

Utjecaj okratoksina A na morfologiju i krivulju rasta odabranih sojeva vinskih kvasaca

Juričić, Helena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:269679>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno- biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Helena Juričić
7329/N

**UTJECAJ OKRATOKSINA A NA MORFOLOGIJU I KRIVULJU RASTA ODABRANIH
SOJEVA VINSKIH KVASACA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

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

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za Biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom profesorice dr. sc. Ksenije Markov.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno- biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Utjecaj okratoksina A na morfologiju i krivulju rasta odabranih sojeva vinskih kvasaca

Helena Juričić, 0058209286

SAŽETAK:

Okratoksin A (OTA) je jedan od najopasnijih mikotoksina, a zbog svoje sveprisutnosti i izraženih toksičnih svojstava, predstavlja ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju i ekonomiji. U posljednje vrijeme se razvijaju (mikro)biološke metode uklanjanja ili detoksifikacije mikotoksina te je potrebno prikupiti što više saznanja o međusobnom odnosu mikotoksina i mikroorganizama. Budući da postoji jako malo ili uopće ne postoje podatci o utjecaju OTA na morfologiju i broj stanica kvasaca, cilj ovog rada je bio odrediti utjecaj OTA na krivulju rasta i morfologiju stanica kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Hanseniaspora uvarum*. Mikrobn rast određen je brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi, promjena morfologije stanica kvasaca određena je metodom mikrometrije uz upotrebu objektnog i okularnog mikrometra. Dobiveni rezultati su pokazali da OTA ima neznatan utjecaj na krivulju rasta kvasaca *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *H. uvarum* što nam sugerira da su kvasci razvili mehanizme prilagodbe za uvjete u kojima je prisutan mikotoksin. Također, utjecaj OTA na veličinu stanica ovisi o vremenu izloženosti i koncentraciji OTA.

Ključne riječi: okratoksin A, kvasci, krivulja rasta, morfologija

Rad sadrži: 25 stranica, 13 slika, 0 tablica, 44 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: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Pomoći pri izradi: Željko Jakopović, mag.ing.techn.aliment.

Datum obrane: rujan, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory of General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Effects of ochratoxin A on the morphology and growth curve of selected wine yeast strains

Helena Juričić, 0058209286

ABSTRACT:

Ochratoxin A (OTA) is one of the most dangerous mycotoxins and due to its overall presence and expressed toxic properties, presents a serious threat to human health and economy. Lately, microbiological methods of removing and detoxifying mycotoxins are developed so it is necessary to gather as much knowledge as possible about interactions between mycotoxins and microorganisms. Since there is very limited or no data at all about OTA impact on yeast cell number and morphology, the aim of this study was to determine OTA influence on the growth curve and morphology of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Hanseniaspora uvarum*. Microbial growth was determined by counting grown colonies on solid nutrient medium while change in morphology of yeast cells was determined by micrometric method, using the stage and ocular micrometers. Results obtained showed that OTA has minor impact on growth curve of the yeasts *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *H. uvarum*, which suggests that yeasts have developed adaptation mechanisms for conditions where mycotoxin is present. Also, impact of OTA on cell size depends on the exposure time and OTA concentration.

Keywords: ochratoxin A, yeasts, growth curve, morphology

Thesis contains: 25 pages, 13 figures, 0 tables, 44 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Full Professor, Ksenija Markov, PhD

Technical support and assistance: Željko Jakopović, M.Sc.

Defence date: September, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MIKOTOKSINI	2
2.1.1. Okratoksin A	3
2.2. KVASCI.....	4
2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.2.2 <i>Saccharomyces bayanus</i>	6
2.2.3. <i>Hanseniaspora uvarum</i>	7
2.3. MIKROBNI RAST	8
2.3.1. Krivulja rasta kvasaca	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1 Mikroorganizmi.....	11
3.1.2 Hranjiva podloga za uzgoj kvasaca.....	11
3.1.3 Mikotoksin	11
3.1.4 Aparatura	11
3.1.5 Pribor	12
3.2. METODE	12
3.2.1 Standard OTA	12
3.2.2 Priprema uzorka kvasaca.....	12
3.2.3. Određivanje krivulje rasta	12
3.2.4. Mikrometrija.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1 Utjecaj OTA na krivulju rasta kvasaca <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> i <i>H. uvarum</i>	15
4.2 Utjecaj OTA na morfološke karakteristike kvasaca <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> i <i>H. uvarum</i>	18
5. ZAKLJUČCI	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

