

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АКОПЯН ЛУСИНЕ ЛЕВОНОВНА

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПРОИЗВОДСТВА СУШЕНОГО
ВИНОГРАДА НА ВИДОВОЙ СОСТАВ МИКРОМИЦЕТОВ-
КОНТАМИНАНТОВ И НА ИХ ТОКСИГЕННОСТЬ**

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности “03.00.17” – “Микология”**

**Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
К.М. Григорян**

Ереван 2016

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀԱԿՈԲՅԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ԼԵՎՈՆԻ

ՉՈՐԱՑՐԱԾ ԽԱՂՈՂԻ ՈՐՈՇ ՈՐԱԿԱԿԱՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ԵՎ
ԱՐՏԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՉԱՓՈՐՈՇԻՉՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԱՂՏՈՏԻՉ ՄԻԿՐՈՄԻՑԵՏՆԵՐԻ ՏԵՍԱԿԱՅԻՆ ԿԱԶՄԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ
ՏՈՔՄԻԿՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Գ.00.17 “Մակաբանություն” մասնագիտությամբ կենսաբանական
գիտությունների թեկնածուի աստիճանի հայցման

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅՈՒՆ

Գիտական ղեկավար՝
Կենս. գիտ. թեկնածու
Կ.Ս. Գրիգորյան

ԵՐԵՎԱՆ 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Страны производящие сушеный виноград. Экономические данные в мировом масштабе.	11
1.2. Разновидности сушеного винограда и показатели качества	13
1.3. Микобиота сушеного винограда и проблема его контаминации охратоксином А в мире	18
1.4. Технологии сушки винограда и влияние их условий на качество готового продукта	22
1.5. Употребление SO ₂ , его опасность и лимитирование	25
1.6. Актуальность проблемы загрязнения свежих плодов винограда микроскопическими грибами и их микотоксинами	27
1.7. Основные условия выращивания винограда и сбора урожая	29
1.8. Охратоксин А. Структура. Продуцирующие грибы. Токсичность.	31
1.9. Влияние физико-химических параметров на рост микромицетов и синтез ОТА	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	37
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНТАМИНИРУЮЩЕЙ МИКОБИОТЫ ИЗУЧЕННЫХ СОРТОВ СУШЕНОГО ВИНОГРАДА	47
3.1. Таксономический анализ видов грибов, изолированных из образцов сушеного винограда	47
3.2. Сравнение видового состава мицелиальных грибов, выделенных из армянских и импортированных образцов сушеного винограда	54
3.3. Сравнительный анализ микобиоты белых и темных сортов сушеного винограда	60
3.4. Видовой состав грибов–контаминантов сушеного винограда в Армении в разные годы исследования	62
3.5. Недавно описанные виды грибов из секции <i>Aspergillus Nigri</i> , выделенные из образцов сушеного винограда	66
ГЛАВА 4. МИКОБИОТА ПОЧВЫ И СВЕЖИХ ПЛОДОВ ВИНОГРАДА ИЗ ВИНОГРАДНИКОВ РАЗНЫХ ОБЛАСТЕЙ АРМЕНИИ	72
4.1. Микологический анализ образцов почвы из–под виноградной лозы	72
4.2. Микологический анализ свежих плодов винограда	76

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ТЕХНОЛОГИИ СУШКИ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В СУШЕНОМ ВИНОГРАДЕ	82
5.1. Влияние активности воды (a_w) и pH	83
5.2. Влияние технологии сушки	85
5.3. Результаты исследования влияния условий хранения	90
5.4. Содержание SO_2 в разных сортах сушеного винограда.....	93
ГЛАВА 6. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ СУШЕНОГО ВИНОГРАДА И СВЕЖИХ ПЛОДОВ ВИНОГРАДА	96
6.1. Определение токсичности грибов-потенциальных продуцентов ОТА методом биотестирования.....	97
6.2. Определение токсичности штаммов <i>A. flavus</i> , методом биотестирования	100
6.3. Определение ОТА в экстрактах штаммов <i>A. carbonarius</i> методом тонкослойной хроматографии	101
6.4. Определение афлатоксина B_1 в экстрактах штаммов <i>A. flavus</i> методом тонкослойной хроматографии	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	111
РЕКОМЕНДАЦИИ	113
ЛИТЕРАТУРА	114

ВВЕДЕНИЕ

Безопасность пищевых продуктов вызывает большую обеспокоенность у потребителей как развитых, так и развивающихся стран. Болезни пищевого происхождения представляют собой угрозу для здоровья потребителей, нанося серьезный экономический ущерб государству (FAO/WHO, 2002). Инфекции, токсикозы и микотоксикозы, связанные с употреблением контаминированных продуктов, являются причиной развития острых и хронических заболеваний в слаборазвитых и развитых странах (WHO, 2008). Для обеспечения биобезопасности пищевых продуктов, в том числе микологической и микотоксикологической, на всех стадиях их производства, хранения и реализации необходимо провести научно-обоснованную оценку биологических рисков. Результаты такой оценки служат основой для разработки рекомендаций по предотвращению рисков (FAO/WHO, 2006). Одним из главных способов управления рисками в пищевой промышленности является внедрение системы гигиенической сертификации по HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points). Принципы HACCP применяются на всех этапах производства продуктов питания, от вегетации сырья до процесса реализации готовых продуктов.

К особо опасным биологическим контаминантам пищевых продуктов относятся микотоксины - вторичные метаболиты микроскопических плеснеобразующих грибов. Большинство из них обладают мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Контаминация пищевых продуктов, в том числе свежих и переработанных продуктов растительного происхождения токсинообразующими мицелиальными грибами, является важной актуальной проблемой почти для всех стран (Barkai-Golan & Paster, 2008).

К числу наносящих наибольший экономический ущерб микотоксинов, контаминирующих фруктовые плоды и ягоды относятся афлатоксины, охратоксины и патулин. Продуцентами указанных микотоксинов являются мицелиальные грибы, в основном, из родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Поражение плодово-ягодных культур, в том числе и винограда, мицелиальными грибами, имеет место в период вегетации, сбора урожая, хранения и их переработки.

Одним из основных методов, широко используемых в международной практике по регулированию употребления контаминированного продовольственного сырья и готовых пищевых продуктов микотоксинами, является лимитирование их количественного содержания. Предельно допустимые количества микотоксинов в продовольственном сырье и пищевых продуктах представлены в международных регулированиях Кодекс Алиментариус, инструкциях и директивах ЕС. При этом учитываются такие характеристики как суточное потребление определенных видов продуктов питания, благоприятных для биосинтеза микотоксинов возраст и состояние здоровья потребителей и др.

Актуальность проблемы контаминации сырьевого винограда штаммами вида *Aspergillus carbonarius* и другими видами из секции *Aspergillus Nigri*, в качестве активных продуцентов ОТА (охратоксина А), впервые была выявлена в 1996 г (Zimmerli & Dick, 1996). Важность указанной проблемы в короткий период была доказана учеными в многочисленных научных исследованиях, проводимых в разных странах мира. Изюм и другие разновидности сушеного винограда являются благоприятным субстратом для роста мицелиальных грибов из секции *Aspergillus Nigri* и биосинтеза охратоксина А (Alghalibi and Shater, 2004). В сушеном винограде основным продуцентом охратоксина А является вид *Aspergillus carbonarius* (Magnoli et al., 2003). В последние годы отмечается тенденция роста случаев обнаружения ОТА в сушеном винограде. Учитывая его токсичные свойства (нефротоксичные, генотоксичные, иммунотоксичные и тератогенное) и способность накапливаться в почках, возникла необходимость его лимитирования в пищевых продуктах. В сухофруктах, в том числе и в сушеном винограде, максимально допустимое количество ОТА составляет 10 мкг/кг (EC Regulation No 1881/2006).

Производство сушеного винограда составляет 50% от мирового производства сухофруктов. Главными производителями и поставщиками сушеного винограда являются США, Турция и Иран. Армения также имеет потенциальные возможности для увеличения объемов производства сушеного винограда и выхода на международный рынок.

На контаминацию сушеного винограда плеснеобразующими грибами и их токсинами значительное влияние оказывает ряд физико-химических параметров, таких, как активность воды, температура, содержание диоксида серы и др. Изучение

влияния указанных факторов на биосинтез ОТА оказывает неоценимую помощь при организации мероприятий по предотвращению распространения грибов-продуцентов ОТА в районах виноградарства в период вегетации, сбора урожая и в процессе сушки, обеспечивая микологическую и микотоксикологическую безопасность сушеного винограда.

Для предотвращения вторичной контаминации готового продукта важное значение имеет наличие хорошей гигиенической (ХГП) и производственной практики (ХПП) на предприятиях по производству сушеного винограда.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является выявление источников контаминации сушеных плодов винограда охратоксигенными видами грибов, охратоксином А и определение критически контрольных точек на всех стадиях их производства.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучить микобиоту контаминирующую армянские и импортированные сорта сушеного винограда и определить степень их заспоренности охратоксигенными видами грибов из секции *Aspergillus Nigri*.
2. С целью выявления источников загрязнения сушеных плодов винограда охратоксином А выявить виды микромицетов, встречающиеся в почве из-под виноградной лозы и контаминирующие ягоды винограда в период вегетации и созревания.
3. Изучить влияние физико-химических факторов на развитие охратоксигенных грибов, загрязняющих сушеный виноград и на синтез ОТА.
4. Изучить влияние технологии и условий сушки на уровень загрязненности готового продукта токсигенными грибами из секции *Aspergillus Nigri*.
5. Определить критически контрольные точки (ККТ) в процессе производства сушеного винограда в Армении.
6. Определить влияние уровня диоксида серы (SO_2) на степень контаминации армянских и импортированных образцов сушеного винограда плеснеобразующими грибами и охратоксином А.
7. Исследовать токсигенный потенциал изолированных штаммов грибов и выявить наличие ОТА в образцах сушеного винограда местного производства.

Научная новизна. Впервые в Армении изучен видовой состав микобиоты сушеного винограда, который используется в качестве готового к употреблению продукта, а также ингредиента для хлебобулочных и кондитерских изделий и некоторых кулинарных блюд.

Из сушеного винограда (изюм и кишмиш) местного производства изолированы охратоксигенные виды *A. carbonarius* и *A. niger* и определен их токсигенный потенциал. Выявлены активные продуценты охратоксина А. Составлен банк культур микромицетов из секции *Aspergillus Nigri* – активных продуцентов ОТА.

В образцах армянского сушеного винограда идентифицированы два недавно описанных охратоксигенных вида из секции *Aspergillus Nigri*: *A. lacticoffeatus* Frisvad&Samson и *A. sclerotioniger* Samson&Frisvad, для которых сушеный виноград в качестве субстрата отмечается впервые.

Исследованы критически контрольные точки в процессе выращивания винограда и производства сушеных плодов в Армении.

Практическое значение. Проведенные исследования свидетельствуют о наличии проблемы контаминации виноградников Армении и сушеных плодов винограда охратоксигенными видами грибов из секции *Aspergillus Nigri*. Результаты исследования показали высокую степень контаминации, как армянских, так и ввозимых сортов сушеного винограда грибами из секции *Aspergillus Nigri* – потенциальными продуцентами ОТА.

Определены основные факторы, способствующие накоплению ОТА в готовом продукте. Установлены критически контрольные точки в процессе сушки винограда.

Полученные результаты использованы для составления НАССР плана по выявлению опасностей и оценке рисков контаминированности охратоксигенными видами плеснеобразующих грибов в процессе сушки, с целью предотвращения биосинтеза ОТА.

Внедрены гигиенические мероприятия в процессе сушки винограда на ряде предприятий Армавирского района.

Для Армянской государственной службы по безопасности пищевых продуктов подготовлены предложения относительно принятия регламентов по содержанию охратоксина А в продуктах переработки винограда в соответствии с Директивой ЕС.

Апробация работы. Материалы исследований представлены на 6th Congress of Toxicology in Developing Countries, Croatia, 2006; на EFFOST Annual Meeting, Sustainability of the Agri – Food Chain. Hague, 2006; на XIIth International Congress of Mycology. IUMS Istanbul, Turkey, 2008; на International Students Conference on Life Science. Armenia, Yerevan, 2009; на Международной научной конференции «Армагрофорум» в Государственном аграрном университете Армении, 2009.

Основные положения выносимые на защиту.

1. Сушеный виноград часто контаминируется мицелиальными грибами из родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Alternaria*.
2. При микологическом анализе сушеного винограда часто выделяются охратоксигенные виды *A. carbonarius* и *A. niger*.
3. Основными факторами влияющими на рост грибов, загрязняющих сушеный виноград и на синтез микотоксинов являются активность воды (aw) и температура.
4. Технология сушки оказывает значительное влияние на степень контаминации сушеных плодов винограда микромицетами.
5. Штаммы *A. carbonarius* и *A. niger*, изолированные из образцов сушеного винограда, в большинстве случаев синтезируют ОТА в разных количествах.
6. В экстрактах штаммов *A. flavus*, выделенных из образцов сушеного винограда, часто обнаруживается афлатоксин В₁.
7. В проанализированных образцах сушеного винограда обнаружен охратоксин А и афлатоксин В₁ в разных количествах.

Опубликовано 24 научных работ, 10 из которых по теме диссертации.

1. Grigoryan K.M., Hakobyan L.L., Hayrapetyan H.G, Sargsyan M.P. Mycobiota of raisin from Armenian market and factors influencing its development // - Toxicology Letters. – Croatia. – 2006. – V. 164. – P. S 276.
2. Grigoryan K.M, Hakobyan L.L., Hayrapetyan H.G, Sargsyan M.P. Risk of contamination of grape – products by ochratoxin A // - EFFOST Annual Meeting, Sustainability of the Agri – Food Chain. – Hague. – 2006. – P. 6.08.
3. Hakobyan L.L., Grigoryan K.M.. Mycobiota of raisin from red grape // - XIIth International Congress of Mycology. – IUMS. – Istanbul. – Turkey. - 2008. - p. 748,

4. Hakobyan L.L. Comparative analyze of contamination level of Armenian and imported raisin by filamentous fungi // - International Students Conference on Life Science. - Armenia. –Yerevan. - 2009. - P. 11.
5. Акопян Л.Л., Григорян К.М.. К вопросу о распространенности видов из секции *Aspergillus Nigri* в образцах армянского и иранского изюма // - Известия Государственного аграрного университета Армении. - 2009. - том 1. - с. 93-97,
6. Hakobyan L., Grigoryan K., Kirakosyan A.. Contamination of Raisin by Filamentous Fungi – Potential Producers of Ochratoxin A // - Potravinarstvo. - ISSN: 1337-0960. - 2010. - Vol 4. - No 4. - P. 28-33.
7. Grigoryan K., Hakobyan L., Sargsyan M.. “Risk Assessment of Contamination of Grape Products by Ochratoxin A Producing Fungi in Armenia” // - Journal of Hygienic Engineering and Design. – Ohrid. - Republic of Macedonia. – 2011. -p. 97-100.
8. Hakobyan L.L. Fungi Species From *Penicillium* Genera in Raisins Consumed in Armenia // - Biological Journal of Armenia. - 2014. – Vol 66. – № 3. – p. 49-53.
9. Grigoryan K.M., Hakobyan L.L.. Effect of Water Activity, pH and Temperature on Contamination Level of Dried Vine Fruit by Filamentous Fungi During storage // - Proceedings of the Yerevan State University. – Chemistry and Biology. – 2015. – № 3. – p. 23–28.
10. Hakobyan L.L.. Detection of Toxicity of Filamentous fungi Isolated From Dried Vine fruit by Biotest Method. – Biological Journal of Armenia. – Vol 67. - № 4 – 2015. – p. 6-10.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из: введения, 6 глав, выводов, рекомендаций и списка цитированной литературы, который включает 236 наименований иностранных авторов. Работа изложена на 135 страницах и содержит 34 таблиц, 37 рисунков и 44 фотографий.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Страны производящие сушеный виноград. Экономические данные в мировом масштабе

Второй по значимости продукт виноградарства, после вина - это сушеный виноград (Shanmugavelue, 1989). Сушеный виноград применяют в производстве различных хлебобулочных и кондитерских изделий. Он повышает их калорийность, улучшает вкусовые качества и одновременно замедляет процесс черствения. Сушеный виноград составляет 50% мирового производства сухофруктов (FAS USDA). Он имеет высокую питательную ценность и высокую калорийность (264 – 279 кКал). Содержит 75% легкоусвояемых сахаров (глюкоза и фруктоза), 4—6% пектина, 1—3% органических кислот, около 2% минеральных веществ. В его состав входят такие микроэлементы, как фосфор, натрий, кальций, магний, железо, а также витамины К, С, Е, В₁, В₂, В₅, РР (никотиновая кислота) и другие полезные соединения (INDFC).

За счет содержания никотиновой кислоты, магния и витаминов В₁, В₂ и В₅, которые сохраняются в изюме, изюм укрепляет нервную систему. Калий, которым столь богат изюм, регулирует кислотно-щелочное равновесие в крови, активизирует мышечную работу сердца, улучшает передачу нервных импульсов, а также благоприятно влияет на работу почек и кожи. Изюм также благотворно влияет на легкие и сердце. В сушеном винограде содержится также много антиоксидантов, в частности, олеаноловая кислота, и фитовещества, которые подавляют рост бактерий, являющихся причиной стоматологических заболеваний.

В исторических книгах существуют заметки о том, что технология получения сушеного винограда путем солнечной сушки, используется с 1490 до н.э. Однако прошло несколько столетий, прежде чем были определены те виды винограда, из которых возможно было получить сушеный виноград хорошего качества. Армяне были одним из древних народов мира, которые имели развитое виноградарство и производили сушеный виноград. Финикийцы и армяне торговали изюмом с Грецией и Римом (Mencarelli, Bellincontro, 2005). С 120 по 900 годы до нашей эры интенсивно развивались новые технологии выращивания винограда и подбирались особые сорта для получения разных видов сушеного винограда. Как сообщают некоторые источники, впервые изюм завезли в Европу из Средиземноморских стран

крестоносцы в XI веке (Mencarelli, Bellincontro, 2005). В XIV веке изюм стал часто использоваться в европейской кухне, в связи с этим цены на сушеный виноград резко возросли. В настоящее время в кулинарии широко используется не только изюм, но и изюмный сок и изюмная паста для придания мясным блюдам особого аромата и вкуса.

Сегодня основными производителями и экспортерами сушеного винограда в мировом масштабе считаются США и Турция. Производство сушеного винограда в указанных странах составляет около 80% мирового производства (OIV Report, 2012). За ними следуют Китай, Иран и Чили (рис. 1.). По объемам экспорта сушеного винограда первое место занимает Турция, второе США, а третье - Иран (рис. 2.).

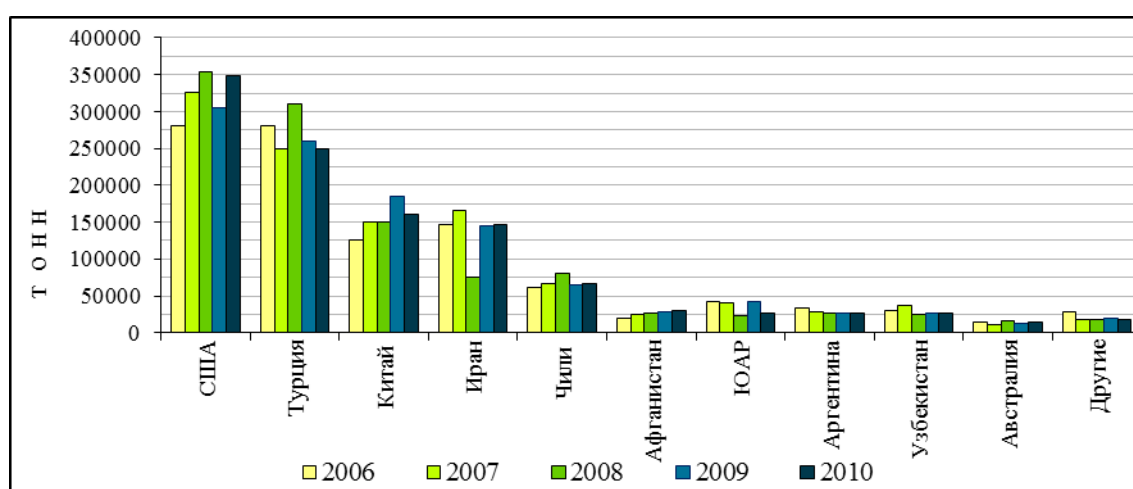


Рис. 1. Статистические данные по производству сушеного винограда в мире (источник – FAS USDA)

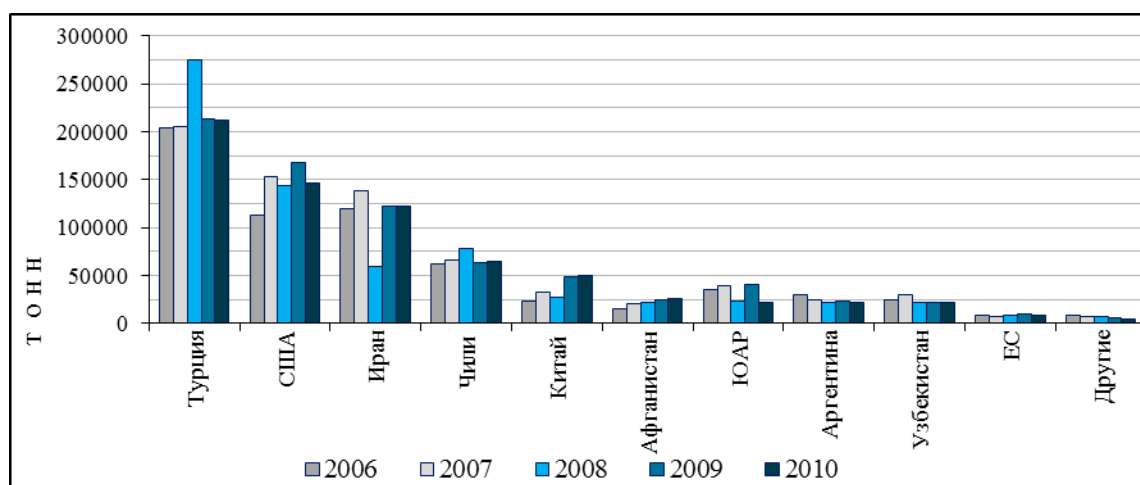


Рис. 2. Статистические данные по экспорту сушеного винограда в мире (источник – FAS USDA)

Основными импортерами изюма и других видов сушеного винограда являются: Великобритания, Германия, Нидерланды и Франция (табл. 1). Второе место по

импортированию сушеного винограда, после Европы, занимает Россия, за ней следуют Канада, Япония и Австралия.

Таким образом, экономические анализы свидетельствуют о постоянном росте производства и расширения торговли сушеным виноградом на международном рынке.

Табл. 1. Основные страны импортирующие сушеный виноград (в тоннах)
(источник – FAS USDA)

Страна	2006	2007	2008	2009	2010
Страны ЕС	336 600	349 900	325 000	338 600	338 000
Россия	70 325	70 500	64 500	71 700	54 000
Канада	32 800	32 500	31 300	29 300	32 800
Япония	31 850	32 300	27 300	29 700	29 300
Австралия	27 400	28 900	26 500	22 700	25 000
Бразилия	19 200	22 700	19 500	27 000	23 000
Украина	19 700	20 100	16 000	17 600	19 000
США	28 900	21 600	19 300	21 100	19 400
Китай	12 300	13 600	11 300	13 300	16 200
Арабские Эмираты	10 000	12 300	6 300	16 900	17 800
Ирак	6 000	6 000	14 400	15 900	16 000
Мексика	14 300	13 000	15 500	16 900	14 300
Другие	127 725	82 150	48 900	88 100	79 800

1.2. Разновидности сушеного винограда и показатели качества

Сушеный виноград производится из разных сортов винограда. При производстве разных сортов сушеного винограда используются разные технологии сушки. В зависимости от цвета ягод, сушеный виноград бывает светлым и темным. В зависимости от сорта и используемой технологии сушки различают три вида сушеного винограда: изюм, кишмиш и коринка (Covareli et al., 2012).

Изюм – получают из семенных сортов винограда. Существуют два вида изюма, светлый и темный.

При получении светлого изюма используют светлые сорта винограда, ягоды которого предварительно обрабатывают щелочью и сушат путем воздушно-солнечной или механизированной сушки. Для сохранения светлого цвета, сырьевой виноград обрабатывается диоксидом серы.

Темный или черный изюм получают из красных сортов винограда. Виноград сушат воздушно–солнечным или механизированным методом, без предварительной обработки.

Кишмиш – сушеный виноград, получаемый из бессемянных сортов винограда. Различают 4 разновидности кишмиша: сояги, сабза, бедона и шигани (ГОСТ 6882-88). Шигани получают из темных сортов винограда без предварительной обработки. При производстве остальных трех разновидностей используют белые сорта винограда. Сояги сушат в специальных помещениях, исключая попадание прямых солнечных лучей, а сабза и бедона– методом воздушно–солнечной или механизированной сушки. При получении сушеного винограда «сабза», сырьевой виноград предварительно обрабатывают щелочью и диоксидом серы.



(а)



(б)



(в)



(г)

Фото 1. (а) – Изюм светлый, (б) - Изюм темный, (в) - Кишмиш сабза или золотистый изюм, (г) - Черный коринка

Коринка или черный коринфский изюм – получают исключительно из черных сортов винограда без семян (Arthey, Ashurst, 2001). Обычно, сырьевой виноград не подвергается предварительной обработке и сульфитации. Черный коринфский изюм получают, в основном, в Греции, Калифорнии и в Австралии.

Пищевые продукты должны удовлетворять физиологическим потребностям человека в необходимых веществах и энергии, отвечать обычно предъявляемым к

пищевым продуктам требованиям в части органолептических и физико-химических показателей и соответствовать установленным нормативными документами требованиям к допустимому содержанию химических, радиоактивных, биологически активных веществ и их соединений, микроорганизмов и других биологических организмов, представляющих опасность для здоровья нынешних и будущих поколений (СанПин 2.3.2.1078-01).

Качество сушеного винограда во многом зависит от показателей микробиологической безопасности, к которым относятся патогенные и токсигенные микроорганизмы контаминирующие сушеный виноград. Сушеный виноград часто контаминируется плесневыми грибами, присутствие которых в пище представляет опасность для здоровья потребителя. Поэтому содержание плесневых грибов и некоторых других микроорганизмов в пище нормируются в СанПиН 2.3.2.1078-01 (табл.2).

Табл. 2. Нормативы микробиологических показателей в сушеном винограде (СанПиН .3.2.1078-01)

Наименование показателя	Норма
Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г	не более 5×10^4
Бактерии группы кишечной палочки (колиформные) в 0.1г. продукта	не допускаются
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы, в 25г. продукта	не допускаются
Плесневые грибы, КОЕ/г	не более 5×10^2
Дрожжи, КОЕ/г	не более 5×10^2

Оценка качества пищевого продукта основывается также на органолептических и физико-химических показателях, представленных в таблице 3. В зависимости от показателей качества сушеный виноград изготавливают высшего, первого и второго сортов.

Табл. 3. Физико-химические и органолептические показатели разных сортов сушеного винограда в соответствии с ГОСТ 6882 – 88

Наименование сушеного винограда	Показатели качества							
	Цвет	Внешний вид	Вкус и запах	Массовая доля в %				
				Раство- римые СВ	Сернис- тый ангидрид	Механические повреждения	Ягоды с плодо- ножками	Свободно отделяемых примесей растительного происхождения
Характеристика и нормы для видов и сортов кишмиша								
Сояги	Высший – светло-зеленый. Первый и Второй – светло-зеленый с желтым оттенком	Масса ягод одного вида, сыпучая, без комкования, без плодоножек	Свойственные сушеному винограду, вкус сладкий или сладко-кислый. Посторонний привкус или запах не допускаются	Не менее 81	–	Не более Высший – 3 Первый – 6 Второй – 8	Не более Высший – 2 Первый – 4 Второй – 6	Не более Высший – 0.03 Первый – 0.05 Второй – 0.05
Сабза	Высший – от золотистого до светло-коричневого. Первый и Второй – от золо- тистого до коричневого			Не менее 81	Не более 0.01	Не более Высший – 5 Первый – 10 Второй – 14	Не более Высший – 4 Первый – 6 Второй – 8	Не более Высший – 0.03 Первый – 0.07 Второй – 0.07
Бедона	Высший и Первый – коричневый с бурым оттенком. Второй – бурый разных оттенков			Не менее 83	–	Не более Высший – 3 Первый – 6 Второй – 9	Не более Высший – 3 Первый – 4 Второй – 7	Не более Высший – 0.03 Первый – 0.07 Второй – 0.07
Шигани	Высший – сине-черный Первый – сине-черный с примесью красного Второй– от сине-черного до красного			Не менее 82	–	Не более Высший – 5 Первый – 8 Второй – 12	Не более Высший – 3 Первый – 5 Второй – 8	Не более Высший – 0.03 Первый – 0.07 Второй – 0.07
Характеристика и нормы для видов и сортов изюма								
Изюм светлый	Высший - светло-зеленный с золотистым оттенком Первый и Второй – от светло-зеленого до коричневого с бурым оттенком	Масса ягод одного вида, сыпучая, без комкования, без плодоножек	Свойственные сушеному винограду, вкус сладкий или сладко-кислый. Посторонний привкус или запах не допускаются	Не менее 81	Не более 0.01	Не более Высший – 5 Первый – 8 Второй – 12	Не более Высший – 3 Первый – 5 Второй – 8	Не более Высший – 0.04 Первый – 0.07 Второй – 0.07
Изюм окрашенный	Все сорта – Сине -черный с красным оттенком			Не менее 82	–	Не более Высший – 5 Первый – 8 Второй – 12	Не более Высший – 3 Первый – 5 Второй – 8	Не более Высший – 0.05 Первый – 0.07 Второй – 0.02

Но вне зависимости от сорта сушеного винограда, готовый продукт должен соответствовать основным требованиям по качеству. Изюм должен обладать свойствами изюма, полученного из надлежащим образом созревшего винограда, что должно характеризоваться соответствующим сорту цветом и консистенцией. Изюм должен содержать значительное количество спелых ягод с высоким содержанием сахаров.

В сушеном винограде не допускаются ягоды загнившие, ягоды, пораженные вредителями, признаки спиртового брожения и плесень, видимая невооруженным глазом, насекомые-вредители, их личинки и куколки, ощущаемые органолептически (для готового продукта) металлические и минеральные примеси,.

Комитет Codex Alimentarius также установил стандарты качества изюмных и кишмишных сортов сушеного винограда (CAC/RCP 67-1981). Готовый продукт должен соответствовать следующим требованиям качества: сырье и способы производства сушеного винограда должны обеспечивать нормальные для данного сорта цвет, вкус, показатели зрелости, а также соответствовать требованиям количественного содержания влаги в конечном продукте. Количественное содержание влаги является важным фактором влияющим на контаминацию сушеного винограда микотоксинами. Для каждого сорта или вида сушеного винограда имеются конкретные требования относительно содержания влаги (CAC/RS 67-1981):

<u>Содержание влаги</u>	<u>максимум</u>
Сорт малага, мускатель	31%
семенные сорта (или с удаленными семенами)	19%
другие виды и/или сорта	18%

В документе Codex Alimentarius (CAC/RS 67-1981) изложено также требование относительно использования сульфитации винограда до сушки. Сульфитацию запрещается использовать при производстве темного или черного сушеного винограда, так как диоксид серы влияет на товарный вид продукта.

Наличие некоторых отклонений и пищевых добавок в готовом к употреблению сушеном винограде лимитировано Комитетом Codex Alimentarius (талб. 4).

Табл. 4. Нормирование некоторых пищевых добавок и допускаемые отклонения в сушеном винограде

Отклонение	Лимитирование (максимальное количество)	
	сорта без косточек	сорта с косточками
Кусок стебля	2/кг	2/кг
Незрелые или необработанные ягоды	6% общего веса	4% общего веса
Поврежденные	5% общего веса	5% общего веса
Засахаренные	15% общего веса	15% общего веса
Косточки	–	20/ в 500г
Пищевые добавки		
Диоксид серы	Разрешается только в обесцвеченных сортах изюма* – 1500 мкг/кг	
Минеральные масла (пищевые)	5г/кг	
Сорбитол	5г/кг	

* присутствие в максимальном количестве допускается только непосредственно после обработки.

Комитет Codex Alimentarius установил также гигиенические требования предъявляемые к производству сухофруктов, в том числе и сушеного винограда, которые изложены в кодексе CAC/RCP 3-1969. В документе подробно изложены гигиенические требования к сырью и производственным помещениям сухофруктов.

1.3. Микобиота сушеного винограда и проблема его контаминации охратоксином А в мире

Сухофрукты, в том числе сушеный виноград, восприимчивы к загрязнению грибами и микотоксинами, так как содержат достаточное количество влаги и сахаров (Alghalibi and Shater, 2004). Основные роды мицелиальных грибов контаминирующих пищевые продукты, в том числе сушеный виноград: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* и *Alternaria* (Pitt, 2009).

В винограде и изюме основными ОТА продуцирующими грибами являются виды из секции *Aspergillus Nigri*: *A. niger*, *A. carbonarius* и *A. tubingensis*. Сушеный виноград представляет собой больше риска с точки зрения контаминации ОТА, так как во время сушки винограда, относительная доля *A. carbonarius* в популяции “черных аспергиллов” увеличивается в связи со снижением влажности (Valero et al., 2006).

Проблема контаминации сушеного винограда охратоксином А изучена во многих странах с развитым виноградарством и виноделием: в Испании (Bau et al., 2005), во

Франции (Sage et al., 2002), Италии (Battilani et al., 2006), Португалии (Serra et al., 2003), Аргентине (Magnoli et al., 2003) и Австралии (Leong et al., 2006). В указанных исследованиях отмечается, что большинство из охратоксигенных штаммов относятся к виду *A. carbonarius*. Небольшое количество штаммов, принадлежащих к виду *A. niger*, синтезировали ОТА.

При микологическом анализе коринфского изюма (коринка) проведенном в Греции, авторами был обнаружен высокий уровень контаминации изюма видами *Aspergillus spp.*, среди которых доминировали *A. niger* и *A. carbonarius* (Tjamos et al., 2004). Большая часть штаммов *A. carbonarius*, продуцировала ОТА. Результаты анализа сушеного винограда (коринка, кишмиш, и изюм) в Испании показали также доминирование видов *A. niger* (98%) и *A. carbonarius* (58%) (Abarca et al., 2003). Охратоксин А синтезировали 96.7% из всех изолированных штаммов *A. carbonarius* и всего 0.6% - штаммов *A. niger*.

В странах Южной Америки (Аргентина, Бразилия, Чили) основными контаминантами винограда, изюма и других продуктов получаемых из винограда, являются виды *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* и *Alternaria alternata* (Chulze et al., 2006). С целью оценки токсигенного потенциала микроскопических грибов в сушеном винограде, в Аргентине две разные группы ученых независимо друг от друга исследовали микобиоту образцов сушеного винограда после внешней дезинфекции (Romero et al., 2005, Magnoli et al., 2004). Доминирующими родами были *Aspergillus*, *Eurotium* и *Penicillium*. Самый часто выделяемый вид был *A. niger*, но лишь незначительное количество из изолированных штаммов указанного вида продуцировали ОТА. *A. carbonarius* выявлен реже, но 96% из штаммов в одном случае и 82.6% - в другом, синтезировали ОТА. Выявлены также токсигенные виды *A. ochraceus* и *A. japonicus*, которые синтезировали ОТА. Обнаружена также высокая частота встречаемости видов *A. flavus*, *P. citrinum* и *Alternaria alternata*. В результате анализов проведенных в Бразилии из образцов кишмиша выделен афлатоксигенный вид *A. flavus* (Iamanaka et al., 2007). Из выделенных штаммов 18% синтезировали афлатоксин В₁ и В₂.

Как показывают исследования, в Калифорнии также, наличие охратоксина А в образцах изюма связано в основном с видом *A. carbonarius* (Palumbo et al., 2011). В

Венгрии помимо *A. niger* и *A. carbonarius*, среди видов выделенных из образцов изюма доминировал и другой охратоксигенный вид *A. tubingensis* (Varga et al., 2006).

В результате микологического анализа 100 образцов сушеного винограда, египетские авторы изолировали 36 видов из 12 родов грибов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Eurotium*, *Saccharomyces*, *Acremonium*, *Nigrospora* и *Botryotrichum* (Youssef et al., 2000). Часто встречающимися были виды: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *P. chrysogenum*, *P. oxalicum*, *E. chevalieri*, *E. amstelodami*, *M. racemosus* и *R. stolonifer*. Микотоксины продуцировали 66 штаммов изолированных грибов: алтернариол, афлатоксины В₁, В₂, G₁, G₂, фумагилин, охратоксин А, пеницилловая кислота, стеригматоцистин, цитринин и террин. Во время анализов, проведенных в других странах ближневосточного региона (Саудовская Аравия и Йеменская Республика), получились похожие результаты. Среди видов выделенных из образцов изюма в Саудовской Аравии, наиболее распространенными были грибы из родов: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* и *Rhizopus* (Gashgari et al., 2011).

Виды *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *P. chrysogenum* и *Rhizopus stolonifer* доминировали в образцах изюма из Йеменской Республики (Alghalibi and Shater 2004). А в Республике Ботсвана (Южная Африка), согласно результатам микологического анализа самым часто встречающимся видом в сушеном винограде является *A. flavus* (Khare et al. 2013). За ним следуют виды из родов: *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium* и *Rhizopus*. Виды из родов *Alternaria*, *Geotrichum*, *Trichoderma* и *Fusarium* имели низкую частоту встречаемости.

