

EVALUATION OF FODDER CONTAMINATION WITH OCHRATOXIN A AND METHODS OF ITS DECONTAMINATION

Summary

Ochratoxin A is a high toxigenic secondary metabolite of fungi and was claimed as a cancerogen class 2B by the IARC (International Agency for Research on Cancer). Ochratoxin A is responsible for cancer disease in animals and probably is cancerogenic to human. Toxic for animals metabolites produced by fungi often contaminate food and feed. According to the "from field to fork" strategy it is necessary to control the level of contamination also in fodder. It is highly probable that basic feed for cattle such as meadow sward, grass and silages prepared with these sources, can be contaminated with mycotoxigenic moulds including OTA-producing strains. For many years there have been carried out researches on lowering contamination with toxigenic fungi in food and feed by inactivating mould's growth or production of ochratoxin A. Many physical, chemical and microbiological attempts were made to eliminate the toxin from these products. For the reason of lack of an appropriate plant's protection against moulds, the promising could be the method of microbiological decontamination in biotechnological processes, especially during lactic acid fermentation. Nowadays an important case to solve is to evaluate the ability of lactic acid bacteria starter cultures to eliminate the content of ochratoxin A during forage's fermentation in manufacturing conditions.

OCENA SKAŻENIA PASZ OCHRATOKSYNĄ A I METODY ICH DEKONTAMINACJI

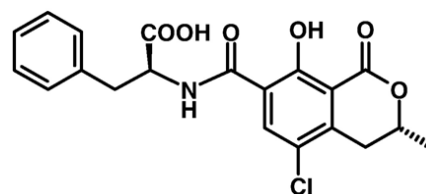
Streszczenie

Ochratoksyna A jest wysoko toksycznym metabolitem drugorzędowym grzybów strzępkowych, zakwalifikowanym przez IARC (International Agency for Research on Cancer) do kategorii 2 B czynników nowotworczych, powodujących nowotwory u zwierząt i prawdopodobnie u ludzi. Toksyczne dla zwierząt metabolity grzybów pleśniowych stanowią częste zanieczyszczenia pasz i żywności. Zapewnienie bezpieczeństwa żywności „od pola do stołu” wymaga bezwzględnego objęcia urzędową kontrolą środków żywienia zwierząt. Pasze objętościowe jak ruń łąkowa, trawy i sporządzone z nich kiszonki, które stanowią podstawową paszę dla bydła, są często skażone pleśniami toksynotwórczymi, w tym produkującymi ochratoksynę A. Od wielu lat prowadzone są badania nad możliwościami ograniczenia zanieczyszczenia żywności i pasz mikotoksynami, zarówno na drodze hamowania wzrostu grzybów i produkcji mikotoksyn, jak i poprzez eliminację toksyn na drodze chemicznej, fizycznej i mikrobiologicznej. Ze względu na brak odpowiednich metod zabezpieczania roślin przed inwazją pleśni, w sprzyjających warunkach klimatycznych, coraz większe zainteresowanie budzi możliwość hamowania ich rozwoju przez wybrane mikroorganizmy w procesach biotechnologicznych, a szczególnie w procesie fermentacji mlekowej. Ważnym obecnie problemem do rozwiązania jest ocena działania kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej na obniżenie zawartości ochratoksyny A, w czasie kiszenia pasz objętościowych w warunkach produkcyjnych.

1. Wprowadzenie

Grzyby strzępkowe są mikroorganizmami bardzo często powodującymi psucie się produktów żywnościowych oraz pasz objętościowych [1]. Wiele gatunków pleśni jest także zdolnych do produkcji toksycznych dla człowieka i zwierząt metabolitów drugorzędowych zwanych mikotoksynami [2], których obecność w paszach jest poważnym zagrożeniem dla bezpieczeństwa żywności [3]. Według danych FAO z 2001 roku prawie 25 % światowej produkcji pasz i żywności jest zanieczyszczona mikotoksynami [4], stąd coraz częściej ich obecność jest uznawana za istotny wskaźnik jakości pasz i żywności [5-6].

Ochratoksyna A uznana została za najważniejszą mikotoksynę stwierdzoną w surowcach roślinnych w Polsce, w tym przede wszystkim we wszystkich zbożach [7-8]. OTA jest peptydem aminokwasu α -fenyloalaniny, połączonym wiązaniem peptydowym poprzez grupę aminową z pochodną kumaryny [7] (rys. 1). Mikotoksyna ta stanowi najczęściej izolowany w praktyce związek z grupy ochratoksyn. Obok OTA rzadko wykrywana jako naturalne zanieczyszczenie żywności jest mniej toksyczna ochratoksyna B. Inne rodzaje ochratoksyn nie występują w naturalnych produktach [9-10].



Rys. 1. Struktura chemiczna ochratoksyny A
Fig. 1. Chemical structure of ochratoxin A

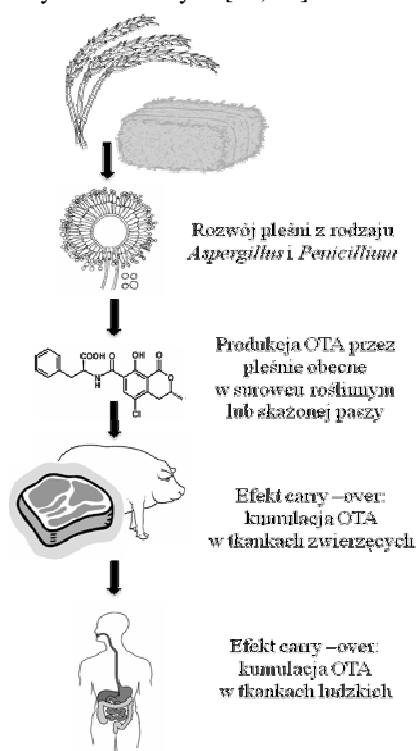
Obok szkodliwego wpływu na zdrowie zwierząt i ludzi skażenie pasz toksynami grzybów strzępkowych prowadzi do poważnych strat ekonomicznych. Zgodnie z opinią Komisji Codex Alimentarius z 2003 roku całkowite uniknięcie spożycia ochratoksyny A jest niemożliwe, ale wiele wysiłku wkłada się w poszukiwanie nowych metod mających na celu odkażenie zanieczyszczonych produktów [4, 12-14]. Poza metodami fizycznymi i chemicznymi w kręgu zainteresowania pojawiają się metody biologiczne, w tym w sposób szczególny skupia się uwagę na możliwości dekontaminacji skażonych pasz przez bakterie fermentacji mlekowej [15].

