



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA



Scienze Agrarie

Curriculum Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXX

**Approcci eco-sostenibili per il controllo
della contaminazione da ocratossina in alimenti destinati al
consumo umano e animale**

Dott.ssa Maria Grazia Farbo

<i>Coordinatore del Corso</i>	Prof. Antonello Cannas
<i>Referente di Curriculum</i>	Dott. Severino Zara
<i>Docente Guida</i>	Prof. Quirico Migheli
<i>Docente Tutor</i>	Dott.ssa Barbara Scherm

Anno Accademico 2016 - 2017



Università degli Studi di Sassari
Corso di Dottorato di ricerca in
Scienze Agrarie

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Agrarie dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2016/2017 - XXX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio cofinanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

La tesi è stata prodotta, altresì, grazie al contributo della Fondazione di Sardegna.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Agenti patogeni di natura fungina	1
1.2. Micotossine	1
1.3. Micotossicosi	3
1.3.1 Interventi finalizzati al contenimento delle contaminazioni da micotossine	4
1.4 Ocratossine	7
1.4.1. Tossicità dell'ocratossina	11
1.4.2. <i>Effetto nefrotossico</i>	11
1.4.3. <i>OTA biomarker</i>	12
1.4.4. <i>OTA nel sangue umano</i>	13
1.4.5. <i>OTA nei campioni di urine e tessuti</i>	13
1.4.6. <i>OTA nei campioni di latte materno umano</i>	14
1.4.7. <i>OTA nei campioni di origine animale</i>	14
1.5 Limiti di tolleranza dell'ocratossina	15
1.6 Strategie di riduzione dei livelli di contaminazione da ocratossina	19
1.6.1. <i>Meccanici fisici</i>	20
1.6.2. <i>Chimico-fisici</i>	21
1.6.3. <i>Chimici</i>	22
1.6.4. <i>(Micro)biologici</i>	23
1.7 Lotta biologica	23
1.7.1. <i>Lotta biologica</i>	25
1.7.2. <i>Micoparassitismo</i>	25
1.7.3. <i>Antibiosi</i>	26
1.7.4. <i>Competizione per spazio e nutrienti</i>	27
1.7.5. <i>Induzione di resistenza</i>	27

1.8 Agenti di contenimento biologico	28
1.9 I lieviti	29
1.9.1. Lieviti nella lotta biologica	30
1.9.2. Patogenicità dei lieviti	31
1.9.3. Impiego dei lieviti nelle biotecnologie	33
1.9.4. Assorbimento e biodegradazione	34
1.9.5. Micofumigazione	36
2. SCOPO DEL LAVORO	38
3. CAPITOLO I	40
Adsorbimento di ocratossina A nel succo d'uva mediante cellule di lievito immobilizzate in sfere di alginato di calcio	
3.1. Introduzione	41
3.2. Materiali e metodi	42
3.2.1. <i>Realizzazione di sfere di alginato di sodio con cellule di lievito</i>	42
3.2.2. <i>Adsorbimento dell'OTA</i>	43
3.2.3. <i>Time course dell'adsorbimento di OTA</i>	44
3.2.4. <i>Esame mediante microscopia elettronica a scansione</i>	44
3.2.5. <i>Purificazione dell'OTA dai campioni e analisi HPLC</i>	45
3.2.6. <i>Realizzazione di un prototipo di bioreattore</i>	46
3.2.7. <i>Analisi statistica</i>	46
3.3. Risultati	47
3.3.1. <i>Decremento dell'OTA</i>	47
3.3.2. <i>Il bioreattore quale potenziale strumento di decontaminazione</i>	48

Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilised in calcium alginate beads (Articolo pubblicato su <i>International Journal of Food Microbiology</i>)	50
4. CAPITOLO II	56
Effetto dei composti volatili organici prodotti da lieviti in <i>Aspergilli</i> produttori di ocratossina A	
4.1. Introduzione	57
4.2. Materiali e metodi	58
4.2.1. <i>Ceppi fungini e condizioni colturali</i>	58
4.2.2. <i>Inibizione della crescita fungina e produzione di OTA in vitro</i>	59
4.2.3. <i>Purificazione dell'OTA e analisi HPLC</i>	60
4.2.4. <i>Espressione genica in <i>Aspergillus carbonarius</i> MPVA566</i>	62
4.2.5. <i>Estrazione e analisi delle sostanze volatili prodotte dai lieviti</i>	64
4.2.6. <i>Analisi statistica</i>	65
4.3. Risultati	65
4.3.1. <i>I VOCs riducono crescita e sporificazione di <i>A. carbonarius</i> e <i>A. ochraceus</i> in vitro</i>	65
4.3.2. <i>I VOCs inibiscono la produzione di OTA in vitro</i>	66
4.3.3. <i>Effetto dei VOCs sul pathway biosintetico dell'OTA</i>	67
4.3.4. <i>Composizione dei VOCs prodotti da lieviti</i>	68

**Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing
Aspergilli (manoscritto inviato per la pubblicazione su *International
Journal of Food Microbiology*)** 69

5. DISCUSSIONE GENERALE 103

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI 111

1. INTRODUZIONE

1.1 Agenti patogeni di natura fungina

Le comunità fungine dei suoli ospitano specie patogene di una grande varietà di piante di interesse. Tra gli agenti patogeni più importanti in agricoltura, i funghi rivestono un ruolo di primo piano. Nel settore agricolo le malattie di origine fungina determinano gravi danni economici e possono manifestarsi sia durante la coltivazione in campo, sia negli stadi successivi. Sono numerose le specie di funghi responsabili delle infezioni. In particolare, per colture largamente diffuse come mais, frumento, soia, sono segnalate numerose specie micotossigene, appartenenti principalmente ai generi *Fusarium* e *Aspergillus*. Questi patogeni possono colpire in ogni fase del processo produttivo, dal campo alla raccolta, durante le operazioni di lavorazione, conservazione, trasporto e commercializzazione. L'incidenza e lo sviluppo delle malattie è determinata da diversi fattori: la suscettibilità della specie/cultivar, l'abbondanza dell'inoculo e la virulenza del patogeno, le tecniche di coltivazione, lo stato di maturazione del prodotto, le condizioni ambientali alla raccolta e quelle in fase postraccolta. Spesso le infezioni restano latenti e si riattivano dopo un tempo variabile, quando i patogeni riprendono la loro attività patogenetica provocando marciumi. I patogeni fungini responsabili di marciumi appartengono per lo più ai *phyla* ascomiceti (*Monilinia* spp., *Sclerotinia* spp.), zigomiceti (*Rhizopus* spp., *Mucor* spp.), mitosporici (*Monilia* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp.) e con minore frequenza agli oomiceti (*Pythium* spp., *Phytophthora* spp.), ai basidiomiceti e ad alcune specie batteriche (De Cicco et al., 2009; Lima e De Cicco, 2009).

1.2 Micotossine

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da alcune specie di funghi. Sono molecole generalmente a basso peso molecolare, con diverse strutture chimiche e origini biosintetiche, con diversi effetti biologici, determinati dalla grande varietà di specie fungine che le producono (Bennett e Klich, 2003). Le micotossine sono coinvolte nei meccanismi di competizione microbica, hanno attività antibiotica verso i

microrganismi competitori, e possono avere un effetto diretto sui tessuti dell'ospite (Castoria et al., 2008; Manners, 1993; Matta et al., 1996). A oggi sono conosciute più di 300 micotossine. Le aflatossine, i tricoteceni, lo zearalenone, le fumonisine, le ocratossine e la patulina, per la loro tossicità, sono riconosciute come le più importanti. Substrato di crescita e condizioni ambientali giocano un ruolo importante nella biosintesi delle micotossine con conseguente caratterizzazione di vari livelli di tossicità (Bourgeois et al., 1990).

Le specie fungine più rilevanti per diffusione e pericolosità appartengono ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. E' possibile distinguere i miceti micotossigeni in due gruppi: quelli che interessano la fase preraccolta (ad es. *Fusarium* e *Alternaria*) e il gruppo che interessa principalmente la fase di postraccolta, che comprende i generi *Aspergillus* e *Penicillium* (Battilani et al., 2008; Bottalico, 2002a; Matta, 1996).

Le micotossine rappresentano un pericolo per la salute dell'uomo e degli animali. Esse possono avere attività cancerogena, mutagena, nefrotossica, epatotossica, immunotossica e teratogena (Giuffrida, 2012; Refai, 1988). E' possibile riscontrare la presenza delle micotossine negli alimenti venuti a contatto con i funghi micotossigeni, anche dopo la morte di questi ultimi. Un valido intervento è quello di prevenire lo sviluppo fungino nelle materie prime, nei prodotti finiti e risanare con interventi mirati di riqualificazione del prodotto mediante detossificazione (Bottalico, 2002b; Machado, 2006). La produzione di micotossine è influenzata da fattori endogeni (il diverso potenziale tossigeno dei funghi) e da fattori esogeni quali acqua, temperatura, pH, qualità del substrato (Belli, 2016; Matta, 1996). Inoltre, la loro presenza è influenzata dalle condizioni climatiche e ambientali, dai generi di coltivazione e dalle pratiche di stoccaggio. Gli alimenti esposti a una contaminazione diretta sono soprattutto i cereali (mais, orzo, segale, riso, mais), la frutta secca, le spezie, il caffè e i semi ad alto contenuto lipidico (arachidi, semi di cotone e di girasole).

Le micotossine si possono ritrovare come residui o metaboliti tossici anche nei prodotti che derivano da animali alimentati con mangimi contaminati. In questo caso si può avere la contaminazione indiretta per l'uomo, che tuttavia riveste una notevole importanza, a causa degli elevati livelli di micotossine presenti nei cereali utilizzati per

la produzione di mangimi (Giuffrida, 2012). In Europa, la European Food Safety Authority (EFSA), visto il rischio per la salute umana, ha un ruolo fondamentale nella sicurezza alimentare. I regolamenti in materia di micotossine nascono, appunto, dalla valutazione del rischio tossicologico e dall'esposizione a tali sostanze. La World Health Organization (WHO), insieme al Joint Expert Committee on Food Additives (JEFCA) e la Food and Agriculture Organization (FAO), valuta periodicamente il rischio associato alle principali micotossine (aflatossine, ocratossina A, patulina, fumonisine, zearalenone, tricoteceni, ...) (WHO, 2002, 2006, 2011, 2013).

Molte ricerche sono finanziate alla elaborazione di strategie mirate al contenimento delle contaminazioni da micotossine negli alimenti destinati al consumo umano o animale. A prescindere da considerazioni di carattere sanitario, la presenza dei metaboliti secondari nei prodotti alimentari e nei mangimi determina danni economici all'agricoltura e intacca la competitività commerciale. Dunque, per poter mettere in atto un piano di prevenzione della contaminazione sia in pre che in postraccolta, è necessaria una combinazione di strategie, e l'impiego di agenti di biocontrollo capaci di ridurre gli effetti tossici dovuti alle micotossine e/o interromperne la biosintesi, a oggi appare una valida alternativa all'impiego di prodotti chimici.

1.3 Micotossicosi

Le micotossine, pur risalendo a tempi remoti, sono state scientificamente oggetto di studio a partire dal 1850, quando si dimostrò la correlazione tra l'ingestione di segale contaminata con sclerozi di *Claviceps purpurea* e la manifestazione di ergotismo. L'inizio della moderna micotossicologia è databile al 1960, anno in cui vennero identificate le aflatossine, prodotte da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e la loro presenza fu correlata alla "malattia X" del tacchino. Le micotossine, oltre ad essere molto diverse tra di loro dal punto di vista chimico, mostrano una notevole gamma di effetti biologici dovuti alla loro capacità di interagire con diversi organi e/o sistemi bersaglio (Hsieh, 1987). Per tale motivo esse possono essere immunotossine, dermatossine, epatotossine, nefrotossine e neurotossine, oppure sulla base del loro effetto cronico, sviluppano un potenziale mutageno, cancerogenico e teratogenico

(Krogh, 1974). Tutte queste attività biologiche sono dovute ad interazioni delle micotossine e/o ai loro derivati con DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici, costituenti di membrana (Hussein e Brasel, 2001). Gli effetti tossici osservati, possono dare origine a fenomeni patologici di tipo acuto ed il rischio maggiore risiede nel loro accumulo, che può scatenare sintomatologie di tipo cronico (Berry, 1988). Gli effetti tossici rilevati consentono di classificare le micotossicosi in acute primarie, dovute all'introduzione di micotossine in quantità elevate e in un periodo di tempo limitato; in croniche primarie e secondarie, patologie meno pericolose sul breve termine, difficilmente diagnosticabili nell'immediato (Bottalico, 2002b; Smith et al., 1994). I controlli ai quali le derrate alimentari vengono sottoposte per il monitoraggio delle contaminazioni sono numerosi, ma possono comunque verificarsi intossicazioni acute, sebbene quelle mortali siano rare (International Agency for Research on Cancer, IARC, 1993). Queste non creano solo danni alla salute umana, ma anche a quella degli animali e arrecare notevoli danni economici negli allevamenti e negli impianti zootecnici, dovuti a un calo nella fasi produttive e riproduttive (Grasso, 1983).

1.3.1 Interventi finalizzati al contenimento delle contaminazioni da micotossine

Sono necessari degli interventi per evitare che le derrate alimentari siano contaminate da funghi micotossigeni, poiché la mancata commercializzazione di prodotti caratterizzati da livelli superiori ai limiti di legge, ne comporta un danno economico, gravato anche dai costi per l'applicazione di strategie di prevenzione e/o decontaminazione. Sono importanti anche i risvolti sanitari e sociali dovuti al consumo di alimenti contaminati e la riduzione della produttività degli animali nutriti con mangimi contaminati (da Rocha et al., 2014). Per evitare che le derrate alimentari siano contaminate, è necessario predisporre condizioni sfavorevoli allo sviluppo dei funghi produttori e attuare degli interventi preventivi. E' importante monitorare tutti i fattori responsabili di tali contaminazioni.

Le basi dell'Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) sono: la prevenzione di possibili contaminazioni degli alimenti, promuovendo il concetto di prevenzione; l'analisi dei possibili pericoli verificabili in ogni fase del processo produttivo e nelle fasi successive come lo stoccaggio, il trasporto, la conservazione e la vendita o somministrazione al consumatore. Il sistema pone un importante accento sulla qualità alimentare, in particolare riguardo a salubrità e sicurezza; concetto che va oltre la semplice soddisfazione del consumatore, ma punta piuttosto alla tutela della salute pubblica. Questo protocollo aiuta nello stimare il livello di rischio che una contaminazione da micotossine, possa superare i limiti di legge (Cheli et al., 2008; Magan et al., 2006). Nonostante l'impiego di misure preventive, è difficile contrastare le colonizzazioni fungine, dunque sono necessari degli interventi di decontaminazione e detossificazione degli alimenti. In particolare la decontaminazione prevede la rimozione delle parti contaminate, mentre la detossificazione viene attuata mediante inattivazione o distruzione *in situ* delle micotossine. (Bata et al., 1999; Bottalico, 2000; Jalili et al., 2010; Jouany et al., 2007).

Per la decontaminazione possono essere impiegate tecniche manuali, quali l'ispezione sanitaria e la selezione manuale, oppure tecniche meccaniche, rappresentate da ventilazione, cernita, molitura o elettroniche con irraggiamento e scarto elettronico. Negli ultimi tempi la decontaminazione chimica, a causa di possibili modifiche organolettiche apportate al prodotto trattato, viene applicata in concomitanza con un'altra tecnica preventiva (Goughenour et al., 2017; Karlovski et al., 2016; Tata et al., 2001; Zhu et al., 2016).

L'alternativa alla decontaminazione è l'inattivazione delle micotossine rilevate nelle derrate alimentari. I sistemi applicabili possono essere di tipo fisico, chimico o biologico. I metodi fisici possono includere il calore, le radiazioni e l'assorbimento (Cenkowski et al., 2007; Huwig 2001; Jalili et al., 2010). Per i prodotti chimici impiegati nella detossificazione si preferiscono ammoniaca, idrossido di calcio e sodio (acidi, basi), perossido di idrogeno e ozono (agenti ossidanti), bisolfito (agente riducente), cloro, sali e formaldeide. Diversi estratti naturali di piante ed oli essenziali quali eugenolo, cannella, menta e altri composti chimici (fungicidi, erbicidi, e surfactanti) sono conosciuti per la loro capacità di prevenire l'azione micotossigena e

impedire la presenza, crescita e sporificazione dei miceti durante i periodi di postraccolta (Milićević et al., 2010; Pani et al., 2014, 2016). Inoltre, l'applicazione di estratti di piante e agenti chimici come il sodio bisolfito e cloro sembrano avere un potenziale nella detossificazione, purtroppo il loro uso riduce significativamente il valore nutrizionale dei prodotti alimentari, alterandone le caratteristiche, non favorendone il loro impiego. Allo stesso modo, occorre ricordare che il trattamento chimico su prodotti alimentari destinati al consumo umano non è ammesso da parte della Comunità Europea.

Recentemente, c'è stato un crescente interesse per la detossificazione biologica, la quale consiste nella degradazione o trasformazione in composti meno tossici delle micotossine, attraverso l'utilizzo di batteri, lieviti, piante o loro metaboliti. Richiede attenzione anche lo studio dei derivati della degradazione in modo da poter ottenere prodotti che conservino le proprietà organolettiche e nutrizionali. Numerosi sono gli studi che hanno dimostrato il ruolo di lieviti e batteri nel degradare le micotossine prodotte da funghi micotossigeni: numerosi ceppi sono stati selezionati quali agenti di lotta biologica, in ragione delle loro capacità detossificanti (Milićević et al., 2010; Sinha 1998; Varga et al., 2005).

Tra i microrganismi selezionati presso la Sezione di Patologia Vegetale del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Sassari sono stati individuati alcuni lieviti che, oltre a contrastare la presenza e la sporificazione di patogeni fungini sia in pre che in postraccolta, hanno dimostrato un'ottima capacità di assorbimento delle micotossine prodotte *in vitro* da funghi micotossigeni. Allo stesso tempo, i ceppi di lievito selezionati hanno dimostrato di essere capaci di liberare dei composti volatili organici in grado di bloccare la germinazione, la sporificazione e la produzione di micotossine, apportando un significativo contributo alla sicurezza alimentare dei prodotti destinati al consumo umano e animale. In particolare, possono essere citati *Candida intermedia* (isolato 253), *Cyberlindnera jadinii* (isolato 273), *Candida friedrichii* (isolato 778) e *Lachancea thermotolerans* (isolato 751), attivi contro *Penicillium expansum* e *Aspergillus* spp. produttori di ocratossina A (OTA).

1.4 Ocratossine

Le ocratossine costituiscono un gruppo di derivati dell'isocumarina strettamente correlati tra loro, legati al gruppo amminico della L- β -fenilalanina e classificati in base alla loro origine biosintetica come pentacetidi nell'ambito del gruppo dei polichetidi (Turner, 1971). Vengono classificate in ocratossine: A, B, C, α , β , 4R/S-idrossi ocratossina A, 10-idrossiocratossina A, ocratossina A aperta (OP-OTA) (Budavari, 1989; Pohland et al., 1982; Van der Merwe et al., 1965; Xiao et al., 1995) (Tabella 1). L'ocratossina A (Figura 1), il 7-carbossi-5-chloro-8-idrossi-3,4-dihydro-3Rmetil isocumarinamide della L- β -fenilalanina (Van der Merwe et al., 1965; Neshiem, 1969), è il metabolita secondario più importante e dotato di maggiore tossicità. Le ocratossine B e C sono i derivati, rispettivamente, declorurato ed etilestere dell'ocratossina A. L'OTB manca del gruppo cloridrico in posizione C-5 ed è dieci volte meno tossica dell'OTA; l'OTC invece possiede una struttura ed una tossicità simile a quella dell'OTA.

L'ocratossina A (OTA) è una delle micotossine più pericolose per la salute dell'uomo e degli animali (Jørgensen, 1998; Santos et al., 2009). Isolata e caratterizzata chimicamente nel 1965 (Van der Merwe et al., 1965), è stata riconosciuta per la prima volta in Sudafrica, come metabolita secondario prodotto da *Aspergillus ochraceus*, nella farina di mais contaminata artificialmente (Van der Merwe et al., 1965). Altre specie come l'*A. niger*, *A. carbonarius* sono riconosciute produttrici di OTA e, a partire dal 2004, sono stati isolati e identificati da campioni di caffè altre due specie micotossigene, l'*A. westerdijkiae* e l'*A. steynii*. Inoltre, l'ocratossina è prodotta anche dal genere *Penicillium*, in particolare, nel 1969, VanWalbeek isolò per la prima volta l'OTA dalla specie *P. viridicatum* (VanWalbeek et al., 1969).

L'ocratossina A è un composto cristallino poco colorato, che esibisce una fluorescenza blu sotto i raggi UV. Essa ha un punto di fusione di circa 90°C, e contiene approssimativamente una mole di benzene; dopo disseccamento per un'ora a 60°C il punto di fusione oscilla in un range di 168° – 173°C. E' poco solubile in acqua, altamente solubile in solventi polari, e in bicarbonato di sodio acquoso. In seguito ad idrolisi acida, essa produce fenilalanina ed un acido lattone otticamente attivo, l'ocratossina α (che rappresenta il metabolita inattivo dell'OTA). Gli esteri dell'ocratossina A (oltre alla già citata OTC) possiedono una tossicità simile a quella

dell'OTA, mentre la tossicità degli esteri dell'OTB è pressoché nulla (Ueno, 1987); l'OTa ed i derivati idrossilati dell'ocratossina A (4R/S-OH-OTA), invece, non risultano tossici; al contrario, la forma aperta dell'OTA sembra possedere una tossicità simile a quella dell'OTA (Xiao et al., 1996). Ulteriori ricerche hanno dimostrato che l'OTA ha azione nefrotossica, epatotossica, embriotossica, teratogena, neurotossica, immunotossica, genotossica e cancerogena in molte specie animali. Inoltre l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro, nel 1993, ha classificato l'ocratossina come un possibile cancerogeno umano (gruppo 2B) in seguito a diversi studi sulla cancerogenicità, sviluppati sugli animali (IARC, 1993).

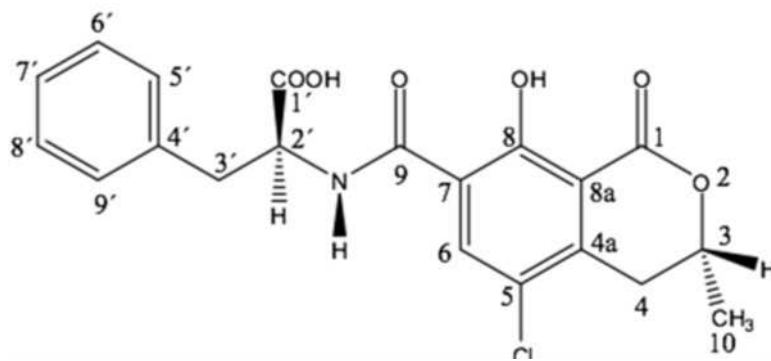


Figura 1. Struttura della ocratossina.

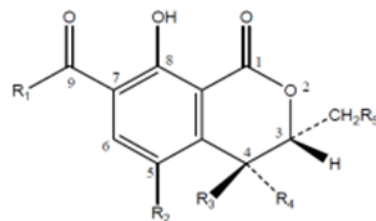


Tabella 1. Struttura chimica dell'OTA e i suoi derivati (Malir et al., 2016).

Metabolites	Abbreviations	MW	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Ochratoxin A	OTA	403	Phe	Cl	H	H	H	OH
Ochratoxin B	OTB	370	Phe	H	H	H	H	OH
Ochratoxin C	OTC	431	Phe Ethyl ester	Cl	H	H	H	OH
Ochratoxin α	OT α	256	OH	Cl	H	H	H	OH
Ochratoxin β	OT β	223	OH	H	H	H	H	OH
4R-hydroxy Ochratoxin A	4R-OHOA	419	Phe	Cl	H	OH	H	OH
4S-hydroxy Ochratoxin A	4S-OHOA	419	Phe	Cl	OH	H	H	OH
10-hydroxy Ochratoxin A	10-OHOA	419	Phe	Cl	H	H	OH	OH
Ochratoxin A open lactone	OP-OA	421	Phe	Cl	H	H	-	OH
Ochratoxin B open lactone	OP-OB	388	Phe	H	H	H	-	OH
Ochratoxin α open lactone	OP-OT α	274	OH	Cl	H	H	-	OH
Ochratoxin β open lactone	OP-OT β	241	OH	H	H	H	-	OH
Ochratoxin A quinone	OTQ	383	Phe	O	H	H	H	O
Ochratoxin A hydroquinone	OTHQ	385	Phe	OH	H	H	H	OH

Metabolites	Abbreviations	MW	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Conjugate Ochratoxin A quinone-glutathion	OTQ-Glutathion	689	Phe	O	H	H	H	O
Conjugate Ochratoxin A-acyl hexose	Acyl-hexose OTA	565	Phe acyl hexose	Cl	H	H	H	OH
Conjugate Ochratoxin A-acyl pentose	Acyl-pentose OTA	535	Phe acyl pentose	Cl	H	H	H	OH
Conjugate Ochratoxin A methyl ester	OTA-Me	417	Phe methyl ester	Cl	H	H	H	OH
Conjugate Ochratoxin B methyl ester	OTB-Me	384	Phe methyl ester	H	H	H	H	OH
Conjugate Ochratoxin B ethyl ester	OTB-Et	398	Phe ethyl ester	H	H	H	H	OH
4 <i>R</i> -hydroxy Ochratoxin A methyl ester	4 <i>R</i> -OHOA-Me	433	Phe methyl ester	Cl	H	OH	H	OH
10-hydroxy Ochratoxin A methyl ester	10-OHOA-Me	433	Phe methyl ester	Cl	H	H	OH	OH
Ethylamide Ochratoxin A	OE-OA	430	Phe ethyl amide	Cl	H	H	H	OH
Ochratoxin A decarboxylated	DC-OA	359	Phe decarboxylated	Cl	H	H	H	OH
Ochratoxin A <i>O</i> -methyl	OM-OA	417	Phe	Cl	H	H	H	OCH ₃
<i>d</i> -Ochratoxin A	<i>d</i> -OA	403	<i>d</i> -Phe	Cl	H	H	H	OH
Ochratoxin α ester methyl	M-O α	270	OCH ₃	Cl	H	H	H	OH
Tyrosine Ochratoxin A	OTA-Tyrosine	419	Tyrosine	Cl	H	H	H	OH

Maria Grazia Farbo – Approcci eco-sostenibili per il controllo della contaminazione da ocratossina in alimenti destinati al consumo umano e animale – Tesi di Dottorato in

Scienze Agrarie –

Curriculum “Biotecnologie microbiche agroalimentari “– Ciclo XXX

Università degli Studi di Sassari

Anno Accademico 2016 - 2017

1.4.1 Tossicità dell'ocratossina

1.4.2 *Effetto nefrotossico*

E' stato accertato che l'OTA è responsabile di nefropatie negli animali d'allevamento, in particolare suini e volatili. Nell'uomo, invece, essa è responsabile di alcune malattie renali, tra cui la nefropatia endemica dei Balcani (BEN), tumori renali che si sono registrati in alcune regioni della Penisola Balcanica (Fuchs et al., 2005; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002). Inoltre, la micotossina è responsabile di nefropatia interstiziale cronica, assai diffusa in Tunisia (Maaroufi et al., 1995) e in altri paesi del Nord Africa (Wafa et al., 1998).

Le lesioni renali sono state osservate a livello dei tubuli prossimali, con danneggiamento delle cellule epiteliali. All'esame istologico è possibile riscontrare una mancata integrità della membrana cellulare, alterazione delle dimensioni cellulari e della densità dell'orletto a spazzola nella parte apicale delle cellule del tubulo convoluto prossimale del rene. È visibile la condensazione della cromatina e la degradazione della membrana nucleare, con rigonfiamento della membrana tubulare e presenza di collagene (WHO, 1965). All'inizio la patologia BEN è caratterizzata da alterazione delle cellule epiteliali senza compromissione delle dimensioni dell'organo. Dopo un'esposizione assidua, i reni sono ridotti per dimensione e presentano una fibrosi interstiziale. Alla fine, la diminuzione della funzionalità renale porta all'alterazione dei parametri enzimatici (gamma-glutamyl-transferasi, fosfatasi alcalina, lattato deidrogenasi), al verificarsi della poliuria, insieme a sintomi quali: lingua rossa, sete, gusto amaro (Stefanović et al., 1991). Si registrano altri sintomi, quali cefalea, dolore lombare, astenia, anemia, creatinina sierica elevata e aumento delle immunoglobuline M (IgM) ed E (IgE) (Stefanović, et al., 1991).

Nel 1987, l'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha riclassificato l'OTA, inserendola nel gruppo 3 (non cancerogeno per gli esseri umani), ma sulla base dei nuovi studi condotti sugli animali nel 1993, l'OTA è stata definitivamente assegnata al gruppo 2, dunque sostanza potenzialmente cancerogena per l'uomo (IARC, 1976; 1983).

Ad oggi, si potrebbe rivedere la classificazione dell'OTA come agente più o meno cancerogeno, grazie a nuove informazioni riguardanti la genotossicità dell'OTA, come il suo ruolo nello stress ossidativo, o l'appartenenza alla classe di fattori epigenetici coinvolti nella carcinogenesi. Alla luce di tali dati, però, ancora non è possibile aggiornare la sua posizione dal gruppo 2B (potenzialmente cancerogeno per gli esseri umani) al gruppo 2A (probabilmente cancerogeno per gli esseri umani) o perfino al gruppo 1 (cancerogeno accertato per gli esseri umani).

1.4.3 *OTA Biomarker*

Il monitoraggio dell'ocratossina in campioni clinici è uno dei migliori approcci per poter valutare l'esposizione umana all'OTA. Negli anni '70 alcuni studi effettuati nella popolazione dei Balcani evidenziarono la presenza dell'OTA nel sangue umano (Degen, 2011; Hult et al., 1982). L'esposizione all'OTA, così come alle altre micotossine, è un problema che riguarda tutte le popolazioni a livello mondiale.

Recentemente l'esposizione a un biomarcatore è stata definita come parametro biologico correlato alla quantità di xenobiotici introdotti dall'uomo (Baldwin et al., 2011).

La ricerca di OTA nel latte (campionamento non invasivo), nel siero (campionamento invasivo), nelle urine (campionamento non invasivo) o nei tessuti renali, è considerata il biomarcatore per l'esposizione all'OTA (Duarte et al., 2011).

In uno studio condotto da Soto et al. nel 2016, i valori del biomarcatore rilevato nel sangue, latte materno e urine variavano, rispettivamente, da 0,15 a 18,0, da 0,002 a 13,1 e da 0,013 a 0,2 ng/mL. L'EDI (Estimated daily intake) ha registrato nel plasma valori di OTA compresi tra 0,15 e 26 ng/kg di peso corporeo/giorno e si è rivelato essere superiore a quello ottenuto nei campioni di urine (da 0,017 a 0,4 ng/kg di peso corporeo/giorno). Tutti questi valori sono stati correlati ad un range riscontrato in prodotti alimentari: (0,0001-25,2 ng/kg di peso corporeo/giorno) (Soto et al., 2016).

1.4.4 *OTA nel sangue umano*

Nel 1979 è stata messa a punto una tecnica per la determinazione dell'OTA nel sangue intero e nel siero umano (Castegnaro et al., 2006). L'ocratossina in questi campioni è un ottimo biomarcatore per segnalare e monitorare l'esposizione dell'uomo a questa micotossina, introdotta principalmente mediante assunzione di cibi e bevande contaminate. Infatti, grazie all'alta affinità che essa ha con l'albumina sierica e altre proteine, è possibile riscontrarne una lunga persistenza nella frazione sierica del sangue (Hult et al., 1982; Scott et al., 2005). La determinazione dell'OTA nel sangue è più affidabile rispetto ad una determinazione nelle urine, quest'ultima invece è consigliata per evidenziare le variazioni giornaliere nell'esposizione da parte di adulti e neonati (Gilbert et al., 2001; Turner et al., 2012).

1.4.5 *OTA nei campioni di urine e tessuti*

L'OTA può essere ritrovata dopo diversi giorni dalla sua assunzione. I valori riscontrabili sono molto bassi (valore medio compreso tra 20 e 80 ng/giorno) (Pfohl-Leskowicz et al., 2007; Ringot et al., 2006), indipendenti dalla dose della micotossina introdotta e variabili a seconda del sesso (Castegnaro et al., 2006). Il primo studio fu condotto nel Regno Unito da MacDonald et al. (2001). Questo studio, che prevedeva la raccolta delle urine nell'arco delle 24 ore, ha dimostrato una forte correlazione tra la concentrazione di ocratossina nell'urina e la sua assunzione dietetica. Inoltre, va ricordato che l'escrezione urinaria riflette principalmente una recente assunzione di micotossina, a differenza dei valori riscontrabili nel plasma/siero, i quali rappresentano un'esposizione a lungo termine (Turner et al., 2012). La presenza di OTA nei tessuti sembra essere una prova definitiva dell'esposizione umana alla micotossina, anche se la praticabilità di tali rilievi *in vivo* è ovviamente limitata (Malir et al., 2012). Diversi studi condotti in Europa sul contenuto di OTA nei reni umani, hanno rilevato non solo la presenza dell'OTA, ma anche dei suoi derivati come OTHQ, OTHQ-GSH, 4-OH OTA e OTB (Malir et al., 2016).

1.4.6 *OTA nei campioni di latte materno umano*

L'OTA viene escreta anche attraverso il latte materno, di conseguenza anche i bambini allattati al seno sono esposti a questa micotossina (Gareis et al., 1988). Tuttavia, le concentrazioni di OTA rilevate, sono fino a 10 volte inferiori di quelle segnalate nel sangue (Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993). Anche in Italia, sono state rilevate tracce di OTA nel latte proveniente da donne sane con diverse diete in diverse regioni geografiche (Micco et al., 1991). Anche in questo caso è probabile la correlazione tra la presenza di OTA nel latte umano e abitudini alimentari materne (Skaug et al., 2001).

1.4.7 *OTA nei campioni di origine animale*

L'ocratossina A è causa di malattie renali anche negli animali, in particolare nei suini, indicata come nefropatia suina. Soprattutto nei Paesi Scandinavi, questa malattia, comporta notevoli perdite economiche nella produzione di carni suine (Fink-Gremmels, 1999). Sebbene l'OTA sia stata indentificata come tossina nefrotossica, la perdita di produzione è dovuta anche agli effetti immuno soppressivi della micotossina, soprattutto in seguito a prolungata esposizione e/o assunzione. A causa della sua elevata affinità per le proteine del siero, l'ocratossina A ha un'emivita molto lunga e spesso si trova come residuo nella carne suina e nei prodotti a base di carne, destinati al consumo umano. Come misura preventiva, la carne contaminata viene distrutta per evitare l'esposizione dell'uomo ai residui della micotossina. Possono indurre tali effetti, concentrazioni di 220 ppb, mentre effetti nefrotossici nei suini, sono stati osservati solo con livelli superiori ai 1400 ppb nei mangimi (Fink-Gremmels, 1999; Krogh, 1987).

L'OTA è stata rilevata come agente compromettente per la fertilità nei cinghiali, e può essere teratogena a concentrazioni elevate. Infatti l'ocratossina è in grado di attraversare la barriera placentare, compromettendo la crescita fetale, con evidenti sintomi. La necrosi della coda nei piccoli è stata segnalata come conseguente esposizione all'ocratossina da parte della madre (Marquardt e Frohlich, 1992).

