

# Utjecaj mikotoksina na feermentacijsku aktivnost bakterija mliječne kiseline

---

Vrdoljak, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:846257>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

**Josipa Vrdoljak**

6901/BT

**UTJECAJ MIKOTOKSINA NA  
FERMENTACIJSKU AKTIVNOST BAKTERIJA  
MLIJEČNE KISELINE**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 3

Mentor: izv.prof.dr.sc. Jasna Mrvčić

Zagreb, 2017

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### UTJECAJ MIKOTOKSINA NA FERMENTACIJSKU AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

*Josipa Vrdoljak, 6901/BT*

**Sažetak:** Toksično djelovanje mikotoksina, osim na čovjeka, životinje i biljke, dokazano je i u mikroba, a najčešće kroz smanjenje aktivnosti i inhibiciju rasta. Cilj rada bio je istražiti utjecaj mikotoksina na fermentacijsku aktivnost bakterija mliječne kiseline, jednih od najvažnijih industrijskih mikroorganizama. Ispitan je učinak mikotoksina aflatoksina i zearalenona na slijedeće bakterije mliječne kiseline: *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Pediococcus pentosaceus* i *Leuconostoc mesenteroides*. Tijekom rasta praćena je optička gustoća stanica i pH vrijednost te su na kraju fermentacije određene koncentracije metabolita bakterija mliječne kiseline. Iz dobivenih rezultata može se uočiti da su mikotoksini utjecali samo na rast bakterije *P. pentosaceus*, a nije zabilježen njihov utjecaj na fermentacijsku aktivnost niti jedne ispitivane bakterije što se može objasniti razgradnjom mikotoksina u stanici ili vezanjem mikotoksina na staničnu stjenku čime se sprečava ulazak mikotoksina u stanicu i njegovo inhibitorno djelovanje.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, fermentacija, mikotoksini

**Rad sadrži:** 28 stranica, 13 slika, 8 tablica, 33 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Jasna Mrvčić

**Pomoć pri izradi:** mag. ing. Karla Hanousek Čiča, asistent

**Datum obrane:** 28. lipnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University Undergraduate studies Biotechnology**

**Department of food technology engineering**

**Laboratory for technology of fermentation and yeasts**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Biotechnology**

### **THE EFFECT OF MYCOTOXIN ON FERMENTATION ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA**

*Josipa Vrdoljak, 6901/BT*

**Abstract:** The toxic effects of mycotoxins, except humans, animals and plants, have also been demonstrated in microbes and most often through decreased activity and growth inhibition. The aim of the study was to investigate the effect of mycotoxins on fermentation activity of lactic acid bacteria, one of the most important industrial microorganisms. The effects of mycotoxins aflatoxin and zearalenone were tested on the following lactic acid bacteria: *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. During bacterial growth, optical cell density and pH value were monitored, and at the end of the fermentation concentration of metabolites of lactic acid bacteria are measured. From the obtained results, it can be seen that mycotoxins only influenced the growth of *P. pentosaceus* and had no influence on the fermentation activity of any of the investigated bacteria, which can be explained by the degradation of mycotoxins in the cell or by the binding of mycotoxins to the cell wall, which is preventing the entrance of mycotoxins into cell and their inhibitory activity.

**Keywords:** fermentation, lactic acid bacteria, mycotoxins

**Thesis contains:** 28 pages, 13 figures, 8 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Jasna Mrvčić, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Mag. ing. Karla Hanousek Čiča, Assistant

**Defence date:** June 28<sup>th</sup> 2017

## **SADRŽAJ:**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.UVOD</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>2.TEORIJSKI DIO</b> .....  | <b>2</b>  |
| 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....  | 2         |
| 2.2. MIKOTOKSINI .....  | 3         |
| 2.2.1. AFLATOKSIN .....   | 4         |
| 2.2.2. ZEARALENON .....   | 5         |
| 2.3. MIKOTOKSINI U HRANI .....  | 6         |
| <b>3.EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....  | <b>2</b>  |
| 3.1. MATERIJALI .....   | 9         |
| 3.1.1. Proizvodni mikroorganizmi .....  | 9         |
| 3.1.2. Mikotoksini .....  | 9         |
| 3.1.3. Hranjiva podloga .....   | 9         |
| 3.2. METODE .....   | 10        |
| 3.2.1. Određivanje metabolita mliječno-kisele fermentacije HPLC metodom ..... | 10        |
| 3.2.2. Određivanje koncentracije glukoze enzimskom (PAP) metodom .....        | 12        |
| 3.2.3. Praćenje rasta BMK mjerenjem optičke gustoće .....                     | 13        |
| 3.2.4. Određivanje pH vrijednosti .....                                       | 14        |
| <b>4.REZULTATI I RASPRAVA</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | <b>25</b> |

## **1.UVOD**

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine grupu nesporogenih, gram-pozitivnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim do isključivo anaerobnim uvjetima. Nalaze se u hrani (mliječni proizvodi, fermentirano meso, fermentirano povrće, probiotički proizvodi itd.), na biljkama, u otpadnim vodama, ali i u genitalnom i intestinalnom traktu ljudi i životinja. Bakterije mliječne kiseline tradicionalno se koriste kao industrijski mikroorganizmi koji imaju GRAS (eng. Generally Regarded As Safe) status. Njihova široka primjena u biotehnološkoj industriji za konzerviranje većine fermentiranih namirnica temelji se na razgradnji ugljikohidrata iz kojih se proizvode krajnji proizvodi primarnog metabolizma (mliječna kiselina, octena kiselina, etanol itd.) i bakterijska biomasa. Osim ovih metabolita BMK još proizvode manju količinu ostalih međuprodukata: diacetila, acetoina, acetona, acetaldehida, te maslačnu, propionsku, mravlju kiselinu i druge spojeve koji utječu na svojstvenu aromu fermentiranih namirnica. Tu vrstu mliječno kisele fermentacije provode bakterije iz rodova *Streptococcus*, *Pediococcus* i različite vrste iz roda *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Tijekom mliječno kisele fermentacije pojedinih sirovina BMK mogu biti izložene djelovanju mikotoksina. Žitarice, orašasti plodovi i mlijeko su sirovine koje često sadrže plijesni. Neke vrste plijesni (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* itd.) proizvode mikotoksine kao svoje sekundarne metabolite. Mikotoksini su termostabilni spojevi, koji se razaraju na temperaturama od 250-300 °C, a koji se ne koriste u prehrambenoj industriji. Stoga, sirovine u kojima su dokazane plijesni, potencijalni producenti mikotoksina, nose određeni zdravstveni rizik za zdravlje potrošača. Primjer sirovina s mikotoksinima su recimo mlijeko i kiselo tijesto. Bakterije mliječne kiseline su dominantne u kiselom tijestu pa reologija, okus, miris i nutritivne karakteristike kruha proizvedenog uz pomoć kiselog tijesta ovise o njihovoj aktivnosti. BMK koje se koriste u pripremi kiselog tijesta potječu iz samih žitarica, kontaminacije pekarskog kvasca ili same mlinarske i pekarske industrije. Za proizvodnju fermentiranih mlijeka upotrebljavaju se mljekarske kulture, najčešće sastavljene od bakterija mliječne kiseline. Ovdje se uloga BMK odnosi na njihovu sposobnost acidifikacije mlijeka, tvorbu okusa i oblikovanja teksture proizvoda. Drugim riječima, stvoreni produkti u fermentiranom mlijeku rezultat su biokemijskih oksido-redukcijskih reakcija razgradnje organskih spojeva uz oslobađanje energije, koje kataliziraju mikrobni enzimi iz sastava kulture. Životinje (krave, ovce, koze) koje konzumiraju hranu zaraženu mikotoksinima (krmiva, kukuruz itd.) daju mlijeko kontaminirano mikotoksinima.

S obzirom na prisutnost mikotoksina u navedenim sirovinama cilj ovog rada bio je ispitati u kojoj mjeri prisustvo ispitivanih mikotoksina u hranjivoj podlozi utječe na rast i fermentacijsku aktivnost korištenih BMK.

