



Ministarstvo poljoprivrede
Vijeće za istraživanja u poljoprivredi

PROCJENA RIZIKA KONTAMINACIJE VINA OKRATOKSINOM A

{ Brošura za vinare i vinogradare }

Autori:

Slaven Zjalić, Jadranka Frece, Marina Pavlović,
Željko Jakopović, Ksenija Markov



SVEUČILIŠTE U ZADRU

Zadar, 2017.



Nakladnik

Sveučilište u Zadru

Za nakladnika

Dijana Vican, rektorica

Povjerenstvo za izdavačku djelatnost

Sveučilišta u Zadru

Josip Faričić, predsjednik

Urednici

Ksenija Markov

Slaven Zjalić

Jadranka Frece

Recenzenti

Tomislav Kos

Karin Kovačević Ganić

Jelka Pleadin

Lektura

Jadranka Varošaneć

Oblikovanje i tisak

Grafikart d.o.o., Zadar

Naklada

250

ISBN

978-953-331-173-9

CIP-Katalogizacija u publikaciji

Znanstvena knjižnica Zadar

UDK 663.2:582.28(035)

582.28:663.2(035)

PROCJENA rizika kontaminacije vina okratoksinom A : brošura za vinare i vinogradare / Slaven Zjalić ... <et al.>. - Zadar : Sveučilište, 2017. - 48 str. : ilustr. u bojama ; 21 cm

Bibliografija.

ISBN 978-953-331-173-9

1. Zjalić, Slaven

150820026

*Priručnik je objavljen u suradnji sa
Prehrambeno-biotehnološkim
fakultetom Sveučilišta u Zagrebu*



*Objavljeno u sklopu projekta „Procjena
rizika kontaminacije crnih vina zadarske
županije okratoksinom A“ (2017.)
financiranog iz programa VIP
Ministarstva poljoprivrede RH*

{ SADRŽAJ }



PRVI DIO

Rezultati VIP projekta Procjena rizika kontaminacije crnih vina Zadarske županije okratoksinom A

5

Rezultati

10

Zaključak

14

DRUGI DIO

Priručnik mjera za smanjenje rizika kontaminacije crnih okratoksinom A

15

Uvod

17

Grožđe i mikroorganizmi

17

Gljivice (plijesni) grožđa

18

1. Najčešće bolesti vinove loze i grožđa uzrokovane gljivicama

20

2. Mikotoksini i okratoksin A (OTA)

24

3. Identifikacija gljivica i metode analize OTA-e

31

4. Procjena rizika izloženosti kontaminaciji okratoksinom A

36

5. Mjere i postupci za smanjenje OTA-e u grožđu

39

Zaključak

46

Literatura

47





{ 1. DIO }

Rezultati VIP projekta:
Procjena rizika kontaminacije crnih vina
Zadarske županije okratoksinom A



Brošura je nastala na temelju rezultata VIP projekta *Procjena rizika kontaminacije crnih vina Zadarske županije okratoksinom A*.

Okratoksin A (OTA) je mikotoksin, odnosno sekundarni metabolit toksičan za ljude i životinje, koji tijekom rasta proizvode neke gljivice iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Različite sirovine i namirnice mogu biti kontaminirane OTA-om. Najčešće su to sjemenke žitarica, kava, neki suhomesnati proizvodi, ali i pivo i vino. Gljivice koje sintetiziraju OTA-u nisu, u normalnim uvjetima, patogeni organizmi i neće uzrokovati pad prinosa. Međutim, mogu uzrokovati pad kvalitete i zdravstvene neispravnosti vina. Zbog njezine toksičnosti, koncentracija OTA-e u sirovinama, namirnicama i vinu ograničena je uredbom EU-a br. 1881/2006. VIP projekt proveden je radi istraživanja prisutnosti okratoksigenih gljivica u Zadarskoj županiji i procjeni rizika kontaminacije crnih vina s OTA-om. Gljivice koje proizvode OTA-u nisu patogene i nisu u stanju probiti kožicu bobice. Mogu se pojaviti oko peteljki na bobama i stvarna infekcija počinje tek nakon oštećenja bobice. Zbog načina proizvodnje kontaminaciji OTA-e izloženija su crna vina u odnosu na bijela. Tijekom provedbe projekta uzeti su uzorci tla, listova i grozdova s pet lokacija u četiri vinograda Zadarske županije. Odabrani su vinogradi na različitim položajima, posađeni na tlima s različitim pedološkim karakteristikama i različitim načinom uzgoja. Jedan vinograd je u vinogorju Zadar-Biograd, a tri vinograda nalaze se u vinogorju Benkovac-Stankovci, u dva vinograda primjenjuje se ekološki sustav proizvodnje, a u druga dva integrirani način proizvodnje. Uzorkovanje je provedeno u lipnju i početkom rujna 2016. i ponovljeno u istom razdoblju 2017.

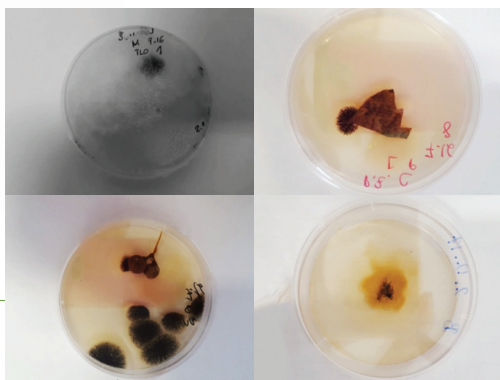
U svim vinogradima uzeti su uzorci u sektorima u kojima se uzgaja grožđe vrste merlot. U vinogradu A, osim uzoraka sorte merlot, uzeti su uzorci i iz sektora u kojem se nalazi uzgoj grožđa vrste crljenak.

Uzimanje uzoraka:

Iz svakog vinograda pri svakom uzorkovanju prikupljeno je:

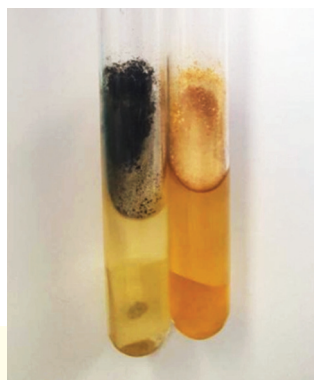
- 20 uzoraka tla
- 20 listova bližih tlu
- 20 grozdova bližih tlu.

Uzorci listova i grozdova uzimani su s istog trsa, a uzorci tla uzimani su u blizini trsa s kojeg su uzimani biološki uzorci. U svakom vinogradu nastojalo se uzeti uzorke tako da cijela površina nasada sorte merlot ili crljenak bude što ravnomjernije pokrivena.



Slika 1.

Uzorci tla, lista, bobе grožđa i kukca nasađeni na hranjivu podlogu radi izoliranja kultura gljivica



Slika 2.

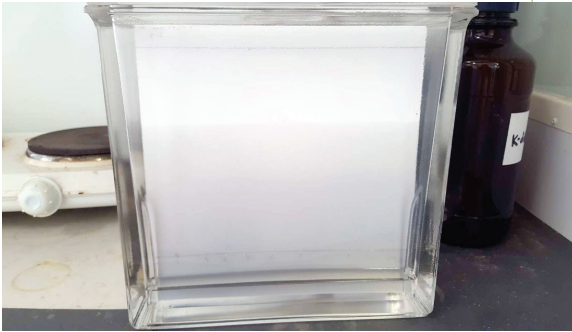
Čiste kulture *Aspergillus carbonarius* i *A. ochraceus* nasađene na tekuću hranjivu podlogu radi provjere okratoksigenosti



Slika 3.

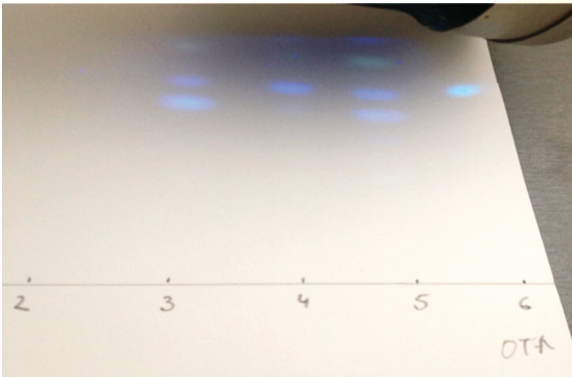
Čiste kulture gljivica u inkubatoru s reguliranom temperaturom i relativnom vlagom

Za analizu sadržaja OTA-e u moštu i vinu uzeto je 50 ml mošta i 50 ml vina iz iste bačve berbi 2016. i 2017. godine.



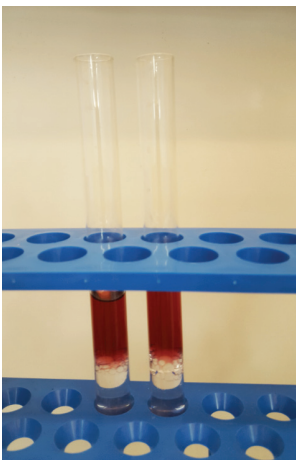
Slika 5.

Postupak razdvajanja kemijskih komponenti pomoću tankoslojne kromatografije (TLC)



Slika 6.

Provjera prisutnosti OTA-e na pločici za TLC. Pločica je osvijetljena UV lampom, u redu broj 6 je uzorak čiste OTA-e (standard), u uzorcima u redovima 3, 4 i 5 mogu se vidjeti fluorescencije na istoj visini i iste boje kao i standard OTA-e.