Есть и многочисленные исследования, которые свидетельствуют о наличии ОТА непосредственно в сушеном винограде (Lombaert et al. 2004, Almeida et al. 2006, Magan & Aldred 2005, Necla 2006, Meyvacı et al. 2005, Moller, Nyberg 2003, Stefanaki et al. 2003, Macdonald et al. 2003, Aksoy et al. 2007). Иногда в образцах изюма были обнаружены не только ОТА, но и афлатоксин В₁ (Shamsuddin et al. 2006, Alghalibi and Shater 2004, Youssef et al. 2000, Iamanaka et al. 2007).

Табл. 5. Доминирующие виды мицелиальных грибов, контаминирующих сушеный виноград в разных странах

Страна	Сорт сушеного винограда	Род выделенных грибов	Доминирующие виды	Литературный источник
Греция	Коринка	<i>Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Fusarium</i>	<i>A. niger, A. carbonarius</i>	Tjamos et al. 2004
Испания	Коринка, кишмиш, изюм	<i>Aspergillus, Eurotium, Penicillium, Alternaria, Trichoderma</i>	<i>A. niger, A. carbonarius</i>	Abarca et al. 2003
Страны Южной Америки (Аргентина, Бразилия, Чили)	Изюм	<i>Aspergillus, Eurotium, Penicillium, Alternaria</i>	<i>A. niger, A. ochraceus, A. carbonarius, Alternaria alternata</i>	Chulze et al. 2006
Аргентина	Изюм, кишмиш	<i>Aspergillus, Eurotium, Penicillium</i>	<i>A. niger</i>	Romero et al. 2005, Magnoli et al. 2004
Бразилия	Кишмиш	<i>Aspergillus, Eurotium, Penicillium, Alternaria</i>	<i>A. flavus, A. niger</i>	Iamanaka et al. 2007
Калифорния	Изюм	<i>Aspergillus, Penicillium,</i>	<i>A. carbonarius</i>	Palumbo et al. 2010
Венгрия	Изюм	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Fusarium,</i>	<i>A. niger, A. carbonarius, A. tubingensis</i>	Varga et al. 2006
Египет	Коринка, кишмиш, изюм	<i>Aspergillus, Penicillium, Mucor, Rhizopus, Cladosporium, Alternaria, Eurotium, Botryotrichum Saccharomyces, Acremonium, Nigrospora</i>	<i>A. fumigatus, A. flavus, A. niger, P. chrysogenum, P. oxalicum, E. chevalieri, E. amstelodami, M. racemosus, R. stolonifer</i>	Youssef et al. 2000
Саудовская Аравия	Изюм	<i>Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Rhizopus</i>	<i>A. fumigatus, A. flavus, A. niger, Alternaria alternata</i>	Gashgari et al. 2011
Йеменская Республика	Изюм	<i>Aspergillus, Eurotium, Penicillium, Alternaria, Rhizopus</i>	<i>A. niger, A. flavus, A. fumigatus, A. chraceus, P. chrysogenum, Rhizopus stolonifer</i>	Alghalibi and Shater 2004
Республика Ботсвана	Коринка, кишмиш, изюм	<i>Aspergillus, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Cladosporium, Alternaria, Geotrichum, Fusarium, Trichoderma</i>	<i>A. flavus, A. niger</i>	Khare et al. 2013

Контролирование уровня загрязненности сушеного винограда видом *A. carbonarius* особенно важно в регионах с преобладающими влажными условиями климата (Magan & Aldred 2005). Исследования показали, что температура и влажность являются основными экологическими факторами, непосредственно влияющими на рост грибов и синтез

микотоксинов до и после сбора урожая, во время транспортировки и хранения сырья. Таким образом, при разработке эффективных методов снижения уровня контаминации сушеного винограда охратоксигенными грибами и их токсинами необходимо учитывать также экологические критерии, особенно влажность и температуру.

1.4. Технологии сушки винограда и влияние их условий на качество готового продукта

Помимо сортов винограда, условий выращивания и сбора урожая, качество сушеного винограда во многом зависит от условий предварительной обработки, сушки и хранения конечного продукта. Преобладающая температура в период сушки, скорость ветра, технология сушки винограда, влажность являются основными экологическими факторами, влияющими на качество сушеного винограда (Veronіue, Aldred, 1993).

Практика сушки меняется в зависимости от географического местонахождения и сортов винограда (Domingo, Giralt, 2006.). Есть три основных метода, которые используются в производстве сушеного винограда: солнечная сушка, теневая сушка и механическая сушка. Традиционный воздушно-солнечный метод сушки используют в течении тысяч лет в Азии и других странах по всему миру. Более 90-95% сушеной продукции производимой во всех странах мира готовят воздушно-солнечным способом.

При открытой солнечной сушке виноград раскладывают на пористой, но прочной бумаге или на специальных деревянных подносах (Pangavhane et al., 2002.), где он подвергается непосредственному воздействию солнца и ветра (фото 1 (а)). Этот метод сушки приводит к значительным потерям из-за влияния разных факторов, таких как грызуны, птицы, насекомые и погодные условия. Для производства изюма таким методом рекомендуется разложить виноград исключительно в один слой и обеспечить равномерную сушку со всех сторон.

Наряду с традиционным воздушно-солнечным методом используется также другой естественный метод сушки – на виноградной-лозе (DOV), который особенно распространен в Узбекистане и США (фото 1 (б)).

С целью предотвращения развития плесневых грибов и синтеза микотоксинов, целесообразно использование солнечных сушилок, которые ускоряют процесс и упрощают контроль условий сушки (Pangavhane, 2002). В солнечных сушилках используется солнечная энергия, как возобновляемый источник тепла. Солнечная сушилка с естественным проветриванием состоит из солнечного калорифера и сушильной камеры. Результаты показывают, что такая сушилка более продуктивна и эффективна (Leon et al., 2002).



(а)



(б)



(в)



(г)



(д)

Фото 2. (а) - Метод воздушно- солнечной сушки, (б) - Сушка на виноградной-лозе, (в) - Теневая сушка – “кишмиш хана”, (г) - Сояги хана, (д) - Сояги хана изнутри

Солнечная-парниковая или туннельная сушиллки выгодны по сравнению с солнечной сушилкой (Kassem et al., 2011). Время сушки в туннельной и в естественной конвекционной солнечной сушилке близки, соответственно пять дней и четыре дня. Кроме того, парниковая сушка не требует больших начальных вложений или дополнительных текущих затрат.

При теневой сушке, предварительно обработанные кисти винограда раскладывают на длинных сеточных стеллажах под навесом. Основным источником необходимого

тепла является теплый воздух (Фото 1(в)). Цель этого способа — получить сушеную продукцию красивого золотисто-янтарного цвета. Его применяют только для сушки урожая сортов винограда со светлой окраской ягод. Поэтому при сортировке особое внимание обращают на деление винограда на партии с зеленой, янтарно-желтой и светло-розовой окраской, которые сушат отдельно. Типичным методом теневой сушки являются так называемые индийские “кишмиш хана” (фото 1(в)) или узбекские “сояги хана” (фото 1(г), (д)). Способ является одним из древнейших и применяется только для светлых сортов “Кишмиша”. “Кишмиш хана” строятся из деревянных или стальных материалов, которые обеспечивают гораздо лучшую циркуляцию воздуха, чем кирпичный “сояги хана” (Zach Lea, 2005). На крыше имеется вентилиационное отверстие, которое обеспечивает выход горячего воздуха. Занавески из мешковины обеспечивают тень. Между стеллажами есть проход.

В последнее время в Америке разрабатывают различные методы механической сушки винограда, при которой снижается риск воздействия неблагоприятных погодных условий и контакт рабочих с сырьем и готовым продуктом (Williams et al., 2002). В основе этих методов лежит механизация всех процессов, начиная со сбора урожая, сушки и заканчивая сбором готового сушеного винограда.

На процесс сушки значительно влияют методы химической предобработки и происхождение продукта. Для получения качественного сушеного продукта нежной консистенции очень важно точное предопределение норм сушки.

Скорость сушки винограда зависит от скорости диффузии воды через ягоды, которая в свою очередь зависит от восковой кутикулы винограда (Ponting and McBean, 1970). Исходя из этого, многие исследователи описывают важность предварительной обработки сырьевого винограда для ускорения сушки и производства изюма нужного качества (Rojchev and Botiyanski, 1998). С этой целью широко используются методы погружения в горячую воду или применения химических веществ (карбоната калия K_2CO_3 (2,5-4,5%), гидроксида натрия (каустическая сода-NaOH), лимонная кислота и этил- или метилолеатные эмульсии) (Femenia et al., 1998). Однако, более высокие

концентрации щелочей и более длительное время погружения могут вызвать нежелательные изменения качества сушеного винограда (Saravacos et al., 1988).

Для эффективной сушки, виноград должен иметь необходимое содержание сахара (20-24° Brix) (Uhlig, Clingeleffer, 1998). Низкий или очень высокий уровень сахара может привести к потемнению готового продукта. Светлый цвет для сушеного винограда считается весьма желательным. Степень потемнения сушеного продукта определяется также активностью фенольных соединений, особенно в кожице ягод (Rathien, Robinson, 1992). Сорта с естественно низким уровнем полифенолоксидазы после сушки обретают более светлый цвет, чем другие. Воздействие солнечного света влияет на состав фенольных соединений в кожице и приводит к потемнению цвета винограда при сушке.

Процессы после сушки могут отличаться в зависимости от метода сушки (Sawhney et al., 2009). После сушки проводится очистка, которая включает индивидуальный отбор, удаление стеблей и посторонних частиц, удаление несортного изюма. Поскольку для устранения посторонних частиц, таких как пыль и песчинки, после воздушно-солнечной сушки используется вода, это приводит к дальнейшей регидратации, из-за чего появляется необходимость в дополнительной конечной сушке.

Хранение сушеного винограда в неблагоприятных условиях также влияет на цвет, вкусовые качества, аромат продукта (Patil et al., 1995). Для сохранения качества изюма и увеличения срока годности, рекомендуется хранить продукт в темноте, низких температурных условиях ($<8^{\circ}\text{C}$), при относительной влажности воздуха не выше 70%. Для предотвращения развития плесневых грибов и синтеза микотоксинов следует избегать высокой температуры хранения ($20-30^{\circ}\text{C}$) и влажности. Влажные условия могут привести к плесневению, гниению и ферментации. При этом существует также риск обесцвечивания продукта.

1.5. Употребление SO_2 , его опасность и лимитирование

Часто некоторые кишмишные и изюмные сорта винограда обрабатывают диоксидом серы для получения более светлого и золотистого цвета, проводя сухую или влажную сульфитацию (Gowda, 2001). Сухая сульфитация осуществляется путем

окуривания винограда, разложенного на деревянных подносах и помещенного в окуривательные (фумигационные) шкафы или камеры. Продолжительность окуривания горячей серой колеблется в пределах от 30-40 мин до 1-1,5 ч. Влажная сульфитация — это обработка уложенного в корзины винограда 2-3% раствором сернистой кислоты в течение 3-5 мин. Затем плоды сушат одним из способов описанных выше.

Диоксид серы используется как в газовом состоянии, так и в виде порошка его сульфитной, бисульфитной и метабисульфитной солей. Газообразная форма получается путем сжигания серы. SO_2 - это бесцветный, негорючий газ с острым удушающим запахом, который хорошо растворяется в холодной воде (85 г в 100 мл при 25°C). Двуокись серы и сульфиты образуют группу соединений известных под общим названием сульфиты. Эти соединения считаются относительно сильными консервантами из-за их сильной антимикробной активности.

Диоксид серы (SO_2) и его производные давно используются для обработки сырьевого винограда в качестве консерванта ингибирующего развитие плесневых грибов и других микроорганизмов. Они также действуют в качестве антиоксидантов, предотвращающих окислительные процессы, способствующие потемнению готового продукта (Chervin et al., 2012). Обработка фруктов после сбора урожая диоксидом серы может значительно уменьшить рост плесневых грибов (Hocking, 1992).

Антимикробное влияние диоксида серы на дрожжевые грибы, плесневые грибы и бактерии является селективным, при этом некоторые виды более устойчивы, чем другие. В производстве вин SO_2 добавляется в сусло для уничтожения бактерий, плесневых грибов и диких дрожжей, тем самым не вредя полезным дрожжевым грибам для спиртового брожения (Weil, 1983, Sander et al., 1984, Mannsville, 1985).

Однако, как выяснилось, остаточное количество диоксида серы может оказывать опасное влияние на здоровье потребителя. Прием пищи с содержанием сульфитов, согласно данным Сеттипан (Settipane, 1984), вызвал острые аллергические реакции у людей и анафилактический шок с фатальным исходом. Известно также о его опасном влиянии на астматических больных (Stevenson & Simon, 1984). SO_2 и сульфиты сильно

уменьшают поглощение витамина В₁ в организме человека, что может привести к ряду проблем со здоровьем, таких, как хронические головные боли и нарушение памяти.

Раньше SO₂ был включен в список безопасных химикатов, для применения которого не требовалось никакого контроля. Но исходя из результатов исследований, которые доказали его опасное влияние на организм человека, на сегодня его количество в пищевых продуктах ограничивается. Остаточное количество SO₂ в винограде и в продуктах его переработки не должно превышать предел 1500 мг/кг, установленный по пищевому кодексу (Codex Alimentarius, 1981).

1.6. Актуальность проблемы загрязнения свежих плодов винограда микроскопическими грибами и их микотоксинами

Основными контаминантами винограда и продуктов получаемых от его переработки являются микроскопические грибы из группы “черных аспергиллов”. Грибы могут контаминировать виноград в период вегетации, во время сбора урожая и переработки винограда (Aydogdu, Gucer, 2009). Микологические исследования винограда после сбора урожая показали, что доминируют виды из родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* и *Penicillium* (Abrunhosa et al., 2001, Magnoli et al., 2003, Serra et al., 2005, Belli et al., 2006, Fredj et al., 2007).

В большинстве случаев сообщается о контаминации винограда видами *A. niger* и *A. carbonarius* (Magnoli et al., 2003). Часто их наличие в винограде сопровождается синтезом охратоксина А. ОТА обнаружен также в сушеном винограде, виноградных соках, сусле и винах. В последнее время наличие этого токсина в продуктах переработки винограда привлекает значительное внимание во многих странах (Bragulat et al., 2008). До сбора урожая кожа ягод размягчается и увеличивается содержание сахаров, что приводит к увеличению восприимчивости винограда к загрязнению видом *A. carbonarius*. Создаются также условия для синтеза охратоксина А. Задержка сроков сбора урожая может увеличивать риск загрязнения винограда ОТА (Hocking et al., 2007). Случаи контаминации сушеного винограда охратоксином А встречаются гораздо чаще, чем вина или виноградного сока (Varga, Kozakiewicz, 2006).

В результате анализа некоторых авторов из ливанского винограда выделено 510 штаммов, 95.5% из которых относились к роду *Aspergillus*, а 4.5% - к *Penicillium* (El Khoury et al., 2008). Доминирующими были виды из секции *Aspergillus Nigri*, среди которых 3 вида: *A. carbonarius*, *A. niger* и *A. japonicus* синтезировали ОТА. Выявлен также *A. flavus*, который синтезировал афлатоксин В1. Абруноса Л. и соавторы из афлатоксигенных гибов в винограде обнаружили виды *A. flavus* и *A. parasiticus* (Abrunhosa et al., 2001).

В последнее время чаще сообщается о контаминации винограда грибами из рода *Penicillium*. В результате анализа 50 образцов винограда проведенных в Словакии, были выделены 170 изолятов из указанного рода: *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. expansum* и *P. chrysogenum* (Felšöciová et al., 2013). В Италии Торелли Е. и соавторы (2006) в образцах винограда выявили виды *P. verrucosum* и *P. nordicum*. Виды *P. expansum* и *P. verrucosum* обнаружены также в образцах винограда в Португалии (Serra et al., 2003).

Проблема контаминации винограда микотоксинами весьма актуальна в тех регионах виноградарства, где летом преобладает жаркая погода (Gessler et al., 2009). Это создает благоприятные условия для развития мицелиальных грибов и синтеза ОТА ими. В регионах с умеренно-холодным климатом практически мала вероятность присутствия микотоксинов в винограде.

Тенденция небольших, но постоянных изменений климатических условий, таких, как увеличение температуры за последние 20 лет, может привести к неожиданному росту проблем загрязненности винограда микромицетами и их токсичными метаболитами. Контаминация винограда охратоксигенными видами из рода *Aspergillus*, (*A. carbonarius*) особенно в южных районах станет более частой. Климатические изменения могут создать условия для синтеза и накопления ОТА в винограде. Исходя из этого возникает необходимость в применении мер, направленных на снижение рисков контаминации винограда и продуктов его переработки охратоксигенными грибами в соответствии с климатическими изменениями.

1.7. Основные условия выращивания винограда и сбора урожая

Производство качественного продукта во многом зависит от качества сырья. Для получения качественного сушеного винограда большое значение имеет правильная организация территории виноградника. Корневая система винограда позволяет адаптирование к разным условиям почвы, например, к высоким значениям pH и солености почвы или низким значениям pH и глинистости почвы (Novello, 1999). Но для разных сортов предпочтительны разные условия выращивания. При выборе земельного участка нужно учитывать, с какой целью выращивается виноград. Например, для производства вин предпочтительны почвы с глубоким и хорошим дренажем, и с легкой структурой. Обильное орошение не всегда благотворно для винных сортов винограда, но необходимо для столовых и изюмных сортов, где желателен высокий урожай.

Необходимо учитывать цель и конечный продукт при выращивании винограда. Но при этом есть всеобщие условия, которые необходимо соблюдать при создании виноградника и при выборе территории (Domingo, Giralt, 2006):

- избегать слишком плодородных земельных участков с высокой урожайностью,
- создать виноградники на хорошо проветриваемых земельных участках и избегать областей с высокой влажностью;
- правильно организовать территории виноградника, что позволит рационально использовать технику, улучшить качество работ и повысить урожайность.

Для получения здорового и качественного сырья важное значение имеет выбор посадочного материала (Novello, 1999). Не все сорта подходят для производства сушеного винограда с хорошими вкусовыми качествами. Только некоторые сорта пригодны для сушки. Таким образом при выборе посадочного материала надо учитывать некоторые критерии:

- выбрать сорта винограда которые менее склонны к плесневению и гниению;
- выбрать такие биотипы, которые лучше адаптированы к климатическим и почвенным условиям выращивания на конкретных земельных участках;

- планировать однородные участки земли (сорта, разновидности), чтобы упростить процесс выращивания и обеспечить хороший урожай и лучший контроль за болезнями.

Следующий шаг в практике создания целевого виноградника, это соблюдение норм техники выращивания (Fregoni, 1998). При этом необходимо:

- избегать методов культивирования, которые способствуют интенсивному росту винограда, необходимо контролировать применение азотного удобрения;
- избегать густых ветвей, а также очень больших ягод, при которых повышается риск механических повреждений,
- благоприятствовать правильному расположению виноградной лозы, избегая наличия опавших листьев вокруг лозы;
- орошать регулярно, избегая рисков повреждения ягод после избыточного полива;
- применять подходящие методы подрезки и формирования виноградной лозы, которые способствуют проникновению света и потоков воздуха, позволяя устранять или сокращать опасность контаминации грибами (Mencarelli, Bellincontro, 2005). Правильное расположение гроздей винограда обеспечивает упрощение процесса выращивания, хороший контроль за вредителями и болезнями, и способствует равномерному созреванию винограда.

Для получения высококачественного сырья важно иметь также соответствующую практику сбора урожая. Как правило, надо применять только надежные методы сбора урожая, без риска потери качества. Достижение этого возможно только соблюдением технологических требований к сбору урожая. Процесс должен выполняться без механических повреждений и потери продукта и как можно быстрее (Debney, 1980). Единственным таким методом является сбор урожая вручную. Основные преимущества этого метода в том, что механические повреждения можно довести до минимума и избежать вторичного загрязнения продукта мицелиальными грибами. Кроме того метод позволяет также выбирать и удалять уже загрязненные ягоды.

Некоторые характеристики винограда (размер ягод, содержание сахара, а также индексы зрелости урожая) играют значительную роль, как в процессе сушки, так и в

качестве сушеного продукта (Chervin et al., 2012). Доказано, что сроки сбора урожая имеют решающее значение для конечного качества продукта, не только с точки зрения содержания сахара в ягодах, но также влияют на органолептические свойства, например на цвет и вкус продукта (Uhlig and Clingeffer, 1998). Таким образом, даты сбора урожая должны назначаться учитывая спелость винограда, прогнозируемые изменения климата и уровень риска контаминации ОТА продуцирующими грибами (Ryall, 1982). В регионах с высоким риском ОТА рекомендуется переносить даты сбора урожая на более ранний срок, то есть в менее влажную погоду.

Контаминированный плесневыми грибами виноград не пригоден для использования потребителем ни в свежем, ни в сушеном виде.

1.8. Охратоксин А. Структура. Продуцирующие грибы. Токсичность.

Охратоксины по своей структуре являются изокумарины связанными пептидной связью с L-фенилаланином. Свое название эта группа токсинов получила из-за вида *Aspergillus ochraceus*, из которого они впервые были выделены. К этой группе относится ряд охратоксинов: А, В, С, α и β . В последнее время описаны новые ОТА производные метаболиты, которые содержат дехлорированные ОТА производные (Faucet-Marquis et al., 2006) и хинон/гидрохиноновый метаболит (Tozlovanu et al., 2006).

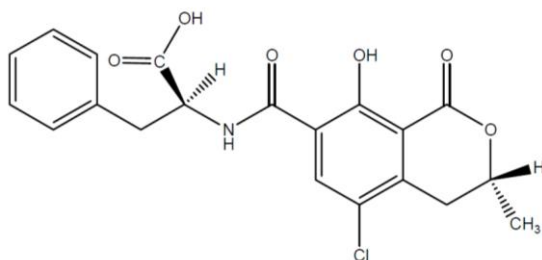


Рис. 3. Химическая структура охратоксина А

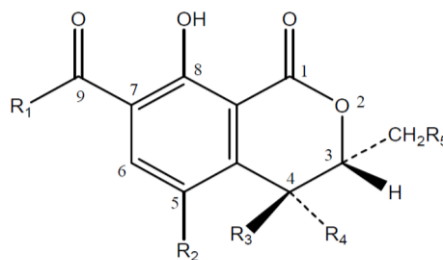


Рис. 4. Общая структура метаболитов ОТА

Табл. 6. Характеристика состава некоторых ОТА производных метаболитов.

Название	R1	R2	R3	R4	R5
Охратоксин А	Фенилаланин	Cl	H	H	H
Охратоксин В	Фенилаланин	H	H	H	H
Охратоксин С	Этиловый эфир, фенилаланин	Cl	H	H	H
Охратоксин α	ОН	Cl	H	H	H
Охратоксин β	ОН	H	H	H	H

ОТА ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) содержит хлорированную часть изокумарина и поэтому в 50 раз более токсичен, чем другие его аналоги. Охратоксин В ($C_{20}H_{19}NO_6$) является дехлорированным аналогом ОТА. Охратоксин С ($C_{22}H_{22}ClNO_6$) – этиловый эфир ОТА (табл. 6).

ОТА впервые был выделен в 1965 году из штамма *A. ochraceus* (секция *Aspergillus Circumdati*) в лабораторных условиях (van der Merwe et al., 1965). Позже, неоднократно сообщалось о синтезе этого токсина грибами из секции *Aspergillus Nigri*, главным образом видом *A. carbonarius* и лишь небольшой процент другими изолятами вида *A. niger* (Téren et al., 1996).

Табл. 7. Виды рода *Aspergillus* синтезирующие ОТА (по Varga et al., 2001)

Вид	Секция	Источник информации
<i>A. glaucus</i>	<i>Aspergillus</i>	Chelkowski et al.(1987)
<i>A. repens</i>	<i>Aspergillus</i>	El-Kady (1994)
<i>A. sydowii</i>	<i>Aspergillus</i>	Ueno et al. (1991)
<i>A. alliaceus</i>	<i>Flavi</i>	Ciegler (1972), Doster et al. (1996), Bayman et al. (2002), Peterson (2000)
<i>A. ochraceus*</i>	<i>Circumdati</i>	Van der Merwe et al. (1965), Krivobok et al. (1995), Varga et al. (1996), Mühlencoert (2004), Pardo et al. (2004)
<i>A. petrakii</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler (1972)
<i>A. sclerotiorum</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler (1972), Varga et al. (1996), Moss (1996)
<i>A. sulphureus</i>	<i>Circumdati</i>	Ciegler (1972), Madhyasta et al. (1990)
<i>A. clavatus</i>	<i>Clavati</i>	Atalla and El-Din (1993)
<i>A. wentii</i>	<i>Cremeri</i>	Varga et al. (1996)
<i>A. fumigatus</i>	<i>Fumigati</i>	Abarca et al. (1997), Atalla and El-Din (1993), Varga et al. (2000)
<i>A. awamori</i>	<i>Nigri</i>	Ono et al. (1995), Téren et al. (1996), Accensi et al. (2001)
<i>A. carbonarius*</i>	<i>Nigri</i>	Horie (1995), Téren et al. (1996), Wickow et al. (1996), Heenan et al. (1998), Joosten et al. (2001)
<i>A. foetidus</i>	<i>Nigri</i>	Ueno et al. (1991), Téren et al. (1996), Magnoli et al. (2003)
<i>A. japonicas</i>	<i>Nigri</i>	Dalcero et al. (2002), Battilani et al. (2003)
<i>A. lactocoffeatus</i>	<i>Nigri</i>	Samson et al. (2004)
<i>A. niger*</i>	<i>Nigri</i>	Abarca et al. (1994), Ono et al. (1995), Téren et al. (1996), Nakajima et al. (1997), Heenan et al. (1998)
<i>A. sclerotioniger</i>	<i>Nigri</i>	Samson et al. (2004)
<i>A. tubingensis*</i>	<i>Nigri</i>	Medina et al. (2005)
<i>A. vadensis</i>	<i>Nigri</i>	De Vries et al. (2004)
<i>A. terreus</i>	<i>Terrei</i>	Ueno et al. (1991)
<i>A. ustus</i>	<i>Usti</i>	Ueno et al. (1991)
<i>A. versicolor</i>	<i>Versicolores</i>	Abarca et al. (1997)

Примечание: * активные продуценты охратоксина А

Совсем недавно появились сообщения о новых охратоксигенных видах из секции *Nigri* (Samson et al., 2004, Medina et al., 2005). Изоляты других подродов обычно производят только малое количество ОТА или их способность производить токсин *in vitro* не была подтверждена другими авторами (табл.7).

Однако естественная встречаемость и практическая значимость ОТА была впервые приписана видам из рода *Penicillium* (Ciegler et al., 1972; Krogh et al., 1978). Позже выяснилось, что некоторые из них, например *P. viridicatum* и *P. cyclopium*, не синтезируют ОТА. Недавно Т.О. Ларсен и др. (2001) биохимически охарактеризовали несколько ОТА синтезирующие штаммы из рода *Penicillium* и разделили их на две большие группы: *P. verrucosum* и *P. nordicum*. В лабораторных условиях вид *P. nordicum* синтезировал больше ОТА, чем *P. verrucosum*. Это можно объяснить тем, что возможно чистые культуры проявили другие свойства в лабораторных условиях.

Табл. 8. Виды рода *Penicillium* синтезирующие ОТА (по Varga et al., 2001)

Вид	Секции	Источник информации
<i>P. cyaneum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Ueno et al. (1991)
<i>P. implicatum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Ueno et al. (1991)
<i>P. sclerotiorum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Ueno et al. (1991)
<i>P. spinulosum</i> (<i>P. purpurescens</i>)	<i>Aspergilloides</i>	El-Banna et al. (1987), Ciegler et al. (1972)
<i>P. variable</i>	<i>Biverticillium</i>	Ciegler et al. (1972), Krivobok et al. (1995)
<i>P. purpurogenum</i>	<i>Biverticillium</i>	Ueno et al. (1991)
<i>P. verruculosum</i>	<i>Biverticillium</i>	Ueno et al. (1991)
<i>P. canescens</i>	<i>Eladia</i>	Ueno et al. (1991)
<i>P. simplicissimum</i>	<i>Eladia</i>	Ueno et al. (1991)
<i>P. atramentosum</i>	<i>Penicillium</i>	Bridge et al. (1989)
<i>P. aurantiogriseum</i> (<i>P. solitum</i>)	<i>Penicillium</i>	Bridge et al. (1989), Krivobok et al. (1995)
<i>P. commune</i>	<i>Penicillium</i>	Ciegler et al. (1972)
<i>P. expansum</i>	<i>Penicillium</i>	Bridge et al. (1989)
<i>P. nordicum</i>	<i>Penicillium</i>	Larsen et al. (2001)
<i>P. verrucosum</i>*	<i>Penicillium</i>	Pitt (1987), Larsen et al. (2001)
<i>P. brevicompactum</i>	<i>Penicillium</i>	Kozakiewicz et al., 1993
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Ramosum</i>	Turner and Aldridge (1983), Krivobok et al. (1995)

Примечание: * активные продуценты охратоксина А

Таким образом, *P. verrucosum* и *A. ochraceus* долгое время были описаны как два основных вида, синтезирующих ОТА. Недавно обнаружен третий активный продуцент этого токсина - *A. carbonarius*, выделенный из винограда (Mantle, Medina, 2002).

Токсикологические свойства ОТА рассматривались много раз и долгое время были в центре внимания МАИР (Международное Агентство по Изучению Рака) (IARC, 1993). После обнаружения спонтанной нефропатии у людей и животных, проведено много экспериментальных исследований, чтобы показать причастность ОТА к возникновению этих заболеваний (Zimmerli and Dick, 1996, Delage et al., 2003, Da Rocha Rosa et al., 2002, Shephard et al. 2003, Visconti et al., 1999, Ospital et al., 1998, Otteneder and Majerus, 2007).

Исследования доказали, что ОТА может иметь несколько эффектов, таких как нефротоксичный, гепатотоксичный, нейротоксичный, тератотоксичный и иммунотоксичный, при воздействии на некоторые виды животных, и может привести к опухоли почек и печени у мышей и крыс (O'Brien et al., 2001). Генотоксичные свойства ОТА остаются спорными из-за противоречивых результатов, полученных во время анализов на микроорганизмах и млекопитающих. Однако сообщается о некоторых изменениях в молекуле ДНК после хронического воздействия ОТА на крыс и острого воздействия на свиней (Faucet et al., 2004).

1.9. Влияние физико-химических параметров на рост микромицетов и синтез ОТА

Рост мицелиальных грибов и синтез ими микотоксинов обусловлены рядом абиотических и биотических параметров. Активность воды (a_w) является самым важным фактором влияющим на спороношения, рост грибов и синтез микотоксинов. Температура также играет важную роль в этих процессах, но ее влияние на рост грибов всегда исследуется вместе с a_w (Pitt and Hocking, 1997, Adams and Moss, 1999, Dantigny et al., 2005a). С другой стороны, очень важно исследовать влияние каждого параметра отдельно на рост грибов, чтобы предотвратить загрязнение пищевых продуктов этими грибами и синтез ОТА (Magan and Aldred, 2005, Pardo et al., 2005a). В таблице 9 приведены оптимальные значения a_w для роста грибов – основных продуцентов ОТА.

Табл. 9. Оптимальные значения и пределы a_w для роста грибов и синтеза ОТА

Вид	Мицелиальный рост		Синтез ОТА		Источник информации
	Оптимальное значение a_w	Пределы a_w	Оптимальное значение a_w	Пределы a_w	
<i>A. carbonarius</i>	0.93 – 0.99	0.82 – 0.99	0.94 – 0.99	0.86 – 0.99	Mitchell et al., 2004, Esteban et al. 2006b
<i>A. niger</i>	0.97	0.80 – 0.99	0.96 – 0.99	0.90 – 0.99	Esteban et al. 2006a Parra & Magan, 2004
<i>A. ochraceus</i>	0.95	0.80 – 0.99	0.95 – 0.98	0.90 – 0.99	Suarez-Quiroz et al. 2004, Ramos et al.1998
<i>P. verrucosum</i>	0.95 – 0.99	0.85 – 0.99	0.95 – 0.99	0.90 – 0.98	Northolt et al., 1979, Pardo et al., 2005, Cairns et al., 2003

Как видно из таблицы, есть некоторое сходство требований к значениям a_w для роста и синтеза ОТА у перечисленных видов грибов. Но абсолютно ясно, что у всех видов, этот параметр значительно выше для синтеза ОТА, чем для роста грибов. Значение a_w для роста грибов и синтеза ОТА может колебаться в зависимости от температурных условий, от вида субстрата и от региона, где они обнаружены.

В таблице 10 приведены оптимальные температурные условия для роста охратоксигенных грибов и синтеза ОТА. Виды из рода *Aspergillus* имеют широкий диапазон температуры роста, максимальная температура составляет 45 °С. Вид *P. verrucosum* может расти и синтезировать ОТА в более низких температурных условиях. Этим и объясняется тот факт, что в странах с преобладающим теплым и влажным климатом, благоприятным для роста токсигенных грибов, наличие ОТА в пищевых продуктах обусловлено их биосинтезом видами из рода *Aspergillus* (Nguyen et al., 2007). Это в основном страны Африки, Южной Азии и Южной Америки. В Северной Европе, где преобладает климат с низкой температурой, высокая степень загрязненности пищевых продуктов охратоксином А обусловлена наличием видов из рода *Penicillium*: *P. verrucosum* и *P. nordicum*.

Табл. 10. Оптимальные значения и пределы температуры для роста грибов и синтеза ОТА

Вид	Мицелиальный рост		Синтез ОТА		Источник информации
	Оптимальное значение t°	Пределы t°	Оптимальное значение t°	Пределы t°	
<i>A. carbonarius</i>	30 – 35	10 – 40	15 – 20	15 – 40	Esteban et al. 2004, Leong et al., 2004, Mitchell et al., 2004, Belli et al., 2005b
<i>A. niger</i>	30 – 35	10 – 45	25	10 – 35	Esteban et al., 2004, Leong et al., 2004,
<i>A. ochraceus</i>	20 – 30	10 – 45	25 – 30	12 – 37	Sansing et al., 1973 Ramos et al., 1998
<i>P. verrucosum</i>	20	10 – 31	25	–	Pitt & Hocking 1997, Pardo et al., 2005, Cairns et al., 2005

Таким образом можно ингибировать синтез ОТА в пищевых продуктах, снижая значение a_w продукта до 0.80 и температуру хранения до 10 °С и ниже. Традиционно контроль контаминации пищевых продуктов микотоксинами был сделан через контролирование активности воды, температуры хранения, pH и контроля качества используемого сырья (Khalesi and Khati, 2011).

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнена на кафедре ботаники Ереванского государственного университета в 2005–2012 гг.

Проведено исследование 167 образцов сушеного винограда (белые и темные сорта изюма и кишмиша), из которых 87 образцов армянского производства и 80 - импортированного из разных стран (Иран, Узбекистан, Казахстан, США). Образцы отбирались из разных магазинов и рынков города Еревана, а также непосредственно на производстве в Армавирской области, в соответствии с ГОСТ 1750-86 и ЕС 2006b (No 401/2006). Проведен также микологический анализ 48 образцов почвы, отобранных с разной глубины из-под виноградной лозы, 81 образца плодов белых и черных сортов винограда и вегетативных органов виноградной лозы (по 12 образцов стеблей и по 12 – листьев), с целью выявления возможных источников контаминации сушеного винограда. Отбор образцов почвы, вегетативных органов и свежих плодов винограда проводили во время сбора урожая в четырех областях Армении: Араратской, Армавирской, Котайкской и Вайоцзорской. В общей сложности было исследовано 320 образцов.

Для достоверного микологического анализа имеют значения не только правильный отбор образцов и количество отбираемого образца, но и питательные среды и техника посева. Для максимального выявления микроскопических грибов из исследуемого материала, должны использоваться оптимальные питательные среды, которые способствуют активному росту микромицетов. Нами использованы следующие готовые питательные среды: Чапек-Дрожжевой Агар (HiMedia M1335), Глюкозо-Дрожжевой Агар (HiMedia M), Мальт-Экстракт Агар (HiMedia M137) и Чапек-Докс Агар (HiMedia M075). Чапек–Дрожжевой Агар часто используется для сохранения способности разных видов грибов биосинтеза охратоксина А (Pitt and Hocking, 1997). Чапек – Докс Агар используется для идентификации охратоксигенных грибов, в основном видов из секции *Aspergillus Nigri*. Грибы на указанной питательной среде образуют характерные для каждого вида колонии, способные к образованию экссудата и пигментации. Для

выделения и идентификации видов мицелиальных микромицетов также готовили вышеперечисленные питательные среды при следующих соотношениях ингредиентов:

Чапек-Дрожжевой Агар

Ингредиент	кол-во
Пептон	2.0 г
Дрожжевой экстракт	2.0 г
Декстроз	20.0 г
MgSO ₄	0.5 г
KH ₂ PO ₄	0.46 г
K ₂ HPO ₄	1.0 г
Агар	20.0 г
Дистиллированная вода	1.01 л

ЧапекДокс Агар

Ингредиент	кол-во
Сахароза	30.0 г
NaNO ₃	2.0 г
K ₂ HPO ₄	1.0 г
MgSO ₄	0.5 г
KCl	0.5 г
FeSO ₄	0.01 г
Агар	15.0 г
Дистиллированная вода	1.01 л

Мальт-Экстракт Агар

Ингредиент	кол-во
Мальт-экстракт	20.0 г
Глюкоза	20.0 г
Пептон	1.0 г
Агар	20.0 г
Дистиллированная вода	1.01 л

Глюкозо-Дрожжевой Агар

Ингредиент	кол-во
Дрожжевой экстракт	10.0 г
Глюкоза	10.0 г
Агар	15.0 г
Вода	1.01 л

Образцы сушеного винограда, плодов винограда и вегетативных органов перед анализом подвергались внешней стерилизации для подавления роста поверхностной сапротрофной микобиоты и выявления внутренней микофлоры анализируемого материала. Для этого, образцы помещали в 3% раствор гипохлорида натрия в течение 15 минут, после чего образцы промывали дистиллированной водой.

