim i Chorus nisu pokazali učinkovitost u kontroli truljenja uzrokovanog od strane plijesni *Aspergillus* sekcije Nigri. S druge strane, korištenjem pesticida pod nazivom Switch, značajno je reducirana učestalost crnih plijesni na grožđu. Switch je kombinirani fungicid dviju djelatnih tvari: ciprodinil i 20 fludioksonil, koji se svrstavaju pod pirimidine i pirolnitrine. Najveća učinkovitost tretmana smjesom ciprodinila i fludioksonila pokazana je u slučaju primjene smjese 21 dan prije berbe, ili u uvjetima visokog rizika pojave kontaminacije vrstama roda *Aspergillus*. U istim uvjetima pokazala se učinkovitom i protiv pojave sive plijesni i biosinteze okratoksina A (Belli i sur., 2007).

S druge strane, fungicid Chorus također sadrži djelatnu tvar ciprodinil a pokazao se neučinkovitim protiv *Aspergilla*, što ukazuje na to da je zapravo fludioksinil aktivni sastojak Switch pesticida. U prošlosti se za suzbijanje crnih *Aspergilla* koristio pirolnitrin, a fludioksonil je njegov sintetički analog. Neka istraživanja provedena u Francuskoj pokazala su da su tretiranja fungicidima Switch, Scala (koji sadrže pirimidin fungicid pirimetanil) i fungicidom



Mikal (koji sadrži fosetil-Al i dikarboksimid folpet) rezultirala značajnim smanjenjem kolonizacije plijesni i samog sadržaja OTA u vinu (Ponsone i sur., 2012). Spomenuta tri fungicida, Switch, Scala i Mikal pokazali su se kao najefektivniji fungicidi pri suzbijanju plijesni i smanjenju koncentracije OTA u vinima. Oni fungicidi koji sadrže bakar ili strobilurine smanjili su i rast i produkciju OTA, za razliku od sumpornih fungicida. Od svih fungicida koji su inhibirali rast *A. carbonarius* u sintetičkom mediju, prilikom testiranja kao najučinkovitiji aktivni sastojak za zaustavljanje rasta plijesni pri smanjenim dozama pokazao se ciprodinil. Prilikom testiranja tih fungicida na grožđu, dobiven je učinak sličan onom na sintetičkom mediju (Belli i sur., 2006). Iako uvelike olakšavaju kontrolu nad plijesnima, fungicidi moraju biti pažljivo primjenjivani jer su neki od njih, unatoč tome što su smanjili floru plijesni, ipak stimulirali proizvodnju OTA. Primjer takvog fungicida je Karbendazim (Lo Curto i sur., 2004).

Druga strategija za smanjenje rasta plijesni i proizvodnju mikotoksina je korištenje antioksidansa poput vanilične ili 4-hidroksibenzojeve kiseline i esencijalnih ulja ekstrahiranih iz nekih biljaka (npr. *Thymus Vulgaris* ili *Aframomum danielli*). Primjena navedenih sredstava utjecala je i na rast plijesni i na smanjenje sinteze OTA (Ponsone i sur., 2012). Razmatrajući utjecaj na ljudsko zdravlje, upotreba antioksidanasa kao antimikrobnih sredstava dopuštena je od strane US Food and Drug Administration (FDA) i proglašena sigurnim (GRAS) kemikalijama. Takvi antioksidansi imaju zaštitni učinak u hrani a uz to mogu pogodovati pozitivnim organoleptičkim svojstvima hrane, što bi mogla biti interesantna opcija za sirovinu koja zahtijeva dugo razdoblje skladištenja, kao što je slučaj kod sušenog voća.

Trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je antioksidativni spoj prirodno proizveden u velikom broju biljaka, te je ujedno i glavna komponenta odgovorna za pojavu fitoaleksina. Nalazi se i u grožđu, te se akumulira u listovima vinove loze i pokožici grožđa kao odgovor biljke na opasnost tj. na različite infekcije uzrokovane plijesnima, UV zračenje ili kemikalije. Trans-resveratrol pronađen je i u vinima u različitim koncentracijama, ovisno o primjenjenoj vinogradarskoj ili enološkoj praksi. Dokazano je da trans-resveratrol povećava otpornost vinove loze i na druge patogene kao što su *Plasmopara viticola*, *Phomopsis viticola* te *Rhizopus Stonifer*. Riječ je o prirodnom pesticidu koji pokazuje učinkovitost u borbi protiv napada patogena te djeluje na prirodno povećanje otpornosti grožđa na infekcije plijesni. Trans-resveratrol također može imati i pozitivne učinke na konzerviranje voća tijekom skladištenja, a može se primjenjivati i u svrhu smanjenja kvarenja grožđa (Ponsone i sur., 2012).

Nadalje, dokazano je prisustvo nekih supstanci u biljkama, čija je uloga sprječavanje rasta i razvoja OTA. Naime, ustanovljeno je da eterična ulja timijana i anisa (500 ppm), cimeta (1000 ppm) i zelene metvice (2000 ppm) inhibiraju rast *A. ochraceus*. 1% ulja timijana i anisa te 2% ulja cimeta potpuno inhibiraju proizvodnju OTA u pšenici (Ciconova i sur., 2010).