## **2.TEORIJSKI DIO**

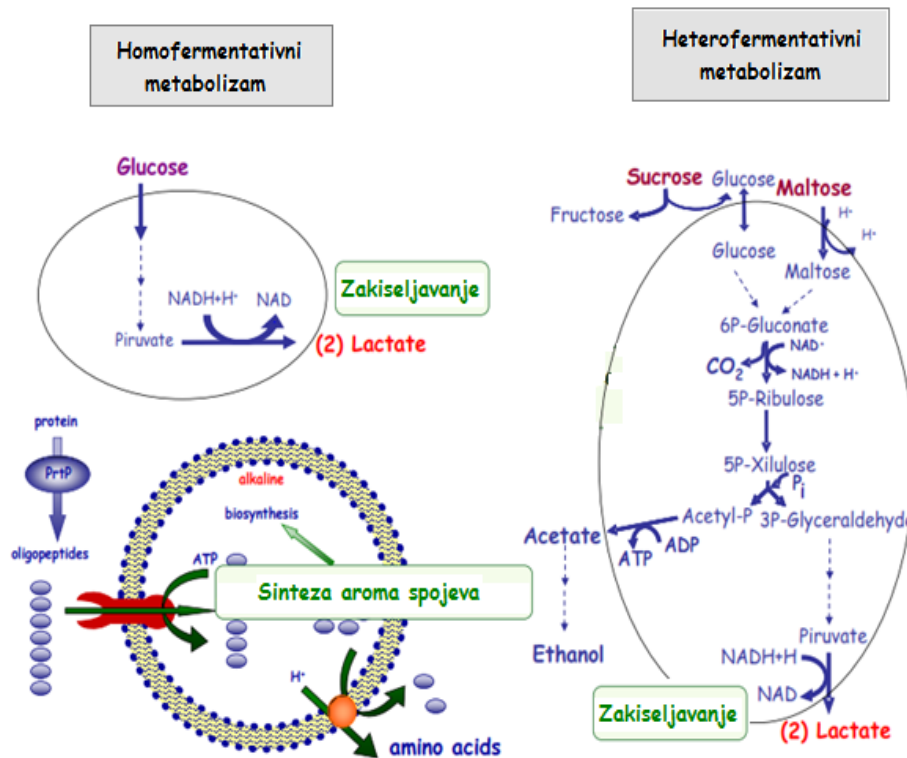


## 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) vjerojatno su najrasprostranjenija skupina bakterija povezana s čovjekom. Prirodno su povezane s mukoznim površinama (usna šupljina, gastrointestinalni i genitalni sustav čovjeka i životinja), prirodna su populacija hrane (mlijeko, meso, vino) i biljaka (voća, povrća i žitarica). BMK čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. To su industrijski vrlo važni mikroorganizmi koji imaju presudnu ulogu u fermentaciji mliječnih proizvoda, mesa, povrća, vina, kave, kakaa i silaže. Osim nekoliko patogenih vrsta roda *Streptococcus*, većina vrsta BMK pripada neškodljivim korisnim bakterijama. Karakterizira ih GRAS status (engl. Generaly Regarded As Safe) (Samaržija, 2015).

Pojam „bakterije mliječne kiseline“ skupni je naziv za oko 50 različitih vrsta bakterija koje su klasificirane u ove rodove: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium*.

BMK energiju dobivaju fermentacijom ugljikohidrata, a većina saharida i oligosaharida transportira se u stanicu uz pomoć specifičnih permeaza te se fosforiliraju unutar stanice pomoću ATP-ovisnih kinaza. Za razgradnju heksoza, BMK koriste glikolizu ili Embden-Meyerhof-Parnasov put i 6-fosfolukonat/fosfoketolazni put. S obzirom na način kojim fermentiraju heksoze, BMK se dijele u dvije grupe (slika 1): homofermentativne bakterije (jedini proizvod razgradnje izvora ugljika je mliječna kiselina) i heterofermentativne bakterije (osim mliječne kiseline nastaju i drugi proizvodi metabolizma npr. etanol, octena kiseline i CO<sub>2</sub>)(Šušković, 1996).



Slika 1. Metabolizam šećera i proteina u stanicama BMK (Gobbetti i Gänzle, 2013)

## 2.2. MIKOTOKSINI

Mikotoksini (gr. *mykes* – gljiva, gr. *toxicon* – otrov) su sekundarni metaboliti plijesni vrlo različite strukture s različitim biološkim učincima. Sintetiziraju se u nizu reakcija kataliziranih enzimima od velikog broja biokemijski jednostavnih međuprodukata primarnog metabolizma. Mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac izravnom ili neizravnom kontaminacijom. U izravnoj kontaminaciji, prehrambeni materijal (sirovina) je osnova rasta toksikogene plijesni (gotovo sve namirnice mogu biti podloge za rast plijesni u tijeku njihove proizvodnje, prerade, transporta i skladištenja). Nasuprot tome, neizravna će se kontaminacija pojaviti kada su dodaci namirnicama kontaminirani mikotoksinima (Duraković i Duraković, 2000). Niske su molekularne mase, ne sudjeluju u primarnom metabolizmu plijesni i nemaju određenu metaboličku funkciju pri njihovom rastu i razvoju. Primarni metabolizam uobičajen je za većinu vrsta plijesni, dok je tvorba sekundarnih metabolita ovisna o vrsti i soju plijesni te njenim genetskim osobinama. Biosinteza sekundarnih metabolita plijesni nastaje i kao odgovor na okolišne uvjete, odnosno fizikalno-kemijske

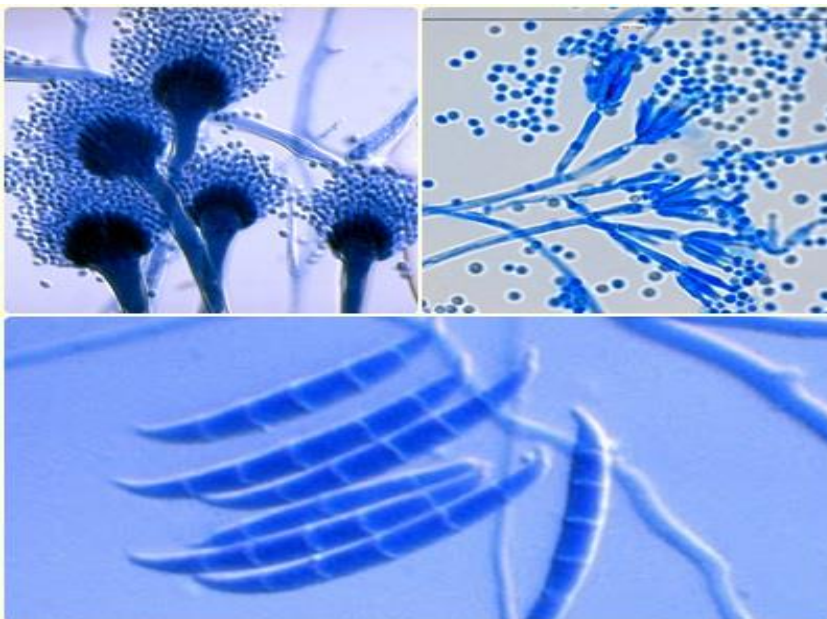
parametre (količina slobodne vode-  $a_w$ , temperatura, količina kisika, sastav i pH supstrata) (Yiannikouris i Jouany, 2002).

Mikotoksini, kao česti onečišćivači hrane, uz brojne značajne štete u gospodarstvu, uzročnici su različitih bolesti, najčešće putem hrane, rjeđe respiratornim putem. Bolesti koje uzrokuju su mikotoksikoze. Prisutnost mikotoksina u hrani (žitaricama) poznata je više od tisuću godina, ali tek u posljednjih četrdesetak godina, razvojem tehnologije izoliraju se i identificiraju pojedini toksini. Istraživanja mikotoksina i bolesti koje uzrokuju potaknula je izolacija toksičnog spoja iz plijesni *Aspergillus flavus* 1960. godine u Velikoj Britaniji. Tom prilikom uginulo je 100 000 purana od nepoznate bolesti nazvane „X disease“. Kao uzročnik toksikoze identificirana je molekula nazvana aflatoksin.

Od dvjestotinjak do sada poznatih mikotoksina, najznačajniji su: aflatoksini ( $AFB_1$ ,  $AFM_1$ ), okratoksini (OTA), zearalenon (ZEA, F-2), fumonizini ( $FB_1$ ,  $FB_2$ ), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (HAH, 2013.).

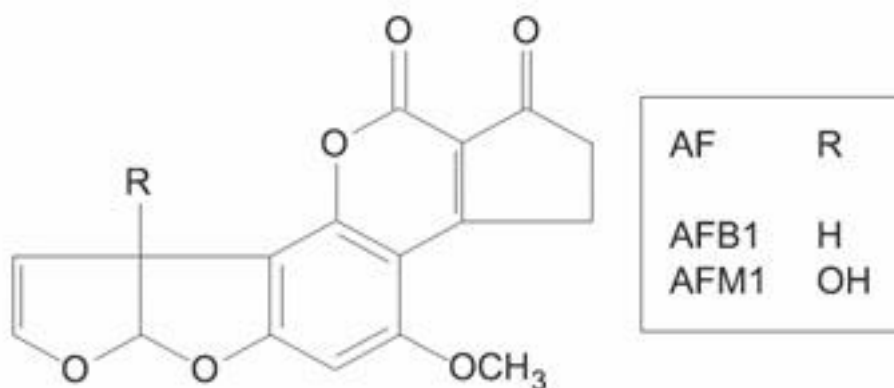
### 2.2.1. AFLATOKSIN

Aflatoksine sintetizira ograničeni broj sojeva plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (slika 2). Predstavljaju smjesu kemijski srodnih spojeva među kojima su najvažniji predstavnici aflatoksini  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $M_1$  i  $M_2$  (slika 3). Oznake B i G obilježavaju boju kojom, pri određenoj valnoj duljini UV- svjetla, aflatoksini fluoresciraju (eng. B-Blue, plavo; G-Green, zeleno), a M prema supstratu (eng. milk, mlijeko) iz kojeg su izolirani (Prasanna i sur., 1975).