Mikotoksini su jedan od glavnih kontaminanata hrane, u najvećoj mjeri žitarica, proizvoda od žitarica te hrane za životinje. Poznata je većina prisutnih mikotoksina, ali se svakako u najvećoj mjeri pojavljuju okratoksin A, fumozini, alfatoksin B₁ te zearalenon. Predstavljaju značajnu prijetnju sigurnosti hrane uzrokujući bolesti ljudi i životinja, ali i ekonomske gubitke. Glavni izvor mikotoksina su namirnice biljnog podrijetla, ali prijenos je moguć i hranom životinjskog podrijetla. Prisustvo mikotoksina u hrani za životinje uzrokuje njihovo nakupljanje u životinjskim tkivima. „Carry over“ efektom odnosno, konzumacijom kontaminiranog mesa, jaja, mlijeka ili mliječnih proizvoda mikotoksini dopijevaju u ljudski organizam (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015). Zahvaljujući izuzetnoj stabilnosti pri nepovoljnim uvjetima kao što su visoka temperatura i niske pH vrijednosti te visok stupanj toksičnosti u malim koncentracijama uvjetuju strogu kontrolu njihove prisutnosti u prehrambenom lancu (Pflieger i sur., 2015). Srednju Europu karakterizira prisutnost kancerogenog okratoksina A koji je u najvećoj mjeri detektiran u žitaricama, ali i u crnom vinu, pivu, kavi, začinima, orašastim plodovima te suhom voću (Petzinger i sur., 2002; Varga i Kozakiewicz, 2006). Njegovo glavno djelovanje se očituje u nefrotoksičnosti, ali je dokazano i imunosupresivno, teratogeno i kancerogeno djelovanje (Varga i Kozakiewicz, 2006). U cilju zaštite zdravlja ljudi i životinja, kao i umanjivanja ekonomskih gubitaka prehrambene industrije došlo je do razvoja novih modernih i pouzdanih metoda za detekciju i uklanjanje mikotoksina kako bi se spriječio ulazak u prehrambeni lanac (Pleadin i sur., 2015). Provedena su brojna istraživanja na temu interakcije različitih skupina mikroorganizama i mikotoksinima te je dokazano da pojedini kvasci imaju sposobnost redukcije toksičnog djelovanja mikotoksina. Ispitivao se potencijalni inhibitorni učinak kvasaca na proizvodnju mikotoksina kod toksikotvornih plijesni, inhibitorni učinak na rast plijesni te sposobnost apsorpcije toksina iz okoline staničnom stjenkom čime dolazi do dekontaminacije proizvoda (Pflieger i sur., 2015). Osim toga kod kvasaca je uočena pozitivna osobina transformacije visokotoksičnih mikotoksina u manje toksične ili ne toksične spojeve. (Pflieger i sur., 2015). Prema podacima SCOOPA i organizacije JCEFA vino je drugi najveći izvor okratoksina A (Remiro i sur., 2012). Interes za korištenje kvasaca kao sigurnog načina dekontaminacije okratoksina A proizlazi iz njihove široke primjene u prehrambenoj industriji pa tako i u industriji vina (Zeidan i sur., 2018). S obzirom na interakcije između mikotoksina i kvasaca, cilj ovog rada je bio odrediti utjecaj okratoksina A na krivulju rasta i morfologiju kvasaca roda *Saccharomyces* i *Hanseniaspora*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni metaboliti, male molekulske mase, koje sintetiziraju toksikotvorne plijesni (Pflieger i sur., 2015). Danas je poznato preko 200 različitih mikotoksina koje sintetiziraju različiti rodovi plijesni poput onih iz roda *Aspergillus* (aflatoksin, okratoksin), *Fusarium* (zearalenon) i *Penicillium* (citrinin). Rast plijesni ne znači nužno i sintezu mikotoksina; neke plijesni ih uopće ne sintetiziraju, a brojne plijesni sintetiziraju metabolite koji nisu prijetnja zdravlju ljudi i životinja (Anli i sur., 2010). Do sinteze mikotoksina dolazi rastom plijesni na supstratima biljnog ili životinjskog podrijetla pa osim žitarica, koje su jedan od najznačajnijih izvora mikotoksina, nalazimo ih u kavi, voću, vinu, pivu, orašastim plodovima, mlijeku i mliječnim proizvodima i mesu (HAH, 2013). Bitno je naglasiti i da se mikotoksini stvaraju u određenim uvjetima vlage, temperature, aktivnosti vode, aeracije, prisutnosti kukaca, u ovisnosti o mehaničkim oštećenjima te o toksikogenom potencijalu same plijesni (Zeidan i sur. 2018.; Pleadin i sur., 2015). Međusobno se razlikuju kemijskim sastavom i molekulskom masom (Anli i sur., 2009).

Mikotoksini predstavljaju jedne od najčešćih kontaminanata hrane i hrane za životinje, godišnje uzrokujući gubitke od milijardu tona hrane u svijetu (Pleadin i sur., 2015.; Pflieger i sur., 2015). Do kontaminacije mikotoksinima može doći u svim fazama proizvodnje i skladištenja, a konzumacijom kontaminiranih proizvoda dolazi do razvoja bolesti koje nazivamo mikotoksikoze (Pleadin i sur., 2015). Posljedično dolazi do ekonomskih troškova zbog uklanjanje takvih proizvoda, medicinske skrbi za ljude i životinje, smanjenje prinosa stočarske industrije te brojna znanstvena istraživanja kojima se razvijaju tehnike otkrivanja, kontrole i dekontaminacije (Pleadin i sur., 2015; Pflieger i sur., 2015).

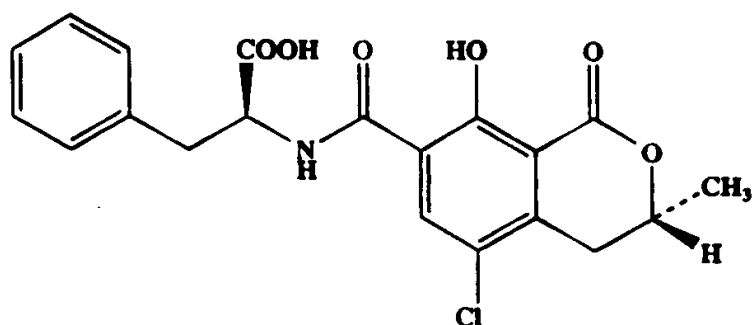
Izazov njihovog uklanjanja predstavljaju termostabilnost i stabilnost pri niskom pH (Pflieger i sur., 2015). Ova svojstva ih čine otpornim na brojne metode koje se koriste pri obradi proizvoda u prehrambenoj industriji pa se za uklanjanje koriste kemijski agensi, dodatne fizikalne metode, a kao najbolji izbor i metode kojima se danas najviše teži su biološke metode uklanjanja mikotoksina mikroorganizmima (Zeidan i sur., 2018).

2.1.1. Okratoksin A

Okratoksin A je skupina izrazito toksičnih spojeva koji se pojavljuju kao prirodni kontaminanti brojnih namirnica (Remiro i sur., 2010; 2012). Glavna podjela ovih mikotoksina je na okratoksin A, njegove metil i etil estere od kojih je najznačajniji okratoksin C, 4-hidroksiokratoksin A te okratoksin B i njegovi metil i etil esteri od kojih se izdvaja okratoksin α. Unutar skupine postoje razlike u strukturi i toksičnom potencijalu svih navedenih vrsta pa je tako OTB dokazano najmanje toksičan, dok je OTA (slika 1) dokazan kao najtoksičniji (Anli i sur., 2010).

Prvi put je izoliran 1965. godine iz plijesni *Aspergillus ochraceus* za vrijeme velikog istraživanja gljivičnih metabolita kojim su se otkrivali novi mikotoksini (Bennett i sur., 2003). Okratoksin A najčešće sintetiziraju plijesni iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus*, a koji od ovih rodova će sintetizirati OTA ovisi o faktorima vlage, temperature, pH i supstrata na kojem plijesni raste pa su tako u različitim klimatskim zonama različiti primarni izvori OTA (Remiro i sur., 2010; Anli i sur., 2010). Okratoksin A se najčešće nalazi u žitaricama, grožđu i njegovim različitim derivatima, zrnima kave, suhom voću, orašastim plodovima, kakau, začинима, pivu, soku od grejpa, ali i u namirnicama životinjskog podrijetla ako što su meso i mlijeko (Varga i Kozakiewicz, 2006; Anli i sur., 2009).

