



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΜΣ "Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του
Ανθρώπου "



In vitro και in situ μείωση της
ωχρατοξίνης Α από βακτήρια
και ζύμες
τεχνολογικής μικροχλωρίδας

ΚΟΛΛΙΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΜΣ "Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του
Ανθρώπου "



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΟΛΛΙΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΓΙΑΝΝΙΩΤΗΣ ΣΤΑΥΡΙΑΝΟΣ

ΚΩΜΑΪΤΗΣ ΜΙΧΑΗΛ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	9
1.1 Γενικά	10
1.2 Ωχρατοξίνη Α	11
1.2.1 Γενικά	11
1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό της ΩΤΑ	13
1.2.3 Ανίχνευση ΩΤΑ σε σταφύλια και κρασί.....	14
1.3 Ο ωχρατοξινογόνος μύκητας <i>Apergillus carbonarius</i>	18
1.4 Ο Μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών	20
1.4.1 Γενικά	20
1.4.2 Στήλες ανοσοσυγγένειας.....	21
1.4.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	22
1.4.3.1 Εισαγωγή- βασικές αρχές.....	22
1.4.3.2 Οργανολογία	23
1.4.3.3 Επίτευξη επιθυμητού διαχωρισμού	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ	27
2.1 Στρατηγικές πριν τη συγκομιδή	28
2.1.1 Γενικές στρατηγικές.....	28
2.1.2 Δημητριακά, σταφύλια και άλλα τρόφιμα σε θερμές περιοχές.....	29
2.2 Στρατηγικές κατά τη διάρκεια της συγκομιδής.....	29
2.3 Στρατηγικές μετά τη συγκομιδή.....	30
2.3.1 Αποθήκευση και μεταφορά	30
2.3.2 Επεξεργασία	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ	33
3.1 Γενικά	34
3.2 Επεξεργασία του προϊόντος	34
3.2.1 Σιτηρά και παράγωγα	34
3.2.2 Προϊόντα σταφυλιών	35
3.3 Φυσικές μέθοδοι	36
3.4 Χημικές μέθοδοι	37
3.4.1 Χημικές ενώσεις προσρόφησης	37
3.4.2 Αποδόμηση της ΩΤΑ ή εκχύλισή της με χημικούς παράγοντες	37
3.5 Μικροβιολογικές μέθοδοι	38
3.5.1 Γενικά	38
3.5.2 Μείωση της ΩΤΑ από βακτήρια	39
3.5.3 Μείωση της ΩΤΑ από ζύμες	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ	42
4.1 Γενικά	43
4.2 Βιολογικός έλεγχος μυκοτοξινογόνων μυκήτων με τη εφαρμογή ζυμών	45
4.3 Βιολογικός έλεγχος μυκοτοξινογόνων μυκήτων με τη εφαρμογή βακτηρίων	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	48
5.1 Νομοθεσία μυκοτοξινών και ειδικότερα ωχρατοξίνης	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
7.1 Θρεπτικά υλικά	55
7.2 Στελέχη ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων και προετοιμασία εμβολίων	56
7.3 Επιλογή μύκητα και διαδικασία παραγωγής και συλλογής κονιδίων	58

7.4 Μείωση της ανάπτυξης του <i>Aspergillus carbonarius</i> και της ικανότητας παραγωγής ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια σε στερεό υπόστρωμα SGM.....	59
7.4.1 Καθαρισμός των δειγμάτων και ανάλυση τους στη HPLC	60
7.5 In vitro και in situ μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας.....	61
7.5.1 Ανίχνευση της ΩΤΑ με HPLC.....	62
7.5.2 Προσδιορισμός αρχικού και τελικού μικροβιακού φορτίου σε τρυβλία Petri	62
7.5.3 Καθαρισμός των δειγμάτων	64
7.6 Ποσοτικός προσδιορισμός ΩΤΑ με HPLC	65
7.6.1 Ποσοτική ανάλυση.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
8.1 Μείωση της ανάπτυξης του <i>Aspergillus carbonarius</i> και της ικανότητας παραγωγής ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια	69
8.2 In vitro μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας.....	78
8.3 In situ μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
9.1 Μείωση της ανάπτυξης του <i>Aspergillus carbonarius</i> και της ικανότητας παραγωγής ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια	90
9.2 In vitro και in situ μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου» με κατεύθυνση «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων».

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σκανδάμη Παναγιώτη για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος και για την υπομονετική καθοδήγησή του σε όλη τη πορεία εκτέλεσης και συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη υποψήφια Διδάκτορα Καπετανάκου Νατάσσα για την συνεργασία, την υπομονή αλλά και την πολύτιμη συμβολή της στην δομή, οργάνωση και διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων για την σημαντική συμβολή τους στην διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου προσέφεραν καθ'όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, αλλά και τη γενικότερη πορεία μου στο πανεπιστήμιο έως τώρα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κάθε χρόνο αποσύρονται μεγάλες ποσότητες τροφίμων λόγω της προσβολής τους από τοξινογόνους μύκητες και την μόλυνσή τους με μυκοτοξίνες. Η Ωχρατοξίνη Α (ΩΤΑ) είναι μια μυκοτοξίνη, η οποία έχει ανιχνευθεί σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων (π.χ. κρασί, δημητριακά, σταφύλια, κακάο), είναι πολύ τοξική και παράγεται κυρίως από μύκητες των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*. Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας 5 μικτών καλλιιεργειών ζυμών και 6 μικτών καλλιιεργειών βακτηρίων απομονωμένων από ζυμούμενα προϊόντα να μειώνουν την ανάπτυξη του ωχρατοξινογόνου μύκητα *A. carbonarius* και την ικανότητά του να παράγει τοξίνη καθώς επίσης και να μειώνουν τη συγκέντρωση της ΩΤΑ τόσο σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα όσο και σε τρόφιμα όπως χυμό σταφυλιού, κόκκινο κρασί και μπύρα.

Η παρεμποδιστική δράση των παραπάνω μικροοργανισμών στην ανάπτυξη του ωχρατοξινογόνου μύκητα *A. carbonarius* και τη παραγωγή τοξίνης μελετήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα προσομοίωσης χυμού σταφυλιού (synthetic grape medium) με pH 3.5 και a_w 0.98, 0.95, 0.92, μετά από επώαση στους 25°C για 5 ημέρες. Διαφορετικοί συνδυασμοί μεγέθους εμβολίου ομάδων βακτηρίων ή ζυμών και μύκητα χρησιμοποιήθηκαν (10^2 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL, 10^5 cfu/mL- 10^2 σπόρια/mL, 10^5 cfu/mL- 10^5 σπόρια/mL). Με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα των παραπάνω μικτών καλλιιεργειών ζυμών και βακτηρίων να μειώνουν την ΩΤΑ, δύο μεγέθη αρχικού εμβολίου 10^3 και 10^7 cfu/mL χρησιμοποιήθηκαν σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (Yeast Medium, MRS broth) με διαφορετικά pH (3.0, 4.0, 5.0, και 6.1 ή 6.5) και 2 αρχικές συγκεντρώσεις ΩΤΑ (50 & 100 µg/L) ενώ ακολούθησε επώαση στους 30°C για 2 και 5 ημέρες αντίστοιχα. Στη περίπτωση των τροφίμων χρησιμοποιήθηκε μόνο η υψηλή συγκέντρωση εμβολίου 10^7 cfu/mL και ως αρχική συγκέντρωση ΩΤΑ τα 100ppb. Η μείωση της ανάπτυξης του μύκητα και η μείωση της ΩΤΑ υπολογίσθηκαν με βάση δείγματα μαρτύρων (control).

Καμία από τις μικτές καλλιέργειες βακτηρίων δεν μείωσε την ανάπτυξη του *A. carbonarius* σε αντίθεση με τις μικτές καλλιέργειες ζυμών. Στις ζύμες η εφαρμογή του υψηλού μεγέθους εμβολίου (10^5 cfu/mL) και συγκεκριμένα ο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

συνδυασμός εμβολίου 10^5 cfu/mL ζυμών και 10^2 σπόρια/mL *A. carbonarius* έδειξε τη μεγαλύτερη μείωση του μύκητα ενώ οι συγκεντρώσεις ΩΤΑ ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όσον αφορά τη μείωση της ΩΤΑ, όλες οι μικτές καλλιέργειες ζυμών έδειξαν μεγαλύτερη μείωση της ΩΤΑ (έως και 65%) σε σύγκριση με τις μικτές καλλιέργειες βακτηρίων (2-25%) στα υγρά θρεπτικά υποστρώματα. Η μέγιστη μείωση της ΩΤΑ παρατηρήθηκε στο pH 3.0 από όλες τις μικτές καλλιέργειες ζυμών ανεξαρτήτως του αρχικού μεγέθους εμβολίου ζυμών και της αρχικής συγκέντρωσης ΩΤΑ. Όπως και στη περίπτωση των θρεπτικών υποστρωμάτων έτσι και στα 3 τρόφιμα οι ζύμες (16YM) έδειξαν καλύτερα ποσοστά μείωσης της ΩΤΑ σε σύγκριση με τα βακτήρια (29BM). Η υψηλότερη μείωση της τοξίνης παρατηρήθηκε στο χυμό σταφυλιού (32%), ακολούθως στο κόκκινο κρασί (22%) και τέλος στη μπύρα (12%).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι συγκεκριμένα στελέχη μικροοργανισμών είναι ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη του *A. carbonarius* και να μειώσουν τη παραγωγή ΩΤΑ μετά από εφαρμογή τους σε ζυμούμενα τρόφιμα, καθιστώντας τους εν λόγω μικροοργανισμούς χρήσιμους για τη ασφάλεια των τροφίμων και του καταναλωτή.

ABSTRACT

Aim of the present study was to investigate the inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of OTA from culture media and beverages by five composites of yeasts and six of bacterial isolates from fermented products. The antagonistic effect of the above composites against *A. carbonarius* growth and its ability to produce OTA was studied in synthetic grape medium of pH 3.5 and a_w 0.98, 0.95, 0.92 after incubation at 25°C. According to the experimental planning, different combinations of initial inocula of bacteria or yeast composites and fungi were used (10^2 cfu/mL vs 10^5 spores/mL; 10^5 cfu/mL vs 10^2 spores/mL; and 10^5 cfu/mL vs 10^5 spores/mL). Regarding the OTA reduction experiment, 10^3 and 10^7 cfu/mL of the bacteria and yeasts composites were inoculated in liquid media of different pH (3.0, 4.0, 5.0, & 6.1 or 6.5) and initial OTA concentration (50 & 100 µg/L) and incubated at 30°C. Fungal inhibition and OTA reduction were calculated in comparison to control samples. Moreover, grape juice, red wine, and beer were supplemented with 100 µg/L of OTA and inoculated with composites of 16 yeasts (16YM) and 29 bacterial (29BM) strains (10^7 cfu/mL) to estimate the kinetics of OTA reduction at 25°C for 5 days. None of bacterial composites inhibited *A. carbonarius* growth. Conversely, all yeasts composites showed higher OTA reduction (up to 65%) compared to bacteria (2-25%), at all studied assays. More specifically, the high inoculum of yeasts composites (10^5 cfu/mL) showed more efficient fungal inhibition and OTA reduction compared to cell density of 10^2 cfu/mL. The maximum OTA reduction was obtained at pH 3.0 by almost all yeasts composites. Decrease in OTA was higher by yeasts (16YM) compared to bacteria (29BM) also in all studied beverages. The highest OTA reduction was observed in grape juice (ca 32%) followed by wine (ca 22%), and beer (ca 12%). The present findings may assist in the control of *A. carbonarius* growth and OTA production in fermented foodstuffs by the use of proper strains of technological importance.

Keywords: inhibition, reduce, yeasts, ochratoxin A (OTA), *A. carbonarius*, grape juice.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο



ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.1 Γενικά

Ο όρος μυκοτοξίνη προέρχεται από την ελληνική λέξη «μύκης (myces)» που σημαίνει μύκητας και την λατινική λέξη «toxicum» που σημαίνει τοξικός. Οι μυκοτοξίνες αποτελούν δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού διαφόρων ειδών μυκήτων που ανήκουν κυρίως στα γένη *Aspergillus*, *Fusarium* και *Penicillium* (ICMSF, 1996). Οι μύκητες των συγκεκριμένων γενών είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και έχουν απομονωθεί από αποσυντιθέμενη βλάστηση, από το έδαφος και από διάφορα τρόφιμα (Wegst and Lingens, 1983). Από τα 200.000 είδη μυκήτων που είναι γνωστά σήμερα, περίπου 100 είδη παράγουν τοξίνες, επικίνδυνες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Έχει καταγραφεί ότι μία τοξίνη μπορεί να παράγεται από περισσότερα του ενός είδους μυκήτων, όπως η αφλατοξίνη, η ωχρατοξίνη Α, ενώ ένας μύκητας μπορεί να παράγει περισσότερες της μίας μυκοτοξίνης (Ιωάννου, 2005).

Η ανάπτυξη των μυκήτων και η παραγωγή τοξινών κατά το μεταβολισμό τους είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ μύκητα, ξενιστή (π.χ. φυτικό υπόστρωμα) και περιβάλλοντος. Ο κατάλληλος συνδυασμός αυτών των τριών παραγόντων καθορίζει το βαθμό προσβολής του φυτού/φυτικού προϊόντος αλλά και το είδος και την ποσότητα της παραχθείσας τοξίνης. Σημειώνεται ότι η παρουσία ενός μύκητα σε ένα φυτό/φυτικό προϊόν δεν προϋποθέτει τη παρουσία τοξίνης, καθώς η ανάπτυξη του μύκητα και παραγωγή τοξινών ευνοούνται κάτω από διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος και συγκεκριμένες απαιτήσεις σε θερμοκρασία και ενεργότητα νερού (a_w) ξεχωριστά για κάθε μύκητα (Marín et al., 2001, 2004). Επιπρόσθετα, σε ένα προϊόν που μακροσκοπικά δεν είναι εμφανής η προσβολή από μύκητες, ή όταν αυτό καταστραφεί (π.χ. χρήση υψηλών θερμοκρασιών), δεν συνεπάγεται ότι είναι απαλλαγμένο και από μυκοτοξίνες.

Οι μύκητες παράγουν τοξίνες σε συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξής τους (μετά το τέλος εκθετικής φάσης) κάτω από συνθήκες στρες, (απότομες αλλαγές στη θερμοκρασία, υγρασία, αερισμό) καθώς και για να αμυνθούν έναντι άλλων μικροοργανισμών κατά τη διεκδίκηση τροφής.

Οι κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁) (Petchkongkaew et al., 2008), οι φουμονισίνες, η ζεαραλενόνη (ZON), η πατουλίνη, οι τριχοθεσίνες, και η ωχρατοξίνη A (Kabak et al., 2006), οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των επιβλαβών και χρόνιων τους επιδράσεων στην υγεία ανθρώπων των ζώων (καρκίνο, οξεία ηπατοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα).

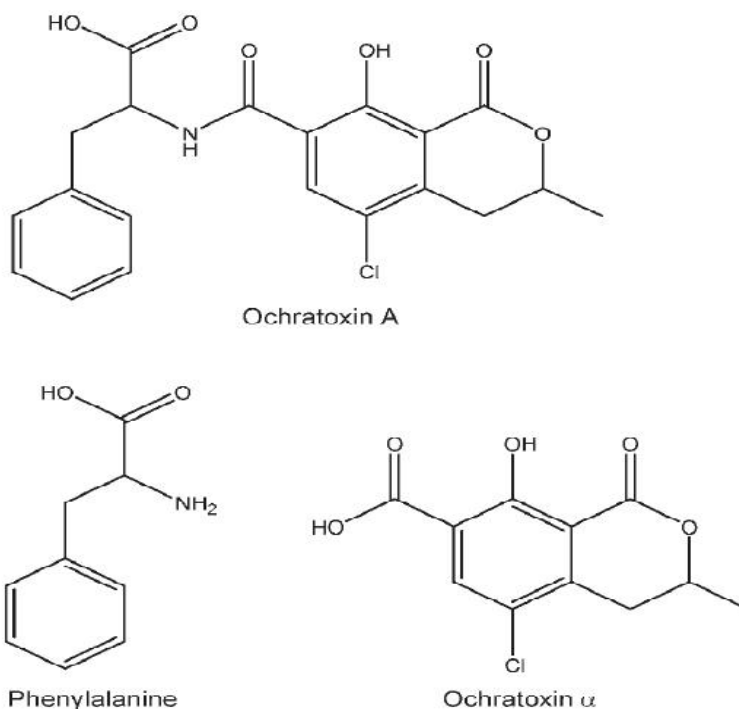


Εικόνα 1.1: Ανίχνευση αφλατοξίνης σε καλαμπόκι (αριστερά) (Robertson, 2005) και πατουλίνης σε μήλο (δεξιά).

1.2 Ωχρατοξίνη A

1.2.1 Γενικά

Οι μυκοτοξίνες όπως αναφέρθηκε είναι τοξικοί μεταβολίτες οι οποίες παράγονται από νηματοειδής μύκητες και έχουν ανιχνευθεί σε ποικίλα αγροτικά προϊόντα. Η ωχρατοξίνη A (ΩΤΑ) είναι μία μυκοτοξίνη η οποία έχει ανιχνευθεί στα σιτηρά, στα σταφύλια, στον καφέ, στο κακάο, στη μπύρα, στα καρύδια και στα μπαχαρικά (Frisvad, 1995) καθώς επίσης και σε κάποια προϊόντα ζωικής προέλευσης λόγω της κατανάλωσης μολυσμένων ζωοτροφών (Aish et al., 2004).



Εικόνα 1.2.1: Χημική δομή ωχρατοξίνης Α, φαινυλαλανίνης και ωχρατοξίνης α (Magan & Olsen, 2004).

Η ΩΤΑ (Εικόνα 1.2.1) είναι μία χλωριωμένη ισοκουμαρινική ένωση με μοριακό τύπο $C_{21}H_{18}ClNO_6$ και μοριακό βάρος ίσο με 403,82 g/mol (Esser & Lemke, 1996). Συχνά περιγράφεται σαν μια ένωση φαινυλαλανίνης–κουμαρίνης (EMAN, 2005) λόγω της χημικής ομοιότητας της με τη φαινυλαλανίνη (Εικόνα 1.2.1). Ο κύριος μηχανισμός δράσης της είναι η αναστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών (Aish et al., 2004), συνεπώς όλα τα κυτταρικά συστήματα που επηρεάζονται από τη φαινυλαλανίνη ή την χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα αποτελούν πιθανό στόχο της ΩΤΑ (Griffin, 1992, Prescott, 1999). Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της είναι ο μεγάλος χρόνος ημιζωής που παρουσιάζει στον άνθρωπο.

Η ΩΤΑ παράγεται από μύκητες των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*, οι οποίοι επιμολύνουν γεωργικά προϊόντα σε ολόκληρο τον κόσμο, είτε πριν από τη συγκομιδή τους είτε κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους (Moss, 1996, Galtier, 1999). Συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η παραγωγή ΩΤΑ από στελέχη των μυκήτων *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. albertensis*, *A. auricomus* και *A. wentii*. (Varga et al., 1996).

Η ΩΤΑ προκαλεί σοβαρές παρενέργειες στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων λόγω των υψηλών τοξικών ιδιοτήτων της (Marquardt and Frohlich,

1992, Petzinger and Ziegler, 2000). Σε αρκετές χώρες έχει ανιχνευθεί στο ανθρώπινο αίμα ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων (Petkova-Bocharova et al., 1988). Συγκεκριμένα μετά την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων η μυκοτοξίνη δεσμεύεται στη ορολευκωματίνη (Il'ichev et al., 2002). Επιπλέον έχει ανιχνευθεί και στο μητρικό γάλα και στον ορό του βρέφους (Creppy, 1999, Hassan et al., 2006). Στα ζώα είναι ιδιαίτερα τοξική κυρίως λόγω της νεφροτοξικής της δράσης, ενώ θεωρείται μία από τις πιο καρκινογόνες ενώσεις στα ποντίκια και τους αρουραίους (Aish et al., 2004) όπου και μεταβολίζεται σε ωχρατοξίνη α (Εικόνα 1.2.1) (Suzuki et al., 1977, Galtier, 1978).

Επίσης η ΩΤΑ έχει αναφερθεί ότι έχει νεφροτοξική, νευροτοξική μεταλλαξογόνο, τερατογόνο και καρκινογόνο δράση (Creppy et al., 1985, Obrecht-Pflumio et al., 1999, Marquardt & Frohlich, 1992, JECFA, 2001, Lock and Hard, 2004, Galvano et al., 2005, Varga and Kozakiewicz, 2006) ενώ το 1993 to International Agency for Research on Cancer την ενέταξε ως πιθανό καρκινογόνο (group 2B). Επιπλέον η ΩΤΑ έχει συνδεθεί με την ανθρώπινη ασθένεια Βαλκανική Ενδημική Νεφροπάθεια, η οποία αποτελεί μια θανατηφόρα χρόνια νεφρική ασθένεια (Marquardt & Frohlich, 1992, Creppy, 1999).

1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό της ΩΤΑ

Η ΩΤΑ όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένας φυσικός δευτερογενής μεταβολίτης ο οποίος παράγεται από πολλούς μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Penicillium*. Η ΩΤΑ στα σιτηρά κυρίως παράγεται από το *P. verrucosum* ενώ στα φρούτα, στο καφέ και στο κακάο από το *A. carbonarius*. Οι κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, της συγκομιδής και της αποθήκευσης των ευαίσθητων στην ΩΤΑ αγροτικών προϊόντων είναι η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε υγρασία και ο χρόνος που το προϊόν παραμένει κάτω από δυσμενείς συνθήκες (Belli et al., 2004, Mitchell et al., 2004, Belli et al., 2005). Άλλοι παράγοντες που ευνοούν την παρουσία των σπορίων είναι οι μηχανικοί παράγοντες (το εσωτερικό μέρος του λαχανικού είναι πιο ευάλωτο στην δράση των μυκήτων

συγκριτικά με το εξωτερικό μέρος), τα έντομα (με το μεταβολισμό τους αυξάνουν την υγρασία του υποστρώματος και τη θερμοκρασία και έτσι διασπούν το προστατευτικό εξωτερικό μέρος του φυτού), οι τραυματισμοί που προκαλεί η βροχή και η καταιγίδα, η διαθεσιμότητα των μεταλλικών συστατικών, το pH (γενικά η μούχλα είναι



ανθεκτική σε όξινα μέσα και συχνά είναι ικανή να καθιστά το pH του υποστρώματος όξινο), τα επίπεδα του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, χημικοί και φυσικοί χειρισμοί και σε ορισμένα αγροτικά προϊόντα η επανύγρανση και η αποξηράνση του προϊόντος (Abrams et al., 1987, Atalla et al., 2003, Chelack et al., 1991, Eskola, 2002, Gimeno, 2000, Magan, et al., 2003). Πράγματι η γνώση όλων των παραγόντων που εμπλέκονται στη παραγωγή της ΩΤΑ και η αλληλεπίδραση τους, επιτρέπει πιο ασφαλή πρόβλεψη και καλύτερη μέθοδο πρόληψης, γι'αυτό και πολλές μελέτες πραγματοποιούνται προς αυτήν την κατεύθυνση (Astoreca et al., 2007, Suarez-Quiroz et al., 2004).

Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η παρουσία των μυκήτων δεν υπονοεί την παραγωγή ΩΤΑ, εφόσον (παρά την ικανότητα παραγωγής των μυκήτων) υπάρχουν συγκεκριμένες βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, οξυγόνου, χρόνου και διαθεσιμότητας θρεπτικών. Επιπλέον, είναι πιθανή η ανίχνευση της ΩΤΑ χωρίς την παρουσία ανάπτυξης μυκήτων, εφόσον συγκεκριμένες χημικές διεργασίες ή περιβαλλοντικές αλλαγές μπορούν να αδρανοποιήσουν τα σπόρια των μυκήτων αλλά χωρίς να μεταβάλλουν την τοξίνη η οποία παραμένει στο υπόστρωμα (Gimeno, 2000).

1.2.3 Ανίχνευση ΩΤΑ σε σταφύλια και κρασί

Η ΩΤΑ έχει ανιχνευθεί σε πολλά τρόφιμα και ροφήματα (Jorgensen, 1998, Medina et al., 2005, Medina et al., 2006, Trucksess et al., 1999, Valente & Rodriguez-Amaya, 1985, JECFA, 2001, Birzelle et al., 2000, Fazekas et al., 2002), συμπεριλαμβανομένου του σταφυλοχυμού

(<3-311 ng l⁻¹) και του κρασιού (<3-388 ng l⁻¹) όπου για πρώτη φορά καταγράφηκε από τους Zimmerli και Dick (1995). Η ανίχνευση της ΩΤΑ στο κρασί έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές την τελευταία δεκαετία (Belli et al., 2002, Blesa et al., 2006, Varga and Kozakiewicz, 2006). Η τοξίνη έχει ανιχνευθεί σε πολλά είδη κρασιού τα οποία έχουν προέλθει από αμπέλια που έχουν καλλιεργηθεί σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές κάτω από διαφορετικές κλιματικές συνθήκες και γεωργικές πρακτικές (Πίνακας 1.2.2).

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες χώρες προκύπτει ότι η συγκέντρωση της ΩΤΑ στο κρασί ακολουθεί τη σχέση λευκό<ροζέ<κόκκινο<επιδόρπιο κρασί. Η συγκέντρωση της ΩΤΑ στα προϊόντα των σταφυλιών και του κρασιού συνήθως ποικίλει από 0,01-3,5μg/l και είναι υψηλότερη σε τρόφιμα που προέρχονται από τις νότιες περιοχές σε σχέση με τις βόρειες περιοχές της Ευρώπης (Battilani et al., 2003, Burdaspal & Legarda, 1999, Mateo et al., 2007, Ospital et al., 1998, Ottender & Majerus, 2000, Ratola et al., 2004). Η ανίχνευση της ΩΤΑ στο κρασί συνδέεται με την ύπαρξη μυκήτων στα σταφύλια. Κάποιοι ερευνητές αναφέρουν ότι ο *Aspergillus carbonarius* είναι ο πιο ωχρατοξινογόνος μύκητας στα σταφύλια (Abarca et al., 2001, Magnoli et al., 2004). Ο υψηλή συχνότητα εμφάνισης του *A. carbonarius* στις πιο θερμές και ξηρές περιοχές οφείλεται στην ανθεκτικότητα των «μαύρων *Aspergilli*» στη ζέστη και την υπεριώδη ακτινοβολία (Benford et al., 2001), ενώ στις πιο ψυχρές περιοχές οι μύκητες του γένους *Penicillium* αποτελούν την κύρια πηγή ΩΤΑ.

Πίνακας 1.2.3: Ανίχνευση ΩΤΑ σε φρουτοχυμούς, μούστο, κρασί και σε ξίδια (Magan & Olsen, 2004).