Dokazano je da ekstrakt gomolja češnjaka potpuno inhibira rast *A. ochraceus*. S obzirom da visoke razine mogu proizvesti neželjene učinke na zrnju, vrlo je važno uzeti u obzir određivanje optimalnih doza aplikacije antifungalnih tvari. Previsoka količina upotrebljenog fungicida može narušiti organoleptička svojstva zrna i njegovih proizvoda, što za posljedice može imati negativan ekonomski i gospodarski učinak. Nasuprot tome, subinhibitorne doze kao i neadekvatna raspodjela kemikalija, posebno pri niskim razinama aktiviteta vode, u konačnici mogu uzrokovati povećanje proizvodnje OTA, tako što je u tom slučaju povećana sporulacija plijesni te stimulacija produkcije sekundarnih metabolita (Reddy i sur., 2007).

Kemikalije su najčešće korištene za sprječavanje rasta plijesni i mikotoksina. S obzirom na povećanje broja otpornih sojeva plijesni i negativnog utjecaja fungicida na okoliš te na ljudsko zdravlje, utvrđeni su strogi propisi od strane Europske unije (Ponsone i sur., 2012). U mnogim proizvodima, uključujući i grožđe, regulirane su maksimalne koncentracije ostataka pesticida (EC, 2005). U posljednje vrijeme, sve više pažnje usmjereno je na alternativne metode koje bi mogle zamijeniti ili dopuniti fungicidne tretmane za kontrolu toksigeničnih plijesni prije i poslije berbe (Ponsone i sur., 2012).

### **2.6.2 Biološka kontrola**

Zbog sve veće rezistencije plijesni na spomenute kemikalije te zbog njihovog nepovoljnog utjecaja na okoliš i zdravlje potrošača, sve je veći interes za alternativnim, ekološki prihvatljivim rješenjima, koja imaju komplementarnu uporabu ili služe kao potpuna zamjena za kemikalije. Među takva rješenja spadaju postupci biološke kontrole u kojima se prirodno prisutne bakterije, kvasci i plijesni koriste kao potencijalni bioagensi za suzbijanje patogena i toksikogenih plijesni (Chulze i sur., 2015). Prednost uporabe bioagenasa je to što se mogu primjenjivati u kombinaciji sa fungicidima i na taj način smanjiti njihovu upotrebu i rast plijesni. Promatrajući mikrofloru prisutnu na površini bobica grožđa, najzastupljeniji su epifitni kvasci. Njihova biofungicidna djelatnost proizlazi iz kompeticije za prostor i nutrijente s drugim mikroorganizmima, a posjeduju i sposobnost kolonizacije na grožđu. Nekoliko je vrsta kvasca različitih rodova koji se danas smatraju potencijalnim agensima za biološku

kontrolu rasta plijesni iz roda *Aspergillus* i kontrolu akumulacije OTA (Ponsone i sur., 2012). Što se tiče biofungicidnog djelovanja kvasaca, smanjenje kontaminacije sa plijesni i OTA postignuto je i upotrebom kvasaca *Cryptococcus laurentii* i *Aureobasidium pullulans*, koji su izolirani sa grožđa u Grčkoj te kvasca *Hanseniaspora uvarum* izoliranog u Italiji, primjenom jenotjednog ili dvotjednog tretmana (Visconti i sur., 2008). Jedno istraživanje provedeno "in vitro" i "in situ" ispitalo je uspješnost dvaju sojeva *Kluyveromyces thermotolerans* u sprječavanju rasta i akumulacije OTA. Prema rezultatima, navedeni sojevi mogu kontrolirati rast *A. niger* i *A. carbonarius* te akumulaciju OTA. Postignuti stupanj inhibicije ovisio je o ispitivanim uvjetima (soj toksikogene plijesni, soj kvasca,  $a_w$  i temperatura te njihove interakcije). Provedenim eksperimentom, akumulacija OTA smanjena je za 3% do 100% a rast plijesni smanjen je od 11% do 82.5% (Ponsone i sur., 2011). Špricanjem vinograda suspenzijom koja sadrži *Aureobasidium pullulans* (soj LS30) u vrijeme pred zatvaranje grozda, ranog šarka i 20 dana prije berbe, postignuto je znatno smanjenje pojave plijesni te je u potpunosti spriječena sinteza OTA (Felice i sur., 2008).

Kvasci *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* i *Candida incommuni* izolirani sa grožđa, smanjuju kolonizaciju *A. carbonarius* i *A. niger* na bobicama grožđa (Bleve i sur., 2006). Vinski kvasaci *S. cerevisiae* mogu i do 100% smanjiti akumulaciju OTA sa grožđa, mošta i vina, ovisno o soju i mediju u kojem djeluju (Quintela i sur., 2013).

Sposobnost inhibicije rasta plijesni i akumulacije mikotoksina posjeduju i razne bakterije. Tako npr. *Bacillus sp.*, *B. thuringiensis* upotrijebljeni tijekom kultivacije grožđa kao komercijalni insekticidi, inhibiraju rast *A. carbonarius* (Bae i sur., 2004). Istraživanjem biofungicidnog djelovanja *Bacillus subtilis* u svrhu inhibicije *A. carbonarius*, zaključeno je da se može uspješno primjenjivati i tijekom skladištenja stolnog grožđa i na polju (Jiang i sur., 2014).