**Slika 2.** Mikroskopski snimak plijesni *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Perši i sur.,2011)

Toksično djelovanje aflatoksina se očituje na nivou interakcije sa genetskim materijalom. Molekula aflatoksina prodire u stanicu, a zatim ulazi između baznih parova DNK. Ubačena molekula aflatoksina u velikoj mjeri usporava proces prenošenja informacije DNK. Često se stvaraju greške u transkripciji DNK, a posljedica toga je inhibicija sinteze proteina, tj. sintetiziraju se "pogrešni" proteini.



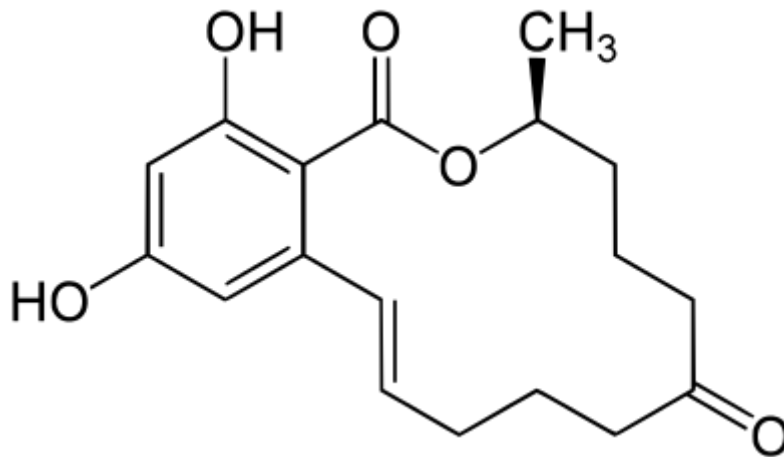
**Slika 3.** Strukturne formule aflatoksina B1 i M1 (HAH, 2013.)

### 2.2.2. ZEARALENON

Zearalenon (ZEA) ili F-2 toksin je prirodni metabolit nekoliko vrsta plijesni iz roda *Fusarium* i to najčešće *F. graminearum*, *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum* i *F. moniliforme* (Mirocha i sur., 1974). Nema sumnje da se ekološki uvjeti za biosintezu mikotoksina bitno razlikuju od sveopćih uvjeta, pa bujan rast toksikogene plijesni nije nužno povezan i sa biosintezom tog toksina. Rezultati istraživanja mnogih autora upućuju da je period niskih temperatura, odnosno naizmjenično smjenjivanje niskih i viših temperatura nužno za sintezu strukture zearalenona, jer se enzimi koji omogućavaju biosintezu F-2 toksina aktiviraju pri nižim temperaturama. Pripada grupi fitoestrogena i do sada je identificirano 15 različitih derivata koji posjeduju različitu biološku aktivnost. Imaju konfiguraciju sličnu estrogenim supstancama (estradiol, estriol i stilbestrol).

Zearalenon ( $C_{18}H_{22}O_5$ , slika 4) je bijeli kristal s molnom masom  $318,36 \text{ g mol}^{-1}$  i talištem  $164\text{-}165 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dobro je topiv u eteru, benzenu, kloroformu, metilkloridu, etilacetatu, acetonitrilu i alkoholu, slabo je topljiv u petroleteru, dok je u vodi, ugljikdioksidu i ugljiktetrakloridu netopljiv. Zearalenon je stabilan spoj, pa se tijekom skladištenja/mljevenja i

prilikom prerade/kuhanja hrane pri visokim temperaturama ne raspada. Glavni je kontaminant kukuruza (slika 5), ali se može naći na pšenici, zobi, riži, ječmu, u kruhu, grahu i u sijenu (Christensen, 1965; Okoye, 1986; Jimenez i sur.,1997).



**Slika 4.** Strukturna formula zearalenona (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>) (Kašaj, 2011.)



**Slika 5.** Kukuruz kontaminiran plijesni *Fusarium* (Poljoprivreda i selo)

### 2.3. Mikotoksini u hrani

Tijekom mliječno kisele fermentacije pojedinih sirovina BMK mogu biti izložene djelovanju mikotoksina. Žitarice, kao i začini, sjemenke uljarica, orašasti plodovi i mlijeko su sirovine koje često sadrže plijesni koje proizvode mikotoksine.

Žitarice i proizvodi od žitarica (brašno) vrlo su pogodne sirovine za rast plijesni. Oko 25 % svjetske proizvodnje žitarica kontaminirano je sa mikotoksinima. Same plijesni mogu rasti na plodovima prije žetve, nakon žetve, tijekom procesiranja i skladištenja. Time se i tvorba mikotoksina, koja već započne u polju, nastavlja u skladištima gdje toksikogene plijesni ili počinju ili nastavljaju proizvoditi svoje metabolite. To se događa pogotovo ako se skladište žitarice s oštećenim zrnjem ili brašnastim naslagama loma ili kada se skladište u prostorima sa starim urodom. Najčešći mikotoksini pronađeni u žitaricama su aflatoksini, okratoksin A, fumonizini i zearalenon od kojih je najtoksičniji aflatoksin. Ministarstvo zdravlja 2012. godine iznijelo je Pravilnik (NN 146/2012) o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani čime je iznešena i najveća dopuštena količina sadržaja aflatoksina u hrani (zbroj aflatoksina B1, B2, G1 i G2) kao i najveći dopušteni sadržaj aflatoksina B1 koji je daleko najtoksičniji sastojak. Prema navedenom Pravilniku aflatoksin je reguliran za sve žitarice i proizvode od žitarica, uključujući prerađene proizvode na bazi žitarica te najveća dopuštena količina B1 aflatoksina iznosi  $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a zbroja B1, B2, G1 i G2 aflatoksina  $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Za prerađenu hranu na bazi žitarica i hranu za dojenčad i malu djecu najveća dopuštena količina B1 aflatoksina je  $0,10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Bilandžić i sur., 2013).

U mlijeku, kao jednom od najčešće korištenih prehrambenih proizvoda na dnevnoj bazi također možemo naći mikotoksine. Najučestaliji mikotoksin u mlijeku je aflatoksin M1. Životinje (krave, ovce, koze) koje konzumiraju hranu zaraženu mikotoksinima (krmiva, kukuruz itd.) daju mlijeko kontaminirano mikotoksinima. Ako se koristi kontaminirana hrana, aflatoksin M1 će se pojaviti u mlijeku dva do tri dana nakon ingestije. Isto tako, dva do tri dana nakon primjene hranidbe bez aflatoksina dolazi do smanjenja koncentracija aflatoksina M1 u mlijeku (Pitet, 1998; Prandini i sur., 2009). Izloženost aflatoksinu M1 u ljudi (najviše su izloženi dojenčad i djeca) nastaje endogenom proizvodnjom ili unosom mliječnim proizvodima. Aflatoksin M1 je relativno stabilan spoj u sirovom i obrađenom mlijeku te na njegovo prisustvo ne utječe postupak pasterizacije ili prerade u sir. Prijenos aflatoksina od hrane do mlijeka u mliječnim krava je pod utjecajem prehrambenih i fizioloških čimbenika, uključujući i režim hranidbe, stupanj digestije, zdravlje životinja, biotransformacijski kapacitet jetre te proizvodnju mlijeka (Duarte i sur., 2013). Hladne i tople sezone utječu na zagađenje aflatoksinima time što su u proljeće i ljeto dostupne svježije namirnice za prehranu stoke kao što su ispaša, trava, korov i sirova hranjiva. U vrijeme hladnih mjeseci puno se češće koriste suha pripremljena hranjiva ili koncentрати. U hrvatskim ruralnim područjima česta je ishrana suhim sijenom koje nepravilnim skladištenjem uz neadekvatne uvjete može rezultirati pojavom aflatoksikotvornih plijesni, a time i zagađenje hranjiva toksinima (Kamkar, 2005.). U

Hrvatskoj je Ministarstvo zdravlja izdalo Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012.) prema europskoj direktivi 466/2001/EC (EC, 2001). Najveća dopuštena količina (NDK) za aflatoksin M1 za sirovo mlijeko, toplinski obrađeno mlijeko i mlijeko za proizvodnju mliječnih proizvoda je  $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Za hranu za dojenčad te mlijeko za posebne medicinske potrebe namijenjeno posebno dojenčadi NDK je  $0,025 \mu\text{g kg}^{-1}$  aflatoksina M1.

### **3.EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Proizvodni mikroorganizmi

Ispitivan je utjecaj mikotoksina na fermentacijsku aktivnost bakterija mliječne kiseline pri čemu su korištene BMK: *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus* uzete iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, te *Lactobacillus plantarum* B i *Lactobacillus plantarum* K1 uzete iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

#### 3.1.2. Mikotoksini

Za provedbu eksperimenta korištena su dva mikotoksina, svaki u dvije koncentracije (Tablica 1).

**Tablica 1.** Mikotoksini i njihove koncentracije ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

| koncentracija | AFLATOKSIN | ZEARALENON |
|---------------|------------|------------|
| 1             | 20         | 75         |
| 2             | 10         | 50         |

#### 3.1.3. Hranjiva podloga

Za uzgoj inokuluma BMK te ispitivanje utjecaja mikotoksina na fermentacijsku aktivnost BMK korištena je Man-Rogosa-Sharpe (MRS) podloga (De Man i sur., 1960) čiji je sastav prikazan u tablici 2.