Konzumacijom kontaminirane hrane, okratoksin A se iz gastrointestinalnog trakta prenosi krvnim serumom tako što se veže za serumske proteine te tako putuje do glavnih mjesta biotransformacije i nakupljanja u organizmu, a to su primarno bubrezi i jetra (Anli i sur., 2010; Bennett i sur., 2003). Uz nefrotoksičnost i hepatotoksičnost, djelovanje mu je teratogeno, imunosupresivno, genotoksično, neurotoksično i kancerogeno. Djeluje na niz staničnih procesa tako da inhibira proizvodnju mitohondrijskog ATP-a, sprječava sintezu kompleksa fenilalanina i t-RNA kompleksa, negativno djeluje na metabolizam glukoze te simulira lipidnu peroksidaciju (Bennett i sur., 2003; Varga i Kozakiewicz, 2006; Pepeljnjak i sur., 2008). Okratoksin A se danas smatra uzrokom Balkanske endemske nefropatije, teške kronične tubulointersticijske nefropatije udružene sa karcinomom, koja zahvaća brojna ruralna područja oko velikih rijeka (Vuković i sur., 2014; Bennett i sur., 2003; Duraković i Duraković, 2003). Dnevne doze unosa okratoksina A su niske, ali zbog dugog vremena poluživota od 35 dana, produljuje se njegovo toksično djelovanje (Pepeljnjak i sur., 2008).



Slika 1. Struktura okratoksina A (Anonymus 1, 2007)

Kao najbolja metoda uklanjanja OTA iz hrane je prevencija pojave provođenjem odgovarajućih mjera u svim koracima uzgoja, proizvodnje i skladištenja hrane. U slučajevima gdje je potrebna detoksifikacija, poseže se za fizikalnim, kemijskim ili mikrobiološkim metodama (Amézqueta i sur., 2009).

2.2. KVASCI

Fermentirana hrana je poznata čovječanstvu još od antičkog doba. Tradicionalna upotreba ovih organizama je povezana s proizvodnjom velike količine prehrambenih proizvoda koji danas postoje na tržištu pa se pomoću kvasaca tako proizvode pekarski proizvodi, alkoholna pića kao što su vino, pivo ili rakije, mliječni proizvodi te mesne prerađevine. Osim u prehrambenoj industriji primjenu pronalaze u agronomiji, znanosti i nekim granama medicine (Kurtzman i sur., 2011).

Kvasci su nefotosintetski jednostanični mikroorganizmi ovalnog ili cilindričnog oblika (Duraković i Redžepović, 2003; Erten i sur., 2014). Razmnožavaju se nesporno pupanjem ili stvaranjem spolnih spora (askospore ili mejospore) i nesporno (konidije ili mitospore). Mogu rasti u širokom rasponu pH vrijednosti, temperature i koncentracije šećera. Kvasci koriste šećer iz okoliša respiracijskim putem u aerobnim uvjetima i fermentacijom u anaerobnim uvjetima. Upravo sposobnost fermentacije pri kojoj nastaju CO₂ i etanol koristi u proizvodnji vina, piva i kiselog tijesta (Duraković i Redžepović, 2003).

Pojam kvasac je sinonim za vrstu *Saccharomyces cerevisiae*, koja je jedna od komercijalno najzastupljenijih vrsta u fermentaciji većine proizvoda pa tako i vina (Fleet, 1990; Kurtzman i sur., 2011). Genetska i fenotipska razlika komercijalnih sojeva ovog kvasca nastala je prilagodbom kvasca na industrijske uvjete što omogućuje dobivanje željenih svojstava

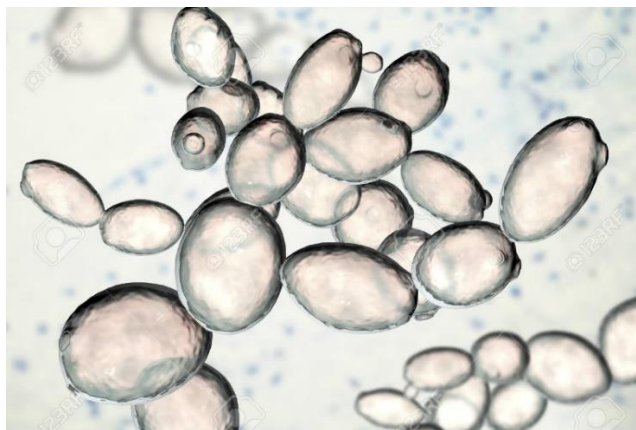
svakog proizvoda (Kurtzman i sur., 2011). Fermentacija kod vina je jedan od ključnih koraka njegove proizvodnje i rezultat udruženog djelovanja različitih vrsta kvasaca čija aktivnost pridonosi svojstvu proizvoda (Fleet, 1990). Ovaj rad se bavi selekcioniranim kvascima *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Hanseniaspora uvarum*.

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (slika 2) je kvasac koji zbog svoje jedinstvene fiziologije pronalazi primjenu u brojnim biotehnološkim procesima. Zaslužan je za fermentaciju niza prehrambenih i drugih industrijskih proizvoda. Jedan je od najdetaljnije istraženih eukariotskih mikroorganizama, čija struktura stanice nam je omogućila bolje razumijevanje strukture i funkcioniranja eukariotskih stanica (Kurtzman i sur., 2011; Ostergaard i sur., 2000).

Oblik stanica je najčešće ovalan, a nalazimo ih i u okruglom obliku. Kao izvor ugljika može koristiti monosaharide (D-glukoza, D-fruktoza, D-manoza, D-galaktoza, disaharide (saharoza, maltoza) i trisaharide (maltotrioza)). Sa obzirom da ne posjeduje amilolitičke enzime ne može fermentirati šećere veće od tri monomerne jedinice, a to uključuje oligosaharide kao i škrob. U prirodi ga zato često nalazimo kao stanovnika na voću i u voćnim prerađevinama.

Industrijski sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* se međusobno razlikuju kao posljedica genetske manipulacije staničnim materijalom kojim su se dobili kvasci prilagođeni za različite uvijete proizvodnje. Vrlo popularnim ga čini visoki stupanj fermentacije prilikom čega nastaje puno etanola, otpornost na visoke koncentracije alkohola i šećera, dobivanje specifičnih aroma, otpornost na niske pH vrijednosti pojačana flokulacija i drugo. Zbog smanjene sposobnosti proizvodnje toksina te dokaza o njegovoj sigurnosti u proizvodnji i konzumaciji FDA (eng. *Food and Drug Administration*) ga svrstava u kategoriju dodatka hrani koji su sigurni za ljudsko zdravlje (Kurtzman i sur., 2011; Cheng i sur., 2017).