U jednoj studiji razvijena je ekološki isplativa, netoksična i učinkovita strategija redukcije OTA korištenjem bakterije *Bacillus subtilis* koja je bila imobilizirana na zrnima natrijevog alginata. Količina OTA smanjena je za 90% (pri pH= 3 i 25% NaCl), a smanjenje sadržaja OTA povećavalo se s padom pH i porastom koncentracije NaCl. Uz to, dodatak zrnaca crvenom vinu kontaminiranom sa OTA rezultirao je smanjenjem OTA za 78,50% ± 0,49% nakon jednog sata. Dodatak slobodnih stanica *B. subtilis* pokazao je smanjenje OTA za 81,70% ± 1,91%, ali s obzirom da takav način primjene zahtijeva i veći broj stanica, takva metoda nije se pokazala isplativom. Nadalje, jednostavno čišćenje zrnaca etanolom omogućilo je njihovu ponovnu upotrebu i obnovu najmanje 10-20 puta, uz značajnu

sposobnost smanjenja OTA. Ovi rezultati sugeriraju potencijalnu primjenu alginatnih zrnaca sa imobiliziranom *B. subtilis* u svrhu smanjenja OTA iz uzoraka crvenog vina, a strategija bi se mogla primijeniti i na druge vrste tekuće hrane (Shruti i sur., 2019).

U posljednje vrijeme, istraživanja vezana za procjenu rizika i prevenciju biosinteze OTA se baziraju na primjeni tzv. prediktivne mikologije, koja je usmjerena na razvoj modela za predviđanje rasta plijesni, njihove inaktivacije te produkcije mikotoksina. Naime, razvijen je model za dinamičku simulaciju proizvodnje OTA na grožđu sa *A. carbonarius*. Prilikom postavljanja modela, korišteni su različiti čimbenici koji su inače značajni za razvoj plijesni i za sintezu OTA. Također, korišteni su podaci dobiveni istraživanjima provedenim u talijanskim regijama Apulija i Emilia Romagna (Battilani i Leggieri, 2015). Ovo istraživanje upućuje na potencijalnu mogućnost izrade jednostavnog softvera čiji bi zadatak bio predviđanje rizika za razvoj OTA u grožđu, moštu i vinu.

## **2.7 UKLANJANJE OKRATOKSINA A IZ VINA**

Ukoliko preventivne metode smanjenja koncentracije OTA nisu provedene ili su provedene neuspješno, krajnji produkt proizvodnje (u ovom slučaju vino), vjerojatno će sadržavati koncentraciju OTA koja premašuje propisanu maksimalnu vrijednost. 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).

### **2.7.1 Fizikalne metode uklanjanja okratoksina A iz vina**

Fizikalne metode smanjenja koncentracije OTA i njegovog uklanjanja iz vina prvenstveno uključuju uklanjanje pljesnivog grožđa, čime se sprječava da takvo kontaminirano grožđe uđe u proces vinifikacije. Tim postupkom se može reducirati i do 98% ukupne koncentracije OTA. Zbog gubitka velikog dijela sirovine na samom početku procesa proizvodnje, za vinsku industriju taj postupak je ipak neisplativ (Quintela i sur., 2013). Dokazano je da, ukoliko se poveća pritisak prilikom prešanja masulja, dolazi do porasta koncentracije OTA. Kad se pritisak pod kojim se preša komina smanji sa 80 atm na 8 atm, koncentracija OTA u vinu se umanjuje i do 4 puta (Gambutti i sur., 2005).

S druge strane, filtracijom se preko membrana 0.45  $\mu\text{m}$  količina OTA smanjuje za 80%. Dokazano je i da povišenje temperature nema nikakvog učinka na smanjenje koncentracije

OTA. Smatra se da se za vrijeme postupka prešanja grožđa ukloni oko 80% ukupne količine OTA, dok kvasci apsorbiraju oko 50% preostalog OTA (Leong i sur., 2006). Tijekom vinifikacije, groždana komina adsorbira OTA zbog svog visokog afiniteta prema njemu. Visoki afinitet groždane komine prema OTA dokazan je dovodenjem kontaminiranog vina u kontakt s kominom. Time je postignuta redukcija OTA za 50 do 65%, ovisno o sorti grožđa od koje je nastala komina. U istom istraživanju dokazano je da u slučaju dovodenja vina u kontakt sa kominom iste sorte ne dolazi do narušavanja parametara kvalitete (uključujući intenzitet boje i fenolni profil). S druge strane, primjena komine od drugih sorti grožđa može imati i pozitivan i negativan utjecaj na kvalitetu tretiranog vina (Solfrizzo i sur., 2010).

Tijekom spontanog procesa bistrenja (dakle bez dodatka sredstava za bistrenje i malolaktičke fermentacije), količina OTA se smanjuje za više od 90%. Ta pojava je posljedica vezanja OTA na krutu frakciju vina tj. na čestice taloga (Fernandes i sur., 2007).

Tijekom jedne godine starenja vina Cabernet sauvignon u bocama, udio OTA smanjio se za 11,8% dok se nakon dodatnih 6 mjeseci starenja smanjio za 17,6%. Nastavkom starenja do dvije godine, nisu zabilježene daljnje promjene u sadržaju OTA (Anli i sur., 2011). Tijekom skladištenja crnog i bijelog vina u periodu od 10-14 mjeseci dolazi do većeg smanjenja količine OTA u crnim u odnosu na bijela vina. Preciznije, redukcija OTA u crnom vinu iznosi 29%, dok u bijelom iznosi 22% (Leong i sur., 2006).