**Tablica 2.** Sastav MRS podloge

| sastojak                 | $\text{g L}^{-1}$ | sastojak                                  | $\text{g L}^{-1}$ |
|--------------------------|-------------------|---|-------------------|
| Glukoza                  | 20                | $\text{NH}_4$ -citrat                     | 2                 |
| Mesni ekstrakt           | 10                | Na-acetat                                 | 2                 |
| Kazein hidrolizat        | 10                | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,05              |
| Kvašćev ekstrakt         | 10                | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,10              |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 5                 | Tween 80                                  | 1                 |

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje metabolita mliječno-kisele fermentacije HPLC metodom

Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) (slika 6) predstavlja vrstu kromatografije koja ima velike mogućnosti razdvajanja najsloženijih smjesa. Mobilna faza je tekućina, a stacionarna faza je čvrsta tvar (porozna ili granulirana) ili tekućina (tanki film vezan na čvrsti inertni nosač). Visokoučinkovita tekućinska kromatografija korištena je za određivanje koncentracija produkata mliječno-kisele fermentacije tijekom uzgoja BMK u MRS podlozi, prema modificiranoj metodi Lefebvre i suradnika (2002).

#### Priprema otopine standarda:

Standardi određenih koncentracija mliječne, octene i mravlje kiseline potrebni za izradu baždarnih pravaca, priređeni su razrjeđivanjem standardne otopine svakog pojedinog metabolita. Na dobivenim kromatogramima očitano je retencijsko vrijeme svakog metabolita te su iz ovisnosti površine ispod pikova o masenoj koncentraciji standarda nacrtani baždarni pravci i izračunate pripadajuće jednadžbe pravaca.

#### Priprema uzorka:

Prethodna obrada uzorka prije analize je neophodna da bi se postigla ekstrakcija organskih kiselina te da bi se iz uzorka uklonili proteini. 1 mL uzorka supernatanta dobivenog centrifugiranjem suspenzije bakterija je pomiješano i homogenizirano s vodom u odmjerne tikvici od 50 mL. U odmjernu tikvicu je zatim dodano 5 mL Carrez I otopine (kalij (II) – heksaferocijanit;  $0,085 \text{ mol L}^{-1}$ ) i 5 mL Carrez II otopine (cink sulfat;  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ) da bi se istaložili proteini. Homogenizacijom je ujednačen sadržaj u tikvici. Slijedi neutralizacija uzorka sa 0,1 M NaOH do pH 7,5-8,5. Volumen je nadopunjen do 50 mL destiliranom vodom i filtriran je cijeli sadržaj kroz standardni filter papir. Filtrat je nakon toga ponovo profiltriran kroz špricu sa filterom  $0,45 \mu\text{m}$ . Takav uzorak je spreman za injektiranje u HPLC kolonu.

#### Kromatografski uvjeti za određivanje organskih kiselina:

|                |  |
|----------------|--|
| Kromatograf:   | ProStarVarian 230  |
| Kolona:        | MetaCarb 87H, $300 \times 7,8 \text{ mm}$ (Agilent Technologies) |
| Pokretna faza: | 5 mM $\text{H}_2\text{SO}_4$ (protok $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ ) |
| Eluiranje:     | izokratno  |

Detektor: PhotodiodeArray ( $\lambda = 210 \text{ nm}$ )  
Temperatura kolone:  $60^\circ\text{C}$   
Vrijeme trajanja: 30 min  
Injektirani volumen:  $10 \mu\text{L}$

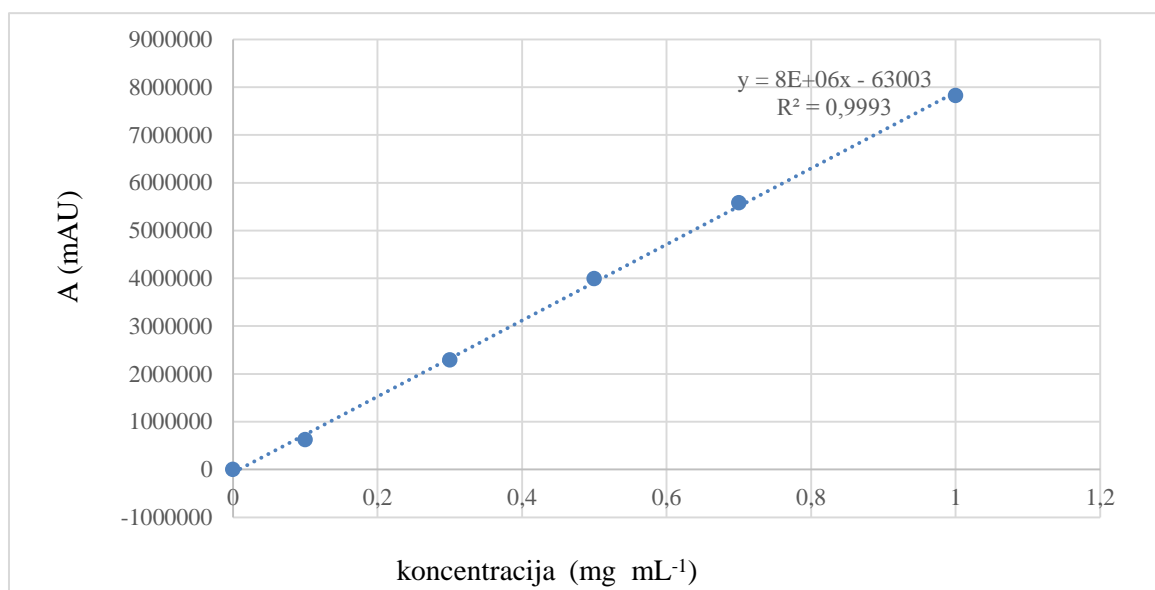
Identifikacija i kvantifikacija spojeva:

Identifikacija metabolita provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s vremenima zadržavanja standarda (tablica 3).

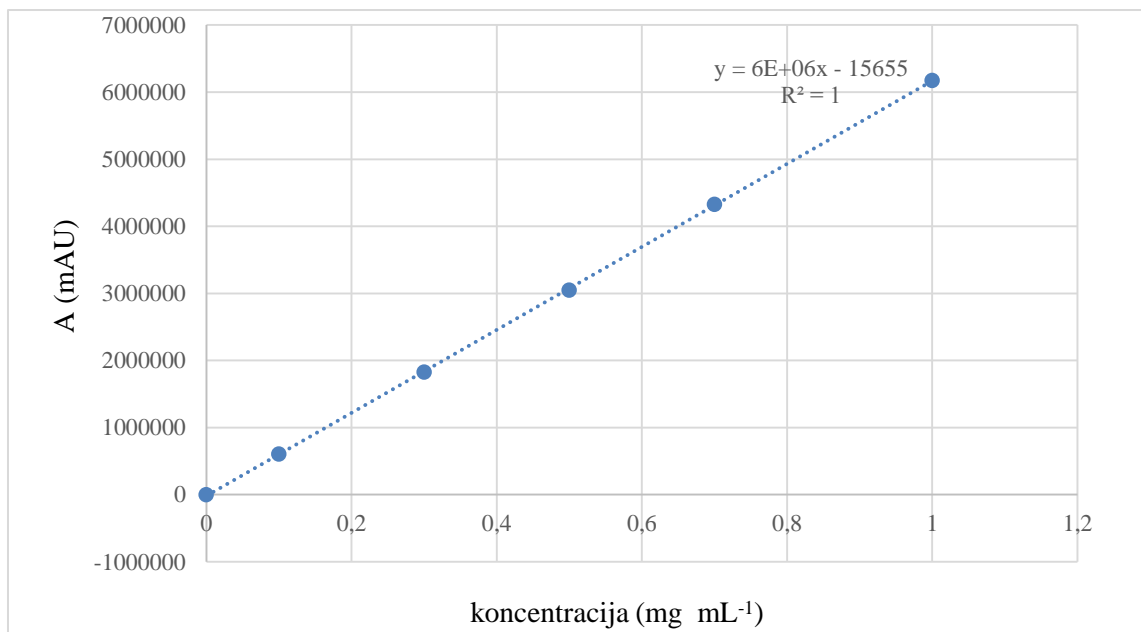
Kvantitativne vrijednosti pojedinačnih spojeva izračunate su iz jednadžbe baždarnih pravaca (slika 7 i slika 8).



