

# Utjecaj odabranih sojeva kvasaca na sintezu okratoksina A

---

**Gradečki, Laura**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:159:796217>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Laura Gradečki**

7892/PT

**UTJECAJ ODABRANIH SOJEVA KVASACA NA SINTEZU  
OKRATOKSINA A**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Mikrobiologija**

**Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov**

**Zagreb, 2021.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za Biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof.dr.sc. Ksenije Markov, uz pomoć Željka Jakopovića mag.ing.techn.aliment.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### Utjecaj odabranih sojeva kvasaca na sintezu okratoksina A

Laura Gradečki, 0178113026

**SAŽETAK:** Neke vrste plijesni imaju pozitivno djelovanje pa se mogu koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Štetan utjecaj plijesni očituje se u tvorbi toksičnih spojeva. Toksikotvorne vrste plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* tijekom svojeg rasta sintetiziraju sekundarne metabolite, mikotoksine. Oni već u malim količinama predstavljaju zdravstveni rizik za ljude i životinje, a jedan od najznačajnijih mikotoksina je okratoksin A. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj odabranih sojeva kvasaca na sintezu okratoksina A, kojeg sintetiziraju plijesni *Aspergillus carbonarius* i *Penicillium nordicum*. Za kvalitativno određivanje prisutnosti okratoksina A u uzorcima micelija plijesni korištena je metoda tankoslojne kromatografije (TLC). Ova se metoda pokazala brzom, jednostavnom i jeftinom za provođenje analize. Dobiveni rezultati pokazuju da neki odabrani sojevi kvasaca inhibiraju sintezu okratoksina A iz plijesni *Aspergillus carbonarius* 408 tijekom 28 dana uzgoja pri 25 °C.

**Ključne riječi:** kvasci, okratoksin A, tankoslojna kromatografija, toksikotvorne plijesni

**Rad sadrži:** 32 stranice, 6 slika, 5 tablica, 53 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u :** Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof.dr.sc. Ksenija Markov

**Pomoć pri izradi:** Željko Jakopović, mag.ing.techn.aliment.

**Datum obrane:** srpanj, 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### **Influence of selected yeast strains on ochratoxin A synthesis**

**Laura Gradečki, 0178113026**

**Abstract:** Some moulds have positive impact, so they can be used in food and pharmaceutical industry. The harmful effect of moulds manifests in the formation of toxic compounds. During their growth, toxicogenic fungi from the genus *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* synthesize secondary metabolites, mycotoxins. Even in small quantities they pose risk to human and animal health, such as ochratoxin A. The aim of this study was to examine the effect of yeast on the synthesis of ochratoxin A, which is synthesized by *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium nordicum*. Thin layer chromatography (TLC) was used as a method to qualitatively determine the presence of ochratoxin A in samples. This method proved to be quick, easy and inexpensive. The obtained results show that some selected strains of yeast inhibit the synthesis of ochratoxin A from the mold *Aspergillus carbonarius* 408 during 28 days of cultivation at 25 °C.

**Key words:** ochratoxin A, thin layer chromatography, toxicogenic moulds, yeasts

**Thesis contains:** 32 pages, 6 pictures, 5 tables, 53 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:** prof.dr.sc. Ksenija Markov

**Technical support and assistance:** Željko Jakopović, mag.ing.techn.aliment.

**Defence date:** July, 2021.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Kvasci .....	2
2.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	2
2.1.2. <i>Saccharomyces bayanus</i> .....	2
2.1.3. <i>Saccharomyces uvarum</i> .....	3
2.1.4. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	3
2.1.5. <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	3
2.1.6. <i>Pichia guilliermondii</i> .....	4
2.2. Plijesni .....	4
2.2.1. Rod <i>Aspergillus</i> .....	4
2.2.2. Rod <i>Penicillium</i> .....	6
2.3. Okratoksin A (OTA) .....	7
2.4. Tankoslojna kromatografija (TLC) .....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. Materijali .....	11
3.1.1. Mikroorganizmi .....	11
3.1.2. Hranjive podloge .....	11
3.1.3. Kemikalije .....	12
3.1.4. Mikotoksin .....	12
3.1.5. Pribor i aparatura .....	12
3.2. Metode rada .....	13
3.2.1. Priprema kultura kvasaca .....	13
3.2.2. Priprema kultura plijesni .....	13
3.2.3. Kvalitativno određivanje sintetiziranog okratoksina A metodom tankoslojne kromatografije (TLC) .....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	16
4.1. Rezultati .....	16
4.2. Rasprava .....	22
5. ZAKLJUČCI .....	25
6. POPIS LITERATURE .....	26

## 1. UVOD

Većina živežnih namirnica može biti kontaminirana plijesnima i može sadržavati određene potencijalno opasne tvari kao što su mikotoksini. Mikotoksine je ponekad nemoguće izbjeći jer mogu biti prirodni sastojci hrane ili se radi o tvarima koje su dodane u hranu ili su posljedica kontaminacije hrane. Prisutnost mikotoksikogenih plijesni i/ili mikotoksina u hrani, potencijalno je opasno za zdravlje ljudi pa je od iznimne važnosti kontrolirati njihovu prisutnost i količinu u hrani. Budući da velik broj plijesni može sintetizirati mikotoksine, a da je još uvijek premalo podataka pod kojim uvjetima dolazi do njihove biosinteze, potrebno je iznaći sva moguća rješenja koja će spriječiti rast i sporulaciju plijesni i tako onemogućiti biosintezu mikotoksina.

Posljednjih godina istraživanja prevencije biosinteze mikotoksina usmjerena su na pronalaženje moguće alternative postojećim fizikalnim i kemijskim metodama, a jedna od metoda je primjena mikrobnih kultura kao što su bakterije i kvasci koje se često ističu kao prirodni biološki antagonisti prema plijesnima uzročnicima kvarenja i propadanja voća i povrća.

Primjena kvasca ima velik potencijal u smanjenju ekonomske štete uzrokovane toksikotvornim plijesnima, jer neki kvasci mogu inhibirati rast plijesni i tako utjecati na smanjenje onečišćenja poljoprivrednih proizvoda mikotoksinima. U raznim tehnološkim procesima kvasci mogu imati izravan učinak na biosintezu mikotoksina neovisno o njihovom inhibitornom učinku na suzbijanje rasta plijesni (Pfliegler i sur., 2015).

Takvi antagonistički kvasci su obećavajuće zamjene kemijskim fungicidima za biokontrolu plijesni koje uzrokuju gubitke prije i nakon berbe/žetve kao i zamjena za razne anorganske mikofiksatore, jer nekoliko vrsta kvasca može akumulirati mikotoksine iz poljoprivrednih/prehrambenih proizvoda, čime ih učinkovito dekontaminira (Pfliegler i sur., 2015; Zhang i sur. 2020).

Stoga je cilj ovog rada bio dokazati da li toksikotvorne plijesni *Aspergillus carbonarius* i *Penicillium nordicum* sintetiziraju okratoksin A tijekom rasta u prisutnosti odabranih antagonističkih kvasaca.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kvasci

Kvasci su jednostanični, fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji se svrstavaju u carstvo gljiva (carstvo *Fungi*). Većina kvasaca razmnožava se vegetativno pupanjem, a budući da ne sadrže klorofil i ne provode fotosintezu, za njihov je rast potreban organski ugljik. Pronalazimo ih na koži i sluznicama životinja i ljudi kod kojih mogu izazvati oportunističke mikoze i gljivične infekcije. Kvasci imaju korisnu primjenu u brojnim industrijama pa se tako u prehrambenoj industriji koriste tijekom proizvodnje vina, piva i pekarskih proizvoda (posebice vrste iz roda *Saccharomyces*), a također se upotrebljavaju i u kemijskoj i farmaceutskoj industriji.

#### 2.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* je vrsta kvasca koja se zbog svoje mogućnosti prilagođavanja različitim uvjetima, brzog rasta te sekvenciranog genoma, dugačak niz godina koristi kao modelni organizam za proučavanje odvijanja brojnih bioloških procesa kod viših eukariota. Vrlo je dominantna vrsta upravo zbog svoje sposobnosti da u aerobnim uvjetima ne koristi respiratorni sustav za rast stanične biomase, već proizvodi etanol koji je toksičan za većinu preostalih mikroorganizama (Pronk i sur., 1996). *S. cerevisiae* uglavnom pronalazimo na deblima i lišću drveća te u vinogradima. Široku primjenu pronalazi u proizvodnji brojnih pekarskih proizvoda i alkoholnih pića kao što su: pivo, vino, rum, vodka i viski. Kod proizvodnje kruha, sojevi kvasca *S. cerevisiae* pridonose poboljšanju okusa i arome s obzirom da se najviše aromatskih spojeva stvara tijekom samog procesa pečenja kruha.

#### 2.1.2. *Saccharomyces bayanus*

*Saccharomyces bayanus* zajedno s *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* i *S. pastorianus* spada u *Saccharomyces sensu stricto* grupu. Ova vrsta raste na temperaturama do 35 °C te pokazuje mogućnost rasta u odsutnosti vitamina (Stewart, 2014). Njezinu primjenu najčešće pronalazimo u proizvodnji vina i piva, a također je pogodna za korištenje u pekarskoj industriji jer uzrokuje dizanje kiselog tijesta. U istraživanju koje su 1988. godine proveli Nabais i sur., ispitivano je kako koncentracija kalcija utječe na toleranciju kvasca *S. bayanus* prema etanolu



te kako se to odražava na njegovo provođenje alkoholne fermentacije. Utvrđeno je da optimalna količina kalcija povećava toleranciju *S. bayanus* na etanol što se u konačnici ima pozitivan učinak na provođenje alkoholne fermentacije.