Slika 2. *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymus 2, 2020)

2.2.2 *Saccharomyces bayanus*

Drugi kvasac koji se aktivno koristi u fermentaciji vina i piva je *Saccharomyces bayanus* (slika 3). Spada u kategoriju kvasaca koji lako fermentiraju mošt bogat fruktozom, što ga čini čestim izborom u proizvodnji pjenušavih i voćnih vina (Gospodarski list, 2015). Često se prilikom fermentacijskih procesa nalazi sa kvascem *Saccharomyces cerevisiae* što rezultira i nastankom velikog broja ovih hibrida (Gonzalez i sur., 2006).

Prvi put je izoliran iz piva i uglavnom je vezan za fermentaciju pri niskim temperaturama pa se izolira iz fermentacijskih procesa u područjima umjerene i hladne klime. Smatra se heterogenetskim hibridom vrsta *Saccharomyces eubayanus* i *Saccharomyces uvarum* uz male frakcije porijeklom iz vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Rodriguez i sur., 2014). Hibridna struktura vrste *Saccharomyces bayanus* otežava predviđanje metaboličkog djelovanja prilikom fermentacije (Rainieri i sur., 2006).

S. bayanus otporan je na visoku koncentraciju etanola ukoliko nisu prisutne kaprilna i dekanska kiselina, dobro podnosi nizak pH, visoke koncentracije šećera, prisutnost sumporovog dioksida i djeluje u širokom rasponu temperatura što ga čini otpornim u slučaju nastanka nepovoljnih uvjeta u moštu (Gospodarski list, 2002; 2015).



Slika 3. *Saccharomyces bayanus* (Anonymus 3, 2018)

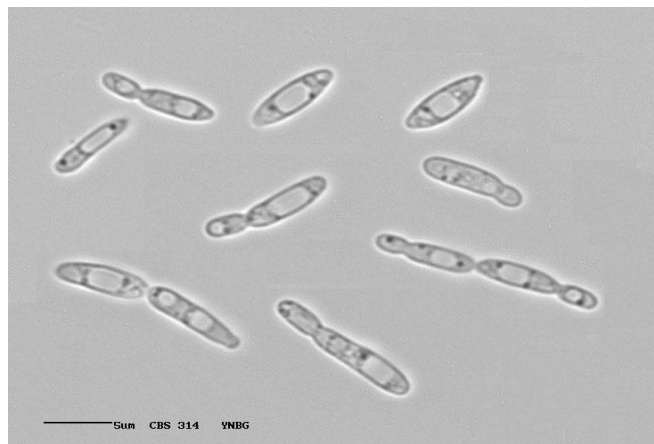
2.2.3. *Hanseniaspora uvarum*

Vino je proizvod fermentacijskog djelovanja velikog broja različitih vrsta kvasaca. Interakcija vrsta iz roda *Saccharomyces* i drugih rodova bitna je za karakteristike koje ima finalni proizvod. Smatra se da su mješovite kulture uzrok izraženije, kompleksnije i bolje arome. Jedan od najčešćih rodova koji se pojavljuju uz rod *Saccharomyces* su kvasci iz roda *Hanseniaspora*, poznati su i pod nazivom divlji kvasci (Duplessis i sur., 2019; Moreira i sur., 2008; Hong i Park, 2013). Pronalazimo ih na grožđu, u moštu, u tlu i vodi, kakau, banani, školjkašima i škampima, a u odrađenim slučajevima izoliran je čak i iz ljudskog organizma (Garcia-Martos i sur., 1999).

Hanseniaspora uvarum (slika 4) je kvasac dominantan na počecima fermentacijskih procesa, kada se detektira i najveći broj stanica. Kako fermentacija napreduje tako dolazi do dominacije kvasaca iz roda *Saccharomyces* (Duplessis i sur., 2019). Djelovanje *H. uvarum* je uvjetovano interakcijama i toksičnim produktima drugih kvasaca, koncentracijom etanola, koncentracijom šećera i ostalih nutrijenata u supstratu, koncentraciji srednjolančanih kiselina, ugljikom i dušikom koji su potrebni za rast i uvjetima fermentacije koji uključuju temperaturu i koncentraciju sumporovog dioksida (Wang i sur., 2015; Moreira i sur., 2008).

Stanice ovog kvasca su ovalnog oblika sa askosporama koje se stvaraju na krajevima (Emmanouil-Nikoloussi i sur., 1994). Poželjni produkti koje stvara *H. uvarum* uključuju estere, više alkohole, karbonilne spojeve, etil acetat i octenu kiselinu što ovisno o vrsti grožđa na kojem raste daju određenu kvalitetu vinu (Duplessis i sur., 2019).

Dokazano je antagonističko djelovanje *H. uvarum* na rast i sporulaciju sivih plijesni i na taj način se sprječava kvarenje nakon berbe i prilikom skladištenja, a paralelno ne utječe na kvalitetu proizvoda (Cai i sur., 2014).



Slika 4. *Hanseniaspora uvarum* (Anonymus 4, 2010)

2.3. MIKROBNI RAST

Mikrobni rast podrazumijeva povećanje veličine stanica nakon kojeg slijedi povećanje broja stanica u populaciji. Kvasci se najčešće razmnožavaju pupanjem (nespolnim načinom) gdje na roditeljskoj stanici raste pup koji se nakon diobe jezgre odvaja i funkcionira kao samostalni organizam (Duraković, 1991). Na rast mikroorganizama utječu vanjski (temperatura, koncentracija kisika i relativna vlažnost) i unutarnji (pH, oksido-redukcijski potencijal, hranjive tvari i a_w -vrijednost) faktori. Mikrobni rast ovisi i o ograničavajućim faktorima kao što su prisutni minerali i kemijski spojevi, metaboliti drugih mikroorganizama u koje spadaju i mikotoksini. Mnogi se kvasci mogu prilagoditi na nepovoljne uvjete u okolišu i na taj način spriječiti odumiranje stanica iako je učinak u puno slučajeva štetan (Jakopović i sur., 2017).

