

ՀՀ ԳԱԱ ԲՈՒՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԼՈՒՍԻՆԵ ԼԵՎՈՆԻ ՀԱԿՈՒՅԱՆ

Չորացրած խաղողի որոշ որակական ցուցանիշների և արտադրության տեխնոլոգիական չափորոշիչների ազդեցությունը աղտոտիչ միկրոմիցետների տեսակային կազմի և նրանց տոքսիկության վրա

Գ. 00.17 – “Մակաբանություն” մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության
ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

ИНСТИТУТ БОТАНИКИ НАН РА

ЛУСИНЭ ЛЕВОНОВНА АКОПЯН

Влияние некоторых показателей качества и технологических параметров производства сушеного винограда на видовой состав микромицетов-контаминантов и на их токсигенность

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.17 – “Микология”

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

կենսաբանական գիտությունների թեկնածու՝

Վ.Մ. Գրիգորյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կենսաբանական գիտությունների դոկտոր՝ պրոֆեսոր
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու՝ դոցենտ

Հ.Գ. Բատիկյան
Ա.Հ. Եսայան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Նայկենսատեխնոլոգիա՝ գիտաարտադրական կենտրոն
Պաշտպանությունը կայանալու է 2016 թ. փետրվարի 16-ին ժամը 14⁰⁰-ին

Բուսաբանության ինստիտուտում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի «Բուսաբանություն»
035 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0040, Երևան, Աճառյան 1, ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտ,
E-mail: botanyinst@sci.am

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Բուսաբանության ինստիտուտի
գրադարանում և www.botany.sci.am կայքում:

Սեղմագիրն առաքված է 2016 թ. հունվարի 15-ին:

035 մասնագիտական խորհրդի գիտքարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու

Ա.Գ. Ղուկասյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

К.М. Григорян

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

А.Г. Батикян

кандидат биологических наук, доцент

А.Г. Есаян

Ведущая организация: Научно-производственный центр «Армбиотехнология»

Защита диссертации состоится 16-го февраля 2016 г. в 14⁰⁰ часов на заседании

Специализированного совета 035 по ботанике ВАК РА, действующего при

Институте ботаники НАН РА

Адрес: 0040, Ереван, ул. Ачарян 1, Институт ботаники НАН РА

E-mail: botanyinst@sci.am

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института ботаники НАН РА

и на сайте www.botany.sci.am

Автореферат диссертации разослан 15-го января 2016 г.

Ученый секретарь специализированного совета 035,

кандидат биологических наук

А. Г. Гукасян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. 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). 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 НАССР (Hazard Analysis and Critical Control Points). Принципы НАССР 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. 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 плоды и овощи, 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 переработки. 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 указанном продукте основным продуцентом охратоксина А отмечается 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 тератогенные) 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 охратоксина А 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 (SO₂) на степень контаминации армянских и импортированных образцов сушеного винограда плеснеобразующими грибами и ОТА.
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 *Aspergillus 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 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 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 (a_w) 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.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из: введения, 6 глав, заключения, 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе приводится подробный литературный обзор исследований экономических данных по производству, импортированию и экспортированию сушеного винограда в мировом масштабе. Подробно изложены проблемы контаминации сырьевого винограда и разных сортов сушеного винограда охратоксигенными грибами и их микотоксинами. Приводятся подробное описание разных сортов сушеного винограда и основные требования, предъявляемые к качеству сушеного винограда. Описываются технологии сушки и их влияние на качество готового продукта, а также основные условия выращивания винограда для сушки. Приводится подробное описание физиоко-химических параметров, влияющих на рост грибов и синтез ОТА, структуры охратоксина А и его токсичности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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 (№ 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.

Количество микроскопических грибов в 1г продукта определяли согласно NF ISO 7954-93 и NF ISO 7698-91. Частота встречаемости микромицетов определяли отношением числа образцов, в

которых обнаружен данный вид, к общему числу исследованных (Мирчинк, 1988; El-Kady et al., 1982).

Идентификация изолированных культур микромицетов проводили на основе макро- и микроскопических признаков, по следующим определителям: Н.М. Пидопличко, А.А. Милько (1971), В.И. Билай, Э.З. Коваль (1988), Д. Саттон и др.(2001), К.В. Raper, D.I. Fennell (1977), J.I. Pitt (1979), J.C. Frisvad (1984), J.I. Pitt, Hocking (1997), R.A. Samson et al. (1995, 2004, 2007).

Как дополнительный метод для достоверного определения видов грибов из группы черных аспергиллов использован тест Эрлиха (Frisvad, Samson, 2004).

Значения активности воды (a_w) образцов сушеного винограда измеряли с помощью прибора AquaLab (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Определение pH проведено с помощью pH-метр (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).

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).

Определение наличия микотоксинов в экстрактах грибов и в образцах сушеного винограда проводили методом ТСХ (тонкослойная хроматография) (Руковод. по методам, 1998). 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.

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.1) и 6 родам – *Mucor*, *Syncephalastrum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*.

Табл. 1. 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
Итого: 2	2	4	6	32	913

Из общего числа изолированных видов мицелиальных грибов 15 (47%) относятся к роду *Aspergillus*. Среди видов указанного рода - *A. niger* (64.8%) и *A. carbonarius* (53%) являются доминирующими по частоте встречаемости. Виды *A. sclerotiiicarbonarius* (37%), *A. tubingensis* (37.5%), *A. foetidus* (35.4%) и *A. flavus* (29.8%) имели среднюю частоту встречаемости (рис. 1). Перечисленные виды, за исключением вида *A. flavus*, относятся к секции *Aspergillus Nigri*.

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. niger* и *A. carbonarius*

отличаются высокой частотой встречаемости, и впервые выявлены в Армении в сушеном винограде. Виды *A. sclerotioniger* и *A. lacticoffeatus* идентифицированы как новые относительно недавно (Samson et al., 2004). Их присутствие повышает вероятность контаминации сушеного винограда охратоксином А. Из секции *A. Nigri* выделены и идентифицированы еще два вида мицелиальных грибов: *A. sclerotii-carbonarius* и *A. uvarum*, которые описаны относительно недавно (Samson et al., 2004).

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, подтвердился также нашими экспериментальными данными (рис. 1).