### **2.1.3. *Saccharomyces uvarum***

Vrsta *Saccharomyces uvarum* se prethodno klasificirala kao *S. bayanus* za koju se smatralo da se može podijeliti u dvije podskupine, od kojih je jedna *uvarum*. Sojevi *S. uvarum* široko su rasprostranjeni u prirodi te ne rastu na temperaturama iznad 37 °C (Pulvirenti i sur., 2000). Kao i ostale vrste koje pripadaju rodu *Saccharomyces*, *S. uvarum* provodi alkoholnu fermentaciju, samo pri nešto nižim temperaturama te višim koncentracijama glicerola i jantarne kiseline (González Flores i sur., 2017).

### **2.1.4. *Kluyveromyces marxianus***

*Kluyveromyces marxianus* je aerobna vrsta kvasca koja spada u hemiascomicete te sadrži gen koji je odgovoran za razgradnju laktoze na glukozu i galaktozu. Za razliku od *S. cerevisiae* ova vrsta nema sposobnost fermentacije šećera u etanol, ali može ga proizvesti na supstratima koji su obogaćeni šećerom. Energiju stvara kombinacijom fermentacije i disanja, što je zajednička karakteristika svih hemiascomiceta. Primjenu u industriji, ponajviše u području biotehnologije, pronalazi zbog mogućnosti rasta na povišenim temperaturama, brzog rasta te sekrecije enzima. Enzimi koji se najviše izlučuju su pektinaze koje se koriste kod proizvodnje voćnih sokova.

### **2.1.5. *Hanseniaspora uvarum***

*Hanseniaspora uvarum* također pripada skupini hemiascomiceta. Uglavnom ga je moguće pronaći na zrelom voću poput banana i grožđa (Morais i sur., 1995; Spencer i sur., 1992). U velikoj mjeri može biti izoliran iz različitih fermentiranih pića, a također je zastupljen kod fermentacije kaka i kave (Batista i sur., 2015; Masoud i sur., 2004). U industriji je posebice bitan zbog svoje sposobnosti suzbijanja rasta plijesni koje uzrokuju truljenje voća. Istraživanja provedena na jagodama nakon berbe dokazala su da *H. uvarum* sprječava pojavu

bolesti izazvane prisutnošću sive plijesni *Botrytis cinerea* te da hlapljivi spojevi koje proizvodi, inhibiraju rast plijesni te produljuju rok upotrebe jagoda (Cai i sur., 2015; Quin i sur., 2017).

### **2.1.6. *Pichia guilliermondii***

*Pichia guilliermondii* pripada grupi flavinogenskih kvasaca. Uslijed nedostatka željeza ova vrsta ima sposobnost sinteze riboflavina, a neki od njezinih sojeva mogu konvertirati ksilozu u ksilitol (Sibirny i Boretsky, 2009). Zbog sposobnosti sinteze riboflavina često se koristi u istraživanjima vezanim uz njegov aktivni transport u stanicu i izvan nje te za proučavanje enzima koji se sintetiziraju za vrijeme nedostatka željeza. Jedno od istraživanja kojim je dokazano da *P. guilliermondii* smanjuje mogućnost pojave bolesti koje uzrokuju patogeni na voću i povrću nakon berbe je ono Zhanga i sur. (2011). Rezultati su pokazali da soj kvasca *P. guilliermondii* koji je korišten na jabukama smanjuje pojavu bolesti koju uzrokuje plijesan *B. cinerea*.

## **2.2. Plijesni**

Plijesni su sveprisutni mikroskopski organizmi koji također pripadaju carstvu gljiva. Građene su od hifa, stanica koje su uglavnom bezbojne, mogu biti različitih oblika te njihovim umrežavanjem nastaje micelij, koji može biti zračni ili vegetativni. Neke vrste plijesni upotrebljavaju se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji gdje imaju najveću upotrebu zbog proizvodnje antibiotika i enzima. Toksikotvorne vrste plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* sintetiziraju mikotoksine, sekundarne metabolite, koji već u malim koncentracijama predstavljaju opasnost za životinje i ljude (Golinski i sur., 2009; Marin i sur., 2013; Antonissen i sur., 2014).

### **2.2.1. Rod *Aspergillus***

Rod *Aspergillus* jedan je od najpoznatijih i najistraživanijih rodova plijesni, a prvog ga je 1729. godine proučio Pier Antonio Micheli te mu dodijelio naziv. Naziv je dobiven promatranjem mikroskopskim preparata čija je struktura Michelija podsjećala na aspergillum – predmet kojeg su rimokatolici koristili za škropljenje svete vode (Baker i Bennet, 2010).

Plijesni roda *Aspergillus* isključivo se razmnožavaju vegetativno, na krutim i tekućim površinama, a mogu rasti u širokom temperaturnom području (6-55 °C) te pri uvjetima niske vlažnosti (Krijgsheld i sur., 2012). Njihove spore su među najdominantnijima u zraku te se mogu široko rasprostranjivati (Baker i Bennet, 2010).

Brojne vrste roda *Aspergillus* luče kiseline i enzime koji razgrađuju polimere na jednostavnije molekule koje stanica potom nazad „upije“ te ih koristi kao nutrijente. Neki od enzima koje luče su: amilaza koja razgrađuje škrob, pektinaza koja razgrađuje pektin te ksilaza koja razgrađuje ksilan (Krijgsheld i sur., 2012). Kod proizvodnje fermentirane hrane enzimi imaju povoljan utjecaj na kvalitetu finalnog proizvoda te poboljšavaju teksturu, okus i aromu. *A. niger* se koristi u proizvodnji limunske kiseline koja se široko upotrebljava u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, a također ga se upotrebljava i u industrijskoj proizvodnji glukonske kiseline. U proizvodnji itakonske kiseline upotrebljava se vrsta *A. terreus*, dok se *A. oryzae* koristi za proizvodnju kojične kiseline (Ruijter i sur., 2002). Opasnost predstavljaju mikotoksini koje sintetiziraju određene vrste roda *Aspergillus*, a u najopasnije se ubrajaju: okratoksini, aflatoksini, patulin i fumigilin.

*Aspergillus carbonarius* vrsta je koja sintetizira značajne količine okratoksina A (OTA). Može rasti u temperaturnom području od 10 do 42 °C, dok se sinteza OTA odvija na nešto nižim temperaturama koje variraju od 15 do 20 °C (Belli i sur., 2004; Esteban i sur., 2004; Leong, 2005; Mitchell i sur., 2004). Građa ove vrste plijesni često se uspoređuje sa vrstom *A. niger* zbog njihove međusobne sličnosti. Glavnu razliku između ovih dviju vrsta, osim veličine konidija koje su kod *A. carbonarius* veće i crnije, upravo predstavlja sposobnost sinteze OTA koja je kod *A. carbonarius* veća. Također vrsta *A. niger* svrstava se u skupinu kserofila te je sukladno tome optimalna vrijednost aktiviteta vode za njezino razmnožavanje 0,77 (Pitt i sur., 1997), dok se *A. carbonarius* razmnožava na vlažnijim područjima uz raspon optimalne  $a_w$  vrijednosti od 0,93 do 0,98 (Mitchell i sur., 2004; Belli i sur., 2005). Vrste roda *Aspergillus* iz odjeljka *Nigri* općenito su prisutne u vinogradima gdje uzrokuju truljenje bobica grožđa i brojne od njih imaju sposobnost proizvodnje OTA. Istraživanja su pokazala da je upravo *A. carbonarius* uzrok pojave najvećih količina OTA u vinu te u sokovima od grožđa (Heenan i sur., 1998). Belli i suradnici su 2004. godine proveli istraživanje na sintetičkom grožđu u kojem je korišteno osam izolata *A. carbonarius*. Rezultati su pokazali da na rast *A. carbonarius* i sintezu OTA velik utjecaj imaju temperatura i aktivitet vode. Najveći rast *A. carbonarius* je zabilježen pri temperaturi od 30 °C te  $a_w$  vrijednosti od 0,95 dok je sinteza OTA također bila maksimalna kod iste  $a_w$  vrijednosti. Osim u grožđu, *A. carbonarius* ima sposobnost sinteze OTA i u zrnima kave (Joosten i sur., 2000). Sojevi *A. carbonarius* izolirani iz tajlandske kave su za razliku od

*A. ochraceus*, inače poznatog po sintezi OTA, na kokosovom agaru rasli vrlo obilno te sintetizirali veliku količinu OTA (Joosten i sur., 2000).

### 2.2.2. Rod *Penicillium*

Rod *Penicillium* prvi je puta spomenut 1809. godine kada je Johann Heinrich Friedrich Link upotrijebio naziv *Penicillium* jer ga je struktura konidiospora izgledom podsjećala na oblik metle. Link je tada također opisao 3 vrste roda *Penicillium*, a to su: *P. glaucum*, *P. candidum* i *P. expansum*. Javnosti postaje šire poznat nakon što je Alexandar Fleming 1928. godine otkrio penicilin, antibiotik koji se koristi za suzbijanje gram pozitivnih bakterija.