Vrijeme koje je potrebno stanicama da se udvostruče zove se generacijsko vrijeme (g) i ono je specifično za svaki mikroorganizam i može se predvidjeti dok god ne dođe do promjene uvjeta u okolišu. Kvasci imaju karakteristično kratko generacijsko vrijeme pa je brzina stvaranja novih stanica velika. Stanice će se stvarati sve dok se iz okoline ne potroše faktori nužni za njihov rast (Duraković, 1991).

2.3.1. Krivulja rasta kvasaca

Kvasci, kao i svi živi organizmi zahtijevaju optimalne uvjete za svoj rast, a to uključuje povoljnu temperaturu, pH, koncentraciju kisika i udio hranjivih tvari. U prirodi, uvjeti za rast mikroorganizama nisu idealni, ali u laboratorijskim uvjetima možemo pratiti brojne karakteristike, a jedna od njih je i mikrobni rast. Nacjepljivanjem kulture kvasca na odgovarajuću podlogu kojom se ispunjavaju svi fizikalni i kemijski uvjeti, rast i razmnožavanje odvija se prema krivulji rasta (slika 5) koja je karakteristična za svaki mikroorganizam. Iz krivulje rasta dobiva se informacija o gustoći populacije u ovisnosti o vremenu (Duraković, 1991). Krivulja rasta se dijeli na 4 faze: lag fazu (fazu suzdržanog rasta) , log fazu (logaritamska ili eksponencijalna faza), stacionarnu fazu i fazu odumiranja.

1. Lag- faza (faza suzdržanog rasta)

Nacjepljivanjem kvasaca u novu okolinu prvo dolazi do njihove prilagode na novonastale uvjete. Sintetiziraju se enzimi potrebni za rast, raste obujam stanice, ali ne dolazi odmah do razmnožavanja i povećanja broja stanica. Trajanje ove faze je uvjetovano vrstom, rodom, starosti kulture, fiziološkim stanjem stanica, te fizikalno- kemijskim svojstvima sredine odnosno sastavu podloge, pH i temperature. U ovoj fazi stanice su izrazito osjetljive na toksične tvari i visoke temperature (Duraković, 1991).

2. Log faza ili eksponencijalna faza

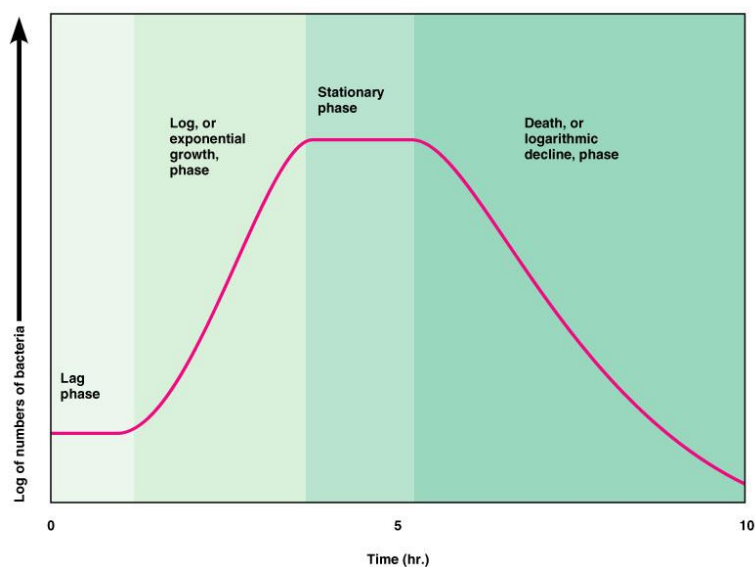
Prilagodбом kvasaca na okolinu dolazi do razmnožavanja geometrijskom progresijom i ubrzanja rasta. Razmnožavanje se nastavlja sve dok mikroorganizmi imaju dovoljno dostupnih hranjivih tvari, a toksični produkti metabolizma nisu u koncentracijama kojima ograničavaju njihov razvitak. Ova faza je i faza od posebnog značaja u industriji jer se stvara najviše produkata metabolizma i nastaje više mikroorganizama nego što ih nestaje. Isto tako sa obzirom na osjetljivost stanica na visoke temperature i kemijske agense u ovoj fazi je najlakše kontrolirati njihov rast (Duraković ,1991.; Duraković ,1996).

3. Stacionarna faza

Nakupljanjem toksičnih produkata nastalih tokom eksponencijalne faze dolazi do odumiranja nekih stanica. Izjednačava se broj novonastalih stanica, koje za rast koriste hranjive tvari oslobođene iz odumrlih stanica, sa odumrlim stanicama. Zbog toga na krivulji ne vidimo nagli pad. Mikroorganizmi su u ovoj fazi otporniji na djelovanje vanjskih čimbenika. Značajno je i da dolazi do sinteze bitnih sekundarnih metabolita kao što su enzimi i antibiotici (Duraković, 1991).

4. Logaritamska faza odumiranja

U ovoj posljednjoj fazi odumire više stanica nego što se razmnožava. Broj živih stanica opada prema geometrijskoj progresiji koja je obrnuta log fazi rasta. Značajno se pogoršavaju se uvjeti životne sredine, mrtve stanice se liziraju i s vremenom odumire cijela populacija. Čest uzrok izumiranja je isušivanje hranjive podloge (Duraković, 1991.; Duraković, 1996).



Slika 5. Krivulja rasta (Anonymus 5, 2004)

3.MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Mikroorganizmi

Kvasci *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Hanseniaspora uvarum* korišteni prilikom ispitivanja djelovanja okratoksina A, dobiveni su iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2 Hranjiva podloga za uzgoj kvasaca

Za uzgoj i određivanje broja živih stanica kvasaca korišteni su sladni agar i sladni bujon (Biolife, Italija). Uzgoj kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Hanseniaspora uvarum* proveden je pri 28 °C tijekom 48 sati.

a) Sladni agar- sastav: (g/L)

- | | | |
|---|-----------------|----|
| ○ | sladni ekstrakt | 30 |
| ○ | Agar | 17 |

b) Sladni bujon- sastav: (g/L)

- | | | |
|---|------------------------|-----|
| ○ | pepton | 15 |
| ○ | mesni ekstrakt | 3 |
| ○ | natrijev klorid | 100 |
| ○ | kalijev hidrogenfosfat | 0,3 |

3.1.3 Mikotoksin

Standard mikotoksina: OTA „Sigma“- St. Louis, MO, USA

3.1.4 Aparatura

- svjetlosni mikroskop Olympus
- brojač kolonija (BZG30) WTW-Weilheim
- termostat Sutjeska, Beograd
- vibromikser EV-102 (Tehtnica, Tjelezniki)
- analitička vaga