Komitet Naukowy ds. Środków Spożywczych (SCF) Unii Europejskiej w swej opinii wyrażonej dnia 17 września 1998 roku na temat ochratoksyny A wnioskował, że OTA jest mikotoksyną o właściwościach rakotwórczych, nefrotoksycznych, teratogennych, immunotoksycznych i prawdopodobnie również neurotoksycznych. OTA została zaklasyfikowana przez IARC (The International Agency for Research on Cancer) jako kancerogen klasy 2B [16]. Spośród zwierząt gospodarskich najbardziej wrażliwe na ochratoksynę A są świny i drób [17], u człowieka OTA powoduje jednostkę chorobową zwaną „Bałkańską Endemiczną Nefropatią” [12].

2. Skażenie mikologiczne oraz występowanie ochratoksyny A w paszach objętościowych

Grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus* oraz *Penicillium* w korzystnych warunkach osiągają możliwość nieograniczonego rozwoju, co może prowadzić do produkcji dużych ilości toksyn i ich koncentracji w skażonej paszy [15]. Obecność tej mikotoksyny w mięsie jest skutkiem tzw. efektu carry-over związanego ze skarmianiem zwierząt rzeźnych oraz drobiu paszą skażoną OTA, która podlega kumulacji w organizmie zwierząt, wiąże się z białkami krwi i przedostaje się do mięsa [18-20]. Mikotoksyna ta kumuluje się przede wszystkim w nerkach, wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej świń oraz drobiu skarmianych skażoną paszą [19]. Uważa się, że około 5-10% OTA spożywanej przez ludzi pochodzi z mięsa wieprzowego [20-21]. Mikotoksyna ta jest rzadko spotykana w mięsie wołowym ze względu na mikroflorę żwacza [19]. Rolę ochratoksyny A w łańcuchu pokarmowym ilustruje rys. 2.

Na skażenie mikologiczne narażone są przede wszystkim pasze zanieczyszczone odpadami komunalnymi i rolniczymi np. gnojowicą. Większym skażeniem mikologicznym oraz zawartością OTA cechuje się często ruń łąkowa z gospodarstw ekologicznych w porównaniu z gospodarstwami konwencjonalnymi, na co może mieć wpływ sposób nawożenia użytków zielonych [10, 15].



Rys. 2. Rola ochratoksyny A w łańcuchu żywieniowym
Fig. 2. The role of ochratoxin A in food chain

Problem kontaminacji pasz objętościowych ochratoksyną A jest szczególnie istotny z punktu widzenia gospodarstw rolnych, w których zielonki, kisonki lub siana stanowią podstawę żywienia przeżuwaczy [6, 10, 17].

Towarzyszący fermentacji cukrów w procesie kiszenia pasz spadek pH, ogranicza wzrost drobnoustrojów niepożądanych takich jak drożdże i pleśnie [22]. Kisonki stanowią jednak matrycę, w której rozwój pleśni może nastąpić nawet w ostatnich dniach terminu przydatności do spożycia przez zwierzęta [23]. Praktyka rolnicza pokazuje, że wzrost grzybów strzępkowych może być wynikiem zbyt słabego ubicia masy kisonnej, nieuszczelnego przykrycia silosu lub uszkodzenia folii, a także niewłaściwej powierzchni wybierania kisonki. Drobnoustroje mogą rozwijać się na powierzchni i we wnętrzu silosów lub balotów [20, 24]. Rozwój pleśni w kisonkach może skutkować produkcją toksycznych metabolitów, co jest szczególnie istotne w kontekście faktu, iż kisonki stanowią podstawowy rodzaj paszy w żywieniu przeżuwaczy [23, 25].

Według danych literaturowych w paszach objętościowych spotyka się od kilku milionów do kilku tysięcy zarodników pleśni w 1 g paszy. Podaje się, że liczba zarodników grzybów pleśniowych może wahać się od $< 10^3$ j.t.k./g do $> 10^7$ j.t.k./g [20]. Analiza mikrobiologiczna zielonek i kisonzek z upraw nawożonych gnojowicą przeprowadzona przez Kluczka i Kurtykę wykazała obecność pleśni w ilości od $3,55 \times 10^4$ do $1,60 \times 10^6$ j.t.k./g w zielonkach oraz od $2,15 \times 10^2$ do $2,72 \times 10^5$ j.t.k./g w sianokisonkach i kisonkach z traw III pokosu [15]. Amigot i in. analizowali 147 próbek kisonzek i ocenili kukurydź jako najbardziej zanieczyszczoną grzybami strzępkowymi (25,6% próbek zawierało więcej niż 10^9 j.t.k./cm³), zaś najmniej sorgo ze względu na obecność tanin (16,4%) [24].

Badania mikroflory kisonzek wykonanych z kukurydzy wykazały, że do najczęściej spotykanych gatunków potencjalnie toksynotwórczych pleśni należą *Arthrinium phaeospermum*; *Aspergillus* sp., *Byssoschlamys* sp.; *Fusarium* sp., *Monascus ruber*; *Penicillium* sp. Pleśnie z rodzaju *Aspergillus* oraz *Penicillium* wyizolowano także z polskich kisonzek z kukurydzy, lucerny, i żyta. Istnieje ograniczona liczba doniesień na temat ochratoksynotwórczej mikroflory kisonzek sporządzonych z runi łąkowej, którą mogą stanowić pleśnie z rodzajów: *Aspergillus* i *Penicillium* [15, 26] i poważnie zagrażać skażeniem mikotoksynami produkowanymi w warunkach klimatu umiarkowanego, charakterystycznego dla Polski [27].

Jak wykazały badania ostatnich lat, OTA występuje w znikomych ilościach we wszystkich rodzajach pasz wilgotnych i suchych [20]. Doniesienia naukowe mówią o zanieczyszczeniu ochratoksyną A polskich mieszanek paszowych oraz śruty zbożowej. O aktualności problemu skażenia toksykologicznego polskich pasz świadczą wyniki badań przeprowadzonych w latach 2002 – 2004, gdzie na 824 próbki mieszanek paszowych stwierdzono obecność OTA w 747 analizowanych próbkach [15, 28]. Ocena poziomu zanieczyszczenia pasz i materiałów paszowych ochratoksyną A przeprowadzona w Polsce w latach 2005-2007 wykazała prawie dwukrotny wzrost liczby skażonych próbek w latach 2006-2007 w stosunku do roku wcześniejszego, który wyniósł w 2005 roku 22%. Mikotoksynę wykrywano w przedziale zawartości od 0,12 do 47,50 ppb [29].

Istnieje niewiele doniesień naukowych na temat stopnia skażenia OTA kisonzek wykonanych z runi łąkowej. Badania prowadzone w Instytucie Biotechnologii Przemysłu

Rolno – Spożywczego wykazały skażenie OTA runi łąkowej pochodzącej z gospodarstw ekologicznych w ilości średnio 7,2 ppb w suchej masie [10]. Nawet późne jesienne pokosy traw zawierają OTA, która ulega pewnej biodegradacji na etapie produkcji sianokiszzonek [20].