Микологический анализ исследуемых образцов сушеного винограда, свежих плодов винограда и почвы проводили методом непосредственного посева и серийных разведений (Pitt and Hocking, 1997). Разведение включает следующие этапы: 1) встряхивание суспензии продукта в течении 15 минут на качалке; 2) настаивание в течение 10 минут; 3) приготовление серийных разведений 1:10 и 1:100; 4) поверхностный посев со следующих разведений на питательную среду: 1:10 и 1:100.

Для подсчета микромицетов, посевы на питательных средах выдерживались 5-7 дней при температуре 25-28 °C (NF ISO 7954 - 93).

После инкубации определяли количество микроскопических грибов в 1г продукта согласно NF ISO 7954-93 и NF ISO 7698-91 по следующей формуле:

$$\omega = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Где,

$\sum C$ – сумма колоний грибов, выросших во всех чашках ;

n_1 – количество чашек используемых для I разведения;

n_2 – количество чашек, используемых для II разведения;

d – коэффициент разбавления.

Частота встречаемости микромицетов определяли отношением числа образцов, в которых обнаружен данный вид, к общему числу исследованных (Мирчинк, 1988; El-Kady et al., 1982), по следующей формуле:

$$A = B/C * 100\%,$$

Где,

B – число образцов, в которых данный вид обнаружен;

C – общее число проанализированных образцов.

Идентификация изолированных культур микромицетов проводили на основе изучения макро- и микроскопических признаков, по следующим определителям: Пидопличко Н.М, Милько А.А. (1971), Билай В.И. (1988), Саттон Д. и др.(2001), Raper K.B. and Fennell D.I. (1977), Pitt (1979), Pitt J.I and Hocking A.D. (1997), Samson R.A. et al. (1995, 2004, 2007). С целью изучения микроскопических признаков грибов готовились препараты с использованием раствора глицерин – спирт – вода, взятых в равных количествах (Методы. эксп. микологии, 1982; King, 1986).

Как дополнительный метод для достоверного определения видов грибов из группы «черных аспергиллов» использован тест Эрлиха (Frisvad, Samson, 2004). Тест основан на обнаружении вторичных метаболитов идентифицируемого гриба – алкалоидов, реагирующих с реагентом Эрлиха (Lund, 1995). Реагент Эрлиха состоит из 2 г 4-диметиламинобензальдегида растворенного в 85 мл 96% этанола и добавленного к 15 мл 10N HCl. Изолят микроскопического гриба инкубировали на питательной среде Чапек-Дрожжевой Агар в течение 5 - 9 дней при температуре 25 °С, затем из центра колонии

вырезали агаровый диск диаметром 4 мм. Фильтровальную бумагу диаметром 1 см смачивали реагентом Эрлиха и ставили на агаровый диск со стороны роста мицелия. Если через 2 - 6 мин. появляется фиолетовое кольцо, значит культура гриба содержит циклопиазоновую кислоту или подобные ей алкалоиды. Если реакция появляется через 7-10 мин., она считается слабой. Через 10 мин. фиолетовое кольцо исчезает. Некоторые грибы продуцируют алкалоиды, которые при реакции с реагентом Эрлиха дают кольца от розового до красного или желтого цвета, характерного для определенных видов.

Хранение культур грибов проводили методом периодических пересевов (Методы эксп. микологии, 1982) на свежие питательные среды. Использовали также стерильные пробирки Эппендорф емкостью 1.5 мл.

Значение активности воды (a_w) образцов сушеного винограда измеряли с помощью прибора AquaLab (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Измельченные изюминки помещали в специальную пластиковую чашку, которую ставили в прибор. Когда параметр на электронной шкале стабилизировался, записывали значение a_w . Определение pH проведено с помощью pH-метра (Oakton, USA).

Так как при производстве светлых сортов сушеного винограда используется диоксид серы (SO_2), с целью сохранения цвета и ингибирования роста плеснеобразующих грибов, то в образцах сушеного винограда определяли количество SO_2 методом аспирации (Wood et al., 2004). Метод состоит из 3-х этапов: 1) определение свободного SO_2 , 2) определение связанного SO_2 , 3) калькуляция.

1. *Определение свободного SO_2* – включает аспирацию смеси гомогената пробы и 25%-ного раствора фосфорной кислоты, в течение 15 мин и титрование 0,01М раствором NaOH до получения оливково-зеленого цвета. Регистрирование значения титра (А).

2. *Определение связанного SO_2* – включает аспирацию при нагревании раствора с содержанием гомогената проба 15 мин. и титрование 0,01 М раствором NaOH до получения оливково-зеленого цвета. Регистрирование значения титра (В).

3. Калькуляция

$$\text{Свободный } SO_2 \text{ (мг/л)} = \frac{(A) \times M \times 32.06 \times 1000}{V}$$

$$\text{Связанный } SO_2 \text{ (мг/л)} = \frac{(B) \times M \times 32.06 \times 1000}{V}$$

Общий SO_2 (мг/л) = Свободный SO_2 (мг/л) + Связанный SO_2 (мг/л),

где

M = молярность раствора NaOH

V = объем образца

Определение токсичности экстрактов и культуральной жидкости грибов на личинках жаброногого рачка *Artemia salina* проводили в соответствии с методом (Brown, 1969, Harwing, Scott, 1971, Reiss, 1993). 20 мкл испытуемого экстракта наносили на диск из фильтровальной бумаги диаметром около 6 мм с помощью микрошприца. Диски помещали в углубления, сделанные на плоской стеклянной пластинке, к каждому диску добавляли 0.2 мл суспензии личинок *Artemia salina*. Пластинку с углублениями помещали в термостат на 16-18 часов при температуре 30°C. Гибель личинок регистрировали по полному прекращению их движения, под стереоскопическим микоскопом. Степень токсичности грибных экстрактов и культуральной жидкости грибов оценивали по проценту летальности личинок артемии. Нетоксичные экстракты вызывали гибель до 9% личинок, слаботоксичные – от 10 до 49%, токсичные – от 50 до 89%, остротоксичные – от 90 до 100 %. В контрольных вариантах допускается гибель 1% личинок, используемых в эксперименте. Биотестирование на личинках проводили в 3-х кратном повторе.

Определение микотоксинов в экстрактах грибов и в образцах сушеного винограда проводили методом ТСХ флуометрии (Руковод. по методам, 1998). Экстракты грибов получали при их инкубировании на жидкой питательной среде Чапек-Докс. Для накопления токсических веществ в питательную среду добавляли сахарозу (5% и 10%) и дрожжевой экстракт (1%). Культивирование токсинообразующих грибов на жидкой питательной среде проводили поверхностным методом. Инкубацию штаммов проводили при температуре 28–30°C, 10–14 дней (Методы эксп. микологии, 1982). Для экстрагирования токсичных веществ грибного происхождения использовали хлороформ. Экстрагирование повторяли трижды. Растворитель отделяли от культуральной жидкости с помощью делительной воронки и все экстракты соединяли, а полученный раствор упаривали на ротационном испарителе.

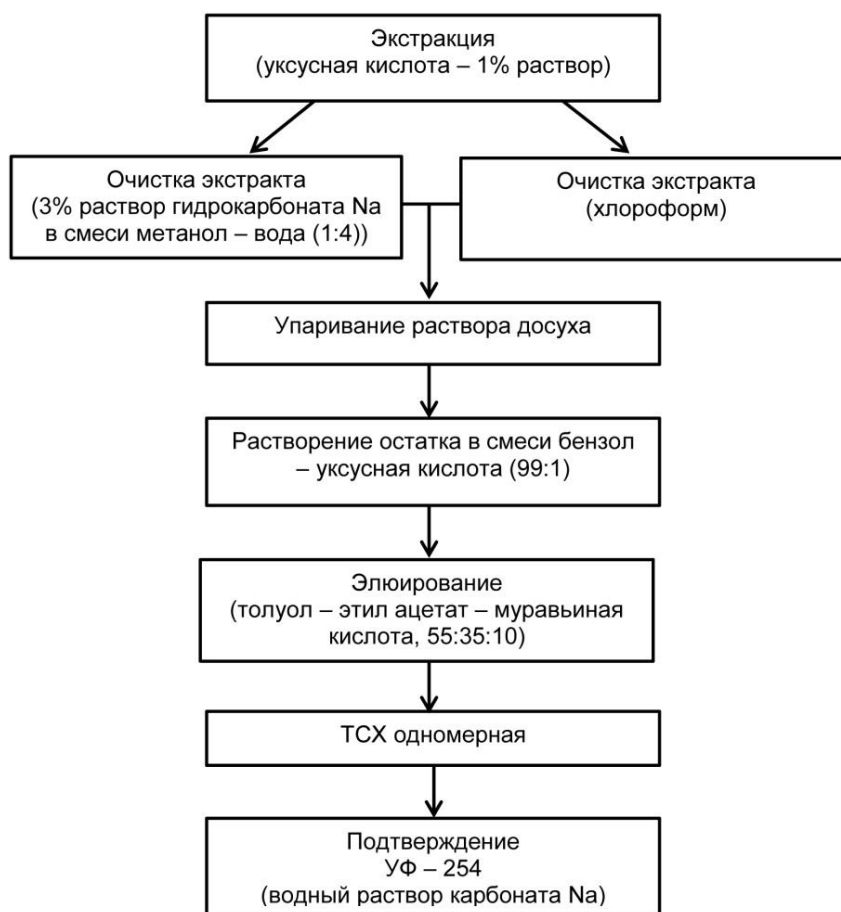


Рис. 5 Основные этапы определения ОТА методом ТСХ

Пластинку рассматривали в длинноволновом УФ-свете. Пятна охратоксина А флуоресцируют зелено-синим цветом. Затем пластинку опрыскивали насыщенным раствором карбоната натрия в воде и рассматривали в длинноволновом УФ-свете. Цвет флуоресценции охратоксина А должен измениться на синий. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности пятнам стандарта охратоксина А свидетельствует о наличии охратоксина А в образце.

Концентрацию охратоксина А в образце рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times V_3 \times m}{10K \times V_2 \times V_4 \times M}$$

где

С - концентрация охратоксина А в образце, мг/кг;

V_1 - объем хлороформа для экстракции образца, см^3 (125 см^3);
 V_2 - объем хлороформного фильтрата взятого для анализа, см^3 (50 см^3);
 V_3 - объем экстракта для ТСХ (раствор А), см^3 ($0,4 \text{ см}^3$);
 V_4 - объем экстракта (раствор А) нанесенного на пластинку, см^3 ($0,02 \text{ см}^3$);
 m - количество охратоксина А в пятне, оцененное по ТСХ (нг);
 M - навеска образца взятая для анализа, г (25 г);
 K - степень извлечения охратоксина А

Определение афлатоксина B_1 в штаммах *A. flavus* также проводили методом ТСХ анализа. Метод отличается только реагентами, используемыми для экстракции штаммов (ацетон, NaCl), очистки экстракта (ацетат свинца, гексан) и элюирования (хлороформ-ацетон, 3:1). Пластинки опрыскивали раствором $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$ (1:3).

Так как ТСХ анализ не позволяет выявить наличие охратоксина А в образцах сушеного винограда, то возникла необходимость в проверке результатов по определению ОТА более чувствительными методами, какими являются ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) (рис. 6) и ИФА (иммуноферментный анализ) (рис. 7). По сравнению с ТСХ эти методы имеют преимущество более высокой эффективности разделения, а также возможности получения более точных количественных результатов. В обоих случаях очистку экстрактов проб проводили с помощью иммуноаффинной колоночной хроматографии (КХ), которая характеризуется высокой степенью извлечения.

Определение количества ОТА в экстрактах грибов и в образцах сушеного винограда проводилось методом ИФА (иммуноферментный анализ) и методом ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) в лаборатории Romer Labs в Австрии.

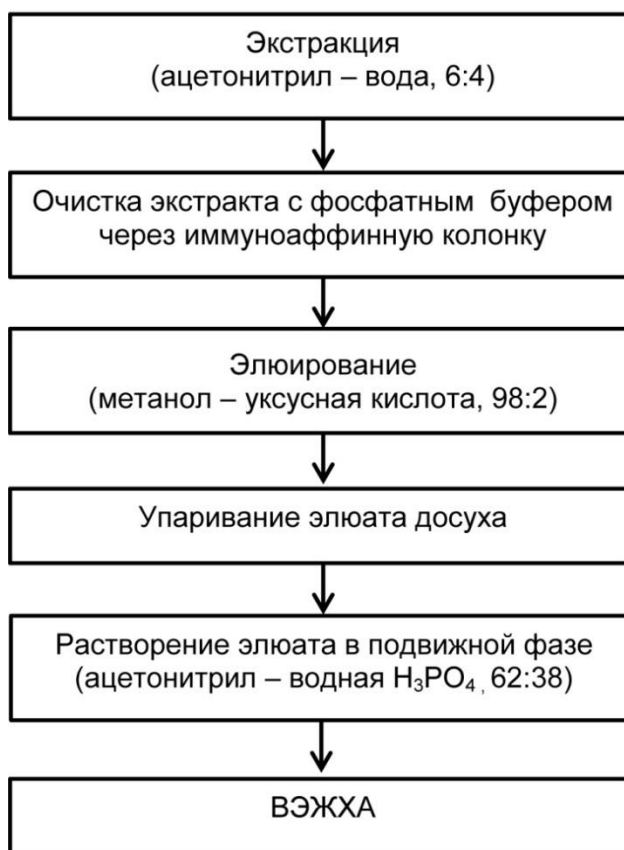


Рис. 6. Основные этапы определения ОТА методом ВЭЖХ по ГОСТ Р 52471-2005

Массовую долю охратоксина А в пробе X , млн^{-1} , вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_1 \cdot V_2 \cdot C_x}{V_3 \cdot m \cdot \eta} \cdot Q \cdot 10^{-3}$$

где

V_1 - объем хлороформа, взятого для экстракции, см^3 (30 см^3);

V_2 - объем конечного концентрата пробы, см^3 ($0,5 \text{ см}^3$);

C_x - массовая концентрация охратоксина А в конечном концентрате пробы нг/см^3 ;

V_3 - объем хлороформного экстракта, взятого для испытаний см^3 (20 см^3);

m - масса навески, г;

η - коэффициент прохождения охратоксина А;

Q - коэффициент разбавления концентрата пробы;

10^{-3} - коэффициент согласования размерности единиц массы.

Коэффициент разбавления Q вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_p}{V_a}$$

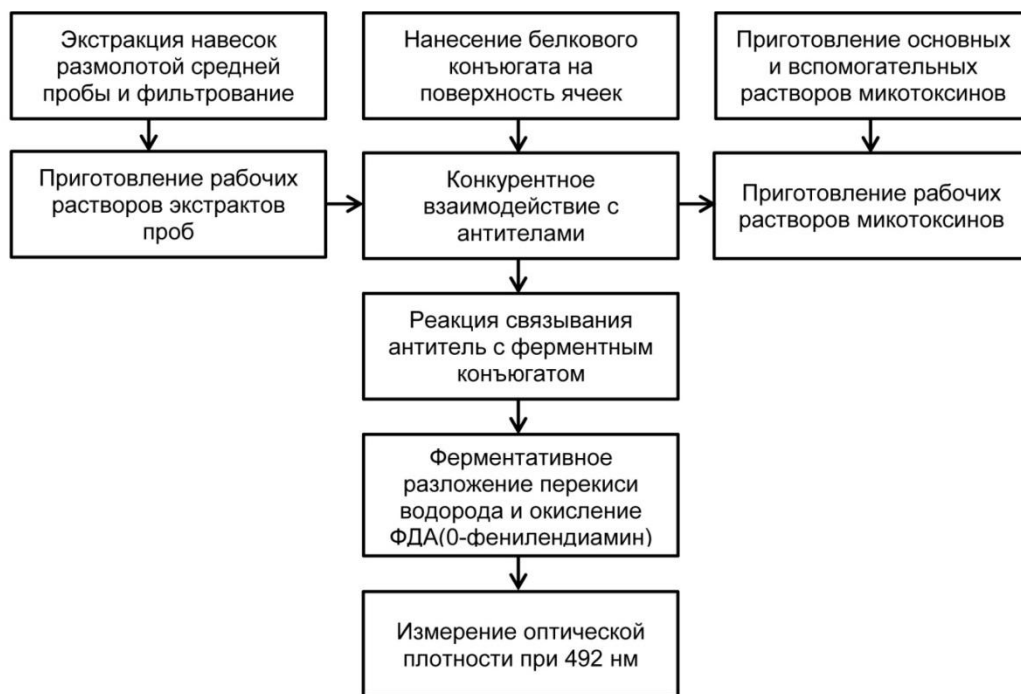
где

V_p - объем разбавленного концентрата испытуемой пробы, см³;

V_a - объем исходного концентрата испытуемой пробы, взятый для разбавления, см³.

За результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов измерений, полученных для двух параллельных проб.

Иммуноферментный метод основан на определении содержания микотоксинов в пробах с помощью непрямого твердофазного конкурентного ИФА рабочих растворов экстрактов (рис. 7). Непрямой ИФА основан на способности микотоксинов взаимодействовать со специфичными антителами в условиях конкуренции с белковым конъюгатом микотоксина, нанесенным на поверхность твердофазного антигена (ГОСТ Р 52471-2005).



Содержание микотоксина в каждой параллельной пробе X_i , мг/кг, вычислялось по формуле

$$X_i = \frac{C * V * K}{m}$$

где

C - массовая концентрация микотоксина в рабочем растворе экстракта, мкг/см³;

m - навеска пробы, взятая для анализа, г;

V - объем смеси ацетонитрила и воды, взятый для экстракции, см³;

K - кратность разбавления экстракта при приготовлении рабочего раствора.

За результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов измерений, полученных для двух параллельных проб.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНТАМИНИРУЮЩЕЙ МИКОБИОТЫ ИЗУЧЕННЫХ СОРТОВ СУШЕНОГО ВИНОГРАДА

3.1. Таксономический анализ видов грибов, изолированных из образцов сушеного винограда

С целью выявления видового состава грибов-контаминантов сушеного винограда, реализуемого в Армении, проведен микологический анализ 167 образцов армянского и импортированного сушеного винограда. Выделено и идентифицировано 32 вида мицелиальных грибов, которые относятся к двум классам: *Zygomycetes* и *Deuteromycetes* (табл. 11) и 6 родам - *Mucor*, *Syncephalastrum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*.

Класс *Zygomycetes* представлен двумя родами: *Mucor* и *Syncephalastrum*. Из класса *Deuteromycetes* выявлены 29 видов мицелиальных микромицетов, которые относятся к 4 родам: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*.

Табл. 11. Таксономический состав грибов, контаминирующий разные виды сушеного винограда

Класс	Порядок	Семейство	Род	Количество	
				ВИДОВ	ИЗОЛЯТОВ
<i>Zygomycetes</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor</i>	2	32
		<i>Piptocephalidaceae</i>	<i>Syncephalastrum</i>	1	3
<i>Deuteromycetes</i>	<i>Hyphomycetales</i>	<i>Moniliaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	15	455
			<i>Penicillium</i>	12	95
			<i>Trichoderma</i>	1	3
		<i>Dematiaceae</i>	<i>Alternaria</i>	1	5
<i>Итого: 2</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>6</i>	<i>32</i>	<i>913</i>

По видовому разнообразию и частоте встречаемости в изученных сортах сушеного винограда род *Aspergillus* отличается от других родов. Из общего числа изолированных видов мицелиальных грибов 15 (47%) относятся к роду *Aspergillus* (рис. 8).

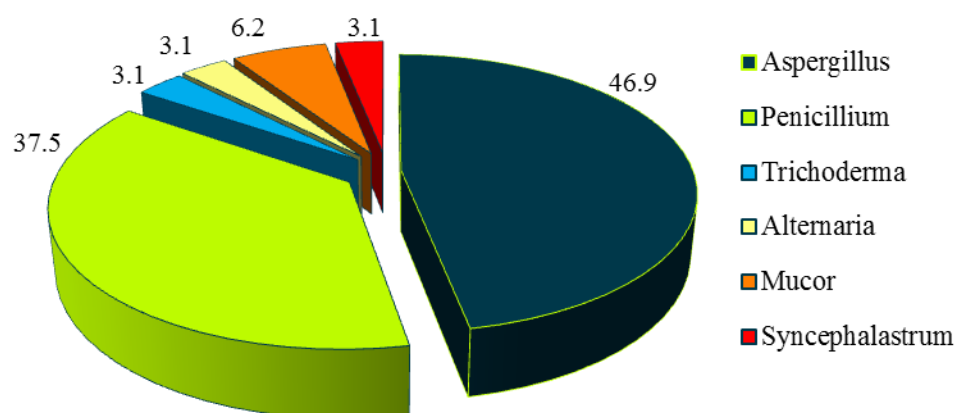


Рис. 8. Процентное содержание родов мицелиальных грибов, выявленных в образцах сушеного винограда

Среди видов рода *Aspergillus* - *A. niger* (64.8%) и *A. carbonarius* (53%) являются доминирующими по частоте встречаемости (фото 3). Виды *A. sclerotiicarbonarius* (37%), *A. tubingensis* (37.5%), *A. foetidus* (35.4%) и *A. flavus* (29.8%) имели среднюю частоту встречаемости (табл. 12). Перечисленные виды, за исключением вида *A. flavus*, относятся к секции *Aspergillus Nigri*. Указанные виды зарегистрированы в большинстве анализируемых образцах сушеного винограда. В таблице 12 приводится частота встречаемости видов грибов, выделенных из всех исследованных образцов сушеного винограда.



(a)



(б)

Фото 3. Колонии видов (а) *Aspergillus carbonarius*, (б) – *Aspergillus niger* и *Aspergillus foetidus* выявленные в образцах армянского изюма

Табл. 12. Частота встречаемости грибов, выделенных из разных сортов сушеного винограда

№№	Виды грибов	Количество выделенных штаммов	Частота встречаемости видов грибов (%)
	Род <i>Aspergillus</i>	675	–
1	<i>A. niger</i> Thom	169	64.8
2	<i>A. carbonarius</i> (Bainier) Thom	173	53
3	<i>A. tubingensis</i> Mosseray	29	37.5
4	<i>A. sclerotii carbonarius</i> Noonim et al.	33	37
5	<i>A. foetidus</i> Thom & Raper	37	35.4
6	<i>A. flavus</i> Link	67	29.8
7	<i>A. sclerotioniger</i> Samson & Frisvad	61	23.7
8	<i>A. aculeatus</i> Iizuka	13	23.7
9	<i>A. nomius</i> Kurtzman et al.	21	18
10	<i>A. fumigatus</i> Fresen	10	17.8
11	<i>A. japonicus</i> Saito	8	14
12	<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	10	13
13	<i>A. lacticoffeatus</i> Frisvad & Samson	28	12
14	<i>A. uvarum</i> Perrone et al.	9	11.9
15	<i>A. oryzae</i> Cohn	7	11.9
	Род <i>Penicillium</i>	95	–
1	<i>P. variable</i> Sopp	29	31.4
2	<i>P. lanosum</i> Westling	19	25.5
3	<i>P. velutinum</i> Beyma	9	16.3
4	<i>P. chrysogenum</i>	11	15
5	<i>P. stekii</i> Zalesky	6	8.3
6	<i>P. corimbiferum</i> Westling	5	7.9
7	<i>P. diversum</i> Raper & Fennell	3	7
8	<i>P. rubrum</i> Stoll	6	6.3
9	<i>P. cyclopium</i> Westling	4	6.3
10	<i>P. griseofulvum</i> Bainier	2	4.5
11	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	2	4
12	<i>P. clavigerum</i> Demelius	2	3.57
	Род <i>Trichoderma</i>	3	–
1	<i>T. viride</i> Persoon ex Fries	3	6.7
	Род <i>Alternaria</i>	5	–
1	<i>A. alternata</i> Keissler	5	9
	Род <i>Mucor</i>	132	–
1	<i>M. racemosus</i> Fries	69	53.1
2	<i>M. mucedo</i> Fries	63	42.8
	Род <i>Syncephalastrum</i>	3	–
1	<i>S. racemosum</i> Cohn ex Schroet	3	5
32	Итого	913	–

Примечание по (Mohamed et al., 1986):
 высокая частота встречаемости - > 50%
 умеренная частота встречаемости – 25% - 49%
 низкая частота встречаемости – 12% - 24%
 редкая частота встречаемости - <12%

Согласно данным Самсона (Samson et. al., 2007), виды *A. sclerotioniger*, *A. lacticoffeatus* и *A. niger* также являются потенциальными продуцентами охратоксина А. Однако, только отдельные штаммы указанных видов способны продуцировать микотоксины. Виды *A. sclerotioniger* и *A. lacticoffeatus* идентифицированы как новые относительно недавно (Samson et. al., 2004). Их присутствие повышает вероятность контаминации сушеного винограда охратоксином А. В образцах сушеного винограда выявлены 9 потенциально токсигенных видов грибов из рода *Aspergillus*. Из них 7 являются охратоксигенными: 6 видов из секции *A. Nigri* и 1 - из секции *A. Circumdati*, вид *A. ochraceus*. Изолированные штаммы *A. niger* составляют 25%, а штаммы *A. carbonarius* – 25.6%, из всех штаммов рода *Aspergillus* (рис. 9). Из изолированных токсигенных видов рода *Aspergillus*, 2 относятся к секции *A. Flavi*: *A. flavus*, *A. nomius*, которые являются потенциальным продуцентом афлатоксинов.

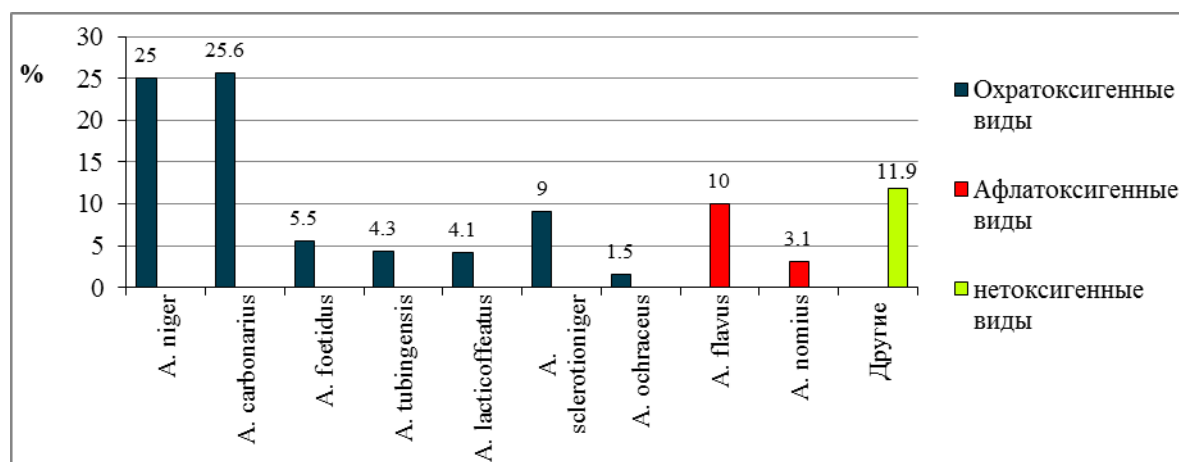


Рис. 9. Процентное распределение потенциально токсигенных видов из рода *Aspergillus*, изолированных из сушеного винограда

Исследованиями многочисленных авторов доказано (Sage et al., 2002, Serra et al., 2003, Magnoli et al., 2003, Bau et al., 2005, Battilani et al., 2006, Leong et al., 2006, Valero et al., 2006), что виды *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. tubingensis* из рода *Aspergillus* составляют специфичную микофлору сушеного винограда, для стран

средиземноморского региона, Австралии (Виктория) и США (Калифорния). Факт доминирования видов грибов из секции *Aspergillus Nigri* в микобиоте сушеного винограда, подтвердились также нашими экспериментальными данными (рис. 10). Виды из указанной секции составили 66.7% (10 видов) от общего количества изолированных видов рода *Aspergillus* (15).

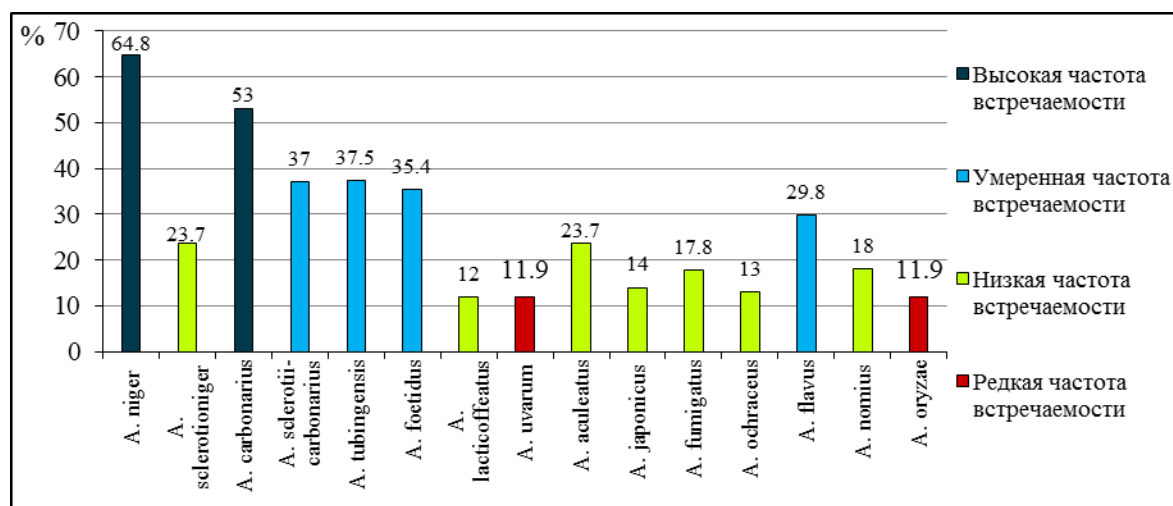


Рис. 10. Частота встречаемости видов рода *Aspergillus*, выделенных из сушеного винограда

Виды из секции *Aspergillus Flavi* имели умеренную (*A. flavus* – 29.8%) и низкую (*A. nomius* -18%) частоту встречаемости. Виды *A. flavus* и *A. nomius* выявлены как в местных, так и импортированных образцах сушеного винограда. Указанные виды также входят в состав характерной микофлоры сушеного винограда (Youssef et al., 2000, Romero et al., 2005, Iamanaka et al., 2007). В работах указанных авторов отмечается, что вид *A. flavus*, наряду с видами из секции *A. Nigri*, имеет высокую частоту встречаемости при микологическом анализе сушеного винограда.

Согласно результатам исследований некоторых авторов, грибы из рода *Penicillium* относятся к категории доминирующей микобиоты сушеного винограда (Zohri, Abdel-Gawad, 1993, Youssef et al., 2000, Giridhar, Reddy, 2001, Saeed et al., 2004). Известно довольно мало работ, в которых описывается род *Penicillium* на сушеном винограде, с указанием видового состава. Представители указанного рода, также представляют определенный риск для здоровья потребителя, в связи с потенциальной способностью продуцировать микотоксины и другие вторичные метаболиты, при высокой степени контаминации сушеного винограда (Weidenborner, 2001, Frisvad et al., 2004).

В результате наших микологических исследований, из образцов сушеного винограда выделено и идентифицировано 12 видов грибов рода *Penicillium*. Доминирующими среди них являются виды *P. variable* (31.4%) и *P. lanosum* (25.5%), с умеренной частотой встречаемости. Для видов *P. velutinum* (16.3%) и *P. chrysogenum* (15%) отмечается низкая частота встречаемости. Частота встречаемости остальных видов рода *Penicillium* не превышает 12% (рис. 11).

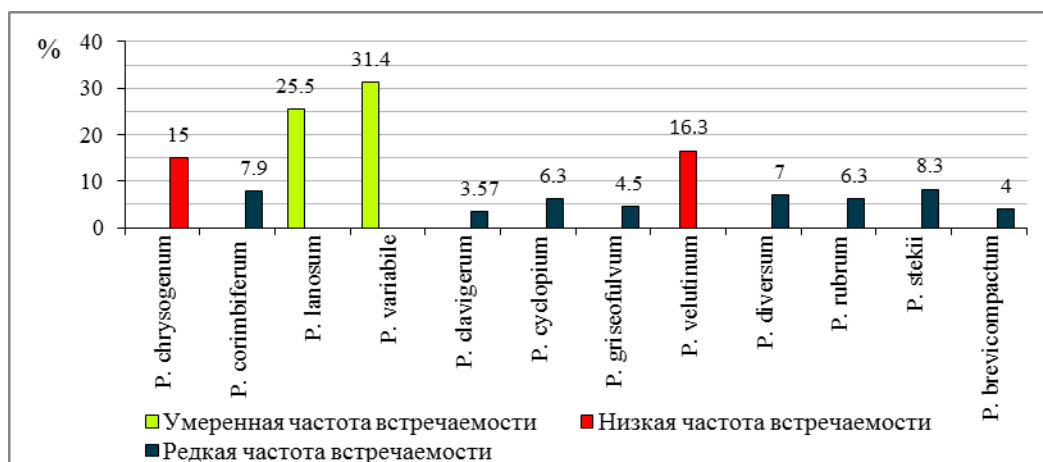


Рис. 11. Частота встречаемости видов рода *Penicillium*, выделенных из образцов сушеного винограда

Среди выявленных видов имеются потенциальные продуценты микотоксинов. Например *P. lanosum*, *P. velutinum* и *P. steckii* известны как продуценты цитринина (Smith, Henderson, 1991, Weidenborner, 2001), *P. rubrum* является продуцентом рубротоксина (Weidenborner, 2001), *P. cyclopium* может синтезировать циклопиазоновую и пеницилловую кислоты (Frisvad, Samson, 2004, Weidenborner, 2001), виды *P. brevicompactum*, *P. clavigerum* – микофеноловую кислоту и патулин (Frisvad, Samson, 2004), *P. griseofulvum* синтезирует патулин. Необходимо также отметить, что среди выявленных видов встречаются коремиальные грибы, такие, как виды *P. clavigerum* и *P. corymbiferum*, которые отличаются высокой устойчивостью к условиям окружающей среды.



Фото 4. Вид *Penicillium variabile* на среде Мальт – Экстракт агар

При идентификации видов рода *Penicillium* были использованы идентификационные схемы по Питт Д.И. (1979) и Пидопличко Н.М. (1972). Для окончательной идентификации, выделенных видов, были учтены изменения в их номенклатуре, приведенные разными авторами за последние годы. В таблице 13 приведены номенклатурные изменения видового состава выделенных видов из рода *Penicillium*.

Табл. 13. Номенклатура видов грибов рода *Penicillium*, изолированных из образцов сушеного винограда

Старое название вида	Подрод	Секция	Новое название вида по ICPA (2013)	Новое название вида по Samson and Pitt (2000)
<i>P. cyclopium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fasciculata</i>	<i>P. aurantiogrizeum</i>	<i>P. aurantiogrizeum</i>
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Chrysogena</i>	–	<i>P. notatum</i>
<i>P. clavigerum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	–	<i>P. duclauxii</i>
<i>P. corimbiferum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fasciculata</i>	<i>P. hirsutum</i>	<i>P. hirsutum</i>
<i>P. variabile</i>	<i>Talaromyces</i>	<i>Biverticillium</i>	<i>Talaromyces variabile</i>	<i>P. expansum</i>
<i>P. griseofulvum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	–	<i>P. patulum</i>
<i>P. velutinum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Exilicaulis</i>	–	<i>P. velutinum</i>
<i>P. lanosum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Ramosa</i>	–	<i>P. puberulum</i>
<i>P. diversum</i>	<i>Talaromyces</i>	<i>Biverticillium</i>	<i>T. diversus</i>	–
<i>P. steckii</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Citrina</i>	–	<i>P. citrinum</i>
<i>P. brevicompactum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Brevicompacta</i>	<i>P. olsonii</i>	–
<i>P. rubrum</i>	<i>Talaromyces</i>	<i>Biverticillium</i>	<i>P. purpurogenum</i>	<i>P. purpurogenum</i>

В проанализированных образцах сушеного винограда обнаружена высокая степень контаминации видами *Mucor mucedo* и *M. racemosus* (табл. 12). Указанные виды

относятся ко вторичным контаминантам сушеного винограда и, в большинстве случаев, их присутствие связано с нарушениями гигиенических условий, которые имеют место в процессе сушки и упаковки. Виды *M. mucedo* и *M. racemosus* более часто регистрируются в местных образцах сушеного винограда. Они поражают исключительно внешнюю поверхность продукта и не выявляются после внешней обработки сушеного винограда 3%-ным раствором гипохлорида натрия. Виды рода *Mucor* характеризуются высокой энергией роста и обычно ингибируют рост других видов микромицетов, специфичных для сушеного винограда.

Роды *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Alternaria* представлены единичными видами, с редкой частотой встречаемости (табл. 11, 12).

3.2. Сравнение видового состава мицелиальных грибов, выделенных из армянских и импортированных образцов сушеного винограда

В последние годы объемы импорта сушеного винограда стали превышать объемы его производства в Армении. Из общего количества импортируемых сухофруктов около 75% составляет сушеный виноград (Статист. Ежегодн. Армении, 2013).

В Армению сушеный виноград импортируется в основном из Ирана, а также из других стран: Турции, Узбекистана, Казахстана и США (Калифорния) (рис. 12). В РА в основном импортируются кишмишные сорта сушеного винограда.

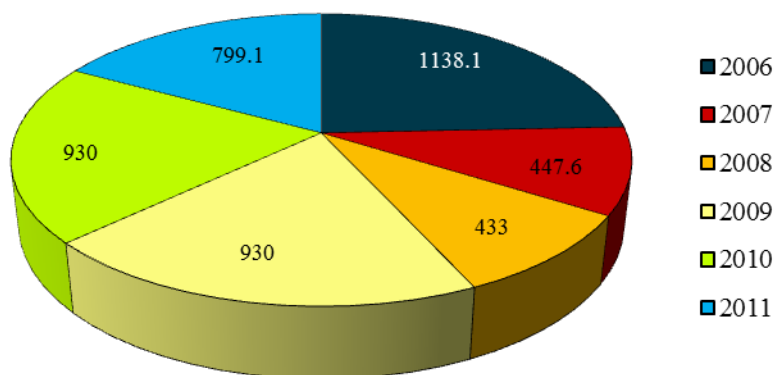


Рис. 12. Объемы импортированного в Армению сушеного винограда (в тоннах) с 2006 по 2011 гг. (источник – Статист. Ежегодн. Армении.)