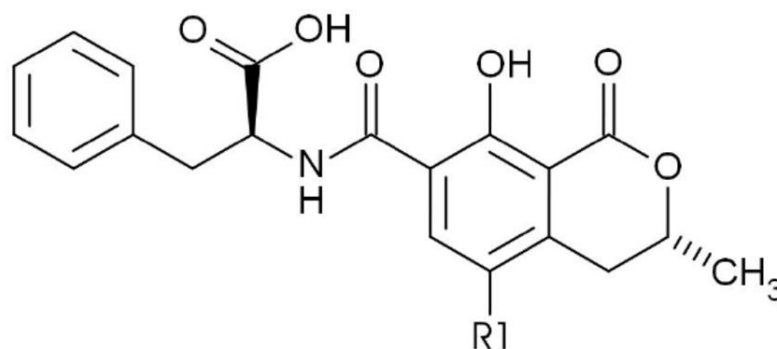
Vrste ovog roda široko su rasprostranjene, a pogodno stanište za njihov rast predstavljaju brojne biljne vrste te razni prehrambeni proizvodi. Također, mogu rasti u ekstremnim okolišnim uvjetima kao što su visoke/niske temperature, u kiselom/alkalnom području, u područjima visoke koncentracije soli te u uvjetima niske vlažnosti. Neke vrste roda *Penicillium* koriste se u proizvodnji sireva kao što su Camembert, Brie i Roquefort (Giraud i sur., 2010). Vrsta *P. caseicolum* se upotrebljava u proizvodnji sireva Brie i Camembert formirajući teksturu i aromu sira (Karahadian i sur., 1985). Istraživanje Lopez-Diaz i sur. (2001) je dokazalo da se neke vrste roda *Penicillium* također mogu upotrebljavati i u proizvodnji fermentiranih kobasica.

*Penicillium nordicum* najčešći je kontaminant hrane bogate proteinima kao što su sušeni mesni proizvodi (ponajviše šunka i kobasice), riba te sir. S obzirom na njegovu prilagodbu rasta u slanim područjima, u sušenom i fermentiranom mesu ova se vrsta smatra najčešćim uzročnikom pojavnosti okratoksina A u navedenim prehrambenim namirnicama (Delgado i sur., 2018). OTA je vrlo stabilan te ga je teško ukloniti iz hrane, stoga je jedini način prevencije suzbiti rast plijesni *P. nordicum*. Kako ne bi došlo do promjene nutritivne vrijednosti i senzorske kvalitete prehrambenih proizvoda u konzerviranju hrane prednost se daje biološkim metodama. Jedan od postojećih načina je reguliranje koncentracije NaCl-a i glukoze čime je moguće kontrolirati rast plijesni *P. nordicum* i posljedično sinteze OTA, što su nedavnim istraživanjem na sušenom mesu, grožđu i žitaricama potvrdili Wang i sur. (2020). Rezultatima je utvrđeno da koncentracija NaCl-a veća od 100 g/L značajno inhibira rast micelija, dok je sinteza OTA prekinuta kod koncentracija većih od 40 g/L. Povećana koncentracija glukoze nema utjecaja na sam rast plijesni *P. nordicum*, ali koncentracije veće od 200 g/L inhibiraju sintezu OTA. Također, na rast plijesni, velik utjecaj imaju bakterije mliječne kiseline (BMK)

koje sintetiziraju brojne organske kiseline, od kojih su najznačajnije octena i mliječna kiselina. Sintezom organskih kiselina dolazi do sniženja pH vrijednosti čime se stvaraju nepovoljni uvjeti za rast plijesni (Ammor i sur., 2006). Kvasci u kombinaciji s odgovarajućim okolišnim parametrima također mogu imati utjecaj na rast određenih vrsta plijesni te sintezu njihovih toksina, što se pokazalo kao povoljna metoda kada je u pitanju očuvanje senzorskih svojstava namirnica. Jedno od brojnih istraživanja provedenih na sušenim mesnim proizvodima koje potvrđuje navedenu tezu je ono Virgilia i sur. (2012). Kvasci izolirani iz sušene šunke, koji su korišteni kao starter kultura, uspješno su suzbili rast *P. nordicum* i sintezu OTA.

### 2.3. Okratoksin A (OTA)

Okratoksin A (OTA) je mikotoksin koji je prvi puta otkriven 1965. godine kao produkt sekundarnog metabolizma plijesni *Aspergillus ochraceus*, a kasnijim istraživanjima je dokazano da ga sintetiziraju brojni pripadnici rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (Abarca i sur., 2001; Geisen i sur., 2004). Najtoksičniji je pripadnik skupine okratoksina koja obuhvaća i okratoksin B (OTB), okratoksin C (OTC), okratoksin  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) te okratoksin  $\beta$  (OT $\beta$ ). Po kemijskoj strukturi OTA je 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-(3R)-metil izokumarin.



**Slika 1.** Kemijska struktura okratoksina A (Heussner i sur., 2010)

Brojnim provedenim istraživanjima dokazano je da OTA ima neurotoksično, nefrotoksično, hepatotoksično, genotoksično, imunosupresivno, teratogeno i karcinogeno djelovanje (El Khoury i Atoui, 2010), a IARC (eng. *International Agency for Research on Cancer*) ga je 1993. godine svrstala u skupinu 2B kao mikotoksin s mogućim karcinogenim učinkom.

Namirnice koje su najčešće kontaminirane OTA, a izrazito su zastupljene u ljudskoj prehrani su žitarice (kukuruz, pšenica, ječam) te vino. Prisutnost OTA također je dokazana i u zrnima kave, mahunarkama, kruhu te mesnim proizvodima (El Khoury i Atoui, 2010; Pleadin i sur, 2018).

OTA sintetiziraju brojne vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, međutim do danas je vrlo malo podataka otkriveno o samom načinu odvijanja sinteze OTA. Pretpostavlja se da glavnu ulogu u njegovoj sintezi ima enzim poliketid – sintaza. Glavnu reakciju biosinteze OTA predstavlja povezivanje fenilalanina i OTa čime dolazi do njegovog nastanka, a poliketid – sintaza je enzim odgovoran za katalizu te reakcije (Ringot i sur., 2006). Temperatura, pH, stupanj aeracije te sastav medija predstavljaju okolišne faktore koji bitno utječu na sintezu OTA. Topliji krajevi predstavljaju područje pogodno za rast i razmnožavanje *Aspergillus* vrsta, posebice *A. ochraceus*, dok u hladnijim predjelima pretežito dolazi do rasta *P. nordicum* i *P. verrucosum* (Pleadin i sur., 2019). Klimatski uvjeti te način proizvodnje vina predstavljaju izrazito bitan faktor kod sinteze OTA u vinima te sokovima od grožđa. Rastu i razmnožavanju plijesni *A. carbonarius*, koji se u najvećoj mjeri smatra odgovornim za sintezu OTA u vinima, pogoduje mediteranska klima (područje južne Europe) upravo zbog njegove izrazite otpornosti na djelovanje sunčevih zraka te sposobnosti prilagođavanja sušnim uvjetima. Crna vina se obrađuju u aerobnim uvjetima te pri povišenim temperaturama prilikom čega dolazi do otapanja prirodno prisutnih bojila koja imaju sposobnost interakcije s toksikotvornim plijesnima te su zbog toga pogodniji medij za sintezu OTA (Majerus i sur., 2000).

Inhibiciju sinteze OTA moguće je provesti putem kemijskih, fizikalnih i mikrobioloških metoda. Prije provedbe neke od navedenih metoda, potrebno je tijekom cjelokupnog procesa rukovanja i obrade određene sirovine osigurati iznimnu čistoću opreme sa kojom se radi te što čišće uvjete kako bi se mogućnost kontaminacije svela na minimum. Uporabu kemijskih metoda dekontaminacije mikotoksina karakteriziraju brojni nedostaci kao što su: gubitak nutritivne vrijednosti, visoki troškovi te promjena organoleptičkih svojstava proizvoda (Galvano i sur., 2001). Od fizikalnih metoda, najučinkovitijom se pokazala uporaba  $\gamma$  – zračenja, dok nešto rjeđu uporabu također pronalaze UV zračenje te postupak zamrzavanja i odmrzavanja (Pleadin i sur., 2018). Uporaba antagonističkih mikroorganizama kao što su netoksikotvorne plijesni te autohtoni kvasci spada u skupinu bioloških metoda. Kvasci djeluju na način da sprječavaju rast i razmnožavanje toksikotvornih plijesni, a samim time utječu i na sintezu OTA. Ova metoda pokazala se vrlo učinkovitom kod dekontaminacije mesnih proizvoda, primjerice

pršuta kod kojeg je rast toksikotvornih plijesni inhibiran pomoću kvasca *Debaryomyces hansenii* (Schmidt – Heydt i sur., 2011).

## 2.4. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Za određivanje mikotoksina u hrani i hrani za životinje koriste se različite analitičke metode koje se dijele na orijentacijske (screening) i potvrdne, a mogu biti kvalitativne i kvantitativne. Kvantitativnim metodama kao konačni rezultat dobiva se vrijednost koncentracije analiziranog mikotoksina dok se kvalitativnim metodama utvrđuje isključivo njihova prisutnost ili neprisutnost (Pleadin i sur., 2018).