Podobne niemieckie badania monitoringowe (przewodzone w latach 1996 – 1999) zbóż i produktów zbożowych (m.in. pszenicy, kukurydzy, żyta i owsa) wykazały obecność OTA w stężeniu powyżej 3 ppm w 1,4 % z 2374 próbek zbóż [19]. Wśród francuskich próbek kiszonek zidentyfikowano obecność OTA w niskiej koncentracji od 1,5 do 5 ppb, co świadczy o możliwości narażenia zwierząt gospodarskich na systematyczne przyjmowanie małych dawek tej toksyny [25, 30].

Według FAO/WHO dopuszczalny poziom bezpiecznego dziennego spożycia (TDI – ang. *tolerable daily intake*) ochratoksyny A z żywnością dla człowieka wynosi do 5 ng/kg masy ciała (5 ppt) [9, 18]. Maksymalne dopuszczalne stężenia OTA w paszach są trudne do oszacowania, co wynika z niejednoznacznych w interpretacji wyników badań oraz problemów w ujednoczeniu standardów na rynku towarów w handlu międzynarodowym [12]. W Europie działa co najmniej kilka różnych organizacji odpowiedzialnych za szacowanie ryzyka związanego z występowaniem OTA [3]. Nadal brak jest jednak jakichkolwiek uregulowań UE dotyczących zawartości OTA w paszach. Spośród krajów europejskich w Danii wprowadzono przepisy określające dopuszczalny poziom OTA w mięsie. Istnieje tam obowiązek dyskwalifikowania tuszek wieprzowych, w nerkach których ta mikotoksyna znajduje się minimum na poziomie 25 ppb oraz podrobów dla tuszek z zawartością OTA na poziomie 10 ppb [9].

3. Ograniczenie stopnia skażenia mikologicznego

Obecne trendy i wymagania stawiane przez producentów żywności i konsumentów sprawiają, że istnieje konieczność stałego podnoszenia jakości pasz i żywności, także w odniesieniu do toksycznych metabolitów grzybów strzępkowych [24]. Kontaminację pasz można ograniczyć już na etapie produkcji polowej, gdyż skażenie żywności i pasz mikotoksynami jest konsekwencją rozwoju pleśni na surowcach roślinnych [15]. Duże znaczenie przywiązuje się do różnorodnych strategii prowadzonych zarówno przed zasiewem, w trakcie wzrostu roślin oraz podczas zbiorów [31]. W przypadku ochratoksyny A, typowej mikotoksyny przechowalniczej, niezbędna jest także prawidłowa technika przygotowania paszy, jej konserwacja i magazynowanie [13]. Rekomendowane są stosowanie Dobrej Praktyki Rolniczej (GAP) oraz Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP), a także wprowadzanie Systemu HACCP (Analizy Zagrożeń w Krytycznych Punktach Kontroli) w gospodarstwach rolnych [32].

Do metod utrwalania żywności i pasz, a tym samym zapobiegania skażeniu toksykologicznemu należą suszenie, mrożenie, przechowywanie w warunkach chłodniczych lub w atmosferze zmodyfikowanej, traktowanie energią cieplną oraz inne metody fizyczne [1]. Wzrost grzyba *A. ochraceus* hamuje także dawka promieniowania X od 2 do 5 kGy, ale zastosowanie tej metody do dekontaminacji żywności i pasz jest wątpliwe [32]. Istnieje także grupa metod chemicznych, które wykorzystują różnorodne konserwanty, ograniczające lub hamujące rozwój pleśni [33].

4. Biologiczne metody hamowania rozwoju mikroflory pleśni w paszach fermentowanych

Nowoczesne podejście hamowania rozwoju mikroflory pleśni w paszach obejmuje wykorzystanie naturalnych zdolności mikroorganizmów do antagonistycznego oddziaływania pomiędzy sobą, a w szczególności zwraca się uwagę na różnorodne gatunki LAB [Schillinger i Varela Villarreal 2010]. Bakterie fermentacji mlekowej produkują liczne związki o aktywności bakteriobójczej oraz hamujące wzrost m.in. grzybów z rodzaju *Monilia*, *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* [1]. Wytwarzanie składników o charakterze antyfungistatycznym zależy od fazy wzrostu, w jakiej znajdują się komórki szczepów LAB i jest najwyższa w logarytmicznej fazie wzrostu [35], a także od temperatury, podłoża, składników odżywczych i pH [36]. Według Magnusson i in. istnieją trzy mechanizmy, które tłumaczą przeciwdrobnoustrojową aktywność szczepów LAB: produkcja kwasów organicznych, współzawodnictwo o substancje odżywcze oraz synteza antagonistycznych związków [36].

Heterofermentatywne oraz względnie heterofermentatywne gatunki bakterii fermentacji mlekowej produkują obok kwasu mlekowego także inne lotne kwasy organiczne jak kwas octowy, mrówkowy, propionowy i inne. Kwas mlekowy jest podstawowym metabolitem omawianej grupy bakterii, który w decydujący sposób wpływa na obniżenie wartości pH. Pleśnie i drożdże mogą rozwijać się nawet do pH o wartości odpowiednio 2 i 2,5; choć bardzo duże stężenie wolnych jonów wodorowych może ograniczać wzrost wielu gatunków m.in. przez denaturację enzymów. Ponadto forma niezdysoncjowana kwasu mlekowego działa silniej z uwagi na łatwiejszą dyfuzję do wnętrza komórki na drodze transportu pasywnego. W cytoplazmie kwas mlekowy ulega dysocjacji i zakwasza środowisko wnętrza komórki, powodując wzrost ciśnienia osmotycznego. W komórce dochodzi do zniszczenia gradientu elektrochemicznego protonów, co prowadzi do śmierci komórki [1, 37]. Kwas octowy i kwas propionowy również wpływają na utratę potencjału elektrochemicznego przez błonę komórkową grzybów strzępkowych. Kwas propionowy redukuje wzrost pleśni przede wszystkim w niższym stężeniu oraz przy niższych wartościach pH i uszkadza błonę grzybów przy pH poniżej 4,5. Oba kwasy hamują wchłanianie aminokwasów przez komórki grzybów strzępkowych. [1, 38]. Właściwości grzybobójcze w stosunku do kilku gatunków pleśni w tym *Aspergillus niger* w stężeniach rzędu mg/cm³ posiada także kwas 4-hydroksyfenylomlekowy produkowany przez *L. plantarum* 21B i MiLAB 393 *L. coryniformis* Si3, *Pediococcus pentosaceus* i *L. sakei* [1, 39-40].

Bakterie fermentacji mlekowej należą do grupy mikroorganizmów katalazo-ujemnych, a zatem w trakcie ich wzrostu nadtlenuk wodoru kumuluje się w znacznych ilościach w środowisku i powoduje destrukcję struktury białek komórkowych. Wykazano także, że reuteryna (mieszanina monomerycznych oraz cyklicznych dimerów 3-HPA - aldehydu 3-hydroksypropionowego) hamuje wzrost grzybów z rodzaju *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* oraz *Fusarium* [41].