Проведен анализ 87 образцов армянского сушеного винограда и 80 образцов, импортированного из разных стран. Сравнительный микологический анализ образцов местного и импортированного сушеного винограда показал, что степень контаминации армянского сушеного винограда мицелиальными грибами (до 4.3×10^4 КОЕ/г) довольно часто превышает предельно допустимый уровень для указанного показателя, представленный в местных и зарубежных санитарных правилах и нормах (табл. 14).

Согласно СанПин 2.3.2.1078-01 предельно допустимое количество диаспор плесневых грибов в 1 г сушеного винограда не должно превышать 5×10^2 КОЕ/г. Из таблицы видно, что в образцах узбекского и казахстанского сушеного винограда степень контаминации диаспорами мицелиальных грибов превышает предельно допустимый уровень.

Табл. 14. Степень заспоренности микромицетами сушеного винограда из разных стран

Страна производитель сушеного винограда	Количество образцов	Степень заспоренности КОЕ/г
Армения	87	$2.2 \times 10^2 - 4.3 \times 10^4$
Иран	40	$2.3 \times 10^2 - 4.8 \times 10^2$
Калифорния (США)	10	$1.8 \times 10^2 - 3.64 \times 10^2$
Узбекистан	17	$2.7 \times 10^2 - 5.8 \times 10^3$
Казахстан	13	$1.82 \times 10^2 - 1.7 \times 10^3$

В видовом составе грибов, выделенных из армянских и импортированных образцов сушеного винограда обнаружены определенные различия. Из местных образцов изолированы 27 видов, 13 из которых относятся к роду *Aspergillus* (рис. 13).

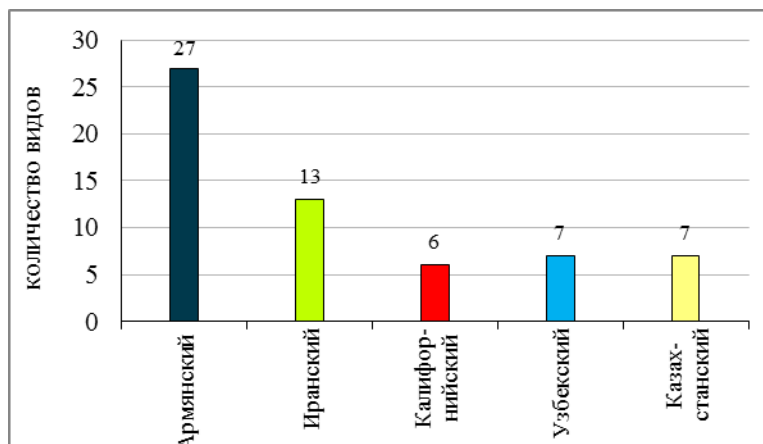


Рис. 13. Количество видов грибов выявленных в образцах сушеного винограда из разных стран

Из образцов иранского сушеного винограда выделено 13 видов грибов, 6 из которых относятся к роду *Aspergillus* (табл. 15). В остальных импортированных образцах выявлены по 3 вида из рода *Aspergillus*. Как видно из таблиц 14 и 15, по количеству выявленных видов грибов и по степени заспоренности образцов наименее контаминированным является Калифорнийский сушеный виноград.

Табл. 15. Количество видов грибов по родам, изолированных из сушеного винограда в зависимости от их происхождения

Род	Страна производитель сушеного винограда				
	Армения	Иран	США, Калифорния	Узбекистан	Казахстан
<i>Aspergillus</i>	13 видов	6 видов	3 вида	3 вида	3 вида
<i>Penicillium</i>	10 видов	4 вида	2 вида	2 вида	2 вида
<i>Trichoderma</i>	-	1 вид	-	-	-
<i>Alternaria</i>	1 вид	-	-	-	-
<i>Mucor</i>	2 вида	2 вида	1 вид	2 вида	2 вида
<i>Syncephalastrum</i>	1 вид	-	-	-	-

Из общего числа 80 проанализированных образцов импортированного сушеного винограда выявлены 8 видов рода *Aspergillus* (табл. 16). Загрязнение сушеного винограда потенциально токсигенными видами *A. niger* и *A. carbonarius* довольно высокая не только в образцах местного производства, но и в импортированных (табл. 16).

Табл. 16 . Результаты сравнительного анализа видов рода *Aspergillus*, выявленных в местных и импортированных образцах сушеного винограда

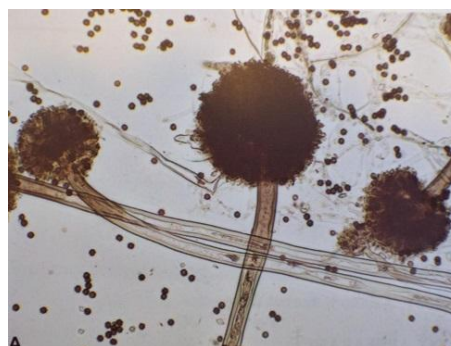
Вид	Количество изолятов	
	Армянские образцы	Импортированные образцы
<i>A. niger</i>	79	90
<i>A. carbonarius</i>	107	66
<i>A. foetidus</i>	20	17
<i>A. tubingensis</i>	16	13
<i>A. sclerotium</i>	61	-
<i>A. sclerotium carbonarius</i>	33	-
<i>A. flavus</i>	45	22
<i>A. lactiofeatus</i>	28	-

<i>A. nomius</i>	21	-
<i>A. uvarum</i>	-	9
<i>A. japonicus</i>	-	8
<i>A. aculeatus</i>	13	-
<i>A. ochraceus</i>	10	-
<i>A. fumigatus</i>	6	4
<i>A. orizae</i>	7	-
Итого	446	229

Вид *A. niger* выявлен в 87% из общего числа проанализированных образцов сушеного винограда. Этот вид был доминирующим среди видов грибов, выделенных как из местных, так и импортированных образцов. Указанный вид более часто встречался в образцах импортированного сушеного винограда (67%), однако и в местных образцах для указанного вида отмечается высокий процент встречаемости (59%). При микологическом анализе сушеного винограда, часто наблюдали монополярный рост *A. niger* (фото 4), для отдельных штаммов которого характерна высокая антагонистическая активность, а также высокая энергия роста.



(а)



(б)

Фото 4. Вид *Aspergillus niger*: (а) – колонии, (б) - конидиальная головка с конидиеносцем (40х)

По сравнению с импортированным, местный сушеный виноград более подвергнут загрязнению токсигенными штаммами *A. carbonarius* (рис. 14). Частота встречаемости одного из активных продуцентов охратоксина А - *A. carbonarius*, в местном сушеном винограде составляет 73%, в импортированном – 44%. Контаминация сушеного винограда видом *A. carbonarius* является основной проблемой, в связи с биосинтезом охратоксина А на разных стадиях производства сушеного винограда. Результаты научных исследований, проводимых в ряде стран показали, что обнаружение

охратоксина А в продуктах виноградарства, в том числе и сушеном винограде, связано в первую очередь с присутствием вида *A. carbonarius* (Abarca et al., 2003, Tjamos et al., 2004, Magnoli et al., 2004, Romero et al., 2005, Palumbo et al., 2011).

Частота встречаемости видов *A. foetidus* и *A. tubingensis* в импортированных образцах составляет соответственно 28.8% и 43.2%. В местном сушеном винограде указанный показатель для вида *A. foetidus* доходит до 52% и для *A. tubingensis* - 46%. Виды *A. sclerotium* и *A. lacticokeatus*, известные как потенциальные продуценты ОТА, обнаружены исключительно в местных образцах изюма. Указанные виды, которые до этого были выделены только из зёрен кофе (Samson et al., 2004), впервые выявлены нами на новом субстрате – сушеном винограде.

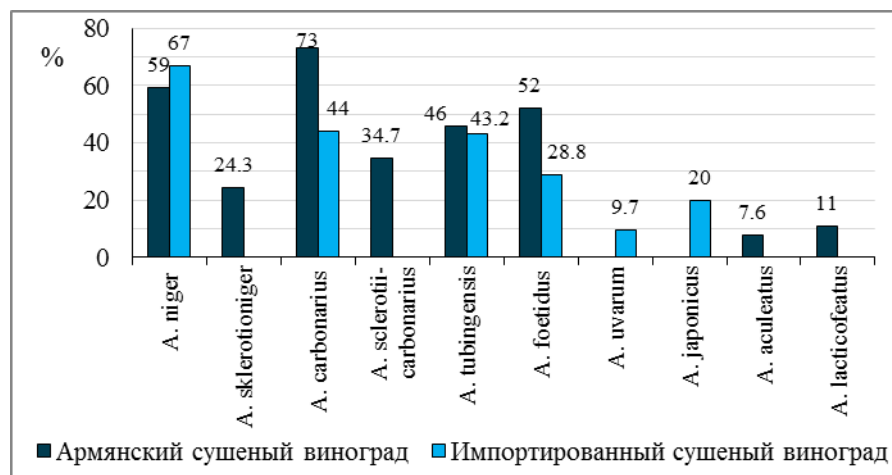


Рис. 14. Частота встречаемости видов грибов из секции *Aspergillus Nigri* в армянских и импортированных образцах сушеного винограда

В местных образцах выявлен только один вид из секции *A. Nigri* с одноярусными стеригмами. Это вид *A. aculeatus*, частота встречаемости которого не превышает 7,6%. В импортированных образцах обнаружены два вида с одноярусными стеригмами: *A. uvarum* (9.7%) и *A. japonicus* (20%).

Из местного сушеного винограда изолированы два вида потенциальных продуцентов афлатоксинов из секции *Aspergillus Flavi*: *A. flavus* и *A. nomius*. В импортированном сушеном винограде выявлен только *A. flavus* с низкой частотой встречаемости (20%). В армянском сушеном винограде частота встречаемости вида *A. flavus* доходит до 59%, для вида *A. nomius* – не более 18% (рис. 15).

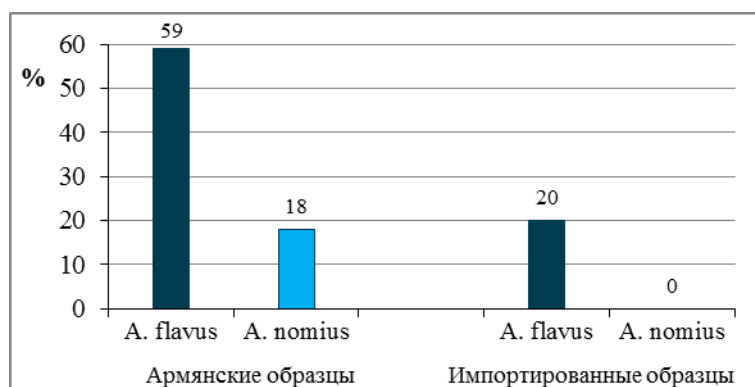


Рис. 15. Частоты встречаемости видов из секции *Aspergillus Flavi* в образцах сушеного винограда

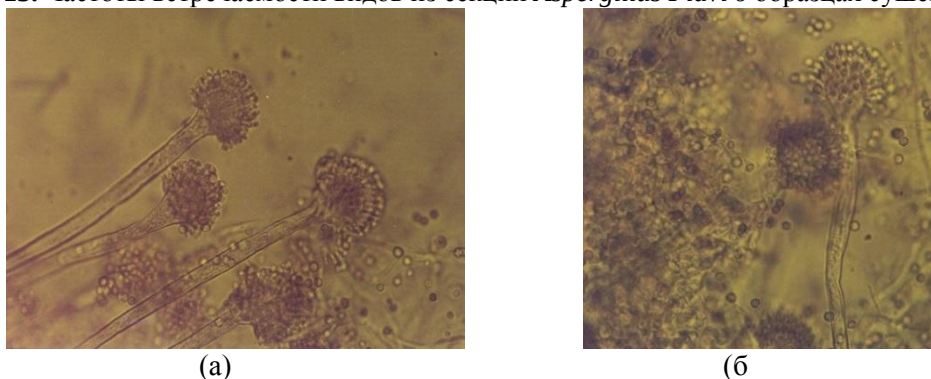


Фото 5. (а) – вид *A. flavus*, (б) – вид *A. nomius* под микроскопом с увеличением (40х)

В местных образцах выявлены 10 видов грибов из рода *Penicillium*: *P. cyclopium*, *P. lanosum*, *P. variable*, *P. clavigerum*, *P. velutinum*, *P. rubrum*, *P. steckii*, *P. brevicompactum*, *P. griseofulvum*, *P. diversum*, а в импортированных – 6 видов: *P. chrysogenum*, *P. clavigerum*, *P. corimbiferum*, *P. griseofulvum*, *P. velutinum*, *P. variable* (рис. 16).

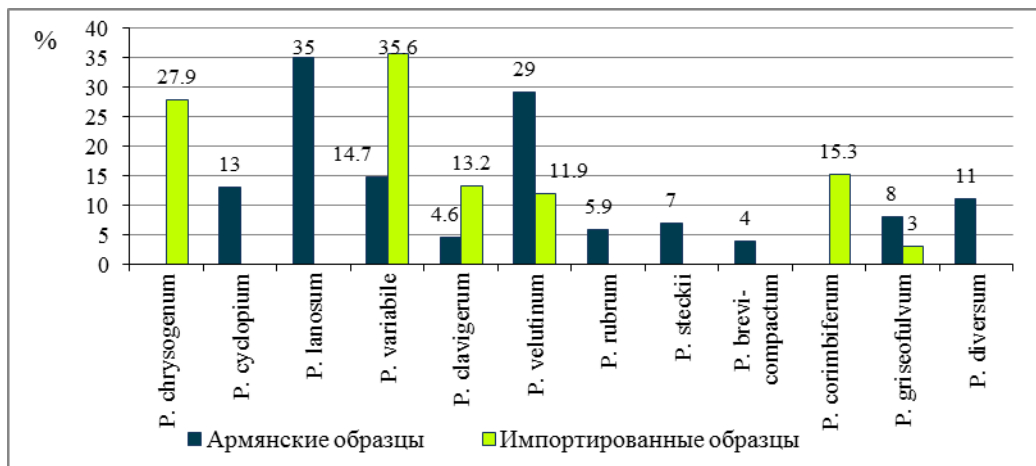


Рис. 16. Частота встречаемости видов рода *Penicillium*, выявленных в исследованных образцах сушеного винограда

Виды *P. chrysogenum* (27.9%) и *P. variable* (35.6%) хотя и имеют умеренную частоту встречаемости, но более часто встречаются в импортированном сушеном винограде (рис. 16). Вид *P. velutinum* более часто встречается в образцах местного происхождения (29%). Виды *P. chrysogenum* и *P. corimbiferum* в армянских образцах не обнаружены.

Из числа проанализированных образцов сушеного винограда, независимо от страны - производителя, 76.3% были контаминированы муковыми грибами. Виды *Alternaria alternata* и *Syncephalastrum racemosum* зарегистрированы только в образцах местного производства (табл. 15).

3.3. Сравнительный анализ микобиоты белых и темных сортов сушеного винограда

При сравнении результатов анализа микобиоты белых и темных сортов сушеного винограда выяснилось, что темные сорта сушеного винограда больше подвержены контаминации мицелиальными грибами. Из проанализированных образцов темного сушеного винограда выделено 28 видов, а из белого - всего 16 видов микромицетов, при почти равном количестве исследованных образцов.

Табл. 17. Сравнительный анализ микобиоты белых и темных сортов сушеного винограда и степень их заспоренности

Продукт	Сорт сушеного винограда	Количество образцов	Количество видов грибов контаминантов	Степень заспоренности КОЕ/г
Изюм	Белый	35	20	$4.5 \times 10^2 - 2.4 \times 10^3$
	Темный	46	28	$2.6 \times 10^3 - 4.3 \times 10^4$
Кишмиш	Белый	48	16	$1.8 \times 10^2 - 7.4 \times 10^2$
	Темный	38	24	$2.0 \times 10^2 - 4 \times 10^4$

Степень заспоренности, в большинстве образцов темных сортов сушеного винограда, превышает допустимые уровни, установленные для плесневых грибов (5×10^2

КОЕ/г), которые приведены в СанПиН 2.1.2.78-01. В отдельных образцах сушеного винограда уровень заспоренности составил 4.3×10^4 КОЕ/г.

В разных сортах сушеного винограда видовое разнообразие и частота встречаемости видов рода *Mucor* почти одинаково. Частота встречаемости видов рода *Aspergillus* для темных сортов сушеного винограда превышает частоту встречаемости видов указанного рода для белых сортов. Роды *Alternaria*, *Trichoderma* и *Syncephalastrum* встречаются только в образцах темных сортов сушеного винограда (табл. 18).

Табл. 18. Процентное соотношение изолятов грибов, изолированных из разных сортов сушеного винограда

	Вид	Изюм		Кишмиш	
		Белые сорта	Темные сорта	Белые сорта	Темные сорта
1	<i>M. mucedo</i>	15.9%	42.9%	11.1%	30.2%
2	<i>M. racemosus</i>	21.7	30	21.7	27.5
3	<i>S. racemosum</i>	-	66.7	-	33.3
4	<i>A. niger</i>	22.5	40.8	13	23.7
5	<i>A. sclerotioniger</i>	27.9	72.1	-	-
6	<i>A. carbonarius</i>	17.3	40.5	19.1	23.1
7	<i>A. sclerotii carbonarius</i>	21.2	48.5	-	30.3
8	<i>A. tubingensis</i>	24.1	27.6	17.2	31.1
9	<i>A. foetidus</i>	24.3	29.7	19	27
10	<i>A. lacticoffeatus</i>	-	100	-	-
11	<i>A. uvarum</i>	-	-	100	-
12	<i>A. aculeatus</i>	-	38.5	-	61.5
13	<i>A. japonicus</i>	25	37.5	12.5	25
14	<i>A. fumigatus</i>	30	30	20	20
15	<i>A. ochraceus</i>	-	60	-	40
16	<i>A. flavus</i>	19.4	44.8	10.4	25.4
17	<i>A. nomius</i>	19	42.9	-	38.1
18	<i>A. orizae</i>	-	42.9	-	57.1
19	<i>P. chrysogenum</i>	18.2	27.3	18.2	36.3
20	<i>P. corimbiferum</i>	-	-	100	-
21	<i>P. lanosum</i>	15.8	42.1	10.5	31.6
22	<i>P. variabile</i>	13.8	37.9	17.2	31.1
23	<i>P. clavigerum</i>	50	-	50	-
24	<i>P. cyclopium</i>	-	75	-	25
25	<i>P. griseofulvum</i>	-	50	-	50
26	<i>P. velutinum</i>	33.3	22.2	-	44.5
27	<i>P. diversum</i>	33.3	66.7	-	-
28	<i>P. rubrum</i>	33.3	50	-	16.7

29	<i>P. stekii</i>	33.3	-	66.7	-
30	<i>P. brevicompactum</i>	-	50	-	50
31	<i>T. viride</i>	-	100	-	-
32	<i>A. alternata</i>	-	60	-	40

Из выявленных видов мицелиальных микромицетов в темных сортах сушеного винограда 50% относятся к роду *Aspergillus*, 32.15% - к роду *Penicillium*. Виды выявленные из рода *Aspergillus* в белых сортах сушеного винограда составляют 39.25% из всех идентифицированных микромицетов в указанных образцах (рис. 17).

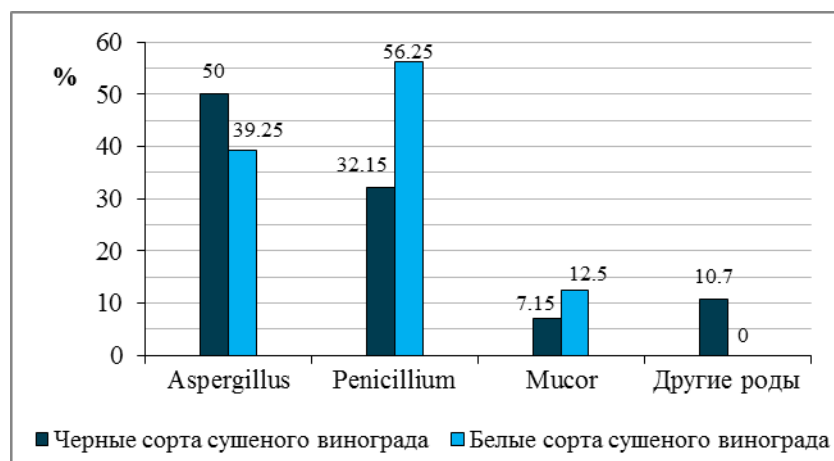


Рис. 17. Процентное содержание родов мицелиальных грибов в образцах белых и черных сортов сушеного винограда

Низкая степень заспоренности светлых сортов сушеного винограда микромицетами объясняется фунгицидным действием диоксида серы, который используется также для сохранения цвета сушеного продукта. Темные сорта сушеного винограда обычно не обрабатываются SO_2 , с целью сохранения натурального черного цвета, поэтому такой продукт больше подвержен контаминации мицелиальными грибами.

3.4. Видовой состав грибов–контаминантов сушеного винограда в Армении в разные годы исследования

При проведении сравнительного микологического анализа сушеного винограда (2005 – 2010гг.), особое внимание уделялось видам грибов из секции *Aspergillus Nigri*, так как они представляли доминирующую микобиоту этого продукта. По результатам

сравнительного анализа степень контаминации сушеного винограда мицелиальными микромицетами увеличивалась с 2005 по 2010 гг.. Отмечается рост частоты встречаемости грибов - потенциальных продуцентов охратоксина А. Идентифицированы также недавно описанные виды из рода *Aspergillus*. Следует отметить, что 10 видов из 15 изолированных, относятся к указанной секции. Как видно из таблицы 23, виды *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. foetidus* и *A. tubingensis* имели более высокую частоту встречаемости в образцах исследованных в 2007-2010 гг., чем в образцах, проанализированных в период с 2005 по 2007 годы.

Табл. 19. Рост частоты встречаемости грибов в проанализированных образцах сушеного винограда по годам

Вид \ Кол-во образцов в разные годы	2005	2006	2007	2008	2009	2010
	27	29	30	26	28	27
	Частота встречаемости видов (%)					
<i>Aspergillus niger</i>	68.7	69.3	77.6	84.5	79	83.7
<i>A. carbonarius</i>	35.3	45	63.3	73.2	69.8	77
<i>A. tubingensis</i>	29	33.6	38	42	47.3	52
<i>A. foetidus</i>	32	34	37.4	41	46	49
<i>A. sclerotii carbonarius</i>	-	-	-	39	44	49
<i>A. flavus</i>	21.4	29.4	35.7	37.3	39.8	43
<i>A. sclerotium niger</i>	-	-	-	27.9	33	39
<i>A. nomius</i>	-	10	14	16.7	20	23.4
<i>A. lacticoffeatus</i>	-	-	-	17	20.3	24
<i>A. aculeatus</i>	12	10.6	14	19	23	22
<i>A. fumigatus</i>	10	11.7	9	12	15.6	17
<i>A. uvarum</i>	-	-	-	14.7	15.1	17
<i>A. japonicus</i>	7	11	9.5	10.8	14	15.8
<i>A. ochraceus</i>	8.5	10.4	10.7	13	11	13.8
<i>A. orizae</i>	7	-	7.6	9	-	12.6
<i>Penicillium variabile</i>	21.8	24	20.7	27	25.9	29
<i>P. lanosum</i>	14.6	18	19.7	23	24.2	23.8
<i>P. velutinum</i>	10.3	12	11	15.9	16	17.8
<i>P. chrysogenum</i>	6	8.4	11.2	13	15.4	17.1
<i>P. stekii</i>	8	11	10.5	11.2	12.6	13
<i>P. corimbiferum</i>	6	-	-	8	10.3	9.8
<i>P. diversum</i>	-	5	-	8	8.6	8.3
<i>P. clavigerum</i>	-	7.4	-	8.8	8.2	7.9
<i>P. griseofulvum</i>	5	-	7	6.6	7.8	7.4
<i>P. rubrum</i>	3	5.8	4.6	5.3	7.9	7.4
<i>P. cyclopium</i>	3	5	-	7.5	7	6.5

<i>P. brevicompactum</i>	4	4.4	-	5.1	4.8	4.6
<i>Mucor racemosus</i>	54	51	52.4	49.8	52	55
<i>M. mucedo</i>	51	48.3	47.8	50.6	49.5	50
<i>Trichoderma viride</i>	-	-	2	3.1	5,4	-
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	-	-	-	3	4.4	6.7
<i>Alternaria alternata</i>	2	3.7	3.4	5	-	-

Если в 2005г. частота встречаемости *A. carbonarius* – активного продуцента охратоксина А, составила 35.3%, то в 2010 г. наблюдается рост указанного показателя до 77%. Частота встречаемости видов *A. niger*, *A. foetidus* и *A. tubingensis* достигла в 2010 г. соответственно 83.7%, 49% и 52% (табл. 19).

В последние годы исследования токсигенные виды грибов из рода *Aspergillus* все чаще выявляются также и в местных образцах. На рисунке 18 приводятся результаты определения частоты встречаемости видов из секции *Aspergillus Nigri* изолированных из образцов армянского сушеного винограда в течение 6 лет, с 2005 по 2010 гг. В местных образцах особенно резко выросла встречаемость вида *A. carbonarius*: от 38.4% до 74%.

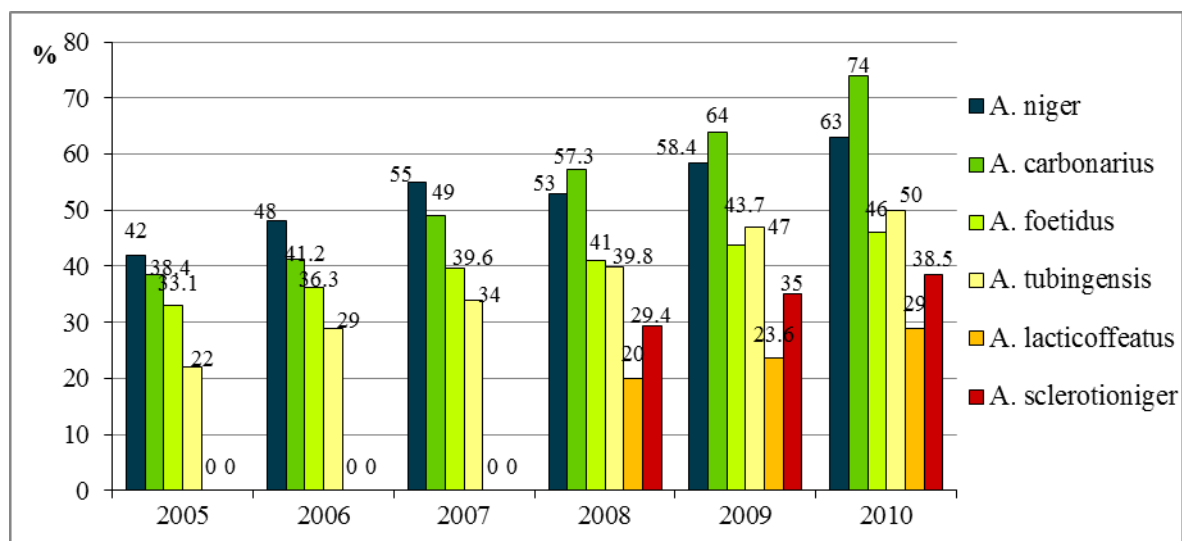


Рис. 18. Частота встречаемости потенциально охратоксигенных видов из секции *Aspergillus Nigri* в местных образцах сушеного винограда с 2005 по 2010 гг.

Виды *A. lacticoffeatus* и *A. sclerotiumiger* не выявлены ни в местных, ни в импортированных сортах сушеного винограда, проанализированных с 2005 – 2007гг. В 2008г. отмечается низкая степень загрязненности образцов местного производства

указанными видами грибов, частота встречаемости которых в 2010г. уже достигает 29% и 38.5% соответственно.

Частота встречаемости потенциального продуцента афлатоксинов *A. flavus* в образцах армянского сушеного винограда выросла с 2005 по 2010 гг. от 39.4% до 63%. Частота встречаемости вида *A. nomius* (рис. 19), который не обнаружен в образцах проанализированных в 2005 г., в полседие годы исследования достигла 27.4%.

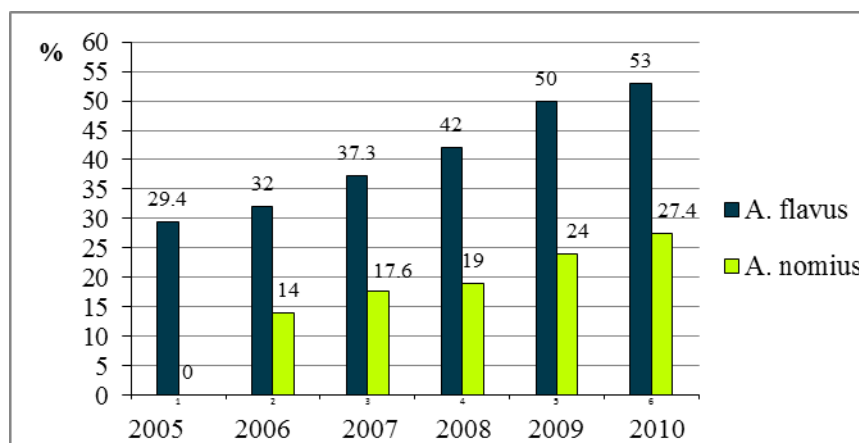


Рис. 19. Частота встречаемости афлатоксигенных грибов из секции *Aspergillus Flavi*, выделенных из армянского сушеного винограда 2005-2010 гг.

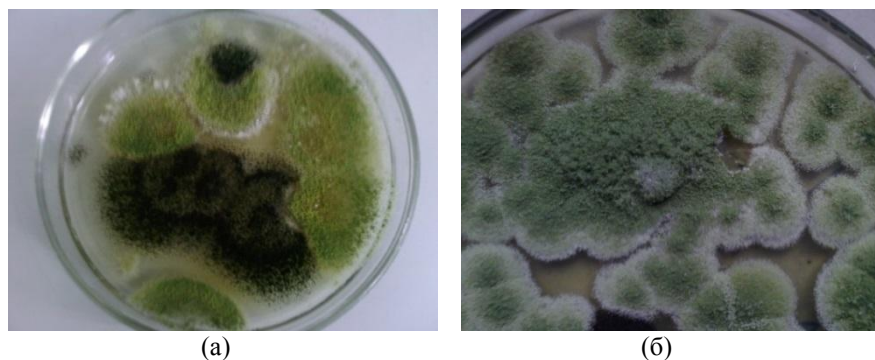


Фото 6. Колонии вида *A. flavus* на средах (а) – Чапек – Докс агар и (б) Глюкоза – Дрожжевой агар

Тенденция роста численности мицелиальных грибов, и в особенности токсигенных, объясняется несколькими факторами: изменением климата во всем мире и в частности в Армении, плохой практикой сельского хозяйства, использованием не эффективных фунгицидов, плохой сортировкой сырья до процесса сушки, отсутствием промежуточного контроля сырья, а также отсутствием гигиенических условий в процессе сушки, плохой практикой производства и отсутствием котроля производимого

продукта для выявления плесневых грибов – потенциальных продуцентов охратоксина А и самого токсина.

Для предотвращения контаминации сушеного винограда микотоксинами, одним из важных условий, является соблюдение гигиенических правил на всех стадиях его производства. Создание базы данных по конкретным видам мицелиальных грибов, распространенных в районах виноградарства и определение основных путей загрязнения готового продукта токсигенными видами грибов из секции *Aspergillus Nigri* и охратоксином А, имеет первостепенное значение для разработки более действенных рекомендаций по предотвращению контаминации конечного продукта микотоксинами.

3.5. Недавно описанные виды грибов из секции *Aspergillus Nigri*, выделенные из образцов сушеного винограда

Одной из основных задач представленной работы являлось использование современных подходов при идентификации видов из секции *Aspergillus Nigri*, руководствуясь новой классификацией, разработанной следующими авторами (Abarca et al., 1997, Varga et al., 2000, Abarca et al., 2004, Samson et al., 2007). Из числа изолированных видов, относящихся к секции *Aspergillus Nigri*, четыре вида, в соответствии с новой классификацией, относятся к потенциальным продуцентам охратоксина А (Samson et al., 2004). Это виды *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sclerotioniger* и *A. laticoffeatus*. Среди указанных видов, *A. niger* и *A. carbonarius* отличаются высокой частотой встречаемости, и впервые выявлены в Армении в сушеном винограде.

Из секции *Aspergillus Nigri* выделены и идентифицированы еще два вида мицелиальных грибов: *A. sclerotiicarbonarius* и *A. uvarum*, которые описаны относительно недавно (Samson et al., 2004).

Для вида *A. sclerotiicarbonarius* определена высокая частота встречаемости до 49%, а для *A. uvarum* – 15.1%. Из четырех вышеперечисленных видов, *A. uvarum* обнаружен только в импортированных образцах, с редкой частотой встречаемости (смотреть рис. 14). Этот вид относится к группе черных аспергиллов с одноярусными стеригмами. Виды *A. sclerotioniger*, *A. laticoffeatus* и *A. sclerotiicarbonarius* встречались только в

местных сортах сушеного винограда. Результаты сравнительного анализа микобиоты сушеного винограда по годам, показали определенную тенденцию к росту их частоты встречаемости (рис. 20).

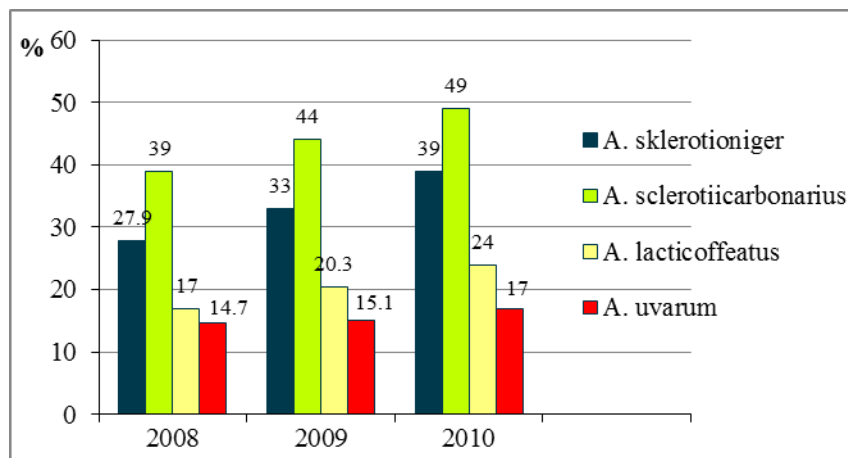


Рис. 20. Частота встречаемости охратоксигенных грибов из секции *Aspergillus Nigri* с 2008 по 2010 год



(а)



(б)

Фото 7. Колонии видов (а) – *A. lacticoffeatus* и (б) – *A. carbonarius* на среде Чапек-Докс агар

Виды секции *Aspergillus Nigri* считаются одними из трудно дифференцируемых и классифицируемых видов среди мицелиальных грибов рода *Aspergillus* (Noonim et al., 2008). Существуют разные таксономические схемы, предложенные рядом авторов, но идентификация указанной секции продолжает оставаться проблематичной. Трудности идентификации заключаются в том, что на разных питательных средах виды из секции *Nigri* проявляют разные характеристики роста и развития (Samson et al., 2007). После изолирования, часто возникает необходимость их дополнительного культивирования на жидких и плотных питательных средах (Pitt, Hocking, 1997, Varga et al., 2001, Samson et

al., 2004). Обычно идентификация грибов осуществляется на основе описания макро- и микроморфологических признаков колоний и структуры конидиального аппарата. Помимо основных признаков, нами обращалось внимание на присутствие дополнительных морфологических признаков, например, образование склероциев, хламидоспор, окраска вегетативных гиф. При микроскопировании препаратов особое внимание уделялось размерам и структуре стенок конидий, форме и ярусности конидиальных головок, а также порядку расположения стеригм на поверхности конидиеносного пузыря.

Некоторые виды, в том числе *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. sclerotioniger* и *A. sclerotiicarbonarius* на питательных средах Чапек – Дрожжевой агар и Мальт – Экстракт агар образуют склероции, цвет которой меняется в зависимости от среды. Для идентификации видов важно микроскопическое описание грибов: размеры и типы конидии, размеры везикулы и т.д. (Varga et al., 2000). В таблице 24 приводятся описания видов на разных селективных питательных средах, использованных нами для правильной идентификации изолированных видов из секции *Aspergillus Nigri*.

Вид *A. carbonarius* отличается от других видов указанной секции крупными размерами (превышающих 7–9 мкм) и щетинистой структурой стенки конидий. Виды *A. sclerotiicarbonarius* и *A. sclerotioniger* также имеют крупные конидии, однако их стенка более или менее гладкая (Abarca et al., 2004).

В ряде случаев для более точной идентификации вида, использовалось биохимическое тестирование, например, с использованием известного теста Эрлиха, который дает возможность определить способность отдельных видов продуцировать индол, что является признаком характерным для отдельных представителей указанной секции. Метод впервые предложил Ф. Лунд в 1995 году для идентификации пенициллов. В 2004 году тест был использован Д.С. Фрисвадом для грибов из секции *Aspergillus Niger* (Frisvad et. al., 2004).