**Slika 6.** Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (vlastita fotografija)



**Slika 7.** Baždarni dijagram mliječne kiseline



**Slika 8.** Baždarni dijagram octene kiseline

**Tablica 3.** Retencijska vremena praćenih metabolita na navedenoj koloni i pri navedenim uvjetima kromatografije

| Metaboliti        | Retencijsko vrijeme (min) |
|-------------------|---------------------------|
| Mliječna kiselina | 12,0                      |
| Octena kiselina   | 14,3                      |

### 3.2.2. Određivanje koncentracije glukoze enzimskom (PAP) metodom

Potrošnja glukoze kao osnovnog izvora ugljika u MRS podlozi je određivana na kraju uzgoja, prema glukoza-PAP metodi (Trinder, 1969). Načelo na kojem se zasniva PAP metoda je da glukoza-oksidadza (GOD) oksidira glukozu u glukonsku kiselinu, pri čemu nastaje vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Nastali  $H_2O_2$  uz peroksidazu (POD) oksidira bezbojni kromogen u obojeni spoj, a intenzitet boje razmjernan je koncentraciji glukoze u uzorku.

Za provođenje ekperimenta pripremljene su 3 otopine-slijepa proba, standard i uzorak. Za slijepu probu je otpipetirano 1 mL reagensa R1 (otopina 4-aminoantipirina (PAP)  $c = 0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ , glukoza-oksidadza (GOD)  $>15 \text{ kU L}^{-1}$ , peroksidaza (POD)  $>1,5 \text{ kU L}^{-1}$ , fenol  $c=0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ , fosfatni pufer (pH 7,5)  $c=0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) i 10  $\mu\text{L}$  deionizirane vode. Za

standard je otpipetirano 1 mL reagensa R1 i 10  $\mu\text{L}$  standarda (otopina glukoze,  $c = 5,55 \text{ mmol L}^{-1}$ ) i za uzorak je otpipetirano 1 mL reagensa R1 i 10  $\mu\text{L}$  našeg uzorka (nakon 24 sata djelovanja mikotoksina). Otopine su zatim ostavljene u termostatu 10 minuta na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon termostatiranja otopinama je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 500 nm i iz dobivenih apsorbancija izračunata je koncentracija glukoze u  $\text{g L}^{-1}$  prema formuli 1.

$$\gamma = \frac{A_{500} (\text{uzorak})}{A_{500} (\text{standard})} \quad [1]$$

### 3.2.3. Praćenje rasta BMK mjerenjem optičke gustoće

Za praćenje rasta BMK mjerenjem optičke gustoće u hranjivoj podlozi sa i bez mikotoksina korišten je UV/Vis spektrofotometar Unicam Hellos  $\beta$  (slika 9). Uzorci su iz Erlenmeyerovih tikvica preneseni u kivete promjera 10 mm, a optička gustoća određena je pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 600 nm (OD600) svakih 2 sata tijekom uzgoja. Apsorbancija suspenzije BMK bez mikotoksina postavljena je kao referentna vrijednost.



**Slika 9.** UV/Vis spektrofotometar Unicam Hellos  $\beta$  (vlastita fotografija)

### 3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Uzorcima izuzetim svakih 2 sata tijekom uzgoja BMK direktno je mjerena pH vrijednost s digitalnim pH-metrom (Schott Typ:CG 842) (slika 10).



**Slika 10.** pH-metar Schott Typ:CG 842 (vlastita fotografija)

## **4.REZULTATI I RASPRAVA**

Bakterije mliječne kiseline čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili anaerobnim uvjetima te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. To su industrijski vrlo važni mikroorganizmi koji se upotrebljavaju kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda. Tijekom mliječno kisele fermentacije pojedinih sirovina BMK mogu biti izložene djelovanju mikotoksina. Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti određenih vrsta plijesni i uglavnom se smatraju neizbježnim onečišćivačima hrane za ljude i životinje i predstavljaju veliki problem u cijelom svijetu.

Cilj rada bio je ispitati utjecaj mikotoksina (aflatoksina i zearalenona-svakog u dvije različite koncentracije) na rast i fermentacijsku aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline: *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* B i *Lactobacillus plantarum* K1.

Prilikom provedenog istraživanja tijekom 24 sata praćena je pH vrijednost te optička gustoća hranjive podloge fermentirane sa BMK uz prisustvo i bez prisustva mikotokisna aflatoksina i zearalenona, te su na kraju provođenja ekperimenta, nakon 24 sata uzgoja, određene koncentracije metabolita bakterija mliječne kiseline te koncentracija glukoze kao osnovnog izvora ugljika.

Kako je već spomenuto, s obzirom na način kojim fermentiraju heksoze, BMK se dijele u dvije grupe: homofermentativne bakterije (jedini proizvod razgradnje izvora ugljika je mliječna kiselina) i heterofermentativne bakterije (osim mliječne kiseline nastaju i drugi proizvodi metabolizma npr. etanol, octena kiseline i CO<sub>2</sub>). U tablici 4 prikazane su koncentracije metabolita (mliječne i octene kiseline) bakterija mliječne kiseline bez prisustva i uz prisustvo različitih koncentracija mikotoksina aflatoksina i zearalenona te koncentracija glukoze nakon 24 sata uzgoja. Rezultati su pokazali da navedeni mikotoksini u primjenjenim koncentracijama nemaju utjecaj na fermentacijsku aktivnost ispitanih BMK.



**Tablica 4.** Koncentracije metabolita bakterija mliječne kiseline bez prisustva i uz prisustvo različitih koncentracija mikotoksina aflatoksina i zearalenona nakon 24 sata

| BMK                     | Mikotoksin    | Mikotoksin koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Metaboliti                                |   |                                 |
|-------------------------|---------------|--|---|---|---------------------------------|
|                         |               |  | Mliječna kiselina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) | Octena kiselina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) | Glukoza ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) |
| <i>L. plantarum</i> K1  | Slijepa proba |  | 18,75                                     | 2,46                                    | 0,02                            |
|                         | aflatoksin    | 20   | 18,17                                     | 2,62                                    | 0                               |
|                         |               | 10   | 17,78                                     | 2,57                                    | 0,02                            |
|                         | zearalenon    | 75   | 17,96                                     | 2,50                                    | 0,02                            |
|                         |               | 50   | 17,28                                     | 2,55                                    | 0                               |
| <i>L. plantarum</i> B   | Slijepa proba |  | 17,15                                     | 2,20                                    | 0,018                           |
|                         | aflatoksin    | 20   | 17,47                                     | 2,29                                    | 0,002                           |
|                         |               | 10   | 17,62                                     | 2,27                                    | 0,028                           |
|                         | zearalenon    | 75   | 17,22                                     | 2,31                                    | 0,002                           |
|                         |               | 50   | 17,41                                     | 2,18                                    | 0,002                           |
| <i>L. mesenteroides</i> | Slijepa proba |  | 19,10                                     | 2,03                                    | 0,02                            |
|                         | aflatoksin    | 20   | 19,52                                     | 2,09                                    | 0,03                            |
|                         |               | 10   | 18,32                                     | 2,23                                    | 0,06                            |
|                         | zearalenon    | 75   | 19,01                                     | 1,97                                    | 0,04                            |
|                         |               | 50   | 18,28                                     | 2,12                                    | 0,03                            |
| <i>P. pentosaceus</i>   | Slijepa proba |  | 15,61                                     | 1,97                                    | 2,12                            |
|                         | aflatoksin    | 20   | 14,90                                     | 1,98                                    | 2,06                            |
|                         |               | 10   | 15,32                                     | 2,00                                    | 2,62                            |
|                         | zearalenon    | 75   | 15,19                                     | 2,00                                    | 2,35                            |
|                         |               | 50   | 15,10                                     | 1,93                                    | 2,33                            |

Mjerenjem pH vrijednosti hranjive podloge fermentirane s bakterijama mliječne kiseline bez dodatka i uz dodatak različitih koncentracija mikotoksina aflatoksina i zearalenona tijekom 24 sata vidi se da se one svakim daljnjim satom smanjuju (nema porasta ili stagnacije vrijednosti) što je zapravo normalno jer bakterije mliječne kiseline troše glukozu koju prevode u svoj glavni metabolit-mliječnu kiselinu koja snižava pH (tablica 5 i tablica 6). Prema ovim rezultatima pH vrijednosti vidi se da nije došlo do utjecaja mikotoksina na fermentacijsku aktivnost BMK.