Negli Stati Uniti, invece, sono stati segnalati bassi tassi di crescita, maggior mortalità nel settore avicolo, alimentato con mangimi contaminati. Le indagini *post mortem*

rivelano tessuti necrotici a livello del tratto prossimale dei tubuli renali e segni di epatotossicità (Huff et al., 1988).

Nei ruminanti, il microbiota intestinale degrada l'ocratossina e al momento non sono riscontrabili segni di intossicazione da essa (Kiessling et al., 1984).

1.5 Limiti di tolleranza dell'ocratossina

A causa delle sue proprietà tossiche, l'OTA è soggetta a regolamentazioni legali sia a livello nazionale che internazionale. La tossicità di tale micotossina è diventata più o meno evidente alla fine degli anni '70. Un reale studio ed indagine se l'OTA sia presente nei cibi e negli alimenti destinati all'uso animale iniziò ad essere affrontato negli anni '90. Situazione diversa fu per altre micotossine, in particolare per l'aflatossina. Negli Usa, le prime regolamentazioni e limiti di legge vennero introdotti e applicati nei primi anni '60, in coincidenza con il suo primo ritrovamento negli alimenti, mentre la Comunità Europea ne regolò la presenza, istituendo dei limiti un decennio più tardi (FAO, 2003; Park et al., 2002).

Nel 1991, tra 60 paesi nei quali era prevista una regolamentazione per il rispetto dei limiti di tollerabilità delle micotossine, solo 11 avevano dei limiti per regolamentare l'ocratossina (Brasile, Cecoslovacchia, Danimarca, Francia, Grecia, Ungheria, Israele, Paesi Bassi, Romania, Svezia e Regno Unito) (Van Egmond, 2007). La FAO nel 2003 condusse un'indagine mondiale sulla regolamentazione legale delle micotossine, da allora il numero dei paesi virtuosi è aumentato sensibilmente (Van Egmond, 2007). Questo può essere dovuto al fatto che la ricerca ha fornito nuovi dati sugli effetti nocivi dell'OTA per l'uomo e per gli animali: inoltre, a causa della globalizzazione dei mercati, sono dovuti aumentare i controlli non solo a livello nazionale ma soprattutto internazionale. A titolo esemplificativo, la Cina sembra avere recentemente stabilito dei limiti per l'OTA sia per il settore alimentare umano che animale (Li et al., 2014).

Per quanto riguarda i limiti di OTA nei prodotti alimentari, questi sono stati stabiliti per la prima volta a livello comunitario con il provvedimento n. 472/2002 (European Union Commission Regulation, 2002) del 12 marzo 2002, modificando la n. 466/2001

(European Union Commission Regulation, 2001), fissando i livelli massimi per alcuni prodotti alimentari (Tabella 2). Quest'ultimo provvedimento è stato ripetutamente modificato e nel 2006 è stato sostituito da un nuovo atto, il n. 1881/2006 del 19 dicembre 2006, che stabilisce modifiche ai limiti massimi tollerabili di micotossine (European Union Commission Regulation, 2006). L'adozione del regolamento n. 1881/2006 si è basata sul parere della sezione scientifica sui contaminanti riguardanti la catena alimentare dell'EFSA (European Food Safety Authority), adottato il 4 aprile 2006 (Verstraete, 2006). Nell'Unione Europea il regolamento 1881/2006 è stato modificato varie volte, ma rimane ad oggi ancora in vigore. Dal febbraio 2016 tale regolamento stabilisce i limiti massimi di OTA non solo per i cereali (prodotti a base di cereali e cereali non trasformati), ma anche per un'ampia varietà di altri alimenti e merci (Tabella 2). Tutti gli stati membri sono tenuti ad applicare integralmente tali regole. Per di più l'Unione Europea dal 2002 ha unificato i metodi di campionamento e le analisi utili al fine del controllo ufficiale dei livelli di micotossine nei prodotti alimentari. Per quanto riguarda i prodotti destinati al consumo animale finora esistono solo delle raccomandazioni non vincolanti, si ha una situazione diversa per i cereali e i mangimi destinati ai suini e al pollame (Commission Recommendation 2006/576/EC del 17 agosto 2006 relativa alla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, OTA, T2, HT2 e fumonisine) (European Union Commission Recommendation, 2006), Tabella 3.

Tabella 2. Livelli massimi di OTA accettabili nei prodotti alimentari secondo la regolamentazione 1881/2006 in vigore.

Code	Foodstuffs	Maximum Levels (ng/g)
2.2.1	Unprocessed cereals	5.0
2.2.2	All products derived from unprocessed cereals, including processed cereal products and cereal intended for direct human consumption with the exception of foodstuffs listed in 2.2.9, 2.2.10, 2.2.13	3.0
2.2.3	Dried vine fruit (currants, raisins, sultanas)	10.0
2.2.4	Roasted coffee beans and ground roasted coffee, excluding soluble coffee	5.0
2.2.5	Soluble coffee (instant coffee)	10.0
2.2.6	Wine (including sparkling wine, excluding liqueur wine and wine with an alcoholic strength of not less than 15 vol %) and fruit wine	2.0
2.2.7	Aromatized wine, aromatized wine-based drinks, and aromatized wine-product cocktails	2.0
2.2.8	Grape juice, concentrated grape juice as reconstituted, grape nectar, grape must as reconstituted, intended for direct human consumption	2.0
2.2.9	Processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children	0.50
2.2.10	Dietary foods for special medical purposes intended specifically for infants	0.50
2.2.11	Spices, including dried spices <i>Piper</i> spp. (fruits thereof, including white and black pepper), <i>Myristica fragrans</i> (nutmeg), <i>Zingiber officinale</i> (ginger), <i>Curcuma longa</i> (turmeric)	15

Maria Grazia Farbo – Approcci eco-sostenibili per il controllo della contaminazione da ocratossina in alimenti destinati al consumo umano e animale – Tesi di Dottorato in

Scienze Agrarie –

Curriculum “Biotecnologie microbiche agroalimentari “– Ciclo XXX

Università degli Studi di Sassari

Anno Accademico 2016 - 2017

Code	Foodstuffs	Maximum Levels (ng/g)
	<i>Capsicum</i> spp. (dried fruits thereof, whole or ground, including chilies, chili powder, cayenne, and paprika)	20
	Mixtures of spices containing one of the abovementioned spices	15
2.2.12.	Liquorice (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> and other species)	15
2.2.12.1.	Liquorice root, ingredient for herbal infusion	20
2.2.12.2.	Liquorice extract for use in food in particular beverages and confectionary	80
2.2.13.	Wheat gluten not sold directly to the consumer	8.0

Tabella 3. Valori di riferimento del contenuto di OTA secondo Commission Recommendation 2006 /576 / EC.

Feed	Guidance Value in mg/kg Relative to Feedstuffs with a Moisture Content of 12%
Feed materials- Cereals and cereal products	0.25
Complementary and complete feedstuffs	
Complementary and complete feedstuffs for pigs	0.05
Complementary and complete feedstuffs for poultry	0.1

Tuttavia, si riscontrano ancora situazioni in cui non esistono dei limiti vincolanti per l'OTA negli alimenti e nei mangimi, ed è il caso degli Stati Uniti. Fa ancor più riflettere il fatto che nessun consiglio o autorità statunitense abbia stabilito una normativa con dei limiti di tollerabilità. Invece la US Food and Drug Administration (FDA), che agisce sotto la Federal Food Drug and Cosmetic Act (FFDCA), prevede l'adozione di buone pratiche agricole e di produzione, la messa in atto di piani per la sicurezza alimentare da parte delle imprese del settore alimentare (Park et al., 2002). Un approccio analogo a quello degli USA è stato adottato da una serie di altri Paesi, come ad esempio Australia, Canada e Giappone (Batt et al., 2014). Per alcuni è preferibile l'approccio statunitense per la regolazione delle micotossine, compresa l'OTA, anche se potrebbe essere causa di attriti commerciali, ma allo stesso tempo sarebbe in grado di ridurre delle perdite economiche dovute a dei prodotti contaminati e a degli standard divergenti (Wu, 2006). Dunque a distanza di cinquant'anni dalla scoperta dell'OTA, le differenze di come regolarne la presenza nei cibi, sono ancora oggi in continuo sviluppo.

1.6 Strategie di riduzione dei livelli di contaminazione da ocratossina

Diverse strategie possono essere impiegate per ridurre i livelli di OTA negli alimenti e nelle derrate. Gli interventi più importanti sono quelli di carattere preventivo, in quanto evitano, in primo luogo, la contaminazione delle merci. L'utilizzo di buone prassi agricole, varietà di colture resistenti ai funghi, la corretta applicazione dei fungicidi e, soprattutto, l'immagazzinamento delle merci in condizioni adeguate, sono misure che potrebbero idealmente far parte di un Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP), per minimizzare la presenza di ocratossina nei punti di controllo critici della catena di approvvigionamento alimentare. Tuttavia, gli schemi HACCP pienamente attuati sono rari e quando le singole misure non riescono o non sono messe in atto, l'OTA resta nei prodotti alimentari e nei mangimi destinati al consumo animale.

La soluzione ideale per ridurre il rischio per la salute umana e animale è quella di prevenire la contaminazione degli alimenti, anche se questa non può essere completamente evitata. Pertanto, si è focalizzata l'attenzione su approcci utili nel

rendere ancora utilizzabili materie contaminate, come la disintossicazione da ocratossina negli alimenti e l'inibizione dell'assorbimento nel tratto gastrointestinale.

Il processo di decontaminazione di ocratossina deve soddisfare i seguenti criteri (Kebak et al., 2006):

- distruggere, inattivare o rimuovere l'OTA;
- bloccare la crescita vegetativa e la sporificazione del micete micotossigeno;
- non produrre o lasciare residui tossici, cancerogeni o mutageni nei prodotti finali o nei prodotti alimentari ottenuti da animali alimentati da mangimi decontaminati;
- non pregiudicare le proprietà fisiche e sensoriali desiderate del prodotto;
- deve essere tecnicamente ed economicamente fattibile.

Sono disponibili diverse strategie e possono essere classificate come approcci fisici, fisico-chimici, chimici e (micro) biologici (Amezqueta et al., 2009).

1.6.1 *Meccanici fisici*

Gli approcci fisici utilizzati per la disintossicazione da OTA sono costituiti da processi di segregazione, smistamento, pulizia, peeling, trattamento termico, trattamento ultrasonico e irraggiamento, tutte tecniche che mirano a rimuovere le frazioni più contaminate delle materie prime. Possono anche coinvolgere l'utilizzo di adsorbenti, additivi nutrizionali che assorbono l'OTA e quindi ne riducono la biodisponibilità. Nell'Unione europea è vietata la diluizione con prodotti alimentari non contaminati. L'OTA è una molecola moderatamente stabile. Può sopravvivere alla maggior parte delle lavorazioni alimentari, come la tostatura (Krogh et al., 1974; Scott et al., 1996). La pulitura del grano può portare ad una riduzione di oltre il 50% della concentrazione OTA, mentre la macinazione del grano duro per la produzione di farina bianca comporta una riduzione del 65% e una ulteriore diminuzione del 10% durante la cottura (Osborne et al., 1996).

La molecola dell'ocratossina è generalmente stabile a temperature utilizzate durante una normale cottura. Boudra et al. (1995) ha mostrato che l'OTA è stabile ad alte temperature e occorrono più di 10 ore (700 min) e 200 min per decomporre il 50% di OTA nel grano secco, rispettivamente a 100 °C e 150 °C. Tuttavia, a causa delle alte

temperature utilizzate per la torrefazione del caffè, è stata osservata una maggiore percentuale di distruzione, anche se sono stati riportati risultati contraddittori in diversi studi.

Durante la produzione di caffè, la macinazione comporta perdite OTA del 20%, mentre il vapore promuove una rimozione di OTA, pari a circa 25% in meno (Blanc et al., 1998; Heilmann et al., 1999). Per quanto riguarda la preparazione della birra, Pérez de Obanos et al. (2005) ha sottolineato che, a seconda del metodo di preparazione, le perdite dell'OTA variano in un intervallo del 15-50%. Un ulteriore esempio di trattamento fisico può essere rappresentato dall'impiego di ultrasuoni a intermittenza su cereali in un mezzo acquoso integrato con alcol e alcali ad una temperatura di 12-50 °C (Lindner et al., 1996). A fine trattamento i prodotti di cereali decontaminati o i prodotti trattati, rimangono sostanzialmente invariati rispetto al loro aspetto, sapore e valore nutritivo.

1.6.2 *Chimico-fisici*

Un altro approccio per la rimozione delle micotossine da prodotti contaminati, implica l'impiego di materiali adsorbenti, capaci di legare e immobilizzare l'ocratossina. Gli agenti adsorbenti possono essere classificati in diversi gruppi in base alla loro origine: minerali (ad esempio, aluminosilicati), carboni attivi, adsorbenti biologici (ad esempio, pareti cellulari, batteri, o fibre vegetali) e adsorbenti sintetici, comprese le argille naturali modificate (ad es., gruppi di ammonio quaternario) e resine sintetiche (ad esempio, polivinilpirrolidone, colestiramina). Tali materiali sono stati valutati principalmente per ridurre la contaminazione OTA nel vino e nei mosti (Castellari et al., 2001; Visconti et al., 2008).

Bejaoui et al. (2004) ha utilizzato con successo ceppi di *Saccharomyces* inattivati per ridurre il contenuto di OTA nei succhi d'uva. I loro risultati hanno mostrato che i trattamenti con calore e acidi e con l'aggiunta di lieviti, apportavano una significativa rimozione dell'OTA dal prodotto. Sia i polisaccaridi che i peptidoglicani, sono influenzati da trattamenti termici e acidi, così che i prodotti liberati possono offrire più siti di assorbimento rispetto alle cellule vitali, aumentando la superficie utile al legame

con l'OTA (Moruno et al., 2005; Petersson et al., 1995). Sono due le principali classi di proteine che si legano covalentemente ai polisaccaridi presenti sulla parete del *S. cerevisiae*. Tra queste, le proteine di parete cellulare GPI dipendenti, che sono indirettamente legate al β -1,3-glucano, mediante connessione ad una porzione di β -1,6-glucano, sono state individuate quali responsabili dell'assorbimento dell'ocratossina sulla parete cellulare, micotossina in grado di legarsi con la componente glucomannana del lievito (Caridi et al., 2006; Meca et al., 2010; Raju et al., 2002; Ringot et al., 2007).

1.6.3 *Chimici*

Un approccio chimico prevede l'utilizzo di acidi, basi, agenti ossidanti, cloranti o riduttori, sali e vari reagenti, come la formaldeide. L'ammonizzazione è il metodo che è stato maggiormente impiegato con successo in diversi Paesi per la detossificazione dei mangimi contaminati da ocratossina e aflatossina (Chelkowski et al., 1982). L'ammoniaca decompone quasi completamente l'OTA presente nel frumento e nei cereali (Scott et al., 1996). Purtroppo, sono stati osservati cambiamenti a livello sensoriale e nutrizionale (cambiamento del colore dei cereali trattati, diminuzione di amminoacidi essenziali). Inoltre, il periodo relativamente lungo di aerazione e il costo ne hanno limitato l'impiego nei cereali destinati ad essere utilizzati nelle formulazioni alimentari per animali. Di conseguenza, l'ammoniaca non è raccomandata per la disintossicazione di alimenti contaminati dall' OTA (Peraica et al., 2002; Scott et al., 1996). Tuttavia, l'ammonizzazione è una procedura approvata in alcuni Stati USA (ad esempio in Arizona, California, Texas, Georgia e Alabama), mentre in Senegal l'ammonizzazione viene utilizzata per la decontaminazione di cibi a base di arachidi, mais, cotone (Kabak et al., 2009ab). Dobbiamo menzionare che il trattamento chimico non è consentito all'interno dell'Unione Europea per le merci destinate al consumo umano.

1.6.4 *(Micro)biologici*

Alla luce di quanto precedentemente esposto, una strategia alternativa, sicura ed efficace può essere rappresentata dall'utilizzo di microrganismi in grado di ridurre il quantitativo di ocratossina presente negli alimenti e nei mangimi contaminati. Sfruttando le loro caratteristiche è possibile impiegarli come validi strumenti biologici per la prevenzione, il contenimento dello sviluppo dei microrganismi patogeni e dei loro metaboliti. Tutto questo può essere racchiuso e meglio esplicitato con il concetto di lotta biologica, fine ultimo di questa è apportare notevoli benefici al produttore, al consumatore e all'ambiente.

1.7 **Lotta biologica**

La lotta biologica è definita come l'insieme delle misure che, applicate anche in modo indiretto, influiscono sull'attività dei parassiti attraverso l'utilizzo di microrganismi non presenti nel binomio ospite-parassita (Matta, 1996). In patologia vegetale la lotta biologica ha come obiettivo quello di ridurre gli attacchi dei microrganismi patogeni, mediante l'impiego di altri microrganismi antagonisti, in grado di contrastarli, e ciò porta all'osservazione e allo studio dei meccanismi di contenimento biologico delle popolazioni dei parassiti in natura. (Matta, 1996). Dal 1919 l'applicazione della lotta biologica ha mosso i suoi primi passi grazie a l'entomologo H. S. Smith, che propose l'introduzione artificiale di insetti esotici parassiti o predatori che controllassero lo sviluppo e l'espansione di insetti dannosi locali (Doutt, 1964). Da quel momento la lotta biologica ha trovato diversi estimatori e sostenitori, come De Bach che negli anni Sessanta definì la lotta biologica come la pratica volta a favorire "l'azione dei parassiti, dei predatori o dei patogeni nel mantenere la densità di popolazione di un altro organismo ad un livello più basso di quello che essa avrebbe in assenza di questi". Nel tempo il concetto di lotta biologica si è ampliato e arricchito in modo da comprendere "la riduzione della densità di inoculo o delle attività patogeniche del patogeno ottenuta per mezzo di uno o più organismi diversi dall'uomo" (Cook e Baker, 1983). Si ebbe una svolta con l'elaborazione del concetto di lotta biologica da parte dell'Accademia

Nazionale della Scienza degli Stati Uniti (1987), in conseguenza della quale la definizione di “biocontrol” comprende anche le pratiche agronomiche, l’applicazione delle tecniche di biologia molecolare e le nuove biotecnologie. In base a questi punti, la lotta biologica venne riformulata come “l’utilizzo di microrganismi naturali o modificati, di geni o prodotti genici, atti a ridurre gli effetti dei microrganismi indesiderati, per favorire quelli utili all’uomo, alle coltivazioni, agli animali e ai microrganismi simbiotici”.

Nella lotta contro i patogeni delle piante sono realizzabili tre strategie (Gabriel e Cook, 1990):

1. intervento sul suolo o sull’ambiente per il contenimento della popolazione patogena;
2. valorizzazione della resistenza della pianta ospite, con meccanismi di natura meccanica e biochimica;
3. trattamento con microrganismi antagonisti per proteggere la pianta dalle infezioni.

Il successo della lotta biologica dipende dall’agente patogeno, dall’antagonista e dalla sua capacità infettante, dalle interazioni ecologiche, dal microbiota naturale e dall’ambiente in genere.

L’antagonismo rappresenta l’opposizione allo sviluppo del patogeno e si esplica con vari meccanismi che si possono verificare anche simultaneamente. L’impiego di batteri o funghi antagonisti per contenere le malattie causate da funghi fitopatogeni è uno degli esempi più diffusi, che trova applicazione contro le malattie sia dell’apparato radicale che della parte aerea delle piante o dei frutti. Tra gli agenti fitopatogeni più dannosi, per i quali esistono interessanti applicazioni, si annoverano specie appartenenti ai generi *Botrytis*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia*. Nel concetto di lotta biologica è possibile racchiudere anche quello di lotta integrata, che ha come fine quello di contenere e non distruggere il patogeno. Con l’impiego di tecniche fitoiatriche, si cerca di mantenere le popolazioni dannose in un range contenuto in modo da non arrecare anche un danno economico alle produzioni (Amano e Haseeb, 2001). In uno scenario ricco di rapidi cambiamenti ecologici, economici e nutrizionali, l’attenzione dell’opinione pubblica e della comunità scientifica è sempre più rivolta alla riduzione di

potenziali rischi, ambientali e sanitari legati all'impiego di sostanze chimiche in agricoltura (Hjeljord e Tronsmo, 1998). Ecco perché nasce l'interesse per forme di agricoltura con ridotto impatto ambientale (Cook e Granados, 1991; Lorito et al., 1994).

1.7.1 *Lotta biologica*

Compito dell'antagonista è contrastare lo sviluppo del patogeno e questo si esplica con diversi meccanismi, i quali possono anche manifestarsi contemporaneamente in modo diretto o indiretto. Si intende per antagonismo diretto nel caso di micoparassitismo (Matta, 1996), o di produzione di inibitori allelo-chimici, o per antibiosi e competizione per spazi e nutrienti, o per predazione e iperparassitismo, che comportano sottrazione di sostanze e sfruttamento. L'antagonismo indiretto comporta, invece, un effetto mediato attraverso l'interazione tra ospite e patogeno, con conseguente manifestazione di resistenza del frutto e della pianta. Grazie a questi meccanismi, gli agenti di contenimento biologico sono in grado di colonizzare i tessuti dell'ospite (a discapito di altri microrganismi) anche nella fase di postraccolta. Inoltre, è possibile che più meccanismi spesso siano coinvolti nello stesso tempo.

Nella lotta biologica deve anche essere considerata l'azione di due o più microrganismi, che simultaneamente hanno un'azione antagonista, con conseguente effetto sinergico. Un esempio è dato dalla combinazione di *Streptomyces lydicus* e *Pseudomonas fluorescens*, che sono in grado di contenere l'insorgenza di malattie fungine e batteriche intervenendo tempestivamente sia sulla comparsa di antracnosi su piante di pomodoro in campo, sia sulle bacche in conservazione (Cuppels et al., 2013).

1.7.2 *Micoparassitismo*

L'antagonista, anche mediante l'utilizzo di appressori e ife specializzate di penetrazione, è in grado di nutrirsi della cellula ospite (attacco biotrofico), oppure rilasciando enzimi litici in grado di deteriorare la parete dell'organismo parassitato e potervi penetrare all'interno (attacco necrotrofico). Alcuni lieviti sono in grado di

aderire alla superficie cellulare, produrre chitinasi e altri enzimi in grado di lisare la parete cellulare di miceti o batteri (Matta, 1996).

L'interazione tra ospite patogeno e antagonista avviene in quattro fasi:

- 1) il contatto e lo sviluppo attorno alle ife del patogeno;
- 2) l'emissione di un segnale chimico che attrae il microrganismo antagonista;
- 3) la secrezione di enzimi litici in grado di lesionare la parete cellulare dell'ospite;
- 4) la presenza di lectine sulla superficie cellulare riconosciute dall'antagonista.

Con tale termine si rivolge l'attenzione a delle alterazioni sulle ife e sugli scleroziti dei funghi fitopatogeni, dovute a penetrazione, lisi provocati da un micete antagonista.

Gli enzimi e gli antibiotici quali peptaiboli (Degenkolb et al., 2015; Schirmbock et al., 1994) rilasciati al momento del contatto, riducono la reazione di difesa del patogeno, facilitando l'ingresso dell'antagonista che così trova più semplice la via per acquisire tutti i nutrienti di cui ha bisogno.

1.7.3 *Antibiosi*

Questo meccanismo riveste un ruolo importante nell'azione che gli antagonisti esplicano nei confronti dei patogeni. Per antibiosi si intende la produzione di sostanze antibiotiche o metaboliti tossici con effetto deleterio su un altro microrganismo, determinando l'inibizione di funzioni metaboliche, della crescita o la morte dello stesso microrganismo (Arras e Maltoni, 2004; Cook e Baker, 1983; Dunlop et al., 1989). Tali metaboliti possono essere composti a basso peso molecolare, oppure macromolecole, quali enzimi extracellulari, o ancora composti volatili (Fravel, 1988; Weller, 1988). La loro funzione è quella di favorire la colonizzazione di una nicchia ecologica da parte di un microrganismo a scapito di altri competitori. I miceti antagonisti sono capaci di produrre una varietà di sostanze antibiotiche coinvolte direttamente nei meccanismi di antagonismo.

E' stato dimostrato che la composizione del terreno di crescita influenza la produzione di composti volatili. I terreni ricchi di nutrienti determinano generalmente un ampio numero e una quantità maggiore di composti volatili (Robinson et al., 1998; Wheatley et al., 1997). Inoltre, alcune sostanze antibiotiche non volatili possono svolgere un'azione

antagonista, come nel caso della iturina prodotta da *Bacillus subtilis*, in grado di contrastare la crescita di *Fusarium* spp. (Ariza, 2012), mentre la cheatomina prodotta da *Cheatomium globosum* è risultata implicata nel contenimento del *Pythium ultimum*, responsabile del fenomeno damping-off nella barbabietola da zucchero (Di Pietro, 1992).

1.7.4 *Competizione per spazio e nutrienti*

La competizione tra due microrganismi avviene principalmente per fattori nutrizionali (carboidrati, azoto, ferro, fattori di crescita), ma anche per lo spazio (siti di ingresso della pianta) e per l'ossigeno (Faull, 1988). Questo fenomeno è strettamente correlato alla capacità degli antagonisti di adattarsi ed essere attivi in diverse condizioni ambientali: tale capacità favorisce la rapida colonizzazione dei siti d'interazione tra antagonista e agente patogeno, con conseguente formazione di una barriera biologica atta alla protezione dell'organismo ospite (Cook, 1988). Inoltre, è possibile che a limitare lo sviluppo di un patogeno siano più microrganismi in grado di creare un equilibrio, per il quale l'azione di uno non inibisce quella dell'altro e potenzialmente anche amplificarne gli effetti. Diversi microrganismi possono agire singolarmente, oppure svolgere un'azione antagonistica sinergica (Bonaterra et al., 2003; Chen et al., 2016; Nuñez, 2002; Wang et al., 2016).

1.7.5 *Induzione di resistenza*

I microrganismi antagonisti possono indurre un cambiamento anche nella fisiologia dell'ospite, che si traduce nell'aumento delle capacità di difesa nei confronti dei patogeni e nella riduzione dell'incidenza della malattia. (Van Wees et al., 2008; Vinale et al., 2008). Infatti l'interazione tra ospite e patogeno può portare come risposta di resistenza, alla produzione di elicitori, molecole biotiche o abiotiche in grado di indurre la biosintesi di metaboliti, come le fitoalessine, implicati nella risposta difensiva (Matta, 1996). Un esempio è il lievito *Aureobasidium pullulans* che induce resistenza nell'ospite mediante produzione di enzimi litici (Nigro et al., 2009).

1.8 Agenti di contenimento biologico

I microrganismi antagonisti possono essere utilizzati incrementando la presenza dei microrganismi naturalmente presenti nella nicchia ecologica, oppure selezionandoli tra quelli naturalmente presenti per introdurli artificialmente. Spesso gli antagonisti artificialmente introdotti possono agire quali integratori dei microrganismi antagonisti già presenti nella comunità microbica. Essi, per poter essere impiegati, devono essere stabili dal punto di vista genetico, la loro azione deve svolgersi a basse concentrazioni e agire ad ampio spettro, sopravvivere a varie condizioni ambientali e incapaci di produrre metaboliti tossici sia per l'uomo che per le piante (Wilson et al., 1994). Inoltre, numerose sostanze consentono di migliorare la sopravvivenza e la capacità degli agenti antagonisti e la loro capacità di colonizzare le superfici dei vegetali. Tra queste vi sono additivi alimentari, nutrienti, altri coadiuvanti. La gomma xantano ha migliorato la sopravvivenza in campo di *A. pullulans* e di *M. pulcherrima*, nonché la loro attività. L'incremento di alcuni nutrienti porta ad un aumento della popolazione di microrganismi antagonisti. Alcuni sali, come il cloruro di calcio, il bicarbonato di sodio e il propionato di calcio, hanno portato a migliori risultati nel caso di *A. pullulans* e/o di altri lieviti antagonisti contro marciumi postraccolta (Nigro et al., 2009). La combinazione di agenti di lotta biologica e di alcuni additivi (sali di calcio organici e inorganici, gomme naturali e alcuni antiossidanti) ha prodotto un significativo aumento dell'efficacia dell'azione antagonistica nel controllo delle infezioni da *P. expansum* nelle mele conservate (Lima et al., 2005).

L'uso di additivi, come il sodio bicarbonato, può quindi costituire un metodo valido per incrementare l'efficacia dei lieviti antagonisti nella lotta ai patogeni fungini in postraccolta (Droby et al., 2003).

Alcuni studi hanno valutato l'effetto sinergico di batteri e lieviti nel contrastare gli attacchi di patogeni in postraccolta, considerando anche come alcune sostanze, quali alcuni aminoacidi, possono incrementare tale efficacia. (Janisiewicz e Bors, 1995). L'utilità e l'efficacia di questo metodo, può essere esplicito anche coniugando ai microrganismi antagonisti delle basse quantità di fungicidi di sintesi (Droby et al., 2009), degli additivi naturali, sali e acidi organici (Droby et al., 1997,2003).

Tutte queste caratteristiche candidano i lieviti tra i microrganismi antagonisti più congeniali, non solo per la loro efficacia contro i patogeni, ma anche per la scarsità di pericolo nei confronti della salute umana.

1.9 I lieviti

I lieviti sono microrganismi ubiquitari diffusi in una grande varietà di ecosistemi naturali ed artificiali. Dimensioni e morfologia dei lieviti, varia a seconda della specie e dello stato fisiologico dello stesso microrganismo (Tibayrenca et al., 2010). Il numero delle specie di lieviti descritte è andato incrementandosi nel tempo (Kurtzman e Fell, 1998; Lodder, 1970), con più di 1500 specie attualmente descritte. Questo può essere spiegato considerando che i primi studi si sono basati sulla morfologia e su pochi test di crescita. Con i primi approcci molecolari per l'identificazione dei lieviti e il sequenziamento del DNA è aumentato il numero delle specie inizialmente individuate, rendendo più agevole lo studio della biodiversità. Secondo gli studi fenotipici molte delle specie hanno distribuzioni molto ampie dei diversi ambienti a differenza dei risultati ottenuti mediante indagini molecolari che consentono una rapida e accurata identificazione permettendo di acquisire un notevole grado di chiarezza negli studi sull'ecologia dei lieviti (Kurtzman e Fell, 2006). Essi vengono isolati nel suolo (Botha, 2011), nelle acque marine (Kutty e Philip, 2008), nei materiali lapidei, vitrei, lignei e tessuti (Arenz et al., 2006; Sterflinger, 2010) nell'uomo e in altri organismi, come gli insetti (Gibson e Hunter, 2010). Crescono a un pH neutro, alcune specie vanno incontro a stress in ambienti troppo acidi (Piper et al., 2001).

Infine, riescono a svilupparsi da temperature sotto i 0 gradi fino a temperature elevate di oltre 45 °C (Arthur e Watson, 1976).

I lieviti sono microrganismi chemio-organotrofi giacché impiegano composti organici come fonte di energia e carbonio. Il carbonio è ottenuto da glucosio e fruttosio e da disaccaridi quali saccarosio e maltosio. Alcune specie sono in grado di metabolizzare anche alcoli, acidi organici e pentasaccaridi (ribosio). Diverse specie di lieviti sono

aerobi obbligati a differenza di altre specie anaerobiche facoltative e non obbligate. Si riproducono per gemmazione, possono assumere l'aspetto di organismi pluricellulari, con formazioni chiamate pseudoife o false ife, rendendo la struttura dei lieviti più simile quella dei miceti filamentosi (Kurtzman e Fell, 2006).

Le combinazioni di fattori biotici ed abiotici presenti nei vari habitat influenzano il metabolismo, lo sviluppo e la sopravvivenza dei lieviti, che devono necessariamente adattarsi alle diverse condizioni per evitare la morte. Un esempio è la formazione di biofilm, che può essere definito un meccanismo di antagonismo contro i microrganismi patogeni, tale da essere stato impiegato anche nella lotta biologica (Scherm et al., 2003, Droby et al., 2009; Liu et al., 2013). La formazione del biofilm avviene in seguito a secrezione di molecole quorum sensing da parte dei lieviti e che agiscono da induttori di segnale che mediano risposte fisiologiche e morfologiche a seconda della densità cellulare, influenzandone il comportamento (Sprague e Winans, 2006; Wuster et al., 2009).

1.9.1 Lieviti nella lotta biologica

Per valutare l'efficacia dei lieviti come antagonisti, è necessario conoscerne il comportamento, l'interazione con ospiti e patogeni e la eventuale patogenicità, affinché possano essere diffusi nell'ambiente a concentrazioni ottimali, senza però arrecare danni all'uomo o ad altri organismi. Ad oggi si sta attenuando lo scetticismo presente in agricoltori e consumatori nell'utilizzare microrganismi ad alte concentrazioni su frutta e ortaggi. Questo sta avvenendo perché vengono valutati sotto il profilo del potenziale rischio biologico prima della loro registrazione e del loro impiego come agenti della lotta biologica (Gullino, 2005; Migheli, 2001; Janisiewicz et al., 2002). Tra i possibili effetti negativi nell'impiego dei microrganismi nella lotta biologica sono l'allergenicità, la tossicità nei confronti dell'uomo e degli animali, mutazioni genetiche a seguito di trasferimento orizzontale di geni da specie a specie. Un ulteriore effetto negativo dovuto a possibili mutazioni genetiche, potrebbe rivelare la presenza all'interno di una specie apparentemente antagonista, rivelarsi invece innocua per il suo ospite target e comportarsi invece da patogeno nei confronti di altri ospiti con cui potrebbe venire a

contatto (Cook et al., 1996; Hang et al., 2005). Dunque, se pur minimo, è presente un rischio nell'applicazione di un qualsiasi antagonista biologico (van Elsas e Migheli, 1999). Per prevenire questo rischio è importante effettuare test di patogenicità su più specie possibili, saggiare la sua eventuale patogenicità sull'uomo e animali con test sia in vivo che in vitro, volti ad assicurare l'innocuità nella produzione di metaboliti secondari nocivi e tossici (Migheli et al., 2001; Steyaert et al., 2003). Di conseguenza, è opportuno osservare e studiare la morfologia di alcune specie lievitiformenti, giacché a seconda delle varie condizioni ambientali nelle quali si ritrovano, è possibile che essi la modificano, a discapito della sicurezza per l'uomo e gli animali manifestandosi patogeni nei confronti di questi ultimi.

1.9.2 Patogenicità nei lieviti

Alcuni funghi possono differenziare sia un *habitus* lievitiformenti che ifale, in base ad un meccanismo che prende il nome di dimorfismo. Tale capacità è regolata da condizioni ambientali e nutrizionali. Il dimorfismo è la capacità reversibile di presentarsi nella forma parassitaria o tissutale (in genere lievitiformenti), oppure sotto forma colturale o vegetativa costituita da micelio. Il dimorfismo è condizionato da variazioni di temperatura e pH (Reynolds e Fink, 2001), potenziale di ossidoriduzione e a seconda del contenuto in azoto amminoacidico. Alcune specie di miceti sono patogene e spesso il loro comportamento è correlato alla transizione dimorfica. L' *Histoplasma capsulatum*, un ascomicete, penetra nell'ospite umano attraverso l'inalazione di conidi o frammenti di ife; passando nei polmoni vengono fagocitati dai macrofagi polmonari e si convertono in lieviti (in quanto fungo dimorfico), in grado di replicarsi all'interno dei macrofagi stessi. Nell'ospite il cui sistema immunitario non è compromesso i macrofagi acquistano l'immunità e limitano l'infezione; ma in condizione di immunocompromissione l'infezione si diffonde e può diventare grave. In casi, dove vi siano già problemi polmonari, questo fungo può provocare lesioni anche distruttive del

tessuto polmonare (Aronis et al., 2011; de Oliveira Nuñez et al., 2016; Goldenberg e Price, 2008).