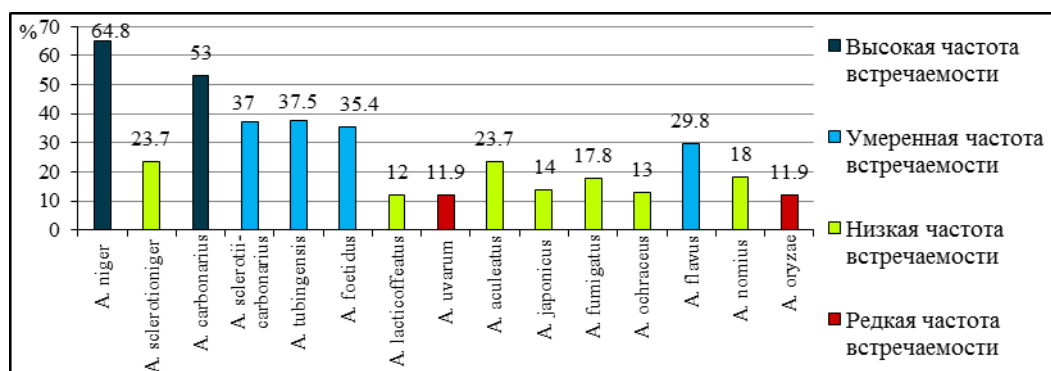
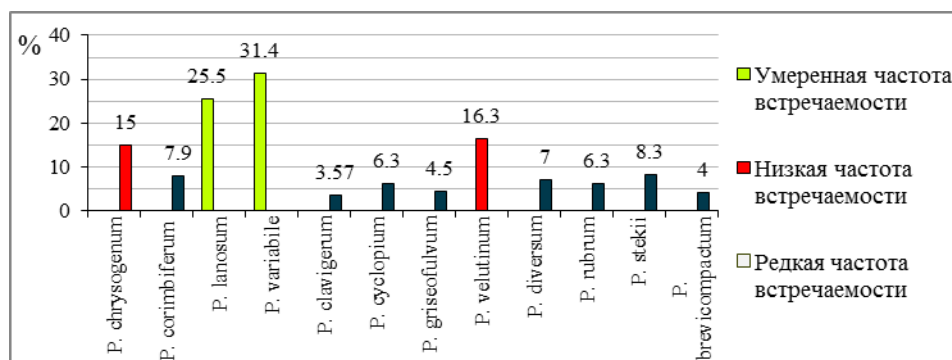


Рис. 1. Частота встречаемости видов рода *Aspergillus*, выделенных из сушеного винограда

В образцах сушеного винограда выявлены 9 потенциально токсигенных видов грибов из рода *Aspergillus*. Из них 7 являются охратоксигенными: 6 видов из секции *A. Nigri*: *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. sclerotioniger*, *A. lacticoffeatus*, и 1 - из секции *A. Circumdati* – вид *A. ochraceus*. Из изолированных токсигенных видов рода *Aspergillus* 2 относятся к секции *A. Flavi*: *A. flavus*, *A. nomius*, которые являются потенциальным продуцентом афлатоксинов.

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. 2).

Рис. 2. 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). Необходимо также отметить, что среди выявленных видов

встречаются коремииальные грибы, такие, как виды *P. clavigerum* и *P. corymbiferum*, которые отличаются высокой устойчивостью к условиям окружающей среды.

В проанализированных образцах сушеного винограда обнаружена высокая степень контаминации видами *Mucor mucedo* и *M. racemosus*. 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.

Роды *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Alternaria* представлены единичными видами, с редкой частотой встречаемости.

3.2. Сравнение видового состава мицелиальных грибов, выделенных из местных 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. 3). В РА в основном импортируются кишмишные сорта сушеного винограда.

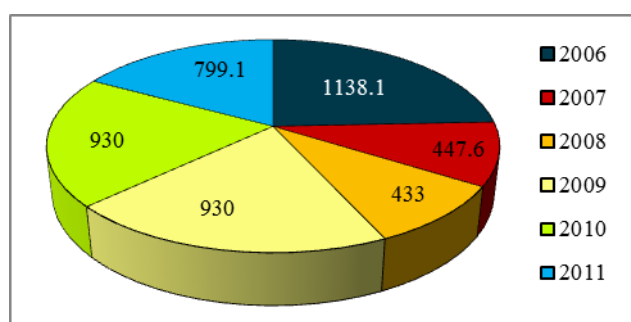


Рис. 3. Объемы импортированного в Армению сушеного винограда (в тоннах) с 2006 по 2011 гг. (источник – Статист. Ежегодн. Армении. 2013)

Проведен анализ 87 образцов армянского сушеного винограда и 80 образцов, импортированного из разных стран. Анализы показали, что степень контаминации армянского, узбекского и казахстанского сушеного винограда мицелиальными грибами довольно часто превышает предельно допустимый уровень для указанного показателя, представленный в местных и зарубежных санитарных правилах и нормах (табл. 2).

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.

Табл. 2. Количество видов грибов по родам изолированных из сушеного винограда в зависимости от их происхождения и степень заспороенности

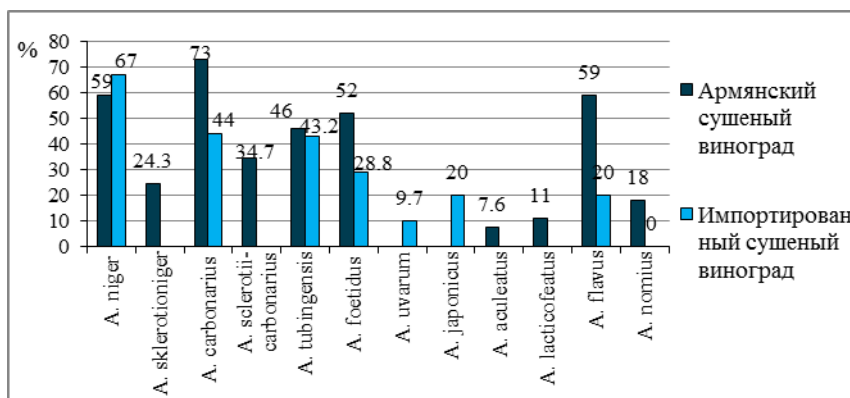
Род	Страна производитель сушеного винограда				
	Армения	Иран	США	Узбекистан	Казахстан
<i>Aspergillus</i>	13 видов	6 видов	3 вида	3 вида	3 вида
<i>Penicillium</i>	10 видов	4 вида	2 вида	2 вида	2 вида
<i>Mucor</i>	2 вида	2 вида	1 вид	2 вида	2 вида
<i>Alternaria</i>	1 вид	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	-	1 вид	-	-	-
<i>Syncephalastrum</i>	1 вид	-	-	-	-
Итого видов	27	13	6	7	7
Степень заспороенности (КОЕ/г)	$2.2 \times 10^2 - 4.3 \times 10^4$	$2.3 \times 10^2 - 4.8 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2 - 3.64 \times 10^2$	$2.7 \times 10^2 - 5.8 \times 10^3$	$1.82 \times 10^2 - 1.7 \times 10^3$