Juices, musts and fruit pulp	Maximum (mean) toxin level (ng/l)	References
Red grape juice, Switzerland	311	Zimmerli and Dick, 1996
Tomato juice, Germany	32	Majerus et al., 2000
Blackcurrant juice, Germany	60	Majerus et al., 2000
Red grape juice, Germany	5300	Majerus et al., 2000
White grape juice, Germany	1300	Majerus et al., 2000
Grapefruit juice, Morocco	1160	Filali et al., 2001
Pulp of frozen grapes, Brazil	35,4	Rosa et al., 2004
Red grape juices, Brazil	100	Rosa et al., 2004
Red juice, Canada and USA	104	Ng et al., 2004
White juice, Canada and USA	71	Ng et al., 2004
Grape juices and drinks, Poland	64,7	Czerwiecki et al., 2005

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Grape juices, Japan	-6	Kawamura, 2005
French musts	461	Sage et al., 2002
Spanish musts	813	Belli´ et al., 2004
Tunisian musts	4300	Fredj et al., 2007
Wines		
Red wine, Switzerland	388	Zimmerli and Dick, 1996
Rose wine, Switzerland	123	Zimmerli and Dick, 1996
White wine, Switzerland	178	Zimmerli and Dick, 1996
Red wine, Germany	7000	Majerus and Otteneder, 1996
Rose wine, Germany	2400	Majerus and Otteneder, 1996
Red wine, France	270	Ospital et al., 1998
Rose wine, France	110	Ospital et al., 1998
White wine, France	20	Ospital et al., 1998
Commercial red wine, Italy	7630	Visconti et al., 1999
Commercial rose wine, Italy	1150	Visconti et al., 1999
Commercial white wine, Italy	970	Visconti et al., 1999
European red wine	603	Burdaspal and Legarda, 1999
European rose wine	161	Burdaspal and Legarda, 1999
European white wine	267	Burdaspal and Legarda, 1999
Southern Italy red wine	3177	Pietri et al., 2001
Southern Italy dessert wine	3856	Pietri et al., 2001
Morocco red wine	3240	Filali et al., 2001
Morocco rose wine	540	Filali et al., 2001
Morocco white wine	180	Filali et al., 2001
Mediterranean red wine	3400	Markaki et al., 2001
Spanish red wine	316	Lopez de Cerain et al., 2002
Spanish white wine	208	Lopez de Cerain et al., 2002
Northern Greece red wine	2690	Stefanaki et al., 2003
Northern Greece rose wine	1160	Stefanaki et al., 2003
Northern Greece white wine	1720	Stefanaki et al., 2003
Dessert wines, Greece	2820	Stefanaki et al., 2003
South African red wine	380a	Shephard et al., 2003
South African white wine	300a	Shephard et al., 2003
Portuguese wine	2100	Ratola et al. 2004
Brazilian red wine	42,4	Rosa et al., 2004
Brazilian white wine	28,2	Rosa et al., 2004
Brazilian rose wine	35,4	Rosa et al., 2004
Argentina red wine	42,4	Rosa et al., 2004
Argentina white wine	NDb	Rosa et al., 2004
Chile red wine	70,7	Rosa et al., 2004
Canadian red wine	393	Ng et al., 2004
Canadian white wine	156	Ng et al., 2004
Red wine, Japan	-4	(4) Kawamura, 2005
Red wine from Italy	-47	(47) Kawamura, 2005
Red wine from France	-77	(77) Kawamura, 2005
Red wines, Poland	6710	6710 Czerwiecki et al., 2005
Vinegars		
Wine vinegar	1900	1900 Majerus et al., 2000
Balsamic vinegar	252	252 Markaki et al., 2001

^a: εμφιαλωμένα μπουκάλια ^b: μη ανιχνεύσιμη (<21ng/l).

Σύμφωνα με το κώδικα τροφίμων (Codex Alimentarius), το 15% της συνολικής ποσότητας ΩΤΑ βρίσκεται στο κρασί, το οποίο αποτελεί τη δεύτερη κύρια πηγή ΩΤΑ μετά τα σιτηρά (Πίνακας 1.2) (Codex Alimentarius Commission, 1998, JECFA, 2001). Το σταφύλι περιέχει περισσότερη ΩΤΑ σε σχέση με το κρασί, καθιστώντας τον κίνδυνο πρόσληψης της τοξίνης από τα παιδιά μεγαλύτερο (Zimmerly & Dick, 1996).

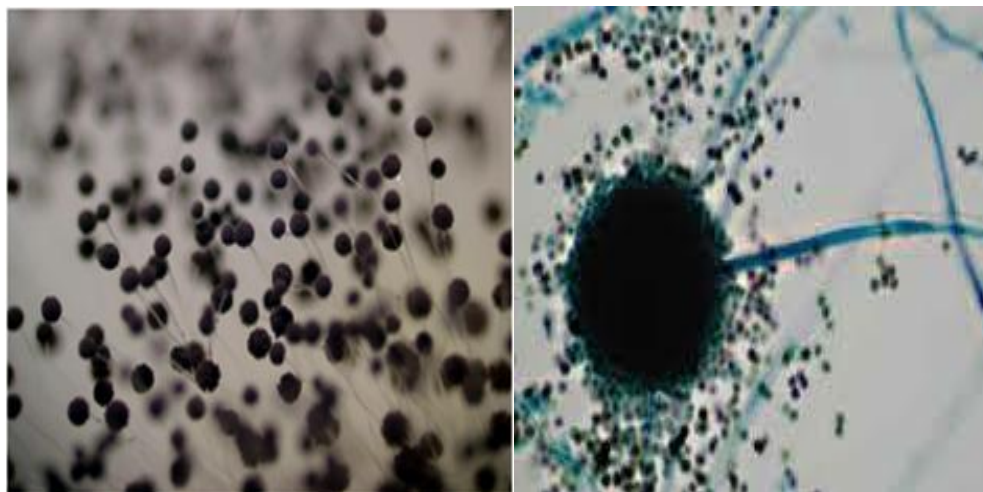
Πίνακας 1.2.3.1: Η συνεισφορά των διαφόρων κατηγοριών τροφίμων στη πρόσληψη της ΩΤΑ από τον άνθρωπο (JECFA, 2001).

Food category	Contamination (µg/kg)	Intake		
		(g)	µg /person per week	ng/kg bw per week
Cereals	0.94	230	1.5	25
Wine	0.32	240	0.54	8.9
Grape juice	0.39	69	0.19	3.1
Roasted coffee	0.76	24	0.13	2.1
Pork	0.17	76	0.09	1.5
Beer	0.023	260	0.04	0.69
Dried foods	2.2	2.3	0.03	0.58
Pulses	0.19	25	0.03	0.55
Cocoa	0.55	6.3	0.02	0.40
Poultry	0.041	53	0.02	0.25
Tea	0.3	2.3	0.00	0.08

Λαμβάνοντας υπόψιν τις παραπάνω πληροφορίες συμπεραίνεται ότι, η μίανση των σταφυλιών και του κρασιού με ΩΤΑ αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα. Οι διαφορετικές παρατηρήσεις που προκύπτουν, όσον αφορά την ανίχνευση και τη συγκέντρωση της ΩΤΑ σε μια περιοχή κατά τη διάρκεια του έτους (διαφορετικές εποχές), οφείλονται σε πολλούς παράγοντες (το μέγεθος του πληθυσμού του μύκητα, τις κλιματικές συνθήκες, τη γεωργική διαχείριση) οι οποίοι επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα και την παραγωγή τοξίνης.

1.3 Ο ωχρατοξινογόνος μύκητας *Apergillus carbonarius*

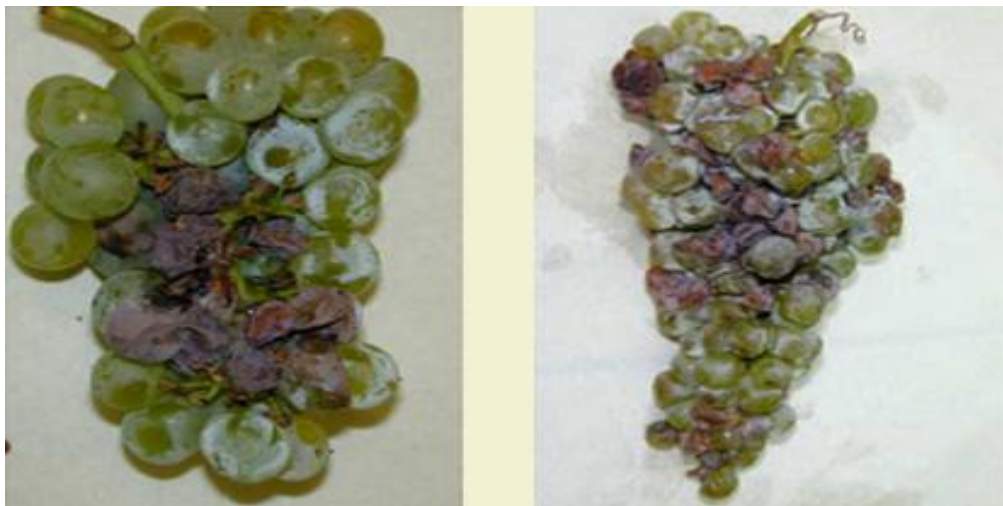
Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει εστιάσει σήμερα στη συσσώρευση της ΩΤΑ στα σταφύλια, στο κρασί και στους χυμούς καθώς και στους μύκητες που την παράγουν. Γενικά έχει σημειωθεί ότι στις εύκρατες περιοχές η ΩΤΑ παράγεται από το *P.verrucosum* ενώ στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές από στελέχη του γένους *Aspergillus* (Abarca et al., 1994, Varga et al., 1996). Μέχρι το 1996 επικρατούσε ότι, η παραγωγή ΩΤΑ στα σταφύλια οφείλονταν μόνο στην ανάπτυξη του *A.ochraceus* από όλα τα είδη του γένους *Aspergillus*, παρόλο που είχε καταγραφεί η ικανότητα παραγωγής της τοξίνης από το *A.niger var. niger* (Abarca et al., 1994). Στη συνέχεια οι σποριογόνοι μύκητες *A.carbonarius* και *A.niger* αναγνωρίστηκαν ως κύρια πηγή παραγωγής της εν λόγω τοξίνης εξαιτίας των σημαντικών ποσοτήτων ΩΤΑ που ανιχνεύθηκαν σε σταφυλοχυμό και κρασί από τους Zimmerly και Dick (1996). Γενικά ο *A.carbonarius* ομοιάζει σε πολλά χαρακτηριστικά με τον *A.niger* με κύρια μορφολογική διαφορά την παραγωγή μεγαλύτερων σπορίων (Klich and Pitt, 1988).



Εικόνα 1.3: Κονιδιοφόροι *A.carbonarius* (αριστερά) και κονιδιοφόρος *A.niger* (δεξιά).

Η παραγωγή ΩΤΑ από μύκητες και συγκεκριμένα από «μαύρους *Aspergillus*» έχει επισημανθεί και καταγραφεί από τους Battilani and Pietri (2004). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε σταφύλια της νότιας Γαλλίας, οι Sage et al., (2002) έδειξαν ότι ο *A.carbonarius* ήταν το μόνο είδος που παρήγαγε ΩΤΑ παρόλο που μόνο τα 6 από τα 11 δείγματα σταφυλιών μολύνθηκαν με ωχρατοξινογόνα στελέχη. Τα επίπεδα ΩΤΑ που ανιχνεύθηκαν

ήταν μεταξύ 0.5 και 87.5 µg/g. Από τους υψηλούς πληθυσμούς των *Aspergilli* που καταγράφηκαν από τους Sage et al., (2004) σε 60 δείγματα σταφυλιών, μόνο τα στελέχη *A.carbonarius* ήταν ωχρατοξινογόνα με παραγόμενες συγκεντρώσεις πάνω από 1.9 µg/g.



Εικόνα 1.3.1: Προσβολή σταφυλιών από τον ωχρατοξινογόνο μύκητα *A.carbonarius*.

Ο *A.carbonarius* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και να παράγει τοξίνη σε ένα μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (Esteban et al., 2005). Από όλα τα είδη του γένους *Aspergillus* που απομονώθηκαν από 10 αμπέλια της Γαλλίας σε διαφορετικές κλιματικές συνθήκες, οι «μαύροι *Aspergilli*» ήταν οι πιο πολλοί συχνοί παθογόνοι (99%) (Bejaoui et al., 2006) ενώ από τα 3 είδη που απομονώθηκαν (*A.carbonarius*, *A.Japonicus* και *A.niger*) μόνο ο *A. carbonarius* παρήγαγε ΩΤΑ (πάνω από 37.5 µg/g). Η επίδραση των διαφορετικών pH στην παραγωγή ΩΤΑ είναι πολύ σημαντική καθώς η σάρκα των σταφυλιών και ο σταφυλοχυμός είναι πολύ όξινα (pH<4.5). Η ανάπτυξη του μύκητα είναι καλύτερη σε pH 4 και 7 απ'ότι σε pH 2.6, ανεξαρτήτως του επιπέδου της a_w . Αν και έχει βρεθεί ότι οι υψηλότερες τιμές ΩΤΑ παράγονται σε pH 7 απ'ότι σε 4.5, ωστόσο το ουδέτερο pH δεν είναι μια κατάσταση που συναντάται στο κρασί, στο σταφυλοχυμό και στα σταφύλια. Η υψηλή παραγωγή ΩΤΑ σε pH 2.8 και pH 7 ίσως οφείλεται στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων και τη παραγωγή της τοξίνης σε τέτοια pH απ'ότι σε pH 4.5 (Mitchell, 2006).

Οι άριστες συνθήκες παραγωγής ΩΤΑ από τον *A.carbonarius* αναφέρονται γύρω στους 15–20°C και σε ενεργότητα ύδατος 0.95-0.98

(Mitchell et al., 2004, Belli et al., 2004, Esteban et al., 2006, Leong et al., 2006d). Η παραγωγή τοξίνης από τον *A.carbonarius* έχει ανιχνευθεί κυρίως σε a_w 0.97 (Leong et al., 2006d, Valero et al., 2006a). Σε μελέτες που έγιναν σε Ισπανικά σταφύλια, από τους «μαύρους» *Aspergilli* που υπήρχαν σε αυτά, όλα (Bau et al., 2005) ή τα περισσότερα (Belli et al., 2006b) στελέχη *A.carbonarius* ήταν ικανά να παράγουν ΩΤΑ και συγκεκριμένα στα τελευταία στάδια ανάπτυξης, ενώ από τα στελέχη *A.niger* και *A.japonicus var. aculeatus* κανένα δεν παρήγαγε τοξίνη. Το ίδιο αποτέλεσμα διαπιστώθηκε και σε σταφύλια της Αυστραλίας (Leong et al., 2006, 2007).

Επίσης οι Pollastro et al. (2006) σε μια μελέτη που πραγματοποίησαν στη νότια Ιταλία, έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης των «μαύρων *Aspergilli*» στα σταφύλια μειώνεται σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά: *A.niger*>*A.carbonarius*>*A.aculeatu*>*A.wentii*. Από τους συγκεκριμένους μύκητες μόνο ο *A.carbonarius* παρήγαγε ΩΤΑ.

1.4 Μέθοδοι ανίχνευσης μυκοτοξινών

1.4.1 Γενικά

Όπως αναφέρθηκε οι μυκοτοξίνες είναι πολύ σημαντικοί μεταβολίτες των μυκήτων και αποτελούν έναν πιθανό κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου και των ζώων. Ο όρος μυκοτοξίνη (mycotoxin) καλύπτει ένα ευρύ φάσμα συστατικών με διαφορετικές χημικές δομές και επιπλέον διάφορες τοξικές επιδράσεις. Ο κίνδυνος στον οποίο εκτίθεται ο άνθρωπος από τις μυκοτοξίνες επαναξιολογείται συνεχώς και για ορισμένες μυκοτοξίνες έχουν θεσπιστεί μέγιστα εφαρμόσιμα όρια. Για αυτόν τον λόγο, είναι αναγκαία η ύπαρξη αναλυτικών μεθόδων για την εξασφάλιση της ύπαρξης μυκοτοξινών στα τρόφιμα πάνω από τα επιτρεπόμενα όρια.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής (Ιωάννου, 2005):

A. Χημικές μέθοδοι:

- ✓ Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, “HPLC”)
- ✓ Αέριος- υγρή χρωματογραφία (Gas Liquid Chromatography, “GLC”)

- ✓ Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, "TLC")
- ✓ Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, "MS")

Β. Ανοσολογικές μέθοδοι:

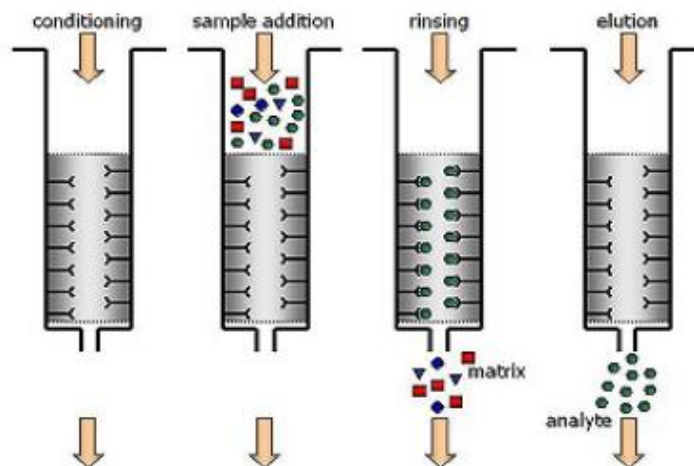
- ✓ Χρωματογραφία στήλης ανοσοσυγγένειας- φθορισμομετρία (ImmunoAffinity Column Chromatography, "IACC"- Fluorometry)
- ✓ ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Γ. Συνδυασμός ανοσολογικών και χημικών μεθόδων:

- ✓ IACC- HPLC
- ✓ IACC- GLC
- ✓ IACC- TLC

1.4.2 Στήλες ανοσοσυγγένειας

Η χρήση των στηλών ανοσοσυγγένειας (Immunoaffinity Columns) έγινε ιδιαίτερα δημοφιλής τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της υψηλής τους εκλεκτικότητας. Είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό των δειγμάτων, τα οποία είναι μiasmμένα με κάποια μυκοτοξίνη. Γενικά χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό και τη συμπύκνωση των τοξινών από πολύπλοκα δείγματα τροφίμων, πριν την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους με κλασικές αναλυτικές τεχνικές όπως GC, HPLC και TLC.



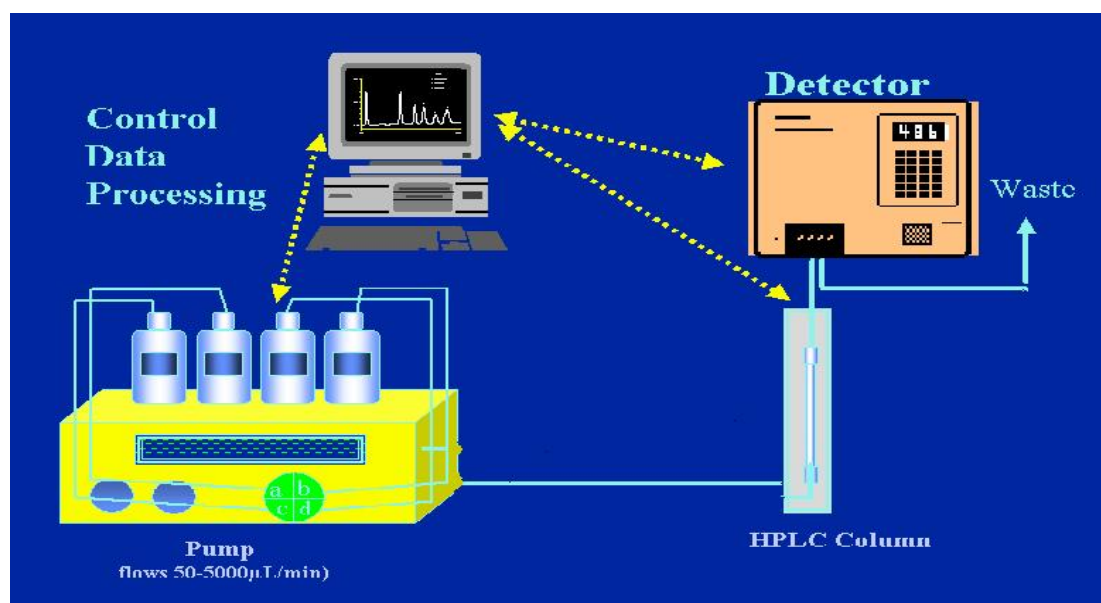
Εικόνα 1.4.2: Βασική αρχή λειτουργίας των στηλών ανοσοσυγγένειας (European Mycotoxin Awareness Network, 2007)

Η μήτρα της στήλης ανοσοσυγγένειας περιλαμβάνει μια στερεή φάση, στην οποία υπάρχουν δεσμευμένα αντισώματα. Αφού πρώτα προηγηθεί ένα “conditioning” της στήλης, στη συνέχεια εφαρμόζεται το δείγμα στη στήλη και η περιεχόμενη σε αυτό τοξίνη δεσμεύεται από το αντίστοιχο ακινητοποιημένο αντίσωμα. Από τη στιγμή που τα συστατικά της μήτρας δεν αλληλεπιδρούν με τα αντισώματα, αρκεί ένα στάδιο έκπλυσης για την απομάκρυνσή τους. Οι συγκεκριμένες στήλες είναι εμπορικά διαθέσιμες, έχουν υψηλό κόστος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο μια φορά. Βρίσκουν εφαρμογή στην ωχρατοξίνη A, στη ζεαραλενόνη, στις φουμονισίνες και στη DON. (European Mycotoxin Awareness Network, 2007)

1.4.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

1.4.3.1 Εισαγωγή- βασικές αρχές

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης, η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιούνται αντλίες υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια μικρής διαμέτρου με μεγάλη αντίσταση και υψηλή διαχωριστική απόδοση. (Χατζηγιάννου, 1998)



Εικόνα 1.4.3.1: Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης.

1.4.3.2 Οργανολογία

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα: α) δοχείο κινητής φάσης-διαλύτης, β) αντλία, γ) σύστημα εισαγωγής δείγματος, δ) στήλη, ε) ανιχνευτής και στ) καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής-εκτυπωτής.

Το δοχείο ή τα δοχεία κινητής φάσης ή φάσεων είναι συνήθως γυάλινης κατασκευής και χωρητικότητας τουλάχιστον 500ml. Στο σωλήνα τροφοδοσίας προσαρμόζεται ειδικό φίλτρο (2μm) που παρεμποδίζει τη μεταφορά σωματιδίων που μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα στην αντλία. Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και να έχει απαερωθεί (degassed).

Η αντλία είναι η καρδιά ενός συστήματος HPLC. Βασική απαίτηση είναι η σταθερότητα της ταχύτητας ροής (παροχής) της κινητής φάσης. Η αντλία είναι υψηλής πίεσης (14-16.000psi) και συνδυάζεται με σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλουση, στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution) η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.

Η έγχυση του δείγματος γίνεται με σύριγγα. Ο θάλαμος έγχυσης του δείγματος είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1-500μl. Η βαλβίδα στη θέση "πλήρωσης" συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση "εισαγωγής" εισάγει το δείγμα στη στήλη. Η ποιότητα της βαλβίδας κρίνεται κατ' αρχήν από την ακρίβεια εισαγωγής του δείγματος. Σημαντικό ρόλο παίζει η κεφαλή, γιατί από το σχήμα της εξαρτάται η κατανομή ταχυτήτων της κινητής φάσης, μέσα στη στήλη. Φυσικά σημασία έχει και η ποιότητα των υλικών κατασκευής, τα οποία θα πρέπει να είναι από αδρανή ως προς την χρησιμοποιούμενη κινητή φάση υλικά. Επίσης, υπάρχουν βαλβίδες εισαγωγής που η λειτουργία τους ελέγχεται αυτόματα από την κεντρική μονάδα ελέγχου του συστήματος HPLC, αν και πολλοί χρήστες προτιμούν για διάφορους λόγους χειροκίνητο χειρισμό.

Το υλικό κατασκευής της στήλης είναι συνήθως ανοξειδωτος χάλυβας. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης (2-3mm) για να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά τη λειτουργία του

συστήματος. Το μήκος της στήλης κυμαίνεται από 10-100cm. Συνήθως κατασκευάζονται στήλες μήκους 25-30cm. Η αποτελεσματικότητα μιας στήλης κρίνεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Από μια πρώτη άποψη είναι φανερό ότι μια μακριά στήλη ή μια σειρά στηλών θα έχει οπωσδήποτε μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών. Όμως ταυτόχρονα η διάρκεια του διαχωρισμού θα είναι μεγαλύτερη. Αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών μπορεί να επιτευχθεί με μείωση της διαμέτρου των κόκκων του πληρωτικού υλικού. Συνήθως οι κόκκοι είναι διαμέτρου 5-10 μ m, ενώ υπάρχουν και κόκκοι 3 μ m, οι οποίοι βέβαια δίνουν ένα σημαντικά μειωμένο Υ.Ι.Θ.Π. (ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα), επιτρέπουν τη χρήση στηλών μικρού μήκους και άρα ταχύτατους διαχωρισμούς. Το μέγεθος των κόκκων δεν πρέπει να είναι μόνο μικρό αλλά και ομοιόμορφο, το δε σχήμα σφαιρικό. Σε υψηλής ποιότητας στήλες η απόκλιση από τη διάμετρο των κόκκων είναι μικρότερη του $\pm 2\%$, το σχήμα σχεδόν απόλυτα σφαιρικό και η κατανομή των πόρων ομοιόμορφη. Βασικά στοιχεία καθορισμού του αριθμού των θεωρητικών πλακών είναι η σταθερότητα παροχής της αντλίας καθώς και η ελάχιστη παροχή. Μικρή παροχή συνεπάγεται πτώση της πίεσης.

Επίσης σημαντικός παράγοντας είναι η εσωτερική διάμετρος της στήλης. Σε μια λεπτή στήλη, η ταχύτητα της κινητής φάσης είναι περίπου ίση στο κέντρο της στήλης και στα τοιχώματα της, πράγμα που δε συμβαίνει σε μια "φαρδιά" στήλη. Συνεπώς μια λεπτή στήλη απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος και φυσικά διαλύτη, επιτρέποντας την εξοικονόμηση διαλύτη έως και 80%. Το υλικό πλήρωσης της στήλης, ως προς τη φύση του μπορεί να είναι: α) πορώδες, με βάση την πυριτική γη (silica), β) μη πορώδες (pellicular) και γ) σκληρή πηκτή, με βάση το πολυστυρόλιο. Τα υλικά αυτά αντέχουν σε πιέσεις μέχρι 5.000 psi.