Slika 7.

Ekstrakcija OTA-e iz uzoraka crnog vina

Za analizu prisutnosti spora na kukcima, najvažnijim vektorima za prijenos kontaminacije okratoksinogenim gljivicama, pomoću klopki hvatani su kukci u sva četiri vinograda i izolirana je mikoflora. S ulovljenih kukaca u 2016. godini nije izolirana niti jedna okratoksigena kolonija gljivica. Podatci za 2017. godinu su u izradi.

REZULTATI

Tijekom 2016. godine iz biljnog materijala, tla i kukaca izolirano je ukupno 2012 kolonija gljivica. Morfološkom determinacijom 197 kolonija izoliranih iz tla, listova i bobica determinirano je kao potencijalno okratoksigene vrste i nasađene su na tekuću hranjivu podlogu koja podržava sintezu OTA-e i stavljene u inkubator u idealne uvjete za proizvodnju ovoga toksina. Nakon 21 dana inkubacije izvedena je ekstrakcija OTA-e iz svih uzoraka. Prisutnost toksina analizirana je prvo metodom tankoslojne kromatografije, a zatim su pozitivni uzorci analizirani tekućinskom kromatografijom visoke preciznosti (HPLC) kako bi se potvrdila prisutnost OTA-e u uzorku. Prisutnost OTA-e dokazana je u 14 uzoraka, u Tablici 1. prikazani su rezultati po vinogradu i podlozi s koje je izolirana okratoksigena kolonija. Podatci za kolonije izolirane s kukaca nisu izneseni u tablici s obzirom na to da s kukaca nije izolirana niti jedna okratoksigena kolonija.

Tablica 1.

Broj ukupno izoliranih gljivica, potencijalno okratoksigениh kolonija i potvrđenih proizvođača OTA-e izoliranih iz uzoraka tla, listova i bobica grožđa sakupljenih u srpnju i početkom rujna 2016. u četiri vinograda u Zadarskoj županiji. Podatci su prikazani prema vinogradu i podlozi s koje su izolirane kolonije gljivica.

Vinograd A			
Izolirano s	Ukupno izolirana mikoflora	Potencijalno okratoksigene gljivice (broj izoliranih kolonija)	Potvrđeni proizvođači OTA-e
List	191	28	1
Boba	108	7	0
Tlo	196	9	0
Ukupno vinograd A	485	46	1
Vinograd B			
List	211	30	3
Boba	104	8	1
Tlo	194	11	0
Ukupno vinograd B	509	49	4

Vinograd C			
List	209	30	2
Boba	110	13	2
Tlo	198	10	1
Ukupno vinograd C	517	53	5
Vinograd D			
List	198	34	2
Boba	109	8	2
Tlo	194	7	0
Ukupno vinograd D	501	49	4
Ukupno 2016. godine	2012	197	14

Uzorci prikupljeni 2017. godine još nisu u potpunosti obrađeni. Do sada je izolirano više od 2100 čistih kultura gljivica s uzoraka tla, lišća i boba grožđa, a 204 su determinirane kao potencijalni proizvođači OTA-e. Vidljivo je da su podatci za mikroorganizme izolirane 2017. godine usporedivi s podacima iz 2016. godine. Samo su za vinograd C obrađeni svi uzorci te su podatci izneseni u Tablici 2. Može se vidjeti da je izoliran nešto veći broj toksigenih gljivica u odnosu na 2016. godinu, no to povećanje nije znakovito. Zasiurno možemo potvrditi da u tom vinogradu (kao i u ostalim vinogradima uključenim u istraživanje) postoje kolonije gljivica proizvođača OTA-e, no njihova je pojavnost u odnosu na druge gljivice niska.

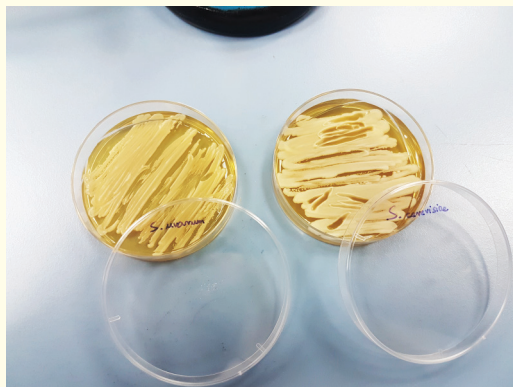
Tablica 2.

Broj potencijalno okratoksigenih kolonija izoliranih iz uzoraka tla, listova i boba grožđa sakupljenih u srpnju i početkom rujna 2017. godine u vinogradu C u Zadarskoj županiji. Podatci su prikazani prema podlozi s koje su izolirane kolonije gljivica.

Izolirano s	Ukupno izolirana mikoflora	Potencijalno okratoksigene gljivice (broj izoliranih kolonija)	Potvrđeni proizvođači OTA-e
List	229	31	3
Boba	112	17	2
Tlo	199	18	2
Ukupno	540	66	7

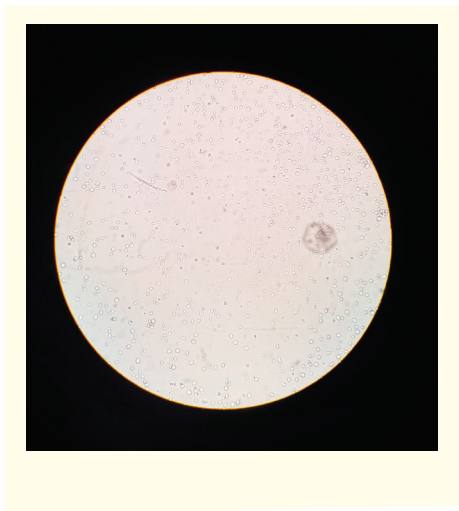
Prisutnost okratoksigenih gljivica u nekom vinogradu ne znači automatski da će vina iz toga vinograda biti kontaminirana OTA-om. Poznato je da se tijekom alkoholne fermentacije razgrađuje i jedan dio OTA-e prisutan u moštu, pa je stoga koncentracija OTA-e u moštu veća od one u vinu nastalom iz toga mošta. U svim vinogradima uzeti su uzorci mošta i vina berbi 2016. i 2017. i provedene su analize prisutnosti OTA-e u uzorcima. Analize su provedene u sveučilišnom laboratoriju i potvrđene u laboratoriju akreditiranom za certificiranje kvalitete hrane i krmiva. Niti u jednom uzorku nisu nađeni tragovi OTA-e, odnosno ako je u nekom uzorku i bilo OTA-e, njezina koncentracija je bila toliko niska ($< 10 \text{ ngL}^{-1}$) da ju ova metoda nije mogla detektirati.

U cilju pripreme strategije za smanjenje koncentracije OTA-e u vinima provedena su *in vitro* istraživanja mogućnosti kvasaca koji se upotrebljavaju u vinifikaciji da adsorbiraju i/ili razgrade OTA-u: Na tekuću podlogu koja je sadržavala poznatu koncentraciju OTA-e nasadene su žive i mrtve stanice kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *S. uvarum* i inkubirane na 28 °C 48 sati. U određenim vremenskim razmacima (0, 4, 8, 24 i 48 sati) uzeti su uzorci podloge i ekstrahirana je OTA. Njezina koncentracija određena je standardnom kromatografskom metodom (HPLC). Rezultati su pokazali da su kvasci smanjili koncentraciju OTA-e u tekućoj podlozi između 20 i 60 %, ovisno o vrsti. I mrtve i žive stanice kvasaca bile su aktivne u smanjivanju koncentracije OTA-e što upućuje na to da je, barem većim dijelom, mehanizam smanjenja koncentracije adsorpcija. U prilog toj tezi ide i činjenica da je smanjenje koncentracije OTA-e u mediju bilo usporedivo za žive i mrtve stanice iste vrste kvasca.



Slika 8.

Kolonije kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *S. uvarum* uzgojene na krutoj hranjivoj podlozi



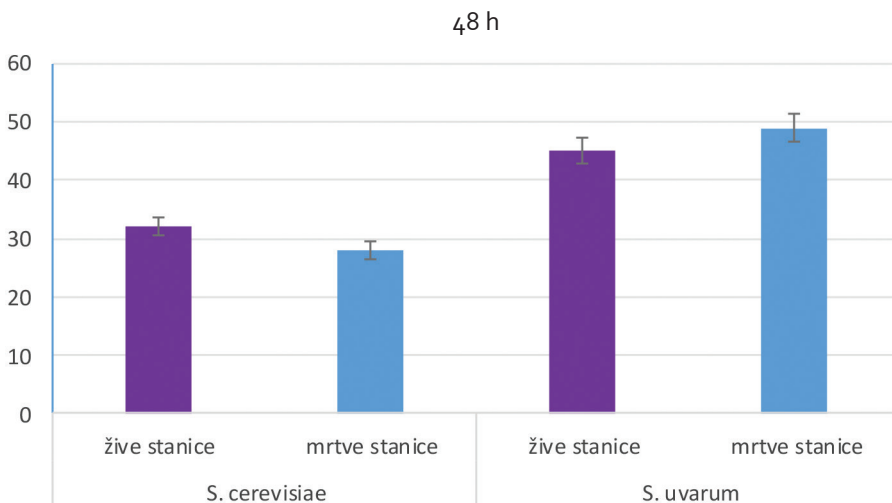
Slika 9.

Stanice kvasaca *S. uvarum* u tekućoj podlozi koja sadrži OTA-u videne pomoću optičkog mikroskopa



Graf 1.