Загрязнение сушеного винограда потенциально токсигенными видами *A. niger* и *A. carbonarius* довольно высокая не только в образцах местного производства, но и в импортированных. Вид *A. niger* более часто встречался в образцах импортированного сушеного винограда (67%), однако и в местных образцах для указанного вида отмечается высокий процент встречаемости (59%). Частота встречаемости одного из активных продуцентов охратоксина А - *A. carbonarius*, в местном сушеном винограде составляет 73%, в импортированном – 44% (рис. 4). Контаминация сушеного винограда видом *A. carbonarius* является основной проблемой, в связи с биосинтезом охратоксина А на разных стадиях производства сушеного винограда.

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% (рис. 4). Виды *A. sclerotium* и *A. lacticofeatus*, 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.

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* составляет 59%, для вида *A. nomius* – не более 18% (рис. 4).

Рис. 4. Частота встречаемости видов грибов из секции *Aspergillus Nigri* и *Aspergillus Flavi* в армянских и импортированных образцах сушеного винограда



В местных образцах выявлены 10 видов грибов рода *Penicillium*: *P. cyclopium*, *P. lanosum*, *P. variabile*, *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. variabile* (рис. 5).

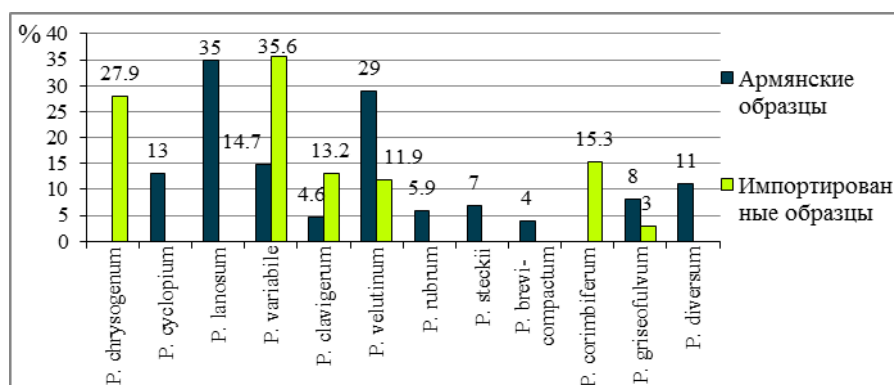


Рис. 5. Частота встречаемости видов рода *Penicillium*, выявленных в исследованных образцах сушеного винограда

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 равном количестве исследованных образцов (табл. 3).

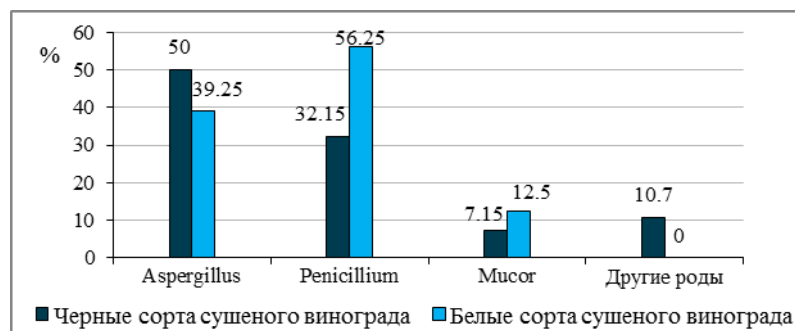
Степень заспоренности, в большинстве образцов темных сортов сушеного винограда, превышает допустимые уровни (табл. 3), установленные для плесневых грибов.

Табл. 3. Сравнительный анализ микобиоты белых и темных сортов сушеного винограда и степень их заспоренности

Продукт	Сорт сушеного винограда	Кол-во 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	$2.0 \times 10^3 - 4 \times 10^4$

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. 6).

Рис. 6. Процентное содержание родов мицелиальных грибов в образцах белых и черных сортов сушеного винограда



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 особое внимание уделялось видам грибов из секции *Aspergillus Nigri*, так как они представляли доминирующую микобиоту этого продукта. Результаты сравнительного анализа показали, что степень контаминации сушеного винограда мицелиальными микромицетами увеличилась с 2005 по 2010 гг.. В последние годы исследования токсигенные виды грибов из рода *Aspergillus* все чаще выявляются как в местных так и импортированных образцах. В местных образцах особенно резко выросла встречаемость вида *A. carbonarius*: от 38.4% до 74% (рис. 7).

Виды *A. lacticoffeatus* и *A. sclerotioniger* 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 2010 г. уже достигает 29% и 38.5% соответственно (рис. 7).

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

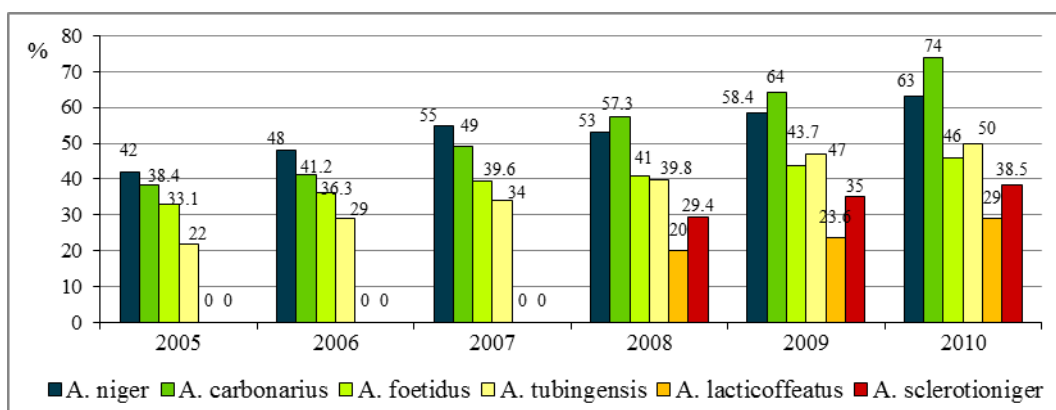


Рис. 7. Частота встречаемости потенциально охратоксигенных видов из секции *Aspergillus Nigri* в местных образцах сушеного винограда с 2005 по 2010 гг.