Tablica 2. Uklanjanje OTA iz vina fizikalnim metodama (Quintela i sur., 2013)

<b>Vrsta postupka</b>	<b>Udio uklonjenog OTA</b>
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 55°C	0
Uklanjanje plijesnivog grožđa prije maceracije	98% manje OTA
Ponovni prolazak kontaminiranog mošta ili vina kroz kominu koja ne sadrži OTA	50-56% manje OTA

## 2.7.2 Kemijske metode uklanjanja okratoksina A iz vina

Kemijske metode podrazumijevaju primjenu adsorbensa poput aktivnog ugljena, bentonita, želatine, kazeina i hitina, koji imaju sposobnost čvrsto adsorbirati i imobilizirati mikotoksin. Budući da ovakva sredstva često imaju negativan utjecaj na nutritivnu vrijednost i organoleptička svojstva proizvoda, njihova primjena je ograničena. Uspješnost uklanjanja OTA iz vina ovisi o stupnju kontaminacije te o vrsti i dozi korištenog sredstva za bistenje koja se kreće u rasponu 2 do 98% (Carvalho, 2014).

U istraživanju utjecaja sredstava iz pojedinih faza proizvodnje vina, sredstava za bistenje te utjecaja starenja u bocama na smanjenje OTA iz bijelih i crnih prirodno kontaminiranih moštova, zaključeno je da je tijekom tehnološkog procesa došlo do smanjenja OTA za 41.8% do 53.7% u bijelim i 44.7% u crnim vinima. Također, ustanovljeno je da aktivni ugljen nema veću moć uklanjanja OTA od ostalih sredstava za bistenje (16.6% u crnom vinu).

Upotrebom bjelanjka jajeta i ribljeg mjehura postignuti su najbolji rezultati dekontaminacije crnih vina (19.7% i 21.3%). S druge strane, bentonit se pokazao kao najučinkovitiji kod bijelih vina (20.3%) dok su PVPP i kazein pokazali slab afinitet prema OTA (2.0% i 8.3%) (Anli i sur., 2011). Istraživanja drugih autora pokazuju da je enološki dekolorizirajući ugljen najučinkovitiji u uklanjanju OTA, no on uklanja i antocijane te druge obojene polifenolne tvari (Var i sur., 2008). Prema drugom istraživanju, najbolje uklanjanje OTA postiže se sa aktivnim ugljenom ili komercijalnim pripravcima koji ga sadrže. S druge strane, osim visoke učinkovitosti u uklanjanju OTA, visok je i gubitak polifenola tretiranih vina (Visconti i sur., 2008).

Rezultati dobiveni od strane drugih istraživača također su pokazali da je doza aktivnog ugljena 10 mg/L dovoljna za uklanjanje 50-60% OTA iz crnog vina, što je prihvatljiva doza koja ne uklanja antocijane i ostale polifenole iz vina. Kod primjene doza koje premašuju vrijednost 50 mg/L, uočava se smanjenje razine obojenih polifenola i ključnih aromatičnih tvari vina (Piotrowska i sur., 2013). Zabilježeno je da se sa sredstvima koja sadrže aktivni ugljen (smjesa želatina, bentonit i aktivni ugljen) iz bijelog vina uklanja oko 80% OTA, dok se primjenom kalijeva kazeinata, proteina graška i manoproteina uklanja 10% do 30% OTA. Za razliku od navedenog, uporaba bentonita, karboksimetilceluloze, hitozana i PVPP-a ne doprinosi smanjenju udjela OTA (Carvalho i sur., 2014). Za uklanjanje proteina na koje se veže OTA često se koristi bentonit. Dodatkom bentonita može se ukloniti do 67% OTA (Leong i sur., 2006). Postoje različite vrste bentonita (prirodni, nonilamonijev, dodecilamonijev i KSF-montmorilonit bentonit). Kada se te vrste usporede, najbolji rezultati u

uklanjanju OTA iz vina postižu se tretmanom s KSF-montmorilonit bentonitom. Međutim, ovakav tretman smanjuje ukupne fenole i antocijane. Korištenjem aktivnog natrijevog bentonita pri preporučenim dozama, razina OTA bi se mogla smanjiti do 33%. S druge strane, tim tretmanom narušava se kvaliteta vina, posebice intenzitet boje (Kurtbay i sur., 2008). Kada se primjenjuju u rasponu od 25 do 150 g/hL, albumin jajeta može reducirati razinu OTA i do 48% pri 150 g/hL, želatina do 20% OTA i mikrokristalinični kalijev kazeinat 24%, no njihovom primjenom se također smanjuje razina ukupnih i obojenih polifenola (Castellari i sur., 2001). Budući da primjena sredstava poput kazeina, kalijevog kazeinata i albumina jajeta uzrokuje neželjene reakcije kod nekih osjetljivih potrošača, nedavno su razvijena sredstva za bistrenje koja ne sadrže alergene. Testirana je sposobnost uklanjanja OTA pomoću kompleksa koji se temelji na PVPP-u, biljnim proteinima i amorfnom siliciju (kao alternativa kazeinu i kalijevom kazeinatu) i pomoću želatine u listićima s visokom molekulskom masom (kao alternativa albuminu jajeta). Kod primjene oba bistrila, OTA je uspješno uklonjen (i do 40%), uz primjenu doze koja se inače koristi u proizvodnji vina, a s najmanjim utjecajem na boju i razinu polifenola (Quintela i sur., 2012). U posljednje vrijeme, sve je zastupljenija primjena hitozana, hitina, hitin glukana ili hitin glukana hidrolizata fungalnog podrijetla sa ciljem smanjenja razine OTA u vinu. Njihovom primjenom uklonjeno je 56.7- 83.4% OTA u crnim, zatim 53.4–64.5% u bijelim i 26.1–43.5% u desertnim (slatkim) vinima (Bornet i Teissedre, 2008).