Większość metabolitów szczepów LAB pochodzenia białkowego o aktywności przeciwdrobnoustrojowej to bakteriocyny. Nie ma jednoznacznych dowodów świadczących o tym, że bakteriocyny hamują także wzrost pleśni. Istnieje jednak kilka doniesień naukowych na temat peptydów o aktywności antyfungistatycznej produkowanych

przez bakterie fermentacji mlekowej. Autorzy Gourama i Bullerman [42-43], pracując nad antypleśniowymi właściwościami popularnego biopreparatu do kiszenia pasz, odkryli niskocząsteczkowe peptydy (o masie poniżej 1 kDa) syntezowane przez *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*. Znane są także inne tego typu peptydy m.in. hamujące wzrost wielu gatunków pleśni i drożdży produkowany przez szczep Si3 *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* [1].

Odkryte kwasy 3-hydroksytłuszczowe produkowane przez szczep *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 wpływają negatywnie na rozwój komórek niektórych gatunków grzybów. Nadal istnieją jednak sprzeczne dane dotyczące korelacji pomiędzy długością łańcucha węglowodorowego w kwasach a efektywnością ich działania. Minimalne stężenie hamujące (MIC) dla hydroksylowanej formy kwasów tłuszczowych wynosi od 10 do 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, co odpowiada stężeniom popularnych leków przeciwgrzybiczych [44]. Cykliczne peptydy zbudowane głównie z proliny i fenyloalaniny, glicyny i L-leucyny, a także mewalonolakton hamują rozwój pleśni w stężeniach rzędu mg/cm^3 , a ich antyfungistatyczne właściwości są słabsze niż wspomnianych kwasów tłuszczowych [1, 40].

Warto podkreślić, że hamowanie wzrostu pleśni w wielu badaniach modelowych wskazują na złożoną interakcję pomiędzy wieloma metabolitami bakterii fermentacji mlekowej, w tym tymi nadal niepoznanymi, co stwarza wciąż nowe wyzwania dla badaczy poruszających tę tematykę i budzi wciąż nowe możliwości aplikacji tej grupy drobnoustrojów [1, 34].

5. Metody dekontaminacji ochratoksyny A

W momencie pojawienia się kłopotów zdrowotnych zwierząt, będących efektem działania mikotoksyn, pierwszym zabiegiem dokonywanym przez hodowcę jest odstawienie skażonej paszy i zastąpienie jej inną, wolną od zanieczyszczeń. Ze względu na straty ekonomiczne skażona pasza nie jest utylizowana, ale podejmuje się próby jej detoksykacji, której celem jest zniszczenie, modyfikacja lub ekstrakcja mikotoksyny. [14, 17, 33]. Metody usuwania OTA ze skażonego materiału obejmują te fizyczne, chemiczne oraz biologiczne, z czego jedynie niektóre na dzień dzisiejszy rekomenduje się do stosowania nie tylko na skalę laboratoryjną, ale także dla praktycznej aplikacji w warunkach produkcyjnych [45].

Metody detoksykacji skażonej paszy klasyfikuje się ze względu na mechanizm działania na metody fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. Idealny sposób dekontaminacji mikotoksyny powinien cechować się prostotą, być ekonomicznie uzasadniony, nie wpływać na jakość oraz bezpieczeństwo spożycia paszy przez zwierzęta [31]

Sposób dekontaminacji pasz zależy od rodzaju paszy, grzybów pleśniowych obecnych w skażonym materiale, ich rozprzestrzeniania się, warunków wzrostu i rozwoju, a także od wytwarzanych toksycznych produktów ich metabolizmu [15]. Stosunkowo skutecznym sposobem zmniejszania zawartości OTA w zbożu jest obróbka termiczna, granulowanie oraz jego przerób technologiczny. Amézqueta i in. [14] opracowali prostą metodę dekontaminacji zanieczyszczonych łupin kokosowych polegającą na ekstrakcji OTA węglanem potasu, którą proponują jako potencjalnie skuteczną również dla zbóż [33]. Przy niskich dawkach toksyny możliwa jest jej częściowa eliminacja poprzez suszenie [17]. Bardzo silne związki chemiczne (mocznik i dwusiarczek sodowy) rozkładają ochratoksynę A tylko od 60 do 71 %.

Dodatek tych związków do paszy może jednak wpłynąć ujemnie na zwierzęta monogastryczne, a więc na świnię i drób [46].

Do metod eliminacji należy także usuwanie mikotoksyn ze skażonych pasz za pomocą organicznych lub nieorganicznych adsorbentów (detoksykantów), które poprzez swoje fizyczne i chemiczne właściwości powinny wiązać mikotoksyny w paszy oraz w warunkach środowiska przewodu pokarmowego. Należy jednak podkreślić, że ich stosowanie nie jest jak dotąd dozwolone na terenie Unii Europejskiej [16; 32]. Do znanych adsorbentów zalicza się substancje o właściwościach sorpcyjnych jak glinokrzemiany, tlenek glinu, zeolit, kaolin, bentonit i inne. Adsorbują one mikotoksyny w porach struktury krzemianów [33]. Metod tych nie uważa się za wystarczająco skuteczne w odniesieniu do ochratoksyny [17, 47], choć w badaniach żywieniowych drobiu wykazano pozytywny efekt preparatów Mycofin[®] oraz Sorbix[®] (którego główny składnik stanowią glinokrzemianach) na obniżenie szkodliwego wpływu OTA [48-49]. Istnieją jednak obawy, że dodatki te mogą wywierać negatywny efekt na biodostępność minerałów, a ponieważ mają one także zdolność do wiązania wody, tym samym blokują przyswajalność części witamin rozpuszczalnych w wodzie. [50]. Istotną redukcję zawartości OTA w krwi i tkankach świń zaobserwowano, stosując węgiel aktywowany. Brak takich rezultatów odnotowano w doświadczeniach z zastosowaniem glinokrzemianów, bentonitu czy komórek drożdży [47].

Ostatnie doniesienia naukowe wskazują na duży potencjał wiązania mikotoksyn przez frakcje D-glukanów komórek drożdży za pomocą wiązań wodorowych oraz sił van der Waals'a [50]. Nowoczesne podejście badaczy obejmuje poszukiwanie substancji pochodnych pod względem struktury do OTA lub o wysokim powinowactwie do białek surowicy krwi, które mogą wypierać OTA z połączeń z proteinami i przyspieszać jej eliminację [16]. Sugeruje się, że aspartam może ograniczać toksyczność OTA poprzez mechanizm kompetycyjny, bowiem jego struktura jest zbliżona do rodziny tej grupy mikotoksyn [12]. Istnieją także próby identyfikacji związków chemicznych, które hamują syntezę OTA przez pleśnie i występują naturalnie w przyprawach. Znane są właściwości antyfungistatyczne piperyny izolowanej z pieprzu czarnego (*Piper niger*) oraz piperlonguminy z *P. longum.*, sezaminy i kurkuminy, które to związki hamują także biosyntezę OTA przez szczepy *A. alliaceus* i *A. sclerotium* oraz oregano, mięty, bazylii, szalwii i kolendry [32, 51]. Do nowych intensywnie badanych strategii należą także stosowanie antyoksydantów m.in. kwasu wanilinowego oraz 4-hydroksybenzoesowego, a także olejków eterycznych z gatunków roślin *Thymus vulgaris* oraz *Aframomum danielli*. Próbuje się także stosować dodatki antyoksydantów, których celem jest obniżenie negatywnego efektu powodowanego przez OTA [31].