Otklanjane OTA-e iz tekućeg medija pomoću živih i mrtvih stanica kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *S. uvarum* nakon 48 sati inkubacije izraženo u postotcima.



ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja pokazali su da na području vinograda u Zadarskoj županiji ima gljivica proizvođača OTA-e. U svim vinogradima izolirane su kolonije gljivica koje sintetiziraju OTA-u, no njihova pojavnost je niska. Od ukupno izoliranih kolonija gljivica okratoksigenih sojeva je bilo između 0,2 i 1 %, ovisno o vinogradu iz kojeg su uzeti uzorci. Pojavnost gljivica, prema rezultatima ovoga istraživanja, nije bila povezana s tipom tla. U vinogradima s usporedivim pedološkim karakteristikama pojavnost okratoksigenih gljivica bila je različita.

Analize prisutnosti OTA-e u moštu i vinima berbi 2016. i 2017. godine crnih sorti grožđa koje su bile uključene u projekt pokazale su da OTA nije bila prisutna u ispitanim uzorcima. Znakoviti su rezultati za 2017. godinu koja je zbog klimatskih prilika bila povoljna za rast okratoksigenih gljivica i kontaminaciju vina. Ovaj rezultat upućuje na to da je rizik kontaminacije vina nizak bez obzira na prisutnost okratoksigenih gljivica u vinogradima. No prisutnost toksigenih gljivica upućuje na to da određeni rizik postoji i da treba poduzeti sve mjere kako se u budućnosti rizik kontaminacije vina s OTA-om ne bi povećao. Stoga je drugi dio ove brošure posvećen širenju informacije o problemu kontaminacije vina OTA-om i mjerama kako smanjiti taj rizik.



{ 2. DIO }

Priručnik mjera za smanjenje rizika
kontaminacije crnih vina okratoksinom A



UVOD



VINO BEZ OKRATOKSINA A?

GROŽĐE I MIKROORGANIZMI

Grožđe i proizvodi od grožđa:

- 71 % koristi se u vinarstvu
- 27 % konzumira se svježe
- 2 % kao suho voće, grožđice.

Svježe grožđe u svojem tkivu sadrži visoke vrijednosti vode dostupne mikroorganizmima (u stručnoj literaturi poznate kao vodena aktivnost, označava se simbolom a_w) te niži pH što podržava rast svih vrsta gljivica.

Od ukupnog broja mikroorganizama koji se mogu naći na bobici grožđa:

- 95 – 98 % pripada gljivicama (plijesnima) i bakterijama
- samo 2 – 5 % su kvasci.

GLJIVICE (PLIJESNI) GROŽĐA

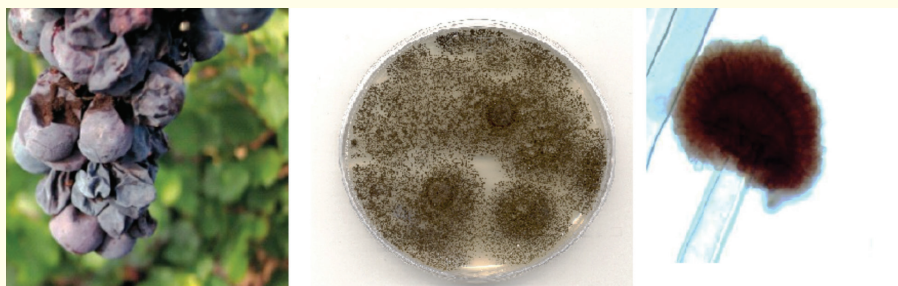
Najčešće prisutne pripadaju rodovima:

- *Aspergillus*
- *Botrytis*
- *Penicillium*

U manjoj mjeri:

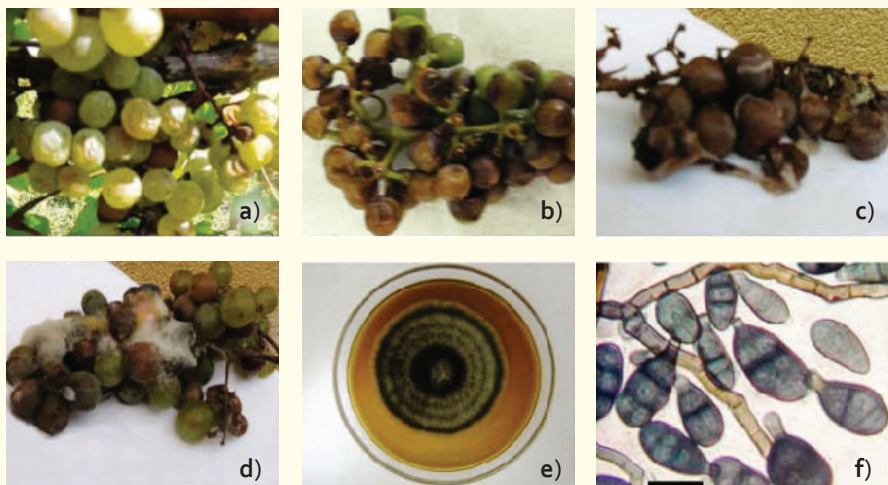
- *Phytophthora*
- *Moniliella*
- *Alternaria*
- *Cladosporium*

- Mitosporične gljivice (ne razmnožavaju se spolnim putem), poznate i pod nazivom plijesni, su velika skupina mikroskopskih gljiva široko rasprostranjena u prirodi.
- Tijelo im je građeno od gustog sustava cijevastih stanica bez klorofila, obično bezbojnih.
- Gljivice na prirodnim staništima obuhvaćaju vrste koje se mogu naći na svim biljkama tijekom njihova rasta u polju.
- Sadržaj vode (aw-vrijednost), temperatura i vjetar najbitniji su okolišni parametri koji određuju rast gljivica.
- Prisutnost i rast gljivica na grožđu važni su za fizičku i kemijsku stabilnost budućeg vina, kao i za njegova senzorska svojstva.
- Nekontrolirano širenje gljivica na grožđu neposredno prije branja, vrlo brzo dovodi do pojave truleži grožđa.



Slika 1.

a) gljivica porasla na grožđu (bobice); **b)** gljivica porasla na hranjivoj podlozi u laboratoriju; **c)** mikroskopska slika dijela micelija (Izvor: Bio Imagines.com)



Slika 2.

a) početni stupanj razvoja truleži; b) vinova loza zaražena gljivicom *Alternaria*; c) micelij gljivice koji raste u pukotinama bobica; d) micelij gljivice koji se širi na preostale bobice; e) kolonija gljivice *Alternaria* na sladnom agaru (uzgojena u laboratoriju); f) spore gljivice *Alternaria*

- Za razvoj gljivica potrebna je ponajprije vlaga, toplina i hranjiva podloga.
- Ako je relativna vlažnost zraka konstantno iznad 65 %, postignuta je pretpostavka za razvoj gljivica.
- Temperatura između 20 i 30 °C pogodna je za rast gljivica, a pri temeperaturama višim od 37 °C dominiraju gljivice roda *Aspergillus*.
- Gljivice se hrane organskim tvarima poput masti, jednostavnih i složenih ugljikohidrata, bjelančevina.
- Rastu pri blago kiselim do neutralnim pH vrijednostima, aerofilne su, a uz pomoć vjetra spore se prenose na udaljene površine.
- Razdoblje između rane faze zrenja i branja kritično je za rast gljivica. Tada je vrlo važna dobra vinogradarska praksa.
- Gljivice sintetiziraju različite sekundarne metabolite – organske kiseline, fenolne spojeve, terpene, hlapiva ulja, alkaloida itd. Veliki problem prilikom proizvodnje hrane ili pića su sekundarni metaboliti – mikotoksini.

1. NAJČEŠĆE BOLESTI VINOVE LOZE I GROŽĐA UZROKOVANE GLJIVICAMA

1 Crna pjegavost vinove loze (*Phomopsis viticola*)

- Uzročnik crne pjegavosti vinove loze je jedna ili više gljivica, a bolest gotovo uvijek čini velike štete.
- Gljivica se javlja u obliku sitnih crnih točkica koje se javljaju po kori pri bazi suhe rozgve, ali i u unutrašnjosti pupova.
- Uzročnik bolesti napada sve zelene dijelove loze – mladice, izboje, vitice, listove, peteljke listova, grozdova i bobica, bobice.



Slika 3.

Crna pjegavost vinove loze (*Phomopsis viticola*)

- Bolest postupno iscrpljuje biljku uzrokujući i do 30 % štete na urodima.
- Gljivica inficira vinovu lozu u širokom rasponu temperature od 1 do 37 °C, a optimum za razvoj te bolesti je 23 °C uz 98 do 99 % relativne vlage zraka.
- Gljivica iz rozgve prelazi u drvo zbog čega nakon duljeg vremena dolazi do truljenja i oštećenja loze. Posljedica takve zaraze je usporen rast mladica i sušenje listova na njima. Postupno dolazi do odumiranja zaraženog kraka čokota po čemu se bolest u američkoj literaturi naziva *dead arm*.



Slika 4.