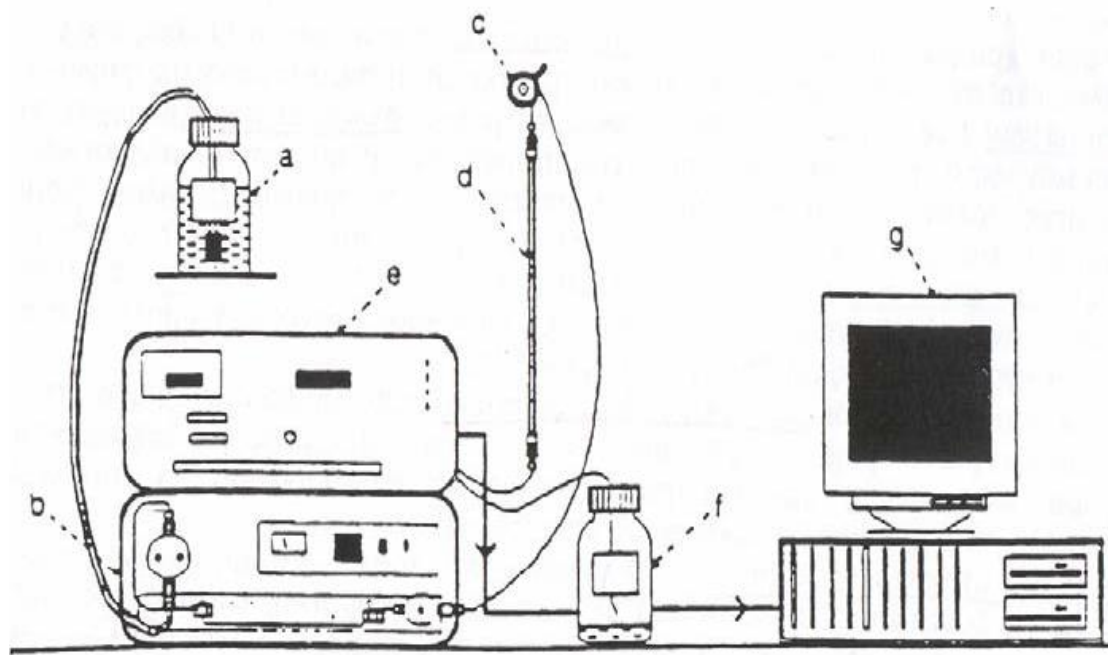
Η στατική φάση μπορεί να επικαλυφθεί στο αδρανές υλικό: α) φυσικά, κατόπιν διάλυσης της στατικής φάσης στον κατάλληλο διαλύτη, προσθήκης του αδρανούς υλικού, ανάμειξης και απομάκρυνσης του διαλύτη με εξάτμιση υπό κενό ή β) χημικά, οπότε προκύπτει η λεγόμενη δεσμευμένη στατική φάση, όπου συνήθως χρησιμοποιούνται υποστρώματα με βάση την πυριτική γη επί της οποίας με χημική αντίδραση προστίθεται η επιθυμητή ομάδα.

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνεται σε: α) κανονικής φάσης (normal phase), όπου η υγρή

στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών (υδατικών) ουσιών οι οποίες εκλύονται τελευταίες από τη στήλη και β) ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

Ανάλογα με τη φύση των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν, ως ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί φωτόμετρο, διαφορικό διαθλασίμετρο, ηλεκτοχημικός (αμπερομετρικός) ανιχνευτής και φθορισμόμετρο.

Ο καταγραφέας αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο παρουσιάσεως του χρωματογραφήματος. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC, αντί καταγραφέα είναι εφοδιασμένα με ηλεκτρονικό υπολογιστή και εκτυπωτή. (Λιοδάκης 1986, Πολυσίου, 1989, Χατζηγιάννου, 1998, Ταραντίλης και Πολυσίου, 2001)



Εικόνα 1.4.3.2: Τα βασικά τμήματα χρωματογράφου HPLC: a) δοχείο κινητής φάσης-διαλύτης, b) αντλία, c) σύστημα εισαγωγής δείγματος, d) στήλη, e) ανιχνευτής, f) δοχείο αποβλήτων κινητής φάσης, g) ηλεκτρονικός υπολογιστής. (Ταραντίλης, 2001)

1.4.3.3 Επίτευξη επιθυμητού διαχωρισμού

Τα περισσότερα μείγματα ουσιών μπορούν να διαχωριστούν και να αναλυθούν με την HPLC, αρκεί να επιλεγεί το κατάλληλο σύστημα στατικής και κινητής φάσης ή πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.

Ένας επιτυχής διαχωρισμός στηρίζεται στην ισορροπία κατανομής του δείγματος μεταξύ κινητής (διαλύτη) και στατικής φάσης. Για να είναι επιτυχής ο διαχωρισμός θα πρέπει το δείγμα να μοιάζει χημικά (π.χ. πολικότητα) με τη στατική φάση και όχι με τον διαλύτη.

Στην χρωματογραφία κανονικής φάσης, η πολικότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται κυμαίνεται από χαμηλή μέχρι μέτρια. Με την τεχνική αυτή το χαμηλής πολικότητας συστατικό θα εκλουστεί πρώτο και με αύξηση της πολικότητας του διαλύτη για δεδομένη στατική φάση προκύπτει ελάττωση του χρόνου κατακράτησης των συστατικών.

Αντίστροφα, με την τεχνική της ανεστραμμένης φάσης, η πολικότητα των διαλυτών κυμαίνεται από μέτρια μέχρι υψηλή. Το υψηλής πολικότητας συστατικό θα εκλουστεί πρώτο και με αύξηση της πολικότητας του διαλύτη για δεδομένη στατική φάση προκύπτει αύξηση του χρόνου κατακράτησης των συστατικών.

Στην HPLC ανάλυση για την επίτευξη επιθυμητού διαχωρισμού χρησιμοποιείται η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης. Δηλαδή κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, κατόπιν προγραμματισμού του οργάνου, μεταβάλλεται η σύσταση και συνεπώς η πολικότητα του διαλύτη, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του αναλυόμενου δείγματος. (Πολυσιού, 1989, Χατζηγιωάννου, 1998, Ταραντίλης, 2001)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο



ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ

2.1 Στρατηγικές πριν τη συγκομιδή

2.1.1 Γενικές στρατηγικές

Καθώς οι αποικίες των μυκήτων αναπτύσσονται σε διάφορα μέρη των φυτών, οι καλλιέργειες θα πρέπει να προστατεύονται ενάντια στις βλαβερές μηχανικές διεργασίες και στην δράση των εντόμων. Για να αποφεύγεται η μόλυνση των φυτικών προϊόντων, πηγές μόλυνσης όπως ζιζάνια, γεωργικά υπολείμματα ή βρώμικα γεωργικά υλικά θα πρέπει να απομακρύνονται και να καταστρέφονται (Codex Alimentarius Commission, 2003, FAO/WHO/UNEP, 1999a).

Η χρήση χημικών ενώσεων είναι μία πολύ ελκυστική στρατηγική για την πρόληψη παραγωγής των μυκοτοξινών (FAO/WHO/UNEP, 1999b). Συγκεκριμένα στη περίπτωση των σταφυλιών, κάποια μυκητοκτόνα όπως το Switch έχουν βρεθεί αποτελεσματικά στη παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων και την παραγωγή ΩΤΑ (Varga & kozakiewicz, 2006). Θα πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη ότι τα μυκητοκτόνα θα πρέπει να επιλέγονται με προσοχή, επειδή κάποια όπως π.χ το carbendazim ενώ μείωναν την ανάπτυξη του μύκητα, βρέθηκαν να συνεισφέρουν στη παραγωγή ΩΤΑ (Medina et al., 2007a).

Οι Bleve et al., (2006) μελέτησαν in vitro τη δυνατότητα βιολογικής αντιμετώπισης των μυκήτων *A.carbonarius* και *A.niger* με την εφαρμογή επιφυτικών ζυμών. Στη περίπτωση των προϊόντων που μιάινονται ή μολύνονται από τον *A.carbonarius*, η χημική ένωση ναταμυκίνη εμφανίζεται να αποτελεί μία αποτελεσματική ουσία για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μυκήτων και την παραγωγή της ΩΤΑ (Medina et al., 2007b).

2.1.2 Δημητριακά, σταφύλια και άλλα τρόφιμα σε θερμές περιοχές

Οι καλλιέργειες στις θερμές περιοχές επηρεάζονται από περιόδους διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών. Για αποφυγή μόλυνσης από μύκητες και παραγωγή ΩΤΑ, η υγρασία του φυτού και η καταπόνηση (stress) της ξηρασίας θα πρέπει να μειώνονται. Κάποιοι κατάλληλες στρατηγικές είναι η κατάλληλη άρδευση, η ισορροπημένη ανόργανη θρέψη και λίπανση.

Άλλοι κανόνες ορθής γεωργικής πρακτικής είναι η αμειψισπορά καθώς και η καλλιέργεια και η συγκομιδή σε κατάλληλες συνθήκες και εποχές (ελεύθερος χώρος για κάθε φυτό για μέγιστη ανάπτυξη, αποφυγή ακραίων περιόδων ξηρασίας) και το βαθύ όργωμα (Aldred and Magan, 2004, Codex Alimentarius Commission, 2003).

Σήμερα καινούριες και ελπιδοφόρες στρατηγικές πριν τη συγκομιδή εξερευνώνται με τη χρήση της βιοτεχνολογικής έρευνας (FAO/WHO/UNEP, 1999b) στις οποίες περιλαμβάνονται η παραγωγή φυτών που συντελούν στη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης μυκητιακής προσβολής, ο περιορισμός της ανάπτυξης τοξινογόνων μυκήτων και πρόληψη της παραγωγής τοξίνης.

Ο βιοέλεγχος, με τη χρήση μη τοξινογόνων βιοανταγωνιστικών παραγόντων, όπως τα μη τοξινογόνα στελέχη *A.niger* (Valero et al., 2007a), αποτελεί μια δυναμική ασφαλή στρατηγική. Όμως η πιθανότητα χρήσης τοξινογόνων στελεχών προκαλεί ανησυχία σε οικολογικό και υγιεινομικό επίπεδο (FAO/WHO/UNEP, 1999c).

2.2 Στρατηγικές κατά τη διάρκεια της συγκομιδής

Αρχικά η σωστή εμφάνιση και καθαριότητα του γεωργικού εξοπλισμού συνίσταται προκειμένου να αποφευχθούν όλα τα εμπόδια τα οποία μπορούν να καθυστερήσουν το χρόνο συγκομιδής (Codex Alimentarius Commission, 2003).

Η συγκομιδή θα πρέπει να γίνεται όταν το περιεχόμενο της υγρασίας του φυτού είναι βέλτιστο, εξασφαλίζοντας τις ελάχιστες μηχανικές ζημιές στο προϊόν (Codex Alimentarius Commission, 2003).

Όσο το δυνατόν αργότερα, μόνο τα ώριμα προϊόντα θα πρέπει να συλλέγονται χωρίς μόλυνση. Τα υπερώριμα, τα ζυμούμενα, τα αλλοιωμένα ή αυτά που έχουν πέσει στο έδαφος θα πρέπει να απορρίπτονται και να καταστρέφονται έξω από το χωράφι, τα οποία είναι πιθανόν να περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ΩΤΑ ή μύκητες που παράγουν ΩΤΑ (Belli et al., 2007a, Bucheli & Taniwaki, 2002, Paulino de Moraes & Luchese, 2003, Perez de Obanos et al., 2005). Επίσης δεν ενδείκνυται η ανάμιξη με κακής ποιότητας προϊόντα ή άλλα αγροτικά προϊόντα (Lopez-Garcia et al., 2008).

2.3 Στρατηγικές μετά τη συγκομιδή

Η πρόληψη είναι η καλύτερη μέθοδος για έλεγχο της μίανσης των τροφίμων με μυκοτοξίνη πριν τη συγκομιδή. Όμως η μίανση που γίνεται ή παραμένει κατά τη φάση αυτή και οι κίνδυνοι που συσχετίζονται με τις τοξίνες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται μετά τη συγκομιδή.

Μετά τη συγκομιδή, η αποθήκευση και η επεξεργασία είναι οι κύριες διεργασίες όπου η μίανση μπορεί να προληφθεί και στη δεύτερη περίπτωση η μείωση της ΩΤΑ μπορεί να επιτευχθεί με φυσικό διαχωρισμό ή χημική αδρανοποίηση μέσα από συγκεκριμένες διαδικασίες (FAO/WHO/UNEP, 1999c).

2.3.1 Αποθήκευση και μεταφορά

Η αποθήκευση είναι μία από τη πιο κρίσιμες φάσεις μετά τη συγκομιδή όσον αφορά το χειρισμό του προϊόντος. Ακατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, μη σωστή συσκευασία ή αλλοιωμένα προϊόντα μπορεί να προκαλέσουν μίανση του προϊόντος με μυκοτοξίνη κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης (FAO/WHO/UNEP, 1999c).

Η αποθήκευση θα πρέπει να γίνεται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας (FAO/WHO/UNEP, 1999a, Quillien, 2002). Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης είναι σημαντική η αποφυγή αύξησης της υγρασίας του προϊόντος (FAO/WHO/UNEP, 1999c, Lopez-Garcia et al., 2008). Είναι σημαντικό να αποθηκεύονται τα προϊόντα τα οποία είναι πλήρως

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ

αποξηραμένα και να διατηρούνται σε μια $a_w < 0.70$ και σε θερμοκρασίες κάτω από 20°C (Bucheli & Taniwaki, 2002, Magan et al., 2003), ή στη περίπτωση των μη συσκευασμένων τροφίμων σε θερμοκρασίες κάτω από 2-3°C (Codex Alimentarius Commission, 2003). Επιπλέον συνίσταται η χρήση μεταλλικών κιβωτίων από ξύλινων (Bankole & Adebajo, 2003).

Πριν την επόμενη συγκομιδή, οι αποθήκες θα πρέπει να καθαρίζονται με σκοπό την αποφυγή μελλοντικής αλλοίωσης του προϊόντος (Bankole & Adebajo, 2003, Scudamore et al., 1999).

Όλες οι παραπάνω συνθήκες θα πρέπει να ελέγχονται κατά τη διάρκεια της μεταφοράς σε εισαγόμενες χώρες καθώς και στα φυτά που μεταφέρονται (FAO/WHO/UNEP, 1999b). Κανονικά η διακίνηση σε εισαγόμενες χώρες γίνεται με πλοίο, όπου η περιεκτικότητα σε υγρασία είναι πολύ υψηλή και η παρουσία εντόμων και τρωκτικών είναι πολύ συχνή. Γι'αυτό είναι σημαντική η ελαχιστοποίηση του χρόνου μεταφοράς και η αποφυγή έκθεσης για πολύ ώρα στον ήλιο των προϊόντων που βρίσκονται σε κιβώτια (FAO, 2006). Οι χώροι αποθήκευσης του πλοίου θα πρέπει να διατηρούνται καθαροί και απολυμασμένοι ενώ θα πρέπει να υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (Codex Alimentarius Commission, 2003). Τέλος τα κιβώτια θα πρέπει να βρίσκονται μακριά από τοίχους και τα σακιά να τοποθετούνται σε παλέτες πάνω από το πάτωμα, για να αποφεύγεται η επανύγρανση του προϊόντος (FAO, 2006).

Οι χειρισμοί μετά τη συγκομιδή του κρασιού με μυκητοκτόνα όπως Azoxystrobin, Switch ή Scala έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα ενάντια στην ΩΤΑ (Varga & Kozakiewicz, 2006). Στη περίπτωση του ψωμιού, τα συντηρητικά όπως το σορβικό κάλιο και το προπιονικό ασβέστιο είναι ικανά στην πρόληψη μόλυνσης με ΩΤΑ (Arroyo et al., 2005, Marin et al., 2002). Μια καινούρια στρατηγική είναι η χρήση βανιλικού οξέος ή 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (Palumbo et al., 2007) καθώς και ελαίων εκχυλισμένων από φυτά όπως το θυμάρι (Aroyeun & Adegoke, 2007, Nguefack et al., 2007) τα οποία μπορεί να επιδράσουν στην ανάπτυξη των μυκήτων και τη παραγωγή ΩΤΑ.



2.3.2 Επεξεργασία

Μετά τις φάσεις της συγκομιδής ένα προϊόν υφίσταται πολλές αλλαγές κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Σε αυτό το στάδιο οι μυκοτοξίνες θα πρέπει να εξαλείφονται ή να αναστέλλεται ο σχηματισμός τους (FAO/WHO/UNEP, 1999c).

Στις βιομηχανίες συνίσταται η εγκαθίδρυση ενός συστήματος αξιολόγησης των προμηθευτών, με σκοπό την προμήθεια των πρώτων υλών στις βέλτιστες συνθήκες, όχι μόνο των προϊόντων που μεταφέρονται αλλά και όλων των σχετικών παραπροϊόντων (Aldred & Magan, 2004, FAO/WHO/UNEP, 1999c).

Στα αρχικά στάδια της μεταφοράς είναι απαραίτητος ο καθαρισμός και η συλλογή των αλλοιωμένων προϊόντων και σε μετέπειτα στάδια η θερμική και χημική αδρανοποίηση. Επιπλέον το περιεχόμενο της υγρασίας, ο αερισμός και η καθαριότητα θα



πρέπει να ελέγχονται συνεχώς και σωστά σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας του προϊόντος (EMAN, 2003, EMAN, 2004, FAO/WHO/UNEP, 1999c).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο



ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ

3.1 Γενικά

Οι στρατηγικές μείωσης της ΩΤΑ ταξινομούνται με βάση το είδος του χειρισμού (φυσικός, χημικός ή μικροβιολογικός) και ο κύριος σκοπός είναι η μείωση ή εξάλειψη των τοξικών αποτελεσμάτων της ΩΤΑ, μέσω της καταστροφής, της μετατροπής ή της απορρόφησης της μυκοτοξίνης (FAO/WHO/UNEP, 1999α). Η ιδανική μέθοδος μείωσης της ΩΤΑ θα πρέπει να είναι εύκολη στη χρήση της και οικονομική και δεν θα πρέπει να παράγει τοξικές ενώσεις ή να μεταβάλλει τα χαρακτηριστικά του τροφίμου, όπως τα θρεπτικά συστατικά (EMAN, 2004). Συνεπώς, αρχικά εξετάζεται η δυνατότητα μείωσης της τοξίνης στα διάφορα στάδια επεξεργασίας (Park, et al., 1999) και στη περίπτωση που αυτό δεν καταστεί δυνατό, εφαρμόζονται άλλοι επιπρόσθετοι χειρισμοί (φυσικοί, χημικοί ή μικροβιολογικοί).

3.2 Επεξεργασία του προϊόντος

3.2.1 Σιτηρά και παράγωγα

Κατά τη διάρκεια παρασκευής άσπρου ψωμιού, ο καθαρισμός των κόκκων και η απομάκρυνση των πίτουρων και των άλλων παραπροϊόντων έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση πάνω από 25% της συγκέντρωσης της ΩΤΑ (Scudamore et al., 2003). Αντίθετα οι θερμικοί χειρισμοί που γίνονται κατά την διάρκεια προσθήκης αλευριού και παραγωγής ψωμιού δεν φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα ΩΤΑ (Osborne, 1979, Scott, 1996, Scudamore et al., 2003). Παρ'όλα αυτά το ψήσιμο μειώνει τη συγκέντρωση της ΩΤΑ λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται και της ελάχιστης περιεκτικότητας σε υγρασία (Osborne, 1979).

Στη παραγωγή μπύρας, ουσιαστική μείωση της ΩΤΑ (40-89%) παρατηρείται κατά τη διάρκεια πολτοποίησης των κόκκων, πιθανόν λόγω της πρωτεολυτικής αποδόμησης (Baxter et al., 2001, Krogh et al., 1974). Επιπλέον μείωση (16%) μπορεί να επιτευχθεί κατά τη διάρκεια αποφλοίωσης

των κόκκων (Baxter et al., 2001). Στη ζύμωση η μείωση της ΩΤΑ κυμαίνεται μεταξύ 2-69% (Krogh et al., 1974, Scott et al., 1995).

3.2.2 Προϊόντα σταφυλιών

Κατά τη διάρκεια παραγωγής κρασιού, η συγκέντρωση της ΩΤΑ αυξάνεται μέχρις ότου η μηλογαλακτική ζύμωση προηγείται της εμφιαλώσεως. Σε αυτό το στάδιο, τα επίπεδα της μυκοτοξίνης μειώνονται, πιθανόν λόγω της προσρόφησης της στην επιφάνεια των ζυμών του γένους *Saccharomyces* και στην αλληλεπίδρασή της με τους μεταβολίτες που παράγονται από τις ζύμες, ή στη ικανότητα αποδόμησης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που βρίσκονται στο κρασί (Bejaoui et al., 2004, Cecchini et al., 2006, Fernandes et al., 2007, ICV, 2002). Το *Oenococcus oeni* (Εικόνα 3.2.2) (παλιά *Leuconostoc oenos*) (Kunkee, 1967, Wibowo et al., 1985) είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο το οποίο θεωρείται υπεύθυνο για τη μηλογαλακτική ζύμωση στο κρασί, συντελεί στη βελτίωση της ποιότητας του και επιπλέον στη μείωση της ΩΤΑ (Maicas et al., 2002, Mateo et al., 2009). Είναι ένα από τα πιο ανθεκτικά στελέχη στις δυσμενείς συνθήκες του κρασιού (χαμηλό pH, αιθανόλη, κ.α). Επίσης διεργασίες όπως το πλύσιμο των σταφυλιών, το μαγείρεμα και το πατίκωμα μπορεί να συντελέσουν στη μείωση της συγκέντρωσης της ωχρατοξίνης (Delage et al., 2003, Ratola et al., 2005).



Εικόνα 3.2.2: Το οξυγαλακτικό βακτήριο *Oenococcus oeni*.

Κατά τη διάρκεια παραγωγής σταφυλοχυμού, απαιτείται πολύ καλή ξήρανση και αναποδογύρισμα επειδή σε αυτά τα στάδια τα επίπεδα των σακχάρων και της υγρασίας συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus* και στη παραγωγή ωχρατοξίνης (Magan & Aldred, 2005).

3.3 Φυσικές μέθοδοι

Με σκοπό να μειωθεί η συγκέντρωση μιας τοξίνης σε ένα προϊόν δεν επιτρέπεται η ανάμιξή της και η αραίωση της με προϊόντα που δεν περιέχουν τοξίνη. Γι'αυτό και στην Ευρωπαϊκή ένωση απαγορεύεται η αραίωση με μη μολυσμένα τρόφιμα (Directive, 2002/32/EC).

Με σκοπό την αποφυγή μίανσης με ΩΤΑ, μελετήθηκε η δυνατότητα απομάκρυνσης των εξωτερικών μερών των τροφίμων τα οποία έρχονται σε επαφή με τους μύκητες (Alldrick, 1996). Όμως στη περίπτωση των σιτηρών και των σταφυλιών αυτή η εφαρμογή αποδείχθηκε πολύπλοκη και απορρίφθηκε.

Επίσης μελετήθηκε και η δυνατότητα εξάλειψης όλων εκείνων των προϊόντων στα οποία έχουν αναπτυχθεί μύκητες κατά την βιομηχανική διεργασία. Όμως η απουσία των μυκήτων δεν υπονοεί ότι η μυκοτοξίνη και η μίανση δεν μπορούν να ελεγχθούν πλήρως (FAO/WHO/UNEP, 1999c, Heilman et al., 1999).

Ενώ οι θερμικοί χειρισμοί δεν εξαλείφουν πλήρως την ΩΤΑ (Boundra, & Le Bars, 1995), χειρισμοί όπως κατάψυξη στους -20°C, απόψυξη στους 26°C, και χρησιμοποίηση UV και η γ ακτινοβολίας μπορούν να συντελέσουν στη μείωση της παραγωγής κονιδίων. Παρόλα αυτά όμως μόνο η χρήση γ ακτινοβολίας μπορεί να εξαλείψει τη μυκοτοξίνη (Aziz et al., 2004, Deberghes et al., 1993, Deberghes et al., 1995).

3.4 Χημικές μέθοδοι

3.4.1 Χημικές ενώσεις προσρόφησης

Για την μείωση της ωχρατοξίνης με χημικές ενώσεις, πολλά προσροφητικά υλικά έχουν εξεταστεί όπως το ενεργό κάρβουνο, οι ζεολίτες, ο μπετονίτης, και τρίμματα ξύλου (Bauer, 1994, Leong et al., 2006, Peteri et al., 2007, Plank et al., 1990, Ringot et al., 2007, Savino et al., 2007, Varga & Kazakiewicz, 2006). Ορισμένα από τα παραπάνω έχουν μελετηθεί και σε πειραματόζωα, όμως η μείωση της τοξίνης δεν ήταν τόσο υψηλή όσο αναμενόταν, εκτός από το ενεργό κάρβουνο (Huwing et al., 2001, Scott, 1996). Σε αυτή τη περίπτωση η χρήση τους απορρίφθηκε λόγω της απορρόφησης των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και της δηλητηρίασης των ζώων (Gambutti et al., 2005, Huwing et al., 2001).

Στο κρασί, το καζεινούχο κάλιο και το ενεργό κάρβουνο υποβαθμίζουν την ποιότητα του κρασιού, παρόλο που έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά τη μείωση της ΩΤΑ (>82%) (Abrunhosa et al., 2002, Castellari et al., 2001).

Μια καινούρια αδιάλυτη φυτική ίνα έχει χρησιμοποιηθεί με σκοπό την προσρόφηση της ΩΤΑ που βρίσκεται σε υγρά τρόφιμα και συγκεκριμένα στη μύρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Tangni et al., 2005).

Επί του παρόντος, τα πιο ελπιδοφόρα προσροφητικά υλικά είναι οι τροποποιημένοι ζεολίτες, οι οποίοι επιτυγχάνουν καλή απολύμανση των τροφίμων (Dakovic et al., 2003, Dakovic et al., 2005, Schall et al., 2002, Tomasevic et al., 2003).

3.4.2 Αποδόμηση της ΩΤΑ ή εκχύλιση της με χημικούς παράγοντες

Στα σιτηρά η συγκέντρωση της ωχρατοξίνης μπορεί να μειωθεί με τη εμβάπτιση των κόκκων σε διάλυμα αιθανόλης και την περιοδική εφαρμογή υπερήχων (Linder, 1992). Οι χειρισμοί με ενώσεις όπως το αλκαλικό υπεροξείδιο υδρογόνου, το υδροξείδιο νατρίου και το αμμώνιο με υδροξείδιο

ασβεστίου αποτελούν αξιόπιστες μεθόδους μείωσης της ΩΤΑ. Ωστόσο η εφαρμογή τους σε πειραματόζωα (*in vivo*) δεν είναι δυνατή λόγω των υψηλών επιπέδων ΩΤΑ που ανιχνεύονται στους ιστούς των ζώων (Scott, 1996).

Στα σταφύλια και στο κρασί έχει αποδειχθεί ότι κάποια μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα συντελούν στη μείωση της ΩΤΑ (>90%) (Belli et al., 2007b, Reddy, & Muralidharan, 2007, Valero et al., 2007b, Varga & Kozakiewicz, 2006).