**Tablica 5.** pH vrijednosti hranjive podloge fermentirane s bakterijama mliječne kiseline bez dodatka i uz dodatak različitih koncentracija mikotoksina aflatoksina tijekom 24 sata

| Vrijeme (h) | Mikotoksin    | Koncentracija mikotoksina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Bakterije mliječne kiseline |                       |                       |                         |
|-------------|---------------|---|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
|             |               |   | <i>L. plantarum</i> K1      | <i>L. plantarum</i> B | <i>P. pentosaceus</i> | <i>L. mesenteroides</i> |
| 0           | Slijepa proba |   | 6,37                        | 6,64                  | 6,66                  | 6,43                    |
|             | aflatoksin    | 20  | 6,41                        | 6,77                  | 6,73                  | 6,47                    |
|             |               | 10  | 6,4                         | 6,72                  | 6,65                  | 6,47                    |
| 2           | Slijepa proba |   | 6,31                        | 6,57                  | 6,62                  | 6,23                    |
|             | aflatoksin    | 20  | 6,39                        | 6,58                  | 6,62                  | 6,26                    |
|             |               | 10  | 6,36                        | 6,59                  | 6,61                  | 6,24                    |
| 4           | Slijepa proba |   | 6                           | 6,5                   | 6,41                  | 5,75                    |
|             | aflatoksin    | 20  | 6,05                        | 6,51                  | 6,42                  | 5,81                    |
|             |               | 10  | 5,94                        | 6,51                  | 6,42                  | 5,81                    |
| 6           | Slijepa proba |   | 5,19                        | 6,14                  | 5,77                  | 4,96                    |
|             | aflatoksin    | 20  | 5,28                        | 6,16                  | 5,91                  | 5,08                    |
|             |               | 10  | 5,22                        | 6,11                  | 5,9                   | 5,07                    |
| 8           | Slijepa proba |   | 4,61                        | 5,1                   | 5                     | 4,58                    |
|             | aflatoksin    | 20  | 4,67                        | 5,15                  | 5,11                  | 4,7                     |
|             |               | 10  | 4,62                        | 5,12                  | 5,04                  | 4,69                    |
| 10          | Slijepa proba |   | 4,27                        | 4,54                  | 4,66                  | 4,36                    |
|             | aflatoksin    | 20  | 4,28                        | 4,55                  | 4,7                   | 4,41                    |
|             |               | 10  | 4,27                        | 4,54                  | 4,72                  | 4,45                    |
| 24          | Slijepa proba |   | 4,03                        | 3,99                  | 4,17                  | 3,96                    |
|             | aflatoksin    | 20  | 4,04                        | 3,98                  | 4,17                  | 3,97                    |
|             |               | 10  | 4,02                        | 4,02                  | 4,16                  | 3,97                    |

**Tablica 6.** pH vrijednosti hranjive podloge fermentirane s bakterijama mliječne kiseline bez dodatka i uz dodatak različitih koncentracija mikotoksina zearalenona tijekom 24 sata

| Vrijeme<br>(h) | Mikotoksin    | Koncentracija<br>mikotoksina<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Bakterije mliječne kiseline |                          |                       |                         |
|----------------|---------------|---|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
|                |               |   | <i>L. plantarum</i><br>K1   | <i>L. plantarum</i><br>B | <i>P. pentosaceus</i> | <i>L. mesenteroides</i> |
| 0              | Slijepa proba |   | 6,37                        | 6,64                     | 6,66                  | 6,43                    |
|                | zearalenon    | 75  | 6,39                        | 6,69                     | 6,67                  | 6,44                    |
| 50             |               | 6,39  | 6,68                        | 6,66                     | 6,43                  |                         |
| 2              | Slijepa proba |   | 6,31                        | 6,57                     | 6,62                  | 6,23                    |
|                | zearalenon    | 75  | 6,35                        | 6,6                      | 6,62                  | 6,25                    |
| 50             |               | 6,34  | 6,59                        | 6,61                     | 6,23                  |                         |
| 4              | Slijepa proba |   | 6                           | 6,5                      | 6,41                  | 5,75                    |
|                | zearalenon    | 75  | 5,98                        | 6,51                     | 6,47                  | 5,81                    |
| 50             |               | 6   | 6,51                        | 6,47                     | 5,79                  |                         |
| 6              | Slijepa proba |   | 5,19                        | 6,14                     | 5,77                  | 4,96                    |
|                | zearalenon    | 75  | 5,25                        | 6,17                     | 5,99                  | 5,05                    |
| 50             |               | 5,21  | 6,18                        | 5,98                     | 5,06                  |                         |
| 8              | Slijepa proba |   | 4,61                        | 5,1                      | 5                     | 4,58                    |
|                | zearalenon    | 75  | 4,66                        | 5,15                     | 5,38                  | 4,62                    |
| 50             |               | 4,63  | 5,14                        | 5,19                     | 4,61                  |                         |
| 10             | Slijepa proba |   | 4,27                        | 4,54                     | 4,66                  | 4,36                    |
|                | zearalenon    | 75  | 4,3                         | 4,55                     | 4,89                  | 4,37                    |
| 50             |               | 4,39  | 4,51                        | 4,74                     | 4,38                  |                         |
| 24             | Slijepa proba |   | 4,03                        | 3,99                     | 4,17                  | 3,96                    |
|                | zearalenon    | 75  | 3,98                        | 4,01                     | 4,18                  | 3,96                    |
| 50             |               | 4,03  | 4,02                        | 4,18                     | 3,99                  |                         |

Kako bi se ispitaio utjecaj mikotoksina aflatoksina i zearalenona na rast ispitanih BMK tijekom rasta praćena je optička gustoća stanica (OD 600nm). Mjerenjem optičke gustoće (OD) hranjive podloge s bakterijama mliječne kiseline poraslim bez prisustva i uz prisustvo različitih koncentracija mikotoksina aflatoksina i zearalenona kroz 24 sata uzgoja vidi se da su oba mikotoksina utjecala samo na rast bakterije *Pediococcus pentosaceus* (tablica 7 i 8).

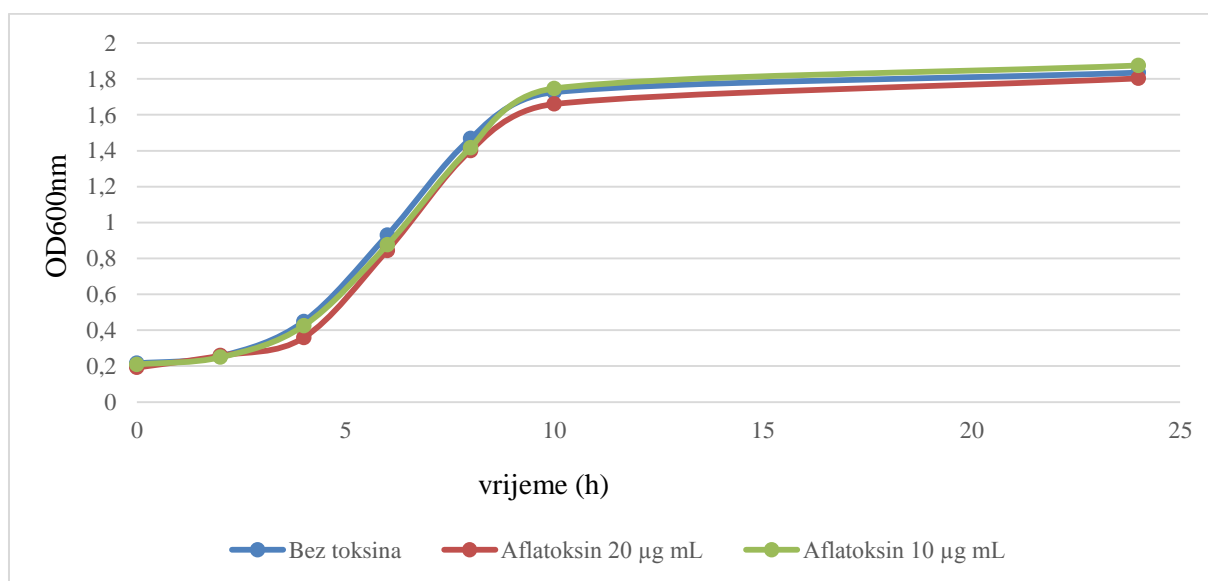
**Tablica 7.** Optička gustoća hranjive podloge s bakterijama mliječne kiseline poraslim bez prisustva i uz prisustvo različitih koncentracija mikotoksina aflatoksina kroz 24 sata uzgoja

| Vrijeme (h) | Mikotoksin    | Koncentracija mikotoksina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Bakterije mliječne kiseline |                       |                       |                         |
|-------------|---------------|---|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
|             |               |   | <i>L. plantarum</i> K1      | <i>L. plantarum</i> B | <i>P. pentosaceus</i> | <i>L. mesenteroides</i> |
| 0           | Slijepa proba |   | 0,354                       | 0,053                 | 0,215                 | 0,475                   |
|             | aflatoksin    | 20  | 0,365                       | 0,052                 | 0,192                 | 0,488                   |
|             |               | 10  | 0,354                       | 0,053                 | 0,209                 | 0,498                   |
| 2           | Slijepa proba |   | 0,334                       | 0,073                 | 0,255                 | 0,503                   |
|             | aflatoksin    | 20  | 0,335                       | 0,065                 | 0,258                 | 0,492                   |
|             |               | 10  | 0,347                       | 0,078                 | 0,249                 | 0,528                   |
| 4           | Slijepa proba |   | 0,538                       | 0,173                 | 0,448                 | 0,994                   |
|             | aflatoksin    | 20  | 0,562                       | 0,165                 | 0,359                 | 0,97                    |
|             |               | 10  | 0,66                        | 0,178                 | 0,425                 | 0,966                   |
| 6           | Slijepa proba |   | 1,274                       | 0,587                 | 0,929                 | 1,539                   |
|             | aflatoksin    | 20  | 1,306                       | 0,574                 | 0,844                 | 1,475                   |
|             |               | 10  | 1,311                       | 0,573                 | 0,875                 | 1,513                   |
| 8           | Slijepa proba |   | 1,767                       | 1,492                 | 1,468                 | 1,788                   |
|             | aflatoksin    | 20  | 1,772                       | 1,462                 | 1,401                 | 1,736                   |
|             |               | 10  | 1,795                       | 1,469                 | 1,417                 | 1,762                   |
| 10          | Slijepa proba |   | 2,007                       | 1,511                 | 1,726                 | 2,009                   |
|             | aflatoksin    | 20  | 1,998                       | 1,908                 | 1,66                  | 1,934                   |
|             |               | 10  | 1,977                       | 1,89                  | 1,747                 | 1,945                   |
| 24          | Slijepa proba |   | 2,356                       | 2,371                 | 1,835                 | 2,298                   |
|             | aflatoksin    | 20  | 2,356                       | 2,372                 | 1,803                 | 2,251                   |
|             |               | 10  | 2,367                       | 2,379                 | 1,875                 | 2,273                   |