3.1.5 Pribor

- Erlenmeyerova tikvica pd 250 ml
- Mikrobiološke epruvete 18 X 180 nm
- Mikropipete 100-1000 μ L JUSTOR 1100G
- Petrijeve zdjelice $\varnothing$ 10 cm
- Okularni mikrometar
- Objektni mikrometar

3.2. METODE

3.2.1 Standard OTA

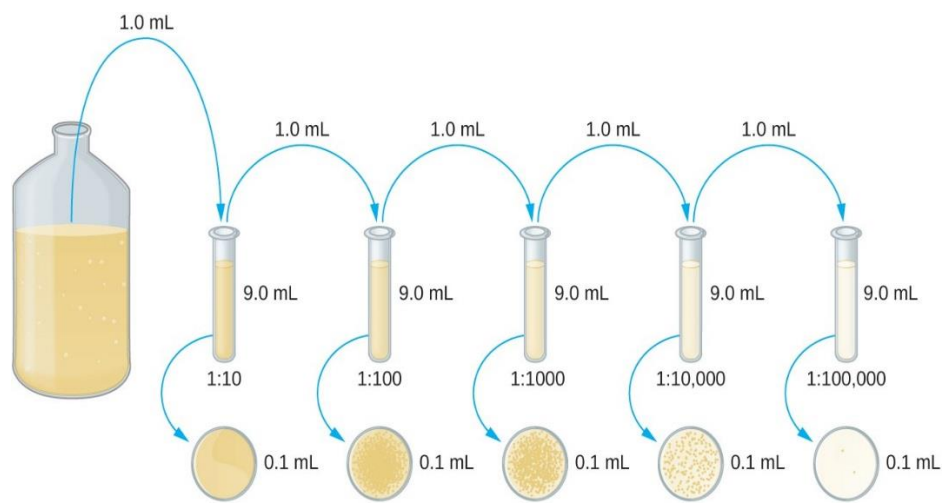
OTA u kristaliničnom obliku otopljen je u etanolu do osnovne koncentracije 1 mg/mL te je takva otopina spremljena na 4 °C do izvođenja pokusa. Kako bi se dobile konačne koncentracije OTA u hranjivoj podlozi od 2, odnosno 4 μ g/mL, u hranjive podloge je dodan odgovarajući volumen osnovne otopine OTA.

3.2.2 Priprema uzorka kvasaca

Odabrani sojevi kvasaca se čuvaju na krutoj podlozi u epruveti pri 4 °C., Kulture kvasaca su precijepljene u sladni bujon (10^6 CFU/ml). Nakon 24 sata inkubacije pri 28 °C, po 1 mL sladnog bujona s poraslom kvašćevom biomasom je dodano u ukupno 9 tikvica s hranjivom podlogom. Po jedna tikvica je bila kontrolna za svaki kvasac pojedinačno i sadržavala je samo kvasac, etanol i sladni bujon. U preostale tikvice, osim kultura kvasaca dodana je i otopina OTA do konačnih koncentracija 2 μ g/mL, odnosno 4 μ g/mL.

3.2.3. Određivanje krivulje rasta

Prilikom ispitivanja utjecaja OTA na krivulju rasta kvasaca *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *H. uvarum*, načinjena je serija decimalnih razrjeđenja. Razrjeđenja su rađena u nultom satu te nakon 4., 6., 12. i 24. sata od početka pokusa u omjeru 1:10 te se nacijepilo 100 μ L suspenzije na sladni agar u Petrijevim zdjelicama. Zdjelice su stavljene na inkubaciju tijekom 48 h pri 28 °C. Za određivanje rasta kvasaca korištena je metoda neizravnog (posrednog) određivanja broja živih stanica izražena kao CFU/mL, a svako određivanje broja živih stanica provedeno je u paraleli.



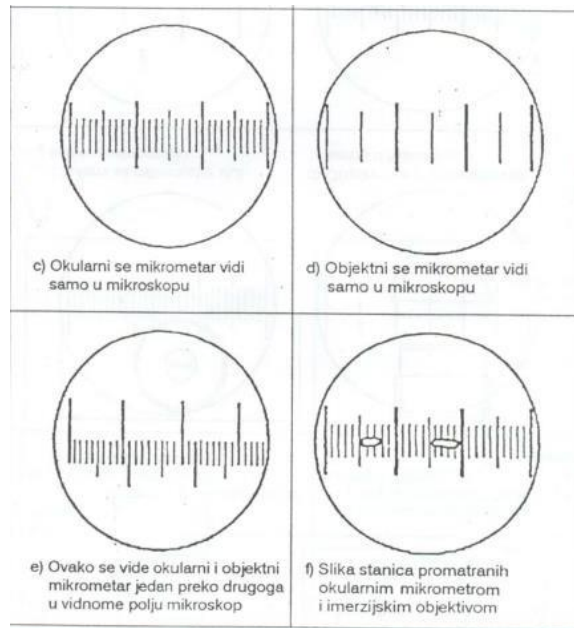
Slika 6. Priprema decimalnih razrjeđenja (Anonymus 6, 2019)

3.2.4. Mikrometrija

Utjecaj OTA na veličinu kvasaca praćen je tijekom 24 sata (0., 4., 6., 12. i 24. sata). Mjerenja su se provodila u paralelama po 100 stanica kvasaca.

Prije mjerenja potrebno je izbaždariiti okularni mikrometar stavljanjem okularnog mikrometra u okular, a objektnog na stolić mikroskopa. Baždarenje za kvasce provodimo pri povećanju od 400x i to tako da se odredi broj podjeljaka objektne skale koji odgovara 100-tom podjeljku okularne skale. Razmak između podjeljaka objektne skale mora biti 10 μm . Faktor povećanja okularnog mikrometra dobije se tako da se podijeli broj podjeljaka objektne skale sa 100 podjeljaka okularne skale i pomnoži s 10. Za svaku kombinaciju okularnog i objektnog mikrometra i mikroskopa potrebno je provesti baždarenje (Duraković i Redžepović, 2002).

Po završetku baždarenja na stolić mikroskopa se stavlja preparat kvasca, a okularni mikrometar ostaje u okularu. Broji se broj podjeljaka koje stanica kvasca zauzima na okularnoj skali i množi se s faktorom povećanja. Iz ovih podataka dobivamo veličinu stanice.