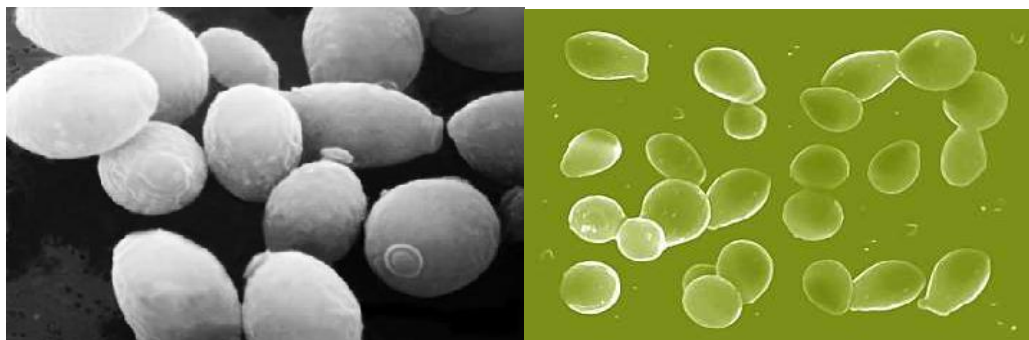
3.5 Μικροβιολογικές μέθοδοι

3.5.1 Γενικά

Η καρβοξυπεπτιδάση Α είναι ένα ένζυμο το οποίο είναι ικανό να μειώσει την ΩΤΑ (Deberghes et al., 1995) και γι'αυτό το λόγο έχει μελετηθεί η χρήση μη τοξινογόνων στελεχών *A.niger* σαν πηγές καρβοξυπεπτιδάσης (Varga, et al., 2000). Άλλα ένζυμα τα οποία μπορούν να απομονωθούν από στελέχη *A.niger* και μπορούν αποτελεσματικά να αποδομήσουν την ΩΤΑ είναι οι λιπάσες (Stander et al., 2000), ένα ακατέργαστο ένζυμο (Abrunhosa et al., 2006) και ένα μεταλλοένζυμο (Abrunhosa & Venancio, 2007). Η ύπαρξη της καρβοξυπεπτιδάσης στη ζύμη *Phaffia rhodozyma* μπορεί να συντελέσει στην μείωση της ΩΤΑ πάνω από 95% (Peteri et al., 2007).

Επιπλέον συγκεκριμένα στελέχη βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Butyribrio*, *Phenylobacterium* (*P. immobile*), *Pleurotus*, *Saccharomyces*, *Bacillus* και *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*) (Fucks et al., 2008, Varga et al., 2005, Varga et al., 2000, Hwang & Draughon, 1994, Piotrowska & Zakowska, 2005) και συγκεκριμένοι μύκητες που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *A. ochraceus*), *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Phaffia*, *Penicillium* και *Rhizopus* (*R. Stolonifer* και *R. oryzae*) (Abrunhosa et al., 2002, Peteri et al., 2007, Varga et al., 2005) επιδεικνύουν μείωση της ΩΤΑ *in vitro* σε ποσοστό πάνω από 95%. Επίσης, κάποιοι από τους παραπάνω μικροοργανισμούς μπορούν να μειώσουν την ΩΤΑ και σε *in vivo* πειράματα (Fuchs et al., 2008). Επιπλέον οι ζύμες

Saccharomyces cerevisiae (Εικόνα 3.5.1) έχουν την ικανότητα να συντελούν στη μείωση της ΩΤΑ (Bejaoui et al., 2004).



Εικόνα 3.5.1: Ζύμες του είδους *Saccharomyces cerevisiae*.

Στη βιομηχανία η μικροβιολογική διεργασία η οποία μειώνει τη συγκέντρωση της ΩΤΑ χρησιμοποιείται στη τελική ζύμωση της μπίρας (Chu et al., 1975, Krogh et al., 1974) και στη μηλογαλακτική ζύμωση παραγωγής κρασιού (ICV, 2002).

3.5.2 Μείωση της ΩΤΑ από βακτήρια

Οι μικροοργανισμοί και ιδιαίτερα τα βακτήρια έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους είτε να αποδομούν τις τοξίνες είτε να μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητά τους (El-Nezami et al., 1998, Fuchs et al., 2008, Haskard et al., 2001, Peltonen et al., 2001). Ανάμεσα στα βακτήρια, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι πιο σημαντικοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί για τις γαστρεντερίτιδες των ανθρώπων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων και αποτελούν επίσης, μέρος της εσωτερικής μικροχλωρίδας. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων (Ouwehand et al., 2002, Saxelin et al., 2005). Μια από τις επιδράσεις που έχει αναγνωρισθεί, είναι η προστασία ενάντια στις τοξίνες που περιέχονται σε πολλά τρόφιμα όπως είναι οι ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι μυκοτοξίνες και τα διάφορα είδη ενεργού οξυγόνου (Fuchs et al., 2008, Hosono & Hisamatsu, 1995, Knasmuller et al., 2001, Stidl et al., 2007a).

Διάφορες έρευνες υποδεικνύουν ότι στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων των γενών *Lactobacillus* και *Lactococcus* προκαλούν μείωση της ΩΤΑ σε υγρά υποστρώματα (Piotrowska and Zakowska, 2000, Piotrowska and Zakowska, 2005, Turbic et al., 2002, Skrinjar et al., 1996). Επίσης σε μια άλλη μελέτη διαπιστώθηκε, ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια του κρασιού έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τη ΩΤΑ (σε ποσοστό 8-28%) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους (Del Prete et al., 2007).

3.5.3 Μείωση της ΩΤΑ από ζύμες

Πολλές διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί για την απομάκρυνση των μυκοτοξινών, χρησιμοποιώντας ζύμες (Stanley et al., 1993, Bauer, 1994, Scott et al., 1995, Devegowda et al., 1996, 1998, Baptista et al., 2004, Bejaoui et al., 2004, Caridi et al., 2004b, 2005a,b, 2006a), κυτταρικά τοιχώματα ζυμών (Huwig et al., 2001, Santin et al., 2003, Yiannikouris et al., 2003, Ringot et al., 2005), ή εκχυλίσματα κυτταρικών τοιχωμάτων ζυμών (Devegowda et al., 1996, Zaghini et al., 1998, Howes and Newman, 2000, Raju and Devegowda, 2000, Baptista et al., 2004, Ringot et al., 2005). Οι μαννοπρωτεΐνες (Bauer, 1994) παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία μείωσης της ΩΤΑ, που οφείλεται στη δέσμευση της μυκοτοξίνης από ένα ολιγοσακχαρίτη (mannanoligosaccharide), που βρίσκεται στη κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης *S.cerevisiae* (Devegowda et al., 1996). Συγκεκριμένα η μείωση της ΩΤΑ βασίζεται σε ένα αυτόματο (Ringot et al., 2005) μηχανισμό απορρόφησης (Bejaoui et al., 2004) όπου οι μαννοπρωτεΐνες δρουν σαν ένα «σφουγγάρι».

Το περιεχόμενο της τοξίνης στα κρασιά μειώνεται πάρα πολύ από γηγενείς ζύμες. Σε έρευνες που έχει μελετηθεί η δυνατότητα μείωσης της ΩΤΑ κατά τη διάρκεια παρασκευής κρασιού, έχουν καταγραφεί αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα σε ζύμες του κρασιού του γένους *Saccharomyces* (Caridi et al., 2006b) και σε ζύμες άλλων γενών (Cecchini et al., 2006). Αυτό οφείλεται αφενός στο διαφορετικό περιεχόμενο σε «mannosylphosphate» των μαννοπρωτεϊνών των ζυμών του κρασιού αλλά και αφετέρου στη διαφορετική

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΩΤΑ

ζύμωση, κυτταρική καθίζηση, κυτταρική διάσπαση και στην κροκύδωση (Caridi, 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο



**ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ**

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

4.1 Γενικά

Με τον όρο βιολογικός έλεγχος (biocontrol) εννοούμε τη χρήση βιολογικών παραγόντων με σκοπό τον έλεγχο των ζιζανίων ή των παθογόνων των φυτών. Αυτή η προσέγγιση έχει θεωρηθεί από την επιστημονική κοινότητα σαν μία αξιόπιστη εναλλακτική μέθοδος αντί της χρησιμοποίησης φυτοφαρμάκων πριν και μετά την συγκομιδή πολλών αγροτικών προϊόντων. Η βιολογική αντιμετώπιση αφενός μεν είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μυκήτων στα σταφύλια, αφετέρου δε συντελεί στη μείωση των αγροχημικών υπολειμμάτων στα σταφύλια, στο κρασί και στα συναφή προϊόντα (Cabras et al., 1999, Cabras and Angioni, 2000).

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την βιολογική αντιμετώπιση μυκήτων των γενών *Aspergillus* και *Penicillium* στα αμπέλια εφαρμόζοντας μικτές καλλιέργειες μικροοργανισμών πριν και μετά τη συγκομιδή των σταφυλιών (Rivka & Nachman, 2008). Συγκεκριμένα ανάμεσα στους μικροοργανισμούς που έχουν καταγραφεί ως αποτελεσματικοί συμπεριλαμβάνονται οι εξής: *Trichoderma harzianum* (Εικόνα 4.1) (Elad, 1994), *Aureobasidium pullulans* (Lima et al., 1997), *Pythium periplocum* (Paul, 1999), *Metschnikowia fructicola* (Karabulut et al., 2003), πολλές ζύμες (Wilson et al., 1991, Zahavi et al., 2000) και ο *Bacillus subtilis* (Εικόνα 4.1) (Pusey, 1989). Ωστόσο όμως κανένας από τους παραπάνω μικροοργανισμούς δεν βρέθηκε μεμονωμένα να είναι αποτελεσματικός. Όμως σε πρόσφατα πειράματα, έχει βρεθεί ότι κάποια στελέχη *Aspergillus pullulans* έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα *A. carbonarius* (προκαλεί σήψη σε σταφύλια) ακόμα και κάτω από ευνοϊκές για την ανάπτυξη του μύκητα συνθήκες. Για τα συγκεκριμένα στελέχη βρέθηκε ότι σε θρεπτικά υποστρώματα (*in vitro*) δύναται να αποδομούν την ΩΤΑ και να τη μετατρέπουν σε μια λιγότερη τοξική ένωση την ωχρατοξίνη α. Επιπλέον σε προσβεβλημένα από μύκητες σταφύλια στα οποία έγινε εφαρμογή βιολογικών παραγόντων, ανιχνεύτηκε μικρότερη συγκέντρωση ΩΤΑ σε σχέση με τα σταφύλια στα οποία δεν εφαρμόσθηκε βιολογική αντιμετώπιση (De Felice et

al., 2007). Επίσης ανιχνεύτηκε και ωχρατοξίνη α, όμως δεν μπορούσε να εξακριβωθεί η προέλευση της.



Εικόνα 4.1: Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* (αριστερά) και το βακτήριο *Bacillus subtilis* (δεξιά).

Η βιολογική αντιμετώπιση με μικροοργανισμούς μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των μυκήτων χωρίς να μειώσει την μεταβολική ικανότητα της ενεργής υφής. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών για βασικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα θρεπτικά στοιχεία και ο ελεύθερος χώρος, έχει καθοριστική επίδραση στο δευτερογενή μεταβολισμό των μυκήτων. Συγκεκριμένα, πολλές μελέτες έχουν καταγράψει τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά μεταξύ ζυμών και μυκήτων (Chalutz et al., 1988, Bjornberg and Schnurer, 1993, Chand-Goyal and Spotts, 1996). Στη πραγματικότητα, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών επηρεάζει σημαντικά το δευτερογενή μεταβολισμό και κατ'επέκταση την παραγωγή της τοξίνης (Luchese and Harrigan, 1993). Οι «μαύροι *Aspergilli*» είναι χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι της μικροχλωρίδας στα σταφύλια και της υψηλής παραγωγής ωχρατοξίνης, η οποία απομονώνεται από το μαύρο τμήμα που υπάρχει (Cabanas et al., 2002, Battiliani et al., 2003). Συνήθως είναι αδύνατον να εξαλειφθεί πλήρως η παραγωγή της μυκοτοξίνης στα σταφύλια, κυρίως επειδή είναι υψηλή και οι μύκητες που την παράγουν αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της μικροχλωρίδας που υπάρχει στα σταφύλια, γι'αυτό και πολλές έρευνες στοχεύουν στην ανάπτυξη βιολογικών στρατηγικών αντιμετώπισης με σκοπό τη μείωση της παρουσίας ωχρατοξινογόνων μυκήτων σε πολλά προϊόντα (Bhatnagar et al., 2002, Gianluca et al., 2005).

4.2 Βιολογικός έλεγχος μυκοτοξινογόνων μυκήτων με τη εφαρμογή ζυμών

Οι ζύμες έχουν πολλά χαρακτηριστικά τα οποία τις καθιστούν επιθυμητούς βιολογικούς παράγοντες στα φρούτα και σε άλλα προϊόντα. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα τους αναφέρονται ότι έχουν απλές θρεπτικές απαιτήσεις, αναπτύσσονται σε ζυμωτήρες με φθηνά θρεπτικά μέσα και παράγουν ενώσεις μη τοξικές για τον άνθρωπο καθώς επίσης μπορούν και επιβιώνουν και σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών (Wilson and Wisniewsky, 1989). Σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, ανταγωνιστικές ζύμες υπέδειξαν την ικανότητα μείωσης της ανάπτυξης νηματοειδών αλλοιογόνων μυκήτων τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* μελέτες (McGuire, 1994, Petersson and Schnurer, 1995). Η ανταγωνιστική ζύμη *Pichia anomala*, έχει δείξει να μειώνει *in vitro* την ανάπτυξη του *Penicillium roquefortii* και του *Aspergillus candidus* (Petersson and Schnurer, 1995).

4.3 Βιολογικός έλεγχος μυκοτοξινογόνων μυκήτων με τη εφαρμογή βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω των υψηλών τους θρεπτικών απαιτήσεων, απαντώνται σε πλούσια σε θρεπτικά συστατικά τρόφιμα όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος και δημητριακά (Carr et al., 2002). Τα συγκεκριμένα οξυγαλακτικά ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus* (Πίνακας 4.2.3) και συνήθως χρησιμοποιούνται σαν βιολογικοί παράγοντες για την πρόληψη της αλλοίωσης και την επιμήκυνση της χρονικής διάρκειας των τροφίμων και των ζωοτροφών.

Σύμφωνα με τους Magnuson et al., (2003), η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλεται κυρίως σε τρεις μηχανισμούς: στον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά, στην παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων και στην αποτελεσματικότητα του οργανικού οξέος. Πολλά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως το *Lactococcus lactis subsp. lactis*, το *Lc. lactis subsp. cremoris*, το *Lc. lactis subsp. diacetylactis*, το

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Lactobacillus acidophilus, το *Lactobacillus plantarum* και το *Lactobacillus curvatu* μπορούν να παράγουν πεπτιδία ή αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, γνωστές και ως βακτηριοσίνες, οι οποίες επιδεικνύουν αντικροβιακή δράση κατά στελεχών, τα οποία σχετίζονται στενά σε σχέση με αυτά. Επιπλέον πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες εναντίον μυκοτοξινογόνων μυκήτων. Συγκεκριμένα τα οξυγαλακτικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactococcus* και *Lactobacillus* μπορούν να αναστείλουν περισσότερο την ανάπτυξη μυκοτοξινογόνων μυκήτων σε σχέση με αυτά που ανήκουν στα γένη *Leuconostoc* και *Pediococcus*.

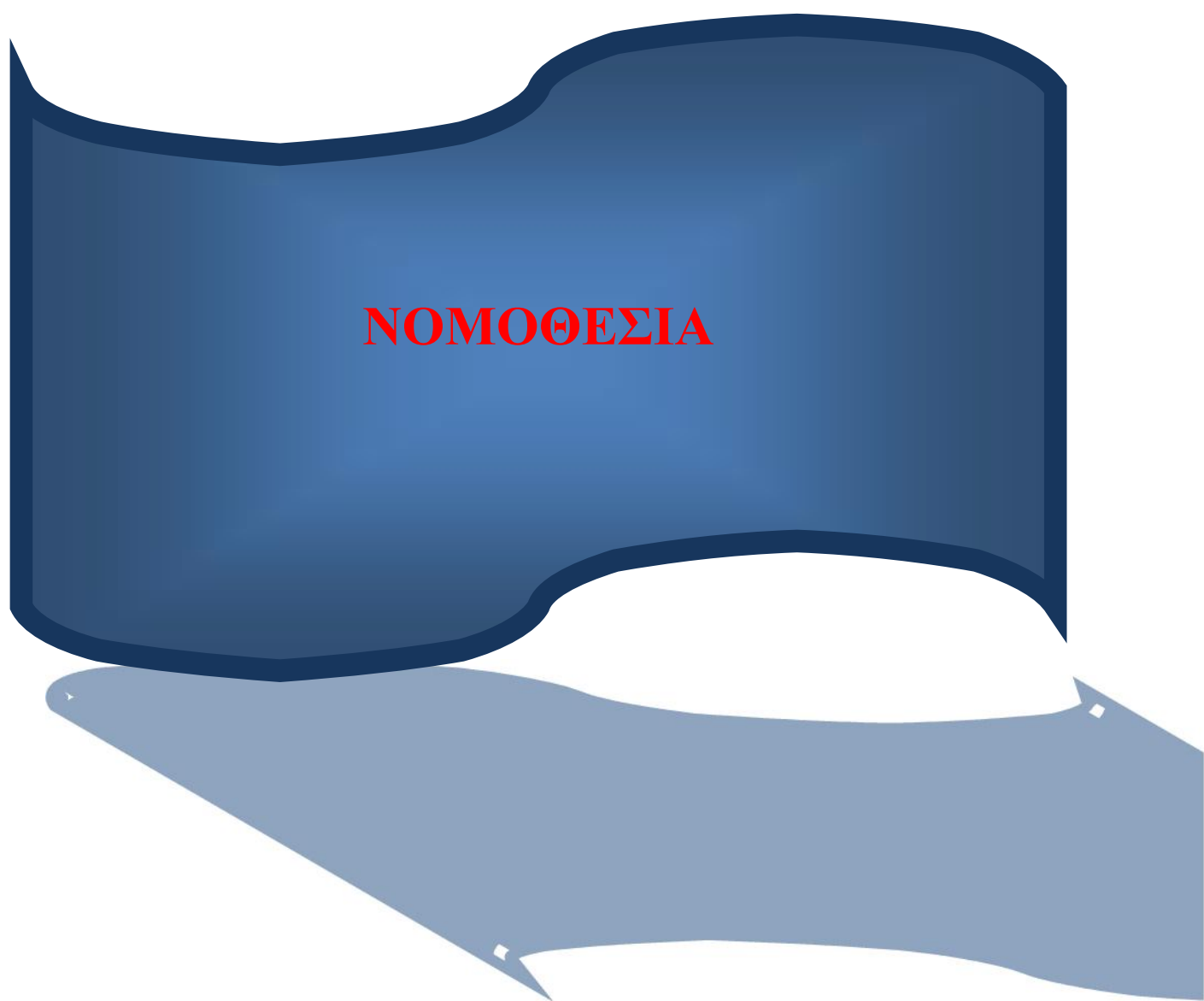
Πίνακας 4.2.3: Οξυγαλακτικά βακτήρια ικανά να αναστέλλουν την ανάπτυξη ωχρατοξινογόνων μυκήτων (Dalie et al., 2009).

LAB	Activity spectrum	References
Genus <i>Lactococcus</i>		
<i>Lc. lactis</i> C10	<i>A. parasiticus</i>	Wiseman and Marth (1981)
<i>Lc. lactis</i>	<i>A. flavus</i>	Coallier-Ascah and Idziak (1985)
<i>Lc. lactis</i>	<i>A. parasiticus</i>	Luchese and Harrigan (1990)
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> DRC1	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Batish et al. (1989)
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CHD 28.3	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Roy et al. (1996)
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz (2001)
Genus <i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. acidophilus</i> R	<i>A. fumigatus</i>	Batish et al. (1990)
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Suzuki et al. (1991)
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> LC. 705	<i>A. niger</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Mäyrä-Mäkinen et al. (1994)
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i>	<i>A. flavus</i>	Gourama and Bullerman (1995, 1997)
<i>Lb. casei</i>	<i>Penicillium</i>	Gourama (1997)
<i>Lb. casei</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz (2001)
<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> Si3	Broad spectrum	Magnusson and Schnürer (2001)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>P. expansum</i>	Florianowicz (2001)
<i>Lb. plantarum</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Suzuki et al. (1991)
<i>Lb. plantarum</i> VTT E-78076	<i>F. avenaceum</i>	Niku-Paavola et al. (1999)
<i>Lb. plantarum</i>	<i>P. corylophilum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>F. graminearum</i>	Lavermicocca et al. (2000)
<i>Lb. plantarum</i> MiLAB 393	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i>	Ström et al. (2002, 2005)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

<i>Lb. Plantarum</i> MiLAB 14	<i>P. roqueforti</i> , <i>P. commune</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. fumigatus</i>	Sjögren et al. (2003)
<i>Lb. plantarum</i>	<i>A. flavus</i> , <i>F. graminearum</i>	Sathe et al. (2007)
<i>Lb. reuteri</i> 1100	<i>F. graminearum</i>	Gerez et al. (2009)
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.	Stiles et al. (2002)
<i>Lb. sanfranciscensis</i> CB1	<i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> , spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Corsetti et al. (1998)
Genus <i>Leuconostoc</i>		
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	Suzuki et al. (1991)
Genus <i>Pediococcus</i>		
<i>Pc. acidilactici</i> LAB 5	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. oxyporum</i> , <i>Penicillium</i> spp.	Mandal et al. (2007)
<i>Pc. pentosaceus</i>	<i>P. expansum</i>	Rouse et al. (2008)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο



ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

5.1 Νομοθεσία μυκοτοξινών και ειδικότερα ωχρατοξίνης A

Η παρουσία υψηλής τοξικότητας πολλών μυκοτοξινών σε συνδυασμό με την σημερινή ανάγκη για υγιεινά, ποιοτικά και κυρίως ασφαλή τρόφιμα έχει οδηγήσει τις εποπτικές αρχές που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων τόσο στον εγχώριο Ελλαδικό όσο και στον διεθνή χώρο στον καθορισμό ανώτατων επιτρεπτών ορίων.

Οι μυκοτοξίνες ήταν για τα τελευταία χρόνια, οι κύριοι επιμολυντές στο Σύστημα Ταχείας Προειδοποίησης για Ανασφαλή Τρόφιμα και Ζωοτροφές (RASFF) που είναι ακρωνύμιο του Rapid Alert System for Food and Feed φθάνοντας τα 993 περιστατικά. Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούσαν τις αφλατοξίνες και δευτερευόντως την ωχρατοξίνη A. Σαν ένας από τους σημαντικότερους αναδυόμενους διατροφικούς κινδύνους, η παρουσία μυκοτοξινών είναι σημαντικό να ελέγχεται σε όλα τα στάδια (από το χωράφι μέχρι την τελική κατανάλωση). (FAO, 2004).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση θέσπισε σειρά νομοθετημάτων για την λύση του προβλήματος.

1. Κανονισμός 466/ 2001 για μυκοτοξίνες και βαρέα μέταλλα
2. Κανονισμός 472/2002-αναθεώρηση του (ΕΚ) αριθ. 466/2001

Με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 472/2002 της Επιτροπής της 12ης Μαρτίου 2002 τροποποιείται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 466/2001 για τον καθορισμό μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα και παράλληλα θεσπίζονται ανώτερα επιτρεπτά όρια ωχρατοξίνης A σε δημητριακά, προϊόντα δημητριακών και σταφίδες.

3. Κανονισμός 683/ 2004 για Αφλατοξίνες και Ωχρατοξίνη σε βρεφικές και παιδικές τροφές

Ο συγκεκριμένος κανονισμός αποτελεί τροποποίηση του τελευταίου (472/2002) και καθορίζει τα επίπεδα ωχρατοξίνης A σε τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και νήπια. Στον κανονισμό αυτόν σαν κυριότερες πηγές πρόσληψης αναγνωρίζονται τα δημητριακά και τα προϊόντα δημητριακών ενώ οι σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή και σουλτανίνα) θεωρούνται υψηλού βαθμού περιεκτικότητας. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στο

τελευταίο τρόφιμο αφού οι σταφίδες αποτελούν σημαντική διατροφική πηγή για τα παιδιά.

4. Κανονισμός 123/ 2005 για ωχρατοξίνη Α σε οίνους

Με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ.123/2005 της Επιτροπής, της 26ης Ιανουαρίου 2005, γίνεται τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ.466/2001, όσον αφορά την ωχρατοξίνη Α καθορίζοντας ως νέο ανώτατο επιτρεπτό όριο τα 2 ppm για το κρασί, τον χυμό σταφυλιού και τα σταφύλια.

5. Κανονισμός 1881/ 2006

Με τον παραπάνω κανονισμό της επιτροπής της 19ης Δεκεμβρίου 2006 καθορίστηκαν νέα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για ορισμένες ουσίες (ανάμεσά τους και η ωχρατοξίνη Α), οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα όπως τα δημητριακά, τα προϊόντα δημητριακών, τις σταφίδες, τον φρυγμένο καφέ, το κρασί, τον χυμό σταφυλιών και τα τρόφιμα για βρέφη και μικρά παιδιά, όλα εκ των οποίων συμβάλλουν σημαντικά στη γενική έκθεση του ανθρώπου στην ΟΤΑ ή στην έκθεση των ευάλωτων ομάδων καταναλωτών, όπως τα παιδιά. (Πίνακας 5.1)

Αρχικά είχε προταθεί ως προσωρινή ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη των 100 ng/kg σωματικού βάρους, περίπου δηλαδή 14 ng/kg κατά βάρος σώματος ανά ημέρα (WHO/FAO Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA, 1996a).

Στις 4 Απριλίου 2006 όμως η ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (ΕΑΑΤ) εξέδωσε επικαιροποιημένη επιστημονική γνώμη σχετικά με την ωχρατοξίνη Α στα τρόφιμα, λαμβάνοντας υπόψη τις νέες επιστημονικές πληροφορίες και έθεσε ένα ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (ΑΟΕΠ) ύψους 120 ng/kg σ. β.

Πίνακας 5.1: Μέγιστα επιτρεπτά όρια ΩΤΑ (Καν.1881/2006).