Istnieją programy genetyczno-hodowlane mające na celu wytworzenie nowych odmian o mniejszej podatności na porażenie grzybami strzępkowymi. Poszukuje się form opornych w bankach genów, ale problem stanowi wprowadzenie nowej cechy do genetycznego tła odmian, które dają wysokie plony i cechują się dużą wartością technologiczną. Współczesna inżynieria genetyczna dysponuje co najmniej kilkoma możliwościami modyfikacji genetycznych, które mogą prowadzić do zwiększonej produkcji białek o właściwościach antyfungistatycznych oraz wzmacniania wła-

snych mechanizmów obronnych roślin lub hamowania syntezy enzymów grzybów strzępkowych odpowiedzialnych za produkcję mikotoksyn [5, 31].

Prostym przykładem biologicznej metody obniżania ochratoksyny A w paszy jest jej wymieszanie z materiałem nieskażonym. Takie postępowanie nie ogranicza jednak ryzyka ponownego rozwoju grzybów strzępkowych i produkcji przez nie mikotoksyn, dlatego w najnowszych metodach biologicznych wykorzystuje się naturalne zdolności mikroorganizmów do dekontaminacji pasz i żywności [17].

6. Biologiczne metody obniżania stężenia OTA

6.1. Dekontaminacja ochratoksyny A w paszach przez bakterie fermentacji mlekowej

Ogólnie wiadomo, że wyselekcjonowane szczepy LAB oraz fermentowane produkty żywnościowe wykazują efekty antymutagenne w stosunku do metali ciężkich (kadm, ołów), amin aromatycznych, policyklicznych węglowodórów aromatycznych i cyjanotoksyn, a także mikotoksyn [4, 52-54]. Jelitowe oraz izolowane ze środowisk roślinnych szczepy LAB są w stanie eliminować takie mikotoksyny jak: ochratoksynę A, patulinę, aflatoksyny oraz toksyny fuzaryjne jak deoksynivalenol, zearalenon i fumonizyny B₁ i B₂ [4, 53, 55-57].

Większość doniesień naukowych dotyczy zdolności do eliminacji aflatoksyny przez mikroorganizmy. Tylko nieliczne doniesienia naukowe traktują zagadnienia mikrobiologicznej degradacji ochratoksyny A. Wśród drobnoustrojów zdolnych do eliminacji OTA są wybrane szczepy LAB z rodzaju *Lactobacillus* (m. in. *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* i *L. rhamnosus*). Większość z nich obniża zawartość ochratoksyny A tylko o około kilkanaście procent. Wyjątkiem są szczepy, które powodują spadek OTA w środowisku o ponad 50% [36, 58].

Znaczna większość szczepów LAB zdolnych do eliminacji OTA jest także niewrażliwa na obecność OTA w badanym przedziale stężeń mikotoksyny od 5 ppb do 500 ppb. Jednak szczepy, które cechują się tą samą wrażliwością w stosunku do mikotoksyny, mogą znacznie różnić się stopniem jej degradacji w środowisku [8, 46, 58]. Prowadzone są różnorodne badania w kierunku określenia optymalnych warunków tego zjawiska. Grupa naukowców z Austrii wykazała, że na poziom eliminacji OTA przez badane szczepy wpływały: pH podłoża, liczba bakterii oraz stężenie samej mikotoksyny [4]. Do innych czynników, które wpływają na dekontaminację OTA przez szczepy LAB wymieniane są: faza wzrostu komórek bakteryjnych, czas inkubacji, rodzaj medium hodowlanego lub matrycy [45, 59].

Zdolność do obniżania zawartości OTA przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jest właściwością szczepową [58-60]. Szczepy zdolne do obniżania zawartości ochratoksyny A, nie koniecznie muszą być efektywne w degradacji innej grupy mikotoksyn, co wykazano na przykładzie patuliny i ochratoksyny A. Jedynie dwa spośród 30 badanych szczepów LAB (*L. plantarum* oraz *L. curvatus*) powodowały identyczną redukcję obu toksyn, co może być wynikiem różnic w chemicznej budowie poszczególnych mikotoksyn, skutkując różnym mechanizmem molekularnym ich eliminacji [4]. Istnieją dwie hipotezy odnośnie mechanizmu ob-

niżania stężenia OTA przez bakterie fermentacji mlekowej: transformacja metaboliczna oraz adsorpcja do ściany komórkowej [8, 58].

Wykazano, że zarówno martwe jak i żywe komórki szczepów *Lactobacillus rhamnosus* GG i LC-705 mają zdolność do wiązania OTA, co sugeruje mechanizm wiązania toksyny do elementów ściany komórkowej. Dodatkowo ci sami autorzy podają, że zauważyli istotne różnice w eliminacji OTA przez żywe komórki szczepów LAB oraz komórki traktowane kwasem i poddawane działaniu wysokiej temperatury [52]. Mateo i in. podają odmienne rezultaty, dowodząc, że w przypadku komórek *Oenococcus oeni* nie obserwuje się korelacji pomiędzy żywotnością a wiązaniem mikotoksyny przez komórki bakterii, choć wskazują na szczepozależność badanej cechy [45].

Według Gwiazdowskiej i in. komórki inaktywowane termicznie były zdolne do efektywniejszej eliminacji toksyn fuzaryjnych, co sugerowało, że usuwanie niwalenolu, deoksynivalenolu oraz zearalenonu odbywa się także na drodze adsorpcji do powierzchni komórek [4, 13]. Wysoka temperatura prowadzi do denaturacji białek, powstawania produktów reakcji Maillarda oraz do generowania porów w strukturze ściany komórkowej. Środowisko kwaśne może skutkować uwalnianiem monomerów z białek i polisacharydów, a rozpad wiązań glikozydowych prowadzi do powstania aldehydów. Oba te procesy skutkują zwiększaniem liczby miejsc wiążących OTA, stąd możliwe jest skuteczniejsze wiązanie mikotoksyn przez komórki inaktywowane termicznie [61, 62].