Pri koncentraciji od 50 g/hL, hitin se može koristiti za uklanjanje OTA do 18% bez negativnog utjecaja na kvalitetu vina (Quintela i sur., 2012).

Novija enološka praksa donosi čestu primjenu komadića hrastova drveta u obliku strugotina ili praha. Na taj način povećana je kontaktna površina između drveta i vina, a kao posljedica toga dolazi do redukcije razine OTA u suhim crnim vinima i do 75% (Covarelli, 2012). Učinkovitost tog tretmana ovisi o sastavu vina, obliku korištenog drveta, količini i vremenu kontakta. Najveća učinkovitost se postiže primjenom praha u količini od 8 g/L nakon 15 dana kontakta s vinom koje sadrži manju količinu ukupnih i monomernih antocijana (tvari koje mogu ometati adsorpciju OTA). Međutim, zbog česte pojave negativnog utjecaja na nutritivnu vrijednost i organoleptička svojstva proizvoda, primjena ovih sredstava je ograničena (Piotrowska i sur., 2013).

### 2.7.3 Mikrobiološke metode uklanjanja okratoksina A iz vina

U posljednje vrijeme raste interes za mogućnosti primjene mikroorganizama sa ciljem uklanjanja toksičnih sastojaka. Studije su pokazale da pojedine bakterije (*Streptococcus*, *Bifidobacterium* i *Bacillus*) te plijesni (rodovi *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis* i *Penicillium*) posjeduju sposobnost razgradnje okratoksina A (Petruzzi i sur., 2014). Djelovanje mikroorganizama uključuje dva osnovna smjera: degradaciju i adsorpciju OTA. Mikrobiološka degradacija OTA podrazumijeva hidrolizu amino veze u netoksične spojeve: L- $\beta$ -fenilalanin i OTa. Mikrobiološke metode razgradnje OTA valja imati na oprezu jer posljedice akumulacije OTa u ljudskom tijelu još uvijek nisu dovoljno istražene, a postavlja se i pitanje utjecaja pojedinih mikroorganizama i njihovih enzima na kvalitetu vina (Russo i sur., 2016).

Drugi smjer razgradnje uključuje hidrolizu laktonskog prstena pri čemu nastaje otvoreni lakton, koji je prilikom testiranja na štakorima pokazao sličnu toksičnost kao i OTA (Abrunhosa i sur., 2010). Neki sojevi vrsta *A. niger*, *A. japonicus* i *A. carbonarius*, koji su izolirani sa Francuskog grožđa, mogu razgraditi preko i 80% OTA u OTa u sintetskom soku od grožđa (Bejaoui i sur., 2006).

U jednom istraživanju, izolirane su bakterije iz tla vinograda te je identificirano 27 različitih sojeva i utvrđeno je da oni pripadaju bakterijskim rodovima *Pseudomonas*, *Leclercia*, *Pantoea*, *Enterobacter* i *Acinetobacter*. Svi ispitivani sojevi pokazali su dobru sposobnost razgradnje OTA, a najveću učinkovitost pokazala su dva soja *Acinetobacter* koji su razgradili 82% odnosno 91% OTA nakon 6 dana pri 24°C (De Bellis i sur., 2015).

Drugi način čijom primjenom se može smanjiti količina OTA je adsorpcija na stanične stijenke nekih sojeva bakterija milječne kiseline (BMK). Tu spadaju *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. sanfranciscensis* te *Oenococcus oeni* (Russo i sur., 2016).

Vinski kvasci koriste se za biokontrolu rasta plijesni i mikotoksina zbog svog antagonističkog učinka. Mehanizam smanjenja OTA temelji se na adsorpciji na stanične stijenke kvasca, u čemu sudjeluju  $\beta$ -D-glukan i manoproteini iz stanične stijenke kvasca. Manoproteini su djelomično vodotopljive komponente koje se otpuštaju tijekom fermentacije. Manoproteini nose negativni naboj pri pH vina, tako da s OTA ostvaruju polarne i nepolarne interakcije. Prisutnost OTA ne ometa alkoholnu fermentaciju. Tijekom fermentacije razina OTA koja se uklanja ovisi o soju kvasca koji je uključen u fermentaciju. Mrtve stanice kvasca imaju bolju sposobnost vezanja OTA. Osim toga, ne mijenjaju organoleptička svojstva gotovog proizvoda



i zato imaju prednost nad živim stanicama. Ukoliko su stanice kvasca inaktivirane toplinom ili kiselinom, uklanjanje OTA iz groždanog soka i vina je uspješnije jer se utječe na promjene u površinskim svojstvima stanica, npr. dolazi do denaturacije proteina ili formiranja produkata Maillardovih reakcija. Nadalje, kiseli uvjeti razaraju strukturu polisaharida pri čemu se oslobađaju monomeri koji se dalje nakon pucanja glikozidnih veza raspadaju u aldehide. Takvi otpušteni produkti posjeduju veću adsorpcijsku površinu nego žive stanice kvasca (Petruzzi i sur., 2014).