Ωχρατοξίνη Α	Μέγιστα επιτρεπτά όρια (ppb)
Μη μεταποιημένα δημητριακά	5,0
Όλα τα προϊόντα που παράγονται από μη μεταποιημένα δημητριακά, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων με βάση τα δημητριακά και των δημητριακών που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων όσων προορίζονται για βρέφη	3,0
Σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή σταφίδα και σουλτανίνα)	10,0
Φρυγμένοι κόκκοι καφέ και φρυγμένος και αλεσμένος καφές, εξαιρουμένου του διαλυτού καφέ	5,0
Διαλυτός καφές (στιγμαιαίος καφές)	10,0
Οίνοι (συμπεριλαμβανομένων των αφρωδών οίνων, εξαιρουμένων των οίνων λικέρ και των οίνων με αλκοολικό τίτλο όχι μικρότερο του 15 % vol) και ποτά που προέρχονται από ζύμωση φρούτων	2,0
Αρωματισμένοι οίνοι, αρωματισμένα ποτά με βάση τον οίνο και αρωματισμένα κοκτέιλ αμπελοοινικών προϊόντων	2,0
Χυμός σταφυλιών, συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών, όπως αυτός ανασυστάθηκε, νέκταρ σταφυλιών, γλεύκος σταφυλιών και συμπυκνωμένος γλεύκος σταφυλιών όπως αυτός ανασυστάθηκε, οι οποίοι προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο	2,0
Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	0,50
Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	0,50
Ωμός καφές, ξηρά φρούτα εκτός από τις σταφίδες, μπίρα, κακάο και προϊόντα με βάση το κακάο, λικέρ, προϊόντα με βάση το κρέας, καρυκεύματα και γλυκόριζα	—

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο



**ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ
ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ΩΤΑ είναι μια φυσικά παραγόμενη τοξίνη από ποικίλα είδη των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*. Ο *Aspergillus carbonarius* θεωρείται ο κύριος ωχρατοξινογόνος μύκητας στα σταφύλια και στο κρασί (Battilany and Pietri, 2002, Cabanes et al., Abarca et al., 2004). Οι μικροοργανισμοί και ιδιαίτερα τα βακτήρια και οι ζύμες έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη ωχρατοξινογόνων μυκήτων αλλά και να μειώνουν την ΩΤΑ τόσο σε υγρά υποστρώματα όσο και σε τρόφιμα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί αφενός η ικανότητα 5 μικτών καλλιεργειών ζυμών και 6 μικτών καλλιεργειών βακτηρίων (απομονωμένων από ζυμούμενα προϊόντα) να αναστέλλουν την ανάπτυξη του ωχρατοξινογόνου μύκητα *A. carbonarius* και τη ικανότητα παραγωγής ΩΤΑ και αφετέρου να μειώνουν τη συγκέντρωση της ΩΤΑ τόσο σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (in vitro) όσο και σε τρόφιμα (in situ) όπως χυμό σταφυλιού, κόκκινο κρασί και μπύρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**7.1 Θρεπτικά υλικά**

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της μελέτης ήταν:

M.E.A	50 g Malt Extract Agar / L
M.R.D	9,5g Maximum Recovery Diluent / L
MRS Broth	55,2g MRS broth with Tween / L
MRS Agar	70,2g MRS Agar with Tween / L
Y.E.A	40,1 Yeast extract glucose chloramphenicol agar / L
P.C.A	22,5 plate count agar / L
Yeast Medium ανά L	3g Malt Extract
	3g Yeast Extract
	5g Peptone Universal
	10g Glucose
Synthetic Grape Medium (1) ανά L	70g D(+)-glucose
	30g D(-)-fructose
	7g L(-)-tartaric acid
	10g L(-)-malic acid
	0,67g (NH ₄) ₂ SO ₄
	1,5g KH ₂ PO ₄
	0,75g MgSO ₄ • H ₂ O
	0,15g NaCl
	0,15g CaCl ₂
	0,0015g CuCl ₂
	0,021g FeSO ₄ • 7H ₂ O
0,0075g ZnSO ₄	
0,05g (+) catechin hydrate	
Synthetic Grape Medium (2)	1 L Synthetic Grape Medium (1) 25 gr Agar
Synthetic Grape Medium (3)	1 L Synthetic Grape Medium (1) 12,5 gr Agar
PBS Tween ανά L	8g NaCl
	1,44g Na ₂ HPO ₄
	0,24g KH ₂ PO ₄
	0,2g KCl

Διαλύμα έκλουσης	98ml μ	2 ml
Διαλύμα εκχύλισης	700ml μ	300 ml

7.2 Στελέχη ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων και προετοιμασία εμβολίων

16
 μ μ
 μ *Hanseniaspora, Kluyveromyces, Pichia, Issatchenkia, Zygosaccharomyces, Kazachstania, Saccharomyces, Lachencea,* μ
 (μ , μ , ,) (7.1.1). ,
 μ 29 (LAB),
Bacillus, Pediococcus, Streptococcus, Weissella, Lactobacillus, μ
 , , , μ , ,
 μ μ μ (7.1.2).
 μ μ μ «stock»
 μ μ
 μ
 μ
 -22°C.

Πίνακας 7.2:

Είδη ζυμών	Κωδικός	Προέλευση
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Kluveromyces dobzhankii</i> <i>Pichia fermentas</i> <i>Issatchekia occidentalis</i>	1	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Issatchekia terricola</i> <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> <i>Kazachstania hellenica</i> <i>Kazachstania hellenica</i> <i>Issatchenkia terricola</i>	3	
<i>Saccharomyces serevisiae</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Lachencea thermotolerans</i> <i>Issatchenkia orientalis</i>	4	
μ	16	

Πίνακας 7.2.1:

Είδη βακτηρίων	Κωδικός	Προέλευση
<i>Bacillus thuringiensis</i> (7)		, , μ
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (6)	PdM	, μ , μ
<i>Streptococcus salivarius</i> (6)	SM	μ , μ
<i>Weissella cibaria</i> (8)	WM	, μ , μ
<i>Lactobacillus sakei</i> (1)	LbM	
<i>Lactobacillus casei</i> (1)	LbM	
	29	

μ μ μ μ μ , μ Yeast Medium 25°C, (24h)

μ μ μ μ μ , μ μ μ μ μ RS Broth 30°C (24h)

(3,500 rpm, 4 C, 15min) μ , μ μ μ μ (M.R.D). μ

μ , μ μ μ

μ 2-8 μ μ μ

μ μ μ (16YM 29BM). μ μ

μ μ μ 5 (BM, LbM, WM, StrM, PdM)

4 (YM1, YM2, YM3, YM4) μ .

μ μ μ μ

μ .

μ μ μ 6 μ

5 μ μ μ μ μ μ μ

μ .

Πίνακας 7.2.2:

Βακτήρια	Κύτταρα/ml	Ζύμες	Κύτταρα/ml
29BM	10^8	16YM	10^7
<i>Streptococcus</i>	10^8	YM1	10^7
<i>Lactobacillus</i>	10^8	YM2	10^6
<i>Bacillus</i>	10^8	YM3	10^7
<i>Pediococcus</i>	10^9	YM4	10^7
<i>Weisella</i>	10^9		

7.3 Επιλογή μύκητα και διαδικασία παραγωγής και συλλογής κονιδίων

μ

μ μ μ μ μ

μ μ μ μ μ *Aspergillus carbonarius* μ

(Abarca et al., 2001, Magnoli et al., 2004). μ A.

carbonarius ATHUM 5659 μ

μ μ μ .

μ μ μ μ μ

. . μ pH 4.7-5.2 (μ μ μ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

μ) 7 μ 25°C (Pardo et al., 2004). μ
A. carbonarius (ATHUM 5659) 7
 μ 0,1% Tween 80, μ
 μ . μ
 μ μ μ
 10⁷ /ml. μ
 Petri 2-8°C μ μ .

7.4 Μείωση της ανάπτυξης του *Aspergillus carbonarius* και της ικανότητας παραγωγής ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια σε στερεό υπόστρωμα SGM

μ μ μ
 Synthetic Grape Medium
 (SGM). μ 2 SGM
 (Synthetic Grape Medium (2) Synthetic Grape Medium (3))
 pH μ 3,5 μ 2 μ pHμ
 526 Metrohm Ltd μ μ
 μ
 L(-)-tartaric acid L(-)-malic acid
 μ . μ (a_w)
 0,98, 0,95 0,92
 μ μ Hygrolab rotronic.
 μ μ μ
 15ml μ Synthetic Grape
 Medium (2) (Bleve et al., 2006) 6ml Synthetic Grape
 Medium (3) 1 ml μ μ .
 μ μ μ μ μ μ
 μ . μ
 μ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

μ 5 ml, μ
 μ HPLC. μ , 100 μl
 HPLC
 μ -18 °C.

7.5 In vitro και in situ μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας

μ μ Yeast Medium (pH:6.5
 aw 0.99) MRS broth (pH:6.5 aw
 0.99). pH 2 μ μ 3.0, 4.0 5.0 μ
 6 N HCl μ μ (121°C 15
 min). μ μ
 μ μ (10.150 μg/mL, Biopure Corporation, USA), μ
 2 50ppb 100ppb.
 μ 5 ml
 μ 15 ml.
 μ μ , 2 μ μ μ
 μ μ μ μ μ
 10³ cfu/ml 10⁷ cfu/ml. μ μ μ
 30°C 25°C
 μ . μ μ μ 2 μ
 μ 5 μ μ μ
 μ μ μ μ μ (μ)
 50 100 μg/l μ μ (cfu/ml)
 μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 μ μ pH 3.3 a_w 0.96, μ (in situ), 200 ml
 μ μ pH 3.6 a_w 0.96

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

μ pH 4.4 a_w 0.97 2 ml μ
 (10.20 μg/mL, Biopure Corporation, USA) μ
 100 μg/l. , μ
 14 ml μ μ falcon
 15 ml. μ μ μ 10⁷ cfu/mL μ (16)
 10⁷ cfu/mL (29). μ
 μ μ μ
 μ , μ μ
 μ μ μ
 μ μ μ μ 25°C,
 μ 3 μ
 . μ μ 0, 2 5 μ
 . μ μ
 μ μ . μ
 μ :

$$\% \text{ μείωση} = \{1 - (C_{\Omega\text{T}\text{A}} \text{ δείγματος} / C_{\Omega\text{T}\text{A}} \text{ μάρτυρα})\} \times 100$$

7.5.1 Ανίχνευση της ΩΤΑ με HPLC

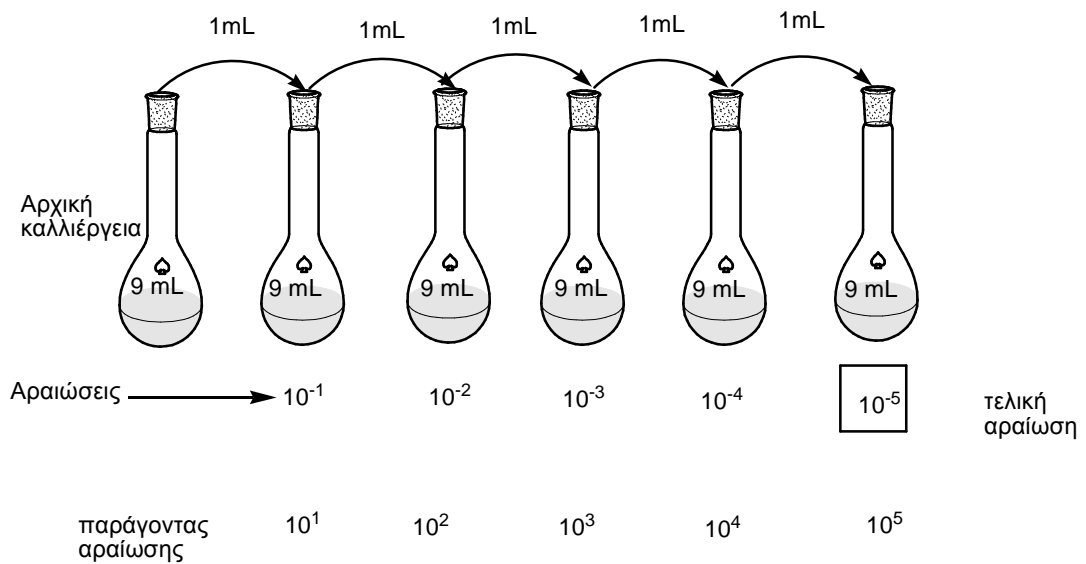
μ (3500 rpm, 4°C, 15min) μ μ
 μ . μ μ
 μ μ μ (immunoaffinity
 columns, **OchraStar**[™], R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) μ μ
 . μ -18°C
 μ HPLC.

7.5.2 Προσδιορισμός αρχικού και τελικού μικροβιακού φορτίου σε τρυβλία Petri

μ 3 μ μ pH a_w.
 μ μ μ
 μ μ μ , μ μ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

μ 0,2 5 μ
 μ μ
 Petri μ μ
 YGC – Agar (Yeast extract glucose chloramphenicol agar), μ
 μ μ 25°C 48
 μ μ (pour plate technique),
 1ml μ
 μ μ μ MRS Agar (MRS Agar with
 Tween 80) Petri
 30°C 48
 μ μ Petri μ
 μ μ PCA μ μ μ 30°C
 48
 μ μ μ μ μ

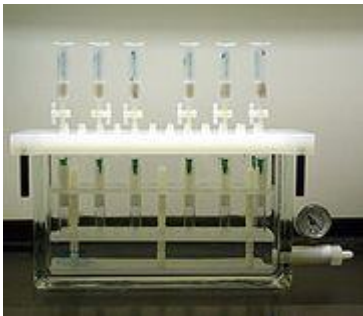


Εικόνα 7.4.2: μ

7.5.3 Καθαρισμός των δειγμάτων

μ (3500 rpm, 4°C, 15 min) μ μ
 (HPLC). μ μ μ μ
 (OchraStar – Immunoaffinity Columns, Code:COIAC2000,
 Romer Labs Diagnostic GmbH – Austria).

μ μ 2 ml
 7.4). μ 22 ml μ PBS Tween (0,01%v/v, pH
 μ μ 50 ml, μ
 μ μ 2-3 ml/min (μ
) μ . μ



μ μ 5 ml/min, μ
 μ 20 ml μ PBS Tween (0,01%v/v, pH
 7.4). μ

1,5 ml μ μ : (μ 98:2)
 1,5 ml μ H₂O HPLC. μ μ
 100μl HPLC.

μ μ μ , μ
 μ μ μ
 μ 10 ml μ
 pH μ 7.8
 μ pH μ 7.2, μ
 μ NaOH 2 .



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

μ , μ μ 10 ml μ
PBS Tween (0,01%v/v, pH 7.4)
μ μ μ
μ , μ μ
μ μ , μ μ μ
μ μ μ μ 1
μ μ , μ μ
CO₂.

7.6 Ποσοτικός προσδιορισμός ΩΤΑ με HPLC

- HPLC (6.2.2.2)
μ μ μ
:
- μ Moller et al. (2003).
 - μ μ (injector) μ μ
100μl.
 - μ (/ / : 49:49:2),
 - (column) (Resteck Pinnacle II, 250x4,6 mm, C18, 4μm)
 - μ μ (detector) (Lachrom Merck Hitachi, L-7485) μ 333nm (x) μ 460nm (Em).
 - (μ -pump) (Lachrom Merck Hitachi, L-7100). μ
(/ / : 49/49/2) μ
1 ml/min.
 - μ Peak Simple 329.

7.6.1 Ποσοτική ανάλυση

μ μ μ μ
 . μ
 μ μ
 (μ , μ μ μ
 μ μ),
 μ
 μ μ μ HPLC. μ
 500μl μ 100μl μ 2ml
 μ
 5-6 μ μ HPLC.
 μ μ μ
 μ μ μ
 μ μ :) μ
 μ μ) μ
 μ μ .
) _____ μ μ μ
 μ μ
 (MRS Broth, east Medium) μ (μ , , μ)
 5, 25, 50, 80 120ppb TA
 μ μ μ .
 μ μ (SGM) 5,
 25, 100 250ppb TA. μ μ μ μ
 10.150ppb
 (μg/ml).
) _____ μ
 μ μ μ μ
 . μ μ μ μ
 μ μ μ .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

) _____ μ

μ μ μ μ MRS Broth east

Medium μ μ 2

(50ppb 100ppb) μ , μ

100ppb. (recovery)

(C2/C1)x100, C1

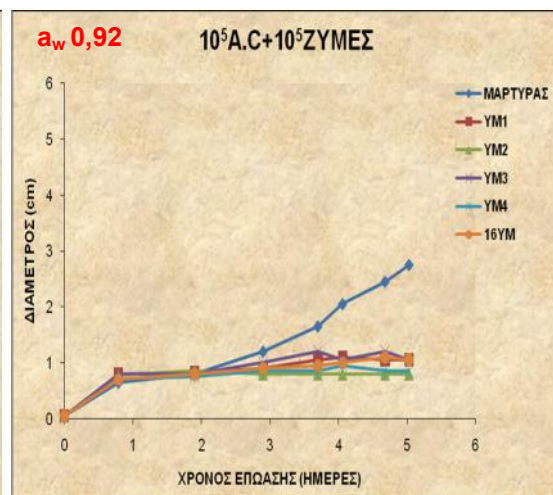
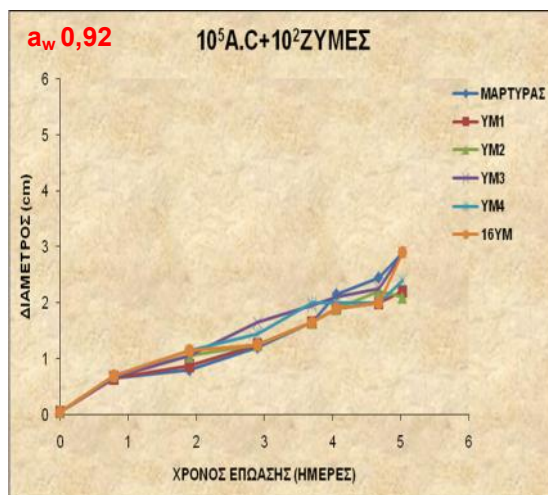
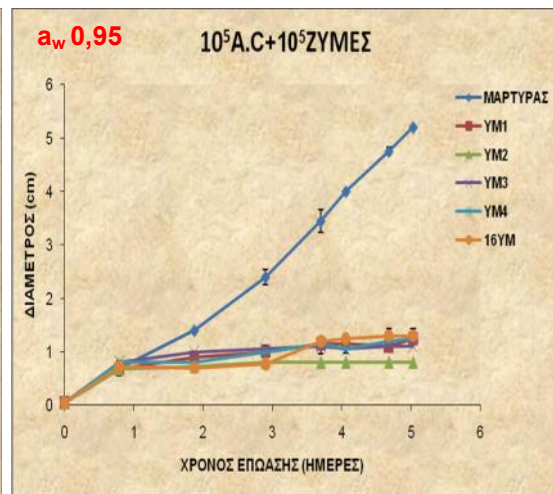
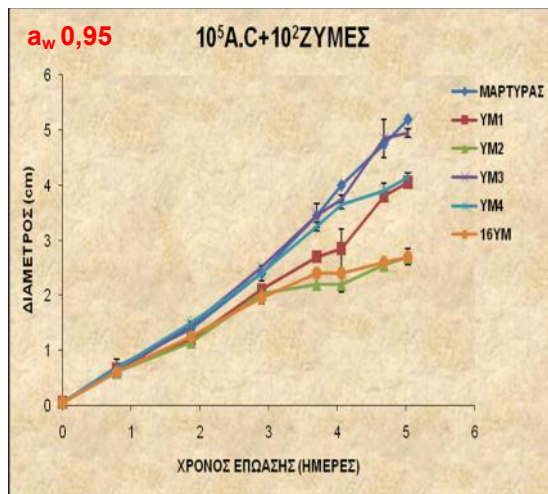
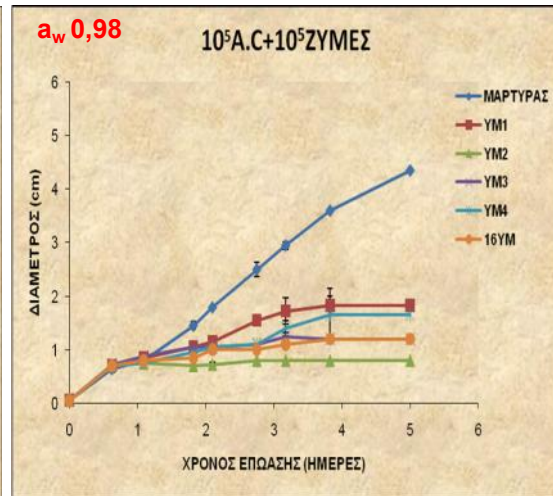
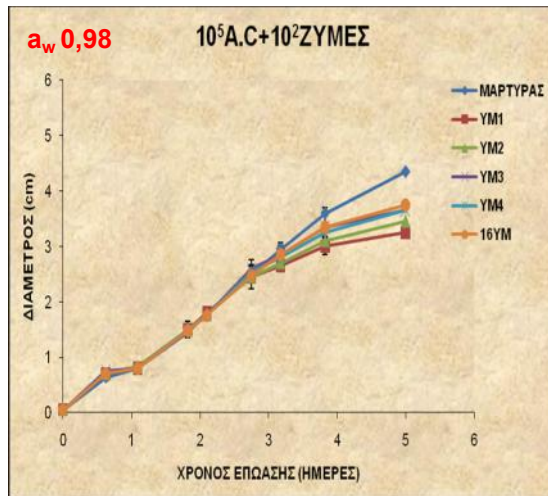
C2 μ μ μ .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

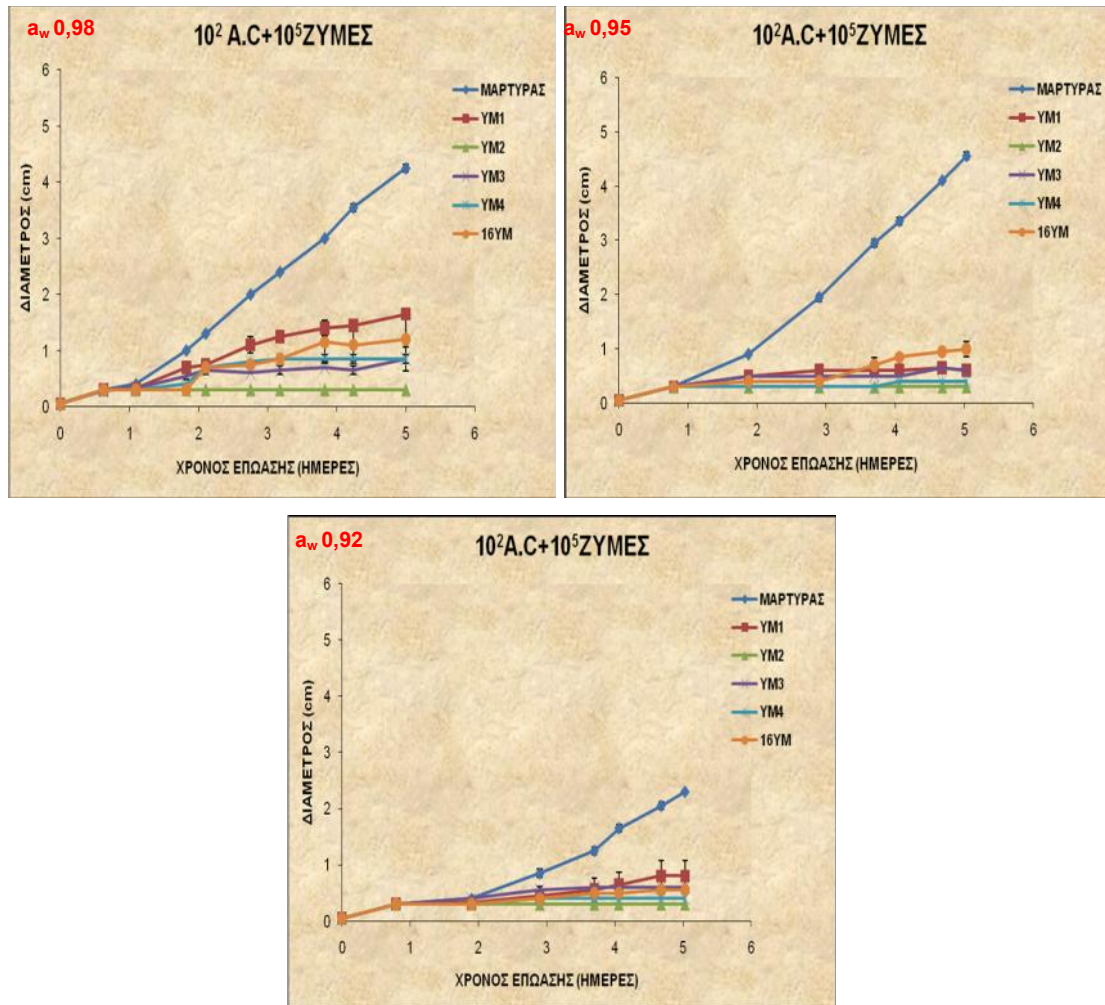


ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

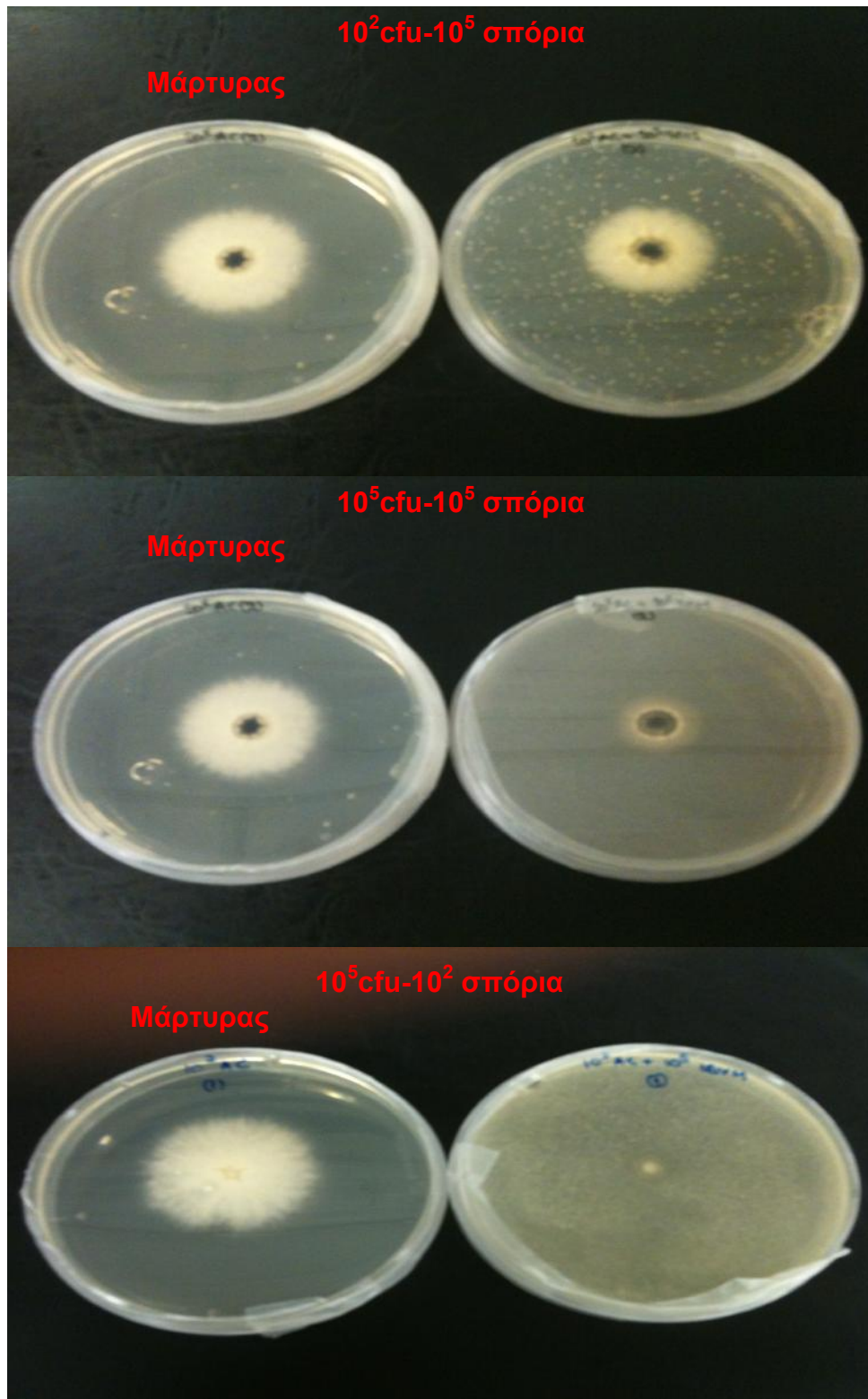


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γραφήματα 8.1.1: μ *Aspergillus carbonarius*, μ
 (5 μ 25°C), μ μ μ μ 5 μ
 (control) μ μ μ μ μ μ μ μ μ SGM
 μ (YM1, YM2, YM3, YM4, 16YM), μ μ μ μ μ μ μ μ μ SGM
 (pH 3,5) 3 (a_w 0,98, 0,95 0,92).
 μ μ μ μ μ : () 10^2 cfu/ml- 10^5
 /ml () 10^5 cfu/ml- 10^5 /ml () 10^5 cfu/ml- 10^2 /ml.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 8.1.1:

5 μ
0,95, and 0,92) μ
carbonarius μ
μ
10²cfu/ml-10⁵ μ
/ml () 10⁵ cfu/ml-10⁵ μ

A. carbonarius, μ
μ SGM (pH 3,5, a_w 0,98, μ
(μ μ μ μ A.
5 μ . μ μ μ μ
: () 10⁵ cfu/ml-10² μ
/ml. ()

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ (μ 8.1.2)
 μ μ μ
 μ μ A.
carbonarius μ SGM.
 μ SGM 99-105%.