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 гигиенических условий в процессе сушки, плохой практикой производства и отсутствием контроля производимого продукта с целью выявления плесневых грибов – потенциальных продуцентов охратоксина А и самого токсина.

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. 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, Вайоцдзорского 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*, *Fuzarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* и *Mucor*. 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. 8).

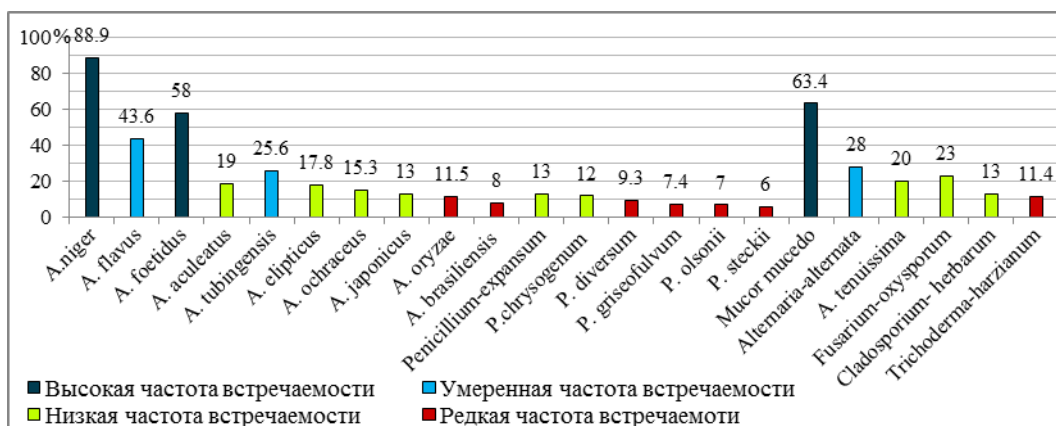


Рис. 8. Частота встречаемости видов мицелиальных грибов, выделенных из образцов почвы

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.

Результаты микологического анализа разных горизонтов почвы показали на высокую степень контаминации поверхностных и подповерхностных слоев почвы мицелиальными грибами при сравнении с глубинными слоями.

Проведен также микологический анализ разных вегетативных органов виноградной лозы по 12 образцов стеблей и листьев. 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, Belli 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*.

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).

Из темноокрашенных гифомицетов выделены и идентифицированы два вида – *Alternaria alternata* и *Cladosporium herbarum*. Результаты показали высокую степень контаминации плодов винограда грибами из рода *Mucor* (табл. 4).

Табл. 4. Виды грибов, выделенные из свежих плодов винограда (Grigoryan, Nakobyan, 2011)

Вид	Частота встречаемости грибов (%)				Количество изолятов
	Армавирская область	Арагатская область	Котайкская область	Вайоцзорская область	
<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. sclerotioniger</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.ucedo</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

Виды *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. foetidus* 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. sclerotioniger*. Вид *A. flavus* имел среднюю частоту встречаемости.

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*.

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.

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

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ТЕХНОЛОГИИ СУШКИ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В СУШЕНОМ ВИНОГРАДЕ

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. Технологические режимы сушки винограда также существенно влияют на степень контаминации готового продукта грибами и микотоксинами.

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 (Bougas 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, что доказывает их ксеротолерантность.

Нашими исследованиями показана определенная корреляция между a_w и степенью заспоренности сушеного винограда мицелиальными грибами (Накобян et al., 2010). Начиная со значения a_w 0.56 и выше отмечается более строгая корреляция между активностью воды и уровнем контаминации сушеного винограда микромицетами (рис. 9). 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*.

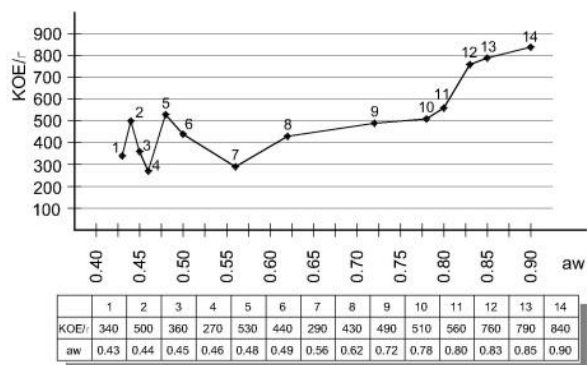


Рис. 9. Корреляция между a_w и степенью контаминации сушеного винограда микромицетами

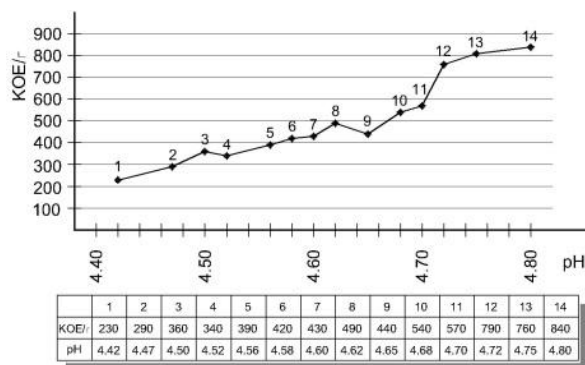


Рис. 10. Корреляция между pH и степенью контаминации сушеного винограда микромицетами

Значения активности воды сушеного винограда, произведенного в Армении, обычно превышает 0.85, что является благоприятным фактором для биосинтеза охратоксина А.

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), для микромицетов из секции *A. Nigri* оптимальные 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. 10). 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.

5.2. Влияние технологии сушки

В Армении основная часть сушеной продукции производится традиционным воздушно-солнечным методом. Но наряду с этим, также используют и солнечные сушилки (Урндцшб, 2007). 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.

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. 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. 5). Однако, в образцах отобранных непосредственно после сульфитации сырья не обнаружен рост плеснеобразующих грибов, 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 промежуточном продукте находится на максимальном уровне.