Crna pjegavost rozge (*Phomopsis viticola*)

2. Pepelnica vinove loze (oidium) (*Uncinula necator*)

- Uzročnik pepelnice vinove loze živi u tlu i odatle dolazi na bobice još nezrelog grožđa. Javlja se na svim zelenim dijelovima vinove loze, na kojima se stvara sivo-pepeljasta prevlaka.
- Napadnuto mlado lišće se deformira, a često i suši, dok se mlade bobice u cijelosti pokrivaju sivo-pepeljastom prevlakom, smežuraju i suše, a kod kasnijih zaraza često pucaju.
- Za naglo širenje pepelnice dovoljna je visoka relativna vlaga zraka od 30 % (nije nužna kap vode za klijanje i infekciju) i temperatura od oko 26 °C.
- Kod temperatura iznad 30 °C prestaje razmnožavanje gljivice. Gljivica ugiba pri 40 do 45 °C.
- Bolest je prisutna na svim područjima uzgoja vinove loze, a urod može biti smanjen i do 80 – 90 %



Slika 5.

Pepelnica vinove loze (oidium) (*Uncinula necator*)

3. Peronospora, plamenjača (*Plasmopara viticola*)

- Peronospora je najraširenija i najopasnija bolest vinove loze u svijetu koju uzrokuje parazitna gljiva, a pojavljuje se na svim organima loze.
- Preduvjeti za zarazu: temperatura tla min. 8 °C tijekom 24 sata, oborine i vlaga (kapi na listu) u trajanju 4 – 6 sati, listić promjera 5 – 10 cm.
- Najkarakterističniji simptomi javljaju se na lišću, cvjetovima i grozdovima. Na lišću se prvi znaci pokazuju u obliku lako prozirnih pjega, zvanih „uljaste pjege“.



Slika 6.

Peronospora, plamenjača (*Plasmopara viticola*)



Slika 7.

Peronospora, bjeličasta paperjasta prevlaka

- Vrijeme između zaraze i pojave uljastih pjega označava se kao period inkubacije
- Duljina ovoga razdoblja ovisi o visini temperature i u našim krajevima kreće se u svibnju i lipnju obično 7 – 14 dana.
- Kada je vrijeme vlažno, stvara se bjeličasta paperjasta prevlaka, koja predstavlja najkarakterističniji simptom peronospore.
- Zastoj u razvoju parazita i širenju bolesti nastaje jedino u periodima suhog vremena i periodima bez kiše.

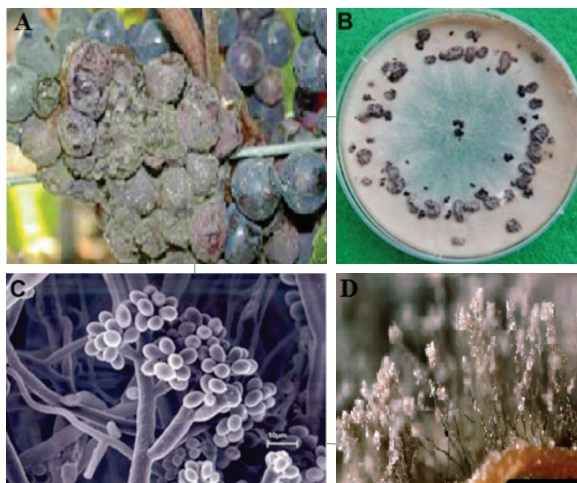
4. Siva plijesan grožđa (*Botrytis cinerea*)

- Siva plijesan, *Botrytis cinerea*, može rasti na velikom broju biljaka i tipična je bolest vino-ve loze „visokog“ standarda.
- Napadnuti mogu biti i listovi i mladice, ali najveće štete nastaju na grozđićima u i po- slije cvatnje, peteljčicama i bobama.
- Na njezin porast pozitivno utječu hladni i vlažni uvjeti, a obilježava je siva paučinasta površina koja prekriva smeđu boju bobice. Pokazatelj ranog stadija rasta ove gljivice je promjena boje bobica u smeđu, odnosno čokoladnu nijansu.
- Iako u većini slučajeva njezin porast sma- njuje kvalitetu grožđa, katkad je zaraže- nost gljivicama poželjna za proizvodnju vi- sokokvalitetnih desertnih vina (takozvana plemenita plijesan).
- Boba s više šećera, a manje kiseline i tanina pogodnija je za napad sive gljivice (plijesni).
- Optimalna temperatura i relativna vlažnost za porast gljivica je između 15 °C i 20 °C, i > 90 % relativne vlažnosti.



Slika 8.

Siva gljivica (plijesan) grožđa (*Botrytis cinerea*)



Slika 9.

Botrytis cinerea

- a) na bobama grožđa;
- b) na hranjivoj podlozi;
- c) mikroskopska slika gljivice;
- d) mikroskopska slika spora (siva paučinasta površina na bobi)

2. MIKOTOKSINI I OKRATOKSIN A (OTA)

MIKOTOKSINI

Mykes – grč. gljiva

Toxicon – grč. otrov

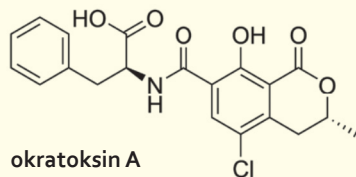
- Sekundarni produkti koje gljivice proizvode tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog podrijetla, a njihovo nastajanje je odgovor gljivica na uvjete okoline.
- Više od 400 molekula klasificirano je kao mikotoksini.
- Opasni su zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakva senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja sadrži mikotoksine.
- Neki mikotoksini su stabilni spojevi tako da se često nalaze i u gotovom proizvodu koji je prošao tehnološku obradu.
- Zbog toksičnosti i učestalosti kontaminacija desetak mikotoksina je od posebnog interesa zakonodavaca i znanstvene zajednice (aflatoksini B₁, B₂, G₁, G₂, M₁; **okratoksin A (OTA)**, patulin, fumonisini, zearalenone, deoksinivalenol – DON).

OKRATOKSIN A (OTA)

- Prema IARC-u (*International Agency for Research on Cancer* / Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma), svrstan je u skupinu 2B, moguće kancerogeno djelovanje na ljude.
- Posljedice njegove prisutnosti u prehrani ljudi i životinja su brojne: pad imuniteta, bolesti bubrega (nekroze, tumori bubrega, urinarnog trakta i jetre)
- Povezan je i s ljudskom nefropatijom, teškom kroničnom obostranom bolesti bubrega, povezuje se i sa smrtonosnom bolešću poznatom kao balkanska endemska nefropatija (BEN).

Gljivice proizvođači OTA-e

Vrste iz roda *Aspergillus*, *A. ochraceus*, *A. niger* i *A. carbonarius* i iz roda *Penicillium*, *P. verrucosum* smatraju se najvažnijim uzročnicima kontaminacije hrane s OTA-om. Niti jedna od ovih gljivica nije tipičan patogen, ne uzrokuju gubitke u proizvodnji te protiv njih, za sada, nisu predviđene posebne mjere za kontrolu.



okratoksin A

Slika 10.

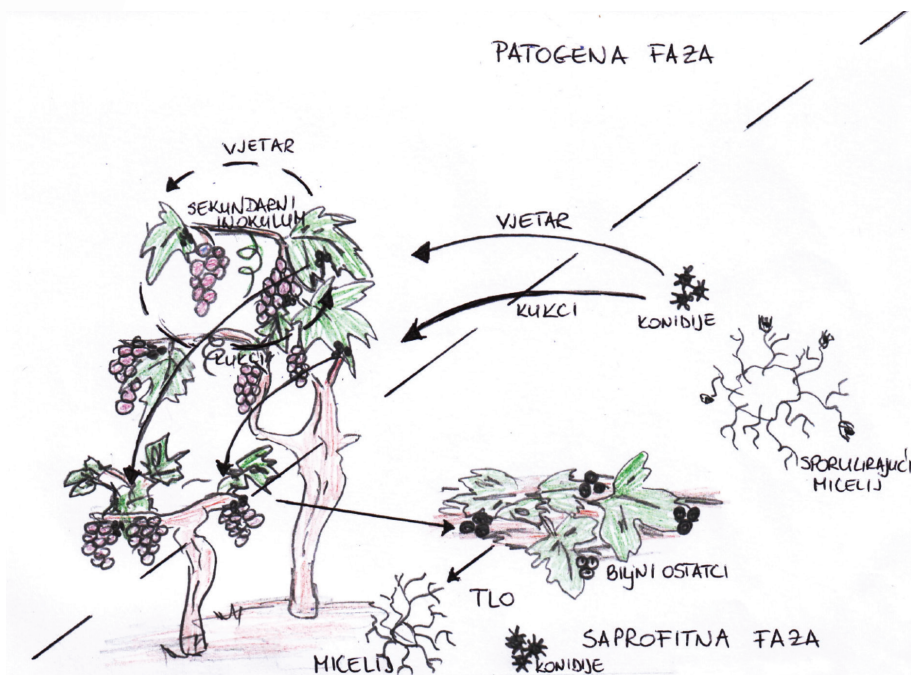
Kemijska formula okratoksina A

ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA BIOSINTEZU OTA-e

- Prisutnost OTA-e u moštu i vinu javlja se zbog kontaminacije grožđa gljivicama koje se mogu razviti prije ili nakon berbe, ili u fazi procesa proizvodnje vina.
- Razine OTA-e u vinu ovise o različitim čimbenicima kao što su lokacija vinograda (zemljopisna širina), vrijeme (kiša, temperatura, relativna vlažnost u vinogradima), vrijeme berbe, tretiranje pesticidima i tehnika proizvodnje vina.
- Istraživanje (2001. – 2003.) je pokazalo da stupanj sazrijevanja grožđa ima utjecaj na učestalost gljivica proizvođača OTA-e te je utvrđeno da oko 96 % OTA-e nastaje za vrijeme berbe. Sinteza OTA-e otkrivena je u svim stadijima sazrijevanja.
- Sastav grožđa u različitim fazama sazrijevanja visoko je utjecao na proizvodnju OTA-e testiranih na soj *A. carbonarius*. Proizvodnjom OTA-e rasla je i koncentracija organskih kiselina, a smanjivala se koncentracija reducirajućih šećera.