Coccidioides immitis è un altro fungo dimorfico ascomicete, che esiste come micete filamentosi a temperature vicine ai 25 °C e come lievito a temperature prossime ai 37 °C. Microscopicamente presenta ife settate ialine scarsamente ramificate che producono artroconidi cilindrici. Gli artroconidi inalati giungono infine nei polmoni dove la temperatura corporea li trasforma in cellule sferiche di lievito. Una volta raggiunte le massime dimensioni vanno incontro a frammentazione con rilascio di endospore tramite un fenomeno detto clivaggio progressivo (Fisher et al., 2002; Goughenour e Rappleye, 2017).

Diversi lieviti tra cui *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, hanno la capacità di crescere sia in modo unicellulare che pseudoifale con produzione di blastoconidi o gemme. Tutte le specie, ad eccezione di *C. glabrata*, producono pseudoife e vere ife; *C. albicans* forma tubuli germinativi e clamidoconidi, spore terminali con parete spessa. In coltura la maggior parte delle *Candida* spp. formano colonie lisce, bianche, cremose, con piccola cupola. *C. albicans* e altre specie possono subire un cambiamento fenotipico reversibile in differenti morfotipi dalla colonia liscia, cremosa costituita da cellule lievito gemmanti, alla colonia lanuginosa, cotonosa costituita principalmente da pseudoife e ife, probabilmente in risposta a segnali dell'ambiente. È stato postulato che il cambiamento fenotipico possa essere una capacità delle *Candide* per sopravvivere alle varie modificazioni dei vari habitat all'interno dell'ospite (Bendinelli, 2005; La Placa, 2005).

Alcuni di questi lieviti sono opportunistici come *Malassezia* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Geotrichum capitatum* e talvolta possono creare problemi a causa di resistenza a farmaci antifungini. Il gruppo più importante è costituito da specie del genere *Candida*.

Candida spp. colonizza gli uomini e altri mammiferi ed è ampiamente diffusa in tutto il mondo. Il sito primario di colonizzazione è il tratto gastrointestinale, dalla bocca al retto (Pagano et al., 2006). Quest'ultime costituiscono la quarta causa di infezioni setticemiche nosocomiali dopo i patogeni Gram negativi e *Staphylococcus* spp. Sebbene più di 100 specie di *Candida* siano state descritte, solo poche specie sono implicate in

infezioni cliniche. Virtualmente, tutti siamo portatori di *Candida* e possiamo contrarre malattia, qualora il nostro sistema immunitario risulti compromesso, come chiaramente dimostrato dalla elevatissima frequenza delle candidosi orali nel soggetto HIV+ con meno di 100 linfociti CD4+.

La fonte di infezione predominante è il paziente stesso (candidosi endogena), quando la normale flora commensale dell'ospite approfitta della opportunità di provocare infezione; la trasmissione esogena (candidosi esogena) può anche avvenire con l'uso di soluzioni irriganti contaminate, liquidi parenterali nutritivi, valvole e cateteri a permanenza, valvole cardiache, cornee. *C. albicans* è il più comune agente eziologico di micosi nell'uomo ed è stato trovato anche nell'aria, nell'acqua, nel suolo, oltre che in quasi tutti gli animali indagati, compresi i pesci. Inoltre è la specie più comune isolata da materiali clinici (90-100% dalle mucose; 50-70% dal sangue).

Approssimativamente il 95% di tutte le sepsi nosocomiali da *Candida* sono dovute principalmente a quattro specie: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Wisplinghoff et al., 2004; Richter et al., 2005).

1.9.3 Impiego dei lieviti nelle biotecnologie

Da tempo gli alimenti e le bevande fermentate (pane, vino, birra, kefir) hanno rappresentato un esempio dell'applicazione dei lieviti nelle biotecnologie. Si ritiene che la produzione di bevande alcoliche fermentate e la lievitazione del pane sia avvenuta nella civiltà egizia intorno al 6.000 a.C. La scoperta dei microrganismi è avvenuta soltanto alla fine del XVII secolo e il loro studio approfondito è iniziato nella seconda metà del XIX secolo. Nel corso degli ultimi decenni i numerosi studi sulle diversità metaboliche dei lieviti hanno rivelato le loro proprietà in campo biotecnologico.

L'esempio principale è quello di *Saccharomyces cerevisiae*, il primo eucariote ad avere il proprio genoma, costituito da 12.000.000 paia di basi, completamente sequenziato (Goffeau et al., 1996) e che grazie a tali conoscenze biomolecolari (unite a quelle cellulari) e alle diverse tecniche genetiche applicabili efficacemente su un organismo così facile da coltivare in laboratorio, ha permesso di individuare importanti principi

riguardanti la biologia, l'ecologia e l'evoluzione degli eucarioti (Landry et al., 2006). Oltre ai lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces*, noti per la produzione di bevande alcoliche, esiste infatti nel mondo dei lieviti una biodiversità e un promettente potenziale biotecnologico (Fleet, 2003; Wolf et al., 2003).

Oltre alle numerose applicazioni in campo alimentare, chimico, farmaceutico, i processi che impiegano le attività delle cellule e dei metaboliti dei lieviti rivestono un ruolo importante nelle biotecnologie per l'ambiente e per l'agricoltura. I lieviti possono essere utilizzati per produrre cellule, enzimi, lipidi, carotenoidi, vitamine, acidi organici, polisaccaridi extracellulari e altre sostanze. Alcuni lieviti al pari di batteri e miceti filamentosi, sono in grado di degradare composti di sintesi derivanti da attività industriali (Buzzini e Vaughan- Martini, 2006). Altri utilizzano come unica fonte di carbonio ed energia i derivati fenolici degradandoli in parte o completamente (Aleksieva et al., 2002).

1.9.4 Assorbimento e biodegradazione

Sono riportate in letteratura diverse tecniche per l'impiego di ceppi di lieviti in grado di degradare, adsorbire l'ocratossina nei prodotti destinati al consumo umano e animale. *S. cerevisiae* e altri lieviti sono descritti come agenti capaci di biodegradare l'OTA, capacità dovuta alla proprietà adsorbente della parete. *S. cerevisiae* è in grado di adsorbire il 41% di 0,3 mg di OTA/L dopo 24 h a 30 ° C, ma non sono stati forniti dei dettagli circa il meccanismo coinvolto (Piotrowska et al., 2000). Allo stesso modo, Böhm e co-autori hanno affermato che alcuni ceppi hanno una capacità di adsorbire fino al 38% di 0,05 mg di OTA/L senza descrivere i metaboliti derivanti dal processo di degradazione (Böhm et al., 2000). Inoltre è stato verificato che le cellule di *Saccharomyces* trattate con il calore e acido, possono assorbire un quantitativo di OTA maggiore (75%) rispetto a delle cellule di lievito vitali ma non trattate (35/45%) (Bejaoui et al., 2004).

I lieviti sono stati impiegati anche per ridurre il contenuto di OTA nei processi di fermentazione alcolica della birra e del vino. Durante la fermentazione del mosto, è

stato dimostrato che i lieviti adsorbono fino al 21% dell'OTA aggiunta al campione da analizzare (Scott et al., 1995). La parete delle cellule di lievito essiccati è stata segnalata come la parte più efficace ad adsorbire l'OTA. Diversi lavori hanno spiegato questi fenomeni collegandoli alla presenza di β -D-glucani (Yiannikouris et al., 2006), glucomannani (Raju et al., 2002) e mannanoligosaccaridi (Oguz et al., 2004). D'altra parte, alcuni studi hanno sottolineato la partecipazione dei meccanismi di biodegradazione. Ad esempio, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* hanno dimostrato una capacità di biodegradazione dell'OTA attraverso la scissione del legame ammidico e un conseguente rilascio di OT α (Schatzmayer et al., 2003). Il *T. mycotoxinivorans* è segnalato per la sua eccellente capacità di adsorbimento non solo dell'OTA ma anche dello zearalenone, con una percentuale pari al 100% di 0.2 mg/L di micotossina, dopo solo 5 ore di incubazione a 35°C (Molnar et al., 2004).

Tuttavia, uno studio recente ha riconosciuto *T. mycotoxinivorans* come un nuovo patogeno umano associato alla fibrosi cistica e alla morte di un paziente con polmonite da *Trichosporon* documentata istologicamente: questo solleva questioni sulla sicurezza nel suo uso pratico (Hickey et al., 2009). Più recentemente, *Aureobasidium pullulans* è stato segnalato come agente di "biocontrol" sia nell'uva che nel vino, in grado di degradare l'OTA attraverso l'idrolisi del legame ammidico dal momento che è stata rilevata la presenza di OT α (de Felice et al., 2008) da impiegare con particolare attenzione verso la salute del consumatore (Hawkes et al., 2005). Inoltre è stata valutata la sua capacità di ridurre la germinazione conidica e la patogenicità di alcuni funghi patogeni presenti in postraccolta (*B. cinerea*, *C. acutatum*, *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*), senza nessun contatto tra il patogeno e l'antagonista, ma solo mediante l'emissione di sostanze volatili organiche (Di Francesco et al., 2015).

1.9.5 Micofumigazione

Negli ultimi anni sta ricevendo un'attenzione sempre più crescente l'impiego di lieviti produttori di composti organici volatili (VOCs), capaci di svolgere un'azione di "biocontrol", senza contatto diretto con le derrate alimentari, (Arrarte et al., 2017; Di Francesco et al., 2015; Fialho et al., 2010; Huang et al., 2012, 2011; Mari et al., 2016). Le sostanze volatili organiche (VOCs) sono molecole lipofile, con basso peso molecolare e con un'elevata pressione di vapore (Werner et al., 2016), hanno un basso peso molecolare, contengono composti di carbonio a bassa polarità e ad alta pressione di vapore (Bennett et al., 2012; Vespermann et al., 2007). Possono essere prodotti anche da batteri e miceti filamentosi.

I VOCs sono composti chimici definiti come metaboliti secondari, in quanto non sono essenziali per la crescita, lo sviluppo o la riproduzione dell'organismo stesso; la funzione e l'importanza di questi prodotti per lo sviluppo dell'organismo è normalmente di natura ecologica, poiché sono usati spesso come meccanismi di difesa contro agenti patogeni e per la competizione interspecifica (Maffei et al., 2011).

Esempi di metaboliti secondari di origine vegetale sono i pigmenti che conferiscono colorazioni specifiche (principalmente antociani e carotenoidi).

Diversi metaboliti secondari vegetali, anche composti, sono impiegati dall'uomo come farmaci, quali ad esempio gli alcaloidi antitumorali, che possono inibire la mitosi cellulare. Inoltre vengono utilizzati nella cura delle leucemie e in alcuni tipi di carcinomi. (Ayob et al., 2017). Un estratto dalla corteccia del *Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*, viene utilizzato contro i tumori delle ovaie e della mammella nell'uomo (Guerritte-Voegelein et al., 1994; Tabata, 2004).

Infine, appartiene alla categoria dei metaboliti secondari vegetali gran parte dei composti utilizzati dall'uomo come stupefacenti (morfina, cocaina, tetraidrocannabinolo, papaverina, ecc.). In contrasto ai metaboliti primari, questi prodotti non sono onnipresenti nell'organismo vivente che li produce, né sono espressi in continuo.

Le classi principali di metaboliti secondari sono: alcaloidi, terpeni, acidi organici alifatici o aromatici o eteroaromatici, fenoli, iridoidi, steroidi, olii volatili, resine e balsami, saponine.

I lieviti hanno il potenziale per essere dei bio fumiganti. L'approccio consiste nell'utilizzo dei composti volatili organici prodotti dai lieviti. Il concetto nacque con la descrizione di *Muscodor albus* Worapong, Strobel & W.M.Hes e l'emissione di sostanze volatili in grado di inibire la crescita dei microrganismi patogeni (Strobel et al., 2001; Worapong et al., 2001). Alcuni VOCs hanno attività antimicrobica, alcuni sono coinvolti nelle interazioni microbiche, agendo da quorum sensing (Bennett et al., 2012). I lieviti mostrano una capacità di contenimento biologico verso la crescita e l'attività metabolica di funghi micotossigeni, ed è anche questa una qualità che ne favorisce lo studio e l'impiego (Bleve et al., 2006; De Curtis et al., 2012; Huang et al., 2011; Ponsone et al., 2011). Diversi studi stanno investigando sulle capacità di tali VOCs prodotti dai lieviti, contro funghi fitopatogeni e/o micotossigeni dei generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis* e *Rhizopus* (Grondin et al., 2015; Liu et al., 2013; Pimenta et al., 2009).

Un esempio sono i VOCs emessi da *Candida intermedia*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima*, che hanno la capacità di inibire la crescita di *Botrytis cinerea* in vitro e in vivo riducono la manifestazione dell'infezione su fragola (Huang et al., 2011; Parafati et al., 2015; Suwannarach et al., 2010).

Una miscela di VOCs prodotta dal genere *Candida* si è mostrata in grado di ridurre l'incidenza di malattia causata da *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* nella mela (Arrarte et al., 2017).

VOCs di vari ceppi di *Pichia anomala*, *Pichia Kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum* hanno mostrato capacità inibente nella crescita di *A. ochraceus* e nella produzione di OTA in *Coffea arabica* (Masoud et al., 2005; Masoud e Kaltoft, 2006). Dunque i composti organici volatili sono ecofriendly (Kanchiswamy et al., 2015) e potrebbero essere una strategia attraente per le industrie del settore, tali da poter essere usati come approccio alternativo ai fungicidi e non costituire minaccia per gli esseri umani, animali e per l'ambiente in generale (Papurello et al., 2012; Passoth et al., 2006; Romano et al., 2015).

2. SCOPO DEL LAVORO

Le infezioni fungine rappresentano la causa principale delle perdite in campo e in postraccolta. Nelle ultime fasi della filiera produttiva, inoltre, il danno economico è elevato, giacchè si verifica quando il prodotto ha acquistato un valore aggiunto determinato dai costi connessi ai precedenti stati del processo produttivo. Inoltre, la contaminazione da micotossine prodotte da funghi fitopatogeni pone un problema rilevante per la salute e sicurezza del consumatore. Le micotossine sono resistenti a temperature molto elevate, la loro presenza in alta concentrazione in alimenti destinati sia al consumo umano che animale, può essere nociva per tali soggetti, per via della loro azione immunosoppressiva, nefrotossica, teratogena, epatotossica e per le loro proprietà cancerogene. Alcune micotossine riducono la resistenza della pianta ospite a diversi patogeni fungini, accelerando così l'evolversi della infezione (EFSA 2006; Rodríguez et al., 2011).

I fungicidi e le innovative tecnologie, hanno permesso di ridurre tali perdite. Tuttavia gli interventi con agrofarmaci sono sottoposti ad una severa legislazione Comunitaria e Nazionale degli Stati membri. I principi attivi ammessi sono in numero sempre più limitato e per alcuni prodotti non è previsto l'uso di alcuna sostanza di sintesi. Negli ultimi anni la Comunità Europea e gli Stati Uniti, hanno introdotto norme più restrittive in materia di controlli di qualità e sicurezza alimentare, al fine di fissare dei limiti massimi anche per le micotossine, che possono essere presenti entro limiti accettabili, in diverse materie prime. In molti Paesi mancano ancora tali norme, con la conseguente produzione ed esportazione di alimenti contenenti residui di micotossine, con valori molto superiori a quelli considerati come non nocivi per la salute umana ed animale (Beccari et al., 2011; RASFF, 2016).

Alla luce di quanto esposto, è risultata chiara, in questo percorso di ricerca, la necessità di sviluppare metodi alternativi ed ecosostenibili per il contenimento dello sviluppo di funghi micotossigeni, per poter monitorare individualmente o sinergicamente la produzione di micotossine e/o l'eradicazione dei miceti, impedendo la biosintesi delle micotossine, inattivando gli stessi metaboliti secondari, o trasformandoli in composti di minore o nulla tossicità. Ulteriori obiettivi di tali studi sono stati sviluppare e applicare

nuovi metodi biotecnologici in grado di contenere funghi ocratossigeni, con attenzione rivolta anche alla selezione di antagonisti biologici, capaci di rimuovere tracce di micotossine in cibi e bevande e impedirne la biosintesi.

I lieviti, in particolare, in tale percorso, hanno costituito un'importante risorsa per il contenimento biologico. Essi hanno caratteristiche tali da essere scelti come microrganismi efficaci e sicuri. Hanno requisiti nutrizionali semplici, crescono su supporti poco costosi, sopravvivono in condizioni ambientali differenti e non sono particolarmente esigenti, nella manipolazione ed impiego, sono genericamente sicuri per l'uomo.

A tal fine in questo lavoro di ricerca si è voluto verificare se alcuni lieviti di interesse enologico possano avere la capacità di controllare la crescita e la sporificazione di *Aspergillus* spp., principali responsabili dell'accumulo di ocratossina A (OTA) nel vino e nei succhi di frutta. In particolare, ci si è concentrati sulle specie *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. E' stata valutata la capacità bio-assorbente e degradante della micotossina da parte dei lieviti in studio, nonché l'effetto dei ceppi di lievito antagonisti selezionati sull'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi dell'OTA e sulla produzione dell'OTA in coltura. Per chiarire alcuni aspetti del processo, parte di questa ricerca è stata dedicata anche alla composizione di sostanze volatili organiche prodotte dai lieviti antagonisti selezionati, potendo dimostrare che essi hanno un ruolo fondamentale nell'attività antagonistica degli *Aspergilli* micotossigeni.

CAPITOLO I

Adsorbimento di ocratossina A nel succo d'uva mediante cellule di lievito immobilizzate in sfere di alginato di sodio.

3.1 Introduzione

La presenza di ocratossina (OTA) nei succhi e nelle bevande a base di frutta è causata principalmente da infezione su uva da parte di *Aspergillus* spp. Dunque è legittima la preoccupazione sulla presenza della micotossina, dal momento che una di queste bevande, il vino, è largamente consumata in tutto il mondo, e il resto dei prodotti sono per lo più assunti in una fascia d'età pediatrica, risultando una fonte d'assunzione di OTA anche per i consumatori più giovani. La Commissione Europea ha fissato come livello ammissibile di OTA nel vino e nel succo d'uva a 2 µg/kg i livelli massimi ammissibili. (Regolamento della Commissione n. 1881/2006 che modifica i regolamenti n. 446/2001 e n. 123/2005).

Di conseguenza, sono necessari nuovi interventi biologici di decontaminazione, sicuri, che non alterino le qualità organolettiche dei prodotti e che siano poco costosi e attuabili.

In un precedente studio (Fiori et al., 2014), due ceppi di lievito non fermentanti (*Cyberlindnera jadinii* 273 e *Candida friedrichii* 778) e due ceppi a bassa fermentazione (*Candida intermedia* 235 e *Lachancea thermotolerans* 751) hanno mostrato un comportamento antagonistico significativo contro un ceppo virulento di *A. carbonarius* sia in vivo che in vitro, mentre il filtrato e il brodo di coltura filtrato ed autoclavato dei ceppi di lievito, non hanno avuto alcun effetto significativo sulla crescita degli agenti patogeni. Tra i lieviti saggiati, la *C. intermedia* mostrava un'inibizione di crescita e sporulazione del patogeno, maggiore rispetto agli altri ceppi selezionati.

In questo studio si evince che la decontaminazione dipende da meccanismi di adsorbimento sviluppatasi sulla parete cellulare del ceppo selezionato per questo studio, *Candida intermedia* 253.

Con tali presupposti, è stata creata e testata una miscela costituita da una sospensione di cellule di lievito, a concentrazione nota, e sodio alginato, e trasformata in piccole sfere. Inoltre, le cellule di lievito sono state trattate termicamente e immobilizzate in una matrice naturale, costituita da alginato di sodio. E' stata scelta la molecola di alginato di sodio, un polisaccaride naturale, composto da acidi D-mannuronico e D-glucuronico in quanto è atossico, biocompatibile, biodegradabile ed edibile.

E' impiegato nel settore farmaceutico ed alimentare. Inoltre è stato valutato anche l'inserimento di particelle magnetiche inglobate nelle sfere di alginato di sodio, in modo da poterne facilitare la rimozione dal mezzo liquido.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Realizzazione di sfere di alginato di sodio con cellule di lievito

Il ceppo di *Candida intermedia* 253, è stato fatto crescere in 20 mL di YPD liquido (1% di estratto di lievito, 2% di peptone batteriologico, 2% di destrosio), overnight ad una temperatura di 25 °C. Le cellule di lievito sono state recuperate mediante centrifugazione, risospese con acqua sterile. Sono state allestite delle diluizioni seriali per poter effettuare una conta delle colonie alla camera emocitometrica di Thoma, per ottenere una sospensione con concentrazione finale di 1×10^9 CFU/mL. A tale sospensione è stato addizionato alginato di sodio, in concentrazione al 2%.

La sospensione di alginato di sodio e *C. intermedia* 253, è stata prelevata con una pipetta Gilson tarata a 250 µL, mediante stillicidio in una soluzione di CaCl₂ al 2%, si è trasformata in formazioni sferiche-piriformi. Questo processo è stato realizzato anche autoclavando la sospensione per 20 minuti a 120 °C. E' stata preparata una sospensione di solo alginato di sodio, impiegata come controllo negativo.

Ad un'altra sospensione di alginato di sodio e lievito autoclavato, è stato aggiunto Fe₃O₄ in un quantitativo del 13%, per facilitarne la rimozione dal succo d'uva mediante calamita (Figura 2).

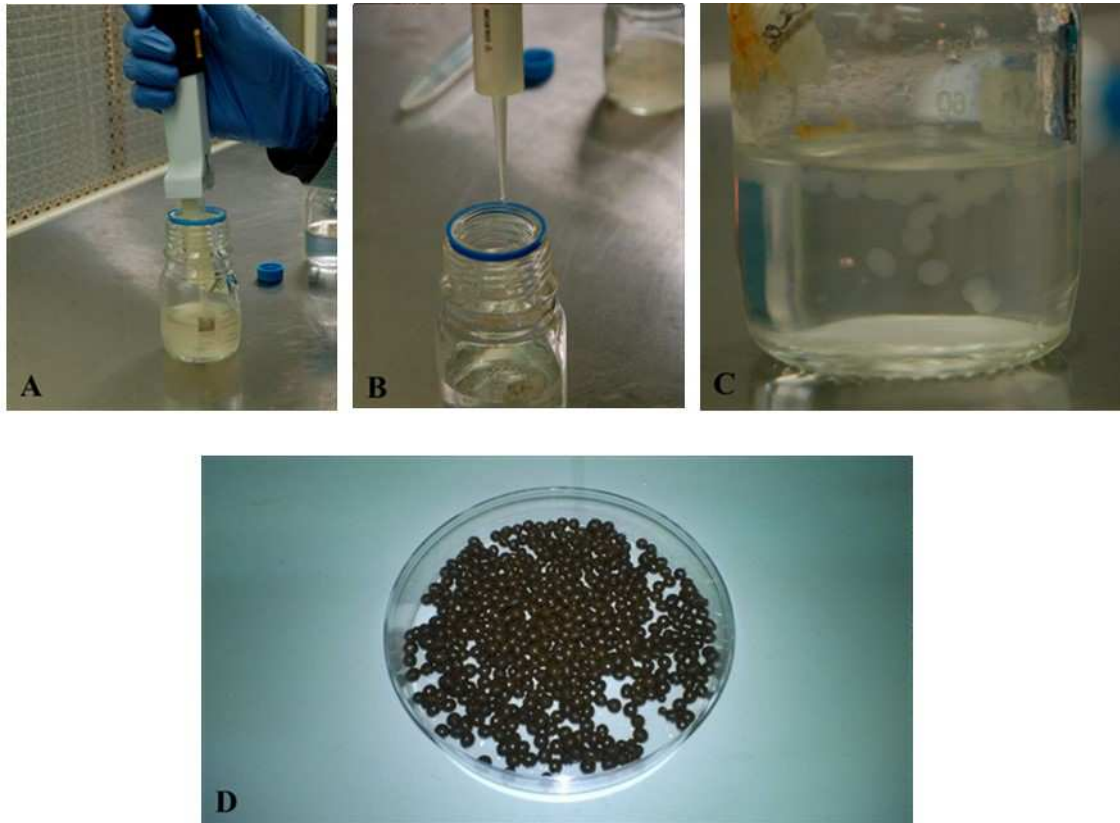


Figura 2. Prelievo della sospensione di alginato di sodio e lievito con pipetta Gilson (A). Stillicidio della sospensione in CaCl_2 , che al contatto con esso assume una forma sferica (B). Sfere di alginato di sodio e lievito in acqua distillata sterile, per dilavare residui di cloruro di calcio (C). Sfere magnetiche d'alginato ottenute con l'aggiunta di ossido di ferro in particelle di dimensioni di 20 nm di diametro (D).

3.2.2 Adsorbimento dell'OTA

Per poter confrontare la capacità adsorbente delle diverse sospensioni create in precedenza, sono stati addizionati 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ di OTA a 25 mL di succo d'uva presente in commercio (Vitalift, Lidl Stiftung & Co. KG. Neckarsulm, Germany), in seguito sono state aggiunte le sfere di alginato di sodio con cellule di lievito vive o sottoposte a trattamento termico. Lo stesso è stato eseguito anche per le sfere di alginato di sodio con lievito e Fe_3O_4 , il controllo era costituito da sfere prive di cellule di lievito.

I 25 mL (tre ripetizioni per trattamento) sono stati incubati a 25°C al buio, in costante agitazione (100 rpm) per due giorni. In seguito le cellule di lievito sono state recuperate mediante centrifugazione a 40.000 rpm per 20 minuti. Sei grammi di ogni ripetizione per ciascun trattamento sono stati purificati attraverso colonnine con immunoaffinità per OTA, così da poter essere poi sottoposti ad HPLC analisi.

3.2.3 *Time course dell'adsorbimento di OTA*

Per cinque giorni è stata osservata la potenzialità adsorbente del lievito *C. intermedia* 253 autoclavato con alginato di sodio, mediante rilievi effettuati ogni 24 ore. Ogni analisi è stata costituita da 6 grammi di succo d'uva per ogni replica.

3.2.4 *Esame mediante microscopia elettronica a scansione*

Le sfere sono state fissate in glutaraldeide al 2,5% in un mezzo di buffer, fosfato 0.1 M, (pH 7.2) per un'intera notte. I campioni sono stati poi fissati in OsO₄ per un'ora, messi in recipienti porosi, poi immersi in quantità sempre maggiori di etanolo 50-100% in modo da rimuovere l'acqua per gradi. La superficie del campione deve essere conduttrice, perché possa essere leggibile al microscopio elettronico a trasmissione. Si ricopre il campione con uno strato sottile di metallo (Au) che agisce come una sorgente di elettroni secondari. I preparati sono stati osservati con SEM Zeiss DSM 962 (Figura 3).

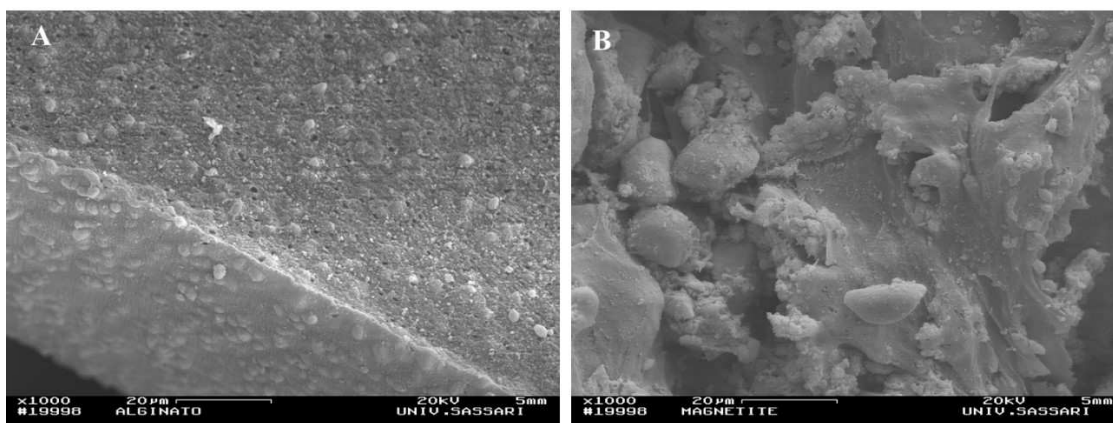


Figura 3. Cellule di lievito inglobate all'interno e presenti sulla superficie della sfera d'alginato di sodio (A). Sfere addizionate con particelle di ossido di ferro (B). Immagini acquisite mediante microscopia SEM con ingrandimento 1000X.

3.2.5 Purificazione dell'OTA dai campioni e analisi HPLC

Per determinare la presenza di OTA nei campioni, è stato necessario purificare tutti i campioni di succo d'uva, mediante colonnine ad immuno affinità (Romer Labs®, Union, MO, USA). Il filtrato ottenuto, 4 mL è stato evaporato con azoto 5.0 e risospeso in 400 µL di fase mobile (acetonitrile, acqua, acido acetico, 49.5: 49.5:1).

Per determinare la presenza di OTA nei campioni e conoscerne il quantitativo, sono state allestite delle letture all'HPLC Agilent 1200 series. Essa è costituita da una pompa quaternaria, con degassatore a vuoto, auto campionatore integrati e rivelatore a fluorescenza. La separazione di fase è stata effettuata con colonna Zorbax SB-C18, 4.6 x 150 mm, 5Micron. Il flusso in colonna è stato tarato a 1 mL/min ad una temperatura di 25°C. Lo spettro di emissione è stato fissato tra 330 e 460 nm. E' stato iniettato un volume pari a 100 µL. La presenza di ocratossina è stata identificata confrontando i tempi di ritenzione espressi nel cromatogramma mediante rilevazione di picchi, con quello emesso dallo standard dell'OTA (5,9 minuti).

3.2.6 Realizzazione di un prototipo di bio reattore

Le sfere di alginato di sodio e cellule di lievito autoclavate, pari ad un quantitativo di 50 mL, sono state inserite in una colonna di vetro per gascromatografia, alta 30 cm, con diametro di 3 cm (Figura 4). Un pari quantitativo di succo d'uva, ammendato con OTA (20 µg/Kg) è stato fatto defluire lentamente nella colonna attraversando le sferette e recuperato in un beaker sterile. E' stato fatto defluire per quattro volte. Tutto è stato replicato, impiegando tre colonne di vetro e per ogni campione filtrato sono stati purificati 6 grammi di succo d'uva e letti mediante HPLC.

3.2.7 Analisi statistica

I risultati di ogni esperimento sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza a una via, in seguito sono stati eseguiti confronti multipli con il test Tukey ($p < 0,05$), utilizzando il programma Statgraphics Centurion® XV per Windows.

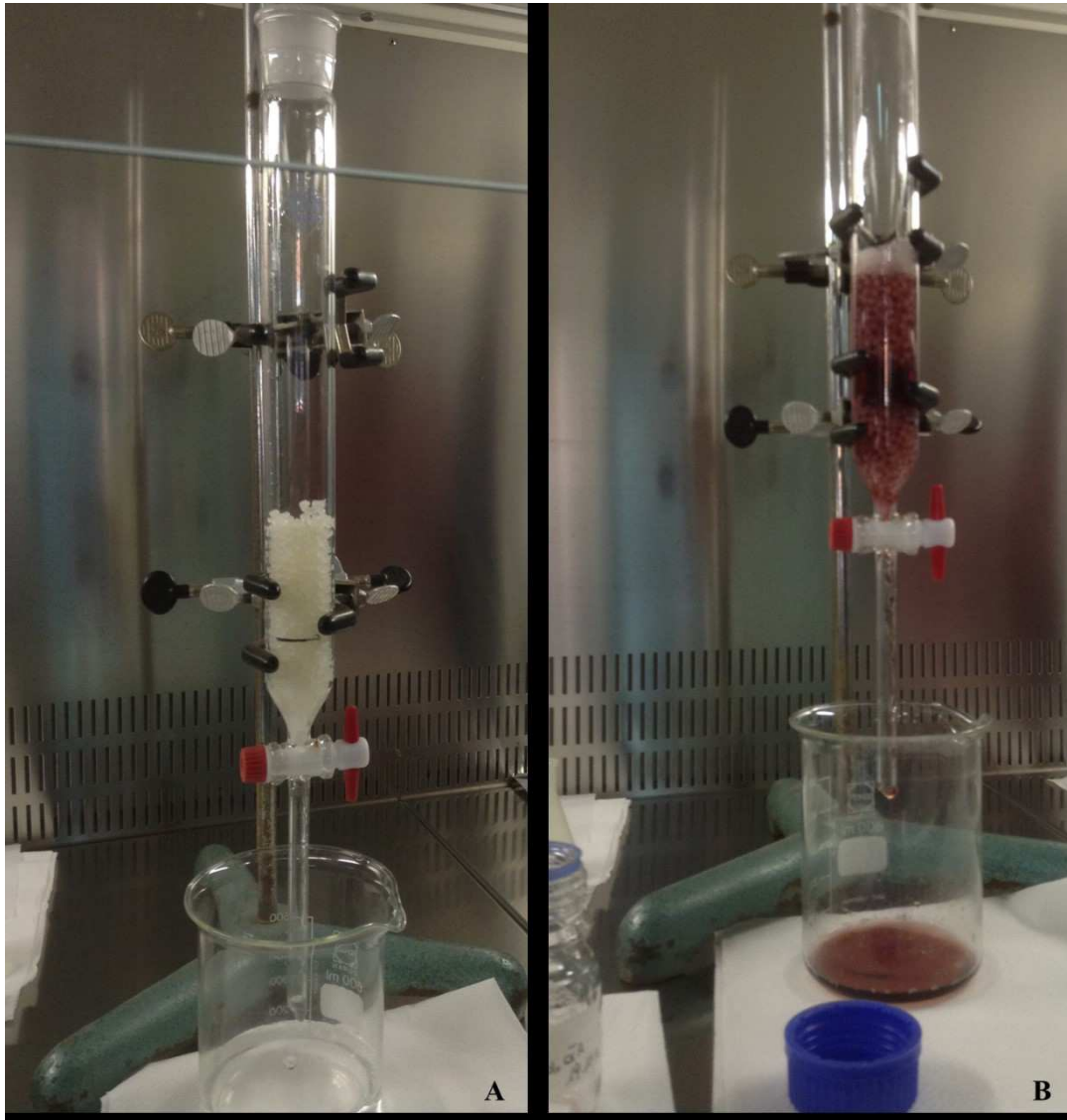


Figura 4. Colonna cromatografica con sfere d’alginate di sodio e lievito (A).
Deflusso del succo d’uva attraverso la colonna e recupero mediante raccolta in beaker sterile (B).

3.3 Risultati

3.3.1 *Decremento dell’OTA*

Le sfere di alginate con cellule di lievito autoclavate aggiunte al succo d’uva contaminato con OTA, per un tempo di 48 ore, hanno mostrato rispetto al contenuto totale della micotossina, una riduzione pari all’ 80%, $P \leq 0,05$ (17,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Al contempo, le sfere realizzate con cellule di lievito non sottoposte a trattamento termico hanno mostrato una riduzione dell'OTA nel succo d'uva pari al 70% $P \leq 0,05$. La presenza Fe_3O_4 oltre all'alginato di sodio e cellule di lievito autoclavato, non ha influito sull'adsorbimento dell'OTA, in quanto è stata osservata una riduzione del contenuto della micotossina comparabile a quello ottenuto dalle cellule di lievito autoclavate libere nel succo d'uva, e da cellule autoclavate immobilizzate in forma di sfere con l'alginato di sodio.