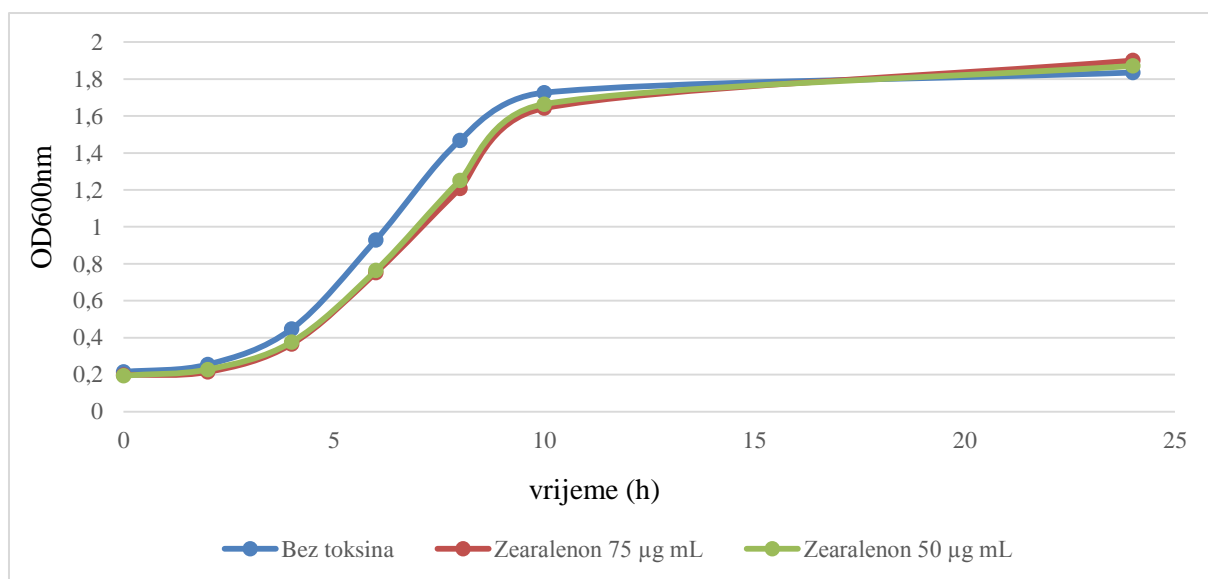
**Tablica 8.** Optička gustoća hranjive podloge s bakterijama mliječne kiseline poraslim bez prisustva i uz prisustvo različitih koncentracija mikotoksina zearalenona kroz 24 sata uzgoja

| Vrijeme (h) | Mikotoksin    | Koncentracija mikotoksina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Bakterije mliječne kiseline |                       |                       |                         |
|-------------|---------------|---|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
|             |               |   | <i>L. plantarum</i> K1      | <i>L. plantarum</i> B | <i>P. pentosaceus</i> | <i>L. mesenteroides</i> |
| 0           | Slijepa proba |   | 0,354                       | 0,053                 | 0,215                 | 0,475                   |
|             | zearalenon    | 75  | 0,347                       | 0,055                 | 0,198                 | 0,497                   |
|             |               | 50  | 0,389                       | 0,055                 | 0,195                 | 0,474                   |
| 2           | Slijepa proba |   | 0,334                       | 0,073                 | 0,255                 | 0,503                   |
|             | zearalenon    | 75  | 0,322                       | 0,073                 | 0,215                 | 0,517                   |
|             |               | 50  | 0,365                       | 0,065                 | 0,228                 | 0,513                   |
| 4           | Slijepa proba |   | 0,538                       | 0,173                 | 0,448                 | 0,994                   |
|             | zearalenon    | 75  | 0,559                       | 0,162                 | 0,366                 | 0,954                   |
|             |               | 50  | 0,605                       | 0,181                 | 0,377                 | 0,932                   |
| 6           | Slijepa proba |   | 1,274                       | 0,587                 | 0,929                 | 1,539                   |
|             | zearalenon    | 75  | 1,268                       | 0,57                  | 0,752                 | 1,471                   |
|             |               | 50  | 1,273                       | 0,515                 | 0,764                 | 1,441                   |
| 8           | Slijepa proba |   | 1,767                       | 1,492                 | 1,468                 | 1,788                   |
|             | zearalenon    | 75  | 1,728                       | 1,444                 | 1,208                 | 1,769                   |
|             |               | 50  | 1,738                       | 1,427                 | 1,251                 | 1,717                   |
| 10          | Slijepa proba |   | 2,007                       | 1,511                 | 1,726                 | 2,009                   |
|             | zearalenon    | 75  | 1,938                       | 1,893                 | 1,642                 | 2                       |
|             |               | 50  | 1,993                       | 1,904                 | 1,664                 | 1,961                   |
| 24          | Slijepa proba |   | 2,356                       | 2,371                 | 1,835                 | 2,298                   |
|             | zearalenon    | 75  | 2,362                       | 2,394                 | 1,9                   | 2,337                   |
|             |               | 50  | 2,336                       | 2,377                 | 1,871                 | 2,294                   |

Dobiveni rezultati za BMK *Pediococcus pentosaceus* oblikuju krivulje rasta bakterija (slika 11 i 12) te se mogu jasno uočiti pojedine faze rasta. Lag-faza odnosno faza suzdržanog rasta kod sva tri uzorka trajala je do 3.sata, nakon koje bakterija ulazi u eksponencijalnu (logaritamsku) fazu koja je trajala do 10.sata uzgoja i naposljetku ulaze u stacionarnu fazu. Kod uzoraka s dodanim mikotoksinom aflatoksinom vidi se da je bakterijski rast inhibiran od 4. do 8. sata eksperimenta za obe koncentracije mikotoksina, nakon čega se inhibicijski rast nastavlja samo u uzorku sa aflatoksinom u koncentraciji od  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  do 24-og sata tj. do kraja provođenja ekperimenta (slika 11). Kod uzoraka s dodanim mikotoksinom zearalenonom vidi se da je rast bakterijskih stanica inhibiran od 3. do 16. sata provođenja eksperimenta što kao rezultat ima nastajanje manje količine biomase (slika 12). Iz analiziranih rezultata vidi se da su bakterijske stanice *P. pentosaceus* i kod prisustva aflatoksina i kod prisustva zearalenona do kraja provedbe eksperimenta postigle istu koncentraciju biomase što objašnjava da su razvile određeni mehanizam adaptacije.



**Slika 11.** Krivulja rasta bakterije mliječne kiseline *Pentococcus pentosaceus* kroz 24 sata bez prisustva i uz prisustvo mikotoksina aflatoksina u dvije različite koncentracije

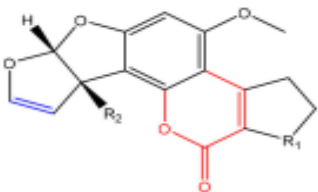
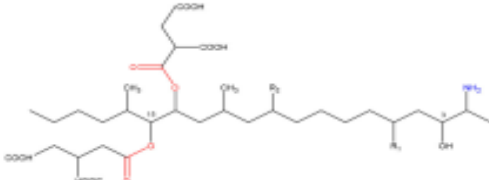
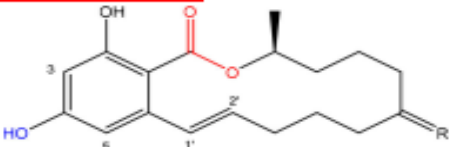
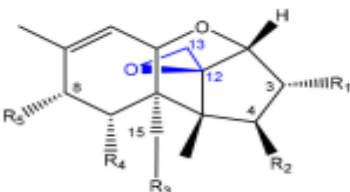


**Slika 12.** Krivulja rasta bakterije mliječne kiseline *Pentococcus pentosaceus* kroz 24 sata bez prisustva i uz prisustvo mikotoksina zearalenona u dvije različite koncentracije