PUT ZARAZE VINOVE LOZE I GROŽĐA OKRATOKSIGENIM GLJIVICAMA

Gljivice koje uzrokuju bolesti vinove loze i grožđa prezimljuju u otpalom lišću, u pukotinama kore, u pupovima. Raspadom lišća zimi spore gljivice dospiju u tlo prolazeći proces sazrijevanja. Spore su u stanju mirovanja, otporne na hladnoću, kišu i vlagu. Kada je tlo dovoljno vlažno i kada se postigne pogodna temperatura, započinje klijanje spora, obično u svibnju. Čokoti u to vrijeme razvijaju mladice koje mogu biti napadnute od trenutka izlaženja iz pupa pa sve dok ne odrvene. Cvat može biti napadnut i prije oplodnje, a češće su napadnuti cvjetovi priljubljeni jedan uz drugi. Najveće štete nastaju na bobama koje mogu biti napadnute od zametanja pa do promjene boje boba.



Slika 11.
Životni ciklus gljivice

IZVORI I KOLIČINE OKRATOKSINA A U VINU

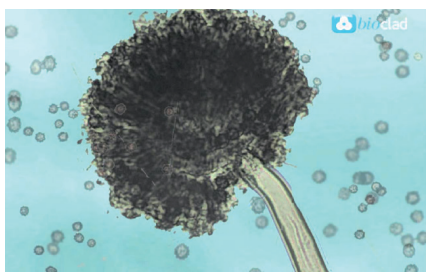
U Europskoj uniji sigurnosni standardi hrane su visoki. Još 1979. godine osnovan je **EU RASFF** (*Rapid Alert System for Food and Feed* – Sustav žurnog uzbuđivanja), sustav koji zaprima i dijeli informacije o svim rizicima za sigurnost hrane i krmiva u zemljama Europske unije. Na stranicama portala RASFF-a moguće je naći podatke o svim slučajevima ugroze sigurnosti hrane, a analizom podataka može se zaključiti:

- značajna prisutnost mikotoksina u hrani za ljude i životinje
- od ukupne količine proizvedene hrane u svijetu 20 – 25 % prehrambenih proizvoda, uglavnom biljnog podrijetla kontaminirano je mikotoksinima
- s obzirom na njihovu toksičnost, od iznimne je važnosti kontrolirati prisutnost i količinu mikotoksina u hrani.

- Pojava OTA-e u vinu vezana je uz rast gljivica na grožđu.
- Glavni izvor OTA-e u proizvodnom lancu vina je prisutnost takozvane „crne plijesan“.
- „Crna plijesan“ uključuje vrste iz roda *Aspergillus* posebno *Aspergillus carbonarius*.
- *A. carbonarius* prisutan je na grožđu, soku od grožđa, vinima, grožđicama.
- Kontaminacija grožđa s gljivicama može se dogoditi prije berbe, za vrijeme berbe i tijekom procesiranja grožđa.
- Okratoksin se primarno stvara u vrijeme prije berbe kada *A. carbonarius* inficira bobicu grožđa čemu pogoduje porast količine šećera i omekšavanje kožice bobe do berbe.



Slika 12.
„Crna plijesan“ na grožđu



Slika 13.
Mikroskopska slika *A. carbonarius*



Slika 14.
Poplavljeni vinogradi

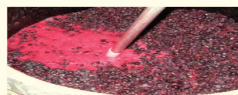
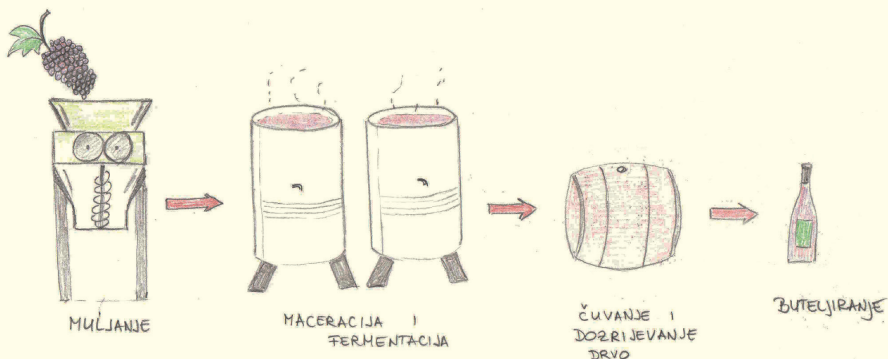
Prekomjerno navodnjavanje prije sazrijevanja te kiše prije berbe uobičajen su uzrok zaraženosti bobica. Pucanje bobica zbog prekomjerne vlage, oštećenje bobica od ptica, kukaca ili drugih gljivičnih infekcija glavni su čimbenici razvoja infekcije grožđa i nakupljanja OTA-e u bobicama grožđa.



Slika 15.

Kukci na vinovoj lozi

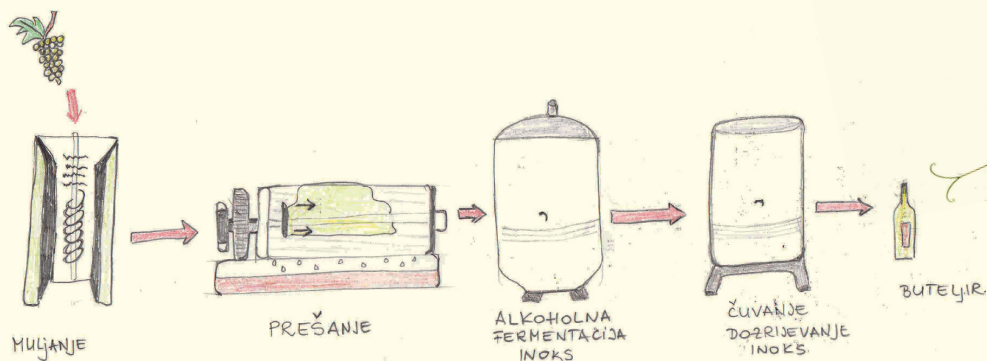
Kukci poput groždanog moljca (*Lobesia botrana* L.) mogu prenositi konidije okratoksigenih gljivica i oštetiti grozdove te na taj način omogućiti kolonizaciju grozda još na stabljici i uzrokovati pojavu OTA-e već tijekom rasta.



Slika 16.

Shematski prikaz proizvodnje crnih vina

- Crna vina izloženija su kontaminaciji s OTA nego ružičasta.
- Na to utječe način proizvodnje. Okratoksigene gljivice ne mogu razgraditi kožicu bobe gržđa, no maceracija masulja nakon runjanja i muljanja grožđa omogućuje rast gljivica i proizvodnju OTA-e. Mošt je u duljem kontaktu s pokožicom grožđa što omogućuje ispuštanje proizvedene OTA-e u mošt i ekstrakciju OTA-e iz pokožice.



Slika 17.

Shematski prikaz proizvodnje bijelih vina

- Bijela vina manje su izložena kontaminaciji s OTA-om.
- Bijelo grožđe preša se odmah nakon berbe i ne provodi se (u pravilu) maceracija masulja što znatno smanjuje vrijeme za rast gljivica i ispuštanje OTA-e u mošt.
- Slatka i specijalna vina također su izloženi kontaminaciji s OTA-om od suhih vina.
- Slatka vina, karakteristična za mediteranske zemlje, pokazala su veći prosječni sadržaj OTA-e od uobičajenog za vino zbog duljeg izlaganja kontaminaciji gljivicama za vrijeme prosušivanja grožđa.
- Kod proizvodnje desertnih vina koja nisu pojačana alkoholom, grožđe se suši na suncu ili u komorama sve dok se ne postigne izrazito visoka razina šećera zbog čega je podložno povećanom razvoju gljivica.



Slika 18.

Primjeri vinograda na različitim geografskim lokacijama i različitim klimatskim uvjetima

Utjecaj klime i geografski položaj

- Vina južnih krajeva – češće pojave i više razine OTA-e (15 – 47 ng/L); vruća i suha ljeta te tople i vlažne jeseni.
- Vina sjevernih krajeva sadrže niže razine OTA-e (12-22 ng/L) ili OTA nije dokazana.



Slika 19.

Grožđe za ledenu berbu

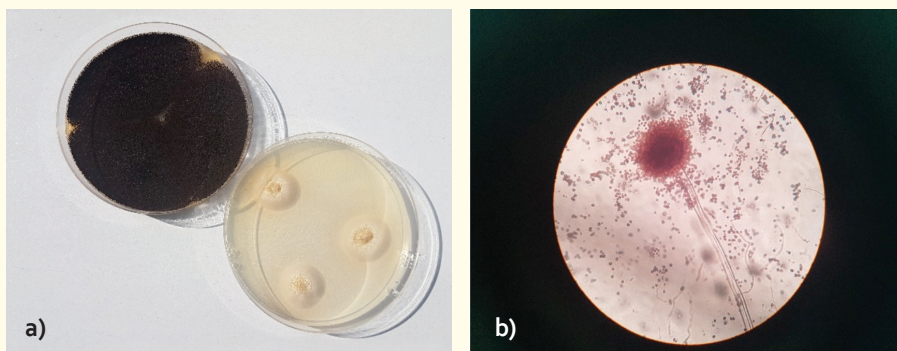


Slika 20.