Nell'esperimento del time course, è stato possibile osservare che già dopo 24-48 ore di incubazione, le sfere di lievito autoclavato e alginato sono state in grado di sottrarre la micotossina dal succo d'uva, con valori rispettivamente di 5,6-2,8 $\mu\text{g/Kg}$ (valore di partenza 16 $\mu\text{g/Kg}$), fino a 6 $\mu\text{g/Kg}$ dopo 5 giorni di incubazione (Figura 5).

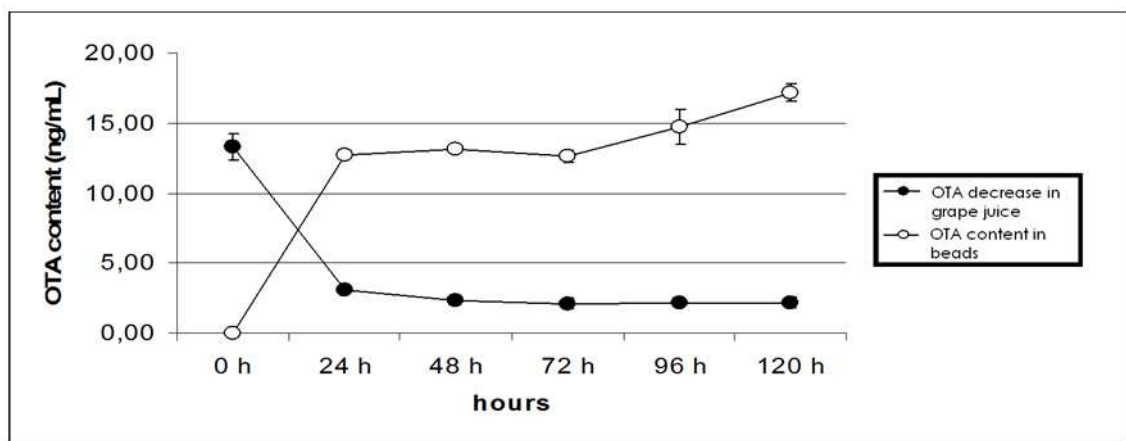


Figura 5. Time course dell'adsorbimento dell'OTA da parte delle sfere e andamento del decremento dell'OTA nel succo d'uva, per un tempo da 0-120 ore. I risultati sono espressi come concentrazione di OTA (ng/mL). Le barre verticali indicano l'errore standard (n=3).

3.3.2 *Il bioreattore quale potenziale strumento di decontaminazione*

E' stato possibile osservare che più passaggi consecutivi del succo d'uva attraverso le sfere di cellule di lievito autoclavato e alginato di sodio inserite in una colonna gascromatografica, portano ad una riduzione sensibile dell'OTA. Facendo defluire il campione per la prima volta, si è registrata una riduzione del 21%. Dopo soli 4

passaggi, la presenza dell'OTA si è ridotta con una percentuale superiore al 50% rispetto al contenuto iniziale. Inoltre è stata realizzata una funzione logaritmica per stimare l'andamento dell'adsorbimento dell'OTA (Figura 6).

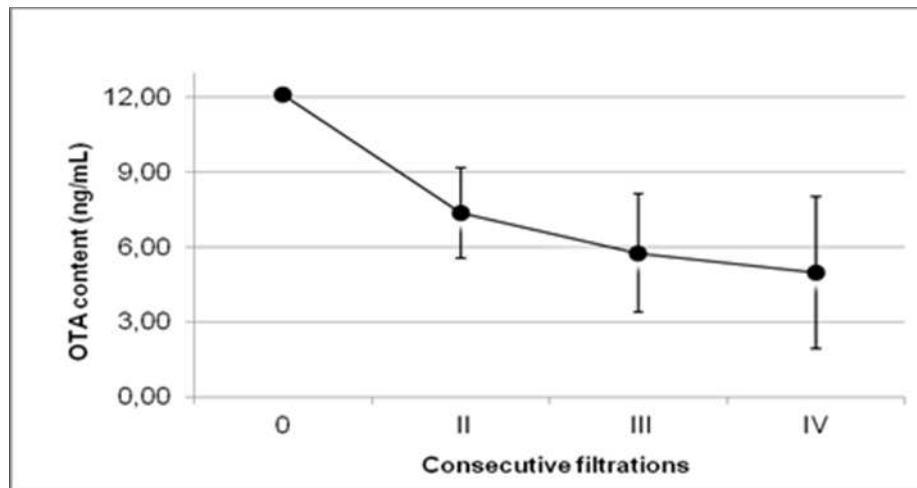


Figura 6. Decremento del contenuto di OTA nel succo d'uva, mediante filtraggio attraverso le sfere di alginato e lievito autoclavato posizionate all'interno della colonna cromatografica. I Risultati mostrano un'iniziale concentrazione dell'OTA (ng/mL) nel campione, a seguire le concentrazioni decrescenti di OTA durante i 4 cicli di filtrazione. Le barre verticali indicano l'errore standard (n=3).

Il lavoro è stato oggetto dell'articolo "*Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilised in calcium alginate beads*", pubblicato sulla rivista *International Journal of Food Microbiology* 217 (2016) 29-34, riportato qui di seguito.



Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilised in calcium alginate beads



Maria Grazia Farbo^{a,b,1}, Pietro Paolo Urgeghe^{a,1}, Stefano Fiori^{a,b}, Salvatore Marceddu^c, Samir Jaoua^d, Quirico Migheli^{a,b,*}

^a Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy

^b Unità di ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy

^c Istituto CNR di Scienze delle Produzioni Alimentari, UOS Sassari, Traversa La Crucca 3, I-07100 Sassari, Italy

^d Department of Biological & Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box: 2713, Doha, Qatar

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2015

Received in revised form 27 September 2015

Accepted 12 October 2015

Available online 22 October 2015

Chemical compounds studied in this article:

Ochratoxin A (PubChem CID: 442530)

Sodium calcium alginate

(PubChem CID: 6850754)

Iron monoxide (PubChem CID: 14945)

Keywords:

Mycotoxin contaminants

Food safety

Biological decontamination

Biosorption

Cell immobilisation

Bioreactor systems

Aspergillus carbonarius

Candida intermedia

Beverage industry

ABSTRACT

Grape juice can be easily contaminated with ochratoxin A (OTA), one of the known mycotoxins with the greatest public health significance. Among the different approaches to decontaminate juice from this mycotoxin, microbiological methods proved efficient, inexpensive and safe, particularly the use of yeast or yeast products. To ascertain whether immobilisation of the yeast biomass would lead to successful decontamination, alginate beads encapsulating *Candida intermedia* yeast cells were used in our experiments to evaluate their OTA-biosorption efficacy. Magnetic calcium alginate beads were also prepared by adding magnetite in the formulation to allow fast removal from the aqueous solution with a magnet. Calcium alginate beads were added to commercial grape juice spiked with 20 µg/kg OTA and after 48 h of incubation a significant reduction (>80%), of the total OTA content was achieved, while in the subsequent phases (72–120 h) OTA was slowly released into the grape juice by alginate beads. Biosorption properties of alginate-yeast beads were tested in a prototype bioreactor consisting in a glass chromatography column packed with beads, where juice amended with OTA was slowly flowed downstream. The adoption of an interconnected scaled-up bioreactor as an efficient and safe tool to remove traces of OTA from liquid matrices is discussed.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Grape juice is one of the most consumed fruit-based beverages. It represents a rich source of flavonoids with antioxidant properties, and has been shown to reduce oxidative stress and to improve endothelial function (Alhosin et al., 2013; Costa de Camargo et al., 2014). Along with wine, it can be often contaminated with ochratoxin A (OTA) (Battilani et al., 2003; Mulè et al., 2006; Zimmerli and Dick, 1996), one of the most dangerous mycotoxins for mammals because of its strong immunosuppressive, nephrotoxic, teratogenic, hepatotoxic and carcinogenic properties (EFSA, 2006; Rodriguez et al., 2011). OTA occurrence

in wine and grape juice is consequent to grape colonisation by black *Aspergilli*, among which *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom is considered the most efficient OTA producer (Battilani et al., 2003; Bau et al., 2005; Cabañes et al., 2002).

Concern about the presence of OTA in grape juice is legitimate, since consumption of this beverage is more widespread than wine and it may be the main source of OTA intake by children (Terra et al., 2013; Varga and Kozakiewicz, 2006). The European Commission (2006) has set at 2 µg/kg the maximum permitted levels of OTA traces for wine and grape juice in the European Union (Commission regulation No. 1881/2006 amending Regulations No. 446/2001 and No. 123/2005). Consequently, efficient, inexpensive and safe OTA decontamination techniques for wine and juice are required. So far, several physical, chemical and microbiological strategies were proposed, albeit with different levels of efficiency (see for review: Amézqueta et al., 2009; Quintela et al., 2013).

Among the microbiological approaches, the use of yeast strains to remove OTA from juice and wine proved most effective (Bejaoui et al.,

* Corresponding author at: Dipartimento di Agraria, Unità di ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy.

E-mail address: qmigheli@uniss.it (Q. Migheli).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

2004; Cubaiu et al., 2012; Fiori et al., 2014; Petrucci et al., 2013). Mycotoxin degradation into new, but not necessarily safer, compounds has not been observed so far, while decontamination efficiency depends upon adsorption mechanisms onto the yeast cell wall and, clearly, on the particular strain chosen for this purpose (Quintela et al., 2013; Zoghi et al., 2014).

Moreover, autoclaving yeast cells may significantly increase their OTA-adsorption properties, likely due to the enhancement of adsorption cell sites as a consequence of the heat treatment (Bejaoui et al., 2004; Fiori et al., 2014; Péteri et al., 2007).

A major constraint in microbiological decontamination approaches is the need to obtain a cell free product upon treatment. A solution adopted in continuous fermentation processes consists in the containment of yeast cells behind a barrier, which can be achieved either by using microporous membrane filters or by entrapment of cells into porous matrices (Verbelen et al., 2006). Immobilisation of the biomass leads to successful decontamination – such as in the case of biosorption of heavy metals – because of the increase of properties such as density, mechanical strength and resistance to artificial environments (Chatterji, 2011).

Alginate is a natural polysaccharide found in brown seaweeds. It is composed of D-mannuronic acid and D-glucuronic acid and its main feature is that it is a gelable compound (Gombotz and Wee, 1998; Inal and Yiğitoğlu, 2011). When melted in water it produces a thick gel that can completely firm up by reacting with polyvalent metal cations such as calcium (Harper et al., 2014). Having non-toxic, biocompatible and biodegradable properties, this compound is exploited in many pharmaceutical preparations (Babu et al., 2007; Simpson et al., 2006) and in the food industry, e.g. in edible coating and biodegradable packaging film production (Azarakhsh et al., 2014; Da Silva et al., 2009).

Alginate beads encapsulating living yeast cells are a well-known tool in wine making processes needing specific and controlled fermentation (Branyik et al., 2005; Verbelen et al., 2006). This is achieved by entrapping yeast within the porous matrix, which is synthesised in situ around the cells. The encapsulating alginate bead allows mutual exchanges between medium and coated microorganisms, increasing production of the desired products by immobilised cells. Moreover, immobilisation may result in variation of the physico-chemical properties of microbial cells, e.g. by modifying metabolic products, ionic charges, water activity, osmotic pressure, or surface tension (Ramakrishna and Prakasham, 1999; Rathore et al., 2013).

The aim of this work was to evaluate whether immobilisation in alginate beads would preserve OTA-decontamination efficacy of the yeast strain *Candida intermedia* 253, previously selected for its combined biosorption and biocidal properties towards *A. carbonarius* (Fiori et al., 2014). Magnetic calcium alginate beads were also prepared to immobilise *C. intermedia* 253 in order to allow fast removal from the aqueous solution with a magnet. Finally, a prototype bioreactor consisting of a glass chromatography column packed with beads is proposed as an efficient and safe tool to remove traces of OTA from liquid matrices.

To the best of our knowledge, this is the first report suggesting the use of autoclaved yeast cells immobilised in alginate beads as an effective tool to remove OTA from beverages.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of calcium alginate gel beads

Candida intermedia (Cif. & Ashford) Langeron & Guerra strain 253, previously shown to be the most efficient among four non-fermentative strains in the adsorption of OTA from grape juice (Fiori et al., 2014), was grown overnight at 25 °C in 20 mL YPD broth (1% yeast extract, 2% bacteriological peptone, 2% dextrose; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were recovered by centrifugation, washed, resuspended in sterile water and counted with a Thoma

haemocytometer to obtain a 1×10^9 CFU/mL concentration in 25 mL of water containing 2% sodium alginate. The jelly solution was either used fresh or first autoclaved for 20 min at 120 °C and then pipetted drop by drop with a Gilson Repetitive® Pipette tared at 250 µL into a 2% CaCl₂ solution, hence converting the drops into gummy beads. Control beads were prepared by using 25 mL of 2% sodium alginate without yeast cell suspension.

Magnetic alginate beads were also obtained from a 3% sodium alginate solution containing 1×10^9 CFU/mL autoclaved yeast cells, 13% iron (II, III) oxide magnetic nanopowder, and 20 nm of diam (Sigma-Aldrich).

2.2. Scanning electron microscopy

Calcium alginate beads were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde and 0.1 M phosphate-buffer (pH 7.2). They were then post-fixed in 1% OsO₄ for 1 h, dehydrated in a graded acetone series, dried by critical point method in a Polaron Jumbo (Quorum Technologies Ltd., Lewes, UK) apparatus and coated with gold in an Edwards S150A Sputter Coater unit (Perkin-Elmer, Santa Clara CA, USA). The specimens were examined with a Zeiss DSM 962 conventional scanning electron microscope.

2.3. OTA adsorption experiments

Calcium alginate beads containing living or autoclaved yeast cells were rinsed twice with 25 mL sterile distilled water to remove CaCl₂ excess and finally added to glass flasks containing 25 mL commercial grape juice (Vitalift, Lidl Stiftung & Co. KG, Neckarsulm, Germany) spiked with 20 µg/kg of OTA (1:1 ratio between calcium alginate beads and juice volume).

In order to compare the biosorption properties of free versus immobilised yeast cells, 1 mL of living or autoclaved yeast cell suspension (2.5×10^{10} CFU/mL sterile water) were added to the OTA-amended grape juice.

Magnetic alginate beads containing autoclaved yeast cells, as well as a control treatment consisting of yeast-free alginate beads were included in the experiment.

The flasks (three flasks per treatment) were then incubated in the dark at 25 °C under constant agitation (100 rpm) for 48 h. Yeast cells and alginate beads were separated by centrifuging at 40,000 rpm (29,000 × g) for 20 min, and a 6-g sample of grape juice from each replicate was subject to OTA extraction and purification with immuno-affinity columns before HPLC analysis.

In a separate experiment, a time course of OTA adsorption by calcium alginate beads containing autoclaved yeast cells was determined by analysing triplicate 6-g samples of OTA-amended grape juice collected as described at 24-h intervals during 5 days.

2.4. Design of an immobilised yeast bioreactor prototype

Glass columns for chromatography (Bicasa s.r.l., Bernareggio, Italy) of 30-cm length and 3-cm diameter were packed with 50 mL alginate beads incorporating autoclaved yeast cells. A 50-mL grape juice amended with OTA (20 µg/kg) were slowly (33 mL/min) flowed downstream through the packed bed reactor until the entire juice volume was recovered into a beaker. The same procedure was repeated three times, and after each round of filtration, a 6-g grape juice sample was collected and subject to HPLC analysis. The experiment was carried out by using three separate columns in parallel.

2.5. OTA purification and HPLC analysis

OTA was extracted from grape juice samples and purified according to the protocol described in the MycoSep® OchrA Push-through kit (Romer Labs®, Union, MO, USA), weighing all the fractions obtained

Table 1

Performance parameters of the analytical method. Different letters indicate statistical differences as per Tukey's test, $P < 0.05$.

Validation level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery % (n = 6)	RSD % (n = 6)	LOD ($\mu\text{g}/\text{L}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RSDs (n = 3, j = 4)
2	76.00 \pm 3.77 ^b	4.99			
10	88.56 \pm 2.96 ^a	3.34	0.159	1.59	
20	83.38 \pm 4.42 ^a	4.88			4.24

during the process. The purified extract was resuspended in 0.4 mL of HPLC mobile phase. OTA determination was performed on an Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump with integrated vacuum degasser (G1311C), autosampler (G1329B), column oven (G1316A) and fluorescence detector (G1321A). The separation was performed on a Zorbax column SB-C18, 4.6 \times 150 mm, 5-Micron (Agilent, Santa Clara, CA, USA), under isocratic conditions. The mobile phase was a mixture of acetonitrile, water and acetic acid (49.5:49.5:1 v/v/v, respectively). The flow was set to 1 mL/min and the column oven temperature was set to 25 °C. The excitation and the emission wavelengths were set to 333 and 460 nm, respectively. OTA was identified by comparing the retention time of the relevant peak on samples with the one from the standard (5.9 min).

The quantification of OTA was performed using a linear external calibration in a range from 0.6 to 60 $\mu\text{g}/\text{L}$, with a mean correlation coefficient of 0.99995. Results were then expressed as μg per kg of sample. Additional experiments were conducted in order to evaluate the performances of the whole analytical method, such as recovery (R), repeatability (RSD) intermediate precision (RSDs), limit of detection (LOD) and quantification (LOQ). Six identical samples for each level of validation were obtained by spiking the blank grape juice with the OTA standard in order to obtain laboratory reference materials with a final concentration of 2, 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. R(%) was calculated as the ratio of the concentration obtained with respect to the original concentration spiked in the grape juice. The repeatability at each level was estimated as the relative standard deviation of the results obtained with these samples (n = 6). The intermediate precision was calculated as the relative standard deviation of the mean values obtained by analysing, during four independent analytical sessions (j = 4), three samples for each session (n = 3), spiked at 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The instrumental LOD was obtained from the calibration function according to the Hubaux–Vos method (Hubaux and Vos, 1970) and expressed as $\mu\text{g}/\text{L}$ of extract. LOQ was calculated as 10-times the obtained LOD. Table 1 reports the obtained performance parameters of the method.

2.6. Statistical analysis

Data from each experiment were subjected to arcsine square root transformation prior to one-way analysis of variance followed by multiple comparisons by Tukey test, using Statgraphics Centurion® XV for Windows.

3. Results and discussion

In the present work, an autoclaved strain of *C. intermedia* that proved efficient in adsorbing OTA from grape juice (Fiori et al., 2014) was encapsulated in calcium alginate beads in order to develop a handy and easily removable tool to adsorb the mycotoxin from liquid matrices.

Adsorption properties of calcium alginate are well documented and so far mainly exploited for removal of heavy metals (Veglio et al., 2002; Yu et al., 2013) or protein adsorption (Castro et al., 2009). OTA adsorption by yeast is instead likely due to the β -glucans and mannoproteins of the cell wall that, carrying negative charges at grape juice pH, may originate polar and non-polar interactions with the mycotoxin (Ringot et al., 2005). Since the glycan portion of mannoproteins may vary depending on yeast strain, also their OTA removal efficiency can be different (Quintela et al., 2013). For this reason we have utilised a selected strain of *C. intermedia* that had previously shown its excellent OTA biosorption properties (Fiori et al., 2014).

The alginate beads were whitish, with a sub-spherical to pyriform shape (Fig. 1 A–B), measuring 1–2 mm in diameter, and the yeast cells appeared evenly entrapped within the matrix, exposed to the external surface (Fig. 1 C). On the contrary, magnetic beads presented a dark colour and irregular shape (Fig. 2 A), with uneven distribution of yeast cells dispersed among iron nanoparticles (Fig. 2 B–C). Both calcium alginate and magnetic beads could be separated from the liquid matrix, the magnetic beads having the advantage of being easily removed from the aqueous solution with a magnet (not shown).

When autoclaved yeast cells, either free or entrapped in calcium alginate were added to OTA-amended grape juice, a significant reduction (from 17.4 to 3.3–2.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively, corresponding to >80% reduction; $P \leq 0.05$) of the total mycotoxin content was observed after 48 h of incubation (Fig. 3). OTA decrease following treatment with free or immobilised living cells was less evident (from 17.4 to 5.1–5.0, respectively, corresponding to approximately 70% reduction; $P \leq 0.05$). These results suggest that encapsulation in alginate beads does not prevent adsorption of OTA by the yeast cell wall proteins, while autoclaving improves OTA-adsorption properties of the tested yeast significantly, as previously observed by testing four strains belonging to different yeast species (Fiori et al., 2014).

Convenience of alginate beads encapsulating autoclaved yeasts was further enhanced by adding magnetite to the mix, before firming up the drops in CaCl_2 . The presence of iron (II, III) oxide magnetic nanopowder in the yeast–alginate beads did not affect OTA adsorption, as we observed a reduction of the mycotoxin content in the juice comparable to that achieved by standard alginate beads (Fig. 3). The significant, albeit moderate (17.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) OTA-adsorption features of yeast-free alginate beads is reported here for the first time and deserves further attention due to potential use of alginate for OTA-decontamination by continuous flow reactors in beverage industry.

Most of the mycotoxin was adsorbed by autoclaved yeast immobilised in alginate beads during the first two days of contact with the grape juice, as OTA content dropped from 16 to 5.6–2.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after 24–48 h (Fig. 4). In the subsequent phases, OTA was slowly

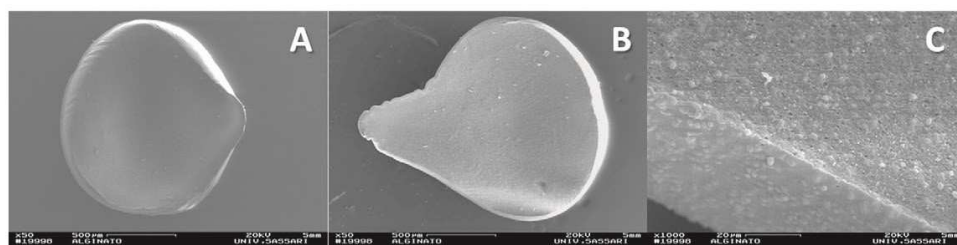


Fig. 1. Alginate beads were obtained by mixing 1×10^9 CFU/mL yeast cells and 2% sodium alginate in a 25-mL water. Beads were whitish, with a sub-spherical to pyriform shape (A–B), measuring 1–2 mm in diameter, and the *Candida intermedia* cells appeared evenly entrapped within the matrix, exposed to the external surface (C).

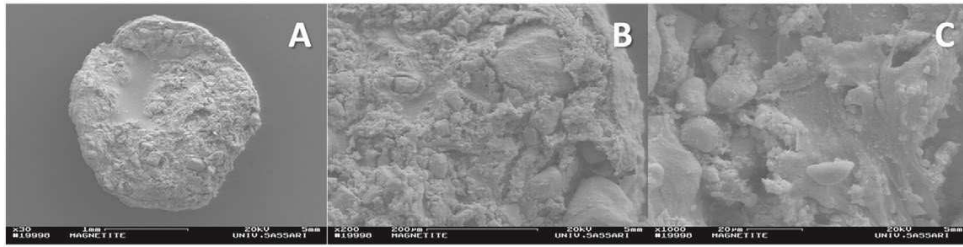


Fig. 2. Magnetic beads, obtained by adding 13% iron (II, III) oxide magnetic nanopowder and a higher percentage (3%) of sodium alginate to the previous mix, presented a dark colour and irregular shape (A), with uneven distribution of yeast cells dispersed among iron nanoparticles (B–C).

released into the grape juice by alginate beads, probably as a result of binding site saturation, reaching a concentration of 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after 120 h of incubation (Fig. 4).

Application of alginate–yeast beads as part of a prototype tool to decontaminate liquid matrices such as fruit juice or wine from OTA was further developed by packing a chromatography glass column with alginate beads containing autoclaved yeast cells. By allowing the OTA-amended juice to flow through the packed column four subsequent times we observed that OTA content in juice decreased after each filtration, achieving a reduction of the initial OTA concentration from 21% (after the first filtration step) to 57% (fourth filtration step; Fig. 5). A logarithmic function is proposed to estimate the adsorption trend in the prototype bioreactor. Fig. 5 presents the interpolating equation.

An interconnected solution of chromatography glass column packed with beads is proposed as a scale-up tool to provide a high cell

density system (Verbelen et al., 2006), hence reducing the possibility of binding site saturation by OTA in combination with high continuous flow rate of juice. Improvement of mycotoxin decontamination from beverages could be achieved by deepening the study of new scaled-up bioreactors (Zoghi et al., 2014) tied with the best combination of yeasts with other natural coating matrices. A similar approach was recently adopted for biosorption of patulin in a bed bioreactor packed with immobilised caustic treated yeast biomass from waste cider (Guo et al., 2013).

The use of autoclaved yeast strains to passively decontaminate grape juice offers the advantage that dead cells cannot ferment or release secondary metabolites within the substrate leading to an alteration of its organoleptic traits. Calcium alginate spheres with autoclaved yeast cells are proposed here for the first time as a promising, safe and natural tool to remove traces of OTA from fruit juice and wine.

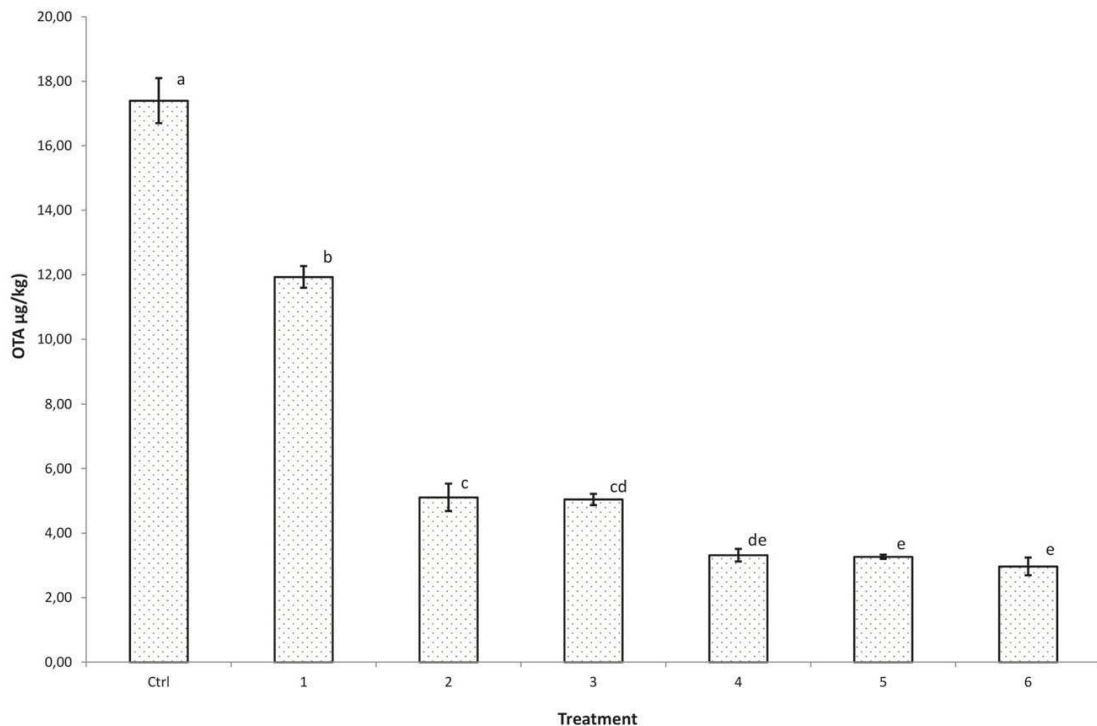


Fig. 3. Ochratoxin A (OTA) adsorption by: 1, alginate beads; 2, living yeast cells; 3, living yeast cells immobilised in alginate beads; 4, autoclaved yeast cells immobilised in magnetic alginate beads; 5, autoclaved yeast cells; 6, autoclaved yeast cells immobilised in alginate beads incubated in OTA-amended grape juice for 48 h. Results are expressed as OTA concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in treated and untreated grape juice. Vertical bars indicate standard error ($n = 3$). Different letters indicate statistical differences as per Tukey's test, $P < 0.05$.

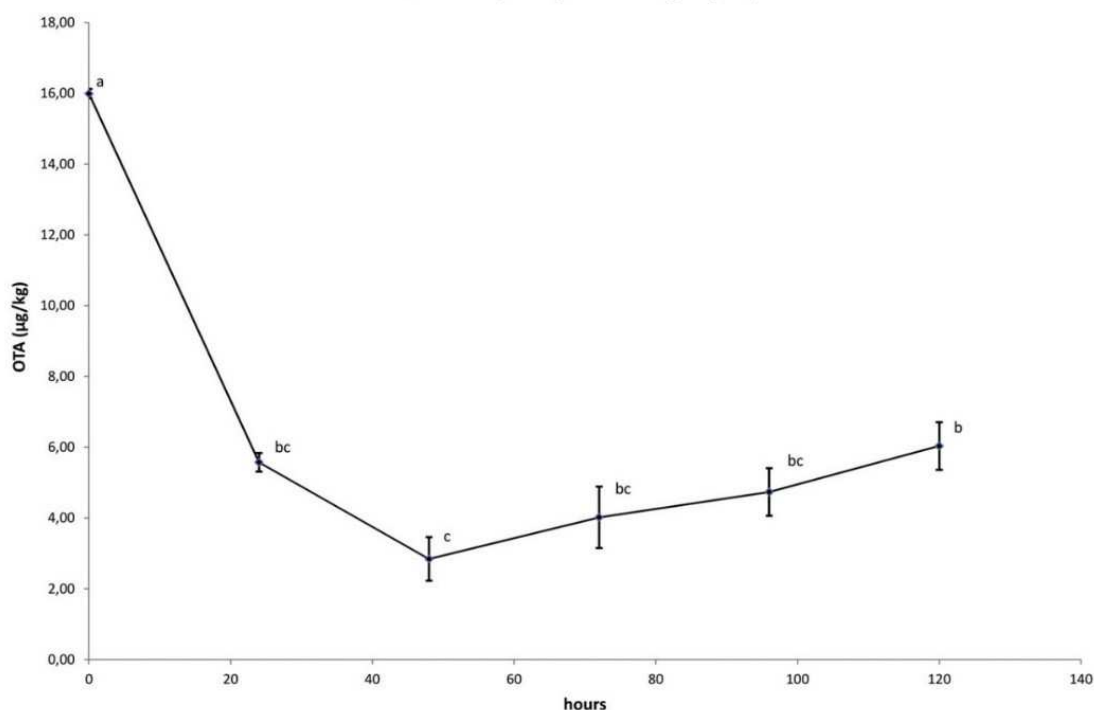


Fig. 4. Time course of ochratoxin A (OTA) adsorption by alginate beads containing autoclaved yeast cells incubated in OTA-amended grape juice for 0–120 h. Results are expressed as OTA concentration (µg/kg) in untreated juice, and thereafter in treated juice samples. Vertical bars indicate standard error (n = 3). Different letters indicate statistical differences as per Tukey's test, $P < 0.05$.

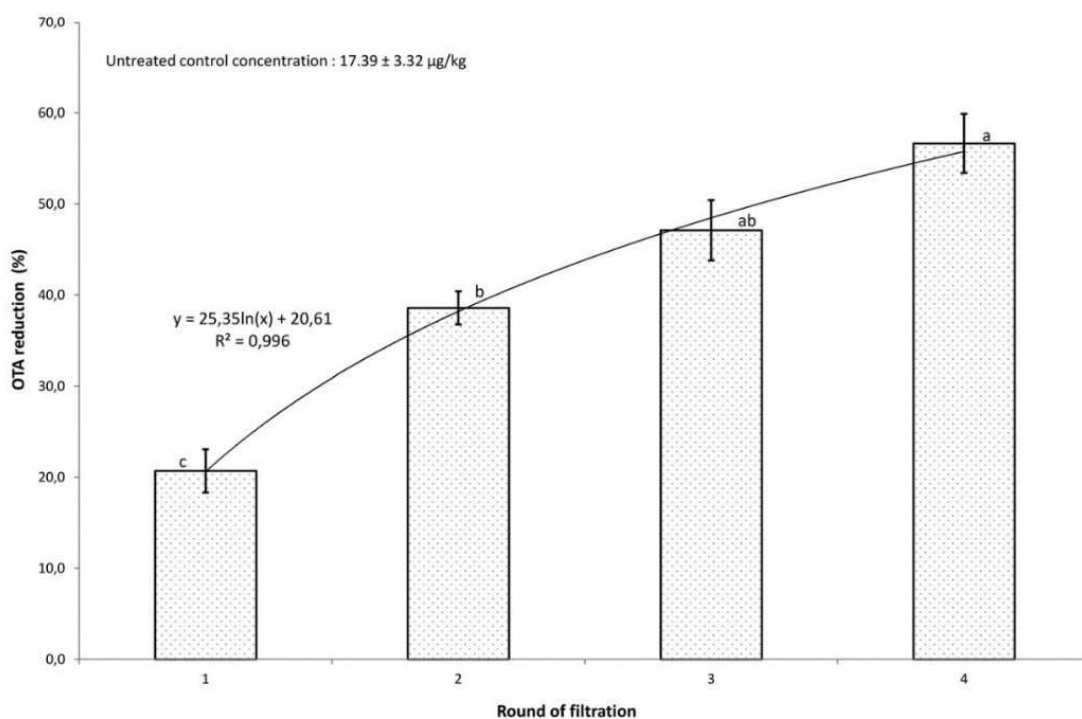


Fig. 5. Ochratoxin A (OTA) adsorption achieved by flowing OTA-amended grape juice into a yeast beads packed column. Results show the initial OTA concentration (µg/kg) in untreated juice, and thereafter in treated juice samples during the four subsequent filtration cycles. Vertical bars indicate standard error (n = 3). Different letters indicate statistical differences as per Tukey's test, $P < 0.01$.

Acknowledgements

This publication was made possible by NPRP grants # NPRP 4-259-2-083 and # NPRP 8-392-4-003 from the Qatar National Research Fund (a member of Qatar Foundation). The statements made herein are solely the responsibility of the authors. We thank Professors Marilena Budroni and Ilaria Mannazzu for kindly providing yeast strains from the DISAABA collection.