Zašto tijekom provođenja eksperimenta nije došlo do djelovanja na fermentacijsku aktivnost BMK može se objasniti sa nekoliko mogućnosti. Prva mogućnost zbog koje nije došlo do inhibicije fermentacijske aktivnosti je ta da toksin nije ušao u stanicu pa tako nije mogao ni djelovati na metabolizam same bakterije. Druga mogućnost je da se toksin vezao na staničnu stjenku bakterijske stanice. Poznato je da kvasci i BMK imaju mogućnost vezanja različitih molekula, kao npr. metalnih iona i toksina, na vezujuće strukture na površini svoje stanične stjenke (Brady i sur., 1994; Bolognani i sur., 1997; Santos i sur., 2000). Razvijen je model koji predlaže da se mehanizam vezanja mikotoksina odvija u dva procesa, vezanje (adsorpcija) i otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice mikroorganizma. Tim je modelom ustanovljeno da su različite učinkovitosti različitih vrsta BMK da vežu mikotoksine povezane s brojem tih mjesta vezanja na površini stanice (Bueno i sur., 2006). Dva soja bakterija mliječnih kiselina (*Lactobacillus rhamnosus*, GG i LC-705), pokazala su sposobnost vezanja zearalenona i  $\alpha$ -zearalenola iz tekućeg medija. Te bakterije, tretirane visokom temperaturom i kiselinom, su uklonile zearalenon i  $\alpha$ -zearalenon što upućuje na to da su se toksini iz podloge uklonili mehanizmom vezanja, a ne metaboličkom aktivnošću bakterija (El-Nezami i sur., 2002). Isto tako, provedena istraživanja, upućuju na to da su peptidoglikani stanične stjenke odgovorni za vezanje toksina (Lahtinen i sur., 2004; Niderkorn, 2007). Baš ta sposobnost BMK da vežu toksine mogla bi u bliskoj budućnosti imati potencijalnu primjenu u uklanjanju mikotoksina iz hrane i organizma ljudi i životinja. Zadnja mogućnost nedjelovanja mikotoksina na fermentacijsku



aktivnost BMK je njihova razgradnja ili detoksikacija unutar bakterijske stanice. Pokazano je da neki mikroorganizmi proizvode enzime koji mogu promijeniti strukturu mikotoksina i/ili proteina koji mogu konjugirati ove spojeve, čineći ih manje toksičnima. Svaki mikotoksin u svojoj strukturi ima jednu ili više kemijskih grupa koje mu daju taj toksični učinak (aflatoksin-laktonski prsten i dvostruka veza u difuranskom prstenu, zearalenon-laktonski prsten i C-4 hidroksilna grupa) (slika 13), pa da bi došlo do razgradnje ili detoksikacije određenog mikotoksina potrebno je da dođe do promjene strukture molekule. Detoksikacija molekule aflatoksina nastaje kada je uklonjena dvostruka veza u difuranskom prstenu ili kada je laktonski prsten otvoren (Mishra i Das, 2003). To uzrokuje gubitak toksičnosti.

| Mycotoxin group   | Side groups   | Main toxic structural groups                          |
|---|---|---|
| <b>AFLATOXINS</b><br>     | $R_1 = \text{C=O, } -(C=O)-O- \text{ or } C-OH$<br>$R_2 = \text{H or OH}$   | Lactone ring<br>Double bond in difuran ring moiety    |
| <b>FUMONISINS</b><br>    | $R_1 = \text{H or OH}$<br>$R_2 = \text{H or OH}$  | Two tricarballic acid side chains<br>Free amino group |
| <b>ZEARALENONES</b><br>  | $R = \text{O or H, } \alpha-OH$<br>$1',2' = \text{trans or dihydro}$  | Lactone ring<br>C-4 hydroxyl group                    |
| <b>TRICHOHECENES</b><br> | $R_1 = \text{H or OH}$<br>$R_2 = \text{H, OH or OAc}$<br>$R_3 = \text{OH or OAc}$<br>$R_4 = \text{H or OH}$<br>$R_5 = \text{H, OH, } =O,$<br>$-O-(C=O)-CH_2-CH-(CH_3)_2 \text{ or}$<br>$-O-(C=O)-CH_2-COH-(CH_3)_2$ | Epoxide group<br>Acylated side groups                 |

**Slika 13.** Strukturne formule mikotoksina sa njihovim toksičnim komponentama unutar molekule (Vanhoutte i sur., 2016)

## **5. ZAKLJUČAK**

Na temelju provedenog eksperimentalnog dijela te dobivenih i obrađenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Mikotoksini (aflatoksin- 10 i 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i zearalenon-50 i 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dodani u podlogu s bakterijama mliječne kiseline (*Lactobacillus plantarum* K1, *Lactobacillus plantarum* B, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*) kroz 24 sata nisu djelovali na fermentacijsku aktivnost BMK što se može objasniti degradacijom mikotoksina u stanici ili vezanjem mikotoksina na staničnu stjenku stanice čime se sprečava ulazak mikotoksina u stanicu i njegovo inhibitorno djelovanje.

2. Mikotoksini (aflatoksin- 10 i 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i zearalenon-50 i 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dodani u podlogu s bakterijom mliječne kiseline *Pediococcus pentosaceus* kroz 24 sata djelovali su inhibicijski na njen rast što se može vidjeti na temelju dobivenih krivulja rasta.

## **6. LITERATURA**

Bilandžić N., Varenina I., Božić Đ., Sedak M., Đokić M., Solomun Kolanović B., Cvetnić Ž. (2013) Aflatoxin M1 u mlijeku i mliječnim proizvodima. *Veterinarska stanica* **3**: 196-198.

Bolognani F., Rumney C. J., Rowland I. R. (1997) Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vitro mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology* **35**: 535-545.

Brady D., Stoll A. D., Strake L., Duncan J. R. (1994) Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **44**: 297-302.

Bueno D. J., Casale C. H., Pizzolitto R. P., Salano M. A., Olivier G. (2006) Physical Adsorption of Aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. *Journal of Food Protection* **70**, 2148–2154.

Christensen C. M. (1965) Fungi in cereal grains and their products. U: Mycotoxins in food stuffs, Vol. I, Wogan G. N., ur., MIT Press., Cambridge, Mass. str. 9-14.

De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* **23**: 130-135.

Duarte S. C., Almeida A. M., Teixeira A. S., Pereira A. L., Falcao A. C., Pena A., Lino C. M. (2013) Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control* **30**: 411–417.

Duraković S., Duraković L. (2000) Specijalna mikrobiologija, Durieux, Zagreb.

EC (2001): Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **L77**: 1-13.

El-Nezami H. S., Polychronaki N., Salminen S., Mykkänen H. (2002) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3545–3549.

Gobbetti M., Gänzle M. (2013) Handbook on Sourdough Biotechnology, Springer US, str. 200.

HAH (2013) Hrvatska agencija za hranu,

[https://www.hah.hr/arhiva/index\\_potrosacki.php?id=900](https://www.hah.hr/arhiva/index_potrosacki.php?id=900) Pristupljeno 30. svibnja 2017.

- Jiménez M., Huerta T., Mateo R. (1997) Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from bananas. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 364-369. *Journal of Applied Bacteriology* **23**: 130-135.
- Kamkar A. (2005) A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* **16**: 593–599.
- Kašaj A. (2011) Određivanje zearalenona Elisa metodom. Diplomski rad.
- Lahtinen S. J., Haskard C. A., Ouwehand A. C., Salminen S. J., Ahokas J. T. (2004) Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants* **21**: 158–164.
- Lefebvre D., Gabriel V., Vayssier Y., Fontagne-Faucher C. (2002) Simultaneous HPLC determination of sugars, organic acids and ethanol in sourdough process. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **35**: 407-414.
- Mirocha C. J., Christensen C. M. (1974) Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. U: *Mycotoxins*, Purchase I. F. H., ur., Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam Ch. str. 129-148.
- Mishra H. N., Das C. (2003) A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **43**: 245-264.
- Niderkorn V. (2007) Activites de biotransformation et de séquestration des fusariotoxines chez les bactéries fermentaires pour la détoxification des ensilages de maïs. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand-Theix, France.
- Okoye Z. S. C. (1986) Zearalenone in native cereal beer brewed in jos metropolis of Nigeria. *Journal of Food Safety* **7**: 233-239.
- Perši N., Pleadin J., Vulić A., Zadavec M., Mitak M. (2011) Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. *Veterinarska stanica* **4**: 336.
- Pittet A. (1998): Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds- An updated review. *Revue de médecine vétérinaire* **149**: 479–492.
- Poljoprivreda i selo, <<http://poljoprivredaiselo.com/2009/10/plijesnivost-klipova-kukuruzna/>> Pristupljeno 30. svibnja 2017.
- Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva G. (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* **47**: 984–991.

Prasanna H., Gupta S., Viswanathan L., Venkitasubramanian T. (1975) Fluorescence changes of aflatoxin B1 and G1. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **159**: 319-32

Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2012) *Narodne novine* **146** (NN 146/2012).

Samaržija D. (2015) Fermentirana mlijeka, Hrvatska mljekarska udruga, str.45.

Santos A., Marquina D., Leal J. A., Peinado J. M. (2000) (1-6)- $\beta$ -D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1809-1813.

Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Trinder P. (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* **6**: 24-27.

Vanhoutte I., Audenaert K., De Gelder L. (2016) Biodegradation of Mycotoxins: Tales from Known and Unexplored Worlds. *Frontiers in Microbiology* **7**: 3.

Yiannikouris A., Jouany J. P. (2002) Mycotoxins in feeds and their fate in animals. *Animal Research* **51**: 81 – 99.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Josipa Vrdoljak*

---