Kada je riječ o primjeni kvasaca za smanjenje OTA u industriji te o njihovom utjecaju na određene parametre vina, rješavanje viška OTA na ovakvoj razini još uvijek nije dovoljno istraženo. Nadalje, prilikom smanjenja OTA u vinu korištenjem kvasaca ili inaktiviranih kvašćevih stanica, paralelno se odvija i smanjenje indeksa boje (Visconti i sur., 2008).

Crno vino je podvrgnuto tretmanu sa komercijalno pripremljenom staničnom stijenkom kvasaca i inaktiviranim stanicama kvasaca. Na taj način uklonjeno je 50% OTA u prvom slučaju, te 43% OTA u drugom slučaju. Valja istaknuti da je pri primjeni stanične stijenke kvasca pao i udio antocijana te intenzitet boje vina (Petruzzi i sur., 2015).

Drugo istraživanje potvrdilo je slične rezultate tj. veću djelotvornost uporabe inaktiviranih kvašćevih stanica. Naime, u tom istraživanju izoliran je 21 soj prirodnih kvasaca, od kojih se kao najsnažniji adsorbens pokazao kvasac *Candida fumata* D7. Žive stanice tog kvasaca uklonile su do 21,4 % OTA, a inaktivirane 30,45% OTA (Var i sur., 2009).

Nakon alkoholne fermentacije, vinski talog sadrži OTA, pa se smatra da talozi imaju sposobnost uklanjanja OTA iz vina, što je pokazano primjenom novijih tehnologija proizvodnje vina koje su usmjerene na vinifikaciju na vinskim talozima. Pritom se uklanjanje OTA razlikuje kod bijelih i crnih vina odležanih na vinskom talogu. Nakon 7 dana kontakta (20 g/L taloga), talog bijelog vina smanjio je razinu OTA za 70.9 % dok je talog crnog vina smanjio razinu toksina za 51.5%. Ta razlika se pripisuje natjecanju za mjesta vezanja između OTA i polifenola (Garcia-Moruno i sur., 2005). Nadalje, utvrđeno je da se primjenom komercijalnih sojeva kvasaca tijekom alkoholne fermentacije adsorbira više OTA u proizvodnji crnih (79%) nego kod bijelih vina (67%), što se može pripisati djelomičnom vezanju OTA na pokožicu grožđa (5-12%) (Esti i sur., 2012).

### 3. ZAKLJUČAK

- Okratoksin A jedan je od mikotoksina koji se javlja kao kontaminant u vinu. Zbog njegove kancerogenosti, nefrotoksičnosti, genotoksičnosti i teratogenih svojstava, propisima EU određene su najveće dopuštene razine OTA u vinu i moštu od 2 µg/L.
- Plijesan koja je najviše odgovorna za prisutnost OTA u grožđu je *Aspergillus nigr*. Prirodno je prisutna u vinogradima, a može se izolirati iz grožđa počevši od ranih faza razvoja bobica.
- Najznačajniji čimbenici koji uvjetuju prisutnost i količinu OTA u grožđu su geografski položaj i klima s naglaskom na temperaturu, aktivitet vode, zdravlje grožđa, kretanje zraka, prisutnost određenih kukaca te interakcije različitih vrsta plijesni.
- Razine OTA više su u crnim vinima nego u bijelim vinima, što je posljedica razlike u tehnologiji proizvodnje vina.
- Na prisutnost OTA u vinu može se utjecati mjerama koje se poduzimaju u vinogradu ili tijekom tehnološkog procesa proizvodnje. Za smanjenje udjela OTA, u vinogradima se najčešće primjenjuju razna kemijska sredstva kao što su pesticidi, herbicidi i fungicidi.
- Strategije uklanjanja OTA iz vina dijele se na fizikalne, kemijske te mikrobiološke.
- Fizikalne metode uklanjanja uključuju prvenstveno uklanjanje pljesnivog grožđa, čime takvo grožđe ne dopijeva u tehnološki proces proizvodnje vina. Iako ima visoku učinkovitost, ova metoda nije isplativa za vinsku industriju. Učinkovite metode su i prešanje na nižem tlaku, membranska filtracija te ponovni prolazak kontaminiranog mošta ili vina kroz kominu koja ne sadrži OTA.
- Kemijske metode podrazumijevaju upotrebu adsorbensa poput aktivnog ugljena ili bentonita. S obzirom da takva sredstva donose i neke negativne posljedice, njihova primjena je ograničena.
- Mikrobiološke metode podrazumijevaju uporabu mikroorganizama za uklanjanje OTA iz vina, jer neke bakterije, plijesni te kvasci imaju sposobnost njegove razgradnje. Ovakve metode još uvijek nisu dovoljno istražene.

#### 4. LITERATURA

Abrunhosa L., Paterson R., Venâncio A. (2010) Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* **2**: 1078-1099.

Amézqueta S., Penas G. E., Arbizu M. M., De Certain A. L. (2009) Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* **20**: 326-333.