Табл. 5. 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 x10 ²	0	2.4x10 ² –3x10 ²	4.5x10 ² –6.8x10 ²	4x10 ² –7x10 ²
5	Белый кишмиш	90 – 1.3 x10 ²	0	95 – 2x10 ²	2.2x10 ² –5.2x10 ²	2x10 ² –5.5x10 ²
5	Темный изюм	70 – 1.8 x10 ²	*	5.2x10 ² –2x10 ³	2.6x10 ³ –1.8x10 ⁴	2.3x10 ³ –2x10 ⁴
5	Темный кишмиш	1.5x10 ² –2x10 ²	*	1.8x10 ² –8.5x10 ²	2.6x10 ³ –3.4x10 ³	2.6x10 ³ –4x10 ³

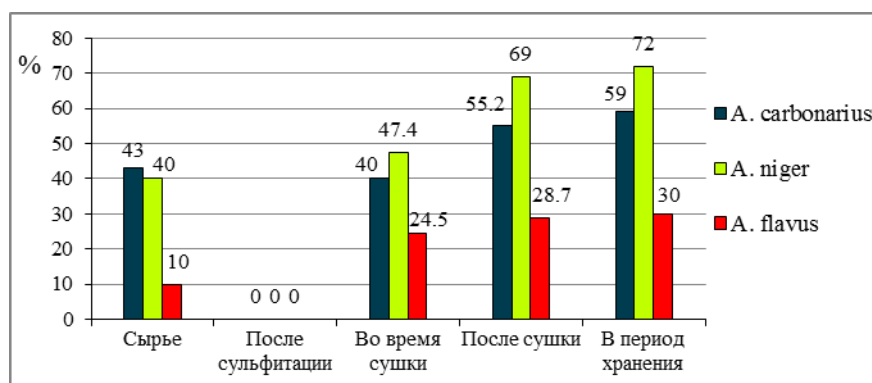
* обработка диоксидом серы не допускается во время производства указанных сортов сушеного винограда

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. 11).

Рис. 11. Процентное содержание токсигенных видов грибов на разных стадиях производства сушеного винограда



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.

5.3. Результаты исследования влияния условий хранения

Проведен повторный анализ 13 образцов темных сортов армянского сушеного винограда, после шестимесячного хранения при температуре $<+4$ °С, с целью выявления возможных изменений в контаминирующей их микобиоте. Результаты микологического анализа экспериментальных образцов показали, что после шестимесячного низкотемпературного хранения темных сортов сушеного винограда, существенных изменений в видовом составе грибов не обнаружено. Но хранение сушеного винограда в условиях низкой температуры способствует некоторому снижению уровня его заспоренности мицелиальными грибами (рис. 12).

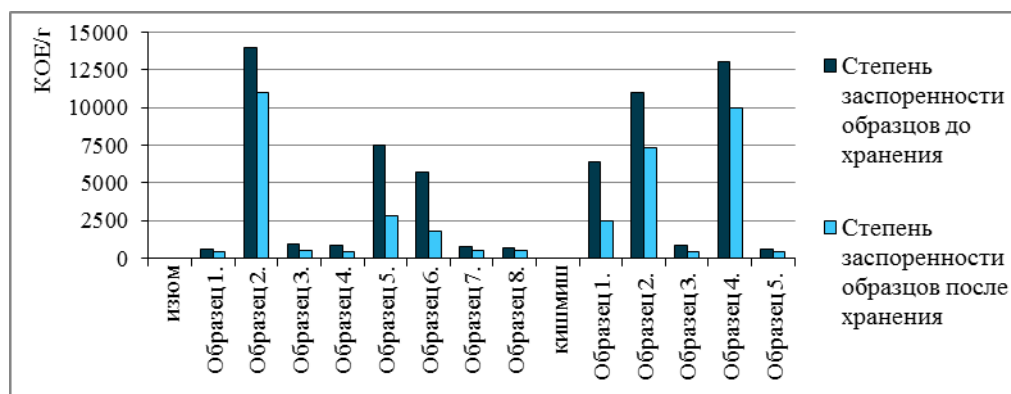


Рис. 12. Степень заспоренности армянских образцов черного сушеного винограда до и после хранения

при температуре $+4 - +6$ °С. Низкое значение КОЕ/г образцов после шестимесячного хранения свидетельствует о торможении роста мицелиальных микромицетов в условиях низкой температурны ($<+4$ °С). Полученные результаты могут служить научным основанием для определения условий и сроков хранения сушеного винограда.

5.4. Содержание SO_2 в разных сортах сушеного винограда

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). Однако использование SO₂ ограничено Международными Санитарными Правилами и Нормами. Согласно требованиям Codex Alimentarius (1981), в готовом сушеном винограде содержание SO₂ не должно превышать 1500 мг/кг.

С целью выявления корреляции между содержанием диоксида серы (SO₂) и степенью контаминации сушеного винограда мицелиальными грибами, в 30 образцах сушеного винограда методом аспирации определено количество диоксида серы, как связанного, так и свободного.

Высокое содержание общего количества диоксида серы до 1350 мг/кг отмечается в иранских образцах (кишмишные сорта) (рис. 13). 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.

Содержание “свободного” диоксида серы (SO₂) в иранских образцах находилось в пределах от 45 – 80 мг/кг. Ингибирующий эффект SO₂ на количественное содержание жизнеспособных спор грибов - потенциальных продуцентов охратоксина А наблюдается при остаточном количестве свободного диоксида серы - 60 мг/кг. 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. 13).

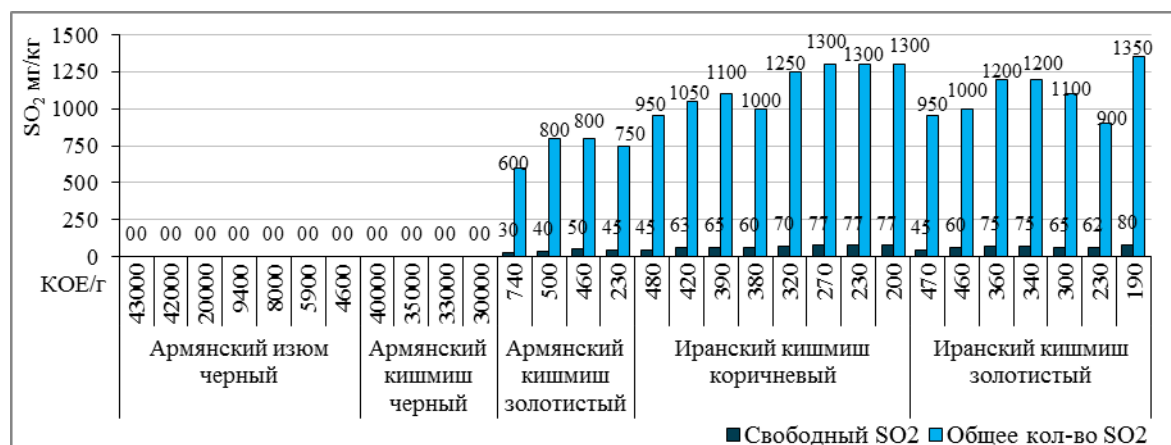


Рис. 13. Коррелятивная связь между содержанием SO₂ в образцах сушеного винограда и степенью заспоренности их мицелиальными грибами

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 508 штаммов - потенциальных продуцентов охратоксина А (ОТА) и афлатоксинов из рода *Aspergillus*: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. sclerotioniger*, *A. ochraceus*, *A. lacticoffeatus* и *A. flavus*. В результате микологического анализа свежего винограда выделены и идентифицированы 218 потенциально токсигенных штаммов из рода *Aspergillus*.