Tankoslojna kromatografija predstavlja jednostavnu kromatografsku metodu, a široku primjenu u laboratorijima diljem svijeta pronašla je upravo zbog svoje jeftine i lako dostupne opreme (tablica 1). Prvi je puta opisana 1903. godine od strane ruskog botaničara Tswetta, a 1938. godine Izmailov i Schraiber ju primjenjuju na staklenim pločama za separaciju biljnih ekstrakata pomoću aluminijevog oksida. Njezina komercijalna upotreba započinje 60-ih godina prošloga stoljeća.

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci tankoslojne kromatografije za određivanju mikotoksina

Metoda	Prednosti	Nedostaci
<b>TLC</b>	jednostavna, brza i jeftina <i>screening</i> metoda; mogućnost simultanog određivanja više mikotoksina; dobra osjetljivost metode za aflatoksine i okratoksin A	slaba osjetljivost metode (za neke mikotoksine); slaba preciznost metode; kvantitativna metoda samo kad se primjenjuje densitometar

Ploče za tankoslojnu kromatografiju mogu biti načinjene od tri vrste materijala, a to su: staklo, plastika i aluminij. U pravilu se najčešće upotrebljavaju ploče načinjene od stakla, iako su aluminijske i plastične ploče fleksibilnije od staklenih pa se zbog toga lakše mogu rezati do željene veličine. Neki od najčešće korištenih adsorbensa su: silikagel, celuloza i aluminijev oksid (Wall, 2005). Uzorak se u obliku točaka nanosi na startnu liniju, s jedne strane sloja adsorbensa

(stacionarna faza - SF), udaljenu otprilike 1 cm od ruba ploče. Ploča se potom stavlja u staklenu kadu u kojoj se nalazi eluens (mobilna faza – MF) koji može biti samo jedno otapalo ili mješavina više vrsta otapala te se kadica zatvara staklenim poklopcem. Djelovanjem kapilarnih sila, MF se kreće kroz adsorbens, čime dolazi i do kretanja sastojaka uzoraka, ali različitim brzinom. Ova faza naziva se razvijanje kromatograma. Po završetku, ploča se izvadi iz kadice te se stavi na sušenje, a nakon što je osušena razvijene zone se detektiraju pod UV svjetlom. Prisutni spojevi se identificiraju pomoću retencijskog faktora ( $R_f$ ) koji predstavlja omjer udaljenosti koju je analit prešao ( $x$ ) i udaljenosti koju prijeđe otapalo ( $y$ ).

Zbog mogućnosti istovremene analize većeg broja uzoraka, brzo dostupnih rezultata te jednostavne i jeftine opreme ova kromatografska tehnika svoju primjenu pronalazi u brojnim područjima. Jednu od najstarijih primjena tankoslojna kromatografija pronašla je u identifikaciji biljnih lijekova, zbog čega je u konačnici i došlo do popularizacije njezine upotrebe (Sherma i Fried, 2005). Danas se tankoslojna kromatografija uspješno koristi za razdvajanje aminokiselina i njihovih derivata, određivanje prisutnosti pesticida u tlu, hrani, različitim biološkim materijalima te vodi, za kvantitativnu i kvalitativnu analizu polifenola u vinima te brojnim drugim područjima (Sherma i Fried, 2005; Rastija i Medić-Šarić, 2009). Također, tankoslojna kromatografija, kao potvrdna metoda, predstavlja metodu pogodnu za kvalitativnu analizu mikotoksina kao što su okratoksini i aflatoksini.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Kako bi se ispitaio utjecaj kvasaca na sposobnost sinteze OTA korišteni su odabrani sojevi kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces uvarum* 20, *Saccharomyces bayanus* 8 dobiveni iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica; *Kluyveromyces marxianus* DS12 iz Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca te *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ, *Hanseniaspora uvarum* S138 i *Pichia guilliermondii* ZIM iz Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Kulture kvasaca čuvaju se na -20 °C u 30% (v/v) glicerolu.

Plijesni *A. carbonarius* 408 i *P. nordicum* 701 producenti OTA dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica a njihove se spore čuvaju u vodi pri temperaturi od 4 °C.

##### 3.1.2. Hranjive podloge

U tablici 2 prikazan je sastav hranjivih mikrobioloških podloga korištenih tijekom provedbe ovog pokusa.

**Tablica 2.** Sastojci za pripremu hranjive podloge

HRANJIVE PODLOGE	SASTOJCI	KOLIČINA (g/L)
<b>Czapek dox agar</b>	saharoza	30
	natrijev nitrat	2
	dikalij hidrogen fosfat	1
	magnezijev sulfat	0,5
	kalijev klorid	0,5
	željezov sulfat	0,01
	agar	15
<b>Sladni agar</b>	sladni ekstrakt (praškasti)	20
	pepton	6
	glukoza	20
	agar	15
	voda (destilirana)	1 L
<b>Sladovina</b>	sladni ekstrakt (praškasti)	20
	pepton	6
	glukoza	20
	voda (destilirana)	1 L

### **3.1.3. Kemikalije**

- Benzen (Kemika – Zagreb, Hrvatska)
- Ledena octena kiselina (Alkaloid – Skopje, Sj. Makedonija)

### **3.1.4. Mikotoksin**

Standard mikotoksina OTA:

- OTA (Sigma – St. Louis, MO, SAD)

### **3.1.5. Pribor i aparatura**

- Petrijeve zdjelice
- epruvete
- stalci za epruvete
- Vibromikser, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)
- mikrobiološka ušica
- Thomaova komorica
- mikrobiološka igla
- pipeta (automatska pipeta)
- mikropipeta (automatska pipeta) od 10  $\mu\text{L}$
- menzura od 100 mL
- Bunsenov plamenik
- staklene kadice za TLC
- ploče sa silikagelom za TLC (20x20 cm, debljine 0,25 mm) („Merck“, Darmstadt, Njemačka)
- UV-lampa („Camag“, Muttenz, Švicarska)
- štapić po Drigalskom

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema kultura kvasaca

Prije početka pokusa, kulture kvasaca čuvane u sladovini s 30 % (v/v) glicerola potrebno je revitalizirati. Kulture su naciepljene u 5 mL svježe pripremljene sladovine te su inkubirane na 28 °C tijekom 48 sati. Nakon revitalizacije određen je ukupan broj (žive i mrtve) stanica kvasaca pomoću Thomaove komorice.

Iz sladovine u kojoj je određen ukupan broj stanica kvasaca načinjena je serija decimalnih razrjeđenja u omjeru 1:10 kako bi se neizravnom metodom naciepljivanja poznatog volumena suspenzije (100 µL) na čvrstu podlogu (Czapekov agar) odredio broj živih stanica kvasca. Kolonije koje su porasle na čvrstoj podlozi predstavljaju stvaran broj živih stanica, a dobivene vrijednosti se označavaju kao CFU vrijednost (eng. *Colony Forming Units*). Konačan broj živih stanica kvasca izračunat je prema jednadžbi (1) i iznosio je 10<sup>6</sup> CFU/mL.

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija (N)}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka (mL)}} \times \text{recipročna (obratna) vrijednost razrjeđenja} \quad (1)$$

### 3.2.2. Priprema kultura plijesni

Plijesni *Aspergillus carbonarius* 408 i *Penicillium nordicum* 701 su mikrobiološkom lancetom naciepljene na kosi Czapekov agar te su inkubirane 7 dana pri temperaturi od 25 °C. Nakon inkubacije, suspenzija spora plijesni pripremljena je dodatkom fiziološke otopine u epruvetu s poraslom kulturom. Mikrobiološkom lancetom kultura je sterilno sastrugana s kose hranjive podloge i homogenizirana pomoću vibromiksera te je određen broj spora brojanjem u Thomaovoj komorici. Iz suspenzije je načinjen određeni broj decimalnih razrjeđenja (1:10) kako bi se dobilo razrjeđenje s konačnim brojem spora 10<sup>5</sup> spora/mL.

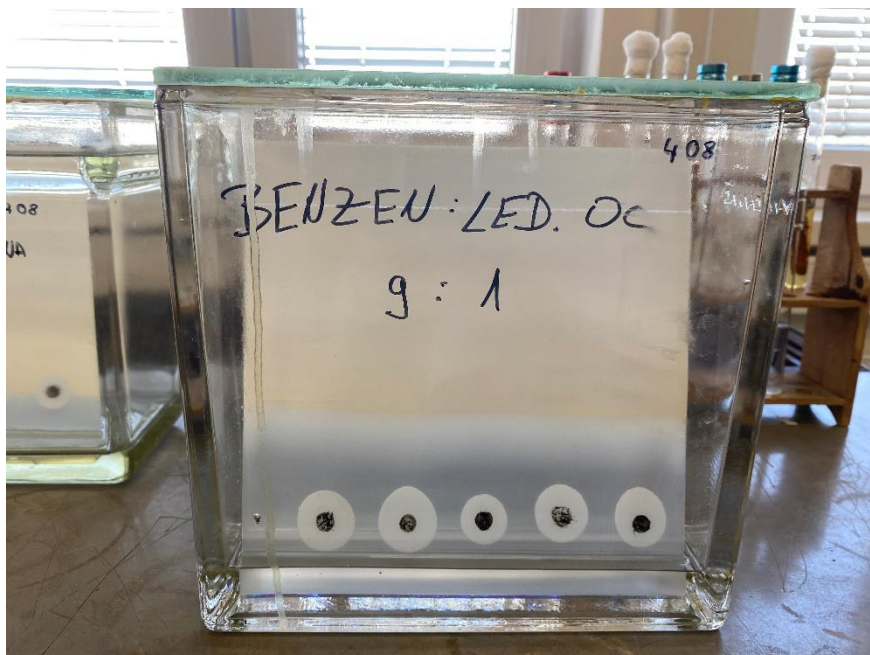
### **3.2.3. Kvalitativno određivanje sintetiziranog okratoksina A metodom tankoslojne kromatografije (TLC)**