Mechanizm adsorpcji ochratoksyny A przez elementy ściany komórkowej bakterii fermentacji mlekowej jest najprawdopodobniej podobny do tego obserwowanego u drożdży z rodzaju *Saccharomyces* i polega na tworzeniu wiązań wodorowych oraz sił van der Waals'a [50]. W procesie wiązania bierze udział warstwa peptydoglikanu oraz polisacharydów, ale nie wyklucza się także udziału pewnych białek ściany komórkowej. Siła wiązania pomiędzy OTA a elementami komórek szczepów LAB jest dość słaba i w wyniku jednego płukania biomasy bakteryjnej odpowiednim buforem można łatwo odzyskać od 31,50 do 55,28% toksyny. Pozostała część cząsteczek jest jednak związana silniej i ich odzyskanie jest niemożliwe [59]. Ponadto proces eliminacji OTA przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej ze środowiska jest częściowo odwracalny [8, 16, 45, 58], stąd istnieje konieczność badań, których celem jest ocena siły wiązania OTA z elementami komórek mikroorganizmów.

Dekontaminacja drogą adsorpcji jest jednak procesem, który nie generuje powstawania innych toksycznych produktów, stąd stanowi ważne walory praktyczne [63]. Szczepy LAB zmniejszają cytotoxicywność OTA w badaniach *in vitro* na ludzkiej linii komórek wątrobowych HepG2, co wskazuje na efektywność obserwowanego procesu redukcji ilości OTA w środowisku [4]. Jest to ważne spostrzeżenie, gdyż niekoniecznie obserwuje się takie zjawisko w przypadku innych mikotoksyn np. na drodze biotransformacji m.in. aflatoksyn i zearalenonu mogą powstawać pochodne o wyższej toksyczności [16, 56].

Niektóre doświadczenia wskazują, że nie jest możliwe zbilansowanie ilości OTA usuniętej na drodze wiązania do składników ściany komórkowej oraz ilości toksyny pozostałej w środowisku. Sugeruje to istnienie innego mechanizmu jej eliminacji [8, 58]. Fuchs i in. w publikacji z 2008 roku uzyskali wyższe poziomy eliminacji OTA dla żywych komórek. Z kolei inne badania potwierdziły brak

zdolności enzymatycznej degradacji OTA przez szczepy winiarskie LAB: *L. brevis* i *L. plantarum* [59]. Wiadomo jednak, że enzymatyczna detoksykacja ochratoksyny A występuje wśród mikroflory żwacza i odbywa się poprzez hydrolyzę wiązania peptydowego z uwolnieniem feniloalaniny [64].

Wobec tak sprzecznych informacji należy przypuszczać, że nie tylko ilość eliminowanej mikotoksyny, ale także sam mechanizm obniżania zawartości OTA w środowisku może być zależny od badanego szczepu LAB.

Prace badawcze dotyczące biologicznej inaktywacji ochratoksyny A i hamowania rozwoju grzybów toksynotwórczych prowadzone są nadal w wąskim zakresie i obejmują przede wszystkim procesy fermentacyjne [16]. Przykładami praktycznego zastosowania mikroorganizmów są biopreparaty szczepów LAB przeznaczone do kiszenia pasz (kukurydzy, runi łąkowej), hamujące rozwój pleśni oraz drożdży, poprawiające stabilność tlenową kiszonek, a tym samym zastępujące m.in. popularny konserwant chemiczny - benzoosan sodu [1]. Kiszenie jest jednym z podstawowych sposobów konserwacji pasz, a ilość bakterii fermentacji mlekowej obecnych w surowcu roślinnym jest często wystarczająca do zapoczątkowania fermentacji. Dodatek kultury starterowej zapewnia nam jednak wysoką jakość przygotowanej paszy, a odpowiednia selekcja umożliwi dobór szczepów LAB o specjalnych właściwościach [65-66]. Efekty synergicznego działania omawianej grupy mikroorganizmów potwierdzają coraz to nowe badania modelowe [58, 67, 68].

6.2. Dekontaminacja ochratoksyny A przez inne mikroorganizmy

Zdolność do obniżania zawartości ochratoksyny A jest cechą właściwą nie tylko bakteriom z rodzaju *Lactobacillus*, ale także innym szczepom LAB z rodzaju *Streptococcus* oraz *Bifidobacterium* [4, 8, 58, 63], a także mikroflorze bakteryjnej jelita ślepego szczurów oraz jelita ludzkiego [69]. Ochratoksyna A ulega biotransformacji w przedżołądkach przeżuwaczy najprawdopodobniej dzięki obecnym tam pierwotniakom, choć gatunki odpowiedzialne za ten proces nie zostały jak dotąd zidentyfikowane. Bydło jest dzięki temu mniej wrażliwe na mikotoksyny w porównaniu do świń czy drobiu [15, 64, 69].

Tab. 1. Mikroorganizmy zdolne do obniżania zawartości ochratoksyny A

Tabela. 1. *Microorganisms with the ability of reducing the content of ochratoxin A*

Bakterie <i>Bacteria</i>	Drożdże <i>Yeast</i>	Pleśnie <i>Mould</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	<i>Candida sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Cryptococcus spp.</i>	<i>Aspergillus spp.</i>
<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Pichia sp.</i>	<i>Botrytis spp.</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<i>Eubacterium sp.</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<i>Pleurotus sp.</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
<i>Phenylobacterium immobile</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Trichosporon spp.</i>	

Petchkongkaew i in. dowiedli detoksykacyjnych właściwości laseczek *Bacillus spp.* w stosunku do OTA oraz AFB₁ [69]. Do grupy bakterii o zdolnościach do eliminacji OTA należą także szczepy gatunków: *Butyrivibrio fibrisolvens* [70], *Acinetobacter calcoaceticus* [71], *Escherichia coli* [16] czy *Phenylobacterium immobile* [8, 58].

Wykazano, że szczepy drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* są zdolne do degradacji OTA w zakwasie piekarskim [8] oraz szczepy *S. cerevisiae* i *S. bayanus* do obniżania zawartości OTA w winie. Na uzyskane rezultaty ma wpływ początkowa liczba komórek drożdży. Bejaoui i in. nie obserwowali zmian stężenia zaadsorbowanej toksyny po czasie 5 minut. Nawet po 72 h inkubacji poziom OTA związanej przez drożdże wynosił niezmiennie ok. 90%. Brak produktów metabolizmu mikotoksyny daje podstawę do założenia hipotezy, że za efekt obniżania stężenia OTA w płynie pochodzącym odpowiedzialny jest mechanizm niespecyficznego adsorpcji (w przeciwieństwie do wiązania toksyny killerowej) do składników ściany komórkowej (glukanu, mannanu, białek i tłuszczu) poprzez wiązania wodorowe, jonowe oraz interakcje hydrofobowe [63]. Teorię tę potwierdza brak obecności metabolitów hipotetycznego rozkładu enzymatycznego toksyny. Pewną rolę w eliminacji OTA przez komórki drożdży mogą mieć także związki fenolowe [72].