References

- Alhosin, M., Anselm, E., Rashid, S., Kim, J.H., Frota Madeira, S.V., Bronner, C., Schini-Kert, V.B., 2013. Redox-sensitive up-regulation of eNOS by purple grape juice in endothelial cells: role of P3-Kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and FoxO3a. *PLoS ONE* 8 (3), e57883.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A., 2009. Ochratoxin A decontamination: a review. *Food Control* 20, 326–333.
- Azarakhsh, N., Osman, A., Ghazali, H.M., Tan, C.P., Adzahan, N.M., 2014. Effects of gellan-based edible coating on the quality of fresh-cut pineapple during cold storage. *Food Bioprocess Technol.* 7, 2144–2151.
- Babu, V.R., Sairam, M., Hosamani, K.M., Aminabhavi, T.M., 2007. Preparation of sodium alginate–methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine. *Carbohydr. Polym.* 69, 241–250.
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z., 2003. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in grapes grown in Italy. *J. Food Prot.* 66, 633–636.
- Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S., Cabañes, F.J., 2005. Ochratoxinogenic species from Spanish wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 125–130.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1038–1044.
- Branyik, T., Vicente, A.A., Dostalek, P., Teixeira, J.A., 2005. Continuous beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems. *Biotechnol. Prog.* 21, 653–663.
- Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G.A., Minguez, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin a in wine? *Int. J. Food Microbiol.* 79, 213–215.
- Castro, G.R., Chen, J., Panilaitis, B., Kaplan, D.L., 2009. Emulsion-alginate beads for protein adsorption. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 20, 411–426.
- Chatterji, A.K., 2011. *Introduction to Environmental Biotechnology*. Third ed. PHI Learning, Delhi.
- Costa de Camargo, A., Bismara Regitano d'Arce, M.A., Camarão Telles Biasoto, A., Shahidi, F., 2014. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *J. Agric. Food Chem.* 62, 12159–12171.
- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A.D.W., Budroni, M., Migheli, Q., 2012. A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins* 4, 1468–1481.
- Da Silva, M.A., Bierhalz, A.C.K., Kieckbusch, T.G., 2009. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: effect of the plasticizer concentration. *Carbohydr. Polym.* 77, 736–742.
- European Food Safety Authority, EFSA, 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA J.* 365, 1–56.
- European Union, 2006. Commission Regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union L364*, 5–24.
- Fiori, S., Urgeghe, P.P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., Migheli, Q., 2014. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 45–50.
- Gombotz, W.R., Wee, S.F., 1998. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 267–285.
- Guo, C., Yue, T., Yuan, Y., Wang, Z., Guo, Y., Wang, L., Li, Z., 2013. Biosorption of patulin from apple juice by caustic treated waste cider yeast biomass. *Food Control* 32, 99–104.
- Harper, B.A., Barbut, S., Lim, L., Marcone, M.F., 2014. Effect of various gelling cations on the physical properties of “wet” alginate films. *J. Food Sci.* 79, 562–567.
- Hubaux, A., Vos, G., 1970. Decision and detection limits for linear calibration curves. *Anal. Chem.* 42, 849–855.
- Inal, M., Yiğitoğlu, M., 2011. Production of bioethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* onto modified sodium alginate gel. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1548–1554.
- Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 28–34.
- Péteri, Z., Téren, J., Vagvölgyi, C., Varga, J., 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol.* 24, 205–210.
- Petrucci, L., Singaglia, M., Corbo, M.R., Beneduce, L., Bevilacqua, A., 2013. Ochratoxin A removal by *Saccharomyces cerevisiae* strains: effect of wine-related physicochemical factors. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2110–2115.
- Quintela, S., Villarín, M.C., López de Armentia, I., Elejalde, E., 2013. Ochratoxin A removal in wine: a review. *Food Control* 30, 439–445.
- Ramakrishna, S.V., Prakasham, R.S., 1999. Microbial fermentations with immobilized cells. *Curr. Sci.* 77, 87–100.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S., 2013. Microencapsulation of microbial cells. *J. Food Eng.* 116, 369–381.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Oriol, E., Larondelle, Y., 2005. Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochem.* 40, 3008–3016.
- Rodríguez, H., Reveron, I., Doria, F., Costantini, A., De Las Rivas, B., Muñoz, R., Garcia-Moruno, E., 2011. Degradation of ochratoxin A by *Brevibacterium* species. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10755–10760.
- Simpson, N.E., Grant, S.C., Gustavsson, I., Peltonen, V.M., Blackband, S.J., Constantinidis, I., 2006. Biochemical consequences of alginate encapsulation: a NMR study of insulin-secreting cells. *Biomaterials* 27, 2577–2586.
- Terra, M.F., Prado, G., Pereira, G.E., Ematné, H.J., Batista, L.R., 2013. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. *J. Sci. Food Agric.* 93, 890–894.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z., 2006. Ochratoxin in grapes and grape-derived products. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 72–81.
- Veglio, F., Esposito, A., Riverberi, A.P., 2002. Copper adsorption on calcium alginate beads: equilibrium pH-related models. *Hydrometallurgy* 65, 43–57.
- Verbelen, P.J., De Schutter, D.P., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., 2006. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol. Lett.* 28, 1515–1525.
- Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z., Shapley, N.C., 2013. Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 425, 31–41.
- Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13, 655–668.
- Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., Sohrabvandib, S., Zoghia, A., Khosravi-Darani, K., Sohrabvandib, S., 2014. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini-Rev. Med. Chem.* 14, 84–98.

CAPITOLO II
Effetto dei composti volatili organici prodotti da lieviti
in *Aspergilli* produttori di ocratossina A

4.1 Introduzione

Un altro aspetto del contenimento biologico, esercitato dai lieviti, e in particolare dei ceppi selezionati (*Cyberlindnera jadinii* 273, *Candida friedrichii* 778, *Candida intermedia* 235 e *Lachancea thermotolerans* 751), è la capacità di emanare composti volatili, in grado di contenere sia in campo che in postraccolta, la manifestazione e lo sviluppo di malattie, causate da funghi fitopatogeni. Alcuni generi di quest'ultimi, possono essere anche produttori di micotossine, in particolare dell'ocratossina, quest'ultima riscontrabile in molti prodotti quali prodotti a base di cereali, caffè, cacao, spezie, frutta secca, succhi di frutta e d'uva, vino, e derrate di frutta pronte per lo stoccaggio dopo la raccolta in campo. Avendo avuto dati così incoraggianti riguardo la capacità adsorbente dei lieviti nei confronti dell'OTA, gli obiettivi di questo lavoro sono stati quelli di valutare l'efficacia degli agenti di "biocontrol", contro i ceppi di *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*, dal punto di vista della crescita vegetativa e della sporificazione e produzione di ocratossina. Si è voluto stabilire il meccanismo intrinseco dell'inibizione della produzione di OTA, sia studiando a livello genico, sia scoprendo e caratterizzando tutti i composti organici volatili (VOCs), prodotti dai quattro ceppi di lievito precedentemente selezionati, e rilasciati nello spazio di testa. Le colonie di *Aspergilli* esposte ai VOCs dei lieviti hanno mostrato la formazione di un micelio bianco, privo di pigmentazione. Già dalle prime osservazioni al microscopio ottico è stato possibile notare un'alterazione dei margini delle colonie, con ife allungate e sparse, rispetto a un controllo non trattato.

Per capire da cosa sia regolato questo comportamento, si è pertanto, investigato sui composti rilasciati nello spazio aereo sovrastante la colonia fungina e sulla loro potenzialità di bloccare la produzione di OTA, e infine ricercare a livello genico, la potenzialità di tali VOCs, nel bloccare l'espressione genica del pathway dei geni responsabili della biosintesi del metabolita secondario, e dei geni implicati nella regolazione nell'*A. carbonarius*. Per conseguire tali risultati si è intrapresa una tecnica di estrazione dell'OTA (Bragulat et al., 2001), rimodulata in base alle nostre esigenze di coltura dei ceppi fungini. La presenza della micotossina OTA è stata rilevata mediante High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Lo studio dei VOCs dei lieviti, è stato affrontato mediante l'analisi Headspace-Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS).

Infine per l'espressione genica, sono stati selezionati i primers specifici e allestita una Real-Time Reverse Transcription PCR (qRT-PCR).

La sottoespressione dei geni individuata grazie a questo studio, può essere ricondotta all'effetto inibitore delle sostanze volatili rilasciate dai quattro ceppi di lievito selezionati per questo studio. Alla luce di quanto osservato si può ipotizzare l'impiego di tali sostanze quale ulteriore strumento biologico di inibizione della biosintesi delle micotossine già a livello genetico, riducendo così i rischi per il consumatore e l'ambiente.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Ceppi fungini e condizioni culturali

Sono stati utilizzati nelle prove i ceppi di *Aspergillus carbonarius* Bainier Thom. MPVA566 e di *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. MPVA703 (concessi dalla Prof.ssa Paola Battilani, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia).

I funghi sono stati fatti crescere su potato dextrose agar (PDA) a 25 °C per sette giorni, affinché fossero in condizioni favorevoli alla produzione di OTA, Figura 7.

Sono stati scelti quattro ceppi di lievito in base alla loro capacità di contenimento della crescita e sporificazione di *A. carbonarius* (Fiori et al., 2014) e per le loro capacità adsorbenti nei confronti dell'OTA (Farbo et al., 2016): *Cyberlindnera jadinii* 273, *Candida friedrichii* 778, *Candida intermedia* 235 e *Lachancea thermotolerans* 751, Figura 7.



Figura 7. I ceppi ocratossigeni utilizzati in questo lavoro: *Aspergillus carbonarius* Bainier Thom. MPVA566 (A), *Aspergillus ochraceus* G. Wilh. MPVA703 (B); i quattro lieviti *Cyberlindnera jadinii* 273, *Candida friedrichii* 778, *Candida intermedia* 235 e *Lachancea thermotolerans* 751 (C).

4.2.2 Inibizione della crescita fungina e della produzione di OTA in vitro

I quattro lieviti sono stati fatti crescere su YPD agar (1% estratto di lievito, 2% peptone, 2% destrosio, 2% agar) a 25 °C per 24 ore e conservati ad una temperatura di 4°C. Due giorni prima l'inizio della prova di inibizione, un'ansata di cellule di lievito sono state stemperate in 100 mL di YPD brodo (1% estratto di lievito, 2% peptone, 2% destrosio) e incubate a 25 °C in agitazione costante, 150 rpm, overnight.

Il giorno successivo le cellule sono state recuperate mediante centrifugazione a 40.000 rpm per 20 minuti e risospese in soluzione di Ringer (0,9% NaCl) per ottenere una sospensione con concentrazione finale di 1×10^8 CFU/mL, mediante conta cellulare alla camera emocitometrica di Thoma.

Per valutare l'efficacia dei lieviti, 100 μ L di ognuna delle quattro sospensioni, sono stati seminati per diffusione su piastra di YPD agar e incubati a 25°C per 24 ore.

E' stata preparata una sospensione di spore fungine di *A. carbonarius* e *A. ochraceus* mediante recupero di micelio cresciuto precedentemente per una settimana su PDA (potato-dextrose-agar, 39 g/L), con soluzione di Ringer e filtraggio attraverso garza sterile. Per le due specie di *Aspergilli* sono state realizzate due sospensioni a concentrazione nota (1×10^7 UFC/mL) con conta alla camera di Thoma. Sono stati inoculati 20 μ L di tali sospensioni al centro di una piastra di PDA. A coperchio di quest'ultime piastre di PDA inoculate con *Aspergilli*, sono state poste le capsule di YPD

agar nelle quali dopo 24 ore sono stati fatti crescere i lieviti. Le due piastre rivolte “faccia a faccia” sono state sigillate con Parafilm® e Scotch®, incubate a 25°C per 7, 10 giorni, (Figura 8). In tali intervalli di tempo sono state osservate modifiche macro e microscopiche della crescita della colonia, rilevati i diametri della crescita radiale degli *Aspergilli* sottoposti a trattamento e non. L’esperienza è stata triplicata e per ogni trattamento sono state eseguite tre repliche.

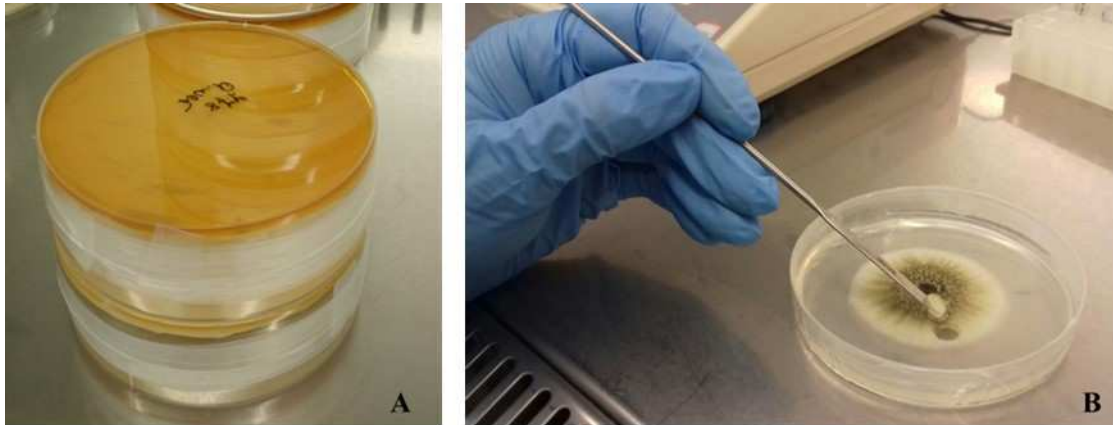


Figura 8. Co-cultura di lievito e *Aspergilli*, posti faccia a faccia senza nessun contatto tra di essi. Piastre sigillate con Parafilm e Scotch (A). Prelievo di 3 plugs per ogni colonia di *Aspergilli* di controllo negativo e di colonie esposte alle sostanze volatili dei lieviti (B).

4.2.3 Purificazione dell’OTA e analisi HPLC

Dopo sette giorni di incubazione a 25°C, sono stati prelevati 3 plugs di micelio cresciuto in PDA (6 mm di diametro). Ogni campione è stato pesato in tubi Eppendorf da 2 mL, aggiunto 1 mL di metanolo e miscelato per inversione manualmente. Sono stati lasciati in incubazione per un’ora e centrifugati a 13.000 rpm per 15 minuti. Con siringa sterile stato prelevato il surnatante e filtrato con filtri sterili da 0,2 µm. Il filtrato è stato pesato. Dei campioni filtrati, 600 µL sono stati evaporati mediante Azoto 5.0 e risospesi in fase mobile (acetonitrile, acqua, acido acetico, 49.5: 49.5:1), (Figura 9).

Per determinare la presenza di OTA nei campioni e conoscerne il quantitativo, sono state allestite delle letture all’HPLC Agilent 1200 series. Essa è costituita da una pompa

quaternaria, con degassatore a vuoto, auto campionatore integrati e rivelatore a fluorescenza. La separazione di fase è stata effettuata con colonna Zorbax SB-C18, 4.6 x 150 mm, 5Micron. Il flusso in colonna è stato tarato a 1 mL/min ad una temperatura di 25°C. Lo spettro di emissione è stato fissato tra 330 e 460 nm. E' stato iniettato un volume pari a 100 µL. La presenza di ocratossina è stata identificata confrontando i tempi di ritenzione espressi nel cromatogramma mediante rilevazione di picchi, con quello emesso dallo standard dell'OTA (5.9 minuti).

E' stato eseguito anche un time course per osservare la crescita del micelio e la produzione di OTA degli *Aspergilli* esposti ai possibili composti organici volatili prodotti dai quattro ceppi di lievito, insieme ai controlli negativi, costituiti da *A. carbonarius* e *A. ochraceus* privi di alcun trattamento. Le osservazioni sono state effettuate a 24, 48, 72 e a 168 ore.



Figura 9. Evaporazione dei campioni filtrati con azoto gassoso 5.0 e risospesi in fase mobile (acetonitrile, acqua, acido acetico).

4.2.4 Espressione genica in *Aspergillus carbonarius* MPVA566

Sono stati inoculati 20 μ L di sospensione conidica di *A. carbonarius* MPVA566 (1×10^7 CFU/mL) in 15 mL di PDB (potato-dextrose-broth) in capsule Petri, e a coperchio di esse sono state usate delle capsule Petri di YPD agar nelle quali un giorno prima erano stati fatti crescere i lieviti con modalità e condizioni uguali, descritte precedentemente. Tutte le capsule sono state sigillate con Parafilm® e Scotch® e incubate a 25°C per 5 giorni. L'esperimento è stato triplicato e per ogni trattamento sono state eseguite tre ripetizioni.

Trascorso il tempo di incubazione, il micelio è stato raccolto e separato dal terreno liquido mediante pompa a vuoto e ridotto in polvere con azoto liquido e conservato alla temperatura di -80°C , (Figura 10).

L'espressione di alcuni geni chiave del pathway implicato nella biosintesi dell'OTA in *A. carbonarius* MPVA566, costituito dai geni *acpks*, *acOTApks*, *acOTAnrps* e due geni regolatori *laeA* e *veA*, è stata valutata mediante qRT-PCR. L'espressione di tali geni è stata normalizzata seguendo l'espressione del gene di riferimento *18S* e quella dei geni di un controllo negativo.

L'RNA è stato estratto seguendo il protocollo del kit di purificazione GeneMATRIX® URxLtd, e retro trascritto in cDNA con il kit iScript® cDNA Synthesis, Bio-Rad.

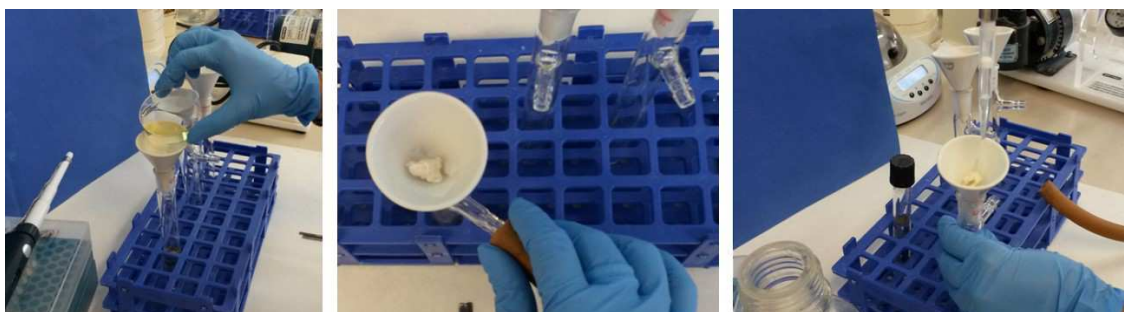


Figura 10. Recupero del micelio di *A. carbonarius* MPVA566, cresciuto per 5 giorni in PDB a 25 °C in co-cultura con i lieviti, attraverso una pompa a vuoto e lavaggi consecutivi con 1 mL d'acqua sterile.

Sono state allestite cinque diluizioni seriali di cDNA per l'efficienza dei primer specifici impiegati nella reazione polimerasica a catena, (Tabella 4). L'analisi è stata eseguita mediante apparecchiatura CFX96 Touch Real Time PCR, Bio-Rad, versione 3.1 anno 2010. Per le reazioni è stata usata la SsoAdvance Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad, iniziando con un quantitativo di 10 ng/μL di cDNA di *A. carbonarius*.

E' stato impostato il seguente programma: 95°C per 3 minuti, 95°C per 10 secondi, 58 °C per 1 minuto, le ultime due fasi ripetute per 40 cicli. La curva di melting è stata definita con un incremento di 0.5 °C in un range di temperatura da 55 °C a 95 °C. L'esperimento è stato triplicato e in ogni qRT-PCR sono state effettuate tre repliche del controllo negativo, privo di cDNA

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>acpks-F</i>	GAGTCTGACCATCGACACGG
<i>acpks-R</i>	GGCGACTGTGACACATCCAT
<i>acOTApks-F</i>	CGTGTCCGATACTGTCTGTGA
<i>acOTApks-R</i>	GCATGGAGTCCTCAAGAACC
<i>acOTAnrps-F</i>	ATCCCCGGAATATTGGCACC
<i>acOTAnrps-R</i>	CCTTCGATCAAGAGCTCCCC
<i>laeA-F</i>	CACCTATACAACCTCCGAACC
<i>laeA-R</i>	GGTTCGGCCAACCGACGACGC
<i>veA-F</i>	TCCCGGTTCTCACAGGCGTA
<i>veA-R</i>	GCTGTCCTTGGTCTCCTCGTA
<i>18S-F</i>	GCAAATTACCCAATCCCGAC
<i>18S-R</i>	GAATTGCCGCGGCTGCTG

Tabella 4. Elenco dei primers impiegati.

4.2.5 Estrazione e analisi delle sostanze volatili prodotte dai lieviti

Le colonie dei quattro ceppi di lievito selezionati sono state seminate per diffusione e isolamento su YPD agar e incubati a 25°C per 24 ore. In seguito un'ansata calibrata (10 µL) di cellule di lievito, è stata seminata su 5 mL di YPD agar a becco di clarino in un vial ambrato della capacità di 20 mL. Le colonie sono state fatte crescere con un tappo di cotone per le prime 48 ore (Figura 11), i vials sono stati poi chiusi con tappo a vite e lasciati ad una temperatura costante di 25 °C per i restanti cinque giorni.

Le composizioni delle sostanze volatili organiche prodotte da ciascun lievito e dal solo terreno di crescita, valutato come controllo negativo, e ritrovate nello spazio di testa dei vials, sono state analizzate mediante headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) seguita da gas chromatography associata a mass spectrometry analisi (GC-MS).

Tutti i campioni sono stati posti ad una temperatura di 50 °C per 30 minuti, è stato fissato un tempo di estrazione di 30 minuti per ciascuno. Prima e dopo ogni estrazione, la fibra utilizzata è stata sottoposta a una temperatura di 250°C. La fibra impiegata in questo lavoro è stata SPME fiber assembly Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), Supelco.

La separazione cromatografica effettuata con una colonna capillare HP-5MS, è stata impostata con il seguente programma: 60 °C per 3 minuti, aumento della temperatura fino a 210 °C, con un aumento di 4 °C al minuto, temperatura di 210 °C stazionaria per 15 minuti e infine un aumento di questa fino a 280 °C, con aumento di 10 °C al minuto. Come veicolo gassoso è stato scelto l'elio, con un flusso costante di 1 mL/min.

I composti volatili sono stati identificati mediante la comparazione degli indici di ritenzione presenti nelle librerie o in letteratura e mettendo a confronto gli spettri emessi da ciascun composto con quelli già presenti nel NIST Standard Reference Database.



Figura 11. Semina dei lieviti su terreno YPD agar a becco di clarino in vials da 20 mL per l'analisi HS-SPME/GC-MS.

4.2.6 *Analisi statistica*

I risultati di ogni esperimento sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza a una via, in seguito sono stati eseguiti confronti multipli con il test Tukey ($p < 0,05$), utilizzando il programma Statgraphics Centurion® XVI per Windows.

4.3 **Risultati**

4.3.1 *I VOCs riducono crescita e sporificazione di A. carbonarius e A. ochraceus in vitro*

La crescita radiale delle colonie di *Aspergilli* sottoposte alla presenza dei VOCs di tutti e quattro i ceppi, osservata per sei giorni, è diminuita sensibilmente, con una riduzione tra il 30-56% rispetto ad un ceppo di *A. carbonarius* e *A. ochraceus* fatti crescere nelle medesime condizioni, ma privi di trattamento con i VOCs, dunque definiti come controlli negativi. *C. intermedia* 253 e *C. friedrichii* 778 sono i lieviti che hanno mostrato maggiore incidenza nella riduzione della crescita dei funghi, (Tabella 5).

Le colonie esposte ai VOCs non hanno sporificato, modificando il proprio colore del micelio aereo, pigmentazione, tessitura. Ad un esame microscopico si segnalano formazioni ifale allungate e irregolari. Ad una osservazione microscopica sono visibili ammassi citoplasmatici granulari all'interno delle ife di *A. ochraceus* esposte ai VOCs

prodotti da *L. thermotolerans* 751 (immagine 3 del manoscritto “*Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing Aspergilli*” inviato per la pubblicazione).

Treatment	Reduction radial growth after 6 days (%)	
	<i>A. carbonarius</i> MPVA566	<i>A. ochraceus</i> MPVA703
<i>C. intermedia</i> 253	55.7 ± 0.3 ^c	51.6 ± 0.1 ^b
<i>C. jadinii</i> 273	34.9 ± 0.3 ^{bc}	30.8 ± 0.2 ^b
<i>L. thermotolerans</i> 751	30.7 ± 0.0 ^b	51.1 ± 0.2 ^b
<i>C. friedrichii</i> 778	37.5 ± 0.1 ^{bc}	54.2 ± 0.1 ^b

Tabella 5. Attività antagonistica esercitata dai volatili dei quattro lieviti contro *A. carbonarius* MPVA566 e *A. ochraceus* MPVA703 dopo sei giorni di co-coltura. I risultati sono espressi in percentuale (\pm errore standard), sono riferiti alla riduzione della crescita radiale su PDA a 25 °C.

4.3.2 I VOCs inibiscono la produzione di OTA in vitro

Una riduzione della crescita è stata accompagnata da un'inibizione della produzione di OTA da parte di entrambi gli *Aspergilli*. In *A. carbonarius* MPVA566 esposto ai VOCs c'è stata una produzione di OTA di 0,1-135 ng/g rispetto ad un controllo non trattato in grado di produrre dai 7.613,9 ai 13.883 ng/g, dopo sette giorni di incubazione in co-coltura a 25 °C. Nell'*A. ochraceus* MPVA703 la produzione di OTA è stata di 2,7-940 ng/g, confrontando i valori prodotti da un controllo negativo (19.609-42.960 ng/g). *L. thermotolerans* 751 si è mostrato essere il lievito con maggiore capacità inibente su entrambi gli *Aspergilli*, (Figura 12).

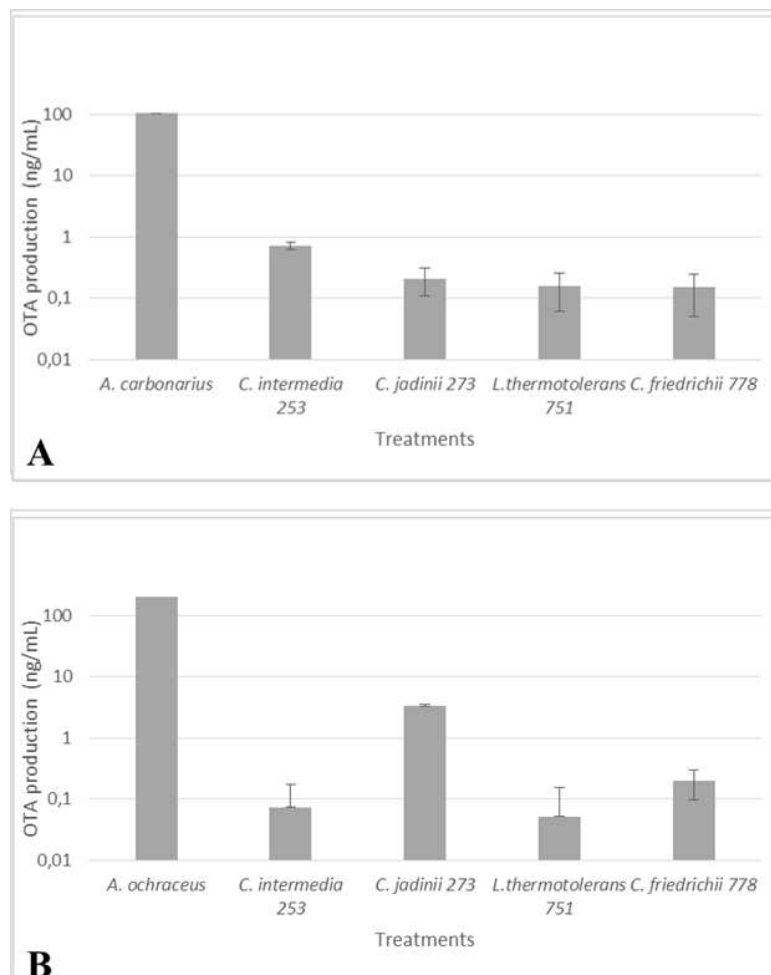


Figura 12. Riduzione di OTA in *Aspergillus carbonarius* (A) e *Aspergillus ochraceus* (B) espressa in ng/mL dopo sette giorni di co-cultura con i lieviti a 25 °C. I dati sono espressi in grafico con scala logaritmica base 10. Le barre verticali indicano l'errore standard (n=3).

4.3.3 Effetto dei VOCs sul pathway biosintetico dell'OTA

L'espressione del gene *acpks* in *A. carbonarius* MPVA566 è stata inibita significativamente da parte dei composti volatili prodotti da tutti e quattro i ceppi di lievito. Allo stesso modo è stato possibile osservare un fenomeno di sottoregolazione anche per i geni *acOTApks*, *acOTAnrps* e per i due geni regolatori *laeA* e *veA*. I dati riportati in un grafico rappresentativo dell'espressione dei geni chiave coinvolti nella

biosintesi dell'OTA, sono visibili nel manoscritto inviato per la pubblicazione su *International Journal of Food Microbiology*, riportato nel capitolo II.

4.3.4 *Composizione dei VOCs prodotti da lieviti*

All'analisi HS-SPME/GC-MS sono stati identificati 20 analiti, appartenenti alla classe degli alcoli, aldeidi, terpeni e idrocarburi. Il principale composto tra tutti i VOCs di tutti i quattro lieviti è stato il 2-feniletanolo, non ritrovato nel cromatogramma del controllo negativo, cioè il solo YPD agar, terreno di crescita dei lieviti. La tabella riassuntiva di tutti i composti volatili e l'aria assoluta di ognuno, sono rappresentati in una tabella consultabile nel manoscritto inviato per la pubblicazione su *International Journal of Food Microbiology*, riportato nel capitolo II.

Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergilli*

Maria Grazia Farbo^{1§}, Paolo Urgeghe^{1§}, Angela Marcello¹, Stefania Oggiano¹,
Virgilio Balmas¹, Zahoor Ul Hassan², Samir Jaoua², Quirico Migheli^{1,3}

¹ *Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy.*

² *Department of Biological & Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box: 2713, Doha, Qatar.*

³ *Unità di Ricerca Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy.*

§ The first two authors have equally contributed to the present work.

Corresponding author:

Quirico Migheli, Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari

Viale Italia 39, I - 07100 Sassari, Italy

Phone: +39 079 229295; Fax: +39 079 229316; E-mail: qmigheli@uniss.it

Key words: mycotoxin, food safety, gene expression, 2-phenylethanol, post-harvest

Abstract

Many foods and beverages in temperate and tropical regions are prone to contamination by ochratoxin A (OTA), one of the most harmful mycotoxins for human and animal health. *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* are considered among the main responsible for OTA contamination. We have previously demonstrated that four low or non-fermenting yeasts are able to control the growth and sporulation of OTA-producing *Aspergilli* both *in vitro* and on detached grape berries: the biocontrol effect was partly due to the release of volatile organic compounds (VOCs). Aiming to further characterize the effect of

VOCs produced by biocontrol yeast strains, we observed that, beside vegetative growth and sporulation, the volatile compounds significantly reduced the production of OTA by both *A. carbonarius* and *A. ochraceus* isolates. Exposure to yeast VOCs also affected gene expression in *A. carbonarius*, as confirmed by downregulation of polyketide synthase, non-ribosomal peptide synthase, and the regulatory genes *laeA* and *veA*. The main compound of yeast VOCs was 2-phenylethanol, as detected by Headspace-Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS) analysis. Yeast VOCs represent a promising tool for the containment of growth and development of mycotoxigenic fungi, and a valuable aid to guarantee food safety and quality.

1. Introduction

After aflatoxins, ochratoxin A (OTA) is the second most frequent mycotoxin found in food and feed products (European Commission, 2012). The OTA structure consists in the amino acid phenylalanine linked by an amide bond to a pentaketide dihydroisocoumarin (Huffman et al., 2010). Some species of *Aspergillus* and *Penicillium* are the main source of OTA in warm and tropical regions, and in particular *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom. is considered one of the most relevant OTA producers in food and feed (Abarca et al., 2003; Duarte et al., 2010; Kogkaki et al., 2015). OTA is classified as a group 2B carcinogen by the World Health Organization (Cabañes et al., 2013; IARC, 1993; JECFA, 2008; Van der Merwe et al., 1965). Studies are still under way to confirm whether OTA is responsible for the so-called Balkan Endemic Nephropathy (Castegnaro et al., 1998; Krogh, 1978). In most countries, strict regulatory limits are set for the presence of OTA in food commodities. The European Union has set the maximum OTA level at 2 µg/kg in wine, grape juice, and other grape products, and at 3 µg/kg for all products derived from cereal, including processed cereal products and cereal grains for human consumption (Duarte et al., 2010; European Commission, 2012).

Inhibiting the growth of OTA-producing fungi on sensitive commodities is by far the most reliable method to prevent OTA contamination of food and feed. Fungicides can control the growth of OTA-producing fungi and OTA contamination, but the European Union has established a strict legislation concerning the maximum residue levels of pesticides in agricultural commodities. Moreover, continuous application of specific active substances favours the selection of resistant OTA-producing *Aspergillus* spp. (Malandrakis et al. 2013; Zhang et al., 2016), and often growth inhibition achieved by improper use of fungicides can be accompanied by an unwanted induction of toxin biosynthesis (Schmidt-Heydt et al. 2013).

Many studies were focused on alternative biological control methods, which may be most appropriate to reduce infection and mycotoxin production by different fungal pathogens both in the field and during the postharvest phases. Among the biological antagonists, yeasts are particularly promising in different commodities, as they have several properties that can be manipulated to improve their use and efficiency. Many yeast species have simple nutritional requirements, they are adapted to colonise wounds as well as dry surfaces and can grow quickly on a broad range of substrates in bioreactors. Furthermore, yeasts do not produce allergenic compounds or secondary metabolites like many filamentous fungi or bacterial antagonists do (Droby et al., 2009; Janisiewicz et al., 2010; Liu et al., 2013).

A number of yeast strains were selected and evaluated for use as a pre- or postharvest biological treatment of grape against OTA-producing *Aspergilli* (Bleve et al., 2006; Cubaiu et al., 2012; De Curtis et al., 2012; Ponsone et al., 2011; Zhu et al., 2015).

Besides other mechanisms of action, the biocontrol ability of some antagonistic yeast strains has been at least partly attributed to the production of volatile organic compounds (VOCs). VOCs are low molecular weight substances (<300 Da), with high vapour pressure and low polarity, and they are able to inhibit mycelial growth and sporulation in many fungi (Buzzini et al., 2005; Chang et al., 2015; Di Francesco et al., 2015; Fiori et al., 2014; Huang et al., 2012;

Parafati et al., 2017). Yeast VOCs may also modulate the expression of genes involved in the OTA biosynthesis (Chang et al., 2015). Hence, VOCs released by selected yeasts deserve attention for their ability to reduce spore germination, mycelial growth, and mycotoxin production in preventive food safety strategies.

We have previously demonstrated that four low or non-fermenting yeasts are able to control the growth and sporulation of OTA-producing *A. carbonarius* both *in vitro* and on detached grape berries (Fiori et al., 2014). This biological effect was at least partly due to the release of VOCs. The objectives of the present study were: 1) to further determine the effect of VOCs produced by selected yeast strains on vegetative growth and sporulation of OTA-producing *A. carbonarius*, and *A. ochraceus*; 2) to identify the main component(s) of VOCs released by yeasts; 3) to evaluate the capability of yeast VOCs to inhibit OTA production; 4) to evaluate the effect of yeast VOCs on the expression level of key genes in the OTA biosynthetic pathway.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal and yeast strains and culture conditions

A. carbonarius Bainier Thom. MPVA566 and *A. ochraceus* G. Wilh. MPVA703 (courtesy of Professor Paola Battilani, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy) strains are maintained in the mycological collection of the Dipartimento di Agraria, Università di Sassari (Italy). The two strains were tested for their potential to produce OTA on PDA (potato dextrose agar; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), after incubation at 25 °C for 7 days, as described by Bragulat et al. (2001).

Candida friedrichii 778) and two low-fermenting (*Candida intermedia* 235 and *Lachancea thermotolerans* 751) were selected based on their ability to control the growth and sporulation of *A. carbonarius* (Fiori et al., 2014) and for their OTA-adsorption properties (Farbo et al., 2016).

2.2. Inhibition of fungal growth and OTA production by yeast strains

A spore suspension (10^5 spores/mL) of each strain of *A. carbonarius* MPVA566 and *A. ochraceus* MPVA703, grown on PDA for seven days at 25 °C, was prepared in Ringer's solution containing 0.1% Tween 20 (Sigma) to prevent spore clumping.

The four yeasts were routinely grown on YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and stored at 4 °C until use. Two days before each trial, yeast were grown on PDA agar at 25 °C and a loopful of fresh cells was further grown overnight at 25°C in 100 mL YPD broth (1% yeast extract, 2% bacteriological peptone, 2% dextrose; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were recovered by centrifugation, washed, resuspended in Ringer's solution (0.9% NaCl) and counted in a Thoma haemocytometer to obtain a final concentration of 1×10^8 CFU/mL.