Kako bi se ispitao utjecaj odabranih sojeva kvasaca na sposobnost plijesni *A. carbonarius* 408 i *P. nordicum* 701 da sintetiziraju OTA, 100 µL suspenzije svakog soja kvasca ( $10^6$  CFU/mL) je naciepljeno na površinu Czapekovog agara u Petrijevoj zdjelici i razmazano po cijeloj površini pomoću štapića po Drigalskom. Nakon što je suspenzija kvasca difundirala u podlogu, na sredinu Czapekovog agara je naciepljeno 10 µL suspenzije spora plijesni ( $10^5$  spora/mL). Tako pripremljeni uzorci inkubirani su na 25 °C tijekom 28 dana, a ukupno je postavljeno 64 uzorka. Kontrolni uzorak sadržavao je samo naciepljene spore plijesni. Uzorci su uzimani nakon 7., 14., 21. i 28. dana inkubacije.

Metoda tankoslojne kromatografije korištena je za kvalitativno dokazivanje prisutnosti okratoksina A u uzorcima plijesni koje su rasle u prisutnosti odabranih sojeva kvasaca. Na pločama za tankoslojnu kromatografiju sa silikagelom provodi se razdvajanje komponenti uz mogućnost korištenja različitih otapala. Prisutnost okratoksina A u određenom uzorku dokazuje se izlaganjem ploča UV svjetlu određene valne duljine i uspoređuje sa njegovim standardom.

Ploče za tankoslojnu kromatografiju pripremljene su tako da su na njima označena mjesta na koja se nanose standard okratoksina A te uzorci micelija plijesni koji su rasli u prisutnosti kvasaca, odnosno kontrolni uzorak bez prisutnosti kvasca.

U periodu od 28 dana, svakih 7 dana uzimani su uzorci micelija plijesni. Iz sredine porasle kolonije pomoću bušača ( $\Phi=5\text{mm}$ ) izrezani su uzorci micelija plijesni zajedno s agarom te su pomoću mikrobiološke igle preneseni na označena mjesta na ploči za TLC. Uzorci se na silikagel stavljaju stranom na kojoj se nalazi agar. Standard okratoksina A (10 µL) je pomoću mikropipete nanesen na označeno mjesto na ploči. Nakon što su standard i uzorci stavljeni na ploču za TLC te nakon njihovog sušenja, ploča je stavljena u staklenu kadu u kojoj se nalazilo 100 mL smjese benzena i ledene octene kiseline (u omjeru 9:1) te je kadica poklopljena staklenim poklopcem premazanim s laboratorijskom mašću (slika 2).



**Slika 2.** Staklena kadica za provođenje tankoslojne kromatografije (vlastita fotografija)

Fronta otapala iznosila je 14 cm. U trenutku kada je postignuta fronta mobilne faze ploče za TLC izvađene su iz staklene kadice i ostavljene da se osuše u struji zraka. Nakon sušenja, ploče su stavljene pod UV lampu te su osvjetljenje pri valnoj duljini od 365 nm. Prisutnost okratoksina A provedena je vizualno, usporedbom fluorescencije mrlja standarda OTA i fluorescencije mrlja u uzorku. Mrlja uzorka mora biti u ravni sa standardom i fluorescirati istom bojom kako bi mogli zaključiti da je prisutan OTA.

Prisutnost OTA u uzorku se određuje pomoću računanja  $R_f$  vrijednosti koja predstavlja omjer udaljenosti koju je mrlja prešla od startne linije ( $x$ ) i udaljenosti koju je prešla fronta otapala ( $y$ ) (2). Mjerenje udaljenosti mrlje i otapala te računanje  $R_f$  vrijednosti se provodi nakon što se uzorci osuše u struji zraka i osvijetle pod UV lampom valne duljine 365 nm.

$$R_f = X/Y \quad (2)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

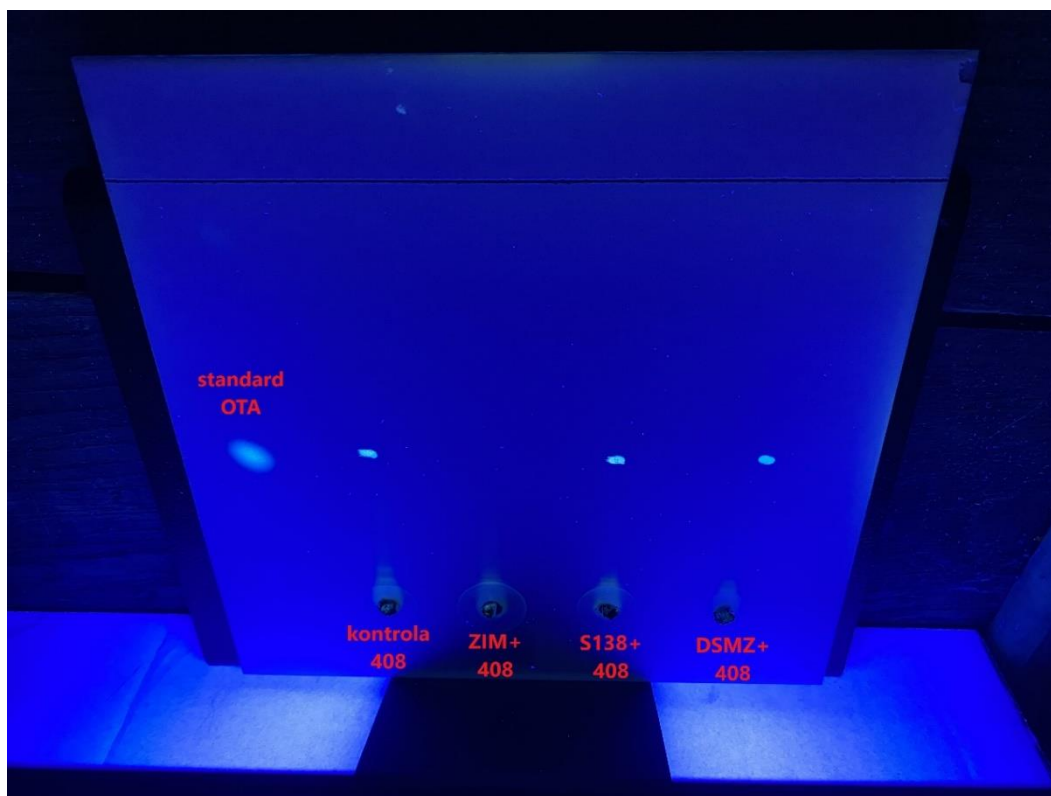
### 4.1. Rezultati

U ovom radu kao potencijalni producenti okratoksina A korištene su plijesni *Aspergillus carbonarius* 408 i *Penicillium nordicum* 701. Obje plijesni su u periodu od 28 dana rasle na temperaturi od 25 °C. Porasle kolonije *Aspergillus carbonarius* 408 bile su crne boje, a kolonije *Penicillium nordicum* 701 svijetlozelene boje.

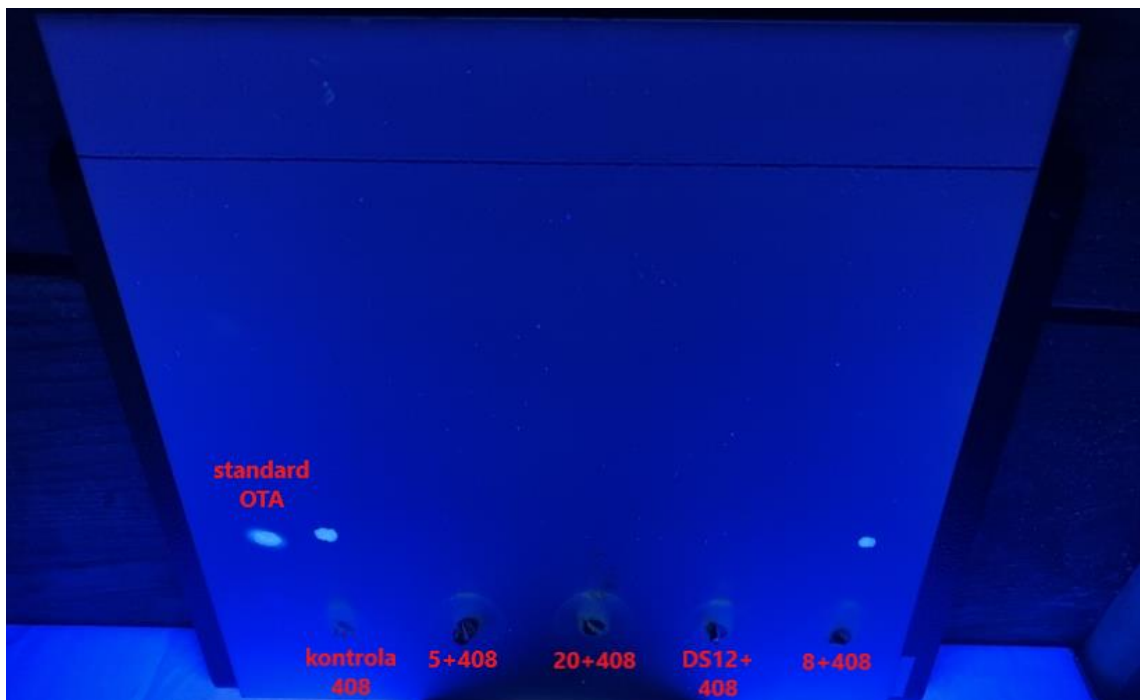
Prisutnost OTA, tijekom rasta plijesni na čvrstoj hranjivoj podlozi, određena je svakih 7 dana tijekom 28 dana inkubacije s pomoću TLC, jednostavne „screening“ metode.