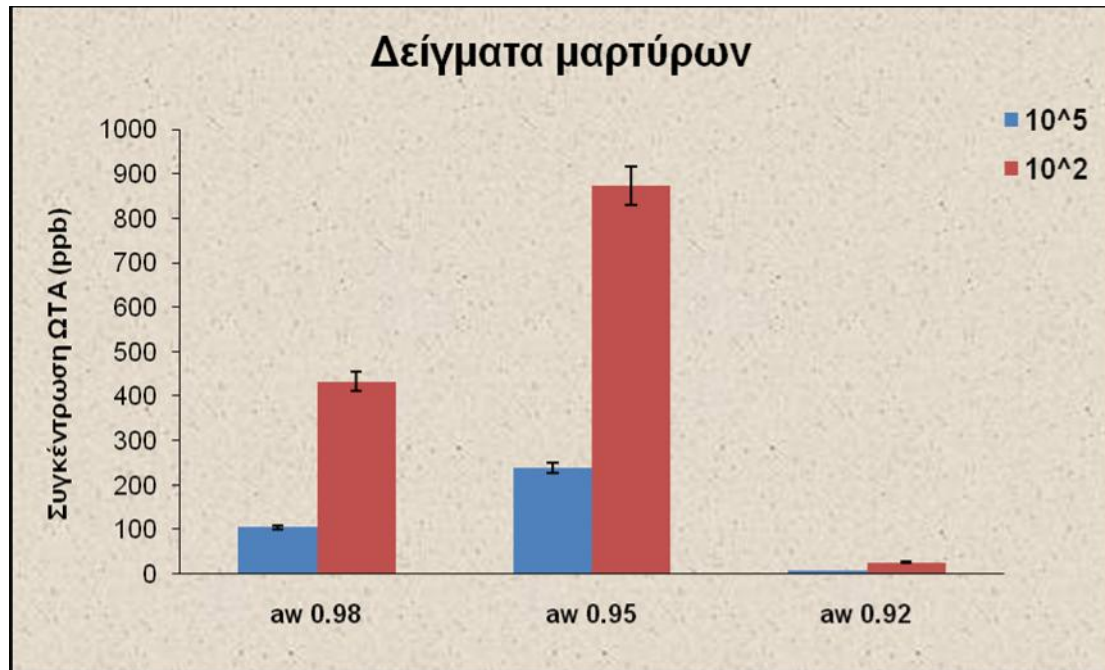


Γράφημα 8.1.2: μ μ μ μ SGM μ
 μ HPLC.

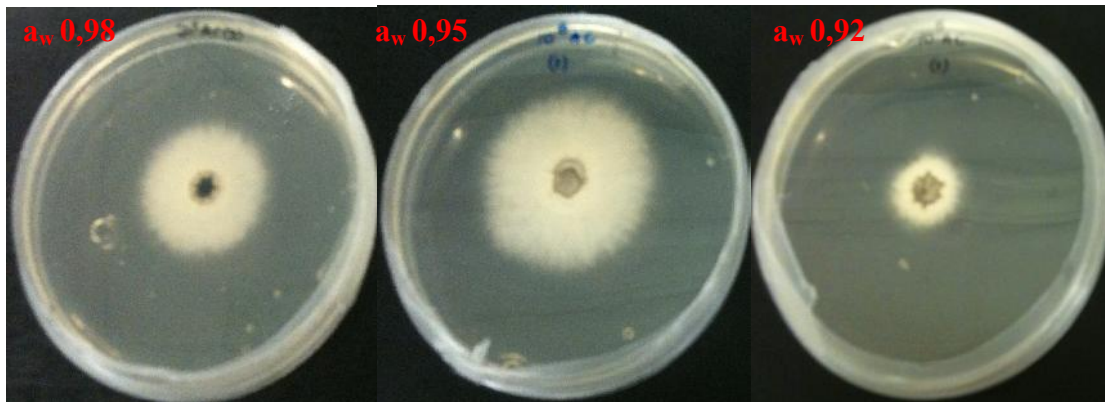
A. carbonarius
 (a_w) μ μ μ
 μ μ (μ 8.1.3)
 μ μ μ
 a_w μ
 a_w 0,92 (8 ppb) μ a_w 0,95 (873 ppb)
 (μ 8.1.3), μ μ ,
 8.1.2 μ μ
 μ μ μ
 μ μ μ (10²)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

/ml) μ ,
 (432, 873 26 ppb)
 μ μ (a_w 0,98, 0,95 0,92)
 μ μ (104, 238 8 ppb)
 μ μ (10⁵ /ml) μ
 a_w (μ 8.1.3).



Γράφημα 8.1.3: μ μ μ *A. carbonarius* (10⁵ 10² /ml) μ (a_w 0,98, 0,95, 0,92).



Εικόνα 8.1.2: μ μ μ μ *A. carbonarius*, μ μ 25°C 5 μ μ .
 (a_w 0,98, 0,95, 0,92) μ

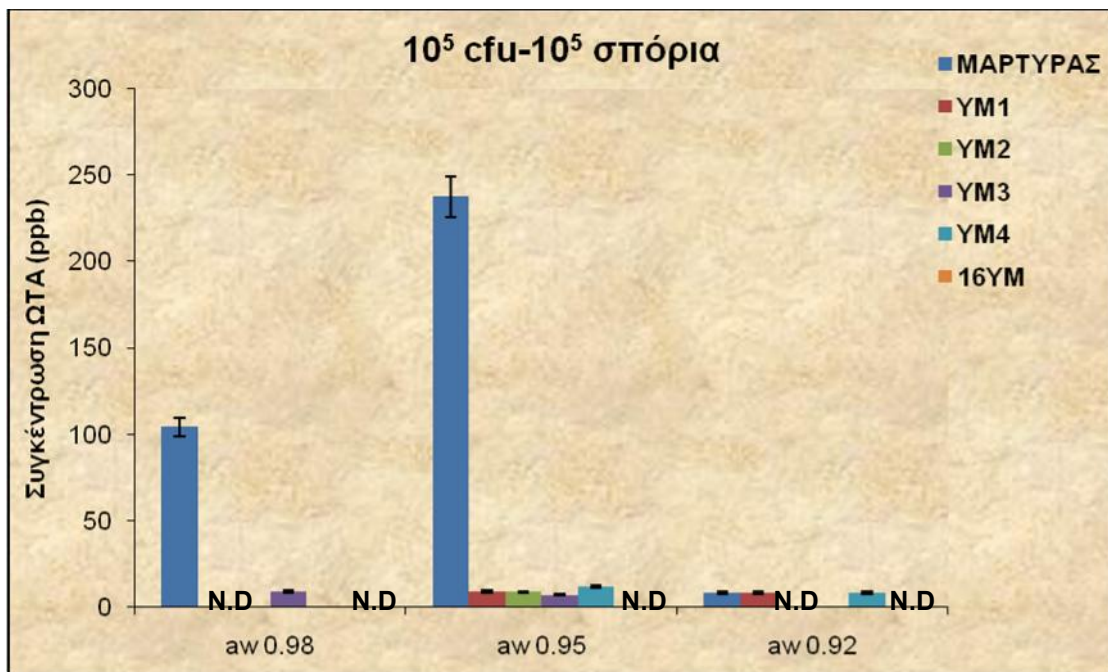
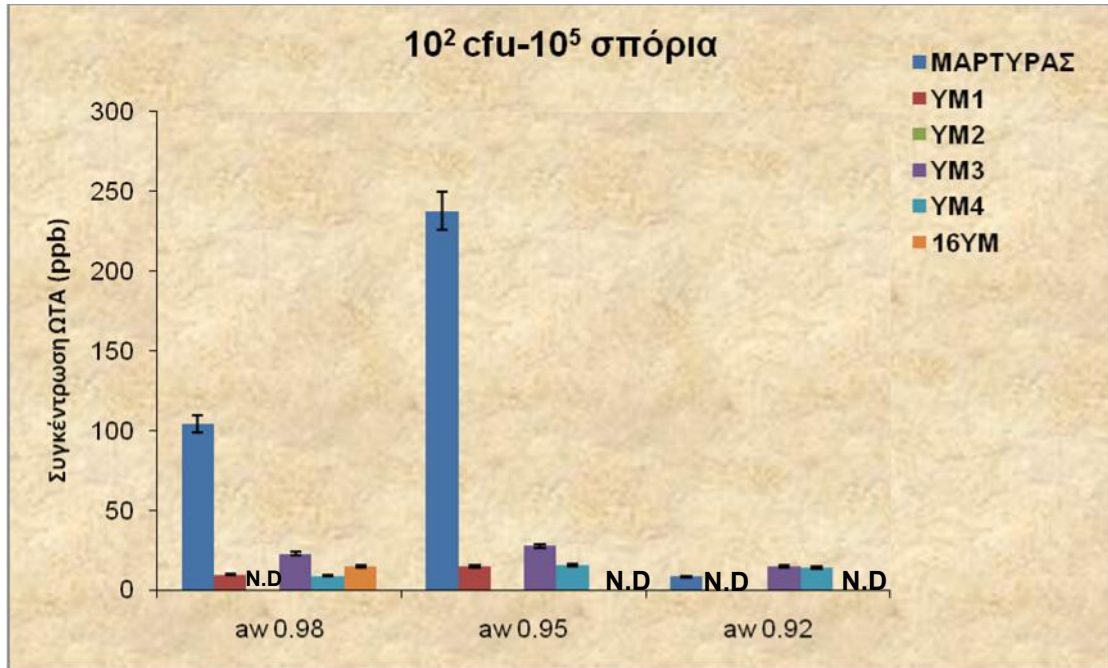
μ μ μ μ μ μ ,
 a_w μ
A. carbonarius. μ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ a_w 0,95 μ μ
 (μ 2 16) μ μ
 (27 ppb) (μ 8.1.5). μ
 (8-15ppb) a_w 0,92 μ μ
 μ μ μ μ μ μ μ
 (0,3-2,9cm) μ a_w .
 μ μ μ μ μ (10^5 cfu/mL)
 μ μ μ μ 10^5 cfu/mL μ 10^2 /mL
A. carbonarius μ μ μ μ (78-
 93%)
 μ μ μ μ a_w . μ
 μ μ μ (10^2 cfu/mL) μ μ
 μ 10^2 cfu/mL μ 10^5 /mL *A. carbonarius*,
 μ (27ppb μ μ 3)
 (μ 8.1.4) μ μ μ
 μ (4,95cm) a_w 0,95 (μ 8.1.5).
 μ 10^5 cfu/mL μ 10^5 /mL *A. carbonarius*,
 μ (8-12ppb) μ
 μ 10^2 cfu/mL μ 10^5 /mL *A. carbonarius* (μ
 8.1.4).
 μ μ , μ
 μ 2 μ
 a_w μ μ μ μ (μ
 μ 10^5 cfu/mL μ 10^5 /mL *A. carbonarius*
 a_w 0,95) (μ 8.1.4)
 μ (0,3-3,45cm) μ a_w (μ 8.1.5). μ
 μ μ 16 , μ (0,55-
 3,75cm) a_w (μ 8.1.5), μ
 a_w μ μ μ μ (μ
 μ 10^2 cfu/mL μ 10^5 /mL *A. carbonarius* a_w 0,98)
 (μ 8.1.4). μ μ μ μ (10^2
 cfu/mL) a_w 0,92, μ μ μ (3
 4) (15ppb 14ppb) μ
 μ (8ppb) (μ 8.1.5). a_w (0,92)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μ μ μ μ (10⁵ cfu/mL-10⁵ /mL)
 μ μ (1 4)
 μ μ (8ppb), μ μ
 (2,90cm μ 1,05 0,85cm) (μ 8.1.5).



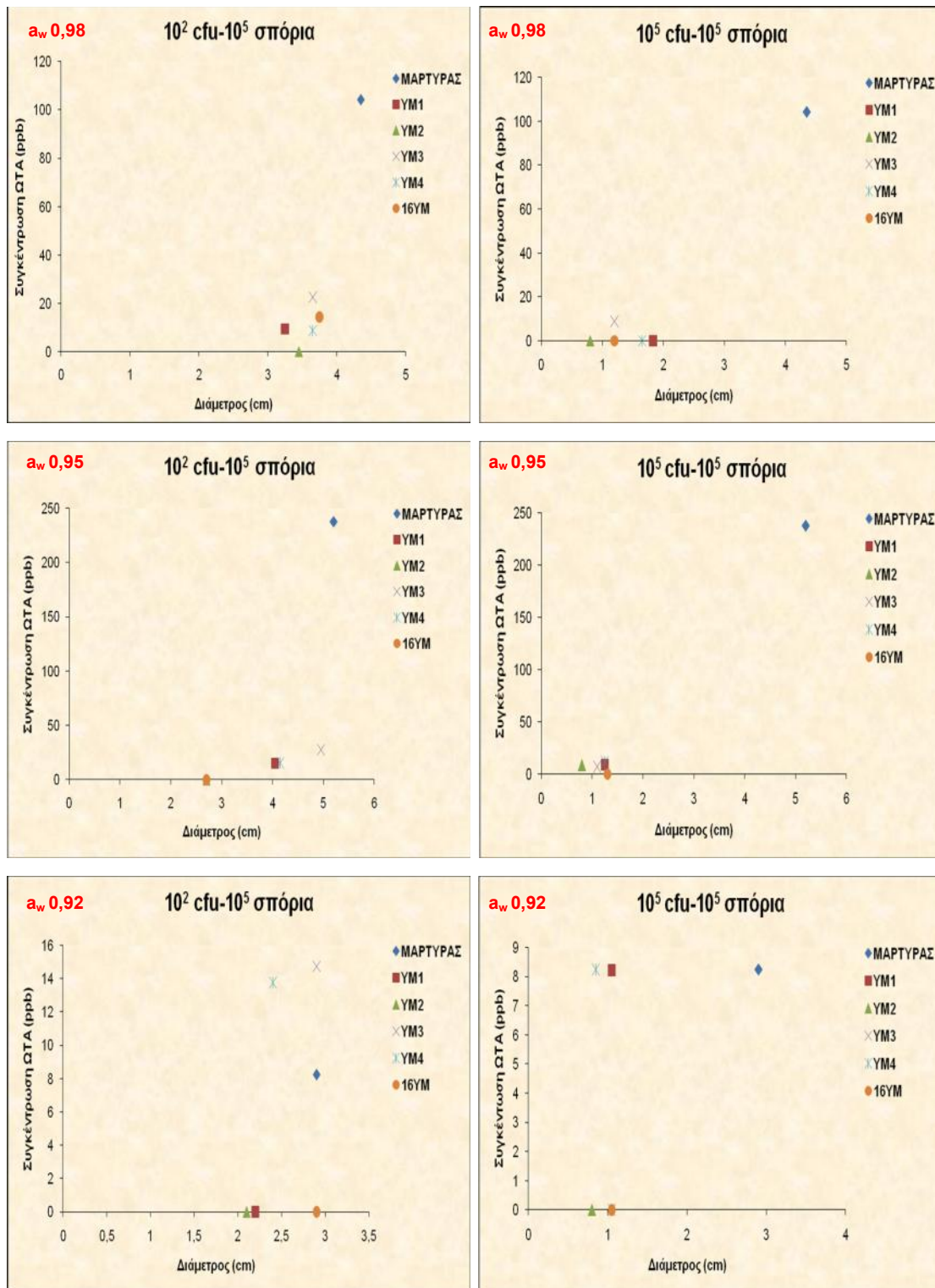
Γραφήματα 8.1.4:

μ μ (10⁵ 10² /ml)
A. carbonarius, μ

(a_w 0.98, 0.95, 0.92).

N.D:

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γραφήματα 8.1.5:

A. carbonarius μ

μ μ μ , μ μ μ 5 μ

μ (YM1, YM2, YM3, YM4, 16YM) (control), μ

μ SGM (pH 3,5) 3 (a_w 0,98, 0,95 0,92).

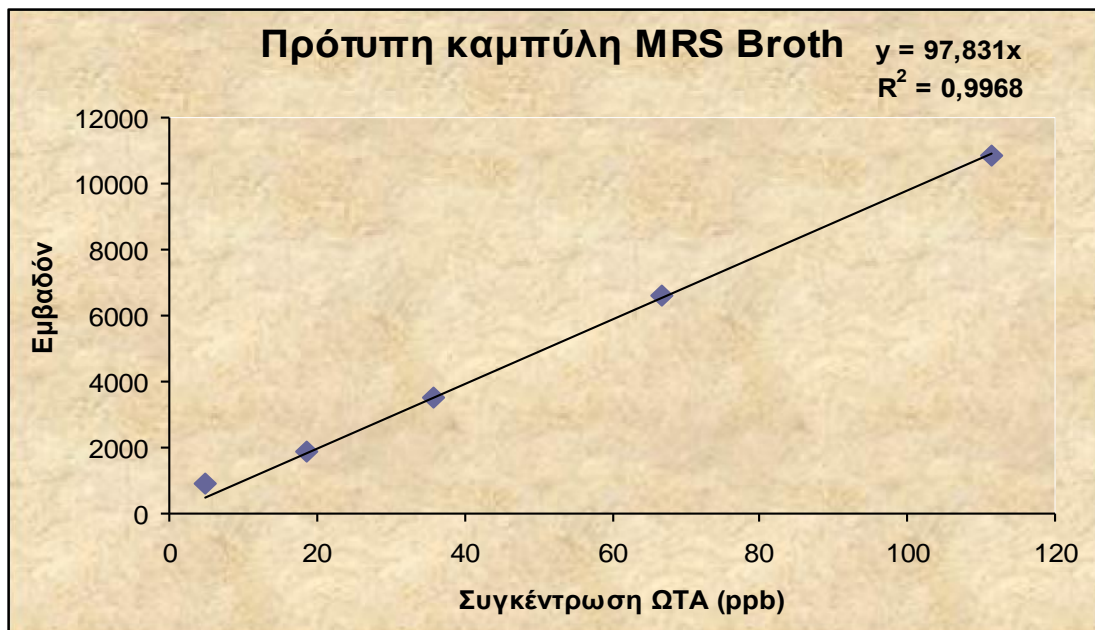
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

() 10^2 cfu/ml- 10^5 /ml () 10^5 cfu/ml- 10^5 /ml.

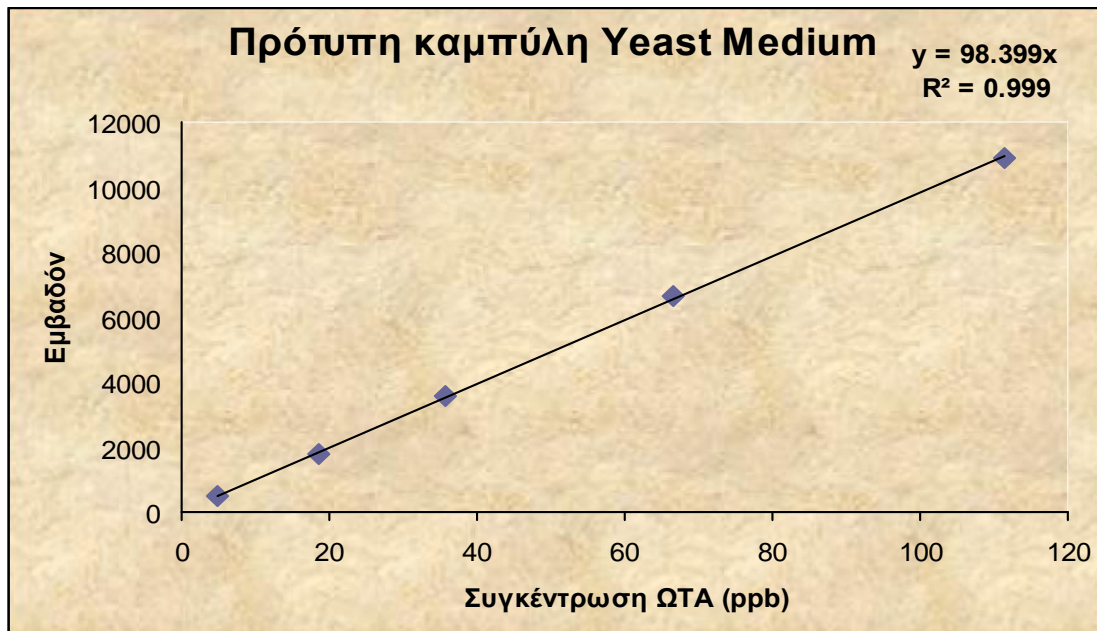
8.2 In vitro μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας

Broth Yeast Medium 92-107% 88-113% () MRS

8.2.1).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γραφήματα 8.2.1:

Yeast Medium
HPLC.

μ μ μ μ μ MRS Broth μ

μ μ pH, μ

μ μ μ , μ 65%
μ μ μ

μ μ : 16 (61-
65%), 1 (53%) 4 (44-50%). μ

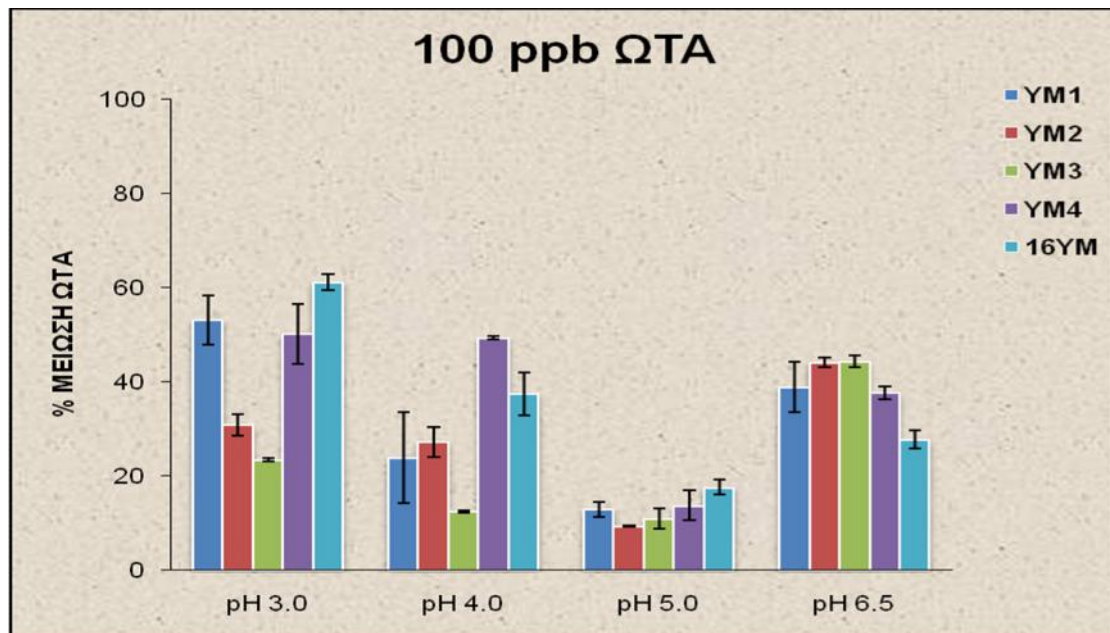
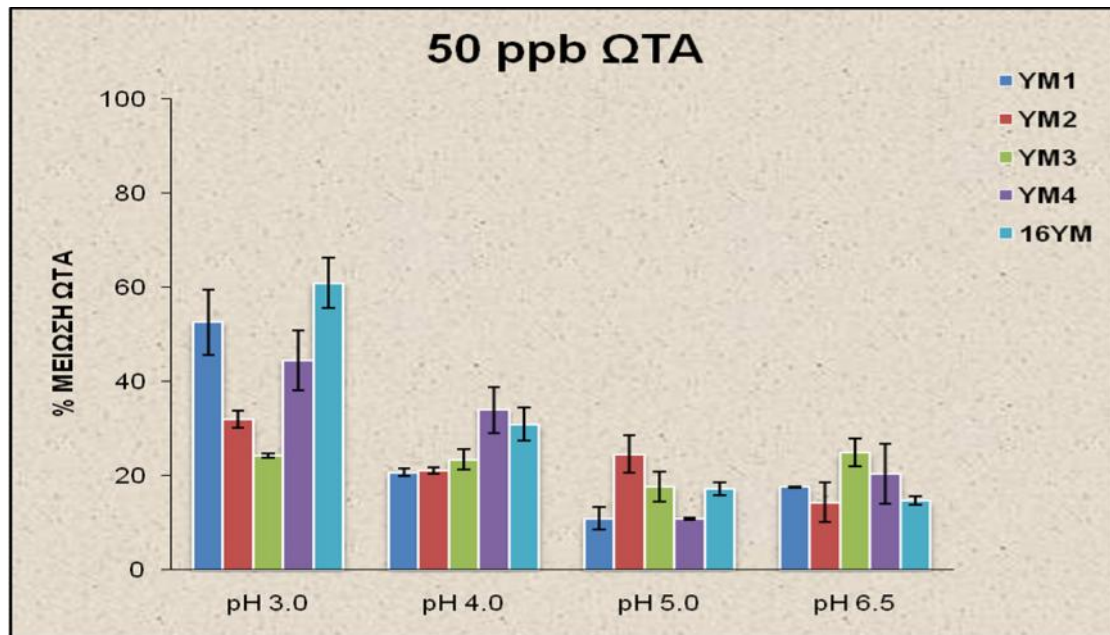
(2 3) μ , pH 3.0 μ