Prosušivanje grožđa za proizvodnju desertnog vina

3. IDENTIFIKACIJA GLJIVICA I METODE ANALIZE OTA-E

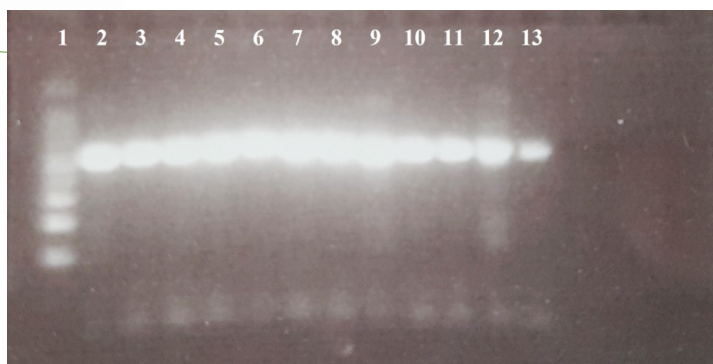
- Za identifikaciju gljivica bitno je promatrati nekoliko osobina koje uključuju: način razmnožavanja, izgled micelija (tijelo gljivice), tvorbu staničnih struktura, ali i tvorbu specifičnih mikotoksina.
- Identifikacija gljivica može se provesti do razine roda i/ili vrste klasičnim mikrobiološkim metodama na osnovi morfoloških karakteristika, kao što je izgled kolonija poraslih na hranjivoj podlozi i mikroskopskim pretraživanjem plodonosnog tijela odnosno spolnih i nespolnih gljivičnih struktura.



Slika 21.

Morfološke karakteristike gljivice iz roda *Aspergillus*: **a)** izgled kolonija na hranjivoj podlozi; **b)** mikroskopska slika *Aspergillus* sp.

Posljednjih godina za potvrdu gljivica na razini vrste sve više se uvode i molekularno biološke metode kao što je identifikacija lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i masena spektrometrija poput MALDI-TOF postupka koje se temelje na analizi DNK i proteina. Riječ je o brzim, osjetljivim i pouzdanim metodama određivanja sastava uzorka (gljivica), no zbog visokih cijena, ove metode još uvijek nisu dostupne u većini mikrobioloških laboratorija.



Slika 22.

Primjer identifikacije plijesni PCR metodom. Linija 1 prikazuje DNK standarde. Linije 2 –12 prikazuju uzorke izoliranih plijesni. Linija 13 prikazuje pozitivnu kontrolu plijesni (standardni soj) *Aspergillus carbonarius* ATCC 1008.

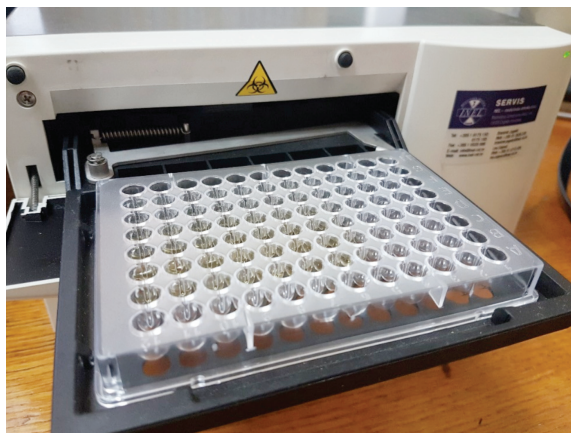
Vidljivo je da *bendovi* u linijama 3, 10 i 11 odgovaraju pozitivnoj kontroli te su uzorci tih plijesni identificirani kao *A. carbonarius*.

METODE ODREĐIVANJA OKRATOKSINA A

- Budući da je prisutnost mikotoksina u hrani i u vinu gotovo nemoguće u potpunosti spriječiti, zbog njihove visoke toksičnosti i kancerogeni razvijene su brojne analitičke metode analize prisutnosti OTA-e u vinu koje se mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne metode.

ELISA test

- Jedna od preciznih i visokoosjetljivih metoda koja ne iziskuje skupu analitičku opremu je ELISA test.
- ELISA je imunoenzimski test visoke osjetljivosti i selektivnosti za određivanje prisutnosti i količine specifičnih molekula, a provodi se prema uputama proizvođača.
- Temelji se na obojenom kompleksu kako bi se dobio mjerljiv rezultat.
- Komercijalno dostupni ELISA kompleti za detekciju mikotoksina su prijenosni, brzi i vrlo specifični, daju mogućnost analize velikog broja uzoraka u kratkom razdoblju, jednostavni su i isplativi za upotrebu.
- Nedostatak ove metode je mogućnost dobivanja lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata što u konačnici zahtijeva potvrđnu metodu



Slika 23.

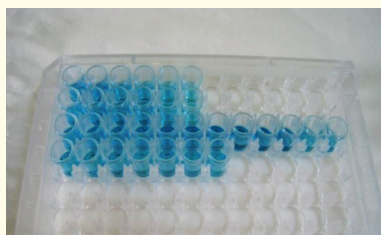
Čitač mikrotitarskih pločica u određivanju količine OTA-e u uzorcima vina ELISA metodom

Neposredno prije početka rada pripreme se uzorci grožđa/vina te standardi OTA-e prema navedenim uputama proizvođača ELISA kita.



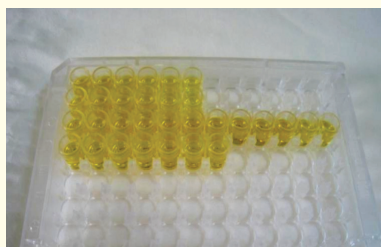
Slika 24.

Nanošenje uzorka za određivanje koncentracije mikotoksina ELISA metodom



Slika 25.

Razvijanje plave boje dodatkom supstrata



Slika 26.

Zaustavljanje enzimske reakcije i promjena boje – obojeni

Brze metode detekcije OTA-e

Na tržištu se mogu naći proizvodi za brzu provjeru prisutnosti okratoksina u sirovinama ili namirnicama. Namijenjeni su brzom probiru uzoraka koje treba poslati na kontrolu kromatografskim metodama. Rezultati brzog testa upućuju na prisutnost toksina, ali je njihova pouzdanost u kvantifikaciji toksina nedovoljna. Temelje se na imunološkim ili metodama tankoslojne kromatografskim i za njihovu primjenu nije potrebna posebna edukacija.

Nedostatak: Većina opreme za brze testove OTA-e namijenjena je analizi žitarica pa može biti manje pouzdana u analizi vina. Metodologija je prihvatljiva za veće proizvođače, kod manjih proizvođača cijena testa mogla bi biti neprihvatljiva.

Potvrдне ili kromatografske metode

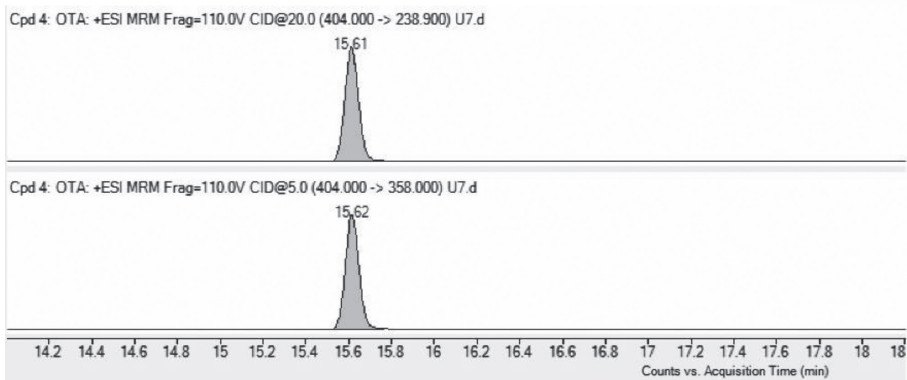
Metode koje zahtijevaju ispravnu ekstrakciju i pročišćavanje uzorka jer se radi o visoko osjetljivim i preciznim metodama, a obuhvaćaju:

- tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC; engl. *High Performance Liquid Chromatography*)
- plinsku kromatografiju (GC; engl. *Gas Chromatography*), i/ili
- tekućinsku kromatografiju/masenu spektrometriju (LC/MS; engl. *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*)

Nedostatak ovih metoda je visoka cijena i složenost postupaka ekstrakcije uzoraka.