Prilikom provođenja ove metode korištene su ploče sa silikagelom dimenzija 20x20 cm, debljine 0,25 mm.

Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 3 – 6 i u tablicama 3 – 5. Na slikama su prikazani razvijeni kromatogrami na ploči za TLC osvijetljeni UV svjetlom pri valnoj duljini 365 nm.

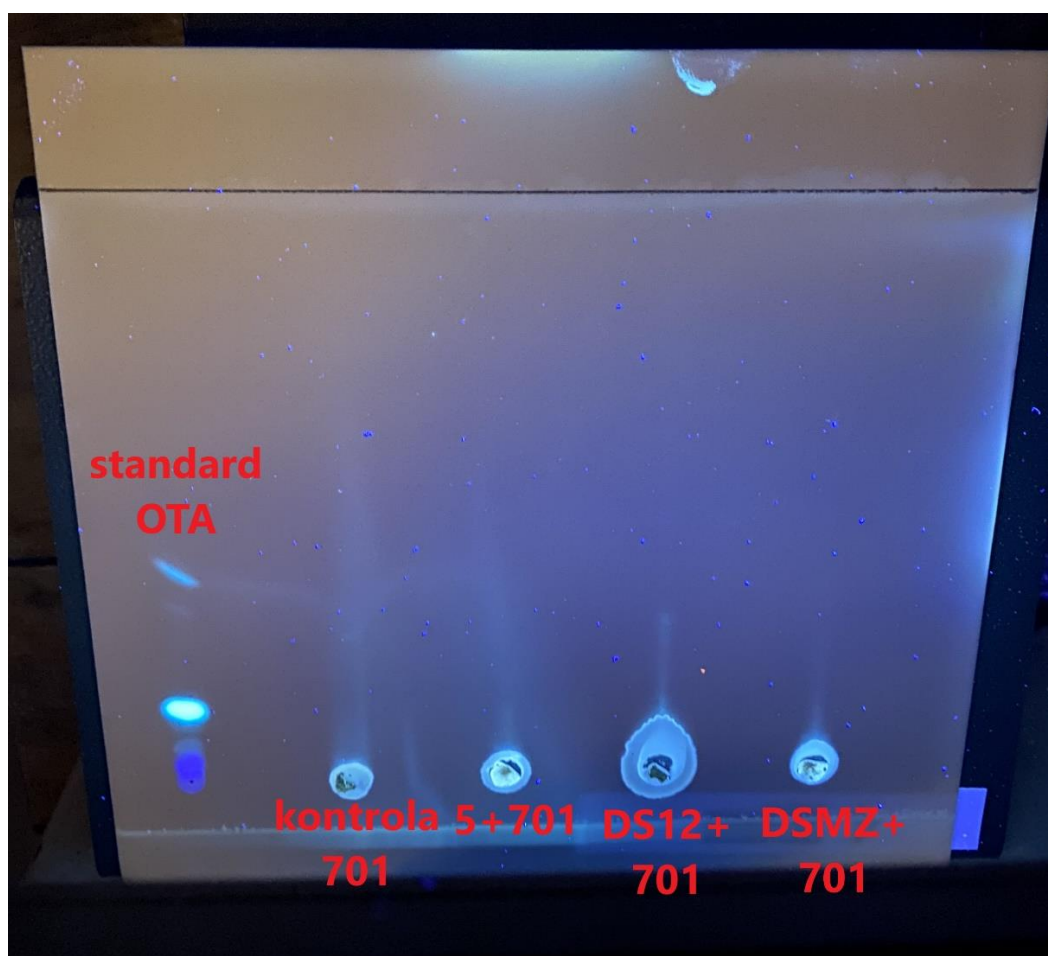


**Slika 3.** Razvijeni kromatogram OTA iz uzoraka plijesni *A. carbonarius* 408 nakon 28 dana uzgoja u prisutnosti kvasaca *Pichia guilliermondii* ZIM, *Hanseniaspora uvarum* S138 i *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ (vlastita fotografija)

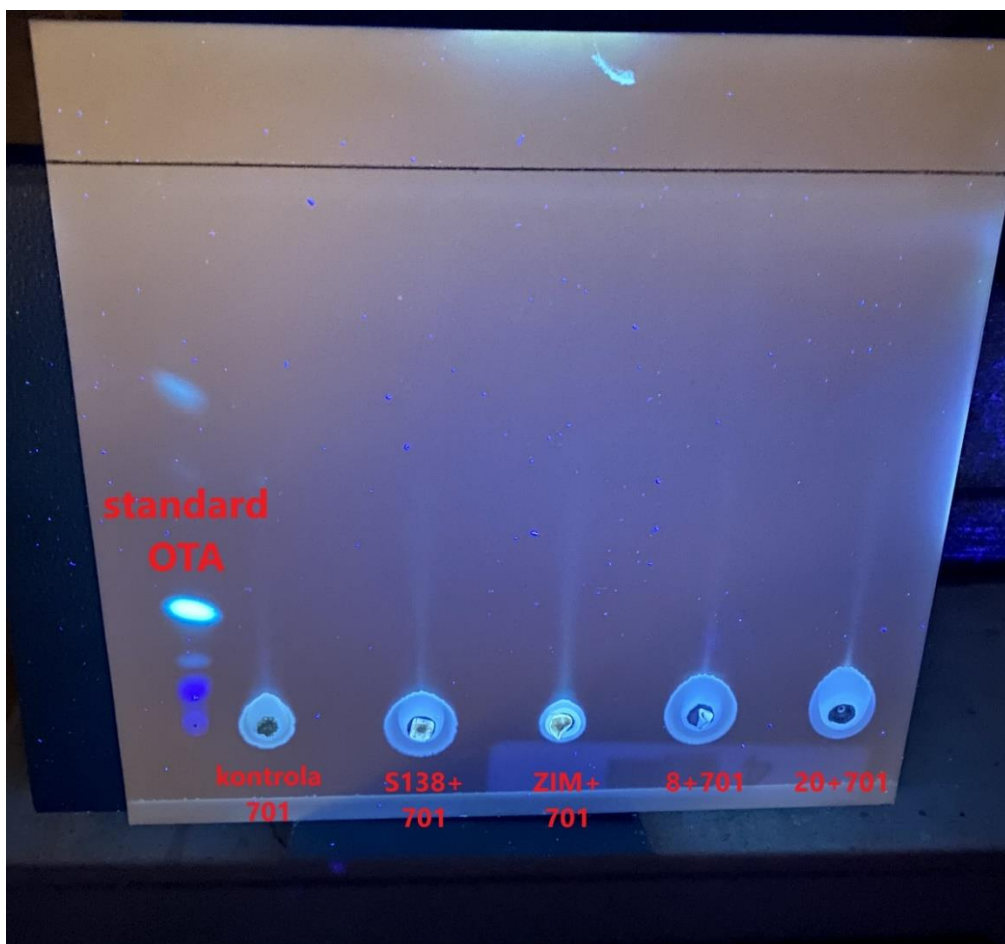


**Slika 4.** Razvijeni kromatogram OTA iz uzoraka plijesni *A. carbonarius* 408 nakon 28 dana uzgoja u prisutnosti kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces uvarum* 20, *Kluyveromyces marxianus* DS12, *Saccharomyces bayanus* 8 (vlastita fotografija)





**Slika 5.** Razvijeni kromatogram OTA iz uzoraka plijesni *P. nordicum* 701 nakon 28 dana uzgoja u prisutnosti kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Kluyveromyces marxianus* DS12, *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ (vlastita fotografija)



**Slika 6.** Razvijeni kromatogram OTA iz uzoraka plijesni *P. nordicum* 701 nakon 28 dana uzgoja u prisutnosti kvasaca *Hansesniaspota uvarum* S138, *Pichia guilliermondii* ZIM, *Saccharomyces bayanus* 8, *Saccharomyces uvarum* 20 (vlastita fotografija)

Na razvijenim kromatogramima potom su izračunate  $R_f$  vrijednosti, mjerenjem udaljenosti uzoraka i otapala od startne linije. Izmjerene vrijednosti služile su za identifikaciju OTA, a prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.**  $R_f$  vrijednosti za OTA, određene TLC metodom

Uzorak	x (cm)	y (cm)	$R_f$
Standard OTA	6,5	14	0,5
<i>A.carbonarius</i> 408 (kontrola)	6,1	14	0,4
<i>A.carbonarius</i> 408 + <i>S. bayanus</i> 8	3,9	14	0,3
<i>A. carbonarius</i> 408 + <i>S. cerevisiae</i> DSMZ	6,4	14	0,5
<i>A. carbonarius</i> 408 + <i>H. uvarum</i> S138	6,3	14	0,5

y - udaljenost od startne linije koju je prešlo otapalo

x – udaljenost od startne linije koju je prešao OTA

$R_f = x/y$

Prisutnost OTA u uzorcima tijekom 28 dana uzgoja plijesni *A. carbonarius* 408 i *P. nordicum* 701 u prisutnosti odabranih kvasaca dokazuje se usporedbom sa standardom OTA, a rezultati su prikazani u tablicama 4 i 5.