To evaluate the efficacy of yeast VOCs against *Aspergillus* spp., 100 µL of yeast cell suspension (10^8 CFU/mL) was evenly spread on YPD agar plates by using a disposable sterile inoculation loop and incubated at 25 °C for 24 h. After 24 h, the lid of the plate was replaced by a base plate containing PDA. Twenty µL of a spore suspension (10^7 CFU/mL) of each pathogen were spotted onto the centre of the PDA plate. The two base plates were sealed immediately with a double layer of Parafilm® and one layer of Scotch® tape and incubated at 25 °C for 7-10 days. The plates were examined daily to measure radial growth and any change in morphology of *Aspergillus* colonies was recorded. A control treatment was represented by plates inoculated only with *Aspergillus*. There were three replicates for each treatment and the experiment was repeated three times.

2.3. Analysis of yeast VOCs

A loopful of freshly grown yeast cells was transferred into a 20 mL amber headspace vial containing 5 mL of YPD agar slant and incubated at 26 °C for seven days. Yeast VOCs composition was qualitatively evaluated by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) followed by gas chromatography

coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis. Prior to extraction the vials were equilibrated under agitation for 30 min at 50 °C. The extraction of VOCs was performed on a 1-cm PDMS 50/30 Stableflex SPME fiber (Supelco, Milano, Italy). The extraction time was fixed at 30 min, after which it was desorbed for 2 min into a Gerstel CIS6 PTV injector operating at 250 °C in a splitless mode. Before and after each extraction, the fiber underwent a bake-out step for 5 min at 250 °C on a Gerstel bake-out station.

The GC-MS analysis was carried out using an Agilent 7890 GC equipped with a Gerstel MPS autosampler, coupled with an Agilent 7000C MSD detector. The chromatographic separation was performed on a HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.17 µm) with the following temperature program: 60 °C hold for 3 min, then increased to 210 °C at a rate of 4 °C/min, then held at 210 °C for 15 min, then increased to 280 °C at a rate of 10 °C/min. Helium was used as carrier gas, at a constant flow of 1 mL/min. The data were analysed using a MassHunter Workstation B.07.00 SP1. The identification of the components was performed by comparing their retention indices with the built-in libraries or literature data and by matching their spectra on mass spectral libraries (NIST/EPA/NIH 2008).

2.4. OTA extraction and HPLC analysis

OTA production was assessed after seven days of incubation according to the method described by Bragulat et al. (2001). Briefly, three PDA agar plugs (6 mm diameter each) were removed with a sterile cork borer, across the diameter of the mycelium. Samples were weighed, placed into a 2.0 mL Eppendorf tube, 1 mL methanol was added and the tubes were briefly hand-shaken. Then, they were left still for one h, extracts were filtered through a 0.2 µm filter (Millex, Millipore Co., Bedford, Mass.) and stored at 4°C until HPLC analysis. OTA was analysed using an Agilent 1200 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a quaternary pump with integrated vacuum degasser (G1311C), autosampler (G1329B), column oven (G1316A) and fluorescence detector (G1321A). Separation of OTA was performed on a Zorbax column SB-

C18, 4.6 x 150 mm, 5-Micron (Agilent, Santa Clara, CA, USA). The isocratic mobile phase composition was a mixture of acetonitrile, water and acetic acid (49.5:49.5:1 v/v/v, respectively). The constant flow and column temperature were set to 1 mL/min and 25°C, respectively. The excitation and the emission wavelengths were set to 333 and 460 nm, respectively. OTA identification was achieved by comparing the retention time of the pure standard (5.9 min) with that of the target peak on samples. The injection volume was 100 µL. A linear external calibration over a range from 0.6 to 60 µg/L, with a mean correlation coefficient of 0.99995, was used for the quantification step. Results were then expressed as ng per g of sample.

In a preliminary experiment, a time course of mycelium growth and OTA production by *Aspergilli* cultured on PDA at 25°C, with no contact with yeast cells, was assessed by evaluating the radial growth and by analysing 3 plugs cut at 1, 2, 3 and 7 days from duplicate colonies as described previously.

2.5. Gene expression analysis in *A. carbonarius* MPVA566

The expression of different genes involved in OTA biosynthesis (*acOTApks* and *acOTAnrps*) as well as the *acpks* gene and the two regulatory genes (*laeA* and *veA*) was evaluated in *A. carbonarius* MPVA566 by qRT-PCR. The expression levels of the target genes were normalised by the expression of the reference gene *18S* and expressed relative to the control. *18S* was chosen as the reference gene being the most stable among four potential reference genes (namely, β - tubulin, actin, *18S*, *gpdA*) used in preliminary studies (not shown). For gene expression analysis, 20 µL of spore suspension (10^7 CFU/mL) of *A. carbonarius* MPVA566 were inoculated in PDB and incubated at 25 °C for five days as described. After 120 h, the mycelium was carefully harvested, ground in liquid nitrogen and stored at - 80 °C. Total RNA was extracted from frozen mycelium using the GeneMATRIX® Universal RNA Purification Kit (URx Ltd, Gdansk, Poland) following the manufacturer's protocol and then reverse-transcribed into cDNA using the iScript® cDNA Sythesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Gene-specific primers are listed in Table 1. The PCR efficiencies for each primer pair were determined by a 5-fold serial cDNA dilution of cDNA, and calculated from the slopes of the curve realized by the CFX96 Touch Real time PCR detection system software (version 3.1, 2010; Bio-Rad). The reactions were held using CFX96 Touch Real Time PCR detection system Bio-Rad (version 3.1, 2010) using SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), by starting with 10 ng/μL of synthesized cDNA. The PCR programme was as follows: 95 °C for 3 min, 40 cycles of 95 °C for 10 s and 58 °C for 1 min. The melting curve was defined by 0.5°C increments of the slow ramp rate between 55 °C and 95 °C after the real-time PCR cycles. Specificity of the PCR amplification was confirmed by dissociation curve analysis. Real time PCR derived data as normalised expression ($\Delta\Delta C_q$) were quantified by using the measured expression level of one reference gene (target) as a normalisation factor. Reaction were prepared in triplicate 96-well reaction plates, and three replicates of control sample without cDNA were also included in the runs.

2.6. Statistical analysis

Data from each experiment were subjected to one-way analysis of variance followed by multiple comparisons by Tukey's test, using the Statgraphics Centurion XVI software.

Table 1. List of the primers used in this study.

Primer name	Sequence (5'→3')	References
<i>acpks-F</i>	GAGTCTGACCATCGACACGG	Gallo <i>et al.</i> , 2009
<i>acpks-R</i>	GGCGACTGTGACACATCCAT	
<i>acOTApks-F</i>	CGTGTCCGATACTGTCTGTGA	Gallo <i>et al.</i> , 2014
<i>acOTApks-R</i>	GCATGGAGTCCTCAAGAACC	
<i>acOTAnrps-F</i>	ATCCCCGGAATATTGGCACC	Gallo <i>et al.</i> , 2012
<i>acOTAnrps-R</i>	CCTTCGATCAAGAGCTCCCC	
<i>laeA-F</i>	CACCTATAACAACCTCCGAACC	Crespo-Sempere <i>et al.</i> , 2013
<i>laeA-R</i>	GGTTCGGCCAACCGACGACGC	
<i>veA-F</i>	TCCCGGTTCTCACAGGCGTA	Crespo-Sempere <i>et al.</i> , 2013
<i>veA-R</i>	GCTGTCTTGGTCTCCTCGTA	
<i>18S-F</i>	GCAAATTACCCAATCCCGAC	NCBI
<i>18S-R</i>	GAATTGCCGCGGCTGCTG	

3. Results

3.1. Yeast VOCs reduce vegetative growth and sporulation of *A. carbonarius* and *A. ochraceus*

All the four yeast strains were able to inhibit mycelium development of both *A. carbonarius* MPVA566 and *A. ochraceus* MPVA703. Colony diameter was reduced to 30-56% compared to the untreated control after 6 days of incubation with no contact between bionts. The yeast strains inducing maximum levels of growth inhibition were *C. intermedia* 253 and *C. friedrichii* 778 towards *A. carbonarius* MPVA566 and *A. ochraceus* MPVA703, respectively (Table 2; Figure 1).

Aspergillus spp. colonies exposed to yeast VOCs did not sporulate, and were characterised by a white mycelium. The colony border was undefined, with elongated hyphae irregularly branched compared to unexposed control (Figure 2). Both *A. carbonarius* MPVA566 and *A. ochraceus* MPVA703, upon exposure to VOCs emitted by *L. thermotolerans* 751, produced hyphae containing

coagulated cytoplasm, with swollen hyphal tips exhibiting frequent lysis (Figures 2-3).

Table 2. Biological control activity of four yeast strains against *Aspergillus carbonarius* MPVA566 and *Aspergillus ochraceus* MPVA703. Results are expressed as percent (\pm standard error) reduction of radial growth after 7 days of incubation on PDA medium at 25 °C. Values in each column followed by different letters indicate significant differences as per Tukey's test ($P < 0.05$).

Treatment	Reduction radial growth after 7 days (%)	
	<i>Aspergillus carbonarius</i> MPVA566	<i>Aspergillus ochraceus</i> MPVA703
<i>C. intermedia</i> 253	55.7 \pm 0.3 ^c	51.6 \pm 0.1 ^b
<i>C. jadinii</i> 273	34.9 \pm 0.3 ^{bc}	30.8 \pm 0.2 ^b
<i>L. thermotolerans</i> 751	30.7 \pm 0.0 ^b	51.1 \pm 0.2 ^b
<i>C. friedrichii</i> 778	37.5 \pm 0.1 ^{bc}	54.2 \pm 0.1 ^b

Figure 1. Biocontrol activity of four yeast strains (253, *Candida intermedia*; 273, *Cyberlindnera jadinii*; 751, *Lachancea thermotolerans*; 778, *Candida friedrichii*) against *Aspergillus ochraceus* (A) or *Aspergillus carbonarius* (B). Results are expressed as colony diameter (cm) over 10 days of incubation at 25 °C. Vertical bars indicate standard error (n = 5)

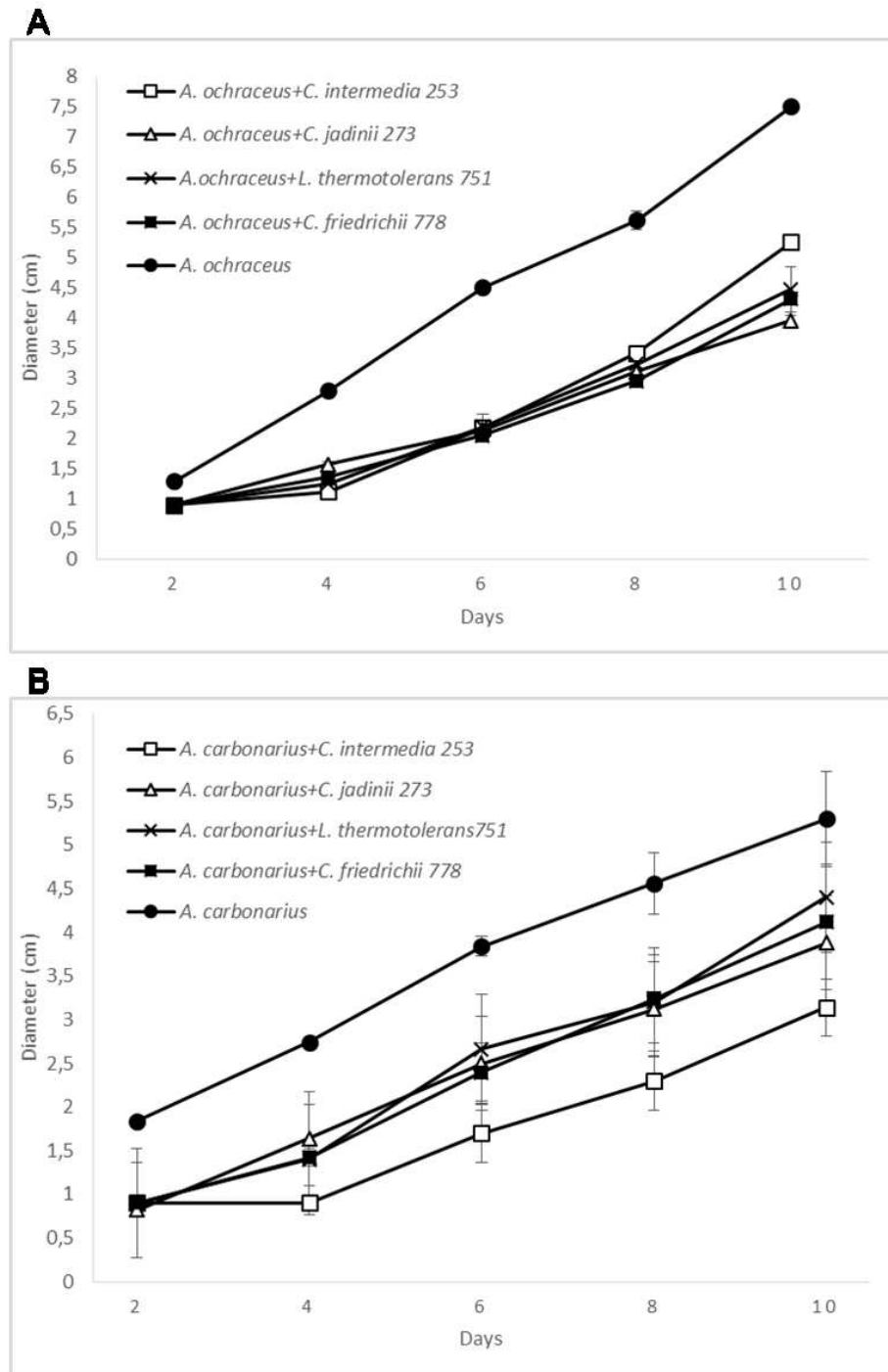


Figure 2. Colony growth and morphology of *Aspergillus carbonarius* MPVA566 (A) and *Aspergillus ochraceus* MPVA703 (F) after seven days of incubation on PDA alone, or in the presence of VOCs produced by yeast strains *Candida intermedia* 253 (B, G), *Cyberlindnera jadinii* 273 (C, H), *Lachancea thermotolerans* 751 (D, I), or *Candida friedrichii* 778 (E, J). Microscopic detail (10X) of the colony margin is displayed below each *Aspergillus*-yeast combination.

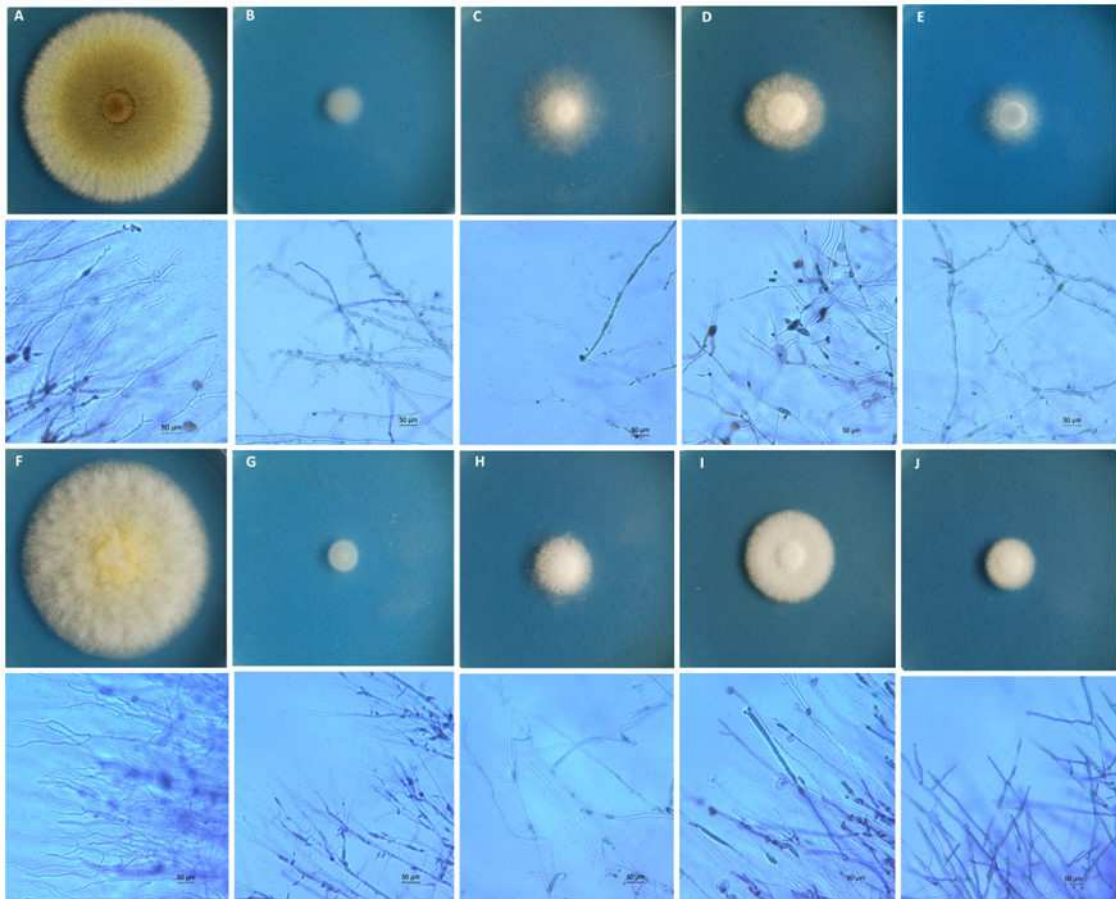
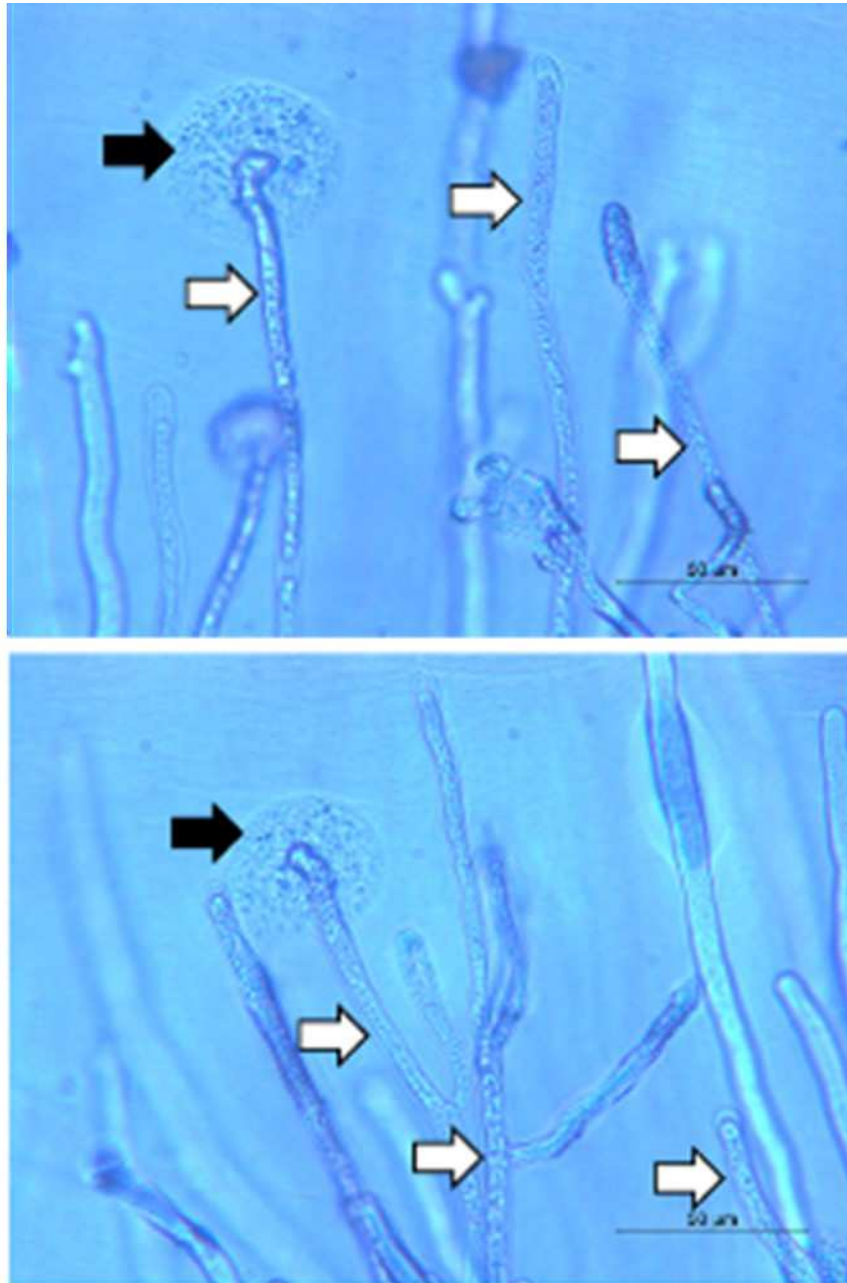


Figure 3. Microphotography (40X) of *A. ochraceus* MPVA703 marginal hyphae exposed to VOCs emitted by *Lachancea thermotolerans* 751: the presence of coagulated cytoplasm (white arrows) and swollen hyphal tips exhibiting lysis (black arrows) is shown.



3.2. Yeast VOCs inhibit OTA production in vitro

A preliminary experiment was set to monitor the time course of OTA production by the two *Aspergilli*. After seven days of growth on PDA medium at 25 °C, *A. carbonarius* MPVA566 produced 8316.6 ng/g of OTA, whereas *A. ochraceus* MPVA703 produced 29679.9 ng/g (Table 3).

Three separate experiments were set up to evaluate the ability of yeast strains to inhibit both growth and OTA production when co-cultured with *A. carbonarius* MPVA566 or *A. ochraceus* MPVA703. The reduction of radial growth after 7 days incubation on PDA at 25 °C ranged from 56 to 74%, with *C. intermedia* 253 and *L. thermotolerans* 751 being the most effective inhibitors of colony growth (Table 4).

The vegetative growth inhibition was accompanied by a striking reduction of OTA production as an effect of VOCs release by the yeast strains: in *A. carbonarius* MPVA566 the OTA content released in the medium dropped from 7,613-13,883 ng/g in the unexposed control to 0.1-135 ng/g upon exposure to yeast volatiles, whereas in *A. ochraceus* MPVA703 OTA release was reduced from 19,609-42,960 to 2.7-940 ng/g. VOCs emitted by *L. thermotolerans* 751 provided the most consistent inhibition of OTA production in both *Aspergillus* species (Table 4).

Table 3. Time course of OTA production by *Aspergillus carbonarius* MPVA566 and *Aspergillus ochraceus* MPVA703 incubated on PDA medium for 1-7 days. Results are expressed as colony diameter (cm) and OTA concentration (ng/g) \pm standard error. Values in the same column followed by different letters indicate significant differences as per Tukey's test ($P < 0.05$).

Day	Colony diameter (cm)		OTA (ng/g)	
	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. ochraceus</i>
1	1.2 \pm 0	0.9 \pm 0	10.2 \pm 3.0 ^c	13.7 \pm 3.1 ^b
2	1.8 \pm 0	1.4 \pm 0	111.7 \pm 36.1 ^c	29.6 \pm 1.0 ^b
3	2.3 \pm 0	2.0 \pm 0	3,059.9 \pm 25.5 ^b	4,624.8 \pm 226.6 ^b
7	4.6 \pm 0	5.0 \pm 0	8,316.6 \pm 90.4 ^a	29,679.9 \pm 2,421.8 ^a

Table 4. Growth of *Aspergillus carbonarius* MPVA566 and *Aspergillus ochraceus* MPVA703 and their ochratoxin A (OTA) production in PDA medium when incubated alone or in co-culture with antagonistic yeast strains after seven days at 25 °C. Data from three independent experiments are expressed as the colony diameter (cm), whereas OTA production is expressed in ng/g \pm standard error. Values in the same column followed by different letters indicate significant differences as per Tukey's test ($P < 0.05$).

Tested combinations	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
	Colony diameter (cm)	OTA (ng/g)	Colony diameter (cm)	OTA (ng/g)	Colony diameter (cm)	OTA (ng/g)
<i>A. carbonarius</i>	5 \pm 0 ^a	13883 \pm 2197	5 \pm 0 ^a	7866 \pm 1214 ^a	5 \pm 0 ^a	7613.9 \pm 643 ^a
<i>C. intermedia</i> 253	1.3 \pm 0.2 ^c	< 0.9	2.8 \pm 0.2 ^{bc}	135 \pm 16.3 ^b	2.5 \pm 0.2 ^b	0.1 \pm 0.1 ^b
<i>C. jadinii</i> 273	2.2 \pm 0.3 ^b	8.9 \pm 1.5	3.2 \pm 0.2 ^{bc}	93.4 \pm 28.1 ^b	2.3 \pm 0.2 ^b	13.7 \pm 6.0 ^b
<i>L. thermotolerans</i> 751	1.9 \pm 0.1 ^{bc}	< 0.4	3.4 \pm 0.1 ^b	13.6 \pm 15.5 ^b	2.2 \pm 0.2 ^b	< 0.8
<i>C. friedrichii</i> 778	2.1 \pm 0.3 ^b	< 0.2	2.6 \pm 0.1 ^c	51 \pm 14.3 ^b	2.0 \pm 0.3 ^b	2.4 \pm 1.4 ^b
<i>A. ochraceus</i>	4.5 \pm 0 ^a	42960 \pm	4.5 \pm 0 ^a	28269 \pm	4.5 \pm 0 ^a	19609 \pm
<i>C. intermedia</i> 253	1.3 \pm	4112 ^a	1.7 \pm	3811 ^a	1.7 \pm	10492 ^a
<i>C. jadinii</i> 273	0.1 ^c	3.2 \pm 0.1 ^b	0.1 ^b	14.1 \pm 6.8 ^b	0.2 ^b	4.5 \pm 0.8 ^a
<i>L. thermotolerans</i> 751	1.6 \pm 0.1 ^b	2.7 \pm 0.1 ^b	2.2 \pm 0.2 ^b	939.7 \pm 145.9 ^b	1.8 \pm 0.2 ^b	75.2 \pm 31.7 ^a
<i>C. friedrichii</i> 778	1.4 \pm 0.1 ^{bc}	3.4 \pm 0.8 ^b	1.9 \pm 0.1 ^b	7.5 \pm 2.3 ^b	1.6 \pm 0.3 ^b	5.3 \pm 0.8 ^a
				50.3 \pm 16.0 ^b		
	1.5 \pm 0 ^{bc}		2.1 \pm 0.1 ^b		1.3 \pm 0.3 ^b	

3.3. 2-phenylethanol is the main component in yeast VOCs

The HS-SPME/GC-MS analysis allowed to identify about 20 compounds, belonging to different chemical classes, such as alcohols, aldehydes, hydrocarbons and terpenes. Table 5 summarizes, for each of the four tested yeast strains, the absolute area ($\times 10^6$) of each analyte. The main component of all the yeast volatile fraction was 2-phenylethanol, which was not detectable in the YPD medium. Other volatile compounds (such as dimethyl disulphide, styrene, 2,5 dimethyl-pyrazine, benzeneacetaldehyde and stilbene) showed a significantly lower or negligible area, compared with 2-phenylethanol; most of these compounds were also found in the control YPD agar medium headspace (Figure 4).

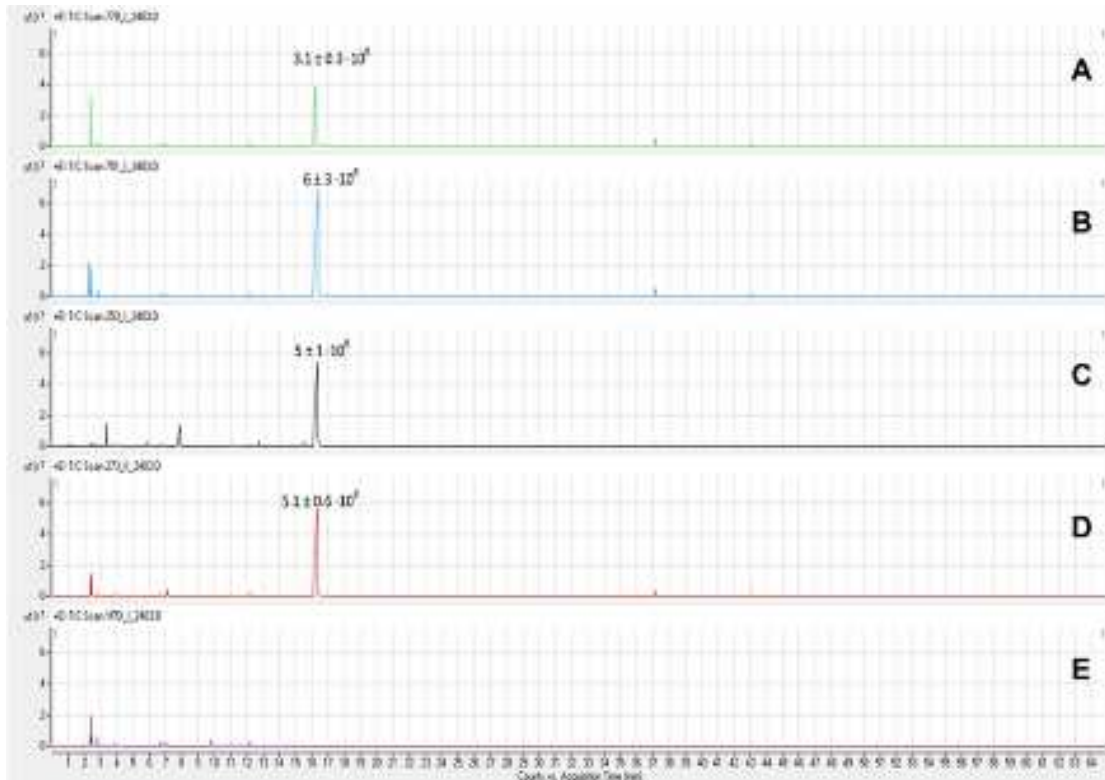
Table 5. VOCs produced by yeast strains.

Compound name	LRI ^a	Peack area ^b				
		273	253	751	778	YPD
Methanethiol	641	0.44 ± 0.09	1.50 ± 1.08	0.87 ± 0.46	0.72 ± 0.59	0.13 ± 0.11
Ethanol	643	0.32 ± 0.13 ^{ab}	0.26 ± 0.05 ^b	ND	0.21 ± 0.02 ^b	0.61 ± 0.17 ^a
2-Butanone	663	ND	0.23 ± 0.07	0.17 ± 0.10	0.21 ± 0.06	0.27 ± 0.10
3-Methylbutanal	681	ND	0.13 ± 0.03	0.38 ± 0.21	0.22 ± 0.05	0.51 ± 0.26
3-Methyl-butanol	726	11.80 ± 4.30	10.30 ± 11.19	20.06 ± 10.75	9.99 ± 3.41	7.57 ± 0.54
2-Methylbutanol	729	3.50 ± 2.21	tr	4.93 ± 3.79	3.09 ± 0.93	14.91 ± 18.63
Dimethyl disulfide	737	0.50 ± 0.22 ^b	3.00 ± 1.37 ^a	Tr	0.76 ± 0.13 ^b	0.93 ± 0.97 ^{ab}
Toluene	757	2.62 ± 1.60	16.59 ± 24.34	2.76 ± 2.58	3.13 ± 1.49	22.28 ± 21.65
Styrene	880	0.96 ± 0.35 ^b	6.99 ± 3.39 ^a	0.55 ± 0.27 ^b	0.53 ± 0.27 ^b	0.43 ± 0.12 ^b
2-Heptanone	883	ND	1.67 ± 0.95	0.71 ± 0.47	0.71 ± 0.13	0.90 ± 0.65
2-Heptanol	895	0.92 ± 0.73	tr	0.46 ± 0.34	0.44 ± 0.03	ND
2,5-Dimethylpyrazine	905	8.27 ± 2.80 ^{ab}	7.20 ± 1.07 ^b	7.36 ± 1.09 ^{ab}	8.05 ± 0.75 ^{ab}	11.52 ± 1.23 ^a
Benzaldehyde	950	0.52 ± 0.14 ^b	0.49 ± 0.06 ^b	1.07 ± 0.63 ^{ab}	1.83 ± 0.51 ^a	1.23 ± 0.54 ^{ab}
D-Limonene	1019	0.45 ± 0.10	0.49 ± 0.13	0.41 ± 0.02	0.52 ± 0.05	1.02 ± 1.23
2-Ethylhexanol	1024	7.76 ± 2.38 ^{ab}	4.17 ± 0.74 ^b	6.49 ± 2.24 ^{ab}	9.95 ± 1.37 ^a	10.82 ± 0.11 ^a
Benzeneacetaldehyde	1035	0.39 ± 0.02 ^b	7.09 ± 5.37 ^a	2.28 ± 0.98 ^{ab}	1.66 ± 0.57 ^{ab}	0.68 ± 0.39 ^b
Acetophenone	1057	0.25 ± 0.13 ^c	1.08 ± 0.43 ^{ab}	0.30 ± 0.11 ^c	0.50 ± 0.09 ^{bc}	1.42 ± 0.28 ^a
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	1072	3.02 ± 0.14	3.31 ± 0.32	2.66 ± 1.23	3.48 ± 0.22	3.35 ± 0.16
2-Phenylethanol	1110	508.67 ± 57.46	499.46 ± 136.90	581.97 ± 283.88	306.55 ± 32.89	ND
Canfora	1134	2.52 ± 0.05	2.16 ± 0.16	1.56 ± 1.07	2.46 ± 0.22	2.94 ± 0.71
2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine	1310	0.31 ± 0.06	0.39 ± 0.07	0.26 ± 0.08	0.33 ± 0.03	0.26 ± 0.02
Nerylacetone	1439	ND	0.94 ± 0.08	1.13 ± 0.93	1.29 ± 0.31	ND
Stilbene	1495	0.43 ± 0.12 ^a	0.38 ± 0.03 ^a	0.21 ± 0.14 ^b	0.30 ± 0.01 ^{ab}	0.31 ± 0.06 ^{ab}

^a LRI = linear retention index calculated according to van den Dool and Kratz (1963).

^b Presented data area expressed as mean peak area x 10⁶ (± standard deviation) of 3 replicate measurement

Figure 4. HS-SPME/GC-MS chromatograms of yeast strains, highlighting the peak of 2-phenylethanol, the main compound released by the *Candida friedrichii* 778 (A), *Lachancea thermotolerans* 751 (B), *Candida intermedia* 235 (C), *Cyberlindnera jadinii* 273 (D) and not detectable in YPD medium (E).