Slika 27.
HPLC uređaj

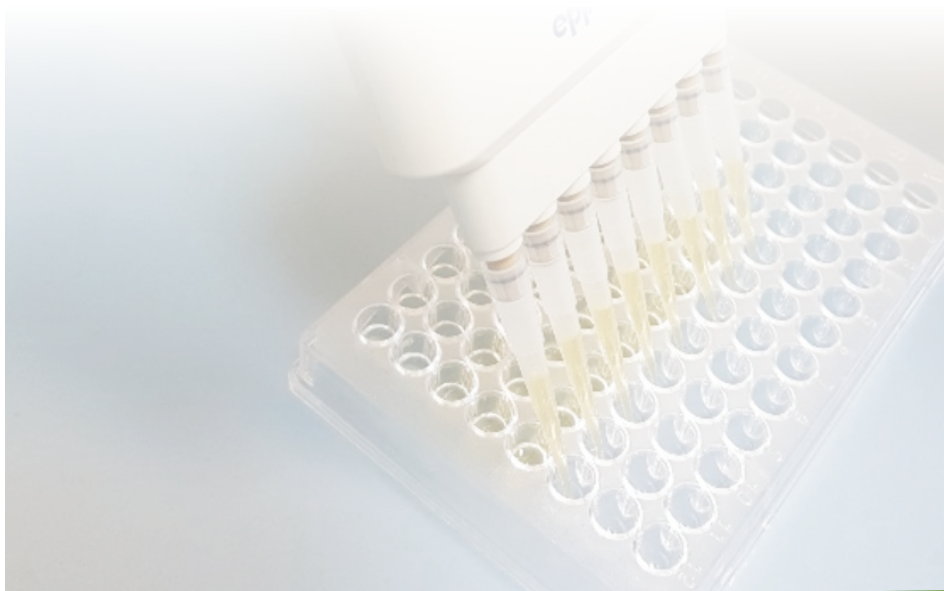


Slika 28.

LC-MS/MS kromatogram potvrđne analize OTA-e u ispitivanim uzorcima

Analize za prisutnost OTA-e mogu provesti:

- Zavod za javno zdravstvo
- certificirani laboratoriji za analizu kvalitete hrane
- sveučilišni laboratoriji.



4. PROCJENA RIZIKA IZLOŽENOSTI OKRATOKSINU A

- OTA je značajan kontaminant grožđa, vina i napitaka od grožđa.
- U Republici Hrvatskoj, kao i u ostalim zemljama Europske unije, na snazi je Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. kojom se utvrđuju najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani (SL L 364, 20. prosinca 2006.).
- Pravilnikom i Uredbom definirana je najveća dopuštena količina okratoksina A u vinu (uključujući pjenušavo vino, osim likerskih vina i vina s volumnim udjelom alkohola ne manjim od 15 vol. %) i voćnom vinu te iznosi 2 µg kg⁻¹.
- Ako je utvrđena količina u navedenim proizvodima veća od propisane, zabranjeno ih je stavljati na tržište.

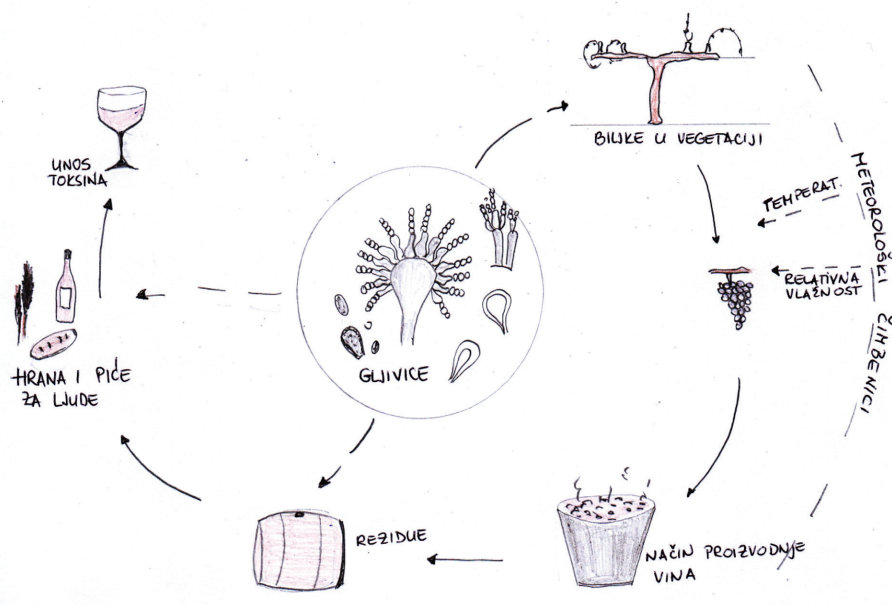
2.2.	Okratoksin A	Najveće dopuštene količine (µg/kg)		
2.2.1.	Nepreradene žitarice	5,0		
»2.2.2.	Svi proizvodi dobiveni iz nepreradenih žitarica, uključujući prerađene proizvode od žitarica te žitarice namijenjene neposrednoj ljudskoj prehrani, osim hrane iz točaka 2.2.9., 2.2.10. i 2.2.13.	3,0 ^e		
2.2.3.	Groždice (sve vrste)	10,0		
2.2.4.	Pržena zrna kave i mljevena pržena kava, osim instant kave	5,0		
2.2.5.	Topiva kava (instant kava)	10,0		
2.2.6.	Vino (uključujući pjenušavo vino, osim likerskih vina i vina s volumnim udjelom alkohola ne manjim od 15 vol.%) i voćno vino (**11)	2,0(**12)		
2.2.7.	Aromatizirana vina, aromatizirano piće na bazi vina i aromatizirani kokteli na bazi vina (**13)	2,0(**12)		
2.2.8.	Sok od grožđa, rekonstituirani koncentrirani sok od grožđa, nektar od grožđa, mošt i rekonstituirani koncentrirani mošt od grožđa, za neposrednu prehranu ljudi (**14)	2,0(**12)		
2.2.9.	Prerađena hrana na bazi žitarica i dječja hrana za dojenčad i malu djecu (3) (7)	0,50		

Slika 29.

Uredba Komisije (EZ) 1881 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani

Analiza rizika

- Prema podatcima iznesenim u više istraživanja provedenih u različitim zemljama Europske unije, procijenjeno je da se izloženost OTA-i u zemljama Europske unije kreće između 0,13 i 4,6 ng kg⁻¹ tjelesne mase po danu. Izloženost u velikoj mjeri ovisi o prehrambenim navikama pojedinca.
- Prisutnost OTA-e potvrđena je u vinima mnogih zemalja. U nekim istraživanjima dokazana je povećana koncentracija OTA-e u krvi osoba koje su konzumirale crno vino.
- U zemljama u kojima je izraženija potrošnja vina, ono može biti odgovorno i za 10 % do 15 % od ukupnog dnevnog unosa OTA-e. Studije o unosu OTA-e iz vina pokazale su da osoba tjelesne mase 60 kg i unosom od 100 mL vina dnevno ima prosječan unos OTA-e od 0,18 ng, što je 3,6 % dnevnog unosa utvrđenog od Znanstvenog vijeća Hrvatske agencije za hranu (5 ng/kg tm/dan).
- Znatne razine ovoga toksina mogu biti prisutne u vinima, moštu i soku od grožđa (do 7 µg po litri).



Slika 30.

Raznolikost ulaska i distribucije OTA-e u proizvodnom lancu vina

Procjena rizika kontaminacije hrvatskih vina okratoksinom A

- Općenito se područje Republike Hrvatske smatra zonom umjerenog rizika kontaminacije vina okratoksinom A, no južniji dijelovi države su na granici zone visokog rizika. Dosadašnja objavljena istraživanja prisutnosti okratoksina A u hrvatskim vinima pokazala su izloženost naših vina kontaminaciji ovim toksinom. Iako je u svim istraživanjima velik dio vina sadržavao okratoksin A, njegova je koncentracija bila daleko ispod limita dopuštenog EU regulativama i nije zabilježen niti jedan slučaj vina neprikladnog za tržište.
- I istraživanja provedena u okviru projekta „Procjena rizika kontaminacije crnih vina Zadarske županije okratoksinom A“ koje je financiralo Vijeće za istraživanja u poljoprivredi (VIP), pokazala su da na području Zadarske županije postoje okratoksigene gljivice, no njihova je brojnost vrlo niska te je nizak i rizik kontaminacije vina okratoksinom.
- Iako se može reći da općenito rizik od kontaminacije vina Zadarske županije nije visok, treba uzeti u obzir to da taj rizik ovisi ponajprije o vremenskim prilikama te bi u nekim godinama posebno povoljnim za rast okratoksigernih gljivica on mogao biti izraženiji. Dosadašnji podatci pokazuju da nema mjesta za uzbuđu, no bilo bi dobro podignuti svijest o problemu i početi primjenjivati mjere dobre poljoprivredne prakse u svrhu smanjenja rizika.

5. MJERE I POSTUPCI ZA SMANJENJE OTA-E U GROŽĐU I VINU

Cilj: smanjenje gljivične infekcije primjenom dobre poljoprivredne prakse

- Treba brati grožđe u odgovarajućoj fazi zrelosti i u najvećoj mjeri smanjiti razmak između branja i vinifikacije.
- Tijekom berbe: – preporučuje se korištenje čiste opreme
– prevencija mehaničkih oštećenja
– odvajanje prezrelih ili fermentiranih plodova.
- Skladištenje se smatra najkritičnijom fazom. U ovoj fazi uvjeti okoline, posebno vlage i temperature, moraju biti dobro kontrolirani te se predlažu i moguće mjere djelovanja za smanjenje OTA-e u vinu u tri koraka:
 - u vinogradu prije berbe
 - odmah nakon berbe
 - za vrijeme proizvodnje vina.

Dobra poljoprivredna praksa prije berbe

Prije podizanja nasada vinograda:

- odabrati lokalitet na kojem postoji optimalno strujanje zraka
- pravilna priprema terena na kojem će se nasad podizati
- odabrati kultivare prikladne za uzgoj u pedoekološkim uvjetima lokaliteta (Pravilnik o nacionalnoj listi priznatih kultivara v. loze; Pravilnik o vinogradarskim područjima uzgoja v. loze)
- odabir zdravog i kvalitetnog sadnog materijala (virus free sadnice)
- odabrati kultivare otpornije na napad bolesti.