μ μ μ μ
(μ 8.2.2). μ μ

2 (50ppb 100ppb) μ
pH 6,5 μ μ

100ppb (μ 8.2.2).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



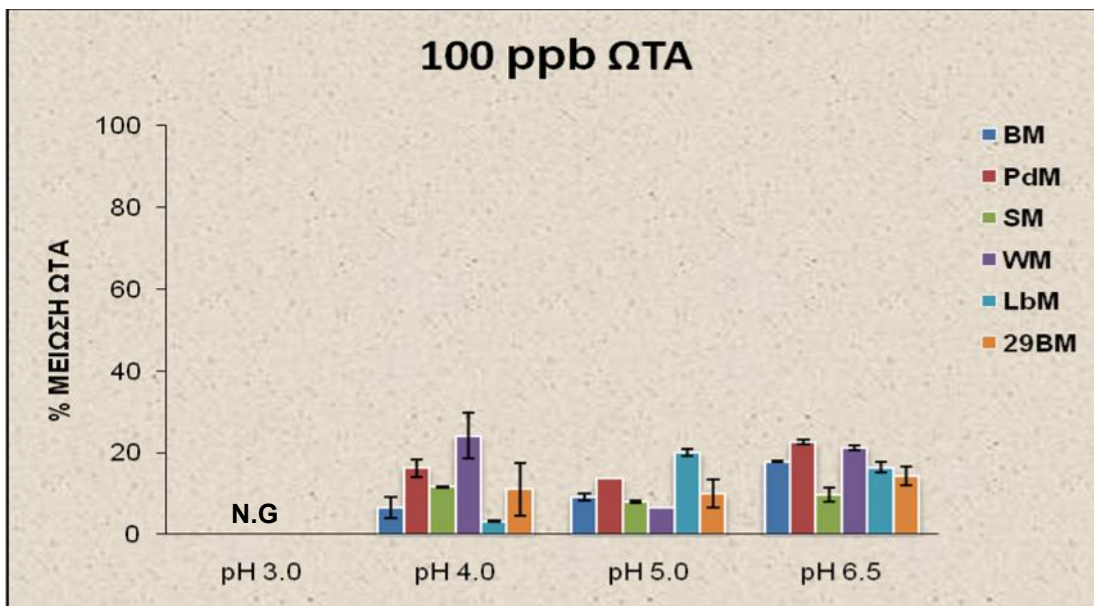
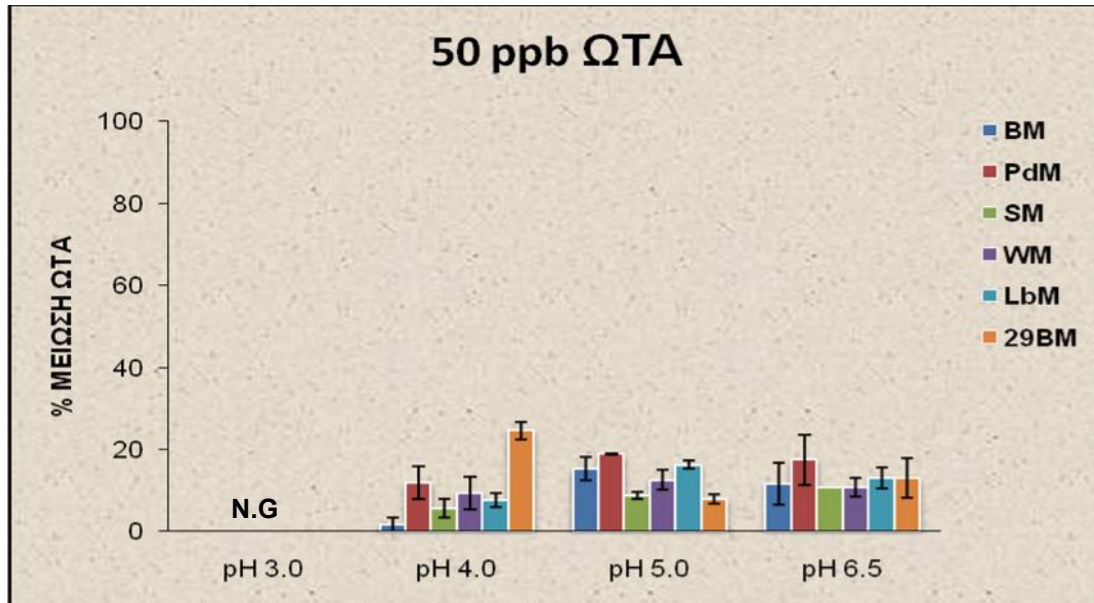
Γραφήματα 8.2.2: μ μ pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.1 or 6.5)
 μ Yeast Medium, μ μ μ 5 μ μ
 (YM1, YM2, YM3, YM4, 16YM), μ 25°C 2 μ .
 μ : (a) 50 ppb (b) 100 ppb.

μ μ μ
 μ μ 2-25% (μ 8.2.3)
 pH,

μ μ
 pH μ
Bacillus thuringiensis (BM), *Pediococcus pentosaceus* (PdM)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Lactobacillus sp. (LbM) μ μ (25%) (μ 8.2.3). μ μ pH 3 μ μ μ μ (μ 8.2.3).



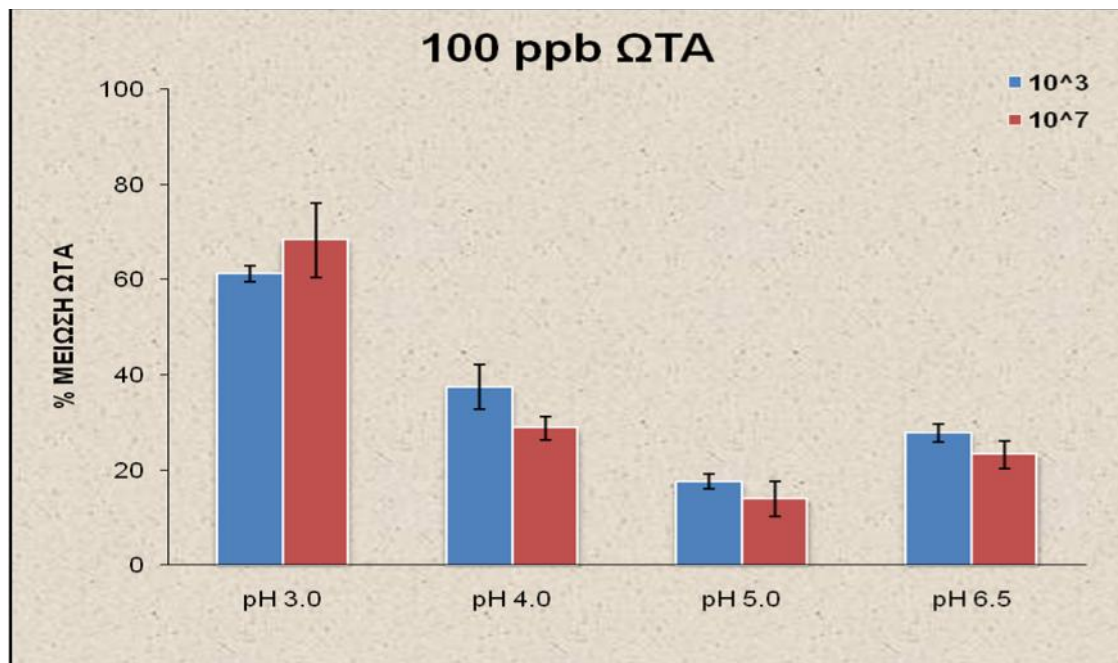
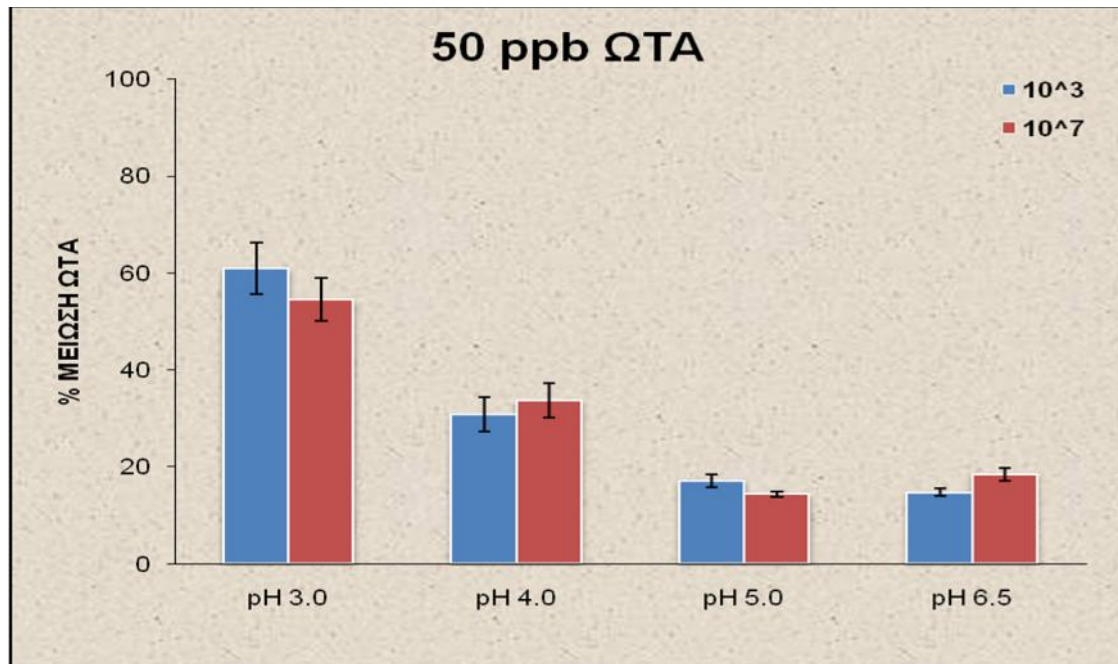
Γραφήματα 8.2.3: μ μ pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.1 or 6.5) μ MRS Broth, μ μ μ 6 μ (BM, SM, PdM, WM, LbM, 29BM), μ 30°C 5 μ . μ : (a) 50 ppb (b) 100 ppb.

N.G.: μ . *in vitro* μ μ μ , μ 2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

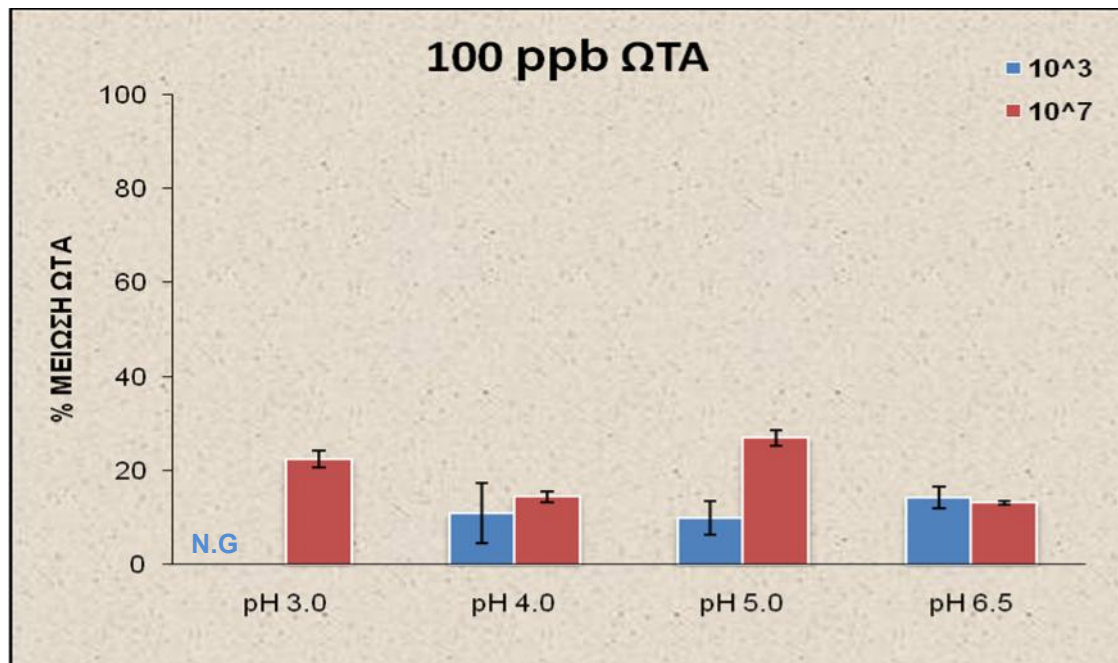
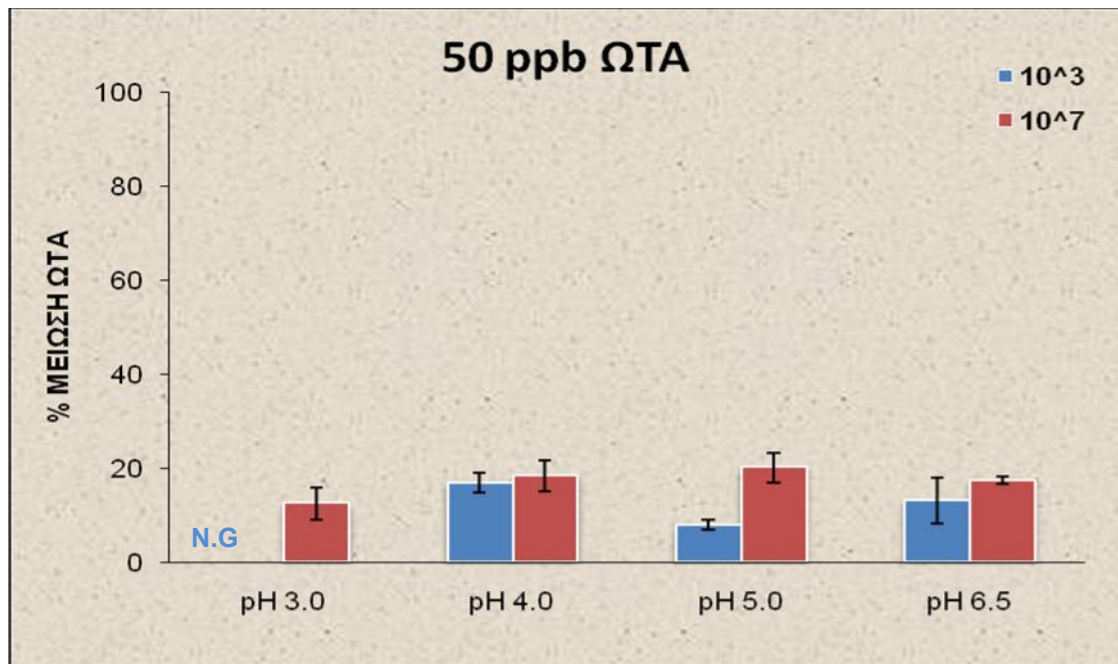
μ , 10^3 10^7 cfu/mL.
 μ (16) μ
 (29). μ (16) μ μ
 (14-68%) μ (29) (8-27%) (μ
 8.2.4, 8.2.5). μ μ μ
 μ pH, pH 3 μ μ ,
 μ μ (μ 8.2.4).
 μ μ μ ,
 μ . μ (29),
 μ (10^7 cfu/mL) (pH 5)
 μ μ μ μ
 (10^3 cfu/mL) (μ 8.2.5).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γραφήματα 8.2.4: μ μ (10³ cfu/mL, 10⁷ cfu/mL) μ
 μ (16) μ (%), μ pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.1
 6.5), μ 25°C 2 μ .
 μ : (a) 50 ppb (b) 100 ppb.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γραφήματα 8.2.5:

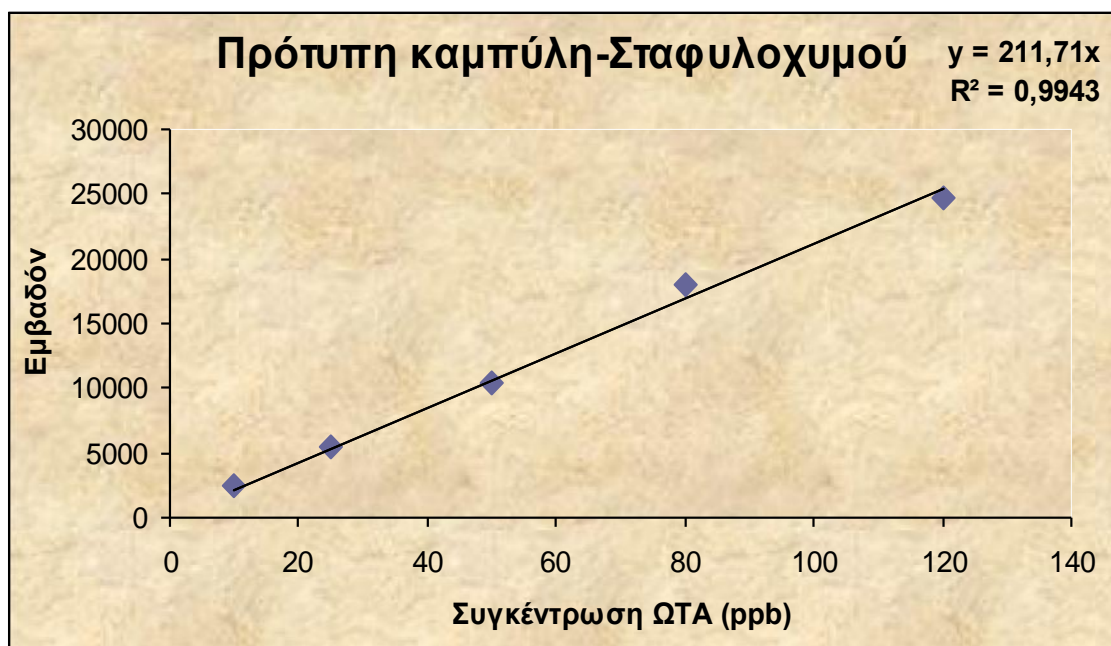
μ μ (10³ cfu/mL, 10⁷ cfu/mL) μ
 (29) μ (%), μ pH (3.0, 4.0, 5.0,
 6.1 6.5), μ 30°C 5 μ .

μ : (a) 50 ppb (b) 100 ppb.

N.G.: μ .

8.3 In situ μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας

μ
μ μ μ μ μ
μ μ μ
μ 3 μ .
μ ,
μ 107-114%, 95-119% 98-112% (μ).





Γραφήματα 8.3.1: μ μ μ 3 μ (μ , μ) μ HPLC.

μ 3 μ μ μ μ (32%), (22%) μ (12%) (μ 8.3.2). μ μ μ (16) μ (29) (2-8%). μ , μ μ (control) μ μ (1-4%), μ μ (1-21%). μ a_w μ 0,95-0,97, μ pH μ , μ μ μ 3,3-3,5, 3,5-3,6 4,4-4,5. μ μ 10^4 cfu/mL, μ μ ($< 10^2$ cfu/mL). μ 10^6 - 10^7 cfu/mL μ μ , 10^4 cfu/mL .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ





Γράφημα 8.3.2: % μ : () μ , () ()
 μ , μ 100 μg/L, μ μ μ 10⁷ cfu/mL 29BM (-▲-)
 16ΥΜ (-■-), μ 25°C 5 μ . μ μ
 μ μ μ μ (-◆-).
 μ , μ 2 μ ,
 μ μ μ μ μ μ
 μ (μ μ) μ μ μ μ
 μ , μ μ , μ μ
 μ μ 2 μ
 (μ 8.3.2). μ μ μ μ
 3 μ μ μ μ 2
 μ (μ 8.3.2).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο



ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

9.1 Μείωση της ανάπτυξης του *Aspergillus carbonarius* και της ικανότητας παραγωγής ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια

μ μ μ
 μ μ μ .
 μ
 μ , μ μ μ μ μ
 μ μ μ . μ , μ
Lactobacillus rhamnosus, *Lb. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* *Weissella cibaria*
 μ *Penicillium expansum* *P. nordicum* (Rouse et al., 2008, Schillinger et al., 2010)
 μ *Bacillus licheniformis*
 μ *Aspergillus westerdijkiae* (Petchkongkaew et al., 2008).
 μ
Lactobacillus casei, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, *Lb. casei subsp. rhamnosus* LC 705 *Lb. casei subsp. pseudoplantarum*
 μ *Aspergillus*
Penicillium (Suzuki et al., 1991, Mayra-Makinen et al., 1994, Gourama & Bullerman, 1995, 1997, Florianowicz, 2001). μ μ μ
 μ μ μ
 μ *Aspergillus carbonarius*
 . μ μ
 ,
 μ pH. μ Synthetic Grape Medium
 μ μ μ μ
 μ μ μ
 μ pH (3,5) μ
 μ μ .
 μ μ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

μ , μ pH, μ
 μ pH
 μ
 μ μ .
 μ μ μ
 μ μ μ *A. carbonarius*
 . μ μ
 μ μ μ
 , μ μ
 μ , μ μ
 μ μ μ μ μ μ
 (Luchese and Harrigan, 1993, Spadaro et al., 2002, 2004).

μ
 (a_w) μ μ μ
 μ . μ
A. carbonarius a_w 0,95 (Mitchell et al., 2004, Belli et al., 2004, Esteban et al., 2006, Leong et al., 2006d),
 μ μ μ (8.1.2)
 a_w μ μ μ
 μ μ (μ 8.1.4). μ μ
 μ (μ μ μ μ
 μ) a_w 0,95 (78-93%), μ
 μ μ μ μ μ μ μ
 μ . μ
 μ μ μ (10²) μ
 μ μ μ (10⁵) (μ 8.1.3) a_w,
 stress μ
 μ (10²),
 , μ μ
 μ μ .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

μ μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ μ
 8.1.1). μ μ μ μ μ μ μ
pulcherrima, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchekia terricola* και
Zygosaccharomyces bailii) 16 (μ μ)
 μ μ μ μ μ μ μ
 a_w
 μ μ μ μ (μ 8.1.5).
 μ μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ μ
 μ μ μ μ μ μ μ
Metschnikowia pulcherrima, *Issatchenkia orientalis*, *I. terricola*
A. carbonarius μ
Pichia anomala, *P. kluyveri* *Hanseniaspora uvarum*
Aspergillus ochraceus (Bleve et al., 2006, Masoud et al., 2006).
 μ *Pichia anomala*, μ in vitro
Penicillium roquefortii *Aspergillus candidus* (Peterson
 and Schnurer, 1995).
 μ μ μ (μ 7-8ppb)
 μ μ μ (μ 3 4) μ μ μ
 (μ μ), μ μ μ μ μ
 μ (10^2 cfu/mL) a_w 0,92, μ
 μ μ (μ 8.1.5), μ
 μ μ μ .
 μ μ μ μ (10^5 cfu/mL)
 μ μ *A. carbonarius* (78-93%),
 μ μ
 μ μ (10^2 cfu/mL) μ μ
 μ 8-27ppb (μ 8.1.5).
 μ μ 5 μ

μ (μ) (27ppb<873ppb), a_w
 μ μ μ μ μ . μ
 μ μ μ μ
 μ , μ μ μ
 μ ,
 μ μ .
 μ μ μ μ μ μ A.
carbonarius μ
 μ pH a_w0,92-0,98 μ , μ .

9.2 In vitro και in situ μείωση της ΩΤΑ από ζύμες και βακτήρια τεχνολογικής μικροχλωρίδας

μ μ μ
 μ (2-25%)
 μ pH TA (μ 8.2.3).
 μ μ Del Prete et al., (2007)
 μ (8-28%), μ 15
 μ , μ
 Mateo et al., (2010) μ 50-70%
 10 *Oenococcus oeni* μ μ MLO
 μ Fuchs et al., (2008)
 μ >98% *Lactobacillus acidophilus* μ μ MRS
 Broth μ 37 °C 4 .
 μ μ
 μ μ
 μ , pH μ , μ
 μ μ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

(Fuchs et al., 2008, Mateo et al., 2010). pH 3.0 (8.2.3), (10⁷cfu/mL) pH. (10³cfu/mL) (8.2.5), Fuchs et al., (2008). (, μ). 68% (μ 8.2.2). Cecchini et al., (2006), 70%. pH, , μ μ pH μ , pH 3 μ (μ 8.2.2). pH 3 μ μ YM1, YM4 16YM in vitro μ μ (44-65%) (μ 8.2.2). *Zygosaccharomyces bailii*, *Kluyveromyces dobzhankii*, *Kazachstania hellenica*, μ μ *S. cerevisiae* μ (Santin et al., 2003, Yiannikouris et al., 2003). μ μ μ pH (3-6,5). μ μ , μ μ a_w μ .

Η παραγωγή προκύπτει από τη ζύμωση της αλάτι-προσηύστασης. Η ζύμωση γίνεται με τη χρήση της *S. bayanus* ή της *S. cerevisiae* (Bejaoui et al., (2004)). Η ζύμωση γίνεται είτε *in vitro* είτε *in situ*. Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες.

Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες.

Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες.

Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in vitro* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες. Η ζύμωση *in situ* γίνεται σε θερμοκρασία 28-30°C, σε pH 4,4-4,8, σε ατμοσφαιρική υγρασία (aw) 0,98-1,00, σε χρόνο 24-48 ώρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

μ
ΤΑ μ μ a_w , pH, μ
μ μ
μ μ . μ μ
μ μ μ
μ *A. carbonarius* μ . μ μ
μ
A. carbonarius
, μ μ .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) . . (2005). μ . . , μ , . . .
- 2) . (2005). μ μ . 1 μ .
- 3) (1986). μ μ . μ μ .
- 4) . . (1989). μ μ μ μ .
- 5) ., . . (2001). μ μ μ .
- 6) . . (1998). μ μ .

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., and Cabanes, F.J. (2001). Current importance of ochratoxin A-producing., *Aspergillus spp. J. Food Prot*, 6, 903–6.
- 2) Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella , G., and Cabanes, F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger var. niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2650–2.
- 3) Abramson, D., Sinha, R. N., & Mills, J. T. (1987). Mycotoxin formation in moist 2-row and 6-row barley during granary storage. *Mycopathologia*, 97, 179–185.
- 4) Abrunhosa, L., Santos, L., & Venancio, A. (2006). Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology*, 20, 231–242.

5) Abrunhosa, L., Serra, R., & Venancio, A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7493–7496.

6) Abrunhosa, L., & Venâncio, E. A. 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. *Biotechnological Letters* 29, 1909–1914.

7) Aish, J.L., Rippon, E.H., Barlow, T., and Hattersley, S.L. (2004). Ochratoxin A. In *Mycotoxins in Food: Detection and Control* (N. Magan and M. Olsen, eds), pp. 307–38. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd.

8) Aldred, D., & Magan, N. (2004). Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153, 165–171.

9) Alldrick, A. J. (1996). The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. *Food Additives and Contaminants*, 13(Suppl.), 27–28.

10) Aroyeun, S. O., & Adegoke, G. O. (2007). Reduction of ochratoxin A (OTA) in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. *African Journal of Biotechnology*, 6, 612–616.

11) Arroyo, M., Aldred, D., & Magan, N. (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 223–231.

12) Astoreca, A., Magnoli, C., Barberis, C., Combina, M., Chiacchiera, S. M., & Dalcerro, A. (2007). Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section Nigri strains isolated from different substrates in Argentina. *Science of the Total Environment*, 388, 16–23.

13) Atalla, M. M., Hassanein, N. M., El-Beih, A. A., & Youssef, Y. A. G. (2003). Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. *Nahrung*, 47, 6–10.

14) Aziz, N. H., Moussa, L. A. A., & Far, F. M. E. (2004). Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. *Journal of Food Safety*, 24, 109–127.