Anli R. E., Vural N., Bayram M. (2011) Removal of ochratoxin A (OTA) from naturally contaminated wines during the vinification process. *Journal of the Institute of Brewing* **117**: 456-461.

Bae S., Fleet G. H., Heard G. M. (2004) Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* **94**: 301–312.

Batnariu M., Butu A. (2019) Qualitative and Quantitative Chemical Composition of Wine. U: Quality Control in the Beverage Industry, 1. izd., Grumezescu A., Holban A. M., Academic Press, str. 385-417.

Battilani P., Barbano C., Marín S., Sanchis V., Kozakiewicz Z., Magan N. (2006) Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Food Microbiology* **111**: 72-82.

Battilani P., Leggeri M. (2015) OTA-Grapes: A Mechanistic Model to Predict Ochratoxin A Risk in Grapes, a Step beyond the Systems Approach, *Toxins* **7**: 3012-3029.

Battilani P., Logrieco A., Giorni P., Cozzi G., Bertuzzi T., Pietri A. (2004) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**: 1736–1740.

Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., i Lebrihi A. (2006) Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS microbiology letters* **255**: 203-208.

Bellí N., Marín S., Argiles E., Ramos A. J., Sanchis V. (2007) Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Food Protection* **70**: 157-163.

Bellí N., Marín 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 and Contaminants* **23**: 1021-1029.

- 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 Agriculture and Food Chemistry* **62**: 7643-7651.
- Berente B., Móricz A., H-Otta K., Záray G., Léko L. i Rácz L. (2005) Determination of ochratoxin A in Hungarian wines. *Micro-chemical Journal* **79**: 103-107.
- Betina V. (1989) *Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects*. Elsevier.
- Blesa J., Soriano J., Molto J., Manes J. (2006) Factors affecting the presence of ochratoxin a in wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**: 473-478.
- Bornet A., Teissedre P. L. (2008) Chitosan, chitin-glucan and chitin eVects on minerals (iron, lead,cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology* **226**: 681–689.
- 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.
- Braunberg R.C., Gantt O., Barton C., Friedman L. (1992) In vitro effects of the nephrotoxin ochratoxin A and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. *Archives of environmental contamination and toxicology* **22**: 464-70.
- Carvalho F., Inês A., Milheiro Nunes F., Filipe-Ribeiro L., Abrunhosa L., Cosme F. (2014) Influence of several oenological fining agents on ochratoxin A removal. 12th Meeting on Food Chemistry, Bridging Traditional and Novel Foods: Composition, Structure and Functionality. Portugal.
- Castellari M., Versari A., Fabiani A., Parpinello G. P., Galassi S. (2001) Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **493**: 917-3921.
- Chulze S. N., Palazzini J. M., Torres A. M., Barros G., Ponsone M. L., Geisen R., Schmidt-Heydtd M., Köhl J. (2015) Biological control as a strategy to reduce the impact of mycotoxins in peanuts, grapes and cereals in Argentina. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **32**: 471-479.
- 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.

- Corzani C. (2007) Food safety in wine: optimization of analytical controls and evaluation of production technologies: doctoral thesis, University of Bologna.
- 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 the Mediterranean area. *Food Control* **26**: 347-356.
- Creppy E.E., Roschenthaler R., Dirheimer G. (1984) Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food and Chemical Toxicology* **22**: 883-886.
- De Bellis P., Tristezza M., Haidukowski M., Fanelli F., Sisto A., Mulè G., Grieco F. (2015) Biodegradation of Ochratoxin A by Bacterial Strains Isolated from Vineyard Soils. *Toxins* **7**: 5079-5093.
- Delaš F. (2010) Mikrobni toksini. U: Hrvatska agencija za hranu: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. *Grafika, Osijek*, str. 31- 49.
- Domijan A. M. i Peraica M. (2005) Ochratoxin A in wine. *Arhiv za Higijenu rada i toksikologiju* **56**: 17-20.
- Duraković S., Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji. *Kugler, Zagreb*.
- EC (2005) Commission Regulation (EC) 123/2005 of 26 January 2005. Amending Regulation (CE) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Journal of the European Union*, L25/3-25/5.
- 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.
- EZ/1881 (2006), Uredba komisije o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani, str. 34-53
- Felice D.V., Solfrizzo M., Curtis F., Lima G., Visconti A., Castoria R. (2008) Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology* **98**: 1261–1270.
- Fernandes A., Ratola N., Cerdeira A., Alves A. Venâncio A. (2007) Changes in Ochratoxin A concentration during winemaking. *Am J Enol Vitic* **58**: 92–96.
- Flajs D., Domijan A. M., Ivic D., Cvjetkovic B., Peraica, M. (2009) ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control* **20**: 590-592.