Skrining czterdziestu szczepów z gatunków *Aspergillus carbonarius*, *A. japonicus* oraz *A. niger* przeprowadzony w syntetycznym soku winogronowym wykazał, że 77% badanych szczepów eliminowało OTA w co najmniej 30%. Szczepy *Aspergillus* potrafiły metabolizować OTA do nieznanymi produktami, choć nie istnieją dane potwierdzające obecności w komórkach grzyba enzymu karboksypeptydazy [61]. Do grzybów strzępkowych, które posiadają omawianą cechę zalicza się także niektóre szczepy z rodzajów *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* [16] oraz *Rhizopus stolonifer*, *R. oryzae* i *R. microsporus* [70]. Nawet szczepy *Pleurotus* (bocznia) i ich enzymy były zdolne do degradacji OTA [69].

Ciekawym przykładem jest doniesienie patentowe Schatzmayr i in., w którym autorzy prezentują metodę dekontaminacji pasz dla zwierząt na drodze mikrobiologicznej hydrolyzy wiązania peptydowego OTA przez drobnoustroje m.in. bakterie i drożdże: *Eubacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Rhodotorula spp.*, *Trichosporon spp.*, *Stenotrophomonas spp* [73]. Chociaż określone mikroorganizmy potwierdzają zdolność do obniżania zawartości OTA w warunkach eksperymentalnych, to brak jest wystarczających danych na temat ich praktycznego zastosowania. Co więcej poziomy eliminacji toksyny uzyskiwane na podłożach syntetycznych i w warunkach imitujących naturalne środowisko fermentacyjne różnią się między sobą ze względu na różne możliwości dyfuzyjne cząsteczek oraz ich kwasowość, która zwiększa jonizację grup aminowych w cząsteczce OTA i ułatwia jej adsorpcję [61, 63].

7. Literatura

- [1] Magnusson J., Schnürer J.: Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science and Technology, 16: 70-78, 2005.
- [2] Chełkowski J.: Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy. Wydawnictwo SGGW-AR, 5-21; 28-37, 1985.
- [3] Van Egmond H. P.: Natural toxins: risks, regulations and the analytical situation in Europe. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378: 1152-1160, 2004.

- [4] Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S.: Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1398-1407, 2008.
- [5] Chełkowski J.: Mikotoksyny i grzyby toksynotwórcze, jako istotny wskaźnik jakości żywności i pasz. *Polskie Drobniarstwo* 10: 22-27, 2008.
- [6] Richard E., Heutte N., Bouchart V., Garon D.: Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Animal Feed Science and Technology* 148: 309-320, 2009.
- [7] Sieńczuk W.: Toksykologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 712-714, 2002.
- [8] Piotrowska M., Żakowska Z.: The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Progress in Biotechnology, Food Biotechnology* 17: 307-310, 2000.
- [9] Żakowska Z., Stobińska H.: Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 124-131, 2000.
- [10] Suterska A. M., Zielińska K. J., Grzybowski R. A., Stecka K. M., Miecznikowski A. H., Kupryś M. P.: Wpływ wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* na ograniczenie skażenia pleśniami i ochratoksyną A kiszonek z runi łąkowej. *Journal of Research In Agricultural Engineering* 53 (4), 2009.
- [11] Richard J. L.: Some major mycotoxins and their mycotoxico-ses — An overview, *International Journal of Food Microbiology* 119: 3–10, 2007.
- [12] O'Brien E., Dietrich D.: Ochratoxin A: The continuing Enigma. *Critical Reviews in Toxicology*; 35: 33-53, 2005.
- [13] Gwiazdowska D., Czaczyk K., Gwiazdowski R.: Usuwanie wybranych mikotoksyn z podłoża przez bakterie fermentacji propionowej i mlekowej. IX Konferencja Naukowa: Mikotoksyny w żywności i paszach, Bydgoszcz, 65, 2008.
- [14] Amézqueta S., González-Peñas E., Lizarraga T., Murillo-Arbizu M., López de Cerain A.: A simple chemical method reduces ochratoxin A in contaminated cocoa shells. *Journal of Food Protection* 71(7): 1422-1426, 2008.
- [15] Kluczek J. P., Kojder A.: Mikotoksyny w zarysie. Wydawnictwo Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy, Bydgoszcz, 19-39, 90-103, 2000.
- [16] Grajewski J.: Możliwości inaktywacji ochratoksyny A w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* u kurcząt. Wydawnictwo Akademii Bydgoskiej im. Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz, 2003.
- [17] Baranowski A., Richter W. I. F., Grzybowski G.: Wybrane mikotoksyny występujące w paszach gospodarskich. *Prace i materiały zootechniczne. Monografie i rozprawy. Jastrzębiec*, 4: 57-77, 2003.
- [18] Petzinger E., Zeigler K.: Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23: 91-98, 2000.
- [19] Petzinger E., Weidenbach A.: Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science* 76: 245-250, 2002.
- [20] Grajewski J.: Mikotoksyny i grzyby pleśniowe. Zagrożenia dla człowieka i zwierząt. Wydawnictwo Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz, 9-15, 165-175, 2006.
- [21] McEvoy J. D. G.: Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chimica Acta*, 473: 3-26, 2002.
- [22] O'Brien M., O'Kiely P., Forristal P. D., Fuller H. T.: Quantification and identification of fungal propagules in well-managed baled grass silage and in normal on-farm produced bales. *Animal Feed Science and Technology*, 132: 283-297, 2007.
- [23] Richard E., Heutte N., Sage L., Pottier D., Bouchart V., Le-bailly P., Garon D.: Toxicogenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 2420–2425, 2007.
- [24] Amigot S. L., Fulgueira C. L., Bottai H., Basílico J. C.: New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biology and Technology*, 41:215-224, 2006.
- [25] Garon D., Richard E., Sage L., Bouchart V., Pottier D., Le-bailly P.: Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. *Journal of Applied Food Chemistry*, 54: 3479-3484, 2006.
- [26] O'Brien M., Nielsen K. F., O'Kiely P., Forristal P. D., Fuller H. T., Frisvad J. C.: Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9268-9276, 2006.
- [27] Czerwiecki L.: Ochratoxin A and other mycotoxins in Polish cereals and foods. *Mycotoxin Research*, 17A (2): 125-128, 2001.
- [28] Bancewicz E., Jarczyk A.: Mikotoksyny, aktualny problem. *Farmer*, nr 24, 2006.
- [29] Petryna M., Jadżyn B.: Zanieczyszczenie pasz ochratoksyną A w latach 2005-2007. IX Konferencja Naukowa: Mikotoksyny w żywności i paszach, Bydgoszcz, 40, 2008.
- [30] Richard E., Heutte N., Sage L., Pottier D., Bouchart V., Le-bailly P., Garon D: Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3479-3484, 2006.
- [31] Amézqueta S., González-Peñas E., Murillo-Arbizu M., López de Cerain A.: Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*, 20: 326-333, 2009.
- [32] Kabak B., Dobson A. W., Var I.: Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46 (8): 593-612, 2006.
- [33] Leroch R. : Mikotoksyny. *Farmer*, nr 19, 2007.
- [34] Schillinger U., Varela Villarreal J.: Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control*, 21: 107-111, 2010.
- [35] Sathe S. J., Nawani N. N., Dhakephalkar P. K., Kapadnis B.P.: Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2622–2628, 2007.
- [36] Dalie D. K. D., Deschamps A. M., Richard-Forget F.: Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins. *Food Control*, 21: 370-380, 2010
- [37] Axelsson L.: Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, Lactic Acid Bacteria. Microbial and Functional Aspects. Marcel Dekker Inc., Nowy Jork, 1-63, 2005.
- [38] Ray I. L., Bullerman B.: Preventing growth of potentially toxic molds using antifungal agents. *Journal of Food Protection*, 45 (10): 953-963, 1982.
- [39] Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M.: Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4084–4090, 2000.
- [40] Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J.: *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4322–4327, 2002.
- [41] Chung T. C., Axelsson L., Lindgren S. E., Dobrogosz W. J.: *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2: 137–144, 1989
- [42] Gourama H., Bullerman L. B.: Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 58: 1249–1256, 1995.
- [43] Gourama H., Bullerman L. B.: Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 34: 131–143, 1997.
- [44] Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer J., Kenne L.: Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus planta-*