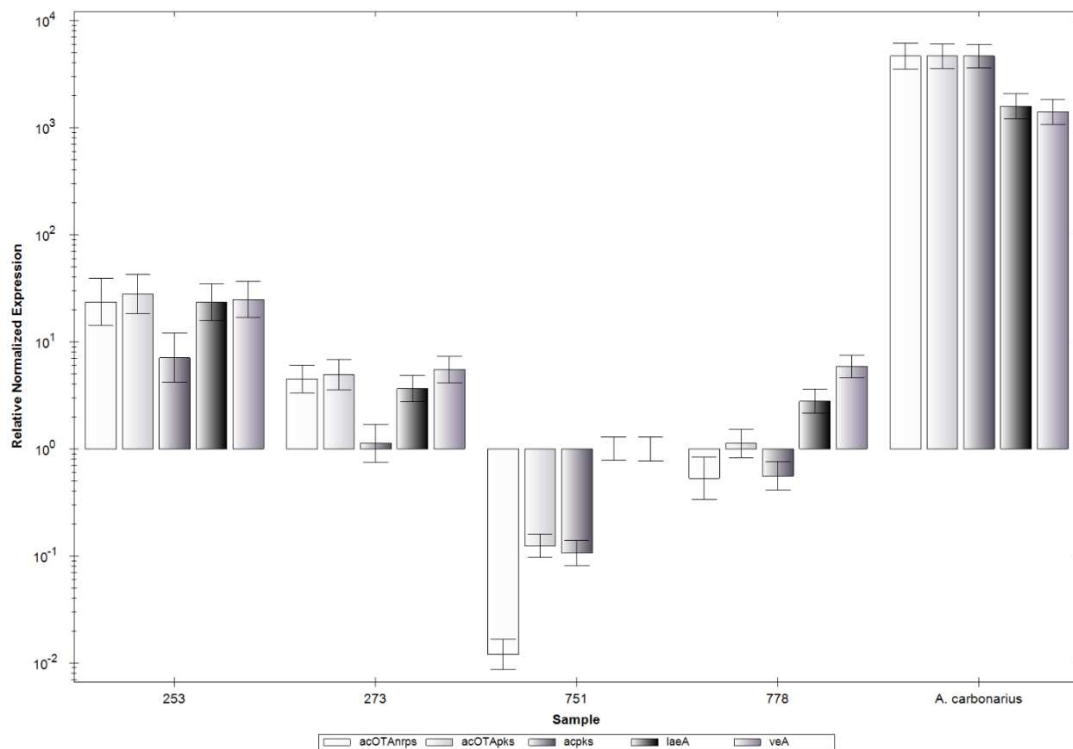


3.4. *Aspergillus carbonarius* genes involved in OTA biosynthesis are downregulated by yeast VOCs

Yeast VOCs affected the expression level of all the tested OTA biosynthetic genes *AcOTApks*, *AcOTAnrps*, *acpks*, as well as the two regulatory genes *veA* and *laeA* (Figure 5). The expression of *acpks* was almost totally abolished (99%) when *A. carbonarius* MPVA566 was co-cultured with *C. intermedia* 253, *C. jadinii* 273, *L. thermotolerans* 751 and *C. friedrichii* 778.

Similarly, *acOTApks* and *AcOTAnrps* expression levels were both equally reduced by 99.9% by the four yeasts. Expression of the regulatory genes *veA* and *laeA* was affected by 97% by 253 and by 99.9% by the other three yeast strains (Figure 5).

Figure 5. Relative expression analysis by qRT-PCR of *AcOTAnrps*, *AcOTApks*, *acpks*, *laeA* and *veA* genes in *A. carbonarius* MPVA566 after five days growth on PDA at 25 °C.



4. Discussion

The presence of OTA in food and feed chain is a major concern for food safety and health authorities (Ponsone et al., 2011). In a previous investigation (Fiori et al., 2014), we proved the high antagonistic efficacy of two non-fermenting (*Cyberlindnera jadinii* 273 and *Candida friedrichii* 778) and two low-fermenting yeasts (*Candida intermedia* 235 and *Lachancea thermotolerans* 751) in controlling *A. carbonarius in vitro* and on grape berries. The biological effect was at least partly ascribed to the release of VOCs. The present work focuses on the chemical composition and role of VOCs produced by these four yeast strains and on their inhibitory effect on *A. carbonarius* and *A. ochraceus* growth and sporulation, OTA production, and OTA biosynthetic gene expression.

VOCs are typically lipophilic molecules with high vapour pressure and a low molecular weight (Werner et al., 2016). VOCs may derive from different biosynthetic pathways, hence the term “volatilome” has been proposed to describe their broad chemical complexity (Maffei et al., 2011). So far, the production of volatile compounds by industrially relevant yeasts has been mainly explored for technological purposes (Passoth et al., 2006; Romano et al., 2015; Wriessenegger and Pichler 2013).

Since the first exploitation in biocontrol of the VOCs producer *Muscodor albus* (Worapong et al., 2001; Strobel et al., 2001), a panoply of VOCs produced by isolated soil microbes showed antifungal activity against plant pathogens (Kanchiswamy et al., 2015; Werner et al., 2016; Zeilinger et al., 2016). Many biocontrol yeast strains have the ability to produce VOCs and in some instances the volatiles were shown to be implicated as main drivers of the antagonistic capacity. For instance, VOCs emitted by *Candida intermedia*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* inhibited *Botrytis cinerea* growth *in vitro* and reduced disease on strawberries inoculated with this pathogen (Suwannarach et al., 2010; Huang et al., 2011; Parafati et al., 2015). A mixture of VOCs produced by *Candida sake* was able to reduce the incidence of apple rot caused by *Penicillium expansum* and *B. cinerea* (Arrarte et al., 2017). VOCs released by different strains of *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, and *Hanseniaspora uvarum* inhibited *A. ochraceus* growth and OTA production during processing of *Coffea arabica* (Masoud et al., 2005; Masoud & Kaltoft, 2006). On the contrary, the role of VOCs released by biocontrol strains of *Candida zemplinina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. kluyveri*, and *Metschnikowia aff. fructicola* in the *in vitro* and *in vivo* inhibition of *A. carbonarius* was not proven (Zhu et al., 2015).

The present study demonstrates that the production of VOCs, and particularly 2-phenylethanol, plays an essential role in the antagonistic activity of four yeasts strains against *A. carbonarius* MPVA566 and *A. ochraceus* MPVA703. All the experiments were performed under airtight conditions, and any contact between *Aspergilli* and yeast strains was prevented. Therefore, the antifungal

activity of yeasts can be definitely attributed to their VOCs release. While all the four yeast tested were biologically active, two strains (*C. intermedia* 253 and *L. thermotolerans* 751), were most effective in reducing mycelial growth, sporulation and *in vitro* OTA production by *A. carbonarius* and *A. ochraceus*. Remarkably, in both *Aspergilli*, hyphae containing coagulated cytoplasm, with swollen hyphal tips and frequent lysis were observed upon exposure to *L. thermotolerans* 751 volatilome. To the best of our knowledge, this study reveals for the first time the ability of the yeast species *C. jadinii*, *C. friedrichii*, *C. intermedia* and *L. thermotolerans* to reduce the production of OTA by two *Aspergilli* through the release of VOCs.

The GC-MS analysis allowed us to identify several compounds, including alcohols, aldehydes, hydrocarbons and terpenes, with a marked variability on their absolute area. Most of these volatiles showed a negligible area, and were also detected in the control headspace, possibly due to the presence of yeast extract in the YPD medium. The main component of all the yeast volatile fraction was 2-phenylethanol, which was definitely not detectable in the YPD medium. The 2-phenylethanol has been previously observed as the main volatile produced by other yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae* with a potential to control the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* and in bean seeds (Fialho et al., 2010), *Kloeckera apiculata* controlling *P. italicum* mold in citrus fruit (Liu et al., 2014), and *P. anomala* able to inhibit spore germination and aflatoxin production by *A. flavus* (Chang et al. 2015; Hua et al., 2014). This compound is present in nature, particularly in extracts of perfumed flowers and essential oils, and represents one of the nine most dominant volatile compounds of the rose scent (Yan et al. 2011). Chang et al. (2015) reported that 2-phenylethanol has a lethal effect against *A. flavus* and inhibits the production of aflatoxin at sub lethal dosage. High concentrations of 2-phenylethanol may cause alterations in amino acid and protein biosynthesis, in mitochondria and the nuclei of both fungi and bacteria (Rosenkranz, et al., 1965; Liu et al., 2014).

The biosynthetic pathway of OTA, as described by Huff and Hamilton (1979) has not yet been fully explained and only few genes were investigated and discovered so far (Abbas et al., 2009; Bacha et al., 2009; Gallo et al., 2014; Geisen et al., 2006; Karolewicz et al., 2005; Niessen et al., 2005; O' Callaghan et al., 2003; O' Callaghan et al., 2013; Wang et al., 2015). According to the OTA structure, the biosynthesis pathway includes a polyketide synthase (PKS) and a non-ribosomal peptide synthase family (NRPS). In *A. carbonarius*, three genes were found responsible for OTA production. The *acpks* gene encodes a conserved ketosynthase and acyl transferase domains (Gallo et al., 2009). The *acOTApks* gene encodes a component of the PKS family, and contains a methyltransferase domain responsible for the addition of a methyl group to the OTA polyketide structure (Gallo et al., 2014). Another gene implicated in OTA biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*, *AcOTAnrps*, is located about 900 nt upstream of *pks* and is transcribed in the same direction, differently from *Penicillium nordicum*, where OTA *pks* and *nrps* genes are transcribed in the opposite direction (Gallo et al., 2009, 2012; Karolewicz et al., 2005). Furthermore, in *A. carbonarius* two other genes are implicated in the regulation of OTA biosynthesis, *laeA* and *veA*. *LaeA* encodes a methyltransferase, and was described for the first time in *Aspergillus nidulans*, in *Aspergillus terreus* and in *Aspergillus fumigatus* (Bok et al., 2004; Linde et al., 2016). *VeA* codes for a regulatory protein, which is transported from the cytoplasm to the nucleus in response to illumination. These two highly conserved proteins are considered as global regulators in fungi, modulating the sporulation capacity and mycotoxin production in *Aspergillus* spp. (Bayram et al., 2008). Deletion of these genes induces a drastic decrease of OTA production and a downregulation in the *nrps* gene expression (Crespo-Sempere et al., 2013).

Our results suggest that yeast volatiles are able to downregulate some key genes implicated in OTA biosynthesis. This report is on line with a previous observation based on *A. flavus* exposed to low concentrations of 2-phenylethanol, where this compound decreased the aflatoxin production by reducing the expression levels of all aflatoxin gene pathway (Chang et al.,

2015). This specific effect on secondary metabolism may explain the fact that while vegetative growth was reduced by 50-70%, OTA release in the medium was almost completely repressed upon exposure to yeast VOCs.

Overall, the present report provides additional evidence to the suitability of selected yeast strains able to produce VOCs as important tools for postharvest management of mycotoxin-producing fungi. Acting as biodegradable fumigants, VOCs leave no residues and do not need any direct contact between yeast cells and the surface of the target commodity (Parafati et al. 2017). To further develop yeast VOCs application in postharvest disease control, it will be crucial to increase their stable production over time by identifying optimal growing and storage conditions. Moreover, there is a need to develop new carriers for efficient and inexpensive application and compatibility with standard postharvest handling pipeline (Parafati et al. 2017). Finally, those compounds that are exclusively responsible for fungal inhibition should be further characterised to allow the design of improved artificial VOCs mixtures with high efficiency and low toxicity towards non-target organisms.

Acknowledgments

This publication was made possible by NPRP grant # 8-392-4-003 from the Qatar National Research Fund (a member of Qatar Foundation). The findings achieved herein are solely the responsibility of the authors.

References

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Castella, G., Cabañes, F.J., 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. J. Food Prot. 66, 504-506.

Abbas, A., Valez, H., Dobson, A.D.W., 2009. Analysis of the effect of nutritional factors on OTA and OTB biosynthesis and polyketide synthase gene expression in *Aspergillus ochraceus*. Int. J. Food Microbiol. 135, 22-27.

- Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., Vero, S., 2017. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biol. Control* 109, 14-20.
- Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T., Lebrihi, A., 2009. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genet. Biol.* 46, 77-84.
- Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Yu, J.H., Braus, G.H., 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504-1506.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 204–209.
- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004. *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryot. Cell* 3, 527-535.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 139-144.
- Buzzini, P., Romani, S., Turchetti, B., Vaughan, A., Pagnoni, U.M., Davoli, P., 2005. Production of volatile organic sulfur compounds (VOCs) by basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res.* 5, 379-385.

Cabañes, F.J., Bragulat, M.R., Castellá, G., 2013. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. Food Microbiol. 36, 135-141.

Castegnaro, M., Mohr, U., Pfohl-Leskowicz, A., Estève, J., Steinmann, J., Tillmann, T., Michelon, J., Bartsch, H., 1998. Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlated with DNA adduction. Int. J. Cancer 77, 70-75.

Chang, P.K., Hua, S.S.T., Sarreal, S.B.L., Li, R.W., 2015. Suppression of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by 2-phenylethanol is associated with stimulated growth and decreased degradation of branched-chain amino acids. Toxins 7, 3887-3902.

Crespo-Sempere, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2013. VeA and LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. Int. J. Food Microbiol. 166, 479-486.

Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A.D.W., Budroni, M., Migheli, Q., 2012. A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. Toxins 4, 1468-1481.

De Curtis, F., de Felice, D.V., Ianiri, G., De Cicco, V., Castoria, R., 2012. Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. Int. J. Food Microbiol. 159, 17-24.

Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., Mari, M., 2015. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biol. Control* 81, 8-14.

Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 137-145.

Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M., 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiol.* 27, 187-198.

European Commission (EC), 2012. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report. Directorate-General for Health and Consumers. Available:

http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf.

Farbo M.G., Urgeghe P.P., Fiori S., Marceddu S., Jaoua S., Migheli Q., 2016. Adsorption of ochratoxin A from grape juice by yeast cells immobilised in calcium alginate beads. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 29-34.

Fialho, M.B., Toffano, L., Pedroso, M.P., Augusto, F., Pascholati, S.F., 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal Microbiology and Biotechnology.* 26, 925-932.

Fiori, S., Urgeghe, P.P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., Migheli, Q., 2014. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against

Aspergillus carbonarius and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *Int. J. Food Microbiol.* 189, 45-50.

Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A.D., Mulè, G., 2009. Characterisation of a *pkS* gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 8-15.

Gallo, A., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mulè, G., Visconti, A., Baker, S.E., 2012. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8208-8218.

Gallo, A., Knox, B.P., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., 2014. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* 179, 10-17.

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Karolewicz, A., 2006. A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Res.* 22, 134-141.

Hua, S.S.T., Beck, J.J., Sarreal, S.B. L., Gee, W., 2014. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 30, 71-78.

Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H., Huang, H.C., 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology* 101, 859-869.

Huang, R., Che, H.J., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D.H., Li, G.Q., 2012. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. *Biol. Control* 62, 53-63.

Huff, W.E., Hamilton, P.B., 1979. Mycotoxins– their biosynthesis in fungi: ochratoxins-metabolites of combined pathways. *J. Food Prot.* 42, 815-820.

Huffman, J., Gerber, R., Du, L., 2010. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* 93, 764-776.

IARC, 1993. Ochratoxin A. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 56. IARC, Lyon, France.

Janisiewicz, W.J., Kurtzman, C.P., Buyer, J.S., 2010. Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast* 27, 389-398.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2008. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO Food Additives Series 59. Available http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241660594_eng.pdf.

Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant. Sci.*, 6, 151.

Karolewicz, A., Geisen, R., 2005. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 588-595.

Kogkaki, E.A., Natskoulis, P.I., Magan, N., Panagou, E.Z., 2015. Effect of interaction between *Aspergillus carbonarius* and non-ochratoxigenic grape-associated fungal isolates on growth and ochratoxin A production at different water activities and temperatures. *Food Microbiol.* 46, 521-527.

Krogh, P., 1978. Casual associations of mycotoxic nephropathy. *Acta Path. Micro. Im.* A 269, 1-28.

Linde, T., Zoglowek, M., Lübeck, M., Frisvad, J.C., Lübeck, P.S., 2016. The global regulator LaeA controls production of citric acid and endoglucanases in *Aspergillus carbonarius*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1139-1147.

Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y., 2013. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 153-160.

Liu, P., Cheng, Y., Yang, M., Liu, Y., Chen, K., Long, C.A., Deng, X., 2014. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiol.* 14, 242.

Maffei, M.E., Gertsch, J., Appendino, G., 2011. Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1359-1380.

Malandrakis, A.A., Vattis, K.N., Doukas, E.G., Markoglou, A.N., 2013. Effect of phenylpyrrole-resistance on fitness parameters and ochratoxin production in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* 165, 287-294.

Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M., 2005. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East

Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. Yeast 22, 1133-1142.

Masoud, W., Kalsoft, C.H., 2006. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. Int. J. Food Microbiol. 106, 229-234.

Morath, S.U., Hung, R., Bennett, J.W., 2012. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. Fungal Biol. Rev. 26, 73-83.

Niessen, L., Schmidt, H., Mühlencoert, E., Färber, P., Karolewicz, A., Geisen, R., 2005. Advances in the molecular diagnosis of ochratoxin A-producing fungi. Food Addit. Contam. 22, 324-334.

O'Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, A.D.W., 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. Microbiology 149, 3485-3491.

O'Callaghan, J., Coghlan, A., Abbas, A., García-Estrada, C., Martín, J.F., Dobson, A.D.W., 2013. Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum*. Int. J. Food Microbiol. 161, 172-181.

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. Food Microbiology 47, 85-92.

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2017. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on

hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology* 63, 191-198.

Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U.Ä., Schnürer, J., 2006. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS yeast research*, 6, 3-13.

Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 70-77.

Romano, A., Capozzi, V., Spano, G., Biasioli, F., 2015. Proton transfer reaction-mass spectrometry: online and rapid determination of volatile organic compounds of microbial origin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 3787-3795.

Rosenkranz, H.S., Carr, H.S., Rose, H.M., 1965. Phenethyl alcohol. I. Effect on macromolecular synthesis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 89, 1354-1369.

Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Geisen, R., 2013. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 407-412.

Strobel, G.A., Dirkse, E., Sears, J., Markworth, C., 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147, 2943-2950.

Suwannarach, N., Bussaban, B., Hyde, K.D., Lumyong, S., 2010. *Muscodor cinnamon*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. *Mycotaxon* 114, 15-23.

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. Available online: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov /](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Van den Doo, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 11, 463-471.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, D.B., Theron, J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.

Wang, L., Wang, Y., Wang, Q., Liu, F., Selvaraj, J.N., Liu, L., Xing, F., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, Y., 2015. Functional characterization of new polyketide synthase genes involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* fc-1. *Toxins* 7, 2723-2738.

Werner, S., Polle, A., Brinkmann, N., 2016. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 8651-8665.

Worapong, J., Strobel, G.A., Ford, E.J., Li, J.Y., Baird, G., Hess, W.M., 2001. *Muscodor albus* anam. nov. and endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon* 79, 67-79.

Wriessnegger, T., Pichler, H., 2013. Yeast metabolic engineering-targeting sterol metabolism and terpenoid formation. *Prog. Lipid Res.*, 52, 277-293.

Yan, H., Zhang, H., Wang, Q., Jian, H., Qiu, X., Wang, J., Tang, K., 2011. Isolation and identification of a putative scent-related gene RhMYB1 from rose. *Molecular Biology Reports*, 38, 4475-4482.

Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P.K., 2016. Secondary metabolism in Trichoderma-Chemistry meets genomics. *Fungal Biol. Rev.*, 30, 74-90.

Zhang, H., Apaliya, M.T., Mahunu, G.K., Chen, L., Li, W., 2016. Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review. *Trends Food Sci. Tech.* 51, 88-97.

Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., Liu, Y., 2015. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. *Food Control* 50, 125-132.

5. DISCUSSIONE GENERALE

Come accennato nella sezione introduttiva, le strategie volte a ridurre la contaminazione degli alimenti da ocratossina sono classificate a seconda del tipo di trattamento - fisico, chimico o microbiologico - e il loro obiettivo comune è quello di ridurre o eliminare gli effetti tossici dell'OTA o di distruggere, modificare o assorbire questa micotossina (FAO/WHO/UNEP, 1999). L'approccio ideale dovrebbe avere le caratteristiche di un facile uso, essere economico e non generare composti tossici o modificare la qualità alimentare dei prodotti (EMAN, 2004).

Negli ultimi decenni, la scienza dei materiali ha fornito particelle funzionali come catalizzatori per diverse applicazioni biologiche, quali la purificazione e l'immobilizzazione di composti bioattivi. Considerando le tendenze attuali nello sviluppo di tecnologie sostenibili, sono sempre più desiderabili metodi riutilizzabili ed economici. La tecnologia che utilizza le cellule di microrganismi è considerata un approccio promettente e sostenibile per il bioassorbimento, in particolare per il legame di molecole specifiche con attività biologica.

Per quanto riguarda quest'ultima applicazione, è vantaggioso impiegare una superficie cellulare più grande per consentire il legame di una quantità maggiore di molecole bersaglio. Poiché il sistema di controllo della qualità delle proteine eucariotiche è superiore a quello dei procarioti, i microrganismi eucariotici sono più appropriati come strumento di bioassorbimento rispetto alle cellule batteriche.

Uno degli obiettivi di questa tesi è stato quello di studiare ceppi di lievito selezionati per valutarne la potenziale capacità antagonistica nei confronti di funghi micotossigeni, quali *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*, e la capacità di decontaminazione da OTA su bevande destinate al consumo umano. Essendo l'OTA una micotossina resistente alle alte temperature e non facilmente deteriorabile, si è voluto studiare un sistema naturale che sfruttasse la capacità adsorbente di un ceppo di lievito, mettendolo a contatto diretto con la bevanda nel quale era stata accertata la contaminazione. Allo stesso tempo, il sistema non avrebbe dovuto alterare le caratteristiche qualitative e organolettiche del prodotto. A tale scopo è stato scelto un ceppo di *Candida intermedia* 253, che in un lavoro precedente di Fiori et al, (2014) si era mostrato efficiente nell'assorbimento di OTA presente nel succo d'uva.

Perché potessero risultare più facili sia la diffusione nel mezzo, che l'interazione con l'ocratossina, il recupero e la successiva separazione dalla matrice liquida, il lievito è stato incapsulato in sfere di alginato di sodio. L'alginato di sodio, di cui è già documentata la proprietà di adsorbimento, è una matrice molto utilizzata in campo tecnologico (Yu et al., 2013; Veglio et al., 2002). Sono state così ottenute delle sfere di alginato di sodio: il lievito viene incapsulato al suo interno, ma anche adsorbito sulla superficie delle sfere, come è visibile a microscopia elettronica a trasmissione.

In una prova successiva si è voluto anche aggiungere all'alginato delle particelle di ferro. E' stato così possibile ottenere la rimozione delle sfere di alginato addizionate alla componente ferrica, mediante un magnete, senza che si intaccasse la natura e la qualità delle bevande nel quale erano immerse.

Il contenuto di ocratossina presente nel succo d'uva messo a contatto con cellule di lievito e alginato sottoposte a trattamento termico era sensibilmente diminuito a confronto con il contenuto di micotossina rilevato nei campioni trattati con cellule di lievito vive (da 17,4 a 5,1-5,0 µg/Kg, pari ad una riduzione del 70%). Questi risultati suggeriscono che l'inclusione in alginato di sodio non impedisce l'assorbimento dell'OTA da parte delle proteine presenti nella parete cellulare del lievito e che il trattamento termico mediante autoclave migliora significativamente la capacità assorbente del ceppo *Candida intermedia* 253.

E' stata, inoltre, segnalata la capacità adsorbente dell'OTA da parte dell'alginato di sodio non associato al lievito, anche se ovviamente il maggior quantitativo di ocratossina è quello adsorbito da sferette di alginato di sodio con cellule di lievito autoclavate. I dati mostrano che dopo 24/48 ore di incubazione di sfere nella bevanda, il contenuto di OTA si è ridotto drasticamente da 16 a 5,6-2,8 µg/Kg, e dopo 5 giorni si è ridotta la sua concentrazione a 6 µg/Kg, probabilmente come risultato di un processo di saturazione dei siti di legame "proteine del lievito/ ocratossina".

L'assorbimento dell'ocratossina potrebbe essere dovuto alla presenza di β-glucani e mannoproteine, presenti sulla parete cellulare del lievito. Dal momento che la componente glicanica delle mannoproteine può variare a seconda del ceppo di lievito, anche la loro efficienza di rimozione dell'OTA può essere diversa.

Osservando la potenzialità di tali sfere costituite da lieviti e alginato quale possibile strumento biologico da impiegare nella decontaminazione di cibi e bevande, è stato messo a punto un mezzo che permettesse alla matrice liquida di fluire e successivamente di essere decontaminata in più passaggi consecutivi. E' stato realizzato un bioreattore, una colonna di vetro per cromatografia "impaccata" con sfere di sodio alginato e lievito autoclavato. Ad ogni passaggio del liquido attraverso questo strumento sperimentale è stato possibile constatare una riduzione di OTA del 21% sin dal primo filtraggio e, dopo soli 4 passaggi, si è registrato un decremento del 57%.

Il bioreattore è stato sperimentato in maniera che potesse fornire la massima superficie disponibile per l'adsorbimento delle micotossine e, allo stesso tempo, potesse evitare fenomeni di saturazione. Per ottenere un miglioramento del processo di decontaminazione mediante adsorbimento, si potrebbero sperimentare nuove matrici in grado di inglobare i ceppi di lievito, mantenendone la capacità di decontaminazione. Un simile approccio è stato impiegato da Guo et al., (2013) per l'assorbimento di patulina presente in succo di sidro, realizzando un bioreattore mediante lieviti immobilizzati e sottoposti a trattamento con etanolo e calore.

Un altro materiale biologico, utilizzato nella formazione di sfere in grado di incapsulare dei lieviti, è il gellano. Iurciuc (Tincu) et al., (2016), come potenziale applicazione nella fermentazione del glucosio, hanno impiegato un microbioreattore che sfrutta i legami ionici del gellano con il lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

In questo lavoro, per la prima volta vengono proposte delle sfere costituite da alginato di sodio e lievito, come promettente mezzo di decontaminazione per rimuovere tracce di OTA da succhi di frutta e vino. Inoltre, un impiego di cellule di lievito autoclavate, che hanno perso la capacità di fermentare o di rilasciare dei metaboliti secondari, prodotti tossici, all'interno della matrice, offre un'ulteriore motivazione per l'applicazione di un tale metodo nel processo di decontaminazione di cibi e bevande.

Se questo lavoro di tesi ha messo, da un lato, in luce l'opportunità di impiegare il lievito come potenziale attore per l'assorbimento di ocratossina da succhi di frutta, diventando valido strumento di detossificazione, dall'altro ha favorito la ricerca e lo studio di altri approcci basati sulle caratteristiche della cellula di lievito.

In un precedente studio (Fiori et al., 2014) era stata evidenziata l'abilità di contenimento nei confronti di *A. carbonarius*, sia *in vitro* che su acini d'uva, da parte di quattro ceppi di lievito: *Candida intermedia* 253, *Lachancea thermotolerans* 751, *Cyberlindnera jadinii* 273 e *Candida friedrichii* 778. La riduzione della crescita del micelio e della sporificazione è stata, almeno in parte, attribuita al rilascio di sostanze organiche volatili.

Sulla base di queste interpretazioni, si è voluta approfondire la composizione chimica delle sostanze volatili organiche prodotte dai quattro ceppi di lievito, valutandone la capacità inibitoria sulla crescita di *A. carbonarius* e *A. ochraceus*. Infine, si è voluto indagare se tali sostanze avessero anche capacità regolatrici nella produzione di OTA e influenza sull'espressione genica del pathway genico coinvolto nella biosintesi dell'ocratossina.

Il primo microrganismo con caratteristiche di agente di lotta biologica, a cui è stata associata la produzione di sostanze volatili, è stato il *Muscodor albus* (Worapong et al., 2001; Strobel et al., 2001). Si sono susseguiti studi che hanno permesso di rilevare sostanze volatili con capacità antifungine nei confronti di agenti fitopatogeni, prodotte da microrganismi isolati dal terreno (Hung et al., 2015; Kanchiswamy et al., 2015; Werner et al., 2016). Tra i numerosi microrganismi considerati, utilizzati come potenziali agenti di contenimento biologico, i lieviti sono stati scelti per le loro caratteristiche biologiche e per le loro proprietà non tossiche.

I lieviti mostrano, inoltre, notevole resistenza a condizioni ambientali avverse, manifestano ridotta tossicità per gli operatori del settore e per l'ambiente, in quanto non rilasciano sostanze nocive per l'uomo e la sua salute (Droby et al., 2009; Morath et al., 2012).

Utilizzando le conoscenze esposte con il presente studio, si è dimostrato che i VOCs svolgono un ruolo fondamentale nell'attività antagonistica esercitata dai quattro ceppi di lievito selezionati contro i funghi *A. carbonarius* MPVA566 e *A. ochraceus* MPVA703. Tutti e quattro i ceppi di lievito si sono mostrati efficaci, ma la *Candida intermedia* 253 e *Lachancea thermotolerans* 751 hanno mostrato, nel tempo, di essere più attivi nel ridurre la crescita miceliale, la sporificazione e la sintesi di OTA.

All'osservazione microscopica è stato anche possibile cogliere la presenza di ife con coaguli citoplasmatici, con fenomeni di lisi, questi ultimi manifestatisi in particolare in seguito alla esposizione dei VOCs rilasciati da *L. thermotolerans* 751.

L'analisi mediante gascromatografia-spettrometria di massa, ha permesso di identificare 23 composti tra alcoli, aldeidi, idrocarburi, terpeni, con una notevole varietà nell'area assoluta nello stesso lievito e tra i diversi ceppi di lievito. La maggior parte di queste sostanze volatili ha mostrato un'area di rilevanza trascurabile. Alcune di esse sono state ritrovate anche nello spazio di testa del controllo negativo, costituito esclusivamente dal terreno selettivo utilizzato. La presenza in tracce di alcune sostanze volatili anche nel cromatogramma del controllo negativo, ci fa tuttavia supporre che esse siano correlate alla presenza di estratto di lievito, un costituente del terreno di crescita (YPD Agar).

Il componente principale di tutti e quattro i *volatilomi* è risultato essere il 2-feniletanolo, assente nel cromatogramma emesso dal YPD Agar del controllo. Questo composto è presente in natura, in particolare negli estratti di fiori profumati e negli oli essenziali (Yan et al., 2011).

Tale composto era stato precedentemente osservato come il principale volatile emesso anche da altri lieviti, come nel caso di *S. cerevisiae*, che è in grado di controllare *Sclerotinia sclerotiorum* sia *in vitro* che *in vivo* su fagiolo (Fialho et al., 2010). Il 2-feniletanolo prodotto da *K. apiculata* si è mostrato efficace nel contenere la crescita di *P. italicum* su agrumi (Liu et al., 2014), mentre i VOCs prodotti da *Pichia anomala* hanno manifestato capacità di inibire la germinazione delle spore e la produzione di aflatossina da parte di *A. flavus* (Chang et al., 2015; Hua et al., 2014).

Un lavoro condotto da Chang et al. (2015) ha dimostrato come il 2-feniletanolo abbia un effetto letale nei confronti di *A. flavus* e sia in grado di inibire la produzione di aflatossina ad un dosaggio sub-letale. Ad alte concentrazioni, il 2-feniletanolo può essere causa di alterazioni nella biosintesi di amminoacidi, nelle proteine a livello mitocondriale e nel nucleo di cellule fungine e batteriche (Liu et al., 2014; Rosenkranz et al., 1965).

Il percorso biosintetico dell'OTA, come descritto da Huff e Hamilton (1979) non è stato ancora completamente spiegato e pochi sono i geni a tutt'oggi scoperti e studiati.

In *A. carbonarius* sono presenti tre geni responsabili della produzione di OTA: *acpks*, *acOTApks*, *acOTAnrps*. Il gene *acpks* codifica un dominio altamente conservato (Gallo et al., 2009). Il gene *acOTApks* contiene un dominio con metiltransferasi, capace di aggiungere un gruppo metilico alla struttura polipeptidica dell'OTA (Gallo et al., 2014). La diversità dei geni *PKS* in *Aspergillus carbonarius* (Atoui et al., 2006), sono stati in precedenza già studiati. La profilazione trascrizionale eseguita da Botton et al., (2008), ha permesso l'identificazione di alcuni geni espressamente differenziati implicati precocemente nella biosintesi dell'OTA e della sua regolazione. Secondo la struttura di OTA, il percorso di biosintesi comprende non solo una famiglia di *PKS*, ma anche una cosiddetta non ribosomiale peptide sintasi (*NRPS*). Infine anche il gene *acOTAnrps* prende parte alla famiglia dei geni implicati nella biosintesi dell'OTA (Gallo et al., 2009; Gallo et al., 2012).

Nel pathway genico responsabile della biosintesi dell'OTA nell'*Aspergillus carbonarius* sono compresi anche due geni regolatori, *laeA* e *veA*. Sono due proteine altamente conservate e sono dei regolatori complessivi nei miceti, che modulano la produzione di OTA nel genere *Aspergillus* (Bayram et al., 2008).

Il gene *laeA*, descritto per la prima volta nell'*Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus terreus*, codifica una metiltransferasi (Bok et al., 2004; Linde et al., 2016). Il gene *veA* codifica per una proteina regolatrice, trasportata dal citoplasma al nucleo, in seguito ad esposizione alla luce. A dimostrazione della loro importanza nella via biosintetica dell'OTA, la loro delezione ne comporta la drastica riduzione nella produzione di OTA, legata ad una mancata regolazione dell'espressione genica (Crespo-Sempère et al., 2013).

In questo lavoro l'espressione dei geni è stata monitorata utilizzando una qRT-PCR, e la produzione di OTA è stata osservata in parallelo mediante lettura all' HPLC.

I risultati di questo progetto di ricerca suggeriscono che le sostanze volatili organiche prodotte da tutti e quattro i ceppi di lievito presi in esame sono in grado di sottoesprimere i geni chiave della via biosintetica dell'ocratossina. Tale osservazione pare essere confermata mediante dei dati raccolti in un lavoro precedentemente svolto, che dimostra come il 2-feniletanolo a bassa concentrazione sia in grado di ridurre i

livelli d'espressione dei geni *aflR* e *aflJ* implicati nella produzione di aflatoxina da parte di *A. flavus* (Chang et al., 2015).

Questo effetto è molto evidente sul metabolismo secondario degli *Aspergilli*, in quanto riduce completamente la produzione di OTA. Tuttavia, non è sempre direttamente proporzionale ad una riduzione della crescita radiale del diametro delle colonie di funghi ocratossigeni (si è osservata una riduzione dal 50 al 70%).

Tale lavoro qualifica i quattro ceppi di lievito selezionati per questo studio come agenti di contenimento biologico, in grado di produrre VOCs, utili alla gestione di funghi fitopatogeni e micotossigeni sia in campo che in postraccolta. Qualora si potesse utilizzare i VOCs come fumiganti, non danneggiando essi né i prodotti né gli operatori, sarebbe utile poter sviluppare la loro applicazione, aumentandone la produzione, rendendola stabile nel tempo e utilizzandoli come strumento di contenimento in postraccolta o come metodo di detossificazione (Di Francesco et al., 2015; Hung et al., 2015; Parafati et al., 2017).

Le interazioni tra lieviti e patogeni delle piante sono, al momento, ancora in fase di sperimentazione.

L'isolamento di altri generi e specie e il loro saggio per valutarne l'attività antagonista, potrebbero porre le basi per intraprendere un'analisi sistematica di quei fattori chiave che, interagendo tra loro, sono coinvolti nella complessa rete costituita da antagonista e fungo.

Sta diventando quindi cruciale la necessità di meglio sviluppare le ricerche sulla proteomica e sulla genomica funzionale da applicare a questo campo, in modo da prevedere, determinare e monitorare i cambiamenti nello stato fisiologico dei microrganismi utilizzati in pre- e postraccolta (Droby et al., 2009).

Inoltre, un ulteriore apporto all'utilizzo dei VOCs nelle biotecnologie per l'abbattimento delle micotossine potrebbe derivare dallo studio e caratterizzazione di altri composti volatili organici. Tutto questo potrebbe essere utile per consentire la progettazione di miscele gassose di VOCs artificiali con esaltazione dell'efficienza e con ridotta se non assente tossicità verso i prodotti alimentari, l'uomo, l'animale e l'ambiente. Sarebbe interessante la formulazione di terreni di crescita atti ad esaltare e differenziare i diversi composti prodotti dai lieviti, in varie condizioni ambientali.