Табл. 21. Описание видов из секции *Aspergillus Nigri* на разных питательных средах на 7-ой день инкубации при температуре 25°C

Виды из секции <i>A. Nigri</i>	Цвет и диаметр колонии			Цвет и диаметр конидии	Конидиеносцы	Цвет и диаметр везикулы	Склеротии
	На среде Чапек – Дрожжевой Агар	На среде Чапек – Докс Агар	На среде Мальт – Экстракт Агар				
Виды с двухярусными стеригмами							
<i>A. carbonarius</i>	Черные колонии с узкими белыми краями, диаметром 4-5см, реверзум белый.	Колонии угольно-черные с воздушным белым мицелием, диаметром до 8 см.	Темно-серые, с белым воздушным мицелием, диаметром до 6-7 см. Ревер-зум белый.	Шаровидные, с крупными шипами, от свтло-коричневого до темно-коричневого, диаметром 7-9 мкм.	Бесцветные, гладкие, размером от 3000-6000 мкм.	Светлая, шаровидная. диаметром 40-80 мкм	От светло-розового до желтого. Размером 1.2 - 1.8 мм
<i>A. foetidus</i>	Темно-коричневый, диаметром 5-5.5 см, ревер-зум желтый.	Коричнево-черные диаметр 4–5см, субстратный мицелий белый или желтоватый. Реверзум желтый.	Светло-коричневый, более темный по краям, диаметром 4–4.5 см, реверзум темно-желтый.	Шаровидные, светло-коричневые, шероховатые, диаметром 3.5–4.5мкм.	Бесцветные, гладкие, дли-ной 700-1000 мкм.	Шаровидная диаметром 50–85 мкм,	Белые. Размером 1.2 - 1.8 мм.
<i>A. lacticoffeatus</i>	Светло-коричневые, диаметр 7.1–7.6см, реверзум от кремового до светло-коричневого.	Светло-коричневые, диаметр 7 – 7.5 см. Реверзум бесцветный.	Светлые, почти соломенного цвета. Диаметр 5.2–7см. Реверз. светлый, белый.	Шаровидные, светлые, гладкие, диаметром 3.4–4.1 мкм.	Оранжево-коричневые, гладкие, длиной 200 - 1200 мкм.	Почти шаровидные, диаметром 40 – 65 мкм.	Не образуют.
<i>A. niger</i>	Светло-серые, размером до 8см в диаметре. Реверзум белый, гладкий.	Темно-серые или черные с белыми краями, диаметром 3-5.5см. субстратный мицелий белый. реверз.белый.	Темно-серые. Диаметр до 5 см. Реверзум белый.	Сферические или субсферические, диаметром 4–5 мкм, темно-коричневые, бугристые.	Размером 450 мкм - 1600 мкм, гладкие, иногда с темным вакуолем у апикального расширения.	Светло-коричневые, диаметром 45 – 80 мкм.	Не образуют.
<i>A. sclerotiicarbonarius</i>	Темно-коричневые, диаметром до 8.5 см, мицелий от белого до светло-желтого, реверзум светло-желтый.	Неправильной формы, разме-ром до 2.8–3.5 см. Субстратный мицелий желто-оранжевый.	Темно-коричневые. Диаметр 4.8 –6.4см, мицелий светло-желтый, реверзум светло-желтый, бороздчатый.	Почти шаровидные,светло-коричневые, шиповатые, диаметром 5-11 мкм.	Длиной 1200–1800мкм, гладкие с желтовао-коричневым пигментом у апи-кальной части.	Грушевидные окрашенные, размером 45–90 мкм.	От желтого до оранжевого или коричневого.

<i>A. sclerotioniger</i>	Бледно-коричневый с желтоватым оттенком, диаметр 7.1–7.8 см, мицелий желтый. Реверзум бледно-желтый.	Светло-коричневый, с желтым мицелием, диаметр 6.5 – 7.5 см. Реверзум свет-ло-коричневый с желтым оттенком.	Светло-коричневый, желтоватый, 6–7.2см, мицелий бледно-желтый. Реверзум желтый.	Почти шаровидные, диаметром 4.5–6.4 мкм, темно-коричневые, слегка шиповатые.	Размером 400–1200мкм, гладкие.	Грушевидные бесцветные, размером 30–50 мкм.	От желтого до оранжевого или коричневого.
<i>A. tubingensis</i>	Светло-коричневые, диаметр 5-7.6 см, реверзум неокрашенный.	Светло-коричневые, 4–5 см диаметр, бархатистые, мицелий белый. Реверзум неокрашенный.	Светло-серые, бархатистые, 4.5-5.5 см. Мицелий белый, реверзум белый.	Шаровидные, диаметр 3–4.5 мкм, шиповатые или шероховатые, темно-коричневые.	Светло-коричневые, гладкие, длина 2000–5000мкм.	Шаровидные, диаметр 30–80 мкм.	От белого до розового. Размером 0.5 – 0.8 мм.
Виды с одноярусными стеригмами							
<i>A. aculeatus</i>	Темно-коричневые, диаметр 3–3.5 см, реверзум белый.	Красно-коричневые, зернистые, диаметром 3–4 см. Реверзум светло-коричневый.	Светло-коричневый, зернистый, диаметром 3–3.5 см, реверзум белый.	Шаровидные или яйцевидные. Светлосерые, шиповатые, диаметром 3.5–4 мкм, 4.5 -5 мкм.	Светлые или бесцветные, размером 2000 –2500 мкм.	Бесцветный, или светло-коричневый, шаровидный, диаметром 60 – 70 мкм.	Кремовый. Размером до 0.5 мм.
<i>A. japonicus</i>	Бурые, более светлые по краям, диаметр до 7–7.5 см, мицелий белый, реверзум бесцветный.	В центре коричневые, по краям белые, диаметром 3.5–4 см, мицелий белый, реверзум бес-цветный.	В центре коричневый, по краям более светлый, диаметр 7-7.5 см, реверзум желтовато-коричневый.	Субсферические или эллипсоидные, 3.7-6×3-5.2 мкм. Шиповатые. Бесцветные или светло-коричневые.	Бледно-коричневые, гладкие, размером 800-1150 мкм.	Почти шаровидные, диаметром 15-38 мкм.	От белого до кремового. Размером до 0.5 мм.
<i>A. uvarum</i>	Темно-шоколадные, диаметр 5-7.8 см, реверзум неокрашенный или светло-коричневый.	Темный шоколадно-коричневые, 5-7см, реверзум неокрашенный или светло-коричневый.	Темный серовато-коричневый, 5–8 см диаметром, реверзум коричневый.	Шаровидные/почти шаровидные, 3– 4.5 мкм диаметр, шиповатые.	Гладкие, окрашенные в терминальной части. Длинной 300 – 2000 мкм.	Шаровидные, диаметром 25–3.5 мкм. Светло-коричневые.	От темно-коричневого до черного. Размером 0.5 – 0.8 мм.

Тест Эрлиха основан на определении индоловых соединений (вторичные метаболиты), которые синтезируются грибами при их непосредственной реакции с Эрлих реагентом. В таблице 20 приведены результаты теста Эрлиха на штаммах из секции *Aspergillus Nigri* выделенных нами из образцов сушеного винограда.

Табл. 20. Результаты теста Эрлиха

Виды грибов из секции <i>Aspergillus Nigri</i>	Реакция штаммов на Эрлих реагент
<i>A. carbonarius</i>	Отрицательная реакция
<i>A. sclerotiicarbonarius</i>	Отрицательная реакция
<i>A. niger</i>	Реакция с желтоватым цветом
<i>A. sclerotioniger</i>	Реакция с фиолетовым цветом
<i>A. laticoffeatus</i>	Отрицательная реакция
<i>A. japonicus</i>	Отрицательная реакция
<i>A. foetidus</i>	Реакция с желтоватым цветом
<i>A. tubingensis</i>	Отрицательная реакция
<i>A. uvarum</i>	Отрицательная реакция
<i>A. aculeatus</i>	Отрицательная реакция

Виды *A. foetidus* и *A. niger* образуют индольные соединения, образуя на месте положительную реакцию с желтыми кольцами. *A. carbonarius*, *A. sclerotiicarbonarius* и *A. tubingensis* не проявляют реакцию на тест Эрлиха. Вид *A. sclerotioniger* может дать фиолетовый цвет (Frisvad et. al., 2004).

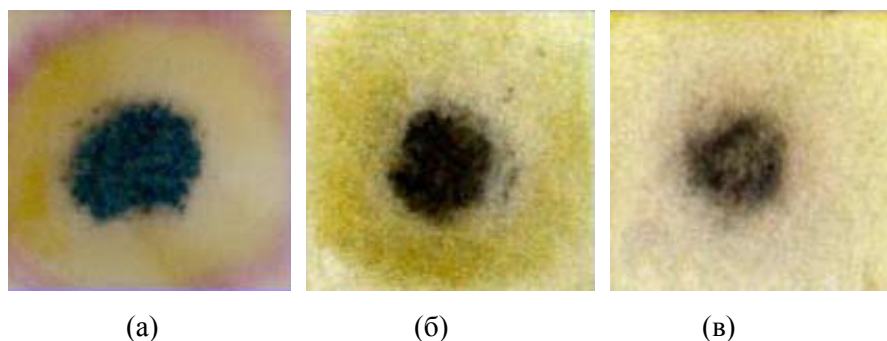


Фото 8. Реакции на Эрлих реагент (а) вида *A. sclerotioniger*, (б) видов *A. niger* и *A. foetidus*, (в) отрицательная реакция видов *A. carbonarius*, *A. sclerotiicarbonarius*, *A. laticoffeatus* и *A. japonicus*.

ГЛАВА 4

МИКОБИОТА ПОЧВЫ И СВЕЖИХ ПЛОДОВ ВИНОГРАДА ИЗ ВИНОГРАДНИКОВ РАЗНЫХ ОБЛАСТЕЙ АРМЕНИИ

Согласно данным А.Д. Хокинг (Hocking et al., 2007), основными источниками контаминации сушеного винограда, вина и других продуктов переработки винограда, видами *A. carbonarius* и *A. niger*, является почва и её остатки на винограде. Часто загрязнение винограда плесневыми грибами происходит при наличии механических повреждений на коже ягод, через которые мицелиальные грибы проникают во внутрь. В созревших ягодах, при низком значении рН и высоком содержании сахаров, создаются более благоприятные условия для роста грибов. Результаты исследований проведенных группой ученых из Испании (Belli et al., 2007) подтвердили, что высокая температура (30°C) и высокая относительная влажность (80-100%) способствуют повышению синтеза ОТА видом *A. carbonarius* в ягодах винограда. Однако, в случае присутствия ксерофитных штаммов из секции *A. Nigri*, биосинтез ОТА может происходить также при низком содержании относительной влажности. Этим и объясняется распространенность охратоксигенных видов грибов из секции *A. nigri* в регионах с более теплым и сухим климатом (Hocking et al., 2007).

С целью выявления источников контаминации армянского сушеного винограда токсигенными видами, проведен микологический анализ свежих плодов винограда и почвы из-под виноградников из следующих областей Армении: Араратского, Армавирского, Вайоцзорского и Котайкского.

4.1. Микологический анализ образцов почвы из-под виноградной лозы

Проведен микологический анализ 48 образцов почвы из виноградников, культивируемых в четырех марзах республики. Образцы почвы отбирались из определенных почвенных горизонтов, находящихся на разной глубине (5 см, 15 см и 25 см). В результате исследования выявлены и идентифицированы 22 вида мицелиальных микромицетов из 7 родов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* и *Mucor* (табл. 22). Из общего числа видов, выявленных в исследованных

образцах почвы, 10 относятся к роду *Aspergillus*, 6 – *Penicillium*, 2 – *Alternaria*. Из родов *Cladosporium*, *Trichoderma* и *Mucor* выявлены по одному виду. Муковые грибы выявлены почти во всех образцах. Они отличаются высокой энергией роста, которое ингибируют развитие других видов микромицетов (фото 9). Использование питательной среды мальт–экстракт агар (HiMedia M) позволило изолировать другие виды плесневых грибов, содержащиеся в образцах почвы.

Табл. 22. Виды грибов, выделенных из почвы с разной глубины

Вид	Глубина почвы			Количество выделенных штаммов
	5 см	15 см	25 см	
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	39
<i>A. foetidus</i>	+	+	+	20
<i>A. flavus</i>	+	+	+	23
<i>A. tubingensis</i>	+	+	+	9
<i>A. aculeatus</i>	+	+	-	9
<i>A. elipticus</i>	+	+	-	5
<i>A. ochraceus</i>	+	+	+	6
<i>A. japonicus</i>	+	+	-	4
<i>A. oryzae</i>	+	+	-	3
<i>A. brasiliensis</i>	+	-	-	3
<i>Penicillium expansum</i>	+	+	+	8
<i>P. chrysogenum</i>	+	+	+	8
<i>P. diversum</i>	+	+	-	5
<i>P. griseofulvum</i>	+	-	-	4
<i>P. olsonii</i>	+	-	-	3
<i>P. steckii</i>	+	-	-	3
<i>Mucor mucedo</i>	+	+	+	13
<i>Alternaria alternata</i>	+	+	+	6
<i>A. tenuissima</i>	+	+	+	5
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+	6
<i>Cladosporium herbarum</i>	+	+	+	4
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	+	+	4
<i>Итого</i>	21	18	16	(190)

К видам грибов, с высокой частотой встречаемости, относятся: *A. niger* (88.9%), *A. foetidus* (58%) и *Mucor mucedo* (63.4%). К группе, со средней частотой встречаемости,

отнесены виды *A. flavus* (43.6%), *A. tubingensis* (25.6%), *Alternaria alternata* (28%). Остальные виды имели низкую или редкую частоту встречаемости (рис. 21).

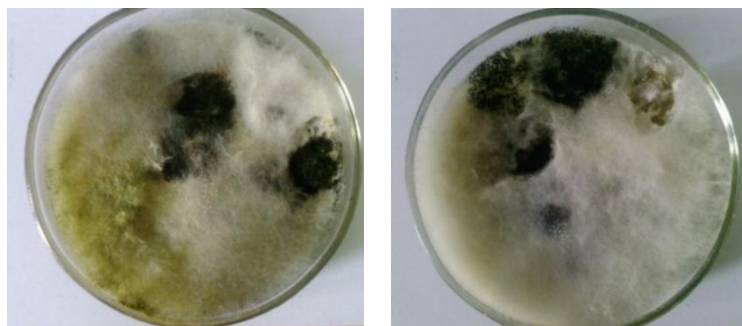


Фото 9. Посев образцов почвы из Араратской области на среде Чапек-Докс агар (разведение 1:100)

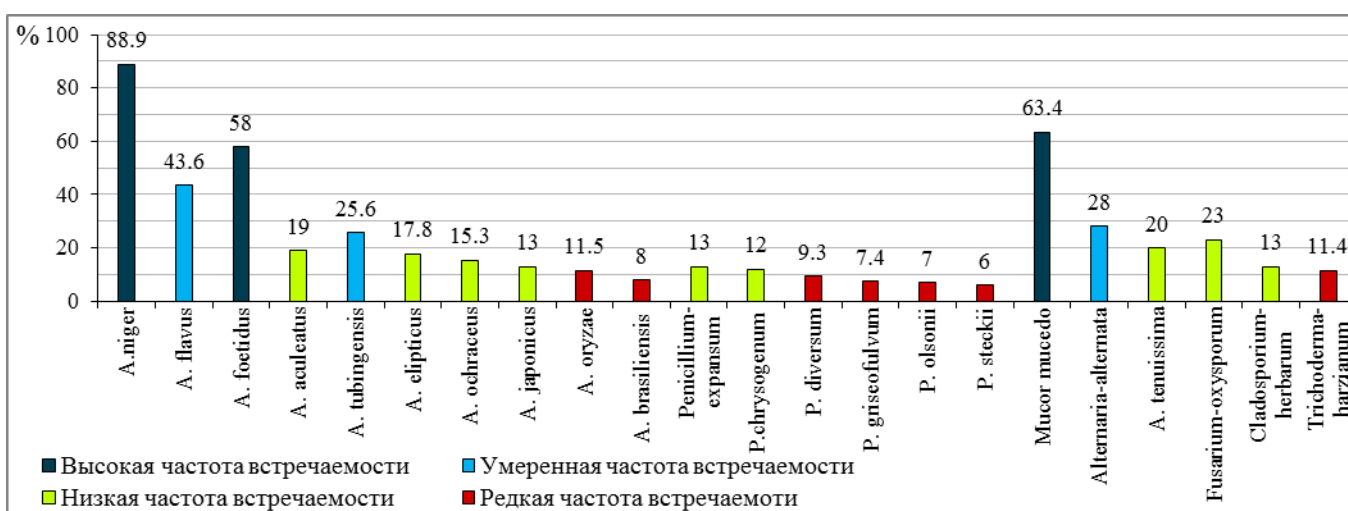


Рис. 21. Частота встречаемости видов мицелиальных грибов, выделенных из образцов почвы

Результаты микологического анализа разных горизонтов почвы показали на высокую степень контаминации поверхностных и подповерхностных слоев почвы мицелиальными грибами при сравнении с глубинными слоями (табл. 23 и рис. 22).

Табл. 23. Количественная заспоренность микромицетами образцов почвы с разных глубин

Глубина взятия образца	Степень заспоренности образцов (КОЕ/г)	Количество выделенных видов
5 см	$4.8 \times 10^4 - 9.3 \times 10^4$	21
15 см	$8.7 \times 10^3 - 2 \times 10^4$	18
25 см	$5.2 \times 10^2 - 1.9 \times 10^3$	16

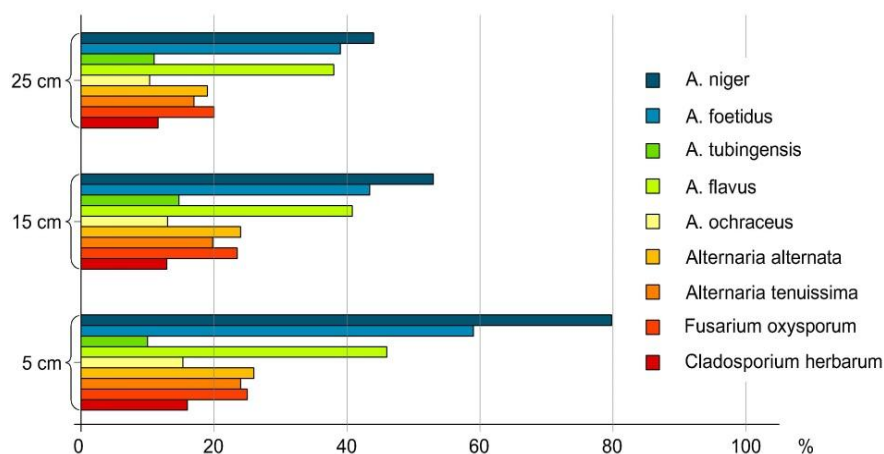


Рис. 22. Частота встречаемости видов грибов, выделенных из образцов почвы с разной глубины от поверхности

Ни в одном из проанализированных образцов почвы не был выявлен вид *A. carbonarius*. Другие виды – продуценты охратоксина А из секции *Aspergillus Nigri* выделялись из поверхностных слоев почвы чаще, чем из более глубоких слоев. Высокий уровень контаминации поверхностных слоев почвы микромицетами – продуцентами охратоксина А отмечается в период созревания и сбора урожая. В этот период ягоды винограда содержат высокий уровень глюкозы и влаги. Ягоды с механическими повреждениями кожицы становятся хорошим субстратом для развития и распространения грибов из секции *Aspergillus Nigri*.

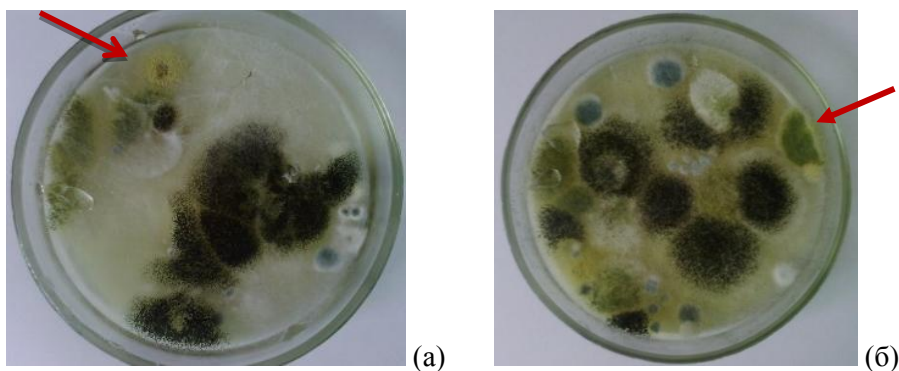


Фото 10. Колонии видов *Aspergillus ochraceus* (а) и *Trichoderma harzianum* (б) выделенные из почвы

Проведен также микологический анализ разных вегетативных органов виноградной лозы- по 12 образцов стеблей и листьев из двух областей: Котайкского и Армавирского. В указанных вегетативных органах винограда наблюдалась высокая

степень контаминации мукоральными грибами и видами из рода *Alternaria*, среди которых вид *Alternaria alternata* являлся доминирующим.

4.2. Микологический анализ свежих плодов винограда

Ягоды винограда в период вегетации, и в особенности, в период сбора урожая, в основном поражаются сапротрофными грибами из следующих родов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* и *Alternaria* (Magnoli et al., 2003, Valero et al., 2005, Bellí et al., 2006, Осипян, 2013). Виды родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* и *Botrytis* также неоднократно выявлялись при анализах винограда и виноградного сока, проведенных армянскими учеными (Осипян, Батикян, 1981, Осипян, 1990). В указанных работах сообщается о доминировании видов *Penicillium expansum*, *P. claviforme*, *P. frequentans*, *Mucor racemosus* и *Botrytis cinerea* на плодах винограда. Среди аспергиллов довольно часто встречаются *A. niger* и *A. flavus*.

Результатами работ показано, что основным источником контаминации продуктов переработки винограда охратоксином А являются ягоды винограда пораженные охратоксигенными видами грибов из секции *Aspergillus Nigri* (в основном видом *A. carbonarius*) (Da Rocha Rosa et al., 2002; Cabañes et al., 2002). В указанных работах также отмечается важность погодных условий в момент сбора урожая, резко влияющих на биосинтез и концентрацию ОТА в ягодах винограда и в продуктах его переработки.

Нами проведен анализ 81 образцов белых и черных сортов винограда, выращенных в 4 марзах республики, в период сбора урожая. В результате микологического анализа свежих плодов винограда выделены и идентифицированы 19 видов микромицетов (Grigoryan, Nakobyan, 2011). Результаты анализов приведены в таблице 24.

Из темноокрашенных гифомицетов выделены и идентифицированы два вида – *Alternaria alternata* и *Cladosporium herbarum*. Х. Айдогду показано, что указанные виды часто изолируются из свежих плодов и ягод (Aydogdu et al., 2009).

Результаты показали высокую степень контаминации плодов винограда грибами из рода *Mucor* (табл. 24). Вид *M. racemosus* встречается во всех образцах с довольно

высокой частотой встречаемости. Вид *M. mucedo* не выявлен в плодах винограда из Вайоцдзорской области. Сравнительно низкая частота видов из рода *Mucor* наблюдается в плодах взятых из Армавирской области.

Табл. 24. Виды грибов, выделенные из образцов свежих плодов винограда (Grigoryan, Nakobyan, 2011)

Вид	Частота встречаемости грибов в разных областях (%)				Количество изолятов
	Армавирская	Араратская	Котайкская	Вайоцдзорская	
<i>Aspergillus niger</i>	41	36	49.5	29	96
<i>A. carbonarius</i>	45.7	24	48.3	8	98
<i>A. foetidus</i>	36	21	5.4	11	27
<i>A. sclerotium</i>	14	10.4	2	–	9
<i>A. flavus</i>	9	11	17	–	15
<i>A. tubingensis</i>	7.8	6.3	4.3	2.3	8
<i>A. japonicus</i>	–	4	4	5	6
<i>A. uvarum</i>	3.9	4.2	2.4	–	4
<i>A. aculeatus</i>	2	3.4	1.5	–	5
<i>A. pulverulentum</i>	–	2.6	1.5	3	3
<i>Penicillium expansum</i>	4	3	3.5	2	8
<i>P. viridicatum</i>	2	1.3	–	–	2
<i>P. granulatum</i>	–	3	–	–	1
<i>P. claviforme</i>	–	3	–	–	1
<i>P. clavigerum</i>	–	–	2.4	–	1
<i>Mucor racemosus</i>	25	45.5	51	46.8	55
<i>M. mucedo</i>	21	13	48	–	29
<i>Alternaria alternata</i>	5.2	3.4	2	–	4
<i>Cladosporium herbarum</i>	–	11.7	1.3	4.5	4
Итого					376

По видовому разнообразию и частоте встречаемости среди изолированных видов микроскопических грибов выделяется род *Aspergillus* (рис. 23), который представлен 10 видами (52.6%), за ним следует род *Penicillium* – 5 видов (26.3%).

Виды *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. foetidus* (фото 11) и мукоровые грибы доминировали во всех областях. Остальные виды имели низкую или редкую частоту встречаемости. Из охратоксигенных видов выявлены *A. niger*, *A. carbonarius* и *A. sclerotium*. Вид *A. flavus* имел среднюю частоту встречаемости (фото 11(б),(в)).

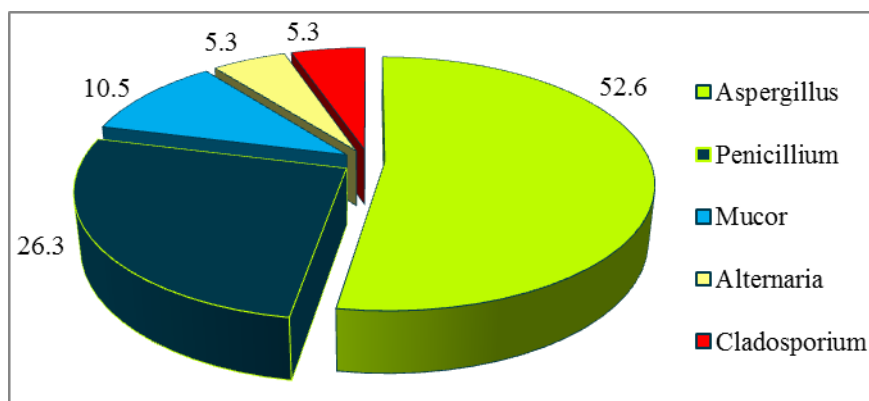


Рис. 23. Процентное содержание родов мицелиальных грибов, выявленных в плодах винограда

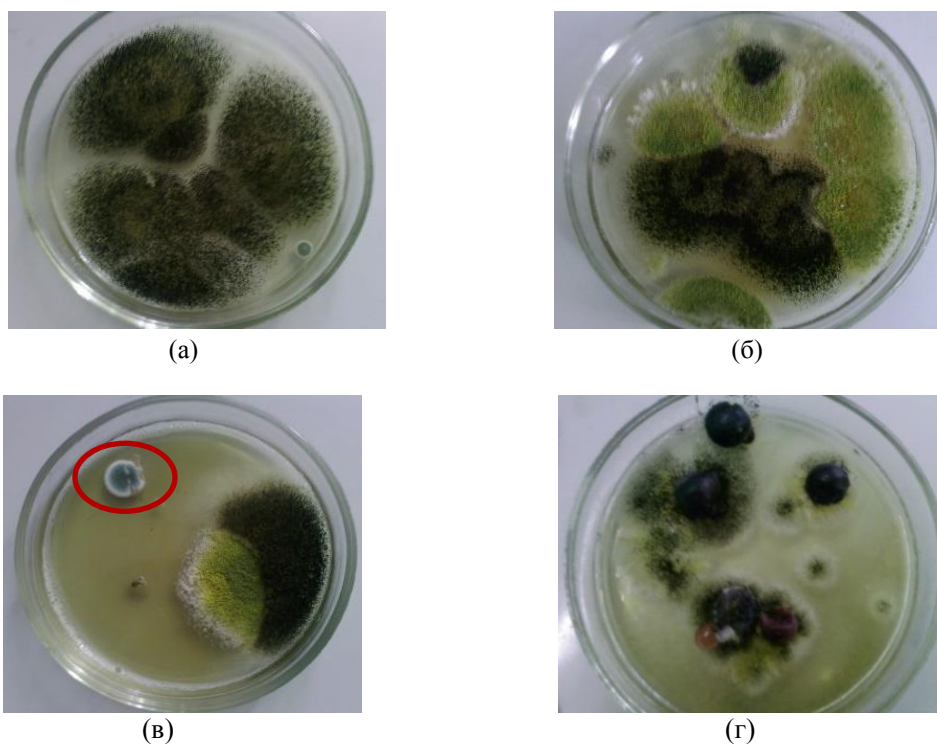


Фото 11. Колонии видов (а) - *A.niger*, (б) – *A. flavus* и (в) – *P. expansum*, выявленные в образцах винограда из разных областей Армении, (г) - Непосредственный посев черного винограда на среде Чапек – Докс агар

Частота встречаемости охратоксигенного вида *A. carbonarius* в плодах винограда из Котайского и Армавирского марзов составила соответственно 48.3% и 45.7%. В образцах из Араратского марза указанный вид выявлен с более низкой частотой встречаемости, а из Вайоцзорского марза – всего с 8% (рис. 24).

Вид *A. niger* также часто выделяется из виноградов Котайского и Армавирского марзов: с частотой 39.5% и 41% соответственно. В остальных двух марзах *A. niger*

встречается менее часто: в 36% образцов из Араратского и 29% образцов из Вайоцдзорского марза.

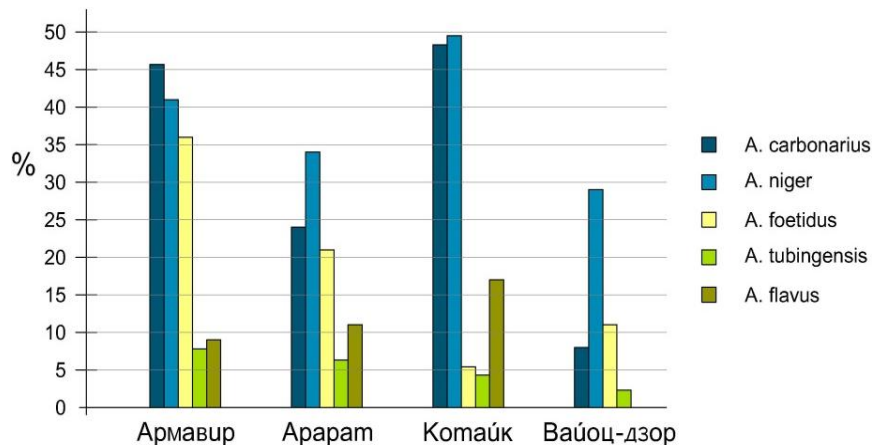


Рис. 24. Частота встречаемости токсигенных грибов в образцах винограда, взятых из разных областей Армении

Из образцов винограда, отобранных из марза Вайоцдзор изолирован единственный вид из рода *Penicillim* - *P. expansum* (фото 11 (в)). Указанный вид встречается в образцах из всех исследованных областей (табл. 24), так как является специфичным контаминантом зрелых плодов винограда.

При сравнении результатов микологического анализа плодов винограда, отобранных из 4 марзов показано, что наименьшая степень контаминации отмечается для образцов винограда из Вайоцдзорского марза. Из указанных образцов выделено и идентифицировано всего 9 видов, причем процентное содержание потенциально-токсигенных видов довольно низкое (рис. 24.).

Образцы винограда из Вайоцдзорской области имели наименьшую степень контаминации мицелиальными грибами: 40–90 КОЕ/г (табл. 25).

Табл. 25. Степень заспоренности образцов винограда взятых из четырех областей Армении

Место взятия образцов	Количество исследованных образцов	Степень заспоренности КОЕ/г	Количество видов	Количество изолятов
Армавирская область	23	65 – 2x10 ²	13	121
Араратская область	20	60 – 95	18	104
Котайкская область	18	80 – 2.8x10 ²	16	98
Вайоцдзорская область	20	40 – 90	9	54

Самое высокое количество видов микромицетов выделено из образцов Котайкской области. Здесь также отмечается высокая степень заспоренности винограда плесневыми грибами: $80\text{--}2.8 \times 10^2$ КОЕ/г.

В результате исследования 81 образцов винограда изолированы 9 видов из секции *Aspergillus Nigri*, частота встречаемости которых представлены на рисунке 25.

Таким образом, пораженные “черной” плесенью ягоды винограда являются основным источником контаминации сушеного винограда охратоксигенными видами из рода *Aspergillus*.

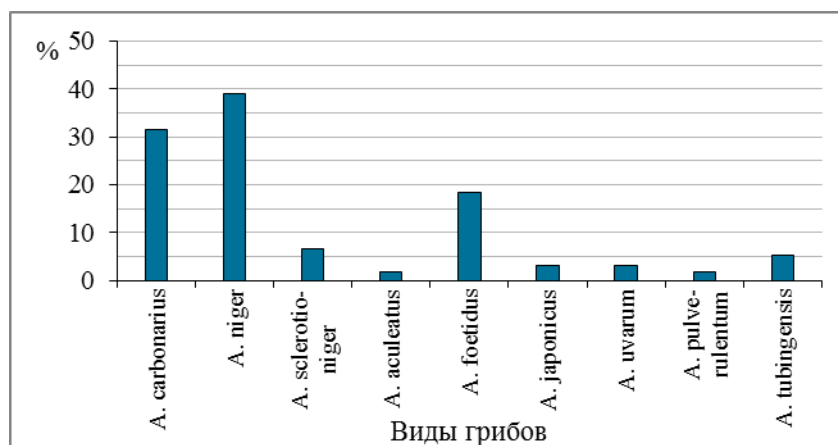


Рис. 25. Частота встречаемости видов грибов из секции *Aspergillus Nigri*, контаминирующих армянский виноград



Фото 12. Виноградник в Араратской области



Фото 13. Черный и белый контаминированный виноград

Из ягод винограда выделены виды грибов из секции *A. Nigri*, которые имеют одноярусные стеригмы - *A. aculeatus*, *A. japonicus* и *A. uvarum*. Среди указанных видов, в сушеном винограде местного производства, обнаружен только вид *A. aculeatus*. Остальные два вида оказались более чувствительными к сульфитации и режимам сушки.

Результаты микологического анализа образцов винограда и почвы, отобранных в виноградниках позволили нам идентифицировать основные источники контаминации сушеного винограда охратоксигенными видами *A. carbonarius* и *A. niger*.

Показано, что загрязнение сушеного винограда видами из секции *Aspergillus Nigri* в основном происходит во время вегетации винограда: на стадии созревания и сбора урожая. Вторичная контаминация указанными видами может иметь место при плохой сортировке и в процессе сушки, при нарушениях режимов сушки и не соблюдении гигиенических условий на производстве. В случае использования сушки воздушно-солнечным методом, важную роль играют климатические условия. При дождливой погоде повышается вероятность вторичной контаминации промежуточного продукта токсигенными грибами.

Критически контрольными точками при производстве сушеного винограда являются стадии хранения урожая, условия транспортировки до перерабатывающего предприятия и технология предварительной обработки сырья до сушки.

Погодные условия до сбора урожая, типы и количество используемых фунгицидов во время вегетации, виды основных грибов контаминантов и содержание влажности в ягодах винограда при сборе урожая, являются основными аспектами, которые нужно учитывать для прогнозирования степени контаминации сушеной продукции мицелиальными грибами и их токсинами.

Для снижения рисков загрязнения сырья микотоксигенными видами из рода *Aspergillus* и накопления микотоксинов в сушеном винограде необходимо использовать непораженное, доброкачественное сырье. Также необходимо соблюдать основные принципы Хорошей Сельскохозяйственной, Производственной и Гигиенической Практик (GAP, GMP, GHP). Особое внимание следует уделять вопросам предотвращения поражения виноградников охратоксигенными грибами посредством проведения гигиенических мероприятий в районах возделывания виноградников: своевременное удаление листьев, с целью улучшения аэрации, хорошего прохождения солнечных лучей, удаление пораженных плесенью и механическими повреждениями гроздьев винограда.

ГЛАВА 5

ВЛИЯНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ТЕХНОЛОГИИ СУШКИ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В СУШЕНОМ ВИНОГРАДЕ

Безопасность и качество сушеного винограда в основном обусловлена микробиологическим качеством сырья: отсутствием гнилей разной природы, «плесени», «дрожжей» и заражение насекомыми (Bhat et al., 2006). Рост мицелиальных грибов и биосинтез ОТА в продуктах переработки винограда определяется физическими, химическими и биологическими факторами (Nielsen, 2003). Для получения сушеного винограда высокого качества большую роль играют физические параметры (размер и цвет ягод, характер восковой кутикулы и т.д.) и химические показатели ягод во время сбора урожая (содержание влаги, сахара и кислотность).

Синтез ОТА в сушеном винограде на разных стадиях сушки, зависит от динамики изменения следующих физико-химических показателей – активности воды (a_w), pH и консистенции субстрата. Не менее важное значение имеют климатические условия (температура и влажность) в период сбора урожая. Виды грибов из рода *Aspergillus* широко распространены на многих пищевых продуктах. Они способны развиваться при разных климатических условиях, чем и объясняется их широкое распространение. Согласно К.Ф. Нельсену (2003), виды указанного рода наиболее часто встречаются в регионах с теплым климатом.

Технологические режимы сушки винограда также существенно влияют на степень контаминации готового продукта грибами и микотоксинами. Самым распространенным методом производства сушеного винограда является традиционная воздушно-солнечная сушка. При воздушно-солнечной сушке повышается риск контаминации сушеного винограда плеснеобразующими грибами и микотоксинами, так как в указанных условиях растет вероятность механических повреждений винограда из-за непосредственного воздействия погодных условий, поражения насекомыми и др. Степень контаминации, сушеного винограда в период сушки, находится в прямой зависимости от использования сульфитации и количественного содержания диоксида серы в промежуточном и готовом продуктах. Последний является эффективным консервантом и оказывает довольно

активное ингибирующее воздействие на развитие мицелиальных грибов, в том числе и токсинообразующих, в процессе сушки и во время хранения продукта.