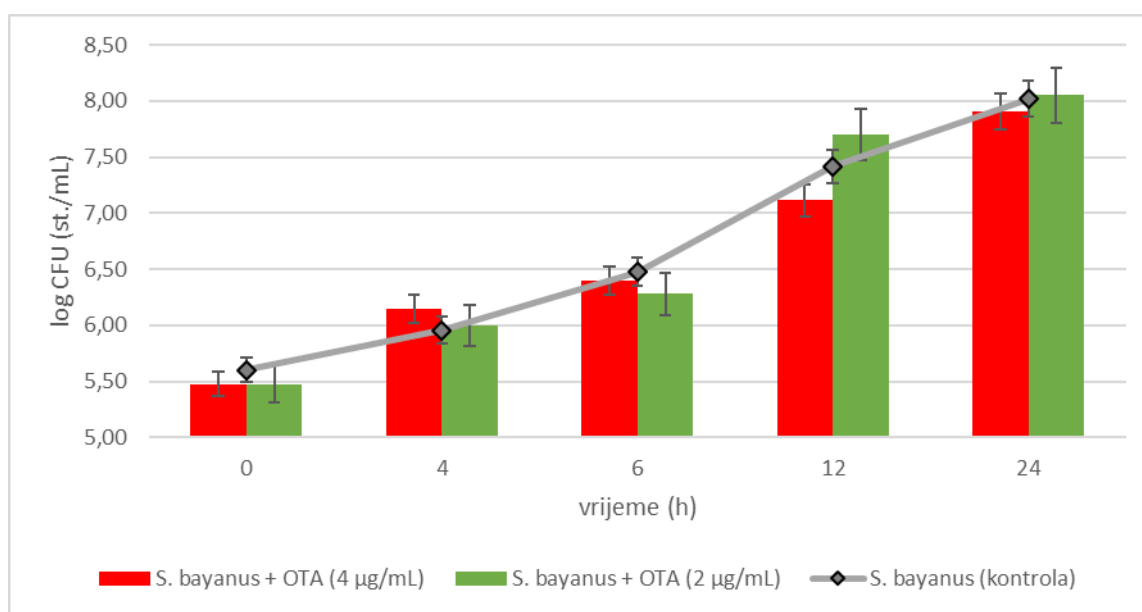
Slika 7. Prikaz okularnog i objektnog mikrometra (Duraković i Duraković, 2001)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Utjecaj OTA na krivulju rasta kvasaca *S. bayanus*, *S. cerevisiae* i *H. uvarum*

Rast kvasaca s dodatkom OTA i bez prisutnosti OTA u mediju, određen je tijekom 24 sata neizravnom metodom određivanja broja živih stanica, brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi (sladnom agaru) u Petrijevim zdjelicama. Rezultati su prikazani na slikama 8 do 10.

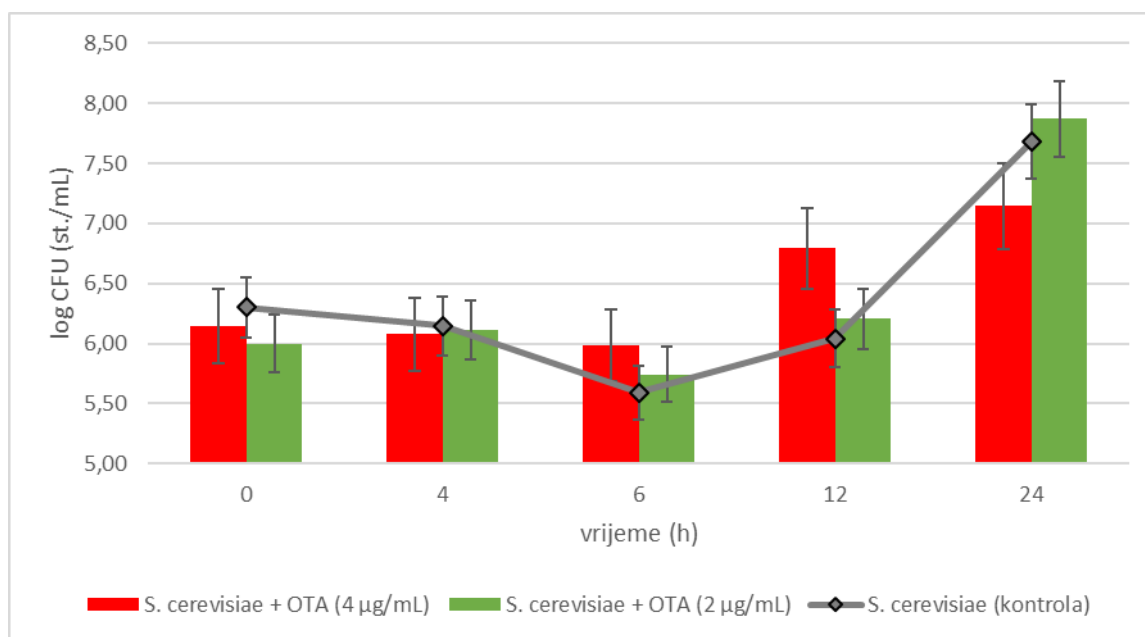
Dobiveni rezultati pokazuju da kvasci u kontrolnom uzorku oblikuju krivulju rasta te se mogu uočiti pojedine faze rasta. Vidljivo je da su svi kvasci dosegli maksimalan broj stanica nakon 24 sata i to *S. bayanus* 8,02 log CFU/mL, *S. cerevisiae* 7,68 CFU/mL, a *H. uvarum* 8,32 log CFU/mL.



Slika 8. Krivulja rasta kvasca *S. bayanus* bez dodanog OTA i s dodanim OTA u koncentracijama od 2 i 4 µg/mL pri 28 °C tokom 24 sata.