**Tablica 4.** Kvalitativno određivanje prisutnosti OTA, dokazano TLC metodom, tijekom 28 dana rasta plijesni *A. carbonarius* 408 na čvrstoj hranjivoj podlozi

Mikotoksin	Vrijeme (dani)	<i>Asp.c.</i> + <i>S.c.</i> 5	<i>Asp.c.</i> + <i>S.u.</i>	<i>Asp.c.</i> + <i>S.b.</i>	<i>Asp.c.</i> + <i>K.m.</i>	<i>Asp.c.</i> + <i>S.c.</i> DSMZ	<i>Asp.c.</i> + <i>H.u.</i>	<i>Asp.c.</i> + <i>P.g.</i>
OTA	7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	28	nd	nd	+	nd	+	+	nd

nd – nije dokazana prisutnost OTA

+ - dokazana je prisutnost OTA

**Tablica 5.** Kvalitativno određivanje prisutnosti OTA, dokazano TLC metodom, tijekom 28 dana rasta plijesni *P. nordicum* 701 na čvrstoj hranjivoj podlozi

Mikotoksin	Vrijeme (dani)	<i>Pen.n.</i> + <i>S.c.</i> 5	<i>Pen.n.</i> + <i>S.u.</i>	<i>Pen.n.</i> + <i>S.b.</i>	<i>Pen.n.</i> + <i>K.m.</i>	<i>Pen.n.</i> + <i>S.c.</i> DSMZ	<i>Pen.n.</i> + <i>H.u.</i>	<i>Pen.n.</i> + <i>P.g.</i>
OTA	7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	28	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd – nije dokazana prisutnost OTA

+ - dokazana je prisutnost OTA

## 4.2. Rasprava

Plijesni su mikroorganizmi koji djelovanjem svojeg metabolizma sintetiziraju brojne sekundarne metabolite. Njihovo korisno djelovanje poznato je u brojim granama industrije, a najbolji primjer je proizvodnja antibiotika u farmaceutskoj industriji. Štetan utjecaj plijesni očituje se u sintezi mikotoksina koji imaju toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja.

Diljem svijeta, mikotoksini kontaminiraju brojne vrste namirnica kao što su žitarice, mlijeko, meso i sir. Njihova prisutnost, osim što predstavlja rizik za zdravlje ljudi i životinja, utječe i na ekonomiju. Usjevi koji su kontaminirani mikotoksinima nisu pogodni za prodaju, a u područjima gdje se prisutnost mikotoksina slabo kontrolira mogu dovesti do smanjenja populacije određenih vrsta životinja, a posljedično i do smanjenja kvalitete njihovih proizvoda (npr. mlijeka) (Bhatnagar i sur., 2002).

Kako bi se prisutnost mikotoksina svela na minimum, potrebno je provoditi stalnu kontrolu prehrambenih namirnica. Analitičke metode za detekciju mikotoksina dijele se na orijentacijske i potvrdne, koje se zatim dijele na kvalitativne i kvantitativne metode. Neke od analitičkih metoda koje se u današnje vrijeme najčešće koriste su: tankoslojna kromatografija (TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i plinska kromatografija (GC). Tankoslojna kromatografija je vrlo jednostavna, jeftina i brza metoda, koja se pokazala djelotvornom za određivanje prisutnosti okratoksina A.

Cilj ovog završnog rada bio je, pomoću tankoslojne kromatografije ispitati utjecaj odabranih sojeva kvasaca na sintezu okratoksina A kod plijesni *A. carbonarius* 408 i *P. nordicum* 701 u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

Pod UV svjetlom OTA pokazuje plavu fluorescenciju, pa ga je moguće detektirati promatranjem pod UV lampom. Stoga je kvalitativno određivanje OTA provedeno

osvjetljivanjem ploča pri valnoj duljini od 365 nm te je vizualnom usporedbom fluorescencije mrlja u kromatogramu uzoraka sa standardom OTA provedena identifikacija OTA (slike 3-6).

Tankoslojnom kromatografijom se odvajaju komponente iz smjese, a na temelju njihovog afiniteta prema otapalu (eluensu) različite komponente prijeći će različitu udaljenost. Razdvojene komponente definiraju se  $R_f$  vrijednošću koja predstavlja karakteristiku svakog spoja. Kako bi se potvrdila prisutnost OTA, izračunate su  $R_f$  vrijednosti (tablica 3).

Na temelju rezultata prikazanim u tablici 4 vidljivo je da plijesan *A. carbonarius* 408 tijekom 21 dan uzgoja ne producira OTA ni u kontrolnim uzorcima ni u prisutnosti odabranih kvasaca. Međutim, u pokusima nakon 28 dana pri 25°C dokazana je prisutnost OTA, jer su na kromatogramima micelija porasle kulture u kontroli i u prisutnosti kvasaca *S. bayanus* 8, *S. cerevisiae* DSMZ i *H. uvarum* S138 nakon izlaganja UV svjetlu vidljive mrlje koje su na istoj udaljenosti od startne linije kao standard i koje fluoresciraju plavo. Iz razvijenih kromatograma izračunate su  $R_f$  –vrijednosti koje su pokazale da je  $R_f$  –vrijednost za uzorak bila ista kao za standard (slike 3 i 4, tablica 3). Dobiveni rezultati su sukladni istraživanjima kojima je dokazano da *A. carbonarius* raste u temperaturnom području od 10 do 42 °C te da se glavna sinteza OTA odvija pri temperaturi oko 20 °C (Belli i sur., 2004; Esteban i sur., 2004; Leong, 2005; Mitchell i sur., 2004).

Iz tablice 3 je vidljivo da je  $R_f$  –vrijednost za standard OTA 0,5, a da se  $R_f$  –vrijednosti za uzorke kreću od 0,3 – 0,5.  $R_f$  –vrijednosti standarda i uzoraka trebale bi biti iste kako bi se potvrdilo da se radi o OTA. Unatoč razlikama u  $R_f$  –vrijednostima, iz dobivenih kromatograma može se zaključiti da se radi o OTA, a te razlike mogu se objasniti neravnomjernim putovanjem otapala po ploči zbog različite debljine uzoraka (agar + micelij).

Teren i sur. (1996) su analizirali 157 sojeva roda *Aspergillus* koji pripadaju odjeljku *Nigri* (12 sojeva *A. carbonarius*, 45 sojeva *A. japonicus* i 100 sojeva *A. niger*). Kao metode za detekciju OTA korištene su: imunoenzimski metoda ELISA, TLC i HPLC metoda. Nakon provođenja sve 3 navedene metode, OTA je detektiran kod 5 sojeva plijesni *A. carbonarius*, 3 soja *A. niger*, dok kod *A. japonicus* nije utvrđena prisutnost OTA.

Utjecaj kvasaca na sposobnost *A. carbonarius* 408 da sintetizira OTA prikazan je na slikama 3 i 4 i u tablici 4. Vidljivo je da kvasci iz roda *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* i *S. uvarum*), *Kluyveromyces* i *Pichia* inhibiraju sintezu OTA. Rezultati su u suglasju s istraživanjima Tryfinopoulou i sur. (2020) koji su analizirali utjecaj kvasaca na rast plijesni *A. carbonarius* izoliranog iz grožđa i njegovu sposobnost sinteze OTA. Od ukupno 67 izolata kvasaca u navedenom istraživanju korišteno je 17 sojeva koji su pripadali rodovima *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Dekkera* i *Metschnikowia*. Kvasci i plijesni zajedno su uzgojeni na sladnom

agaru, Czapekovom agaru, bobicama grožđa te u steriliziranom soku od grožđa. Nakon 8 i 15 dana inkubacije pri 25 °C provedena je analiza prisutnosti OTA pomoću HPLC metode. Provedenom analizom utvrđeno je da je korišteni soj kvasca *S. cerevisiae* Y<sub>33</sub> doveo do inhibicije rasta plijesni *A. carbonarius* te je reducirao sintezu OTA. Ovim istraživanjem potvrđeno je da kvasci mogu biti od velike koristi u prevenciji rasta toksikotvornih plijesni te sinteze mikotoksina.