- rum MiLAB 14. Applied and Environmental Microbiology, 69: 7554–7557, 2003.
- [45] Mateo E. M., Medina A., Mateo F., Valle-Algarra F. M., Pardo I.: Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. Food Control, 21: 23-28, 2010.
- [46] Jarczyk A.: Uwaga, mikotoksyny! Farmer, nr 9, 2006.
- [47] Huwig A., Freimund S., Kappeli O., Dutler H.: Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters, 122: 179-188, 2001.
- [48] Griessler K., Horea S.: Novel strategies to counteract the negative impact of deoxynivalenol and ochratoxin A on growing broiler chicken. IX Konferencja Naukowa: Mikotoksyny w żywności i paszach, Bydgoszcz, 61, 2008.
- [49] Pudyszak K., Majewska T.: Efektywność Sorbixu® w sytuacji żywienia kurcząt brojlerów paszą skażoną ochratoksyną A. IX Konferencja Naukowa: Mikotoksyny w żywności i paszach, Bydgoszcz, 63, 2008.
- [50] Jouany J. P.: Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. Animal Feed Science and Technology, 137: 342–362, 2007.
- [51] Lee S. E., Park B. S., Bayman P., Baker J. L., Choi W. S., Campbell B.C. (2007): Suppression of ochratoxin biosynthesis by naturally occurring alkaloids. Food Additives and Contaminants, 24(4): 391-397.
- [52] Haskard A., El-Nezami H. S., Kankaanpää P. E., Salminen S., Ahokas T.: Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 67 (7): 3086-3091, 2001.
- [53] Turbic A., Haskard A., Ahokas T.: Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. Food Additives and Contaminants, 19 (2):144-152, 2002.
- [54] Halttunen T., Collado M. C., El-Nezami H., Meriluoto J., Salminen S.: Combining strain of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. Letters in Applied Microbiology, 46: 160-165, 2007.
- [55] Niderkorn V., Boudra H., Morgavi D.P.: Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. Journal of Applied Microbiology, 10: 1849–956, 2006.
- [56] Niderkorn V., Morgavi D.P., Pujos E., Tissandier A., Boudra H.: Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. Food Additives and Contaminants, 24(4): 406-415, 2007.
- [57] Fazeli M. R., Hajimohammadali M., Moshkani A., Samadi N., Jamalifar H., Khoshayand M. R., Vaghari E., Pouragahi S.: Aflatoxin B₁ binding capacities of autochthonous strains of lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 72(1): 189-192, 2000.
- [58] Piotrowska M., Żakowska Z.: The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria. Polish Journal of Microbiology, 54: 279-286, 2005.
- [59] Del Prete V., Rodriguez H., Carrascosa A. V., Rivas B., Garcia-Moruno E., Munoz R.: In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 70(9): 2155–2160, 2007.
- [60] Kapturowska A., Stecka K., Zielińska K., Kupryś M.: Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania wartości ochratoksyny A w warunkach modelowych. IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów, Kraków, 2010.
- [61] Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A.: Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. FEMS Microbiology Letters, 255: 203-208, 2006.
- [62] Nunez Y. P., Pueyo E., Carrascosa V., Martínez-Rodríguez A. J.: Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system. Journal of Food Protection, 71 (7): 1496-1499, 2008.
- [63] Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A.: Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. Journal of Applied Microbiology, 97: 1038-1044, 2004.
- [64] Hult K., Teiling A., Gatenbeck S. (1976): Degradation of ochratoxin A by a ruminant. Applied and Environmental Microbiology, 443-444.
- [65] Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J.: Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. Applied Environmental Microbiology, 73(17): 5547-5552, 2007.
- [66] Zielińska K., Miecznikowski A.: Kultury starterowe bakterii fermentacji mlekowej do kiszenia pasz - od selekcji szczepów do aplikacji. Monografia, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa, 2008.
- [67] Potkański A., Zielińska K.: Wpływ synergicznego działania LAB i enzymów na przemiany węglowodanów w czasie kiszenia pasz. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Wykorzystanie bakterii mlekowych do otrzymywania produktów żywnościowych wysokiej jakości i o podwyższonej wartości odżywczej”, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa 2005.
- [68] Potkański A., Zielińska K.: Ocena efektywności działania biopreparatu bakteryjno-enzymatycznego w procesie kiszenia traw i mieszanek traw i lucerny. Materiały ze szkolenia: Upowszechnianie proekologicznych technologii produkcji bezpiecznych pasz jako formy aktywizacji obszarów wiejskich w zakresie rozwoju małych i średnich przedsiębiorstw. Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa, 35-37, 2001.
- [69] Petchkongkaew A., Taillandier P., Gasaluck P., Lebrihi A.: Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. Journal of Applied Microbiology, 104 (5):1495-1502, 2008.
- [70] Varga J., Péteri Z., Tábory K., Téren J., Vágvölgyi C.: Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. International Journal of Food Microbiology, 99: 321-328, 2005.
- [71] Hwang Ch., Draughon F. A.: Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. Journal of Food Protection, 57 (5): 410-414, 1994.
- [72] Cecchini F., Morassut M., Garcia Moruno E., Di Stefano R.: Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. Food Microbiology, 23: 411-417, 2006.
- [73] Schatzmayr G., Heidler D., Fuchs E., Binder E. M.: Microorganism for biological detoxification of mycotoxins, namely ochratoxins and/or zearalenons, as well as method and use thereof. United States Patent Application Publication. Pub. No. US 2004/0208956 A1, 2004.