Slika 31.

Povoljni položaji za podizanje vinograda

Dobra poljoprivredna praksa prije berbe

U postojećem vinogradu:

- obratiti pažnju na optimalan odnos lisne mase i grozdova po trsu
- izbjegavati pretjeranu upotrebu dušičnih gnojiva
- izbjegavati dodirivanje grozdova
- održavati površinu ispod loze u vinogradu zatravljenom ili površinu prekriti biljnim (organskim) materijalom



Slika 32. i 33.

Primjeri dobrog odnosa lisne mase i grozdova po trsu



Slika 34.

Nepotrebno obavljena defolijacija u zoni grožđa i loš odnos lisne mase i grožđa po trsu



Slika 35.

Jaka defolijacija u zoni grožđa: negativan utjecaj Sunca na grožđe; grozdovi su zbijeni – potencijalna opasnost od napada plijesni

- izbjegavati okopavanje vinograda i ostale radove kojima se premješta tlo u vremenu od početka dozrijevanja grožđa do berbe kako bi se izbjegao dodir između grozdova i tla (okratoksigene gljivice dio su mikoflore tla)
- ako je potrebno navodnjavanje, treba ga provoditi što je moguće redovitiije i ravnomjernije kako bi se izbjeglo pucanje bobica uzrokovano jakim turgorom biljnih sokova

- ne koristiti pljesnivi kom za gnojidbu
- izvršiti djelomičnu defolijaciju u zoni grožđa koliko je moguće, pazeći pri tome da se grožđe pretjerano ne izloži sunčevoj radijaciji kako ne bi došlo do pojave ožegotina na grozdovima, sve s ciljem osiguranja optimalnog prozračivanja oko grozdova
- primijeniti mjere zaštite protiv groždanih moljaca
- primijeniti sve ostale preporučene mjere zaštite za sprječavanje pojave gljivica i truleži (bolesti) svaki put kada se stvore povoljni uvjeti za rast okratoksigenih gljivica (temperatura, vlaga).



Slika 36.

Zatravljanje površine u vinogradu kao ispravan način održavanja tla



Slika 37.

Osnovna enološka oprema za određivanje optimalnog termina berbe

Dobra poljoprivredna praksa tijekom berbe

- planirati datum berbe prema stupnju zrelosti grožđa, vodeći računa i o vremenskim prilikama u berbi
- u krajevima gdje je rizik onečišćenja okratoksinom A viši planirati raniju berbu
- odstraniti bobice koje su oštetili kukci i/ili bobice na kojima je vidljiva prisutnost gljivica
- prilikom berbe i transporta grožđa koristiti samo posude koje se mogu lako dezinficirati
- održavati higijenske mjere i čistoću tijekom berbe (alat, posude za berbu grožđa).



Slika 38.

Grožđe napadnuto plijesni koje ne smije ući u preradu



Slika 39.

Grozdovi osušeni zbog izlaganja Suncu koji ne bi smjeli ući u preradu



Slika 40.

Primjer loše berbe i transporta grožđa u plastičnim vrećama



Slika 41.

Primjer ispravnog načina berbe grožđa u plastične sanduke

METODE ZA SMANJENJE KONCENTRACIJA OTA-e U VINU

U svrhu smanjenja rizika od unosa OTA-e putem hrane/vina razvijene su razne metode.

Fizikalne metode – ponajprije uključuju uklanjanje pljesnivog grožđa prije nego što uđe u proces vinifikacije, čime se može reducirati i do 98 % OTA-e, no to je za velike proizvođače teško primjenjivo i ekonomski zahtjevno.



Slika 42.

Uklanjanje grozdova vidljivo kontaminiranih gljivicama

Kemijske metode uklanjanja OTA-e iz kontaminiranog vina uključuju primjenu sredstava za bistrenje poput aluminosilikata (uglavnom zeolita), komadića drva, bentonita i aktivnog ugljena, želatine, kazeina, PVPP-a (polivinilpolipirrolidon) koji imaju sposobnost čvrsto vezati i imobilizirati mikotoksin. Pokazalo se da bobice grožđa imaju veći afinitet za okratoksin A od vina. Jedna od mogućih metoda za smanjenje koncentracije toksina je filtriranje vina preko dropa koji ne sadrži okratoksin A, no ta tehnika je manje učinkovita od navedenih.

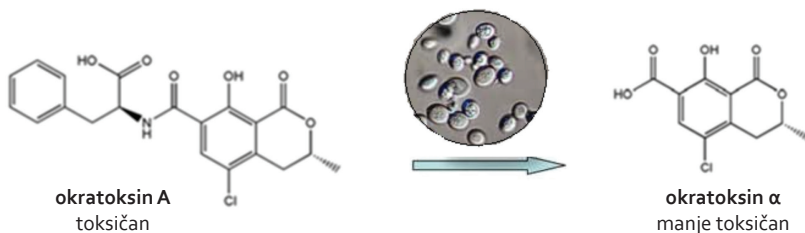


Slika 43.

Shema upotrebe sredstava za adsorpciju OTA-e

Mikrobiološke metode za smanjenje udjela OTA-e u vinu sve više se primjenjuju uz vinske kvasce (*Saccharomyces*), ali i bakterije i gljivice. Iako su obećavajuće, nisu dovoljno istražene posljedice akumulacije OTA-e i/ili njezinih metabolita u ljudskom tijelu, a postavlja se i pitanje utjecaja mikroorganizama i njihovih enzima na kvalitetu vina. Upotreba mrtvih stanica kvasaca pokazala se jednom od mogućih mjera za uklanjanje okratoksina A iz vina adsorpcijom.

BIOLOŠKA DETOKSIFIKACIJA OTA U VINU



Slika 44.

Shema biološke razgradnje OTA-e

ZAKLJUČAK

Okratoksini su potencijalna opasnost za ljudsko zdravlje s obzirom na to da je vino uz žitarice najčešći proizvod kojim je moguć unos OTA-e u organizam ljudi. Praćenjem kritičnih točaka u uzgoju vinove loze i proizvodnje vina moguće je prevenirati pojavu ili smanjiti razinu OTA-e u vinu. Dokazano je da klimatski uvjeti i područja uzgoja vinove loze i proizvodnje grožđa utječu na pojavu OTA-e u vinu, te je u tom smislu potrebno kontinuirano praćenje pojave „crne plijesni“ i pravovremeno poduzimanje potrebnih mjera zaštite. Dobra poljoprivredna i proizvođačka praksa, HACCP sustav te upravljanje mogućim rizicima na temelju kritičnih kontrolnih točaka mogli bi pomoći u kontroli, sprječavanju i akumulaciji OTA-e u grožđu odnosno vinu.



LITERATURA

1. 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 (3), 456-461.
2. Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A. (2006) European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111, Supplement 1, S2-S4.
3. Boudra H, Bars PL, Bars JL. (1995) Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3), 1156-1158.
4. Ciglar, I., Barić, B. (1998). Integrirana zaštita voćnjaka i vinograda. Čakovec, Zrinski, 301.
5. Cozzi, G., Pascale, M., Perrone, G., Visconti, A., Logrieco, A. (2006) Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S88-S92.
6. Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A., Budroni, M., Migheli, Q. (2012) A *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strain Inhibits Growth and Decreases Ochratoxin A Biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4(12),1468-81
7. Cvjetković, B. (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze s opširnim prikazom zaštite. Čakovec, Zrinski, 533.
8. Ćubela, D. (2014) Pojavnost okratoksina A u uzorcima bijelih, crnih i desertnih vina. Specijalistički završni rad, Sveučilište u Zagrebu.
9. Domijan, A. M., Peraica, M. (2005) Ochratoxin A in wine. *Arhiv za Higijenu rada i toksikologiju*, 56, 17-20.
10. EC (2006) Commission Regulation (EC) 1881/2006 of 19 December 2006. setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Journal of the European Union*, L364/5-364/24.
11. EFSA, (2006): Mišljenje Stručnog odbora o kontaminantima u prehrambenom lancu EFSA-e na zahtjev Komisije u pogledu okratoksina A u hrani. http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1521.Par.0001.File.dat/contam_op_ej365_ochratoxin_a_food_en1.pdf.
12. 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.

13. 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, 56, 489-521.
14. 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.
15. Leblanc, J. C., Tard, A., Volatier, J. L., Verger, P. (2006) Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants*, 22, 652-672.
16. Milatić, A. (2016) Okratoksin A u crnim vinima, Završni rad, Sveučilište u Zadru.
17. Ministarstvo poljoprivrede (2014). Tehnološke upute za integriranu proizvodnju grožđa za 2014. www.svjetodavna.hr (pristupljeno 5. studenoga 2017.)
18. Otteneder, H., Majerus, P. (2000) Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17, 793-798.
19. Peraica, M., Flajs, D., Domijan, A. M., Ivić, D., Cvjetković, B. (2010) Ochratoxin A contamination of food from Croatia. *Toxins*, 2, 2098-2105.
20. Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, *Narodne novine*, broj 146/12.
21. Remiro, R., Irigoyen, A., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. (2013) Levels of ochratoxins in Mediterranean red wines. *Food Control*, 32, 63-68.
22. 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.
23. Valero, A., Marín, S., Ramos, A. J., Sanchis, V. (2008) Survey: Ochratoxin A in European special wines. *Food Chemistry*, 108, 593-599.
24. 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 (2), 193-202.
25. Zimmerli, B., Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 655-668.