5.1. Влияние активности воды (a_w) и pH

Среди перечисленных выше, активность воды (a_w) является наиболее важным фактором, определяющим рост, развитие и степень адгезии плесневых грибов на питательных субстратах, в том числе и сушеном винограде, на разных стадиях сушки (Bourgas et al., 2009). Согласно Р.А. Самсону с соавторами (1995) минимальное значение активности воды (a_w), необходимое для роста мицелиальных грибов находится в пределах 0.65 - 0.77. Оптимальное значение активности воды для биосинтеза охратоксина А находится в пределах 0.90 – 0.98. Исследованиями С.М. Ромеро (2010) показано, что штаммы *A. carbonarius*, изолированные из сушеного винограда, продуцируют ОТА при значении a_w - 0.87. Способность штаммов *A. carbonarius* продуцировать токсин при низких значениях активности воды доказывает их ксеротолерантность. При более низких значениях активности воды имеет место подавление биосинтеза охратоксина А (Pateraki et al., 2007, Kapetanakou et al., 2009). В исследованиях М. Патераки и др. (2007) показано, что снижением активности воды до 0.85 и ниже, можно ингибировать биосинтез ОТА. Эти результаты используются в практике производства сушеного винограда для мониторинга и предотвращения синтеза ОТА микромицетами в готовом продукте. На рисунке 26 приводятся результаты по изучению влияния значения активности воды на степень контаминации образцов сушеного винограда мицелиальными грибами.

Нашими исследованиями показана определенная корреляция между a_w и степенью заспоренности сушеного винограда мицелиальными грибами (Hakobyan et al., 2010).

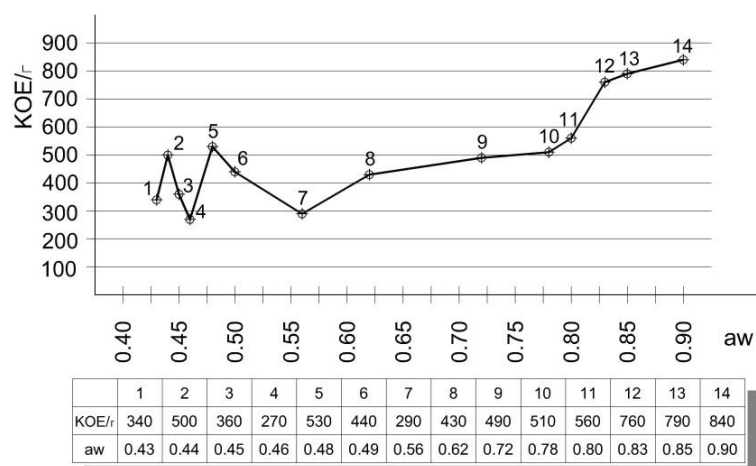


Рис. 26. Корреляция между a_w и степенью контаминации сушеного винограда мицелиальными грибами

В отдельных образцах, с низкими значениями активности воды, отсутствует зависимость между указанными показателями, однако, начиная со значения a_w 0.56 и выше отмечается более строгая корреляция между активностью воды и уровнем контаминации сушеного винограда микромицетами. Высокая степень заспоренности образцов сушеного винограда при низких значениях a_w связана с высоким содержанием в указанных образцах ксеротолерантных видов грибов из секции *A. Nigri*.

Значения активности воды сушеного винограда, произведенного в Армении, обычно превышает 0.85, что является благоприятным фактором для биосинтеза охратоксина А. В указанных образцах отмечается высокий уровень выявления охратоксигенных штаммов вида *A. carbonarius* (см. главу 3.3.).

Исследования показали, что быстрая сушка винограда при температуре выше 30°C приводит к резкому снижению значения a_w до уровня 0.5 и ниже, при которой имеет место снижение скорости роста, а также риска биосинтеза ОТА плесневыми грибами из секции *A. nigri* (Leong et al., 2006 (110)). Однако, быстрая сушка способствует образованию трещин на коже винограда. Это может стать причиной вторичного загрязнения готового продукта мицелиальными грибами.

На биосинтез ОТА грибами из родов *Aspergillus* и *Penicillium* существенное влияние оказывает кислотность питательной среды и субстрата. Согласно Д.И. Питту и А.Д. Хокингу (2009), оптимальный диапазон значения pH, необходимый для активного роста *A. ochraceus* соответствует от 3 до 10, а для микромицетов из секции *A.niger*

оптимальное для роста значения рН находятся в пределах 4.0 - 6.5. Вид *A. carbonarius* способен развиваться и продуцировать микотоксины при более широком диапазоне рН: от 2 до 10. В проанализированных нами образцах сушеного винограда значение рН колеблется от 4.42 до 4.85 (рис. 27). Такая среда является оптимально благоприятной как для роста микромицетов, так и для токсинообразования. Наиболее высокая степень заспоренности сушеного винограда наблюдалась при значении рН 4.75 - 4.85. Указанные значения рН более характерны для армянского сушеного винограда, так как содержание глюкозы в сырьевом винограде высокое.

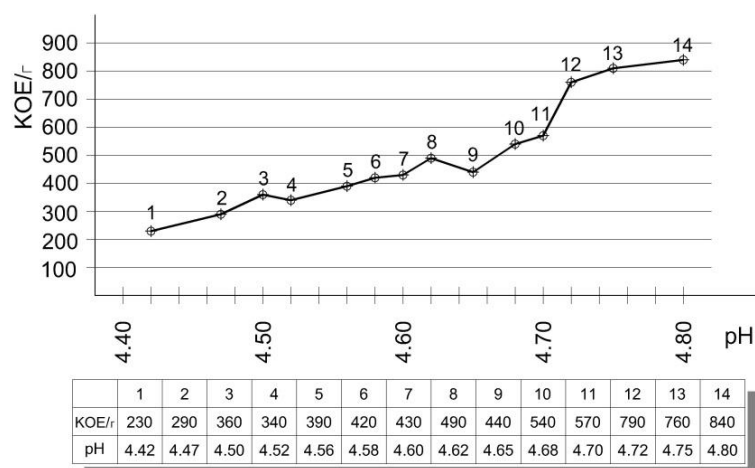


Рис. 27. Корреляция между рН и степенью контаминации сушеного винограда мицелиальными грибами

Кислотность в плодах винограда обусловлена, в основном, высоким содержанием в них сахаров. Для кишмишных сортов сырьевого винограда предназначенного для сушки, содержание сахара должно быть не ниже 23— 25%, а для изюмных — не ниже 22—23% (Arthey и Ashurst. 2001, Uhlig и Clingeleffer, 1998).

5.2. Влияние технологии сушки

При разработке методов по предотвращению контаминации сушеного винограда мицелиальными грибами и их токсинами, необходимо изучить широкий спектр факторов влияющих на рост грибов и биосинтез токсинов. Установление мониторинга над некоторыми параметрами (температура, условия и продолжительность хранения, условия транспортировки и сушки и т.д.) помогает реально прогнозировать уровень

контаминации грибами и микотоксинами готового сушеного винограда (Pose et al., 2010, Khalesi и Khati, 2011, Garcia et al., 2011).

Некоторыми авторами проведен сравнительный анализ технологии сушки, влияющей на контаминацию промежуточного и конечного продукта мицелиальными грибами и микотоксинами (Pangavhane et al., 2002., Leon et al., 2002, Williams et al., 2002, Mencarelli, Bellincontro, 2005, Kassem et al., 2011). Общая схема технологии производства сушеного винограда представлена в рисунке 28.

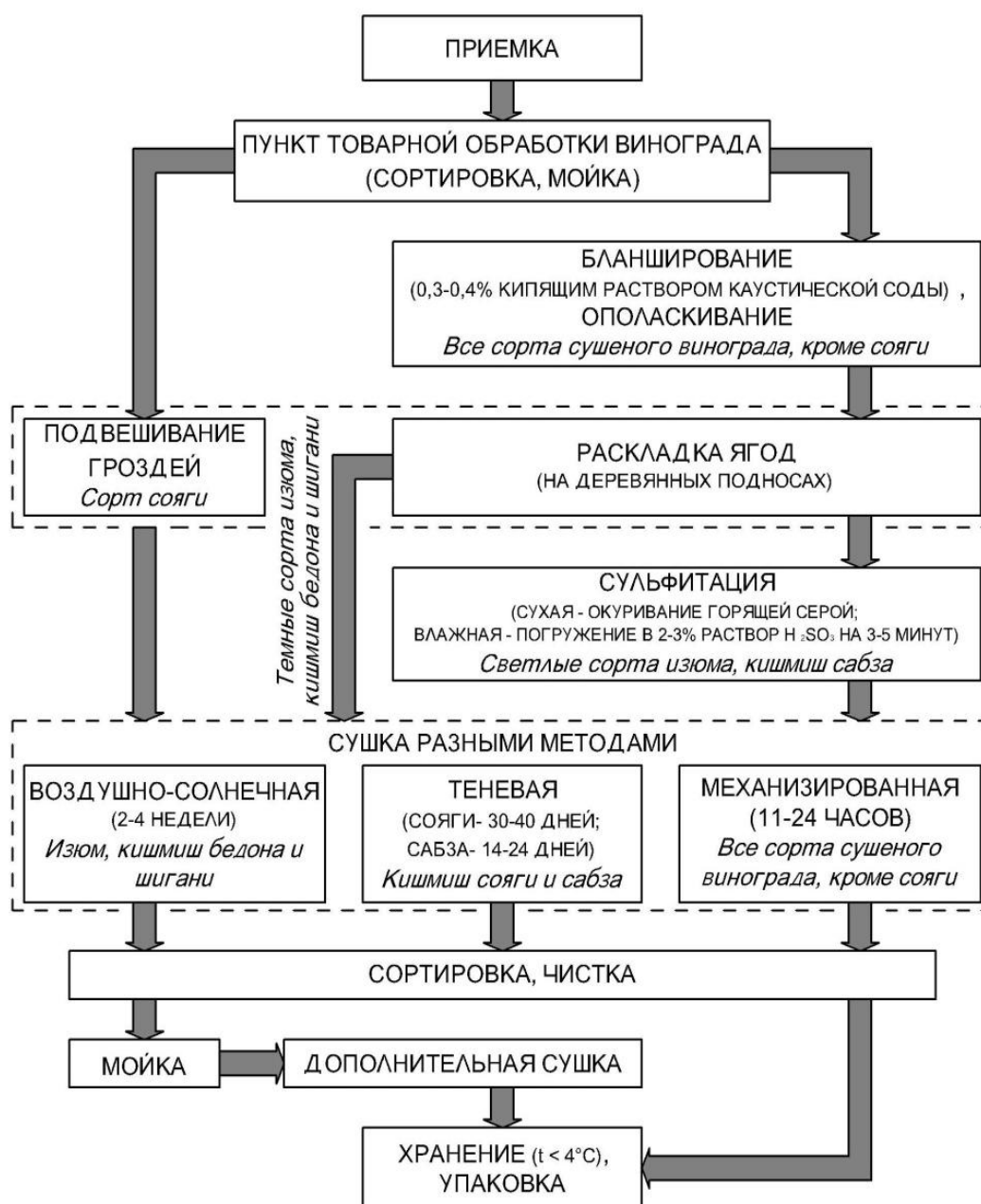


Рис. 28. Технологические стадии производства разных сортов сушеного винограда

Некоторые сорта сушеного винограда не подвергаются предварительной обработке щелочным раствором. Это приводит к тому, что продолжительность сушки продлевается на неделю или больше.

В Армении основная часть сушеной продукции производится традиционным воздушно-солнечным методом. Но наряду с этим, также используют и солнечные сушилки (Урнцјшц, 2007) (фото 14 (а), (б), (в)). Предварительно обработанный виноград раскладывают на деревянных решетчатых подносах и ставят на металлические стеллажи внутри сушилки. Сушилка состоит из трех частей - сушильная камера, обогреватель воздуха и аккумулятор тепла. Передняя южная часть сушилки покрыта прозрачным стеклом. Поток воздуха осуществляется через теплопоглотитель и удаляется через трубы помещенные в верхней части сушилки.

В девяти областях Армении существуют 220 солнечных сушилок. При их полной эксплуатации, объемы производства сушеного винограда можно увеличить.



(а)



(б)



(в)



(г)



(д)



(ж)

Фото 14. Процесс сушки винограда: (а), (б), (в) – в солнечных сушилках Армении (марз Армавир), (г), (д) – воздушно-солнечным методом, (ж) - складское помещение в производственных цехах

Нами проведен микологический анализ 20 образцов армянского сушеного винограда на всех стадиях производства, с целью определения источников контаминации конечного продукта плеснеобразующими грибами и выявления стадий, на которых продукт наиболее подвержен риску загрязнения. Результаты представлены в таблице 26.

Образцы отбирались в двух предприятиях Армавирской области на разных стадиях производства: из первичного сырья, обработанного сырья (после бланширования (обработка щелочью) и сульфитации), во время сушки (2-4 недели), после сушки и в период хранения.

Исследования показали, что степень контаминации производимого продукта повышается в течение всего процесса производства (табл. 26). Однако, в образцах отобранных непосредственно после сульфитации сырья не обнаружен рост плеснеобразующих грибов (фото 15), в то время как, отмечается высокая степень контаминации конечного продукта. Это доказывает ингибирующее влияние диоксида серы на рост и развитие мицелиальных грибов. Следует отметить, что непосредственно после сульфитации содержание диоксида серы в продуктах находится на максимальном уровне.

Табл. 26. Степень контаминации (КОЕ/г) сушеного винограда на разных стадиях производства

Кол-во исследованных образцов	Образец	Сырье	После обработки диоксидом серы	Во время сушки	После сушки	В период хранения (при +8 °С)
5	Белый изюм	$80 - 1.4 \times 10^2$	0	$2.4 \times 10^2 - 3 \times 10^2$	$4.5 \times 10^2 - 6.8 \times 10^2$	$4 \times 10^2 - 7 \times 10^2$
5	Белый кишмиш	$90 - 1.3 \times 10^2$	0	$95 - 2 \times 10^2$	$2.2 \times 10^2 - 5.2 \times 10^2$	$2 \times 10^2 - 5.5 \times 10^2$
5	Темный изюм	$70 - 1.8 \times 10^2$	*	$5.2 \times 10^2 - 2 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3 - 1.8 \times 10^4$	$2.3 \times 10^3 - 2 \times 10^4$
5	Темный кишмиш	$1.5 \times 10^2 - 2 \times 10^2$	*	$1.8 \times 10^2 - 8.5 \times 10^2$	$2.6 \times 10^3 - 3.4 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3 - 4 \times 10^3$

* обработка диоксидом серы не допускается во время производства указанных сортов сушеного винограда

Так как большинство сушеных продуктов производится путем воздушно-солнечной сушки, то происходит вторичное загрязнение. Анализы образцов, отобранных на этом этапе производства, показали высокий уровень загрязненности производимого продукта

микромицетами. В отдельных случаях указанный параметр превышает предельно допустимое количество (ПДК - 5×10^2). Только в образцах, которые сушат в закрытых солнечных сушилках, степень контаминации находится в пределах нормы.

Во время сушки винограда, повышается также загрязненность продукта токсигенными видами. Относительная доля *A. carbonarius* увеличивается, так как в ягодах винограда снижается влажность (рис. 29).

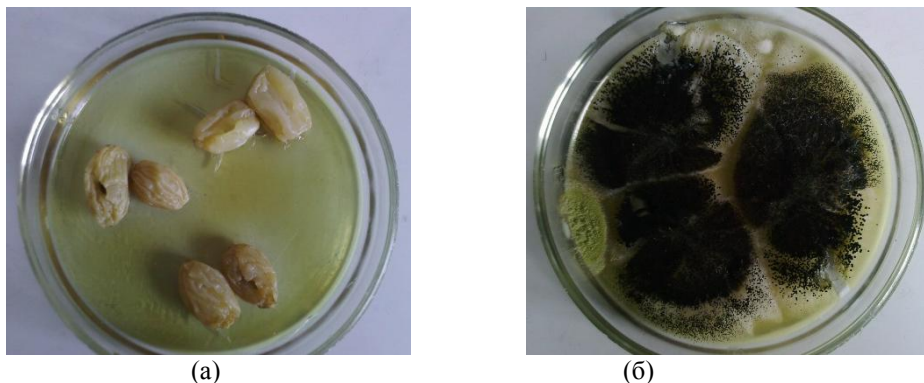


Фото 15. (а) – Посев белого винограда непосредственно после сульфитации, (б) – посев белого готового изюма непосредственно после сушки

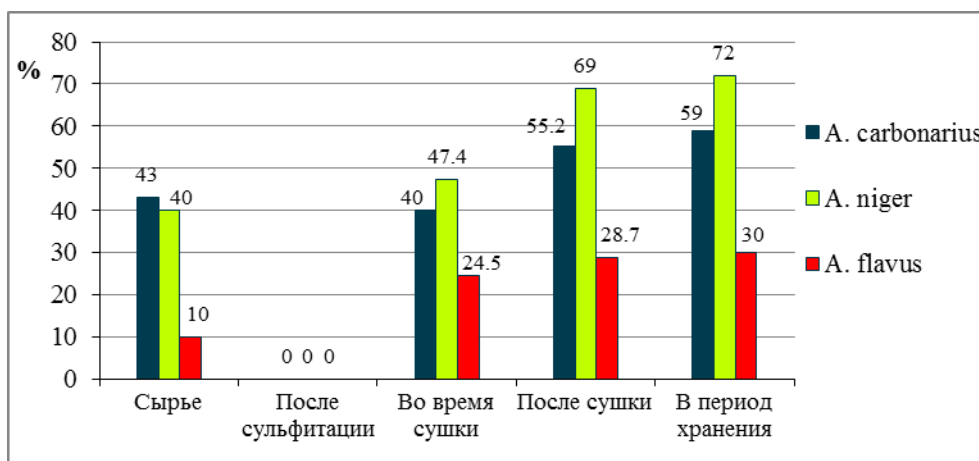


Рис. 29. Процентное содержание токсигенных видов грибов на разных стадиях производства сушеного винограда

Технология сушки в закрытых камерах, с контролируемой температурой и влажностью, обеспечивает микологическую безопасность готового продукта, при сравнении с сушкой на открытом воздухе. Часто процесс сушки винограда проводят при температуре 50°C . При таком температурном режиме, вероятность биосинтеза ОТА

минимальная, так как имеет место почти полное ингибирование роста *A. carbonarius* (Palacios-Cabrera et al., 2005, Spadaro et al., 2010). Однако при указанной температуре наблюдается резкое снижение содержания витаминов, полифенолов, антоцианов, обеспечивающих качество и пищевую ценность готового продукта.

На развитие и токсинообразование грибов-потенциальных продуцентов охратоксина А, существенно влияет частота переворачивания ягод винограда в процессе сушки. Частое переворачивание предотвращает скопление влаги между слоями ягод. Высокая влажность и повышение содержания сахара в ягодах в процессе сушки стимулируют интенсивное развитие грибов из *Aspergillus* секция *Nigri* и биосинтез ОТА (Magan, Aldred, 2005).

Из известных технологий сушки, в настоящее время в производстве сушеного винограда используются вакуумная, для получения безопасного для потребителя продукта. В независимости от используемых технологий сушки, соблюдение гигиенических условий на всех стадиях производства сушеного винограда, начиная со сбора урожая, заканчивая процессом сушки, транспортировки, упаковки и хранения имеет важное значение. Отсутствие этих условий может привести к вторичному загрязнению и перекрестной контаминации изюма грибами-продуцентами ОТА.

5.3. Результаты исследования влияния условий хранения

Среди экологических факторов, влияющих на рост, развитие мицелиальных грибов, и токсинообразование определяющим фактором является температура окружающей среды. Согласно С.Л. Леонгу основными факторами, влияющими на уровень биосинтеза охратоксина А являются активность воды и температура. Минимальное значение температуры для развития *A. niger* составляет 6–8 °С, максимальное – 45–47 °С, оптимальное – 35–37 °С (Leong et al., 2006). Оптимальная температура для синтеза ОТА видом *A. carbonarius* соответствует 10 - 20°C (Belli et al., 2005), а для вида *A. niger* – 20–25 °С (Esteban et al., 2004). Однако, известны случаи биосинтеза охратоксина А и при более низких и при более высоких температурах (Esteban et al., 2004, Leong et al., 2004, Mitchell et al., 2004, Belli et al., 2005b).

Одной из задач представленного исследования являлось изучение влияния условий хранения на микобиоту местного сушеного винограда. Проведен повторный анализ 13 образцов темных сортов армянского сушеного винограда, после шестимесячного хранения при температуре $<+4^{\circ}\text{C}$, с целью выявления возможных изменений в контаминирующей их микобиоте (табл. 27).

Табл. 27. Результаты повторного анализа армянского черного сушеного винограда после шестимесячного низкотемпературного хранения

Образцы		До хранения		После хранения	
		Доминантная микобиота	КОЕ/г	Доминантная микобиота	КОЕ/г
Июм	торг. центр 14.11.2008	<i>M. mucedo</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. foetidus</i>	6.4×10^2	<i>A. niger</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. carbonarius</i>	4.5×10^2
	торг. центр 07.12.2009	<i>M. mucedo</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. rubrum</i> , <i>P. griseofulvum</i>	1.4×10^4	<i>A. foetidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. rubrum</i>	1.1×10^4
	торг. центр 18.03.2009	<i>M. mucedo</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>P. lanosum</i> , <i>P. diversum</i> , <i>A. alternata</i>	9.5×10^2	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. niger</i>	4.8×10^2
	торг. центр 16.10.2008	<i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>P. lanosum</i>	7.6×10^2	<i>A. foetidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. lanosum</i>	5.3×10^2
	торг. центр 07.12.2009	<i>A. carbonarius</i> , <i>P. variabile</i> , <i>P. diversum</i> , <i>A. alternata</i>	6.6×10^2	<i>A. carbonarius</i> , <i>P. variabile</i>	5.1×10^2
	производст. 26.12.2009	<i>M. racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. cyclopium</i>	8.6×10^2	<i>M. racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. rubrum</i>	4.3×10^2
	производст. 26.12.2009	<i>M. mucedo</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. griseofulvum</i>	7.5×10^3	<i>M. mucedo</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. griseofulvum</i>	2.8×10^3
	производст. 23.10.2010	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i>	5.7×10^3	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i>	1.8×10^3
Кишиш	производст. 26.10.2009	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i>	6.4×10^3	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i>	2.5×10^3
	Торг. центр 04.02.2010	<i>M. racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. velutinum</i>	1.1×10^4	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i>	7.3×10^3
	производст. 23.10.2010	<i>M. racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. variabile</i>	5.9×10^2	<i>M. racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>P. variabile</i>	4.6×10^2
	производст. 23.10.2010	<i>M. mucedo</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. fumigatus</i>	8.3×10^2	<i>A. foetidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. alternata</i>	4.5×10^2
	Торг. центр 09.03.2008	<i>M. racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. velutinum</i>	1.3×10^4	<i>M. racemosus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. foetidus</i>	1.0×10^4

Результаты микологического анализа экспериментальных образцов показали, что после шестимесячного низкотемпературного хранения темных сортов сушеного винограда, существенных изменений в видовом составе грибов не обнаружено. В

проанализированных образцах отмечается доминирование видов из рода *Aspergillus*. Из таблицы 27 видно, что виды из секции *Aspergillus Nigri* довольно устойчивы при низкотемпературном хранении сушеного винограда в течение шести месяцев. В отдельных образцах сушеного винограда были обнаружены виды *A. foetidus* и *A. aculeatus*, которые не отмечались в образцах, проанализированных непосредственно после их сушки. Вид *A. aculeatus* принадлежит к группе “черных аспергиллов” с одноярусными стеригмами. Он изолирован из армянских сортов изюма.

Некоторые виды из рода *Penicillium* - *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum* и *P. variable*, также проявили устойчивость к низкотемпературному хранению. Перечисленные виды из рода *Penicillium* являются коремияльными грибами. Агрегация конидиеносцев в виде коремий, повышает их жизнеспособность. После шестимесячного хранения образцов сушеного винограда виды из рода *Mucor* встречаются реже.

Хранение сушеного винограда в условиях низкой температуры способствует некоторому снижению уровня его заспоренности мицелиальными грибами (рис. 30).

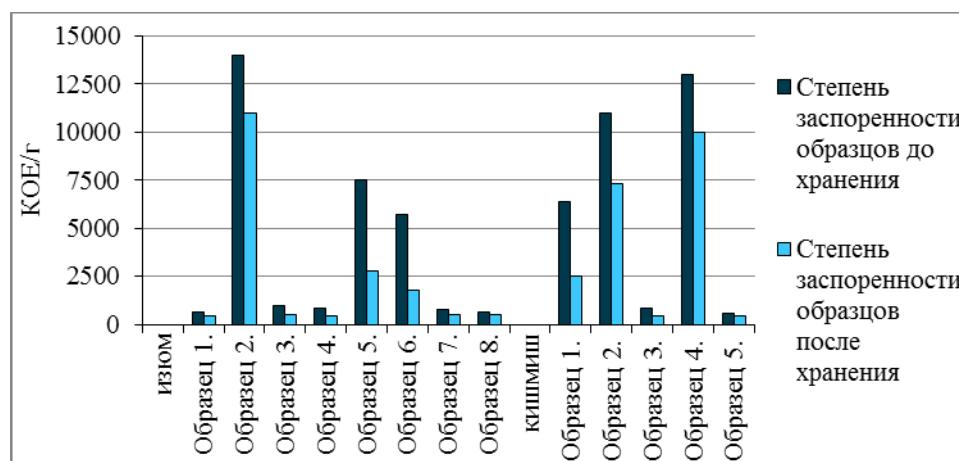


Рис. 30. Степень заспоренности армянских образцов черного сушеного винограда до и после хранения при температуре $<+4^{\circ}\text{C}$

Низкое значение КОЕ/г образцов после шестимесячного хранения объясняется торможением роста мицелиальных микромицетов в условиях низкой температуры ($<+4^{\circ}\text{C}$). Полученные результаты могут служить научным основанием для определения условий и сроков хранения сушеного винограда.

5.4. Содержание диоксида серы (SO₂) в разных сортах сушеного винограда

Для стран Средиземноморья: Испании, Греции, Турции и Италии, производство разных видов сушеного винограда (изюм, кишмиш, «коринф» и др.) имеет довольно важное экономическое значение. Сушеный виноград составляет 50% мирового производства сухофруктов (Shanmugavelue, 1989). На производство сушеного винограда тратится около 30 процентов урожая винограда в мировом масштабе.

Благоприятные климатические условия в странах с развитым виноградарством, способствуют распространению плесневых грибов – потенциальных продуцентов охратоксина А. На основании результатов микотоксикологических анализов, большинством зарубежных авторов показано частое обнаружение ОТА в продуктах переработки винограда, в особенности, в разных видах сушеного винограда (Sage et al., 2002, Serra et al., 2003, Magnoli et al., 2003, Bau et al., 2005, Battilani et al., 2006, Leong et al., 2006). В связи с этим, при производстве сушеного винограда, большое внимание уделяется разработке технологий и методов по ингибированию роста и развития микромицетов-потенциальных продуцетов микотоксинов, с целью снижения рисков контаминации готового продукта. Использование соответствующих агротехнических приемов и фунгицидов при выращивании винограда, может существенно предотвратить рост грибов из рода *Aspergillus* и контаминацию готового продукта охратоксином А (Covarelli et al., 2012). После сбора урожая наиболее эффективным методом для ограничения развития плесневых грибов является обработка сырьевого винограда диоксидом серы (Hocking et al., 1992). Диоксид серы (SO₂) и его производные давно используются для обработки сырьевого винограда в качестве консерванта ингибирующего развитие плеснеобразующих грибов и других микроорганизмов. Он также действует в качестве антиоксиданта, предотвращающего окислительные процессы, в результате которого имеет место изменение цвета готового продукта. Процесс сульфитации исходного сырья обычно выполняется с помощью газовой фумигации или погружением в раствор сернистой кислоты. В Армении широко применяется сухая сульфитация. Предварительная сульфитация сырья также способствует сохранению натурального цвета и консистенции ягод винограда и

улучшению товарного вида, что имеет важное значение в торговле. Однако использование диоксида серы ограничено Международными Санитарными Правилами и Нормами. Согласно требованиям Codex Alimentarius (1981), в готовом сушеном винограде содержание SO_2 не должно превышать 1500 мг/кг.

С целью выявления корреляции между содержанием диоксида серы (SO_2) и степенью контаминации сушеного винограда мицелиальными грибами, в 30 образцах сушеного винограда определено количество диоксида серы, как связанного, так и свободного, методом аспирации. В рисунке 31 приведены результаты анализа образцов иранского и армянского сушеного винограда.

Результаты наших исследований показали о существовании коррелятивной связи между содержанием диоксида серы в образцах сушеного винограда и степенью заспоренности их мицелиальными грибами (Накобьян et al., 2010). Высокое содержание общего количества диоксида серы до 1350 мг/кг отмечается в иранских образцах (кишмишные сорта). В указанных образцах степень контаминации сушеного винограда микромицетами минимальная, не превышает 1.9×10^2 КОЕ/г. В местных образцах, из светлых сортов винограда, содержание связанного и свободного диоксида серы соответствовало требованиям Кодекс Алиментариус (1981). При остаточном количестве диоксида серы 30 мг/кг степень контаминации сушеного винограда диаспорами плесневых грибов превышает 7.4×10^2 КОЕ/г, которая не соответствует требованиям микробиологической безопасности, приведенным в СанПиН 2.3.2.1078-01.

Как показано на рисунке 26, содержание “свободного” диоксида серы (SO_2) в иранских образцах находилось в пределах от 45 – 80 мг/кг. Ингибирующий эффект SO_2 на количественное содержание жизнеспособных спор грибов - потенциальных продуцентов охратоксина А наблюдается при остаточном количестве свободного диоксида серы - 60 мг/кг.



Рис. 31. Коррелятивная связь между содержанием SO₂ в образцах сушеного винограда и степенью заспоренности их мицелиальными грибами.

В проанализированных образцах иранского сушеного винограда общее содержание диоксида серы составляло 900 – 1350 мг/кг, которое не превышало предельно допустимые концентрации, приведенные в СанПиНе 2.3.2.1078-01. В армянских образцах из светлых сортов винограда содержание общего диоксида серы выявлено в пределах 600 - 800 мг/кг. Степень заспоренности указанных образцов находилась в пределах от 2.3×10^2 до 7.4×10^2 КОЕ/г (рис. 31).

Сушеный виноград, полученный из черных или темно-красных сортов винограда не подвергается сульфитации, что является причиной высокой степени контаминации образцов черного сушеного винограда плеснеобразующими грибами. Результаты микологического анализа 11 образцов черных сортов местного сушеного винограда показали на высокий уровень контаминации проанализированных образцов микромицетами от 4.6×10^3 – 4.3×10^4 КОЕ/г. Полученные результаты явились основой для разработки рекомендаций о необходимости соблюдения более строгого гигиенического контроля и более частого микологического мониторинга в процессе производства сушеной продукции из красных сортов винограда.

ГЛАВА 6

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ СУШЕНОГО ВИНОГРАДА И СВЕЖИХ ПЛОДОВ ВИНОГРАДА

В результате микологического анализа 167 образцов разных сортов сушеного винограда выделены и идентифицированы 508 штаммов - потенциальных продуцентов охратоксина А (ОТА) и афлатоксинов из рода *Aspergillus*: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. sclerotiumniger*, *A. ochraceus*, *A. lacticoffeatus* и *A. flavus* (табл. 28). Из числа изолированных штаммов 84.8% (431 штаммов) принадлежат к секции *Aspergillus Nigri* и являются потенциальными продуцентами ОТА. Вид *A. ochraceus* также является потенциальным продуцентом ОТА и относится к группе *Aspergillus ochraceus* из секции *Circumdati* (Bayman et al., 2002). Вид *A. flavus* является потенциальным продуцентом афлатоксина В₁ и относится к секции *Aspergillus Flavi*. Из общего числа изолированных штаммов, относящихся к виду *A. carbonarius* и *A. niger*, соответственно 61.8% и 46.7% штамма, выделены из армянских образцов сушеного винограда.

Табл. 28. Количество токсигенных штаммов, выделенных из разных субстратов

Субстрат		Кол-во образцов	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. sclerotiumniger</i>	<i>A. lacticoffeatus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. flavus</i>
Армянский изюм	Белый	20	20	20	17	-	-	8
	Темный	26	47	32	44	28	6	20
Армянский кишмиш	Белый	19	21	9	-	-	-	5
	Темный	22	19	18	-	-	4	12
Импорт. изюм	Белый	20	10	18	-	-	-	5
	Темный	15	23	37	-	-	-	10
Импорт. кишмиш	Белый	29	12	13	-	-	-	2
	Темный	16	21	22	-	-	-	5
Итого		167	173	169	61	28	10	67
Плоды винограда		81	98	96	9	-	-	15

В результате микологического анализа свежего винограда выделены и идентифицированы 218 потенциально токсигенных штаммов из рода *Aspergillus*, 15 из

которых принадлежали к виду *A. flavus*, а остальные - к секции *Aspergillus Nigri*: 98 штаммов – к *A. carbonarius*, 96 штаммов – к *A. niger* и 9 штаммов – к *A. sclerotium*.

6.1. Определение токсичности грибов потенциальных продуцентов ОТА методом биотестирования

Исследован токсигенный потенциал у 103 штаммов из рода *Aspergillus*. Определена токсичность их культуральных жидкостей и хлороформных экстрактов. Экстракты грибов получали при их инкубировании на жидкой питательной среде Чапека-Докса. Биотестирование проводили на личинках жабраногого рачка *Artemia salina*, которые чувствительны к токсичным метаболитам мицелиальных грибов (Brown, 1969, Harwing, Scott, 1971, Watson, 1985, Reiss, 1993). Определен токсигенный потенциал 30 штаммов *A. carbonarius*, изолированных из образцов сушеного винограда. Результат приведены в таблице 29.

Табл. 29. Результаты биотестирования на личинках *Artemia salina* охратоксигенных штаммов, выделенных из образцов сушеного винограда

Кол-во исследо- ванных штаммов	Штаммы	Количество штаммов разной степени токсичности							
		Токсичность культуральной жидкости				Токсичность хлороформного экстракта			
Штаммы выделенные из местных образцов		A	B	C	D	A	B	C	D
20	<i>A. carbonarius</i>	4	8	4	4	4	8	4	4
10	<i>A. niger</i>	0	0	3	7	0	0	3	7
10	<i>A. sclerotioniger</i>	0	0	2	8	0	0	2	8
5	<i>A. lacticoffeatus</i>	0	0	0	5	0	0	0	5
3	<i>A. ochraceus</i>	0	0	0	3	0	0	0	3
Штаммы выделенные из импортированных образцов		A	B	C	D	A	B	C	D
10	<i>A. carbonarius</i>	0	0	4	6	0	0	4	6
5	<i>A. niger</i>	0	0	3	2	0	0	3	2

Примечание здесь и далее: Согласно (Scott 1980, Biji 1981, Harrch 1982),
 А= остроотоксичные экстракты грибов вызывают гибель личинок 90% и выше,
 В= токсичные - от 50-89%,
 С= слаботоксичные - от 10-49%,
 D= нетоксичные - до 9%.

Из 30 проанализированных штаммов *A. carbonarius* 20 выделены из армянских черных сортов сушеного винограда, среди которых 16 проявили токсичность в разной степени. Из 10 штаммов *A. carbonarius*, изолированных из импортированных образцов, 6 оказались нетоксичными, а 4 проявили слаботоксичные свойства (табл. 29). Из 5 исследованных штаммов *A. niger* изолированных из импортированных образцов темного сушеного винограда, 3 проявили слаботоксичные свойства, 2 оказались нетоксичными (табл. 29).

Изучена также токсичность 10 штаммов *A. niger*, 10 - *A. sclerotium*, 5 - *A. lacticoffeatus* и 3 - *A. ochraceus*, выделенных из местных образцов сушеного винограда. Слаботоксичные свойства выявлены у трех штаммов *A. niger* и у двух - *A. sclerotium*. Все штаммы *A. lacticoffeatus* и *A. ochraceus* оказались нетоксичными (рис. 32).

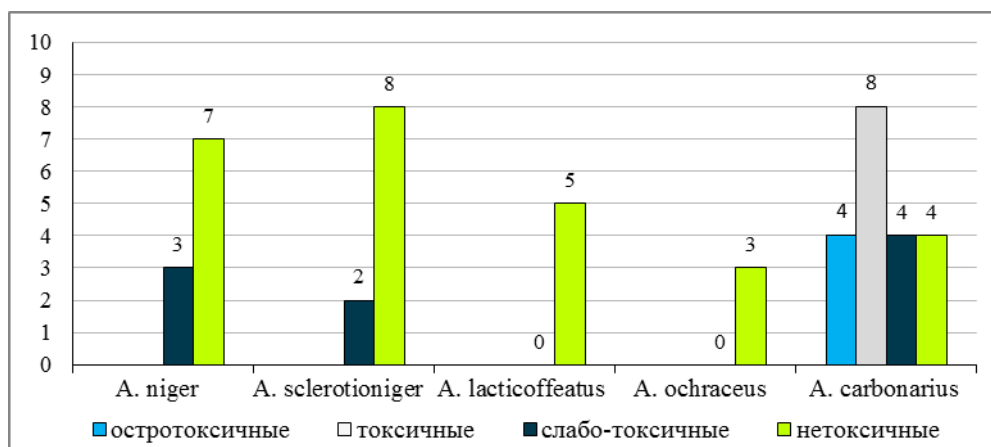


Рис. 32. Количественное распределение по степени токсичности охратоксигенных видов из рода *Aspergillus*, выделенных из местных образцов сушеного винограда

Был исследован токсигенный потенциал плесневых грибов, изолированных из образцов свежих плодов винограда, как основного источника контаминации сушеного винограда микотоксинами. Из 218 потенциально-токсигенных штаммов, выделенных из плодов армянского винограда, 28 исследованы на токсичность методом биотестирования, с использованием личинок *Artemia salina* (рис. 33).