- Gambutì A., Strollo D., Genovese A., Ugliano M., Ritieni A., Moio L. (2005) Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**: 155-162.
- García-Moruno E., Carrascosa A. V., Muñoz R. (2005) A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *Journal of food protection*, **68**: 625-629.
- IARC (1993) Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. U: Ochratoxin A. WHO IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon: IARC, Vol. **56**: 489–521.
- Jiang C., Shi J., Liu Y., Zhu C. (2014) Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control*, **35**: 41-48.
- Katalenić M. (2004) Toksini *Fusarium* plijesni i drugi toksini (I dio), MESO: The first Croatian meat journal **6**: 31-35.
- Khoury E. A., Atoui A. (2010) Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* **2**: 461-493.
- Klarić M. Š. (2012) Adverse effects of combined mycotoxins/štetni učinci kombiniranih mikotoksina. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **63**: 519-530.
- Kumagai S. (1985) Ochratoxin A Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food and Chemical Toxicology* **23**: 941-943.
- Kumagai S., Aibara K. (1982) Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **64**: 94-102.
- Kurtbay H. M., Bekçi Z., Merdivan M., Yurdakoç K. (2008) Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **56**: 2541-5.
- Leong S. L., Hocking A. D., Scott E. S. (2006) The effect of juice clarification, static or rotary fermentation and fining on ochratoxin A in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **12**: 245-251.
- Leszkowicz A. P., Manderville R. A. (2007) Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research* **51**: 61-99.

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.

Markov K., Čubela D., Pleadin J., Frece J., Delaš F. (2014) Ochratoxin A Prevalence in White, Red and Dessert Wines Proceedings of the 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, 244-247.

Marriott N. G., Gravani R. B. (2006) Principles of Food Sanitation, *Springer, USA*

OIV. International Organisation of Vine and Wine. *Vine and Wine Outlook* (2012), dostupno na <http://www.oiv.int/oiv-vine-and-wine-outlook-2012>.

Petruzzi L., Baiano A., De Gianni A., Sinigaglia M., Corbo M. R., Bevilacqua A. (2015) Differential adsorption of ochratoxin a and anthocyanins by inactivated yeasts and yeast cell walls during simulation of wine aging. *Toxins* **2015** **7**: 4350-4365.

Petruzzi L., Bevilacqua A., Corbo M. R., Garofalo C., Baiano A., Sinigaglia M. (2014) Selection of Autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Wine Starters Using a Polyphasic Approach and Ochratoxin A Removal. *Journal of Food Protection*, **7**: 1052-1240.

Piotrowska M., Nowak A., Czyzowska A. (2013) Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *European food research and technology* **236**: 441-447.

Ponsone M. L., Chiotta M. L., Combina M., Dalcero A., Chulze S. (2011) Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus section Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* **151**: 70–77.

Ponsone M. L., Chiotta M. L., Palazzini M. J., Combina M., Chulze S. (2012) Control of Ochratoxin A Production in Grapes. *Toxins* **4**: 364-372.

Quintela S., Villarán M. C., López de Armentia I., Elejalde E. (2013) Ochratoxin A removal in wine: A review. *Food Control* **30**: 439-445.

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.

Richard J. L. (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses- An overview. *International Journal of Food Microbiology* **119**: 3-10.

- Rotaru S., Israel-Roming F., Campeanu G., Deciu G. (2011) Correlation of ochratoxin A level in wine with vine environment. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. **16**
- Rousseau J., Blateyron, L. (2002) Ochratoxine A in Wines: no curative solution in wine, priority in vineyard sanitary management. *Revue des Oenologie France* **29**: 14-16.
- 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**, article 482.
- Samson R. A., Houbraken J. A. M. P., Kuijpers A. F. A., Mick Frank J., Frisvad J. C. (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* **50**: 45–61.
- Shukla S., Park Y. H., Kim, M. (2019) Efficient, safe, renewable, and industrially feasible strategy employing *Bacillus subtilis* with alginate bead composite for the reduction of ochratoxin-A from wine, *Journal of Cleaner Production* (In press), <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.1188344>
- Solfrizzo M., Avantaggiato G., Panzarini G., Visconti A. (2010) Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **58**: 317–323.
- Somma S., Perrone G., Logrieco A. (2012) Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathologia Mediterranea* **51**: 131-147.
- 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. *Acta periodica technologica (APTEFF- Zbornik radova tehnološkog fakulteta, Novi Sad)* **43**: 123-138.
- Valero A., Marín S., Ramos A. J., Sanchis V. (2008) Survey: Ochratoxin A in European special wines. *Food Chemistry* **108**: 593-599.
- Van der Merwe K. J., Steyn P. S., Fourie L., Scott D. B., Theron J. J. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolit produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* **205**: 1112-1113.
- Var I., Kabak B., Erginkaya Z. (2008) Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control* **19**: 592–598.
- Varga J., Kozakiewicz Z. (2006) Ochratoxin A in grapes and grape derived products. *Trends in Food Science and Technology* **17**: 72-81.



Varga J., Kocsubé S., Péteri Z., Vágvölgyi C., Tóth B. (2010) Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals, *Toxins* **2**: 1718-1750.

Visconti A., Perrone G., Cozzi G., Solfrizzo M. (2008) Managing ochratoxin A risk in the grape wine food chain. *Food Additives and Contaminants, Part A* **25**: 193-202.

Vitali Čepo D., Pelajić M., Vinković Vrček I., Krivohlavek A., Žuntar I., Karloglan M. (2018) Differences in the levels of pesticides, metals, sulphites and ochratoxin A between organically and conventionally produced wines, *Food chemistry* **246**: 394-403.

Winkler A. J., Cook James A., Kliewer W. M., Lider Lloyd A. (1974) General Viticulture, *University of California Press, USA*

Žurga P., Vahčić N., Pasković I., Banović M., Malenica Staver M. (2019) Occurrence of Ochratoxin A and Biogenic Amines in Croatian Commercial Red Wines. *Foods* **8**: 348.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

### Izjava o izvornosti

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

Sara Šarić

ime i prezime studenta