Iz razvijenih kromatograma na silikagel pločama za TLC, vidljivo je da plijesan *Penicillium nordicum* 701 tijekom 28 dana uzgoja pri 25°C ni u kontroli ni u prisutnosti odabranih sojeva kvasaca ne sintetizira OTA (slike 5 i 6, tablica 5). Iako je *P. nordicum* snažan producent OTA, u ovom istraživanju OTA nije dokazan, što se može objasniti time da je *P. nordicum* psihro i halo toleratna plijesan koja sporo raste na Czapekovom agaru na temperaturi od 25 °C. Dobro raste na niskim temperaturama, a slabo ili nikako ne raste na 30 °C.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Dokazan je utjecaj odabranih sojeva kvasaca na sintezu okratoksina A u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.
2. Kvasci *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces uvarum* 20, *Kluyveromyces marxianus* DS12 te *Pichia guilliermondii* ZIM inhibirali su sintezu okratoksina A iz plijesni *Aspergillus carbonarius* 408 tijekom 28 dana uzgoja pri 25 °C.
3. Pri odabranim parametrima rasta u laboratorijskim uvjetima plijesan *Penicillium nordicum* 701 nije sintetizirala okratoksin A.
4. Tankoslojna kromatografija je brza i jednostavna metoda za određivanje prisutnosti okratoksina A.

## 6. POPIS LITERATURE

Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Cabanes F.J., (2001) Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. *J. Food Protec.* **64(6)**: 903-906.

Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control.* **17(6)**: 454-461.

Antonissen G., Martel A., Pasmans F., Ducatelle R., Verbrugghe E., Vandebroucke V., Li S., Haesebrouck F., van Immerseel F., Croubels S. (2014) The impact of *Fusarium* mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins* **6**: 430-452.

Batista N.N., Ramos C.L., Ribeiro D.D., Pinheiro A.C.M., Schwan R.F. (2015) Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT Food Sci. Technol.* **63(1)**: 221–227.

Baker S.E., Bennett J.W. (2010) An Overview of the Genus *Aspergillus*. U: Goldman G.H., Osmani S.A., ur., *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research methods*. 1. izd., CRC Press, Boca Raton, str. 1-12.

Belli N., Ramos A.J., Coronas I., Sanchis V. i Marin S. (2004) *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *J. Appl. Microbiol.* **98(4)**: 839-844.

Bennett J.W., Klich M. (2003) Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16(3)**: 497-516.

Bhatnagar D., Yu J., Ehrlich KC. (2002) Toxins of filamentous fungi. *Chem. Immunol.* **81**: 167-206.

Cai Z., Yang R., Xiao H., Qin X., Si L. (2015) Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. *Postharvest Biol. Tec.* **100**: 52–58.

Delgado J., da Cruz Cabral L., Rodríguez A., Rodríguez M. (2018) Influence of ochratoxin A on adaptation of *Penicillium nordicum* on a NaCl-rich dry-cured ham-based medium. *Int. J. Food Microbiol.* **272**: 22–28.

Esteban A., Leong S.L., Tran-Dinh N. (2005) Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in *Aspergillus niger*. *Molec. Ecol. Notes* **5(2)**: 375–377.



- El Khoury A., Atoui A. (2010) Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins (Basel)* **2(4)**: 461-493.
- Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G. (2001) Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food Prot.* **64(1)**: 120-131.ga
- Geisen R., Mayer Z., Karolewicz A., Farber P. (2004) Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* **27(4)**: 501-504.
- Giraud F., Giraud T., Aguilera G., Fournier E., Samson R., Cruaud C., Lacoste S., Ropars J., Tellier A., Dupont J. (2010) Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strain associated with cheese manufacturing. *Int.J.Food Microbiol.* **137(2-3)**: 204-213.
- Goliński P., Waśkiewicz A., Gromadzka K. (2009) Mycotoxins and mycotoxicoses under climatic conditions of Poland. *Polish. J. Vet. Sci.* **12**: 581-588.
- González Flores M., Rodríguez M.E., Oteiza J.M., Barbagelata R.J., Lopes C.A. (2017) Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *Int. J. Food Microbiol.* **249**: 9-17.
- Heenan C.N., Shaw K.J., Pitt J.I., (1998) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* **1(2)**: 67 – 72.
- Heussner A.H., Ausländer S., Dietrich D.R. (2010) Development and Characterization of a Monoclonal Antibody against Ochratoxin B and its Application in ELISA. *Toxins* **2(6)**: 1582-1594.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans* **56**: 245-395.
- Joosten H.M.L.J., Goetz J., Pittet A., Schellenberg M., Bucheli P. (2000) Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int. J. Food Microbiol.* **65(1-2)**: 39-44.
- Karahadian C., Josephson D.B., Lindsay R.C. (1985) Contribution of *Penicillium* sp. to the Flavours of Brie and Camembert Cheese. *Int. J. Dairy Sci.* **68(8)**: 1865-1877.
- Krijgsheld P., Bleichrodt R., van Veluw G.J., Wang F., Muller W.H., Dijksterhuis J. i Wosten, H.A.B. (2012) Development in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **74(1)**: 1-29

- Leong S.L. (2005) Black *Aspergillus* species: implications for ochratoxin A in Australian grapes and wine. PhD thesis, University of Adelaide, Adelaide, South Australia
- Lopez-Diaz T.M., Santos J.A., Garcia-Lopez M.L., Otero A. (2001) Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Int.J.Food Microbiol.* **68(1-2)**: 69-74.
- Majerus P., Bresch H., Otteneder H. (2000) Occurrence of ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Arch. Lebensm. Hyg.* **51(4)**: 81–128.
- Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food. Chem. Toxicol.* **60**: 218-237.
- Masoud W., Bjørg Cesar L., Jespersen L., Jakobsen M. (2004) Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* **21(7)**: 549–556.
- Mitchell D., Parra R., Aldred D., Magan N. (2004) Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.* **97(2)**: 439–445.
- Morais P.B., Martins M.B., Klaczko L.B., Mendonça-Hagler L.C., Hagler A.N. (1995) Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(12)**: 4251–4257.
- Nabais R.C., Sa-Correia I., Viegas C.A. i Novais J.M. (1988) Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(10)**: 2439-2446.
- Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2015) Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *J. Basic Microbiol.* **55**: 805–818.
- Pitt J.I. & Hocking A.D. (1997) *Fungi and Food Spoilage* Blackie, 2.izd., Blackie Academic & Professional, London/New York
- Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018) Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija, Sveučilište u Mostaru, Mostar.
- Pleadin J., Vulić A., Perković I., Kudumija N., Lešić T., Kiš M., Zadavec M., Mitak M. (2019) Mikotoksini aflatoksini i okratoksini-prijetnja sigurnosti tradicionalnih mesnih proizvoda. *MESO* **21(2)**: 186-197.

- Pronk J.T., Steensma H.Yde., van Dijken J.P. (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12(16)**: 1607-1633.
- Pulvirenti A., Nguyen H.V., Caggia C., Giudici P., Rainieri S., Zambonelli C. (2000) *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces* sensu stricto. *FEMS Microbiol. Lett.* **192(2)**: 191-196.
- Qin X., Xiao H., Cheng X., Zhou H., & Si L. (2017) *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production. *Food Microbiol.* **63**: 205–212.
- Rastija V. & Medić-Šarić M. (2009) Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem.Ind.* **58(3)**: 121-128.
- Ringot D., Schneider Y.J., Chango A., Larondelle Y. (2006) Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A. *Chem. Biol. Interact.* **159(1)**: 18-46.
- Ruijter G.J.G., Kubicek C.P., Visser J. (2002) Production of Organic Acids by Fungi. U: Osiewacz H.D., ur., Industrial Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), 1.izd., Springer-Verlag, Berlin
- Schmidt-Heydt M., Graf E., Batzler J., Geisen R. (2011) The application of transcriptomics to understand the ecological reasons of ochratoxin A biosynthesis by *Penicillium nordicum* on sodium chloriderich dry cured foods. *Trends Food Sci. Technol.* **22**: 39-48.
- Sherma J., Fried B. (2003) Handbook of Thin-Layer Chromatography, 3.izd., CRC Press
- Sibirny A.A., Boretsky Y.R. (2009). U: Satyannarayana T., Kunze G. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, Institute of Cell Biology, Lviv, str.113-134.
- Spencer D.M., Spencer J.F.T., De Figueroa L., Heluane H. (1992) Yeasts associated with rotting citrus fruits in Tucumán, Argentina. *Mycol. Res.* **96(10)**: 891–892.
- Stewart G.G. (2014) *Saccharomyces*-Introduction. U: Robinson R., Batt C., Tortorello M.L., ur., Encyclopedia of Food Microbiology, 2.izd., Academic press, San Diego, str. 297-301.
- Teren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E., Kevei F. (1996) Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* **134(3)**: 171-176.
- Tryfinopoulou P., Chourdak A., Nychas G.J.E., Panagou E.Z. (2020) Competitive yeast action against *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production. *Int. J. Food Microbiol.* **317(4)**

Virgili R., Simoncini N., Toscani T., Camardo Leggieri M., Formenti S., Battilani P. (2012) Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. *Toxins* **4**: 68-82.

Wall P.E. (2005) Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical approach, Royal Society of Chemistry, Cambridge

Wang Y., Yan H., Neng J., Gao J., Yang B., Yang L. (2020). The Influence of NaCl and Glucose Content on Growth and Ochratoxin A Production by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* and *Penicillium nordicum*. *Toxins* **12(8)**: 515.

Zhang D., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L. (2011). Potential biocontrol activity of a strain *Pichia guillermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biol. Control* **57(3)**: 193-201.

Zhang, X., Li, B., Zhang, Z., Chen, Y., Tian, S. (2020) Antagonistic Yeasts: A Promising Alternative to Chemical Fungicides for Controlling Postharvest Decay of Fruit. *J. Fungus* **6**: 158.

## 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.

Laura Gradečiči

ime i prezime studenta