15) Bankole, S. A., & Adebajo, A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: Current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology*, 2, 254–263.

16) Baptista, A.S., Horii, J., Calori-Domingues, M.A., Micotti da Glória, E., Salgado, J.M., Vizioli, M.R., 2004. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20, 475–481.

17) Battilani, P. and Pietri, A. (2004). Risk assessment and management in practice: ochratoxin in grapes and wines. *In Mycotoxins in food, Detection and Control* (N. Magan and M. Olsen, eds), pp. 244–61. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

18) Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z., 2003. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66, 633–636.

19) Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., et al. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 125–30.

20) Bauer, J. (1994). Möglichkeiten zur Entgiftung Mykotoxinhaltiger Futtermittel. *Monatshefte für Veterinarmedizin*, 49, 175–181.

21) Baxter, E. D., Slaiding, I. R., & Kelly, B. (2001). Behaviour of ochratoxin A in brewing. *American Society of Brewing Chemists*, 59, 98–100.

22) Belli, N., Mariñ, S., Sanchis, V., and Ramos, A.J. (2002). Review: ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: Occurrence, regulations and samples of analysis. *Food Sci. Technol. Int.*, 8, 325–35.

23) Belli, N., Marin, S., Argiles, E., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2007b). Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Food Protection*, 70, 157–163.

24) Belli, N., Marin, S., Coronas, I., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2007a). Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxin A production in grapes. *Food Control*, 18, 1343–1349.

25) Belli, N., Marin, S., Sanchis, V., and Ramos, A.J. (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section Nigri obtained from grapes. *Int. J. Food Microbiol.*, 96, 19–27.

26) Belli, N., Ramos, A.J., Coronas, I., et al. (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 839–44.

27) Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., and Marin, S. (2006b). Effect of photoperiod and day-night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiol*, 23, 522–627.

28) Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1038-1044.

29) Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., and 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 Microbiol. Lett.*, 255, 203–8.

30) Benford, D., Boyle, C., Dekant, W., et al. (2001). Ochratoxin A. *In Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*, pp. 281–415. FAO Food and Nutrition Paper 74 / WHO Food Additives Series 47, WHO, Geneva, Switzerland.

31) Bhatnagar, D., Yu, J., Ehrlich, K.C., 2002. Toxins of filamentous fungi. *Chemical Immunology* 81, 167–206.

32) Birzele, B., Prange, A., Kramer, J., 2000. Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of levels in relation to storage parameters. *Food Addit. Contam.* 17, 1027–1035.

33) Bjornberg, A., Schnürer, J., 1993. Inhibition of the growth of grain storage moulds in vitro by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 623–628.

34) Blesa, J., Soriano, J.M., Molto, J.C., and Manes, J. (2006). Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46, 473–8.

35) Blevé, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108, 204-209.

36) 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.

37) Bucheli, P., & Taniwaki, M. H. (2002). Review. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives and Contaminants*, 19, 655–665.

38) Burdaspal, P. A., & Legarda, T. M. (1999). Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, 299, 107–113.

39) Cabanes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castella, G., Minguez, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology* 79, 213–215.

40) Cabras, R., Angioni, A., 2000. Pesticide residues in grapes, wines and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 967–973.

41) Cabras, R., Angioni, A., Garau, V.L., Pirisi, F.M., Farris, G., Madau, G., Emont, G., 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3854–3857.

42) Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281–370.

43) Caridi, A., Cufari, A., Galvano, F., Geria, M., Postorino, S., Tafuri, A., Ritieni, A., 2004b. New microbiological approach to reduce ochratoxin levels in alcoholic beverages. 19th International ICFMH Symposium Food Micro 2004, Portorož, Slovenia, p. 264.

44) Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A., 2005a. Ochratoxin A removal during alcoholic fermentation. First International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld2005, Badajoz, Spain, p. 518.

45) Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A., 2005b. Yeast selection for ability to remove ochratoxin A during winemaking. International Workshop on Advances in Grapevine and Wine Research, Venosa, Italy, p. 48.

46) Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A., 2006a. In-vitro screening of *Saccharomyces* strains for ochratoxin A removal from liquid medium. *Annals of Microbiology* 56, 135–137.

47) Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A., 2006b. Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 122–126.

48) Caridi, A., 2007. New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *International Journal of Food Microbiology* 120 (2007) 167–172.

49) 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*, 49, 3917–3921.

50) Chalutz, E., Ben Arie, R., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B., Wilson, C.L., 1988. Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. *Phytoparasitica* 16, 69.

51) Chand-Goyal, T., Spotts, R.A., 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Technology* 7, 51–64.

52) Chelack, W. S., Borsa, J., Marquardt, R. R., & Fohlich, A. A. (1991). Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2492–2496.

53) Cecchini, F., Morassut, M., Moruno, E. G., Di Stefano, R., 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology* 23, 411-417.

54) Chu, F. S., Chang, C. C., Ashoor, S. H., & Prentice, N. (1975). Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. *Applied Microbiology*, 29, 313–316.

55) Codex Alimentarius Commission, (1998). Position paper on ochratoxin A. Codex Committee on Food Additives and Contaminants thirty-first session, 22–26 March, CX/FAC 99/14, The Hague, The Netherlands.

56) Codex Alimentarius Commission (2003). Report of the 34th session of the codex committee on food additives and contaminants. Codex Alimentarius Commission Alinorm 03/12 appendix XII, 100–104.

57) Creppy, E.E. (1999). Human ochratoxins. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, 18, 277–93.

58) Creppy, E.E., Kane, A., Dirheimer, G., et al. (1985). Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.*, 28, 29–35.

59) Dakovic, A., Tomasevic-Canovic, M., Dondur, V., Rottinghaus, G. E., Medakovic, V., & Zaric, S. (2005). Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46, 20–25.

60) Dakovic, A., Tomasevic-Canovic, M., Rottinghaus, G. E., Dondur, V., & Masic, A. (2003). Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30, 157–165.

61) Dalie D.K.D., Deschamps A.M., & Richard-Forget F. (2009). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21 (2010) 370–380.

62) Deberghes, P., Betbeder, A. M., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J. F., Krivobok, S., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., & Creppy, E. E. (1995). Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: Prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, 11, 37–47.

63) Deberghes, P., Deffieux, G., Gharbi, A., Betbeder, A. M., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J. F., & Creppy, E. E. (1993). Detoxification de l'ochratoxine A par des moyens physiques, chimiques et enzymatiques. *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*, 231, 75–82.

64) De Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., et al. (2007). *Aureobasidium pullulans* strains degrade ochratoxin A in vitro and protect wine grape from ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius*. *IOBC WPRS Bull.*, 30, 203–7.

65) Delage, N., d'Harlingue, A., Ceccaldi, B. C., & Bompeix, G. (2003). Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food Control*, 14, 225–227.

66) Del Prete, V., Rodriguez, H., Carrascosa, A.V., de las Rivas, B., Garcia-Moruno, E., Munoz, R., 2007. *In Vitro* Removal of Ochratoxin A by Wine Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 70, 2155-2160.

67) De Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., van den Ende, H., 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 491-9.

68) Devegowda, G., Aravind, B.I.R., Morton, M.G., 1996. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. Proceedings of the Eighth Australian Poultry Science Symposium, Sydney, Australia, pp. 103–106.

69) Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed – Council statement. *Official Journal*, L 140, 10–22.

70) Elad, Y. (1994). Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Prot.*, 13, 35–8.

71) El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkänen, H., 2002. Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants* 19, 680–686.

72) EMAN, (2003). Prevention of ochratoxin A in cereals. EMAN OTA PREV Final Report Summary, 1–13.

73) EMAN (2004). Fact sheets on HACCP – Prevention and control. Available at: <http://193.132.193.215/eman2/fsheet3_1.asp> (accession date: 2008/03/10).

74) EMAN (European Mycotoxin Awareness Network). (2005). Fact sheets on evaluation and risk issues, fact sheet 1, decontamination, processing effect and risk analysis aspects. Available online at: <<http://193.132.190.215/eman2/index.asp>>.

75) Eskola, M. (2002). Study on trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in Finnish cereals: Occurrence and analytical techniques. *EELA Julkaisuja publications*, 3,1–78.

76) Esser K., Lemke P.A. (1996). *The MycotaIV, Human nad Animal Relationships*, Springer.

- 77)** Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., and Cabanes, F.J. (2005). Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. *J. Food Prot.*, 68, 1435–40.
- 78)** Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., and Cabanes, F.J. (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus Carbonarius*. *Food Microbiol.*, 23, 634–40.
- 79)** European Commission, 2007. Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L364, 5-24.
- 80)** Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (2004). Worldwide regulations for mycotoxins, a compendium. *FAO Food and Nutrition Paper*, no. 81.
- 81)** FAO (2006). Reducing OTA in coffee. Available at: <http://www.coffee-ota.org/>(accession date: 2008/03/10).
- 82)** FAO/WHO/UNEP (1999a). Minimising risks posed by mycotoxins utilising the HACCP Concept. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference On Mycotoxins, 8 b, 1–13. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco8b.pdf> (accession date: 2008/03/10).
- 83)** FAO/WHO/UNEP (1999b). Mycotoxin prevention and decontamination, corn - a case study. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference On Mycotoxins, 6b, 1–11. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco6b.pdf> (accession date:2008/03/10).
- 84)** FAO/WHO/UNEP (1999c). Mycotoxin prevention and decontamination, HACCP and its mycotoxin control potential: An evaluation of ochratoxin A in coffee production. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference On Mycotoxins, 6 c, 1–13. Available at: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco6c.pdf> (accession date: 2008/03/10).
- 85)** Fazekas, B., Tar, A.K., Zomborsky-Kovacs, M., 2002. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Vet. Hung.* 50, 177–188.
- 86)** Fernandes, A., Ratola, N., Cerdeira, A., Alves, A., & Venancio, A. (2007). Changes in ochratoxin A concentration during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 92–96.

87) Frisvad, J.C., Lund, F. Elmholt, S. (2005). Ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum* isolates from cereals reveal large AFLP fingerprinting variability. *J. Appl. Microbiol.* 98: 684-692

88) Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmuller, S., 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1398-1407.

89) Galvano, F., Ritieni, A., Piva, G., Pietri, A., 2005. Mycotoxins in the human food chain. In: Diaz, D. (Ed.), *Mycotoxins Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 187–224.

90) Gambuti, 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.

91) Galtier P., (1978), Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology – Ochratoxin A, *Vet. Sci. Commun.*, **1**, 349–358.

92) Galtier, P., (1999). Biotransformation and fate of mycotoxins. *J. Toxicol-Toxin Rev.* 18: 295-312.

93) Gianluca Bleve, Francesco Grieco, Giuseppe Cozzi, Antonio Logrieco & Angelo Visconti (2005). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108 (2006) 204–209.

94) Gimeno, A. (2000). Micotoxinas, introduccion. XVII Congreso centroamericano y del Caribe de avicultura. Available at: <http://www.engormix.com> (accession date: 2008/03/10).

95) Griffin H. (1992). *Fungal Physiology*, Second Edition.

96) Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T., 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3086–3091.

97) Hassan, A.M., Sheashaa, H.A., Fattah, M.F.A., et al. (2006). Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants. *Ped. Nephrol.*, 21, 102–5.

98) Heilmann, W., Rehfeldt, A. G., & Rotzoll, F. (1999). Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *European Food Research Technology*, 209, 297–300.

99) Hosono, A., Hisamatsu, S., 1995. Binding of amino acid pyrolysates and aflatoxins to autoclaved cells of *Enterococcus faecalis* FK-23. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 940–942. Howes, A.D., Newman, K.E., 2000. Compositions and Methods for Removal of Mycotoxins from Animal Feed. U.S., US 6045834.

100) Huwing, A., Freimund, S., Kappeli O., Dutler H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbent. *Toxicology Letters* 122, 179-188.

101) IARC, 1993, International Agency for Research on Cancer (pp. 489–521). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins (vol. 56). Lyon, France: World Health Organization.

102) ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1996), Toxigenic fungi: *Aspergillus* in ICMSF, Microorganisms in foods 5. Characteristics of Food Pathogens, London, Blackie Academic and Professional, 347–81.

103) ICV, Institute Francais du Vin, (2002). Ochratoxine A dans les vins. *Etat des connaissances. ICV*, 9.

104) Il'ichev, Y.V., Perry, J.L., Ruker, F., et al. (2002). Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. *Chem. Biol. Interact.*, 141, 275–93.

105) JEFCA, 2001, JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Ochratoxin A. In: Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Ser 47, *FAO Food and Nutrition Paper* 74. WHO, Geneva 2001, 366.

106) Jorgensen, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 15, 550–554.

107) Kabak, B., Dobson, A.D.W., and VAR, I. (2006). Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46: 593-619.

108) Karabulut, O.A., Smilanick, J.L., Gabler, F.M., et al. (2003). Near-harvest applications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. *Plant Dis.*, 87, 1384–9.

109) Kapetanakou A.E., Ampavi A., Yanniotis S., Drosinos E.H., Skandamis P.N., 2010. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius in vitro* and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food microbiology*, In Press.

110) Klich, M.A. and Pitt, J.I. (1988). A Laboratory Guide to the Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs. North Ryde, Australia: CSIRO Division of Food Processing.

111) Knasmuller, S., Steinkellner, H., Hirschl, A.M., Rabot, S., Nobis, E.C., Kassie, F., 2001. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat. Res.*, 129–138.

112) Krogh, P., Hald, B., Gjertsen, P., & Myken, F. (1974). Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. *Applied Microbiology*, 28, 31–34.

113) Kunkee, R. E. (1967). Malo-lactic fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 9, 235–279.

114) Leong, S. L. 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, 245–252.

115) Leong, S.L.L., Hocking, A.D., and Scott, E.S. (2006d). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolates on a simulated grape juice medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 110, 209–16.

116) Leong, S.L., Hocking, A.D., and Scott, E.S. (2007). *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyards soil and infection of Semillon bunches in Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 102, 124–33.

117) Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F., and Salerno, M. (1997). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biol. Technol.*, 10, 169–78.

118) Lindner, W. (1992). Decontamination and detoxication of cereals contaminated by mycotoxins. Patent number: WO9216116.

119) Lock, E.A. and Hard, G.C. (2004). Chemically induced renal tubule tumors in the laboratory rat and mouse: review of the NCI/NTP database and

categorization of renal carcinogens based on mechanistic information. *Crit. Rev. Toxicol.*, 34, 211–99.

120) Lopez-Garcia, R., Augusto Mallmann, C., & Pineiro, M. (2008). Design and implementation of an integrated management system for ochratoxin A in the coffee production chain. *Food Additives and Contaminants*, 25, 231–240.

121) Luchese, R.H., Harrigan, W.F., 1993. Biosynthesis of aflatoxin — the role of nutrition factors. *Journal of Applied Microbiology* 74, 5–14.

122) Magan, N., & Aldred, D. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, 1, 10–16.

123) Magan, N., Hope, R., Cairns, V., & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 723–730.

124) Magan, N., Olsen, M., 2004. Absorption, distribution, metabolism and excretion of OTA. *Mycotoxins in food* 307-309. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.

125) Magnoli, C., Astoreca, C., Ponsone, L., et al. (2004). Survey of microflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, 326–31.

126) Magnusson, J., Ström, K., Roos, Sjögren, J., & Schnurer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 129–135.

127) Maicas, S., Ferrer, S., & Pardo, I. (2002). NAD(P)H regeneration in *Oenococcus oeni* during heterolactic fermentation of hexoses. *Microbiology*, 148, 325–332.

128) Marín, S., Albareda, X., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (2001) Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 11, 1060-1068.

129) Marin, S., Guynot, M. E., Neira, P., Bernado, M., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2002). Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak acid preservatives in the control of mold growth on bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 203–211.

130) Marin, S., Magan, N., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (2004) Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection* 67, 1792-1805.

131) Marquardt R.R., Frohlich A.A (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. anim. Sci.* 70, 3968-3988.

132) Masoud, W., Høj Kaltoft, C., 2006. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology* 106, 229-234.

133) Mateo, R., Medina, A., Mateo, F., Mateo, E. M., & Jimenez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 79–83.

134) Mateo E. M., Medina A., Mateo F., Valle-Algarra F.M., Pardo I., Jimenez M., 2009. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control* 21 (2010) 23–28.

135) Mateo, E. M., Medina, ., Mateo, F., Valle-Algarra, F.M., Pardo, I., Jimenez, M., 2010. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control* 21, 23-28.

136) McGuire, R.G., 1994. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biological Control* 4, 1–7.

137) Meca G., Blaiotta, G., Ritieni, A., 2010. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* 21, 579-583.

138) Medina, A., Jimenez, M., Gimeno-Adelantado, J. V., Valle-Algarra, F. M., & Mateo, R. (2005). Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A*, 1083, 7–13.

139) Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., Mateo, F., & Jimenez, M. (2006). New method for determination of ochratoxin

A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *Journal of Chromatography A*, 1121, 178–183.

140) Medina, A., Jimenez, M., Mateo, R., & Magan, N. (2007b). Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2234–2239.

141) Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M., & Jimenez, M. (2007a). Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 230–235.

142) Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., and Magan, N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 439–45.

143) Moller T.E and Nyberg M. (2003). Ochratoxin A in raisins and currants: basic extraction procedure used in two small marketing surveys of the occurrence and control of the heterogeneity of the toxins in samples, *Food Additives and Contaminants* 20, No. 11, pp. 1072-1076.

144) Moruno, G., Sanlorenzo E. C., Boccaccino B., Di Stefano R., 2005. Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 73-76.

145) Moss, M.O. (1996). Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 135: 5-9.

146) Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M., 2006. Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science* 71, R51-R65.

147) Nguiefack, J., Nguikwie, S. K., Fotio, D., Dongmo, B., Amvam Zollo, P. H., Leth, V., et al. (2007). Fungicidal potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* to control *Alternaria padwickii* and *Bipolaris oryzae*, two seed-borne fungi of rice (*Oryza Sativa* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 19, 581–587.

148) Nunez, Y.P., Pueyo, E., Carrascosa A.V., Martinez-Rodriguez A.J. Effects of Aging and Heat Treatment on Whole Yeast Cells and Yeast Cell Walls and on Adsorption of Ochratoxin A in a Wine Model System. *Journal of Food Protection*, Vol.71, No.7, 2008 ,Pages 1496-1499.

- 149)** Obrecht-Pflumio, S., Chassat, T., Dirheimer, G., and Marzin, D. (1999). Genotoxicity of ochratoxin A by *Samonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutat. Res.*, 446, 95–102.
- 150)** Osborne, B. G. (1979). Reversed-phase high performance liquid chromatography determination of ochratoxin A in flour and bakery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30, 1065–1066.
- 151)** Ospital, M., Cazabeil, J. M., Betbeder, A. M., Tricard, C., Creppy, E. E., & Medina, B. (1998). L'ochratoxine A dans les vins. *Enologie*, 169, 16–19.
- 152)** 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.
- 153)** Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Anton. van Leeuw.* 82, 279–289.
- 154)** Palumbo, J. D., O'Keeffe, T. L., & Mahoney, N. E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164, 241–248.
- 155)** Park, D. L., Njapau, H., & Boutrif, E. (1999). Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *FAO FNA/ANA* 23, 49–55.
- 156)** Paul, L.B. (1999). *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiol. Lett.*, 181, 277–280.
- 157)** El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkänen, H., 2002. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants* 19, 680–686.
- 158)** Perez de Obanos, A., Gonzalez-Penas, E., & Lopez de Cerain, A. (2005). Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. *Food Additives and Contaminants*, 22, 463–471.
- 159)** Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck P., Lebrihi A., 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1495-1502.
- 160)** Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. and Castegnaro, M. (1988) Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic

nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants* 5, 299–301.

161) Peteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C., & Varga, J., 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology* 24, 205-210.

162) Petersson, S., Schnürer, J., 1995. Biocontrol of mould in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1027–1032.

163) Petzinger E., Ziegler K., (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal Vet. Pharmacol.* 23, 91-98.

164) Piotrowska, M., Zakowska, Z., 2000. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Prog. Biotechnol.* 17, 307–310.

165) Piotrowska, M., Zakowska, Z., 2005. The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Pol. J. Microbiol.* 54, 279-286.

166) Plank, G., Bauer, J., Grunkemeier, A., Fischer, S., Gedek, B., & Berner, H. (1990). Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Adsorbentien gegenüber Ochratoxin A beim Schwein. *Tierärztliche Praxis*, 18, 483–489.

167) Polastro, S., Angelini, R.M.D., and Faretra, F. (2006). A new semi-selective medium for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *J. Plant Pathol.*, 88, 107–12.

168) Prescott, Harley, Klein (1999). *Microbiology* 4th edition, WCB.

169) Pusey, P.L. (1989). Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pest. Sci.*, 27, 133–40.

170) Quillien, J. F. (2002). Mycotoxins. INRA 3: 1–24. Available at: <<http://www.nutrition.org.uk>> (accession date: 2008/03/10).

171) Raju, M.V.L.N., Devegowda, G., 2000. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science* 41, 640–650.

172) Ratola, N., Abade, E., Simoes, T., Venancio, A., & Alves, A. (2005). Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 405–409.

173) Ratola, N., Martins, L., & Alves, A. (2004). Ochratoxin A in wines—assessing global uncertainty associated with the results. *Analytica Chimica Acta*, 513, 319–324.

174) 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.

175) Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J. P., Auclair, E., & Larondelle, Y. (2007). In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*, 98, 1812–1821.

176) Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Oriol, E., Larondelle, Y., 2005. Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry* 40, 3008-3016.

177) Rivka, B.G., Nachman, P., (2008). Biological control of patulin and ochratoxin A producing fungi. *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* 311-333. Academic Press is an imprint of Elsevier.

178) Robertson, A., 2005. Risk of aflatoxin contamination increases with hot and dry growing conditions. *Aflatoxins in corn* 185-186.

179) Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., van Sinderen, D., 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* 104, 915–923.

180) Sage, L., Garon, D., and Seigle-Murandi, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin. A risk in French vineyards. *J. Agric. Food. Chem.*, 52, 5764–8.

181) Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., et al. (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1306–11.

182) Santin, E., Paulillo, A.C., Maiorka, A., Satiko, L., Nakaghi, O., Macari, M., Fischer da Silva, A.V., Alessi, C., 2003. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *International Journal of Poultry Science* 2, 341-344.

183) Santos, A., Marquina, D., Leal, J.A. and Peinado, J.M., 2000. (1,3,6)-b-D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranefaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1809-1813.

184) Savino, M., Limosani, P., & Garcia-Moruno, E. (2007). Reduction of ochratoxin A contamination in red wines by oak wood fragments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 97–101.

185) Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., De Vos, W.M., 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 204–211.

186) SCF (1998). Opinion on ochratoxin A. Expressed on 17 September 1998, the Scientific Committee on Food, the European Commission. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out14_en.html.

187) Schall, N., Simmler-Hubenthal, H., & Sud-Chemie, A. G. (2002). Use of activated layered silicates for the adsorption of mycotoxins. Patent number: WO0240150.

188) Schillinger U., Varela Villarreal J. 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* 21, 107-111.

189) Scott, P. M. (1996). Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: Introduction. *Food additives and contaminants*, 13 (Suppl.), 19–21.

190) Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lawrence, G. A., Daley, E. F., & Farber, J. M. (1995). Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Additives and Contaminants*, 12, 31–40.

191) Scudamore, K. A., Banks, J., & MacDonald, S. J. (2003). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants*, 20, 1153–1163.

192) Scudamore, K. A., Patel, S., & Breeze, V. (1999). Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food additives and contaminants*, 16, 281–290.

193) Skrinjar, M., Rasic, J.L., Stojicic, V., 1996. Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiol.* (Praha) 41, 26–28.

194) Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., Gullino, M.L., 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 123–134.

195) Spadaro, D., Gullino, M.L., 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 185–194.

196) Stander, M.A., Bornscheuer, U.T., Henke, E., Steyn, P.S., 2000. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 5736-5739.

197) Stanley, V.G., Ojo, R., Woldesenbet, S., Hutchinson, D.H., 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science* 72, 1867–1872.

198) Stidl, R., Fuchs, S., Koller, V., Marian, B., Sontag, G., Ehrlich, V., Knasmueller, S., 2007a. DNA-protective properties of lactic acid bacteria. In: Durackova, Z., Slamenova, D. (Eds.), *Synthetic and Natural Compounds in Cancer Therapy and Prevention*. Bratislava, Slovakia.

199) Suarez-Quiroz, M. L., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. P. (2004). Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiology*, 21, 629–634.

200) Suzuki S, Satoh T and Yamazaki M (1977), The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats, *Jpn J. Pharmacol.*, 27, 735–44.

201) Tangni, E. K., Simonis, J., Larondelle, Y., & De Meeus, D. A. L. (2005). Decontaminating and detoxifying liquid food media, especially beer, using insoluble vegetable fibers to adsorb mycotoxins. Patent number: WO2005007794-A1 (2005/01/27).

202) Tassou C.C., Natskoulis P.I., Magan N. and Panagou E.Z. 2009. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production boundaries of two *Aspergillus carbonarius* isolates on a simulated grape juice medium. *Journal of Applied Microbiology* 107, 257–268.

203) Tomasevic-Canovic, M., Dakovic, A., Rottinghaus, G. E., Matijaskjkjevic, S., & fluricic, M. (2003). Surfactant modified zeolites-new

efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials*, 61, 173–180.

204) Turbic, A., Ahokas, J.T., Haskard, C.A., 2002. Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit. Contam.* 19, 144–152.

205) Trucksess, M. W., Giler, J., Young, K., White, K. D., & Page, S. W. (1999). Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. *Journal of AOAC International*, 82, 85–89.

206) Valente, L. M., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1985). Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68, 1128–1130.

207) Valero, A., Farre, J.R., Sanchis, V., et al. (2006a). Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures. *Food Microbiol.*, 23, 753–6.

208) Valero, A., Marin, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2007b). Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 194–199.

209) Valero, A., Olivan, S., Marin, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2007a). Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by *Aspergillus* section Nigri in grapes during dehydration. *Food Microbiology*, 24, 254–259.

210) Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J. and Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4461-4464

211) Varga, J., & Kozakiewicz, Z. (2006). Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 72–81.

212) Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, J., & Vagvolgyi, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 321–328.

213) Varga, J., Rigó, K., Téren, J., 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology* 59, 1–7.

214) Wegst, W. and Lingens, F. (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 341-344.

- 215)** Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 302–313.
- 216)** Wilson, C.L, Wisniewski, M.E., 1989. Biological control of post harvest diseases of fruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology* 27, 425–441.
- 217)** Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Biles, C.L., et al. (1991). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables – alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot.*, 10, 172–7.
- 218)** Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C.-G., François, J., Bertin, G., Jouany, J.-P., 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnology Letters* 25, 783–789.
- 219)** Zaghini, A., Roncada, P., Anfossi, P., Rizzi, L., 1998. Aflatoxin B1 oral administration to laying hens: effects on hepatic MFO activities and efficacy of a zeolite to prevent aflatoxicosis B1. *Revue de Medecine Veterinaire* 6, 668–669.
- 220)** Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., et al. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biol. Technol.*, 20, 115–24.
- 221)** Zimmerli, B., & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B*, 666, 85–99.
- 222)** Zimmerli, B., & Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 655–668.