Из 28 указанных охратоксигенных штаммов, четыре штамма *A. carbonarius* проявили слабую токсичность (Grigoryan, Nakobyan, 2011). Все остальные штаммы *A. carbonarius*, *A. niger* и *A. sclerotium* оказались нетоксичными (рис. 33).

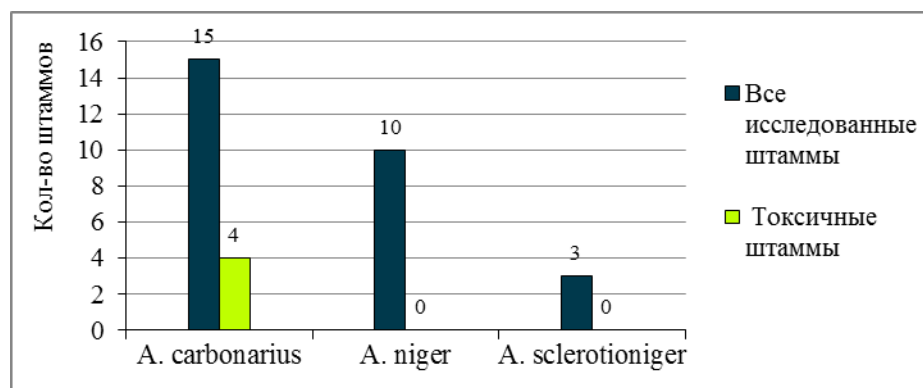


Рис. 33. Количество токсичных штаммов из 28 исследованных, выделенных из образцов винограда

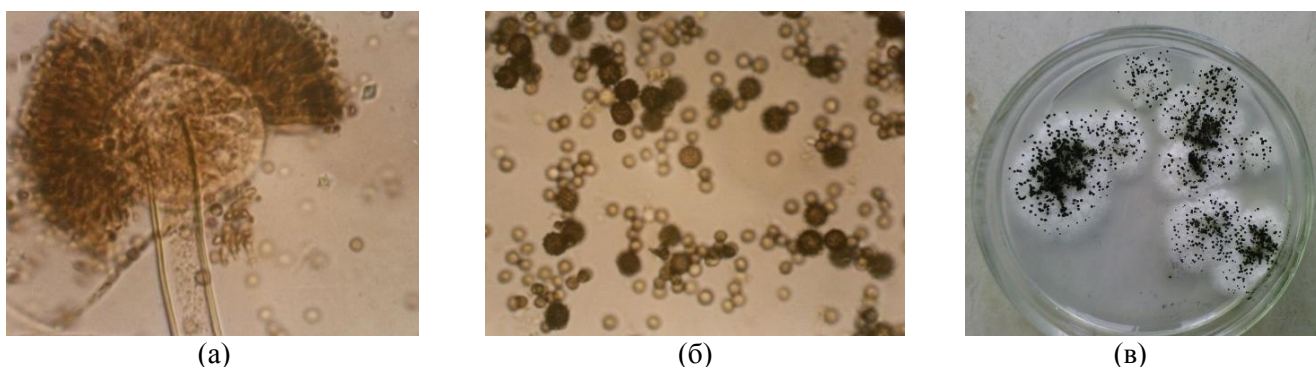


Фото 16. Вид *A. carbonarius* : (а) – конидиеносец и стеригмы (х40), (б) – конидии, (40х)
(в) - чистая культура

Исследована зависимость степени токсичности вторичных метаболитов четырех штаммов вида *A. carbonarius* от процентного содержания сахарозы в питательной среде. Штаммы были инкубированы на жидких питательных средах с 5% и 10% содержанием сахарозы в течении 10 дней при температуре 30 °С (табл. 30).

Табл. 30. Результаты сравнительного анализа токсичности штаммов *A. carbonarius* по процентному содержанию сахарозы в питательной среде

Штаммы <i>A. carbonarius</i>	Токсичность культуральной жидкости				Токсичность хлороформного экстракта			
	10% сахароза		5% сахароза		10% сахароза		5% сахароза	
	Культ. жидкость	Контроль, среда	Культ. жидкость	Контроль, среда	Хлор. экстракт	Контроль, среда	Хлор. экстракт	Контроль, среда
100 – 20.3	B	D	D	D	B	D	D	D
100 – 19.2	D	D	C	D	D	D	C	D
100 – 16.1	B	D	C	D	B	D	C	D
100 – 22.4	D	D	D	D	D	D	D	D

После указанного срока инкубирования, определяли токсичность культуральной жидкости и хлороформного экстракта на личинках жаброногого рачка *Artemia salina*.

Штаммы, инкубированные в жидкой среде с содержанием 10% сахарозы проявили более высокую степень токсичности, чем штаммы инкубированные в питательной среде с 5%-ным содержанием сахарозы. Высокое содержание сахарозы стимулирует токсинообразование у вида *A. carbonarius*, известного как продуцент ОТА.

6.2. Определение токсичности штаммов *A. flavus* методом биотестирования

Из образцов сушеного винограда изолированы 67 штаммов *A. flavus*, потенциальных продуцентов афлатоксинов. Исследовано наличие афлатоксина В₁ в 12-и штаммах *A. flavus*, методом биотестирования на личинках *Artemia salina* (рис. 34).



Рисунок 34. Токсичность культуральной жидкости и экстрактов штаммов *A. flavus*, выделенных из сушеного винограда, при биотестировании

У трех штаммов *A. flavus* обнаружены остротоксичные свойства. Четыре штамма вызывали гибель личинок до 75%, у одного штамма выявлена слаботоксичность. Остальные четыре из 12 проанализированных, не проявили токсичных свойств (рис. 34). Таким образом, существует реальный риск контаминации сушеного винограда афлатоксигенными штаммами *A. flavus*.

Сравнительный анализ видового состава грибов, контаминирующих сушеный виноград, показал повышение процентного содержания вида *A. flavus* в сушеном

винограде в период с 2005 по 2010 гг., что указывает на определенное повышение риска контаминации сушеного винограда афлатоксинами.

6.3. Определение ОТА в экстрактах штаммов *A. carbonarius* методом тонкослойной хроматографии

Охратоксины известны как слабые органические кислоты, продуцируемые в основном видами из родов *Aspergillus* и *Penicillium* (Varga et al., 2001). Они представляют собой дигидроизокумариновые соединения связанные пептидной связью с частью L-фенилаланина (O'Brien and Dietrich, 2005). Охратоксин А в чистом виде нестабилен, чувствителен к действию света и кислорода. Он обладает нефротоксичным, тератогенным и иммунодепрессивным действием. Ингибирует синтез белка, нарушает обмен гликогена. Охратоксин А вызывает нефропатию у свиней. В экспериментах *in vivo* показано канцерогенное, эмбриотоксическое, нейротоксическое и иммунотоксическое действие охратоксина А на разных видах животных. Международное агентство по изучению рака классифицирует охратоксин А как соединение, потенциально канцерогенное для человека. Комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам и контаминантам установлено количество условно переносимого недельного поступления охратоксина А с пищей - 120 нг/кг массы тела. В последние годы охратоксин А часто обнаруживается в пищевых продуктах в довольно высоких количествах, таким образом представляя реальный риск для здоровья потребителя.

Максимально допустимые уровни микотоксинов в пищевых продуктах установлены на основе их токсикологической оценки с точки зрения воздействия на здоровье человека. Пределы установлены в результате совместной работы нескольких международных организаций: Международная Программа по Химической Безопасности (IPCS), Международное Агентство по Изучению Рака (IARC), Объединенный Комитет Экспертов ФАО/ВОЗ по Пищевым Добавкам (JECFA) и Законодательная Комиссия Европейского Союза.

Табл. 31. Максимальные уровни ОТА установленные Законодательным Комитетом (ЕС) No 1881/2006

Пищевые продукты	ПДК ОТА, мкг/кг
Необработанные зерновые	5.0
Продукты получаемые из переработки зерновых, в том числе и обработанные зерновые продукты	3.0
Сушеный виноград (Кишмиш, изюм и коринка)	10.0
Жаренные кофейные зерна (бобы) и жаренный молотый кофе	5.0
Растворимый кофе	10.0
Вино (в том числе игристое вино, кроме вин с содержанием алкоголя не менее 15%) и фруктовое вино	2.0
Ароматизированное вино, ароматизированный винный коктейль	2.0
Виноградный сок, концентрированный виноградный сок, виноградный нектар, виноградное сусло, предназначенные для прямого потребления	2.0
Продукты на основе обработанных зерновых, продукты детского питания	5.0
Диетические специальные продукты медицинского прдназначения для детей	5.0

Европейское Законодательство установило для ОТА максимально допустимое количество во всех сортах сушеного винограда. Оно составляет 10 мкг/кг (ЕС Regulation No 1881/2006). В таблице 38 показаны страны, в которых нормируется максимально допустимое количество ОТА в сухофруктах (Barkai-Golan, Paster, 2008). В Армении, в пищевых продуктах ОТА не нормируется.

Табл. 32. Максимально допустимое количество микотоксинов в некоторых продуктах питания

Страна	Пищевые продукты	Микотоксины	ПДК мкг/кг
Армения (2003)	Все продукты питания	афлатоксин В ₁	5
		зеараленон	1000
		Т-2 токсин	100
	Томатная паста, яблоко	патулин	5
Страны-члены ЕС (2006)	Сушеный виноград (изюм, кишмиш, коринка)	охратоксин А	10
		афлатоксин В ₁	2
Иран (2003)	Финик, сушеный виноград (изюм, кишмиш), инжир и все сухофрукты	афлатоксин В ₁	5
		афлатоксин В ₁ В ₂ G ₁ G ₂	15
		охратоксин А	10
Швейцария (2003)	Все сухофрукты	охратоксин А	20
Турция (2003)	Фундук, арахис, разные виды орехов, сухофрукты (изюм, финик) и пищевые продукты получаемые из сушеного винограда	афлатоксин В ₁	5
		афлатоксин В ₁ В ₂ G ₁ G ₂	10
		охратоксин А	10
Уругвай (2003)	Все сухофрукты	охратоксин А	50

Результаты наших исследований показали на высокую степень контаминации сушеного винограда охратоксигенными грибами из рода *Aspergillus*. Сушеный виноград является благоприятным субстратом не только для роста охратоксигенных грибов, но и для их токсинообразования. Проведен ТСХ (тонкослойная хроматография) анализ 30 изолированных штаммов *A. carbonarius*, с целью выявления ОТА.

Из проанализированных 30 штаммов, 20 были выделены из армянского черного сушеного винограда, а 10 - из импортированного. В экстрактах 16 штаммов, выделенных из местного сушеного винограда, обнаружен ОТА в количестве от 30 до 200 мкг/100мл. Из экстрактов 10 проанализированных штаммов вида *A. carbonarius*, выделенных из импортированных образцов, токсин не был обнаружен в 6 штаммах. В экстрактах остальных четырех штаммов ОТА выявлен в малых концентрациях – от 45 до 55 мкг/100мл (рис. 35).



Рис. 35. Содержание охратоксина А в экстрактах штаммов *A. carbonarius*, выделенных из разных сортов сушеного винограда

Высокое содержание диоксида серы в импортированных образцах обеспечивает низкий уровень контаминации сушеного винограда, как плеснеобразующими грибами, так и их метаболитами.

Проведен хроматографический анализ 15 штаммов *A. niger* и 3 штаммов - *A. ochraceus*, изолированных из темных сортов сушеного винограда. Несмотря на то, что вид *A. ochraceus* известен как активный продуцент ОТА в продуктах питания, указанный токсин не обнаружен ни в одном из проанализированных экстрактов вида *A. ochraceus*

(рис. 36). Из 10 проанализированных штаммов вида *A. niger*, изолированных из местных образцов, ОТА обнаружен в экстрактах трех штаммов в количестве 10-25 мкг/100мл.

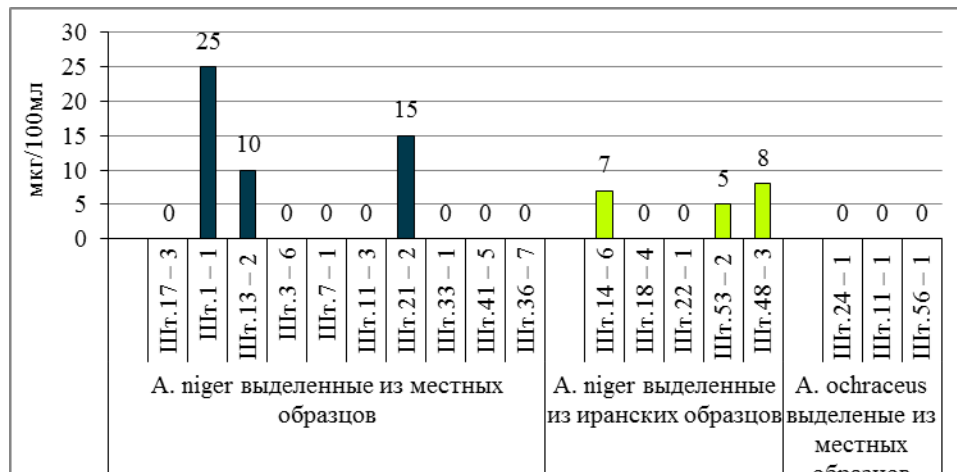


Рис. 36. Количество ОТА в экстрактах штаммов *A. niger* и *A. ochraceus*, выделенных из темных сортов сушеного винограда

Из 5 штаммов *A. niger*, выделенных из иранских образцов, 3 содержали ОТА в количестве 5 – 8 мкг/100мл. В остальных штаммах *A. niger* токсин не был обнаружен (рис. 36). Согласно данным Р. Самосон и соавторов (2004) только некоторые штаммы *A. niger*, способны синтезировать ОТА.

Проведен анализ 10 образцов черного сушеного винограда армянского производства на наличие охратоксина А. ТСХ анализ не позволил выявить наличие микотоксинов в образцах. ОТА обнаружен методом ИФА (иммуно-ферментного) анализа и ВЭЖХ (высоко-эффективной жидкостной хроматографии), с предварительной очисткой экстракта методом аффинной хроматографии. Семь образцов черного сушеного винограда содержали охратоксин А в количествах от 15 до 50 мкг/кг (табл. 33). В отличие от ТСХ анализа, метод иммуно-ферментного анализа более чувствительный и позволяет выявить токсины в количестве менее, чем 2 мкг/кг. Аффинная хроматография обеспечивает хорошую степень очистки экстрактов и высокую степень извлечения охратоксина А из образца до 95 – 100 %.

В таблице 33 приведены результаты сравнительного анализа по оценке содержания ОТА в образцах сушеного винограда и в экстрактах штаммов *A. carbonarius*, выделенных из указанных образцов.

Табл. 33. Содержание охратоксина А в образцах черных сортов армянского сушеного винограда и в экстрактах штаммов *A. carbonarius*, выделенных из указанных образцов

Сорт сушеного винограда	Штаммы <i>A. carbonarius</i>	Токсичность штаммов		Количество ОТА	
		Культуральная жидкость	Экстракт	В образцах (в мкг/кг)	В экстрактах штаммов (в мкг/100мл)
Кишмиш черный	Шт. 100-4.4	В	В	20	55
Кишмиш черный	Шт. 100-24.1	С	С	15	25.5
Кишмиш черный	Шт. 100-20.3.2	В	В	25	45
Кишмиш черный	Шт. 100-3.1	Д	Д	-	-
Изюм черный	Шт. 100-23.6	Д	Д	-	-
Изюм черный	Шт. 100-43.1	С	С	25	40
Изюм черный	Шт. 100-41.1	В	В	43	160
Изюм черный	Шт. 100-35.1	А	А	50	200
Изюм черный	Шт. 100.23-5	С	С	-	30
Изюм черный	Шт. 100-47.3	В	В	30	95

Во всех штаммах *A. carbonarius*, которые проявили остро-токсичные и токсичные свойства обнаружен ОТА. При этом ОТА в высоких количествах обнаружен также в образцах сушеного винограда, из которых выделены токсичные штаммы *A. carbonarius*.

6.4. Определение афлатоксина В₁ в экстрактах штаммов *A. flavus* методом тонкослойной хроматографии

В последнее время неоднократно сообщается о контаминации сушеного винограда афлатоксигенным видом *A. flavus* (Anwar et al., 2013, Hussein et al., 1986, Khare et al., 2013). В большинстве случаев *A. flavus* считается одним из самых чаще встречаемых видов загрязняющих сушеный виноград, после видов *A. niger* и *A. fumigatus* (Giridhar, Reddy, 2001). Наличие вида *A. flavus* в сушеном винограде представляет риск с точки зрения возможности контаминации продукта афлатоксинами. В отдельных странах в образцах сушеного винограда обнаружен афлатоксин В₁ (Youssef et. al., 2000, Alghalibi et al., 2004). Согласно Европейскому регламенту максимальное допустимое количество афлатоксина В₁ в сушеном винограде составляет 2 мкг/кг (EC Regulation No 1881/2006).

В нашей стране максимальное допустимое количество афлатоксина В₁ во всех пищевых продуктах составляет 5мкг/кг (табл. 32).

Результаты проведенного микологического анализа, на период с 2005 по 2010 гг, показали существенный рост проблемы контаминации сушеного винограда афлатоксигенными грибами и афлатоксином В₁ в Армении. В результате анализов выделено 67 штаммов *A. flavus*. Проанализированы 12 штаммов на присутствие афлатоксина В₁ методом тонкослойной хроматографии (рис. 7).

Восемь штаммов продуцировали афлатоксин В₁ в высоких количествах (до 300 мкг/100мл). В 4-х штаммах *A. flavus* афлатоксин В₁ не был обнаружен.

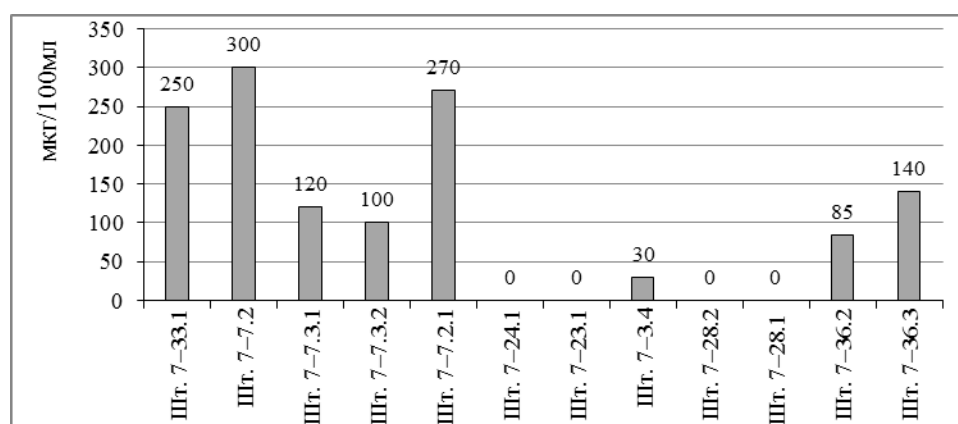


Рис. 37. Количество афлатоксина В₁ в экстрактах штаммов *A. flavus*, выделенных из черных сортов армянского сушеного винограда

Табл. 34. Количество афлатоксина В₁ в образцах черных сортов армянского сушеного винограда

Номер образца	Сорт сушеного винограда	Кол-во афлатоксина В ₁ в мкг/кг
18	Кишмиш черный	15
27	Кишмиш черный	10
33	Изюм черный	27
38	Кишмиш черный	-
41	Изюм черный	-
57	Изюм черный	35
40	Кишмиш черный	18
53	Изюм черный	32
11	Изюм черный	-
24	Изюм черный	23

Проанализированы 10 образцов местного сушеного винограда на присутствие афлатоксина В₁, методом тонкослойной хроматографии. Афлатоксин В₁ был обнаружен в 5 образцах сушеного винограда местного производства в количестве 10 – 35 мкг/кг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Качество сушеного винограда начинается с виноградника в поле. Проведенные нами анализы свежих плодов винограда показали наличие риска контаминации винограда микромицетами. Для предотвращения роста грибов и синтеза микотоксинов в период созревания урожая в виноградниках наиболее важным является соблюдение правил Хорошей Сельскохозяйственной Практики (GAP - Good Agricultural Practices). Целью системы является получение здоровых сельскохозяйственных продуктов. GAP обычно включает: надлежащую подготовку земли, севооборот, использование сортов устойчивых к плесени и вредителям, контроль повреждения выращиваемой культуры насекомыми, управление загрязненностью мицелиальными грибами и предотвращение стрессов выращиваемой культуры (например засуха и сорняки), своевременный сбор урожая и правильная обработка и хранение продуктов после сбора урожая (Barkai-Golan and Paster, 2008). Таким образом, применение GAP обеспечит получение сельхозпродуктов свободных от микотоксинов.

В 2007г. Комитет Codex Alimentarius принял новый кодекс для предотвращения контаминации и снижения уровня охратоксина А в винах и продуктах виноградарства (CAC/RCP 63-2007). Для снижения рисков по кодексу рекомендуется применение следующих профилактических мер в регионах с благоприятными климатическими условиями для синтеза ОТА в продуктах виноградарства: *1. информация о региональном риске* – анализ и идентификация видов токсигенных грибов в регионе виноградарства; *2. тренинг производителей* – обучение идентификации охратоксигенных видов и знаниям о методах предотвращения контаминации в виноградниках; *3. правильная организация виноградников*; *4. выбор правильного посадочного материала*; *5. техника выращивания*; *6. контроль над насекомыми и болезнями.*

Процесс сушки является следующим важным этапом для предотвращения контаминации готового продукта. Как показали наши исследования, на этой стадии производства резко повышается риск загрязнения производимого продукта плеснеобразующими грибами. Для обеспечения микробиологической безопасности производимого сушеного винограда важное значение имеет определение ККТ

(Критически Контрольных Точек) на производствах или в складских помещениях. Это поможет производителям разрабатывать и применять подходящую систему НАССР, которая позволит исключить непредвиденные источники контаминации производимых продуктов микотоксинами. На этой стадии производства, критическими точками являются: вредители и насекомые, продолжительность сушки, частота переворачивания ягод винограда, гигиенические условия, а также погодные условия (температура, влажность, дожди и т.д.). Последнее особенно важно при производстве методом воздушно-солнечной сушки. Во всех перечисленных критических точках должны быть применены меры контроля. Для каждой идентифицированной Критической Контрольной Точки должны быть определены измеряемые параметры и установлены их критические пределы (Mencarelli et al., 2005).

Условия хранения, температура, активность воды (a_w) готовой сушеной продукции, время хранения, плохая аэрация, вредители могут способствовать росту плесневых грибов и синтезу микотоксинов. Содержание влажности, в частности активность воды (свободная вода), является критической точкой, которая может способствовать росту грибов и синтезу микотоксинов (FSIS/USDA, 1999). Это доказано и нашими исследованиями, которые выявили прямую зависимость степени контаминации исследованных образцов сушеного винограда от значения a_w в образцах (смотри. Гл.5.1.).

Несмотря на то, что армяне были одним из древних народов мира, который имел развитое виноградарство и производил сушеный виноград, сегодня Армения не является страной экспортирующей сушеный виноград. Небольшие фермерские хозяйства по производству сухофруктов Армении не способны обеспечить стабильные поставки качественной продукции на Европейский рынок. Однако Армения имеет реальный потенциал для поставки на международный рынок качественной продукции. В связи с этим, разработка стратегии расширения объемов производства сушеного винограда и соответствия международным стандартам качества, является одной из важных экономических задач, способной обеспечить устойчивое развитие данной отрасли. Для достижения этого, первичной задачей является необходимость внедрения системы НАССР (Hazard Analysis and Critical Control Points - Анализ Рисков по Критическим

Контрольным Точкам) на всех стадиях производства, начиная от сырья до производства готового продукта и его реализации.

Следующим важным шагом является нормирование ОТА в сушеном винограде. Решение этой проблемы во многом зависит от поддержки государственных органов. В республике отсутствует регулирование или требования предельно допустимых количеств охратоксина А в продуктах переработки винограда, несмотря на тот факт, что указанная проблема постоянно обсуждается в рамках Комитета Кодекс Алиментариус по пищевым добавкам и контаминантам ФАО и других международных организаций. За последние 10 лет установлены предельно допустимые концентрации для охратоксина А в продуктах виноградарства во многих странах мира. Установление предельно допустимых количеств обязательны для стран с развитым виноградарством.

В 2014 году Армения стала 46-м членом OIV. Последняя является научно-технической организацией, обеспечивающей международные стандарты, помогающие повысить качество винограда, вин и других продуктов виноградарства и соответствие продукции международным требованиям. Это даст большую возможность армянским производителям выйти на международный рынок.

Генеральная Ассамблея МОВВ (OIV - International Organisation of Vine and Wine – Международная Организация Винограда и Вина) в 2012 г. постановила предложить государствам-членам МОВВ руководство по внедрению системы НАССР, чтобы облегчить ее установку в производстве винограда, предназначенного для потребления в свежем виде и в качестве сырья для производства разных продуктов его переработки (вин, сушеного винограда, виноградного сока и др.) (Resolution OIV-VITI 469-2012). Основные стадии выращивания винограда похожи, независимо от его конечного использования. Однако, конечное использование сырья должно быть рассмотрено при применении системы НАССР, т.к. это может повлиять на возникновение рисков и управление ими: например риски связанные с транспортировкой сырья, упаковкой и обработкой (для столового винограда или изюма) или риски во время сушки (для изюма). Кроме этих шагов Генеральная Ассамблея OIV планирует продолжать

применение системы НАССР для процессов переработки винограда в производстве изюма и других продуктов (Resolution OIV-VITI 469-2012).

Применение системы НАССР во всей пищевой цепи, имеет неоспоримое преимущество для усиления системы обеспечения безопасности производимого сушеного винограда и предотвращения его контаминации мицелиальными грибами и их микотоксинами. Эффективная система НАССР обеспечивает также непревышение нормы количества микотоксинов в готовом продукте. Система НАССР включает два основных компонента: 1. Программы Хорошей Производственной Практики (GMP – Good Manufacturing Practices) и Программы Хорошей Гигиенической Практики (GHP – Good Hygienic Practices).

Система НАССР принята во многих странах, причем в ряде стран она стала обязательной, и официальные органы контроля пищевой безопасности требуют внедрение НАССР в пищевой промышленности. Поддержка государственных органов является одним из наиболее важных факторов развития и широкого внедрения НАССР.

Основой для внедрения системы НАССР могут стать результаты данных исследований, которые помогли определить критически контрольные точки на производствах сушеного винограда в Армении. Система НАССР должна быть документирована и должны разрабатываться также системы регистрации мониторинга ККТ и корректирующих действий.

ВЫВОДЫ

Основываясь на данные, полученные в результате наших исследований, были сделаны следующие выводы.

1. Основными контаминантами изюма и других сортов сушеного винограда являются виды мицелиальных грибов из секции *Aspergillus Nigri*. При этом, из 32 выявленных видов микромицетов, как в местных, так и в импортированных образцах, доминирующими являются охратоксигенные виды *A. carbonarius* и *A. niger*, частота встречаемости которых достигала соответственно 73% и 59% в армянских, 44% и 67% в импортированных образцах сушеного винограда. Установлена высокая степень контаминации как импортных так и местных образцов видами *A. foetidus* и *A. tubingensis*. В местных образцах обнаружены также потенциально охратоксигенные виды *A. sclerotioniger* и *A. lacticoffeatus*.
2. В Армении существует также риск загрязнения сушеного винограда афлатоксигенными видами *A. flavus* и *A. nomius* и их микотоксинами в процессе производства. В местных образцах частота встречаемости указанных видов составляет 59% и 18% соответственно. В импортированном сушеном винограде выявлен только *A. flavus* с низкой частотой встречаемости (20%).
3. Степень загрязненности сушеного винограда армянского производства (2.2×10^2 – 4.3×10^4 КОЕ/г) часто превышает предельно допустимое количество (5×10^2 КОЕ/г), приведенное в СанПин 2.3.2 1078-01.
4. Наличие охратоксина А (в количестве 15-50 мкг/кг) в исследованных местных образцах черных сортов сушеного винограда обусловлено высокой степенью их контаминации охратоксигенными видами *A. carbonarius* и *A. niger*.
5. Первичными источниками контаминации сушеного винограда указанными видами являются механически поврежденные свежие плоды, используемые в качестве сырья в производстве.
6. Из физико-химических параметров, на степень контаминации сушеных плодов винограда охратоксигенными грибами и охратоксином А, особенно влияют активность воды (a_w) и pH. Значения активности воды исследованных образцов

сушеного винограда находятся в пределах 0.43–0.9, а значения рН – 4.42–4.8, что является благоприятным фактором для биосинтеза ОТА.

7. На уровень загрязненности готового продукта токсигенными грибами из секции *Aspergillus Nigri* значительное влияние имеют используемые технологии и условия сушки плодов винограда. При этом риск загрязнения повышается при сушке воздушно-солнечным методом.
8. Основными Критически Контрольными Точками в процессе производства разных сортов сушеного винограда являются: некачественное, механически поврежденное сырье, температура и продолжительность сушки, погодные условия в процессе сушки, частота переворачивания плодов, температура и условия хранения сырья и готового продукта, активность воды (a_w) и рН в конечном сушеном продукте, гигиенические условия в производственных цехах и складских помещениях.
9. На степень контаминированности готового продукта плеснеобразующими грибами и их токсигенными метаболитами значительно влияет использование сульфитации светлых сортов сушеного винограда. При этом имеет место сильное ингибирование развития грибов при остаточном количестве свободного диоксида серы (SO_2) – 60 мг/кг в образцах. Содержание “свободного” SO_2 в иранских образцах находилось в пределах от 45 – 80 мг/кг, а в местных образцах – от 0 – 45 мкг/кг.
10. Количества ОТА (15–50 мкг/кг) и афлатоксина B_1 (10–35 мкг/кг) в исследованных образцах сушеного винограда армянского производства превышают предельно допустимые уровни установленные Комитетом ЕС (Regulation 1881/2006): 10 мкг/кг и 2 мкг/кг соответственно. Высокое содержание указанных микотоксинов представляет большой риск для здоровья потребителя.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Для производства высококачественного конечного пищевого продукта существенную роль играет качество используемого сырья. Сырье должно быть здоровым и микробиологически безопасным. Выращивание винограда необходимо организовать и вести таким образом, чтобы он соответствовал санитарно-гигиеническим требованиям и нормам, изложенным в документах Кодекса Алиментариус (2003) и Гост 6882 – 88. Важное значение имеет определение даты сбора урожая, с учетом прогнозируемых погодных условий, а также правильная организация сбора урожая, исключающая механическое повреждение плодов винограда.

Производство сушеного винограда осуществляется разными методами сушки. Для предотвращения контаминации промежуточного и готового продукта при производстве должны быть соблюдены гигиенические требования, технологические нормы и правила.

1. Используемые при сушке плодов винограда технологии должны быть разработаны с учетом эколого-физиологических особенностей охратоксигенного вида *Aspergillus carbonarius*. Рекомендуется проводить регулярный контроль за значениями a_w и pH производимого сушеного продукта, продолжительностью сушки и температурой сушки и хранения.
2. Для получения микробиологически безопасного сушеного винограда в Армении следует соблюдать гигиенические требования на всех стадиях производства сушеного винограда, изложенных в документах Кодекс Алиментариус (2003). Первостепенное значение имеет внедрение системы НАССР в производствах, что позволит снизить риск загрязнения сушеного продукта и одновременно сократить использование диоксида серы (SO_2).
3. Необходимо ввести дополнения в нормативно-технические документы Армении относительно содержания охратоксигенных видов грибов (в частности *A. carbonarius*) и охратоксина А (10 мкг/кг) в сушеном винограде, в соответствии ЕС No 1881/2006.

ЛИТЕРАТУРА

1. Արովյան Ս.Ս. Հորացված Մթերքի Արտադրություն. // - Տեղեկատվական Գրքույկ. - ԵՐԵՎԱՆ. – 2007. - էջ. 15-18.
2. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы// - Определитель. - Киев. Наукова думка. -1988. - 204 страниц.
3. ГОСТ 6882-88. Виноград сушеный. // - Технические условия. - Характеристика видов сушеного винограда. - Межгосударственный Стандарт. - Приложение 1. - 1989. – с. 55 – 62.
4. ГОСТ 1750-86 Фрукты сушеные. // - Правила приемки, методы испытаний. - Госстандарт СССР. - 17.01.1986. - с. 41 – 50.
5. ГОСТ Р 52471-2005. Корма. // - Иммуноферментный метод определения микотоксинов. 01.01.2007. – 16 страниц.
6. Кодекс Алиментариус. // - Гигиена пищевых продуктов. - Базовые тексты. - Рекомендуемые международные технические нормы и правила. - Общие принципы гигиены пищевых продуктов. - (сac/гср 1-1969, - rev. 4. - 2003). - 7. 3-е издание. - Изд-во «Весь мир». - с.- 78.
7. Методы экспериментальной микологии (Справочник) под редакцией Билай В.И.// - Киев. - Наукова Думка. - 1982. – 552 страниц.
8. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология// М. МГУ. – 1988. - с. 218-220.
9. МУК 4.1.2204-07. // - Обнаружение, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высакоеффективной жидкостной хроматографии. - Ред. Н. Е. Аكوпова, Н.В. Кожока. Роспотребнадзор. - 2007. – с. 4 – 12.
10. Осипян Л.Л.// Микобиота Армении. - Том 8. - Ереванский Государственный Университет. - Ереван. – 2013. – с. 216.
11. Осипян Л.Л., Батикян А.Г. Оганесян Г.А.. Флора мицелиальных грибов сырья, предназначенного для изготовления виноградного сока в условиях Республики Армении // Уч. зап. ЕГУ. - № 3. - 1981.– с. 114 - 119.
12. Пидопличко Н.М., Милько А.А. Атлас Мукоральных Грибов.//- Киев.-Наукова думка.- 1971. –187 страниц.

13. Пидопличко Н.М.. Пенициллиум. Ключ для определения видов // - Киев. Наукова думка. - 1972. – 151 страниц.
14. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. Под ред.-Скурихина И.М, Тутельяна В.А.//- Москва.- «Брандес» Медицина.- 1998. – с.207-233.
15. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. // - СанПиН 2.3.2.1078-01. - Продовольственное сырье и пищевые продукты. - Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. - 14.11.2001. – 180 страниц.
16. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М., Определитель Патогенных и Условно Патогенных Грибов // - Москва «Мир». - 2001. - 486 страниц.
17. Статистический ежегодник Армении. // - www.armstate.am
18. Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G., Accensi F., Cabañes F.J. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus* //- Journal of Food Protection.- 60. - 1997. p.1580- 1582.
19. Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market // - J Food Prot. - 66(3) - 2003. – p. 504-506.
20. Abarca M.L., Accensi F., CANO J., Cabañes F.J.. Taxonomy and significance of black aspergilli // - Antonie van Leeuwenhoek. - 86. – 2004. – p. 33-49.
21. Abrunhosa L., Paterson R.R.M., Kozakiewicz Z., Lima N., Venâncio A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes// - Lett Appl Microbiol.-32.-2001– p. 240–242.
22. Accensi F, Abarca ML, Cano J, Figuera L, Cabañes FJ.. Distribution of ochratoxin A-producing strains in the *A. niger* aggregate //- Antonie van Leeuwenhoek. - 79. - 2001. – p. 365-370.
23. Adams M.R., Moss M.O.. *Food Microbiology* //- Royal Society of Chemistry. - Cambridge, U.K. – 1999. – 478 pages.
24. Aksoy U, Eltem R, Meyvacı KB, Altindisli A, Karabat S. Five-year survey of ochratoxin A in processed sultanas from Turkey. // - Food Addit Contam. – 3. – 2007. – p. 292-296.

25. Alghalibi S.M.S., Shater A.R.M.. Mycoflora and mycotoxins contamination of some dried fruits in Yemen Republic. // - Assiut University Bulletin of Environmental Research. - Vol. 7. - No. 2. - 2004. – p. 26-30.
26. Almeida P.A., Alaburda J., Ruvieri V., Sabino M.. Ochratoxin A in rasins samples marketed in San Paulo, Brazil // - Revista do Instituto. - V.3 - 2006. – p. 300 – 303.
27. Anwar K., Kumari K., Jaiswal S., Keshari S., Menta A.. Isolation of toxigenic mycoflora from potential edible sources and study of the susceptibility to produce aflatoxin // - international Journal of Pharma and Bio Sciences. - 4(1). - 2013 - p. 86 – 94.
28. Arthey D., Ashurst P.R. Production of ochratoxin A in a semisynthetic medium// - Egyptian Journal of Microbiology. - 28. - 2001. – p. 271-279.
29. Atalla M.M., El-Din, K.N. Production of ochratoxin A in a semisynthetic medium. // - Egyptian Journal of Microbiology. – 28. - 1993. – p. 271-279.
30. Aydogdu H., Gucer Y.. Microfungi and mycotoxins of grapes and grape products// - Trakia Journal of Sciences. - Vol. 7. - Suppl. 2. - 2009. - p. 211-214.
31. Barkai-Golan R., Paster N.. Mycotoxins in Fruits and Vegetables// - Copyright Elsevier. ISBN: - 978-0-12-374126-4. - 2008. - p. 28 – 30.
32. Battilani P., Pietri A., Bertuzzi T., Languasco L., Giorni P., Kozakiewicz Z.. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy // - Journal of Food Protection. - 66. - 2003. –p. 633-636.
33. Battilani P., Giorni P., Bertuzzi T., Formenti S., Pietri A. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy // - Int J Food Microbiol. - 111. – 2006. – p. S53–S60.
34. Bau M., Bragulat M.R., Abarca M.L., Minguez S., Cabanes F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes // - Int J Food Microbiol. - 98. – 2005. – p.125–130.
35. Bayman P., Baker J.L., Doster M.A., Michailiades T.J., Mahoney N.E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus* // - Applied and Environmental Microbiology. - 68. – Issue 5. - 2002. – p. 2326-2329.
36. Belli N., Mitchell D., Marin S., Alegre I., Ramos A.J., Magan N., Sanchis V.. Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions // - Eur. J. Plant Pathol. - 113. – 2005. – p. 233-239.