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. Биотестирование проводили на личинках жабраногого рачка *Artemia salina*.

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. 6). Из 5 исследованных штаммов *A. niger* изолированных из импортированных образцов темного сушеного винограда, 3 проявили слаботоксичные свойства, 2 оказались нетоксичными (табл. 6).

Изучена также токсичность 10 штаммов *A. niger*, 10 - *A. sclerotioniger*, 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. sclerotioniger*. Все штаммы *A. lacticoffeatus* и *A. ochraceus* оказались нетоксичными (табл. 6).

Из 218 потенциально-токсигенных штаммов, выделенных из плодов армянского винограда, 28 исследованы на токсичность методом биотестирования. Из 28 указанных охратоксигенных штаммов, четыре штамма *A. carbonarius* проявили слабую токсичность (Grigoryan, Накобыан, 2011). Все остальные штаммы *A. carbonarius*, *A. niger* и *A. sclerotioniger* оказались нетоксичными.

Табл. 6. Результаты биотестирования на личинках *Artemia salina* охратоксигенных штаммов, выделенных из образцов сушеного винограда

Кол-во исследованных штаммов	Штаммы	Количество штаммов разной степени токсичности							
		Токсичность культуральной жидкости				Токсичность хлороформного экстракта			
Штаммы выделенные из местных образцов		А	В	С	Д	А	В	С	Д
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		А	В	С	Д	А	В	С	Д
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: Согласно (Scott 1980, Biji 1981, Narrah 1982), здесь и далее
 А= остроотоксичные экстракты грибов вызывают гибель личинок 90% и выше,
 В= токсичные - от 50-89%,
 С= слаботоксичные - от 10-49%,
 Д= нетоксичные - до 9%.

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*. 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.

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

Из проанализированных 30 штаммов *A. carbonarius*, 20 были выделены из армянского черного сушеного винограда, а 10 - из импортного. 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 импортных 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. 14).

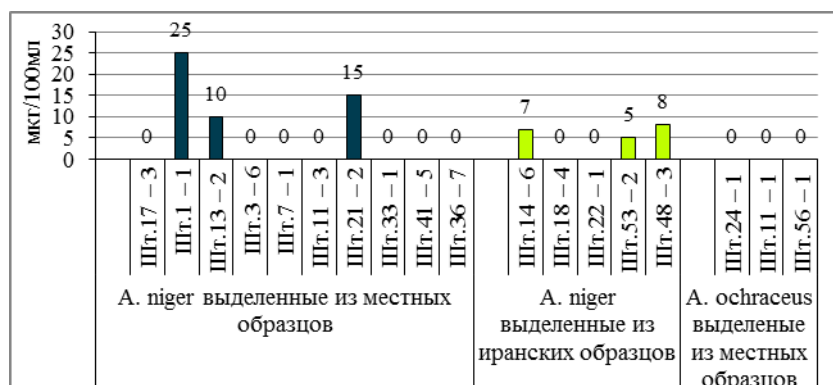


Рис. 14. Содержание охратоксина А в экстрактах штаммов *A. carbonarius*, выделенных из разных сортов сушеного винограда

Высокое содержание диоксида серы в импортных 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. Из 10 проанализированных штаммов вида *A. niger*, изолированных из местных образцов, ОТА обнаружен в экстрактах трех штаммов в количестве 10-25 мкг/100мл (рис. 15).

Рис. 15. 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. 15).

Проведен анализ 10 образцов черного сушеного винограда армянского производства на наличие охратоксина А. 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. 8).

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*.

Табл. 8. 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

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

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

Проанализированы 10 образцов местного сушеного винограда на присутствие афлатоксина В₁, который 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 сельхозпродуктов свободных от микотоксинов.

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. Сушеный виноград производится в малых промышленных объемах для реализации на внутреннем рынке. 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 в соответствии с международными стандартами 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. Установление предельно допустимых количеств ОТА в продуктах виноградарства обязательно для стран с развитым виноградарством.

В 2014 году Армения стала 46-м членом МОВВ (OIV - International Organisation of Vine and Wine – Международная Организация Винограда и Вина). 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 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). 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.

Результаты данных исследований, которые помогли определить критически контрольные точки на производствах сушеного винограда в Армении могут стать основой для внедрения системы НАССР.

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 ($2.2 \times 10^2 - 4.3 \times 10^4$ 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 рН. 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 В₁ (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.

ПУБЛИКАЦИИ 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.1.748.
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 66. – № 4. – 2015. – p. 6-10.

ՀԱԿՈՒՅՑԱՆ ԼՈՒՍԻՆԵ ԼԵՎՈՆԻ

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

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Չամիչը և չորացրած խաղողի մյուս տեսակները շատ լավ սուբստրատ են հանդիսանում *Aspergillus Nigri* սեկցիային պատկանող միցելիալ սնկերի աճի և օխրատոքսին A-ի կենսասինթեզի համար: Չորացրած խաղողում օխրատոքսին A-ի (OSA) հիմնական պրոդուցենտ հանդիսանում է *A. carbonarius* տեսակը:

Բորբոսասնկերով և նրանց տոքսիններով չամիչի աղտոտվածության վրա նշանակալի ազդեցություն են ունենում մի շարք ֆիզիկո-քիմիական չափորոշիչներ, ինչպիսիք են ջրի ակտիվությունը (aw), ջերմաստիճանը, ծծմբի երկօքսիդի պարունակությունը և այլն:

Տվյալ աշխատանքի նպատակն է՝ սնկերի օխրատոքսիզեն տեսակներով և օխրատոքսին A-ով չորացրած խաղողի աղտոտվածության աղբյուրների բացահայտումը և արտադրության տարբեր փուլերում դրանց կրիտիկական վերահսկման կետերի որոշումը:

Հայաստանում առաջին անգամ ուսումնասիրվել է տեղական արտադրության և ներմուծված՝ չորացրած խաղողն աղտոտող սնկերի տեսակային կազմը: Ուսումնասիրության արդյունքները ցույց տվեցին չորացրած խաղողի ինչպես հայկական այնպես էլ ներկրվող տեսակների աղտոտվածության բարձր աստիճան *Aspergillus Nigri* սեկցիային պատկանող սնկերի օխրատոքսի A-ի պոտենցիալ պրոդուցենտ հանդիսացող տեսակներով:

Հետազոտության են ենթարկվել չորացրած խաղողի 167 նմուշներ՝ նմուշառված Երևանի տարբեր խանութներից և սուպերմարկետներից, ինչպես նաև Արմավիրի մարզի որոշ չորանոցներից: Հայտնաբերվել և նույնականացվել են միցելիալ սնկերի 32 տեսակներ, որոնք պատկանում են 2 դասի՝ *Zygomycetes* և *Deuteromycetes*, և 6 ցեղի՝ *Mucor*, *Syncephalastrum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*: *Deuteromycetes* դասին պատկանող տեսակները կազմել են անջատված սնկերի ընդհանուր թվի 90.6%:

Aspergillus ցեղի սնկերի թիվը գերազանցել է անջատված տեսակների ընդհանուր թվի 47%-ը: Այս ցեղից անջատված 15 տեսակների 66.7%-ը (10 տեսակ) կազմել են *Aspergillus Nigri* սեկցիային պատկանող սնկերը:

Անջատվել և նույնականացվել են OSA-ի պոտենցիալ պրոդուցենտներ հանդիսացող *A. carbonarius* և *A. niger* տեսակները, որոնք գերակշռել են ոչ միայն տեղական, այլ նաև չորացրած խաղողի ներմուծված նմուշներում: Առաջին անգամ չորացրած խաղողի նմուշներում նույնականացվել են *Aspergillus Nigri* սեկցիային պատկանող ևս երկու օխրատոքսիզեն տեսակ՝ *A. lacticoffeatus* և *A. sclerotioniger*:

Կազմվել է *Aspergillus Nigri* սեկցիային պատկանող OSA-ի ակտիվ պրոդուցենտ հանդիսացող միկրոմիցետների կուլտուրաների բանկ:

Անջատվել են նաև *Aspergillus Flavi* սեկցիային պատկանող երկու աֆլատոքսիզեն տեսակներ՝ *A. flavus* և *A. nomius*, որոնք հանդիպում են չափավոր հաճախականությամբ:

Penicillium ցեղը, որին պատկանող տեսակների թիվը կազմել է հայտաբերված տեսակների թվի 37.5%-ը, արտահայտվում է 12 տեսակներով:

Չորացրած խաղողի ուսումնասիրված նմուշներում նկատվել է *Mucor* ցեղին պատկանող սնկերով (*M. mucedo* և *M. racemosus*) աղտոտվածության բարձր աստիճան: *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Alternaria* ցեղերից անջատվել և նույնականացվել են մեկական տեսակներ:

Ուսումնասիրվել է ջրի ակտիվության (aw), ջերմաստիճանի և pH-ի ազդեցությունը չորացրած խաղողի նմուշների՝ բորբոսասնկերով աղտոտվածության աստիճանի վրա: Հայտնաբերվել է որոշակի կորելիացիա նշված չափորոշիչների և չորացրած խաղողի աղտոտվածության աստիճանի միջև:

Առաջին անգամ Հայաստանում կատարվել է խաղողի աճեցման ընթացքում և չորացրած խաղողի արտադրությունում կրիտիկական վերահսկողության կետերի ուսումնասիրություն:

Չորացրած խաղողի արտադրության տարբեր փուլերում արտադրանքի 20 նմուշների սնկաբանական ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ բորբոսասնկերով աղտոտվածության հավանականությունը ամենամեծն է խաղողի չորացման շրջանում, հատկապես բացօթյա պայմաններում:

Որոշվել է ուսումնասիրված՝ հայկական և Պարսկաստանից ներմուծված նմուշներում, SO₂-ի պարունակության ազդեցությունը՝ նմուշների աղտոտվածության աստիճանի վրա: Պարսկական նմուշներում հայտնաբերվել է ծծմբի երկօքսիդի բարձր պարունակություն՝ 900 – 1350 մգր/կգ: Նշված նմուշները ունեցել են աղտոտվածության ցածր աստիճան, ի տարբերություն հայկական նմուշների, որոնցում հայտնաբերվել է SO₂-ի ցածր քանակներ՝ 600 – 800 մգր/կգ, և որոնք ունեցել են աղտոտվածության բարձր աստիճան:

Պատրաստի չորացրած խաղողի օխրատոքսիզեն սնկերով աղտոտվածության աղբյուրների բացահայտման նպատակով կատարվել է խաղողի և հողերի անալիզ, որոնք նմուշառվել են Հայաստանի 4 մարզերում գտնվող խաղողի այգիներից: Կատարված հետազոտությունների արդյունքները վկայում են Հայաստանում *Aspergillus Nigri* սեկցիային պատկանող սնկերի օխրատոքսիզեն տեսակներով խաղողի աղտոտվածության խնդրի առկայության մասին: Հողերի 48 նմուշներից անջատվել և նույնականացվել են միցելիալ սնկերի 23, իսկ խաղողի 81 նմուշներից՝ 19 տեսակներ: Անալիզի արդյունքները ցույց տվեցին խաղողի և հողերի աղտոտվածության բարձր աստիճան *Aspergillus Nigri* սեկցիային պատկանող տեսակներով:

Ուսումնասիրվել է չորացրած խաղողի և խաղողի թարմ պտուղների նմուշներից անջատված օխրատոքսիզեն և աֆլատոքսիզեն շտամների էքստրակտների տոքսիզեն պոտենցիալը: Նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով *A. carbonarius*-ի ուսումնասիրված 30 շտամների էքստրակտներում հայտնաբերվել է OSA 30-200 մկգ/100մլ քանակներով: *A. niger*-ի ուսումնասիրված շտամների էքստրակտներից միայն վեցում հայտնաբերվեց OSA ցածր քանակներով՝ 5 – 25 մկգ/100մլ: *A. flavus*-ի 6 շտամներ սինթեզել են աֆլատոքսին B₁ բարձր քանակներով՝ մինչև 300 մկգ/100մլ:

Նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիայի մեթոդը թույլ տվեց ուսումնասիրված հայկական սև չորացրած խաղողի 10 նմուշներում հայտնաբերել աֆլատոքսին B₁ 10–35 մկգ/կգ քանակներով: Ուսումնասիրված 10 նմուշներում բարձր արդյունավետությամբ հեղուկ քրոմատոգրաֆիայի և իմմունոֆերմենտատիվ անալիզի միջոցով հայտնաբերվել է OSA 15-50 մկգ/կգ քանակներով:

Տվյալ հետազոտության արդյունքները օգտագործվել են օխրատոքսին A-ի կենսասինթեզը կանխելու նպատակով չորացման գործընթացում վտանգների բացահայտման և բորբոսագոյացնող սնկերի օխրատոքսիզեն տեսակներով չորացրած խաղողի աղտոտվածության ռիսկերի գնահատմանն ուղղված HACCP պլանի կազման համար:

Պատրաստվել են առաջարկներ ՀՀ սննդամթերքի անվտանգության պետական կոմիտեի համար՝ խաղողի վերամշակումից ստացվող մթերքներում օխրատոքսին A-ի պարունակության մասին ԵՄ հրահանգներին համապատասխանող կանոնակարգերի ընդունման վերաբերյալ:

HAKOBYAN LUSINE LEVON

INFLUENCE OF SOME QUALITY INDICATORS AND TECHNOLOGICAL PARAMETRES OF DRIED VINE FRUIT PRODUCTION ON CONTAMINANT FUNGI SPECIES COMPOSITION AND ON THEIR TOXICITY

SUMMARY

Raisin and other sorts of dried vine fruit are good substrate for growth of filamentous fungi from *Aspergillus Nigri* section and biosynthesis of ochratoxin A by them. The main producer of OTA in dried vine fruit is *A. carbonarius*.

Variety of ecophysiological parameters, such as water activity (aw), temperature and sulphure dioxide content are significantly influencing on contamination of dried vine fruit by moulds and their toxins.

The aim of this work is: detection of contamination sources of dried vine fruit by ochratoxigenic species and ochratoxin A, as well as determination of critical control points in all stages of production.

For the first time in Armenia the mycobiota of fungi contaminating local produced and imported dried vine fruits are determined. The results of this study shown high contamination level of Armenian as well as imported sorts of dried vine fruit by fungi potential producers of ochratoxin A from *Aspergillus* section *Nigri*.

167 dried vine fruit samples collected from different markets and supermarkets of Yerevan, as well as some drying production in Armavir region, were analyzed. 32 species of filamentous fungi were found out and identified, which belong to six genera: *Mucor*, *Syncephalastrum*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, from two classes: *Zygomycetes* and *Deuteromycetes*. Species from *Deuteromycetes* class were 90.6% of total quantity of all isolated fungi.

The quantity of fungi from genus *Aspergillus* exceeded 47% of total quantity of all isolated species. 66.7% (10 species) of isolated 15 species from this genus were fungi from *Aspergillus Nigri* section.

Potential producers of OTA species *A. carbonarius* and *A. niger* were isolated and identified, which dominated in local produced samples as well as in imported samples of dried vine fruit. For the first time two more ochratoxigenic species from *Aspergillus Nigri* section: *A. lacticoffeatus* and *A. sclerotioniger*, were identified in dried vine fruit samples.

The bank of cultures of active producers of ochratoxin A belonging to *Aspergillus Nigri* section was formed.

Two aflatoxigenic species from *Aspergillus Flavi* section: *A. flavus* և *A. nomius*, were isolated with moderate frequency of occurrence.

12 species from genus *Penicillium* were identified, quantity of which were 37.5% of all isolated fungi.

The investigated samples of raisin had high level of contamination by fungi from *Mucor* genus: *M. mucedo* և *M. racemosus*. By single species from *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Alternaria* genera were isolated and identified.

In the last few years of our researches a tendency for raisin contamination level by identified toxigenic species was revealed.

Influence of water activity (a_w), temperature and pH on contamination level of raisin samples by moulds was investigated. The research revealed the shape correlation between these parameters and the contamination level of dried vine fruit.

For the first time in Armenia the Critical Control Points during vine vegetation and in production of dried vine fruit were detected.

Mycological analysis of 20 samples collected during different stages of dried vine fruit production shown, that risk of contamination of product is highest in drying stage, especially when producing by sun-drying method.

The influence of SO_2 content on contamination level of samples was studied in Armenian and Iranian raisins. High level of sulphur dioxide content was revealed in Iranian samples: in 900 – 1350 mg/kg quantity. These samples had low frequency of occurrence. The low content of sulphur dioxide (600 – 800 mg/kg) was detected in Armenian samples which had high contamination level.

In order to reveal the sources of contamination of raisin by ochratoxigenic fungi, the analyses of grape and soil collected from 4 regions of Armenian vineyards were carried out. The studies show existence of a contamination problem of Armenian vineyards by ochratoxigenic species of fungi from *Aspergillus* section *Nigri*.

23 species of filamentous fungi were isolated and identified from 48 samples of soil and 19 species from 81 samples of grape. The results of analyses have shown high contamination level of grape and sound by species belonging to *Aspergillus Nigri*.

The toxigenic potential of ochratoxigenic and aflatoxigenic strains extracts isolated from raisin and grape samples. Ochratoxin A was revealed in extracts of 30 investigated strains of *A. carbonarius* in 30 – 200 mkg/kg quantity by tin layer chromatography method. OTA was detected in only 6 extracts of all investigated strains of *A. niger* in low quantity (5 – 25 mkg/100ml). Six strains of *A. flavus* produced aflatoxin B_1 in high quantity (up to 300 mkg/100ml).

Aflatoxin B_1 was revealed in 10 examined samples of raisin in 10 – 35 mkg/kg quantity by tin layer chromatography method. OTA was detected in 10 investigated samples of black raisin in quantity of 15 – 50 mkg/kg by high effective liquid chromatography (HPLC) and immuno-fermentative (ELISA) analyses methods.

The results of this work were used to make HACCP plan on detection of hazards and risk assessment of dried vine fruit contamination by ochratoxigenic fungi in drying process in order to prevent OTA biosynthesis.

A proposal to accept regulations on the content of OTA in grape processing products in accordance with EU Directive is prepared for the Armenian Agency of food safety.