Molti sistemi microbici possono produrre grandi quantità di composti volatili aromatizzanti, il cui utilizzo può essere limitato perché economicamente non competitivo. Tuttavia questo svantaggio derivante dal maggior prezzo di mercato degli aromi naturali rispetto ai composti di sintesi chimica, è controbilanciato dalla qualità superiore dei prodotti di origine naturale. A tal fine, la possibilità di aumentare i processi produttivi dei volatili dei lieviti può essere considerato uno degli obiettivi chiave per studi futuri.

Di conseguenza, alla luce della versatilità d'impiego dei VOCs dei lieviti, l'applicazione di tali studi ha come finalità il miglioramento dell'efficacia e dell'efficienza di tali metodi, allo scopo anche di evitare contaminazioni e perdite durante la produzione, lo stoccaggio e la lavorazione dei prodotti, nel rispetto degli obiettivi di qualità e di sicurezza alimentare.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Aleksieva, Z., Ivanova, D., Godjevargova, T., Atanasov, B., 2002. Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochemistry* 37, 1215-1219.

Amano, H., Haseeb, M., 2001. Recently - proposed methods and concepts of testing the effects of pesticides on the beneficial mite and insect species: study limitations and implications in IPM. *Applied Entomology and Zoology* 6, 1-11.

Amezqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo-Arbizu, M., De Cerain, A.L., 2009. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20, 326-333.

Arenz, B.E., Held, B.W., Jurgens, J.A., Farrell, R.L., Blanchette, R.A., 2006. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 3057-3064.

Ariza, Y., 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* 10- 18.

Aronis, M.L., Dos Santos, R.P., Goldani, L.Z., 2011. Disseminated *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* co-infection in patients with AIDS. *Mycopathologia* 172(3), 233-236.

Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., & Vero, S., 2017. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control* 109, 14-20.

Arras, G., Maltoni, S., 2004. Postharvest biological and integrated control of fungal pathogens on fruit. In: Dris, R., Niskanen, R., Jain, S.M., Ed., *Crop management and postharvest handling of horticultural crops: disease and disorder of fruit and vegetables*. Science Publishers Inc, Enfield, USA, pp. 115-185.

Arthur, H., Watson, K., 1976. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology* 128, 56-68.

Atoui A., Dao, P., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2006. Amplification and diversity analysis of Ketosynthase domains of putative polyketide synthase gene in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 448-493.

Ayob, F.W., Simarani, K., Abidin, N.Z. & Mohamad, J., 2017. First report on a novel *Nigrospora sphaerica* isolated from *Catharanthus roseus* plant with anticarcinogenic properties. *Microbial Biotechnology* 10(4), 926-932.

Baldwin, T., Riley, R., Zitomer, N., Voss, K., Coulombe, R., Jr., Pestka, J., Williams, D., Glenn, A., 2011. The current state of mycotoxin biomarker development in humans and animals and the potential for application to plant systems. *World Mycotoxin Journal* 4, 257-270.

Bata, Á., Lásztity, R., 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology* 10(6), 223-228.

Batt, C.A., Tortello, M.L., 2014. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd Ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Battilani, P., Barbano, C., Logrieco A., 2008. Risk Assessment and Safety Evaluation of Mycotoxins in Fruits. In: Barkai-Golan, R. and Paster, N., *Mycotoxins in fruits and vegetables*, cap. 1.

Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Yu, J.H., Braus, G.H., 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504-1506.

- Beccari, G., Covarelli, L., & Nicholson, P., 2011. Infection processes and soft wheat response to rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60, 671-684.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Lebrihi, A., Taillandier, P., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1038-1044.
- Belli, G., 2016. *Elementi di patologia vegetale*. Piccin, Nuova Libreria.
- Bendinelli, M., Chezzi, C., Dettori, G., Manca, N., Morace, G., Polonelli, L., Tufano, M.A., 2005. *Microbiologia Medica*. Gli agenti infettivi dell'uomo: biologia, azione patogena, laboratorio. Micologia. Monduzzi Editore, Bologna.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
- Bennett, J.W., Hung, R., Lee, S., Padhi, S., 2012. Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents. In: Hock, Ed., *Fungal Associations, The Mycota IXB*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Berry, C.L., 1988. The pathology of mycotoxins. *The Journal of Pathology* 154, 01-311.
- Blanc, M., Pittet, A., Munoz-Boksz, R., Viani, R., 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 673-675.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108, 204-209.
- Böhm, J., Grajewski, J., Asperger, H., Rabus, B., Razzazi, E., 2000. Study on biodegradation of some trichothecenes (NIV, DON, DAS, T-2) and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycological Research* 16, 70-74.

- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004. *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell* 3, 527-535.
- Bonatterra, A., Mari, M., Casalini, L., Montesinos, E., 2003. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology* 84(1), 93-104.
- Botha, A., 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1-8.
- Bottalico, A., 2000. Prevenzione e prospettive di lotta e di controllo. In: Dragoni, I., Ed., *Muffe alimenti e micotossicosi*, Città Studi Edizioni, cap. 9.
- Bottalico, A., 2002a. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. Speciale micotossine. *Informatore Fitopatologico* Anno LII – n. 12 Dicembre.
- Bottalico, A., 2002b. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. *Informatore fitopatologico* 52(12), 10-16.
- Botton, A., Ferrigo, D., Scopel, C., Causin, R., Bonghi, C., Ramina, A., 2008. A cDNA-AFLP approach to study ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 127, 105-115.
- Boudra, H., Le Bars, P., Le Bars, J., 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1156-1158.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J.F., Zucca, J., 1990. *Microbiologia Alimentare*. Aspetti microbiologici della sicurezza e della qualità. Ed., Tecniche Nuove.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71, 139-144.

- Breitholtz-Emanuelsson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I., Hult, K., 1993. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *Journal of AOAC International* 76, 842-846.
- Budavari, S., Ed. 1989. *The Merck Index*, 11th Ed., Merck & Co. Rahway, NJ, USA, pp. 1068.
- Buzzini, P., Vaughan-Martini, A., 2006. Yeast biodiversity and biotechnology. In: Rosa, C.A., and Péter, G., Ed., *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer. cap. 22.
- Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A., 2006. Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 122-126.
- Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I., Pfohl-Leszkowicz, A., 2006. Balkan Endemic Nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 519-529.
- Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G.P., Galassi, S., 2001. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3917-3921.
- Castoria, R., Wright, S.A.I., Droby, S., 2008. Biological control of mycotoxigenic fungi in fruits: In Barkai-Golan, R. and Paster, N., Ed., *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Elsevier, San Diego, cap. 16.
- Cenkowski, S., Pronyk, C., Zmidzinska, D., Muir, W.E., 2007. Decontamination of food products with superheated steam. *Journal of Food Engineering* 83(1), 68-75.
- Chang, P.K., Hua, S.S.T., Sarreal, S.B.L., Li, R.W., 2015. Suppression of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by 2-phenylethanol is associated with stimulated growth and decreased degradation of branched-chain amino acids. *Toxins* 7, 3887-3902.
- Cheli, F., Pinoti, L., Campagnoli, A., Fusi, E., Rebuci, R., Baldi, A., 2008. Mycotoxin analysis, mycotoxin-producing fungi assays and mycotoxin toxicity bioassays in food mycotoxin monitoring and surveillance. *Italian Journal of Food Science* 20(4).

- Chelkowski, J., Szebiotko, K., Golinski, P., Buchowski, M., Godlewska, B., Radomyrska, W., & Wiewiorowska, M., 1982. Mycotoxins in cereal grain. Part 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Molecular Nutrition & Food Research* 26(1), 1-7.
- Chen, X., Pizzatti, C., Bonaldi, M., Saracchi, M., Erlacher, A., Kunova, A., Cortesi, P., 2016. Biological control of lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endophytic streptomycetes. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Cook, R.J., Baker, K.F., 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, MN. *American Phytopathological Society*, pp. 539.
- Cook, R.J., 1988. Biological control and holistic plant-health care in agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 3, 51-62.
- Cook, R.J., Granados R.R., 1991. Biological control: making it work. In: Macdonald M.J.F., Ed., *Agricultural Biotechnology at the Crossroads*. National Agricultural Biotechnology Council, Ithaca, NY, pp. 213-227.
- Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., Maddox, J.V., McManus, M.L., Moore, L., Meyer, S.F., Quimby, P.C., Stack J.P., Vaughn, J.L., 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biological Control* 7, 333-351.
- Crespo-Sempere, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2013. VeA and LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 166, 479-486.
- Cuppels, D.A., Higham, J., Traquair, J.A., 2013. Efficacy of selected streptomycetes and a streptomycete + pseudomonad combination in the management of selected bacterial and fungal diseases of field tomatoes. *Biological Control* 67, 361-372.
- da Rocha, M.E.B., Freire, F.D.C.O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., & Rondina, D., 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36(1), 159-166.

- De Cicco, V., Salerno, M., Bertolini, P., & Baraldi, E., 2009. *Patologia postraccolta dei prodotti vegetali*. Piccin.
- De Curtis, F., de Felice, D.V., Ianiri, G., De Cicco, V., Castoria, R., 2012. Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. *International Journal of Food Microbiology* 159, 17-24.
- de Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., Castoria, R., 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology* 98, 1261-1270.
- de Oliveira Nuñez, J., Pillon, K.R.A.P., Bizerra, P.L., Paniago, A.M.M., Mendes, R.P., Chang, M.R., 2016. The Simultaneous Occurrence of Histoplasmosis and Cryptococcal Fungemia: A Case Report and Review of the Literature. *Mycopathologia* 181(11-12), 891-897.
- Degen, G., 2011. Tools for investigating workplace-related risks from mycotoxin exposure. *World Mycotoxin Journal* 4, 315-327.
- Degenkolb, T., Fog Nielsen, K., Dieckmann, R., Branco-Rocha, F., Chaverri, P., Samuels, G. J., Thrane, U., von Döhren, H., Vilcinskas, A. & Brückner, H., 2015. Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* Complex. *Chemistry & Biodiversity* 12, 662-684.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., Mari, M., 2015. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control* 81, 8-14.
- Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Pachlatko, J.P., Schwinn, F.J., 1992. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. *Phytopathology* 82(2), 131-135.

Doutt, R.L., 1964. Biological characteristics of entomophagous adults. In: De Bach, P., Ed., *Biological control of insect pests and weeds*. Reinhold Publ. Co., New York, US, pp. 145-167.

Droby S., Wisniewski, M.E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y., Chalutz, E., 1997. Influence of CaCl₂ on *Penicillium digitatum*, grapefruit tissue and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* 87, 310-315.

Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., Wilson, C., 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology* 27, 127-135.

Droby S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson C.L., 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52, 137-145.

Duarte, S., Pena, A., Lino, C., 2011. Human Ochratoxin A biomarkers-from exposure to effect. *Critical Reviews in Toxicology* 41, 187-212.

Dunlop, R.W., Simon, A., Sivasithamparam, K., 1989. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *Journal of Natural Products* 52, 67-74.

EMAN, 2004. Fact sheets on HACCP-Prevention and control. http://193.132.193.215/eman2/fsheet3_1.asp (consultato il 20/06/2017).

European Union. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union* 2001, L. 77, 1-13.

European Union. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union* 2002, L. 75, 18-20.

European Food Safety Authority, EFSA, 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal* 365, 1-56.

European Union. Commission Recommendation No 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, Ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding, (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union* 2006, C 229, 7-9.

European Union. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union* 2006, L. 364, 5-24.

FAO/WHO/UNEP, 1999. Minimising risks posed by mycotoxins utilising the HACCP Concept. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, 8 b, 1-13. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco8b.pdf> (consultato il 05/05/2017).

Faull, J.L., 1988. Competitive antagonism of soil-borne plant pathogens. In: Burge, M.N., Ed., *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester University Press, Manchester, UK, pp. 125-141.

Fialho, M.B., Toffano, L., Pedroso, M.P., Augusto, F., Pascholati, S.F., 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 26, 925-932.

Fink-Gremmels, J., 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly* 21, 115-120

Fiori, S., Urgeghe, P.P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., Migheli, Q., 2014. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International Journal of Food Microbiology* 189, 45-50.

- Fisher, M.C., Koenig, G.L., White, T.J., Taylor, J.W., 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94, 73-84.
- Fleet G. 2003, Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22.
- Food and agriculture organization of the United Nations, 2003. *Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed*, pp. 27.
- Fravel, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology* 26, 75-91.
- Fuchs, R., Peraica, M., 2005. Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Additives & Contaminants* 22, 53-57.
- Gabriel, C.J., Cook, R.J., 1990. Biological control-the need for a new scientific framework. *BioScience* 40, 204-206.
- Gallo, A., Perrone, G., Solfrizzo, M., Epifani, F., Abbas, A., Dobson, A.D., Mulè, G., 2009. Characterisation of a *pks* gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 129, 8-15.
- Gallo, A., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mulè, G., Visconti, A., Baker, S.E., 2012. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 8208-8218.
- Gallo, A., Knox, B.P., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., 2014. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *International Journal of Food Microbiology* 179, 10-17.
- Gareis, M., Martlbauer, E., Bauer, J., Gedek, B., 1988. Determination of Ochratoxin A in human milk. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology* 61-62.

- Gibson, C.M., Hunter, M.S., 2010. Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters* 13, 223-234.
- Gilbert, J., Brereton, P., MacDonald, S., 2001. Assessment of dietary exposure to Ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Additives & Contaminants* 18, 1088-1093.
- Giuffrida, P., 2012. Micotossine, Università degli Studi di Catania. www.UNICT.IT/dfsc/micotossine.htm.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 563-567.
- Goldenberg, S., Price, N., 2008. Opportunistic fungal lung infections. *Medicine* 36(6), 295-299.
- Goughenour, K.D., Rappleye, C.A., 2017. Antifungal therapeutics for dimorphic fungal pathogens. *Virulence* 8(2), 211-221.
- Grasso, P., 1983. Carcinogens in food. In: *Toxic hazards in food*. Boston, MA, Springer US., pp. 122-144.
- Grondin, E., Shum Cheong Sing, A., Caro, Y., Raherimandimby, M., Randrianierenana, A.L., James, S., Nueno-Palop, C., François, J.M., Petit, T., 2015. A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavouring compounds. *International Journal of Food Microbiology* 203, 101-108.
- Guéritte-Voegelein, F., Guénard, D., Dubois, J., Wahl, A., Potier, P., 1994. Chemical and biological studies on Taxol (Paclitaxel) and Taxotere (Docetaxel), new antineoplastic agents. *Journal de pharmacie de Belgique* 49, 193-205.
- Gullino, M.L., 2005. Environmental impact and risk analysis of bacterial and fungal biocontrol agents - Guest editorial. *Phytoparasitica* 33, 3-6.

- Guo, C., Yue, T., Yuan, Y., Wang, Z., Guo, Y., Wang, L., Li, Z., 2013. Biosorption of patulin from apple juice by caustic treated waste cider yeast biomass. *Food Control* 32, 99-104.
- Hang, N.T.T., Oh, S.O., Kim, G.H., Hur, J.S., Koh, Y.J., 2005. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Journal of Plant Pathology* 21(1), 59-63.
- Hawkes, M., Rennie, R., Sand, C., Vaudry, W., 2005. *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 51, 209-213.
- Heilmann, W., Rehfeldt, A.G., Rotzoll, F., 1999. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *European Food Research and Technology* 209, 297-300.
- Hickey, P.W., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., Wickes, B.L., Schmidt, H.J., Walsh, T.J., 2009. *Trichosporon mycotoxinivorans*: A novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3091-3097.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in Biological control: an overview. In: Harman, G.E., Kubicek C.P., *Trichoderma* and *Gliocladium*. Ed., Taylor & Francis Publishing, London, UK, vol.2, pp. 131-147.
- Hua, S.S.T., Beck, J.J., Sarreal, S.B. L., Gee, W., 2014. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research* 30, 71-78.
- Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H., Huang, H.C., 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology* 101, 859-869.
- Huang, R., Che, H.J., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D.H., Li, G., 2012. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. *Biological Control* 62, 53-63.

- Huff, W.E., Hamilton, P.B., 1979. Mycotoxins—their biosynthesis in fungi: ochratoxins-metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection* 42, 815-820.
- Huff, W.E., Kubena, L.F., and Harvey, R.B., 1988. Progression of ochratoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science* 67, 1139-46.
- Hult, K., Plestina, R., Habazin-Novak, V., Radic, B., Ceovic, S., 1982. Ochratoxin A in human blood and Balkan Endemic Nephropathy. *Archives of Toxicology* 51, 313-321.
- Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W., 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3395-3405.
- Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology* 167, 101-134.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* 122(2), 179-188.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1976. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to man: some naturally occurring substances. Lyon, France, Vol. 10, pp. 191-197.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1983. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans: some food additives, feed additives and naturally occurring substances. Lyon, France, Vol. 31, pp. 191-206.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France, Vol. 56, pp. 397-444, 445-466, 467-524.
- Iurciuc (Tincu), C.E., Alupei, L., Savin, A., Ibănescu C., Martin, P., Popa, M., 2016. Yeast cells immobilized in spherical gellan particles cross-linked with magnesium acetate. *Journal of Biotechnology* 236, 45-56.
- Jalili, M., Jinap, S., Noranizan, A., 2010. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control* 21(10), 1388-1393.

- Janisiewicz, W.J., Bors B., 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound- invading postharvest pathogens of fruits. *Applied and Environmental Microbiology* 61(9), 3261-3267.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L., 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Plant Biology* 40(1), 411-441.
- Jørgensen, K., 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15, 550-554.
- Jouany, J.P., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137(3), 342-362.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., Var, I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 593-619.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., 2009a. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Protection* 72, 2006-2016.
- Kabak, B., 2009b. Prevention and management of mycotoxins in food and feed. In: Rai, M., Varma, A., *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*, Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 201-227.
- Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science* 6, 151.
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Dussort, P., 2016. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research* 32(4), 179-205.
- Kiessling, K., Petterson, H., Sandholm, K., and Olson, M., 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1070, 3.

- Krogh, P., Hald, B., Giersten, P., Myken, F., 1974. Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. *Journal of Applied Microbiology* 28, 31-34.
- Krogh, P., 1987. Ochratoxin in foods. In P. Krogh Ed., *Mycotoxins in foods*, London, Academic Press, pp. 97-110.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 1998. The yeasts: a taxonomy study. Fourth Ed., Elsevier Science, Netherlands.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 2006. Yeast systematics and phylogeny. Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Péter, G., Rosa, C., Eds., *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, Vol. 2. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, pp. 11-30.
- Kutty, S.N., Philip, R., 2008. Marine yeasts - a review. *Yeast* 25, 465-483.
- La Placa, M., 2005. *Principi di Microbiologia Medica*. X Ed. Esculapio Editore, Bologna.
- Landry, C.R., Townsend, J.P., Hartl, D.L., Cavalieri, D., 2006. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology* 15, 575-591.
- Li, X., Zhao, L., Fan, Y., Jia, Y., Sun, L., Ma, S., Ji, C., Ma, Q., Zhang, J., 2014. Occurrence of mycotoxins in feed ingredients and complete feeds obtained from the Beijing region of China. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5, 37.
- Lima, G., Spina A., Castoria, R., De Curtis, F., De Cicco, V., 2005. Integration of biocontrol agents and food-grade additives for enhancing protection of stored apples from *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection* 10, 2012-2241.
- Lima, G., De Cicco, V., 2009. In: De Cicco V., Bertolini P., Salerno M.G., *Patologia postraccolta dei prodotti vegetali*. Piccin, cap. 5-6.
- Linde, T., Zoglowek, M., Lübeck, M., Frisvad, J.C., Lübeck, P.S., 2016. The global regulator *LaeA* controls production of citric acid and endoglucanases in *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43, 1139-1147.

- Lindner, W., 1996. Decontamination and detoxification of cereals contaminated with mycotoxins. US Patent number 5498431.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y., 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology* 167(2), 153-160.
- Liu, P., Cheng, Y., Yang, M., Liu, Y., Chen, K., Long, C.A., Deng, X., 2014. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiology* 14, 242.
- Lodder, J., 1970. *The yeasts, a taxonomic study*, 2nd Ed. North-Holland Publishing, Amsterdam.
- Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C.K., Harman, G.E., 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Phytopathology* 140,623-629.
- Maaroufi, K., Achour, A., Hammami, M., El May, M., Betbeder, A., Ellouz, F., Creppy, E., Bacha, H., 1995. Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Human & Experimental Toxicology* 14, 609-614.
- MacDonald, S.J., Langton, S., Brereton, P.A., 2001. Assessment of human exposure to Ochratoxin A in the UK-relationship between dietary intake and plasma and urine levels. In: De Koe, W.J., Samson, R.A., van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M., *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*, Eds.; IUPAC: Wageningen, The Netherlands. Volume 1, pp. 181-188.
- Machado, A., 2006. *Tecnologie chimico-agrarie*, Poseidonia.
- Maffei, M.E., Gertsch, J., Appendino, G., 2011. Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Product Reports* 28, 1359-1380.
- Magan, N., 2006. Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia* 162(3), 245-53.

- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Roubal, T., 2012. Ochratoxin A exposure biomarkers in the Czech Republic and comparison with foreign countries. *Biomarkers* 17, 577-589.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., Toman, J., 2016. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins* 8(7), 191.
- Manners, J.G., 1993. Invasion of the host plant and damage to host tissues. In: *Principles of plant pathology*. Second Edition. Cambridge University Press.
- Mari, M., Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., 2016. Decay control in the postharvest system: role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology* 122, 70-81.
- Marquardt, R.R., and Frohlich, A.A., 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* 70, 2968-3988.
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M., 2005. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast* 22, 1133-1142.
- Masoud, W., Kaltoft, C.H., 2006. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology* 106, 229-234.
- Matta, A., 1996. *Fondamenti di patologia vegetale*. Pàtron Editore, Bologna.
- Meca, G., Blaiotta, G., Ritieni, A., 2010. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* 21, 579-583.
- Micco, C., Ambruzzi, M.A., Miraglia, M., Brera, C., Onori, R., Benelli, I., 1991. Contamination of human milk with Ochratoxin A. In: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N., Bartsch, H. Eds., *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*, vol. 115. IARC Scientific Publications, Lyon, France, pp. 105-108.

- Migheli, Q., 2001. Genetically modified biocontrol agents: environmental impact and risk analysis. *Journal of Plant Pathology* 83, 47-56.
- Milićević, D.R., Škrinjar, M., Baltić, T., 2010. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins* 2(4), 572-592.
- Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E., Prillinger, H., 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 661-671.
- Morath, S.U., Hung, R., Bennett, J.W., 2012. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26, 73-83.
- Moruno, E.G., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., Di Stefano, R., 2005. Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 73-76.
- Neshiem, S., 1969. Isolation and purification of ochratoxins A and B and preparation of their methyl and ethyl esters. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 52, 975-983.
- Nigro, F., Ippolito A., Lima G., 2009. In: De Cicco V., Bertolini, P., Salerno, M.G. *Patologia postraccolta dei prodotti vegetali*. Ed. Piccin, cap. 6.
- Nuñez, C., Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I., 2002. Postharvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology* 92, 247-255.
- Oguz, H., Parlat, S.S., 2004. Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis. *South African Journal of Animal Science* 34, 144-148.
- Osborne, B.G., Ibe, F., Brown, G.L., Petagine, F., Scudamore, K.A., Banks, J.N., Hetminski, M.T., Leonard, C.T., 1996. The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Additives & Contaminants* 13, 141-153.

- Pagano, L., Cairra, M., Candoni, A., Offidani, M., Fianchi, L., Martino, B., Pastore, D., Picardi, M., Bonini, A., Chierichini, A., Fanci, R., Caramatti, C., Invernizzi, R., Mattei, D., Mitra, M.E., Melillo, L., Aversa, F., Van Lint, M.T., Falcucci, P., Valentini, C.G., Girmenia, C., Nosari, A., 2006. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Hemathologica* 91, 1068-75.
- Pani, G., Scherm, B., Azara, E., Balmas, V., Jahanshiri, Z., Carta, P., Fabbri, D., Dettori, M.A., Fadda, A., Dessi, A., Dallochio, R., Migheli, Q. & Delogu, G., 2014. Natural and natural-like phenolic inhibitors of type B trichothecene in vitro production by the wheat (*Triticum* sp.) pathogen *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(22), 4969-4978.
- Pani, G., Dessi, A., Dallochio, R., Scherm, B., Azara, E., Delogu, G., & Migheli, Q., 2016. Natural phenolic inhibitors of trichothecene biosynthesis by the wheat fungal pathogen *Fusarium culmorum*: A computational insight into the structure-activity relationship. *PLoS One* 11(6), e0157316.
- Papurello, D., Soukoulis, C., Schuhfried, E., Cappellin, L., Gasperi, F., Silvestri, S., Santarelli, M., Biasioli, F., 2012. Monitoring of volatile compound emissions during dry anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste by Proton Transfer Reaction Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Bioresource Technology* 126, 254-265.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology* 47, 85-92.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G., 2017. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology* 63, 191-198.
- Park, D.L. and Troxell, T.C., 2002. US perspective on mycotoxin regulatory issues. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 277-286.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U.Ä., Schnürer, J., 2006. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS yeast research* 6, 3-13.

- Peraica, M., Domijan, A.M., Jurjevic, Z., Cvjetkovic, B., 2002. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 53, 229-237.
- Pérez de Obanos, A., Gonzalez-Penas, E., Lopez de Cerain, A., 2005. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. *Food Additives & Contaminants* 22, 463-471.
- Petersson, S., Schnurer, J., 1995. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1027-1032.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I., Castegnaro, M., 2002. Balkan Endemic Nephropathy and associated Urinary tract tumours: A review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives & Contaminants* 19, 282-302.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 61-99.
- Pimenta, R.S., Morais, P.B., Rosa, C.A., Corrèa, A., 2009. Utilization of yeasts in biological control programs. In: Satyanarayana, T., Kunze, G., *Yeast Biotechnology, Diversity and Applications*, Eds.; Springer Science, pp. 199-214.
- Piotrowska, M., Zakowska, Z., 2000. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. In *Progress in Biotechnology (Food Biotechnology)*; Bielecki, S., Tramper, J., Polak, J., Eds; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. Vol. 17, pp. 307-310.
- Piper P., Ortiz Calderon, C., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* 147, 2635-2642.
- Pohland, A.E., Schuller, P.L., Steyn, P.S., van Egmond, H.P., 1982. Physico-chemical data for some selected mycotoxins. *Pure and Applied Chemistry* 54, 2219-2228.

- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcero, A., Chulze, S., 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 151, 70-77.
- Raju, M.V.L.N., Devegowda, G., 2002. Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: Evaluation of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator. *Asian Australas. Journal of Animal Science* 15, 1051-1056.
- RASFF, Food and Feed Safety Alerts, 2009. http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm. Attenti alla salute dei consumatori, da ben 30 anni, European Commission, 40 pp. http://ec.europa.eu/dgs/health_foodsafety/information_sources/docs/fs/rasff30_booklet_it.pdf (consultato il 19.7.2016).
- Refai, M.K., 1988. Aflatoxins and aflatoxicosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 48, 1-19.
- Reynolds, T.B., Fink, G.R., 2001. Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878-881.
- Richter, S.S., Galask, R.P., Messer, S.A., Hillis, R.J., Diekema, D.J., Pfaller, M.A., 2005. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2155-62.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of Ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* 159, 18-46.
- Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Larondelle, Y., 2007. In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology* 98, 1812-1821.
- Robinson, D., & Conroy, J.P., 1998. A possible plant-mediated feedback between elevated CO₂, denitrification and the enhanced greenhouse effect. *Soil Biology and Biochemistry* 31(1), 43-53.

- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Justesenb, M.F., & Córdoba, J.J., 2011. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology* 149, 226-235.
- Romano, A., Capozzi, V., Spano, G., Biasioli, F., 2015. Proton transfer reaction-mass spectrometry: online and rapid determination of volatile organic compounds of microbial origin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3787-3795.
- Rosenkranz, H.S., Carr, H.S., Rose, H.M., 1965. Phenethyl alcohol. I. Effect on macromolecular synthesis of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 89, 1354-1369.
- Santos, L., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2009. Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 1802-1807.
- Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Mohnl, M., Täubel, M., Loibner, A.P., Braun, R., Binder, E.M., 2003. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin Research* 19, 124-128.
- Scherm, B., Ortu G., Muzzu A., Budroni M., Arras, G., Migheli Q., 2003. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology* 85, 205-213.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E., Kubicek, C.P., 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4364-4370.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., Lawrence, G.A., Daley, E.F., Farber, J.M., 1995. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Additives & Contaminants* 12, 31-40.
- Scott, P.M., 1996. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food Additives & Contaminants* 13, 19-21.

- Scott, P., 2005. Biomarkers of human exposure to Ochratoxin A. *Food Additives & Contaminants* 22, 99-107.
- Sinha, K.K., 1998. Detoxification of mycotoxins and food safety. *Mycotoxins in agriculture and food safety* 381-405.
- Skaug, M., Helland, I., Solvoll, K., Saugstad, O., 2001. Presence of Ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Additives & Contaminants* 18, 321-327.
- Smith, J.E., Lewis, C.W. & Anderson, J.G., 1994. Mycotoxins in human nutrition and health. European Comm, Directorate.-General XII. Science, Research and Development, EUR 16048 EN.
- Soto, J., Ruiz, M., Manyes, L., Juan-García, A., 2016. Blood, breast milk and urine: Potential biomarkers of exposure and estimated daily intake of Ochratoxin A: A review. *Food Additives & Contaminants. Part A Chem. Anal. Control. Expo Risk. Assess.*
- Sprague, G.F.Jr., Winans, S.C., 2006. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes & Development* 20, 045-1049.
- Stefanović, V., Polenaković, M., 1991. Balkan nephropathy. Kidney disease beyond the Balkans? *American Journal of Nephrology* 11, 1-11.
- Sterflinger, K., 2010. Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* 24(1), 47-55.
- Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y., & Stewart, A., 2003. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 31(4), 281-291.
- Strobel, G.A., Dirkse, E., Sears, J., Markworth, C., 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 47, 2943- 2950.
- Suwannarach, N., Bussaban, B., Hyde, K.D., Lumyong, S., 2010. *Muscodor cinnamon*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. *Mycotaxon* 114, 15-23.
- Tabata, H, 2004. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. In: Zhong, J.J., Ed. Biomanufacturing. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-23.

- Tata, A., Casaccia, C.R., 2001. Stato e prospettive delle tecnologie di irraggiamento in campo alimentare. *Rivista della Tecnologie Alimentari*.
- Tibayrenca, P., Preziosi-Belloya L., Rogerb J.M., Ghommidha C., 2010. Assessing yeast viability from cell size measurements? *Journal of Biotechnology* 149, 74-80.
- Turner, P., Flannery, B., Isitt, C., Ali, M., Pestka, J., 2012. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutrition Research Reviews* 25, 162-179.
- Turner, W.B., 1971. Fungal Metabolites. Academic Press, New York.
- Ueno, Y., 1987. Mycotoxins. In: Toxicological Aspect of Food. Ed., Miller K. Elsevier, London pp.139-204.
- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., 1965. Mycotoxins Part II. The constitution of Ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal of the Chemical Society* 204, 7083-7088.
- Van Egmond, H., Schothorst, R., Jonker, M., 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 147-157.
- van Elsas, J.D., Migheli, Q., 1999. Evaluation of risks related to the release of biocontrol agents active against plant pathogens. In: Albajes, R., Gullino, M.L., van Lenteren, J.C., Elad, Y. Eds., *Integrated pest and disease management in greenhouse crops*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 377-393.
- van Walbeek, W., Scott, P.M., Harwig, J., Lawrence, J.W., 1969. *Penicillium viridicatum* Westling: A new source of Ochratoxin A. *Canadian Journal of Microbiology* 15, 1281-1285.
- Van Wees, S.C.M., Van Der Ent, S., Pieterse, C.M.J., 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biology* 11(4), 443-448.
- Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, K., Vagvolgyi, C., 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 99, 321-328.

- Veglio, F., Esposito, A., Riverberi, A.P., 2002. Copper adsorption on calcium alginate beads: equilibrium pH-related models. *Hydrometallurgy* 65, 43-57.
- Verstraete, F., 2006. Decision-making process and overview of recent and future European Union legislation on mycotoxins in food and feed. In: Barug, D., Bhatnagar, D., Egmond, H.P., van Kamp, J.W., van der Osenbruggen, W.A., Visconti A., Ed., *The Mycotoxin Factbook: Food & Feed Topics*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B., 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5639-5641.
- Vinale, F., Sivasithamparan, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M., 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1-10.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M., 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives & Contaminants* 25, 193-202.
- Wafa, E., Yahya, R., Sobh, M., Eraky, I., El-Baz, M., El-Gayar, H., Betbeder, A., Creppy, E., 1998. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: A preliminary study. *Human & Experimental Toxicology* 17, 124-129.
- Wang, Q., Narita, J., Xie, W., Ohsumi, Y., Kusano, K., Shirai, Y., & Ogawa, H.I., 2002. Effects of anaerobic/aerobic incubation and storage temperature on preservation and deodorization of kitchen garbage. *Bioresource Technology* 84(3), 213-220.
- Wang, Y., Yuan, Y., Liu, B., Zhang, Z., & Yue, T., 2016. Biocontrol activity and patulin-removal effects of *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides* and *Agrobacterium tumefaciens* against *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology* 121(5), 1384-1393.

- Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26, 379-407.
- Werner, S., Polle, A., Brinkmann, N., 2016. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 8651-8665.
- Wheatley, R.E., Ritz, K., Griffiths, B.S., 1997. Application of an augmented nitrification assay to elucidate the effects of a spring barley crop and manures on temporal variations in rates. *Biology and Fertility of Soils* 24, 378-383.
- WHO Multicentre Growth Reference Study Group, 2006. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatrica Supplementum* 450, 76-85.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B., 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39, 309-17.
- Wolf, K., Breunig, K., Barth, G., 2003. Non conventional yeasts in genetics, biochemistry, and biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Worapong, J., Strobel, G.A., Ford, E.J., Li, J.Y., Baird, G., Hess, W.M., 2001. *Muscodor albus* anam. nov. an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon* 79, 67-79.
- World Health Organization, 2002. Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Report Series 906, pp. 62.
- World Health Organization, 2011. Evaluation of Certain Contaminants in Food. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Reports Series 959.

World Health Organization, 2013. Evaluation of certain contaminants in food. Eighty-third report of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Geneva, WHO Technical Report Series 1002.

World Health Organization, Memorandum, 1965. The Endemic Nephropathy of South-eastern Europe. *Bull. World Health Organ* 32, 441-448.

Wu, F., 2006. A tale of two commodities: How EU mycotoxin regulations have hurt, or helped, food industries. In: *Proceedings of the Fourth Conference*, Cincinnati, OH, USA, November 6-8.

Wuster, A., Babu, M.M., 2009. Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. *Molecular BioSystems* 6(1), 134-141.

Xiao, H., Madhyastha S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kemppainen, B.W., 1996. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137, 182-192.

Xiao, H., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Ling Y.Z., 1995. Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 524-530.

Yan, H., Zhang, H., Wang, Q., Jian, H., Qiu, X., Wang, J., Tang, K., 2011. Isolation and identification of a putative scent-related gene RhMYB1 from rose. *Molecular Biology Reports* 38, 4475-4482.

Yiannikouris, A., Andre, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P., 2006. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules* 7, 1147-1155.

Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z., Shapley, N.C., 2013. Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 425, 31-41.

Zhu, Y., Hassan Y.I., Watts, C., Zhou, T., 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients - A review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology* 216, 19-29.