37. Belli N., Ramos A.J., Coronas I., Sanchis V., Marin S.. Aspergillus carbonarius growth and ochratoxin A production in synthetic grape medium in relation to environmental conditions// - Journal of Applied Microbiology. - 98. - 2005b. – p.839 – 844.
38. Belli' N., Mari'n S., Sanchis V., Ramos A.J. Impact of fungicides on Aspergillus carbonarius growth and ochratoxin A production on synthetic grapelike medium and on grapes //- Food Addit. Contam. - 23. - 2006. – p. 1021–9.
39. Belli N., Marin S., Coronas I., Ramos A.J. Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for A. carbonarius infection and ochratoxin A production in grapes// - Food Controle. - 18. - 2007. - p. 1343 – 1349.
40. Bhat N.R., Desai B.B., Suleiman M.K.. Grapes and Raisins//- Handbook of Fruits and Fruit Processing, ed. by Y. H. Hui. - Blackwell Publishing. - Iowa, USA. – 2006. – p. 439-452.
41. Biji J., Dive D., Van Pelegheim C. Comparison of some bioassay methods for mycotoxin studies// - Environ Pollut A Ecol Biol. – 26. – 1981. – p. 173-182.
42. Bouras N., Kim Y.M., Strelkov S.E.. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat // - Int. J. Food Microbiol. - 131. – 2009. – p. 251-255.
43. Bragulat M.R., Abarca M.L., Caban~ es F.J.. Low occurrence of patulin- and citrinin-producing species isolated from grapes // - Lett Appl Microbiol. – 47. - 2008. – p. 286–289.
44. Bridge P.D., Hawksworth D.L., Kozakiewicz Z., Onions A.H.S., Paterson R.R.M., Sackin M.J., Sneath P.H.A. A reappraisal of terverticillate Penicillia using biochemical, physiological and morphological features. 1. Numerical taxonomy // - Journal of General Microbiology. – 135. - 1989. – p. 2941-2966.
45. Brown R.F.. The effect of some mycotoxins on the brine shrimp *Artemia salina*// - J.A.O.A.C. - 46. - 1969. – p.11.
46. Cabañes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella G., Minguez S., Pons A. What is the source of Ochratoxin A in wine?// - Int.J.Food Microbiol. – 79. – 2002. – p.213–215.
47. Cairns V, Hope R, Magan N. Environmental factors and competing microflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain //- Aspects Appl Biol. – 68. - 2003. – p. 81–90.

48. Cairns-Fuller V., Aldred D., Magan N. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain // - Journal of Applied Microbiology. - 99. - 2005. - p. 1215 – 1221.
49. Chelkowski J., Samson R.A., Wiewiorowska M., Golinski P. Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex Grey (= *Eurotium herbariorum* Wiggers Link ex Grey) from cereal grains //- Nahrung. – 31. – 1987. – p. 267- 270.
50. Chervin C., Aked J., Crisosto C.H. Grapes: Post – harvest technology for dried grapes //- Crop Post-Harvest: Science and Technology. - First Edition. - 2012. - p. 195-197.
51. Chulze SN, Magnoli CE, Dalcero AM. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America // - Int J Food Microbiol. – Sep 1. – 111. - Suppl 1. - 2006. – p. S5-9.
52. Ciegler A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group// - Canadian Journal of Microbiology. – 18. - 1972. – p. 631-636.
53. Ciegler A., Fennell D.J., Mintzlaff H.J., Leistner L. Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species //- Naturwissenschaften. – 59. - 1972. – p. 365-366.
54. Codex Alimentarius Committees. CAC/RCP 3-1969. Code of Hygienic Practice for Dried Fruits. - p.1 – 8.
55. Codex Alimentarius Committee. CAC/RS 67-1974. Adopted 1981. Codex Standard for Raisin. Codex Stan. 67-1981. - p. 1-5.
56. Codex Alimentarius Committee (2007). Code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin A contamination in wine. - CAC/RCP-63-2007. - Food and Agriculture Organization. – Rome. - Italy. – 6 pages.
57. Codex Alimentarius Committee. // - Report of the Sixth Session of the Codex Committee on Contaminants in Foods. – Netherlands. - 26 – 30 March. - 2012. – 94 pages.
58. Controle de la qualite des produits alimentaires controle microbiologique. 1993. NF ISO 7954-88. //-Direktives generales pour le denombrement des levures et moisissures. – 9 pages.
59. Controle de la qualite des produits alimentaires controle microbiologique. 1993. NF ISO 7698-91. //-Direktives generales pour le denombrement des levures et moisissures. – 9 pages.

60. Covarelli L., Beccari G., Marini A., Tosi L. A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, nonfortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area// -Food Control.–26.-2012.– p.347-356.
61. Da Rocha Rosa C.A., Palacios V., Combina M., Fraga M.E., De Oliveira Rekson A., Magnoli C.E., Dalcero A.M. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil // - Food Addit. Contam. – 19. – 2002. – p. 408–414.
62. Dalcero A., Magnoli C., Hallak C., Chiacchiera S.M., Palacio G., Rosa C.A.R. Detection and ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina// - Food Additives and Contaminants.–19. - 2002.– p. 1065-1072.
63. Dantigny P., Guilmar A., Bensoussan M. Basis of predictive mycology //- International Journal of Food Microbiology. – 100. - 2005a. – p. 187-196.
64. De Vries R.P., Frisvad J.C., van der Vondervoort P.J.I., Burgers K., Kuijpers A.F.A., Samson R.A. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli* // - Letters in Applied Microbiology. – 38. - 2004. – p. 440-445.
65. Debney H.G., Blacker K.J., Redding B.J., and Watkins J.B.. Handling and storage practices for fresh fruits and vegetables // - Product Manual. - Aust. - United Fresh Fruit & Veg. - Assn.- Brisbane. - Australia. - 1980. – 157 pages.
66. Delage N., d'Harlingue A., Colonna B., Ceccaldi B.C., Bompeix G. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wines // - Food Control. – 14. – 2003. – p. 225–227.
67. Domingo C., Giralt Li. . Guide lines in vitivinicultural practices in order to minimise levels of Ochratoxin A in vine-based products // - Generalitat de Catalunya Institut Català de la Vinya i el Vi. - No.1. - 2006. – 27 pages.
68. Doster M.A., Michailides T.J., Morgan D.P. *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from California orchards // - Plant Disease. – 80. - 1996. – p. 484-489.
69. E.C. (2006a). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs // - Official Journal of the European Union. - L365. - 20.12.2006. - p. 6-24.

70. EC. 2006b. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs // - Official Journal of the European Union. - L70. - 9.3. 2006. - p.12–34.
71. El-Banna A., Pitt J.I., Leistner L. Production of mycotoxins by *Penicillium* species // - Systematic and Applied Microbiology. – 10. - 1987. – p. 42-46.
72. El-Kady I.A., Abdel-Hafez J.N., El-Maraghy S.S. Contribution to the fungal flora of cereal grains in Egypt // - In Journal Mycopathologia. - no.77. - 1982. - p. 103-109.
73. El-Kady I., El-Maraghy S., Zohri A.N. Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products // - Microbiological Research. – 149. - 1994. – p. 297 – 301.
74. EL Khoury A., Rizk T., Lteif R., Azouri H., Delia M.L., Lebrihi A. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and OTA content in musts and finished wines during year 2004 // - J. Agri. Food Chem. – 54. – 2006. – p. 8977–8982.
75. El Khoury A, Rizk T, Lteif R, Azouri H, Delia ML, Lebrihi A. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts // - Food Chem Toxicol. – Jun. – 46. – 6. – 2008. – p. 2244-50.
76. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabanes F.J. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli // - Research on Microbiology. - 155. - 2004. -p. 861 – 866.
77. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabanes F.J. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate specie // - International Journal of Food Microbiology. - 108. - 2006a. - p.188 – 195.
78. Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabanes F.J. Study of the effect of the water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* // - Food Microbiology. - 32. - 2006b. - p. 634 – 640.
79. FAO/WHO (Food and Agricultural Organization/ World Health Organization). - Food safety risk analyzes. A guide of food safety national authorities. - Food and Nutrition Paper. - N° 87. - Rome. 2006. – 119 pages.

80. Faucet V., Pfohl-Leszkowicz A., Dai J., Castegnaro M., Manderville R.A. Evidence for covalent DNA adduction by Ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig // -Chem. Res. Toxicol. 17.– 2004. – p. 1289–1296.
81. Faucet-Marquis V., Pont F., Størmer F.C., Rizk T., Castegnaro M., Pfohl Leszkowicz A. Evidence of a new dechlorinated ochratoxin A derivative formed in opossum kidney cell cultures after pretreatment by modulators of glutathione pathways: Correlation with DNA-adduct formation // - Mol. Nurt. Food Res. -50. – 2006. – p. 530–542.
82. Felšöciová S., Rybárik Ľ., Tančinová D., Mašková Z.. Occurrence of *Penicillium* species from Nitra wine region // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. – 2. - Special issue 1. – 2013. – p. 1333-1345.
83. Femenia A., Sanchez E.S., Simal S., Rossello C. Effects of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues // - Journal of Agricultural & Food Chemistry. – 46. - 1998. – p. 271–276.
84. Food Safety and Inspection Service/U.S. Department of Agriculture (FSIS/USDA). - 1999. Guidebook for the Preparation of HACCP Plans. <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/nis/outreach/models/HACCP-1.pdf>
85. Foreign Ag Service (FAS). – USDA. - 2011. - Raisins: World Markets and Trade,
86. Fredj M.B., Chebil S., Lebrihi A., Lasram S., Ghorbel A., Mliki A. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards// -Int J Food Microbiol.–113.- 2007.–p. 245–250.
87. Fregoni M.. Viticoltura di qualità// - Edizioni l'Informatore Agrario. - 1998. – 960 pages.
88. Frisvad J.C., Samson R.A.. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins.// - Studies in Mycology. – no. 49. - 2004. - p. 1-173,
89. Garcia D., Ramos A.J., Sanchis V., Marin S. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study with *Aspergillus carbonarius* isolates// - Int. J. Food Microbiol. – 144. – 2011. – p. 432-439.

90. Gashgari R.M., Shebany Y.M., Gherbawy Y.A. Molecular Characterization of Ochratoxigenic Fungi Associated with Raisin // - Foodborne Pathogens and Disease. – 8. – 11. – November. – 2011. – p. 1221-1227.
91. Gessler C., Storari M., Pertot I. Effect of climate change on mycotoxins contamination in grape must // - IOP Conf. Series:- Earth and Environmental Science.– 6. - 2009. – p. 37.10.
92. Giridhar P., Reddy S.M. Incidence of mycotoxigenic fungi on raisins// - Current Advances in Plant Science. – 14. – 2001. - p. 291-294.
93. Global Ag Trade System. - FAS online. - USDA.
<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>
94. Gowda I.N.D. Evaluation of certain pre-treatments for raisin making // - Journal of Food Science & Technology. – Mysore. – 37. – 2001. – p.21–125.
95. Grigoryan K., Hakobyan L., Sargsyan M.. Risk Assessment of Contamination of Grape Products by Ochratoxin A Producing Fungi in Armenia // - Journal of Hygienic Engineering and Design. - EHEDG World Congress on Hygienic Engineering and Design 2011. - Ohrid. - Republic of Macedonia. - 2011. - p. 97-100.
96. Hakobyan L., Grigoryan K., Kirakosyan A.. Contamination of Raisin by Filamentous Fungi – Potential Producers of Ochratoxin A // - Potravinarstvo. - ISSN: 1337-0960. - 2010. - Vol 4. - No 4. - p. 28-33.
97. Harrch B., Nummi M, Niku-Paavol M., Mirocha C.J., Palyusik M. Identification of water-soluble toxins produced by *Stachibotris atra* strain from Finland // - Appl. Environ. Microbiol. - 44. – 1982. – p. 494 - 495.
98. Harwing J, Scott P.M. Brine Shrimp (*Arytemia salina*) Larvae as a Screening System for Fungal Toxins // - Applied Microbiology. - 21(6). - 1971. – p. 1011- 1016.
99. Heenan C.N., Shaw K.J., Pitt J.I. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar// - Journal of Food Mycology. – 1. - 1998. – p. 67-72.
100. Hocking A.D. Xerophilic fungi in intermediate and low moisture foods. (Eds.) in Arora D.K., Mkerji K.G., Marth E.H.. // - Handbook of applied mycology, foods and feed. - New York: Marcel Dekker Inc. – 3. – 1992. - p. 69-97.

101. Hocking A.D., Leong S.L., Kazi B.A., Emmett R.W., Scott E.S. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. // - International Journal of Food Microbiology. – 119. - 2007. – pp. 84–88.
102. Horie Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section Nigri.// - Nippon Kingakkai Kaiho. – 36. - 1995. – p.73-76.
103. Hussein A.M., Sommer N.F., Fortlage R.J. Suppression of *Aspergillus flavus* in Raisins by Solar Heating During Sun Drying.// - Postharvest Pathology and Mycotoxins. - vol. 76. - No. 3. - 1986. – p. 335 – 338.
104. Iamanaka B.T., Menezes H.C., Vicente E., Leite R.S.F., Taniwaki M.H. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil // - Food Control. - Volume 18. - Issue 5. - May 2007. – p. 454-457.
105. IARC. (International Agency for Research on Cancer). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins // -In Monograph on evaluation of carcinogenic risks to humans. – IARC. – Lyon. – France. - 1993. - p. 489–521.
106. Infoagro Systems 2007. // - AgroValdemecum. Infoagro Systems S.L. Available online: <http://www.infoagro.com/agrovaldemecum/fitoplage.asp>.
107. International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus*. // A Commission of the International Union of Microbiological Societies. - *Penicillium* and *Talaromyces* names. - 2012. <http://www.aspergilluspenicillium.org/>
108. INDFC. International Nut and Dried Fruit Council. // - International Nut&DriedFruit. http://www.nutfruit.org/en/currants-their-high-nutritional-value_90529
109. FAO/WHO. Ochratoxin A. In Safety evaluation of certain mycotoxins in food. // Prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). - WHO Food Additives Series 47. - World Health Organisation. – Geneva. – Switzerland. – 2001. - p. 281–387.
110. Joosten H.M.L.J., Goetz J., Pittet A., Schellenberg M., Bucheli P. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. // - International Journal of Food Microbiology. – 65. - 2001. – p. 39-44.

111. Kapetanakou A.E., Panagou E.Z., Gialitaki M., Drosinos E.H., Skandamis P.N. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins.// - Food Control. - Volume 20. - Issue 8. - August 2009. – p. 725-732
112. Kassem A.W.S., Al-Sulaiman M.A., Aboukarima A.E.M., Kassem S.S. Predicting Drying Efficiency during Solar Drying Process of Grapes Clusters in a Box Dryer using Artificial Neural Network// - Australian Journal of Basic & Applied Sciences. – 5.– 6. - 2011. - p. 230 - 241.
113. Khalesi M., Khati N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. // - Environ. Toxicol. Phar. – 32. – 2011. – p. 113-121.
114. Khare KB, Khooanyana TM, Loeto D. Mycological analysis of raisins retailing in supermarkets of Botswana // - International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences. - Vol. 3. – 1. - January-April. - 2013. - p. 26-31.
115. King A.D., Pitt J.I., Beuchat L.R., Corry J.E.L. Methods for the mycological examination of food.// - Plenum Press. - New York. - USA. - 1986. – 328 pages.
116. Kozakiewicz Z., Peterson R.R.M., Bridge P.D. Novel approaches to the identification of mycotoxin producing *Penicillium* species. // - In Scudamore (Ed.). Occurrence and significance of mycotoxins. – London. - Central Science Laboratory. - 1993. - p. 64-75.
117. Krivobok S., Seigle-Murandi F., Steiman R., Creppy E.E. Fungal flora and ochratoxin A production in various food and feed in France.// - Systematic and Applied Microbiology. – 18. - 1995. – p. 455-459.
118. Krogh P, Causal associations of mycotoxic nephropathy. // - Acta Pathol Microbiol Scand. – Sect. A. - Suppl.269. – 1978. – pp. 1-28.
119. Larsen T.O., Svendsen A., Smedsgaard J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium* // - Applied and Environmental Microbiology. – 67. 2001. – p. 3630-3635.
120. Leon M.A., Kumar S., Bhattacharya S.C. A comprehensive procedure for performance evaluation of solar food dryers // - Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 6. - 2002. – p. 367-393.

121. Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.A. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes // - Australian Journal of Grape and Wine Research. - 10. - 2004. - p. 83 – 88.
122. Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.I., Kazi B.A., Emmett R.W., Scott E.S. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. // - Int J Food Microbiol 111. - Suppl 1. – 2006. – p. S10–S17.
123. Leong S.L., Hocking A.D., Scott E.S. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium.// - Int. J. Food Microbiol. – 110. – 2006. – p. 209-216.
124. Lombaert G.A., Pellaers P., Neumann G., Kitchen D., Huzel V., Trelka R., Kotello S. and Scott P.M.. Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail Market. // - Food Additives and Contaminants. - Vol. 21. - No. 6. – 2004. - p. 578–585.
125. Lund F. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. // - Letters in Applied Microbiology. – 20. – 1995. – p. 228–231.
126. Macdonald S.J., Anderson S., and Brereton P.. Determination of Ochratoxin A in Currants, Raisins, Sultanas, Mixed Dried Fruit, and Dried Figs by Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography: Interlaboratory Study. // - Journal of AOAC International. - VOL. 86. - NO. 6. - 2003. – p. 1164 – 1171.
127. Madhyasta S.M., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Platford G., Abramson D. Effect of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. // - Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 38. - 1990. – p. 1506-1510.
128. Magan N., Aldred D. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. // - Food Additives and Contaminants. vol. 22. - Issue 1. - 2005. - p. 10 – 16.
129. Magnoli C, Violante M, Combina M, Palacio G., Dalcero A . Mycoflora and ochratoxin-producing strains of black aspergilli in wine grapes in Argentina. // - Letters in Applied Microbiology. – 37. – 2003. – p. 179-184.

130. Magnoli C., Astoreca A., Ponsone L., Combina M., Palacio G., Rosa C.A.R., Dalcero A.M.. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets.// - Letters in Applied Microbiology.-Volume 39.- Number 4. - October 2004. - p. 326-331.
131. Mannsville. Chemical Products Corp. Chemical/ Products Synopsis: Sulfur Dioxide. – Cortland. - NY. – 1985. – p. 199 – 213.
132. Mantle P.G. Risk assessment and the importance of ochratoxins.// - International Biodeterioration and Biodegradation. – 50. - 2002. – p. 143 - 146.
133. Medina A., Mateo R., López-Ocaña L., Valle-Algarra F.M., Jiménez M. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*.// - Applied and Environmental Microbiology. – 71. - 2005. – p. 4696 - 4702.
134. Mencarelli F., Bellincontro A. GRAPE: Post-harvest Operations. // FAO UN. - Post-harvest Compendium. - Italy. - 2005. – 43 pages.
135. Mencarelli F., Salcini M.C., Bellincontro, A. Consumer risk in storage and shipping of raw fruit and vegetables. // - In Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables (W. Jongen, ed.). - Boca Raton. - FL: CRC Press. – 2005. - p. 556–98.
136. Meyvaci KB, Altindisli A, Aksoy U, Eltem R, Turgut H, Arasiler Z, Kartal N.. Ochratoxin A in sultanas from Turkey I: Survey of unprocessed sultanas from vineyards and packing-houses. // - Food Addit Contam. - 11– 2005. – p.1138-43.
137. Mitchell D., Parra R., Aldred D., Magan N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. // - Journal of Applied Microbiology. – 97. - 2004. - p. 439 – 445.
138. Mohamed S.S., Maraghy EL., Maghraby O.M.EL., Mycoflora and mycotoxins of sunflower (*HELANTHUS ANNUUS* L.) seeds in Egypt, sugar fungi and natural occurrence of mycotoxins // - Qatar Univ.Sci.Bull. – 6. – 1986. – p. 107-121.
139. Möller TE, Nyberg M.. 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 Addit Contam. Nov;20. -11. - 2003. – p. 1072-1076.

140. Moss M.O. Mode of formation of ochratoxin A. // - Food Additives and Contaminants. – 13. - 1996. – p. 5 - 9.
141. Mühlencoert E., Mayer I., Zapf M.W., Vogel R.F., Niessen L. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*// -European Journal of Plant Pathology.–110.-2004 –p.651-659.
142. Nakajima M, Tsubouchi H, Miyabe M., Ueno Y. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography.// - Food Agric Immunol. – 9. 1997. – p. 77 - 83.
143. Necla Ç. Ochratoxin A , hidroksimetilfurfurol and vitamin C levels of sun-dried grapes and sultanas.// - Journal of Food Processing and Preservation.- 30(5).–2006. –p. 549-562
144. Nielsen K.F. Mycotoxin production by indoor molds. // - Fungal Genet. Biol. – 39. – 2003. – p. 103-117.
145. Nguyen M.T., Tozlovanu M., Tran T.L., Pfohl-Leszkowicz A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. // - Food Chem. – 105. - 2007. – p. 42–47.
146. Noonim P., Mahakarnchanakul W., Varga J., Frisvad J.C. Samson R.A. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. // - Int. J. S. Evol. Microbiol. – 58. - 2008. – p. 1727-1734.
147. Northolt M.D., van Egmond H.P., Paulsch W.E.. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. // - Journal of Food Protection 42. - 1979. - p. 485 – 490.
148. Novello V. An overview of table grape production in Italy.// - Proceedings of the 5th Australian Table Grape Technical Conference. - Murray Valley Table Grape Growers Council. - 1999. – 34 pages.
149. O'Brien E., Heussner A.H., Dietrich D.R. Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. // - Toxicol Sci. – 63. – 2001. – p. 256–264.
150. O'Brien E., Dietrich D.R. Ochratoxin A: the continuing enigma. // - Critical Reviews in Toxicology . – 35. - 2005. – p. 33-60.

151. OIV Guide for Implementation of the HACCP System (Hazard Analysis and Critical Control Points) to Viticulture. // Resolution OIV-VITI 469-2012. - Certified in conformity Izmir. - 22nd June. - 2012. – 10 pages.
152. Ono H., Kataoka A., Koakutsu M., Tanaka K., Kawasugi S., Wakazawa M., Ueno Y., Manabe M. Ochratoxin A producibility by strains of *Aspergillus niger* group stored in IFO culture collection. // - Mycotoxins. - 41. - 1995. – p. 47-51.
153. Ospital M., Cazabeil J.M., Betbede A.M., Tricard C., Creppy E., Medina B. L'Ochratoxine A dans les vins. // - OEnologie. – 169. – 1998. – p. 16–19.
154. Otteneder H., Majerus P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: Influence of the type of wine and its geographical origin.// - Food Addit. Contam.– 17. – 2007. – p.93–798.
155. Palacios-Cabrera H., Taniwaki M.H., Hashimoto J.M., de Menezes H., Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. // - Brazilian Journal of Microbiology. - vol.36. - no.1. - 2005. – p. 24 – 28.
156. Palumbo J.D., O'Keeffe T.L., Vasquez S.J. and Mahoney N.E. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins. // - Letters in Applied Microbiology. – 52. – 2011. - p. 330–336.
157. Pangavhane D.R. Comparative Drying Performance Study of Natural Convection Solar Dryer with Traditional Grape Drying Methods. // - International Energy Journal. - Vol.3. - No. 1. - June. - India.- 2002. – p. 54 – 60.
158. Pangavhane D.R., Sawhney R.L., Sarsavadia P.N. Review of research and development work on solar dryer for grape drying.// - Energy Conversion and Management. – 43. -1. - 2002. – p. 45-61.
159. Pardo E., Marín S., Ramos A.J., Sanchis V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins.// - Food Science and Technology International. – 10. - 2004. – p. 45-49.
160. Pardo E., Lagunas U., Sanchis V., Ramos A.J., Marin S. Influence of water activity and temperature on conidial germination and micelial growth of ochratoxigenic isolates of

- Aspergillus ochraceus* on grape juice synthetic medium. Predictiv models. // - Journal of the Science of Food and Agriculture. - 85. - 2005. - p. 1681 – 1686.
161. Pardo E., Lagunas U., Sanchis V., Ramos A.J., Marín S. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes// - Food Microbiology.–22. - 2005a.– p. 383-389.
 162. Parra R., Magan N. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage molds.// - Journal of Applied Microbiology. - 97. - 2004. - p. 429 – 438.
 163. Pateraki M., Dekanea A., Mitchell D., Lydakis D., Magan N. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on in vitro germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes.// - Postharvest Biology and Technology. - 44. – 2007. - p.141–149.
 164. Patil K.V., Chakrawar V.R., Narwadkar P.R., Shinde G.S. Grape. // - In: Handbook of Fruit Science & Technology: Production, Composition, Storage & Processing (eds. D.K. Salunkhe & S.S. Kadam). - New York. – 1995. - p. 7–38.
 165. Peterson S.W. Phylogenetic relationship in *Aspergillus* based upon rDNA sequence analysis.// - In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. - (eds.) Samson R.A., Pitt J.I.// - Harwood Academic Publishers. – Amsterdam. - The Netherlands. - 2000. – p. 323 - 355.
 166. Pitt J.I., The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, Academic press, 1979. – 629 pages.
 167. Pitt, J.I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A.// - Applied and Environmental Microbiology. – 53. – 1987. – p. 266-269.
 168. Pitt JI., Hocking A.D. // - Fungi and Food Spoilage. - 2nd Edition. - Blackie Academic and Professional. - London. – 1997. – 593 pages.
 169. Pitt J.I., Hocking A.D. // - Fungi and Food Spoilage. - 3rd ed. – Springer. - New York. – 2009. – p. 413-414.

170. Ponting J.D., McBean D.M. Temperature and dipping treatment effect on drying rates and drying times of grapes, prunes and other waxy fruits. // - Food Technology. - vol.24. – 1970. - p.1403-1406.
171. Pose G., Patriarca A., Kyanko V., Pardo A., Pinto V.F. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. // - Int. J. Food Microbiol. – 142. -2010. – p. 348-353.
172. Quantitative detection of Ochratoxin A.- Glasgow, 2003. – p. 11 – 15.
173. Ramos A.J., Labernia N., Marin S., Sanchis V., Magan N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by tree strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains.// - International Journal of Food Microbiology. - 44. - 1998. - p. 133 – 140.
174. Raper K.B. and Fennell D.I. The genus *Aspergillus*. // - Robert E. Krieger Publishing. - Co. Inc. - Florida. - USA. – 1977. – 686 pages.
175. Rathien H., Robinson S.P. Characterisation of a variegated grapevine mutant showing reduced polyphenol oxidase activity. // - Australian Journal of Plant Physiology. – 19. – 1992. – p. 43–54.
176. Reiss J., Biotoxic activity in the Mucorales // - Mycopatologia. –14.–1993. – p. 123-127.
177. Rojchev V., Botiyanski P. Effect of preliminary treatment on grape drying & raisin quality of seedless & seeded grapevine varieties. // - Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 4. – 1998. – p. 313–321.
178. Romero S.M., Comerio R.M., Larumbe G., Ritieni A., Vaamonde G., Fernández V.P. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. // - International Journal of Food Microbiology. - Volume 104. - Issue 1. - 25 September. – 2005. – p. 43-49.
179. Romero S.M., Pinto V.F., Patriarca A., Vaamonde G. Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature. // - Int. J. Food Microbiol. – 140. – 2010. – p. 277-281.
180. Ryall A.L., Pentzer W.T. Handling, transportation and storage of fruits and vegetables. // - Fruits and Tree Nuts. - Vol. 2. - AVI Publ. Co.- Westport. – CT. - 1982. – p. 610.

181. Saeed M.S., Alghalibi M.S., Abdul-Rahman M.S. Mycoflora and mycotoxin contamination of some dried fruits in Yemen Republic.// - In Univ. Bull. Environ. Res.. - vol. 7. - no. 2. - 2004. - p. 235-243.
182. Sage L., Krivobok S., Delbos E., Seigle-Murandi F., Creppy E.E. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. // - J Agric Food Chem. – 50. – 2002. – p.1306 –1311.
183. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J., Filtenborg O. In Introduction to Food-borne fungi//4thed. Cenraalbureau Voor Schimmelcultures.–Baarn.-NetherLands.–1995.-p.450.
184. Samson R.A., Pitt J.I. Integration of Modern Taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification// -Harwood Academic Publishers.- Singapore. - 2000. - p. 9 – 51.
185. Samson R.A., Houbroken J.A., Kuijpers F.A., Frank J.M., Frisvad J.C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. // - In Studies in Mycology. - vol. 50. - 2004. - p. 45–61.
186. Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbroken J., Frisvad J.C., Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. // - In Mycology. - vol. 59. - no. 13. - 2007. - p.129-145.
187. Sander U.H.F., Rothe U., Kola R. Sulphur dioxide. // - In: Sander V.H.F., Fischer H., Rothe U., Kola R, eds. - Su/phur, Sulphur Dioxie and Su/phuric AdJ. - An Introduction to Their Industri Chemistry and Technology. – London. - The British Sulphur Corporation. – 1984. - p. 151-254.
188. Sansing G.A., Davis N.D., Diener U.L. Effect of time and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus*. // - Canadian Journal of Microbiology. - 19. - 1973. - p. 1259 – 1263.
189. Saravacos G.D., Marousis S.N., Raouzeos G.S. Effect of ethyl oleate on the rate of air-drying of foods. // - Journal of Food Engineering. – 7. – 1988. – p. 263–270.
190. Sawhney R.L., Pangavhane D.R., Sarsavadia P.N. Drying Studies of Single Layer Thompson Seedless Grapes. // - International Solar Food Processing Conference. - 2009. – 26 pages.
191. Scott P.M., Harwing J., Blanchfield B.J. Screening Fusarium strains isolated from over wintered Canadian grains for trichothecene// - Mycopathologia. – 7. – 1980. – p.66-85.

192. Scott, P.M. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. // - *Food Additives and Contaminants*. - V. 13. - 1996. – p. 19-21.
193. Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z., Venâncio A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. // - *Int J Food Microbiol*. – 88. - 2003. – p. 63–68.
194. Serra R., Braga A., Venâncio A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. // - *Research Microbiol*. – 156. - 2005. – p. 515–521.
195. Settupane G.A. Adverse reactions to sulfites in drugs and foods.// - 1. *Am. Acad. Dermato*. – 10. – 1984. – p. 1077-1081.
196. Shamsuddin Z.A., Khan M.A., Ahmed A. Natural occurrence of ochratoxin 'A' in raisins in Pakistan.// - *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. - 2006. - vol. 49. - n^o1. - p. 43-47.
197. Shanmugavelue K.G. Postharvest handling and marketing of grapes. // - *Viticulture India*. – 1989. - p. 390.
198. Shephard G.S., Fabiani A., Stockenstrom S., Mshicileli N., Sewram V. Quantitation of ochratoxin A in South African wines.// - *J. Agric. Food. Chem.*–51.– 2003. – p. 1102–1106.
199. Smith J.E., Henderson R.S. // - *Mycotoxins and Animal Foods*. - ISBN0-8493-4904-4. - 1991. - 868 pages.
200. Spadaro D., Atharajan S., Lore A., Gullino M.L., Garibaldi A. Effect of pH, water activity and temperature on the growth and accumulation of ochratoxin A produced by three strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Italian vineyards. // - *Phytopathol. Mediterr*. – 49. - 2010. - p.65–73.
201. Stefanaki I, Foufa E, Tsatsou-Dritsa A, Dais P. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. // - *Food Addit Contam*. – 20. – 1. – 2003.– p. 74-83.
202. Stevenson D.D., Simon R.A. Sulfites and asthma. // - 1. *Allergy clin. Immunol.*- 74. – 1984. – p. 469-472.

203. Suarez-Quiroz M.L., Gonzales-Rios O., Barel M., Schorr-Galindo S., Guiraud J.P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. // - Food Microbiology. - 21. - 2004. - p. 629 – 634.
204. Téren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E., Kevei F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. // - Mycopathologia. – 134. – 1996. – p.171-176.
205. Tjamos S.E., Antoniou P.P., Kazantzidou A., Antonopoulos D.F., Papageorgiou I., Tjamos E.C.. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control// - Journal of Phytopathology.-Volume 152.-Issue 4. - 2004.–p. 250–255.
206. Torelli E., Firrao G., Locci R., Gobbi E. Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of “passito” wines. // - International Journal of Food Microbiology. - Volume 106. - Issue 3. - 15 February. – 2006. – p. 307–312.
207. Tozlovanu M., Faucet-Marquis V., Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: Structure-activity relationships for covalent DNA adduction. // - Chem. Res. Toxicol. – 19. – 2006. – p. 1241–1247.
208. Turner W.B., Aldridge, D.C. Fungal metabolites II. // - Academic Press.– London. - UK. - 1983. – p. 82 – 109.
209. Ueno Y., Kawamura O., Sugiura Y., Horiguchi K., Nakajima M., Yamamoto K., Sato S. Use of monoclonal antibodies enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi.// - In: Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary *tract tumors*. - Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. and Bartsch H. (eds.). - IARC Scientific Publications. – Lyon. – France. - 1991. – p. 71-75.
210. Uhlig B.A., Clingeleffer P.R. The influence of grape (*Vitis vinifera* L.) berry maturity on dried fruit colour. // - Journal of Horticultural Science & Biotechnology. – 73. – 1998. – p. 329–339.
211. USDA FAS. - Raisins: World Markets and Trade. - 2011. – 5 pages.

212. U.S. Food and Drug Administration. (FDA) Office of Regulatory Affairs, Office of Regulatory Science.// - ORA Lab Manual. - Volume IV. - Section 7. - Mycotoxin Analysis. - 02.14.2013. - 8 pages.
213. Valero A., Mari'n S., Ramos A.J., Sanchis V., Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. // - Let App Microbiol. – 41. - 2005. – p. 196–201.
214. Valero A., Farre J.R., Sanchis V., Ramos A.J., Marin S. Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures.// -Food Microbiol. – 23. – 2006. – p. 753–756.
215. van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. // - Journal of the Chemical Society. – 5. - 1965. – p. 7083-7088.
216. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB., Theron JJ. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*.// -Wilh Nature.–205.-1965. – p. 1112-1113.
217. Varga J, Kevei F, Rinyu E, Téren J and Kozakiewicz Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. // - Appl Environ Microbiol. – 60. – 1996. – p. 4461-4464.
218. Varga J., Vida Z., Tóth B., Debets F., Horie Y. Phylogenetic analysis of newly described *Neosartorya* species. // - Antonie van Leeuwenhoek. – 77. - 2000. – p.235-239.
219. Varga J., Kevei F., Hamari Z., Toth B., Teren J., Croft J.H., Kozakiewicz Z. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli.// - In: Samson RA, Pitt JI, eds. - Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. – Amsterdam. - the Netherlands. - Harwood Academic Publishers. – 2000. - p. 397–411.
220. Varga J., Rigó K., Téren J., Mesterházy Á. Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins.// - Cereal Research Communications. – 29. - 2001. – p. 85-92.
221. Varga J., Kozakiewicz Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. Trends in Food Science and Technology. – 17. - 2006. – p. 72–81.
222. Varga J., Kocsube S., Koncz Z., Teren J. Mycobiota and ochratoxin a in raisins purchased in Hungary. // - Acta alimentaria. - vol. 35. - n°3. – 2006. - p. 289-294.
223. Veroniue L., David R., California raisins: Chemical: Physical and Functional characteristics. // - Food Science and Technology Today. – 7. - (4). – 1993. - p.217-224.

224. Visconti A., Pascale M., Centoze G. Determination of ocratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography.// - J. Chromatogr. - A . - 864. - 1999. - p. 89-101.
225. Visconti A., Perrone G., Cozzi G., Solfrizzo M. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain.// -Food Additives and Contaminants.-25.-2. - 2008. - p. 193-202.
226. Watson D.H. Toxic fungal metabolites in food// - CRC. Crit.Rev.Food Sci. and Nutr. -V.22. - N3. - 1985. -p. 1777-198.
227. Weidenborner M. // -Encyclopedia of food Mycotoxins. - Berlin. - 2001. - p. 213 - 227.
228. Weil E.D. Sulfur compounds. // - In: Mark H.E, Othmer D.E, Overberger C.G., Seaborg G:I, Grayson N. eds. - Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. - 3rd ed. - Vol. 22. - New York. - John Wiley & Spns. - 1983. - p. 107-167.
229. WHO (World Health Organization). - 2008. - World Health Statistics. - 112 pages.
230. Wickow D.T., Dowd P.F., Alfatafta A.A., Gloer J.B. Ochratoxin A: an antiinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. // - Canadian Journal of Microbiology. - 42. - 1996. - p. 1100-1103.
231. Williams R. L., Shepard S.A., Casey J.E. An Economic and Capital Budgeting Analysis of Alternative Raisin Production Systems. // - California Agricultural Technology Institute May. - 2002. - 74 pages.
232. Wood R., Foster L., Damant A., Key P.//- Analytical methods for food additives. - 2004. - 320 pages.
233. Youssef M.S., Abo-Dahab N.F., Abou-Seidah A.A. Mycobiota and mycotoxin contamination of dried raisins in Egypt. // - African Journal of Mycology and Biotechnology. - vol. . - 8. - no. 3. - 2000. - p. 69-86.
234. Zach Lea J.D. Indian Kishmish Khana Design. - USAID.- Kabul. - Afghanistan. - 2005. - 24 pages.
235. Zimmerli B., Dick R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. // - Food Addit. Contam. - 13. - 1996. - p. 655-668.
236. Zohri A.A., Abdel-Gawad K.M. Survey of mycoflora and mycotoxins of some dried fruits in Egypt. // - J. Basic Microbiology. - no. 4. - 1993. - p. 279-288.