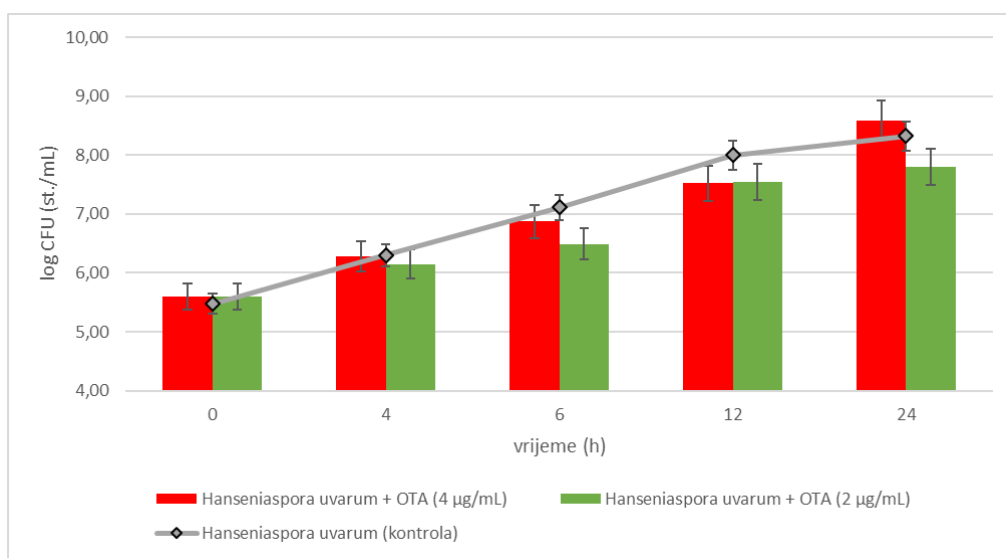
S. bayanus kojem je dodan OTA u koncentraciji od 2 µg/mL lag faza traje do 4.-og sata kada prestaje prilagodba stanica kvasaca i započinje eksponencijalna faza koja traje do 24. sata u kojem broj stanica doseže svoj maksimum. Krivulja rasta kvasca uz dodatak 2 µg/mL OTA prati krivulju rasta kontrolnog uzorka. Maksimalan dosegnut broj stanica iznosi 8,05 log CFU/mL (slika 8).

Također na slici 8 je vidljivo da pri koncentraciji od 4 $\mu\text{g/mL}$ lag- faza prestaje u 4.-om satu, nakon kojega stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta do 24.-tog sata kada je postignut maksimum broja stanica koji iznosi 8,02 log CFU/mL i jednak je kontrolnom uzorku koji nije sadržavao OTA. Iz ovoga je vidljivo da porast broja stanica u uzorcima u koje je dodan OTA prati kontrolu koja ne sadrži dodani OTA.



Slika 9. Krivulja rasta kvasca *S. cerevisiae* bez dodanog OTA i s dodanim OTA u koncentracijama od 2 i 4 $\mu\text{g/mL}$ pri 28 °C tokom 24 sata.

Kod krivulje rasta *S. cerevisiae* prikazane na slici 9, vidljiva je produljena lag faza sve do 12.-tog sata, koju u kontrolnom uzorku prati pad broja stanica u 6. satu. Značajniji pad broja stanica je vidljiv i pri koncentraciji OTA od 2 $\mu\text{g/mL}$. Nakon 12.-og sata krivulja rasta kontrolnog uzorka i uzorka s 2 $\mu\text{g/mL}$ OTA ulazi u eksponencijalnu fazu rasta koja se nastavlja do 24. sata kad je dosegnut maksimalan broj stanica od 7,68 log CFU/mL za kontrolu i 7,87 log CFU/mL za uzorak s koncentracijom OTA od 2 $\mu\text{g/mL}$. Također, na slici 9 je vidljivo da rast kvasca s dodanim OTA u koncentraciji 4 $\mu\text{g/mL}$ ima kraću lag-fazu u odnosu na kontrolni uzorak, odnosno da nakon 6.-tog sata *S. cerevisiae* ulazi u eksponencijalnu fazu. Najveći broj živih stanica postignut je u 24. satu i iznosio je odnosno 7,15 log CFU /mL za uzorak s koncentracijom OTA od 4 $\mu\text{g/mL}$. U 12.-om satu je vidljiva značajna razlika u broju poraslih stanica usporedbom kontrole i uzorka s dodatkom 4 $\mu\text{g/mL}$ OTA što ukazuje na činjenicu da okratoksin A u određenoj koncentraciji utječe na porast broja stanica kvasca *S. cerevisiae*.



Slika 10. Krivulja rasta kvasca *H. uvarum* bez dodanog OTA i s dodanim OTA u koncentracijama od 2 i 4 µg/ml pri 28 °C tokom 24 sata.

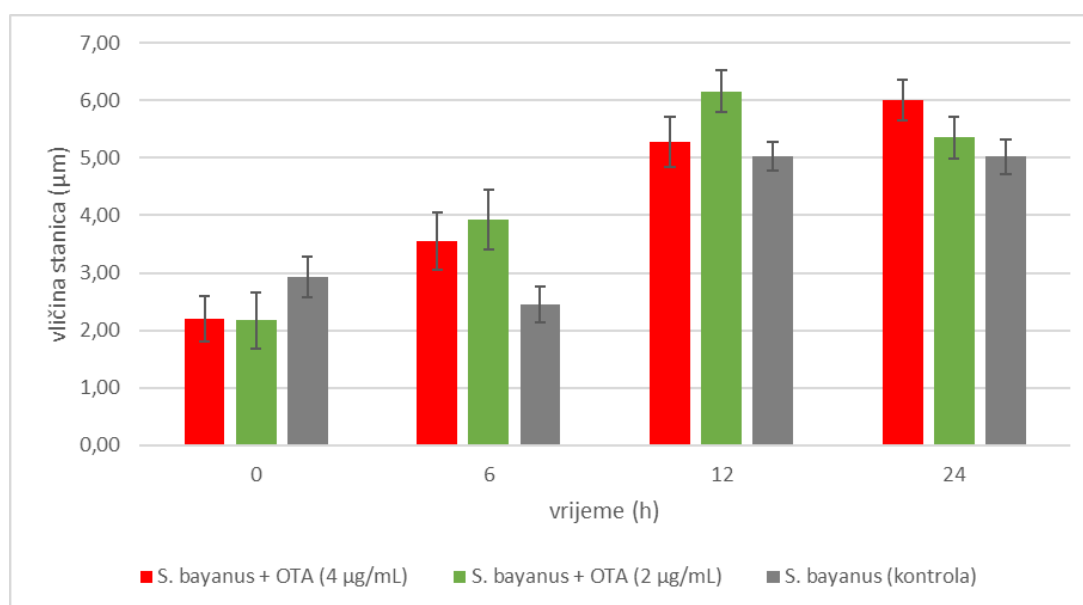
Na slici 10 vidljivo je da prilagodba stanica kvasca *H. uvarum* na uvjete rasta prestaje u 4. satu kada počinje eksponencijalna faza za sva tri uzorka (bez i s dodatkom OTA), a maksimum broja stanica je postignutu 24. satu. Uzorci koji sadrže OTA prate krivulju rasta kontrole. Maksimum broja stanica uzorka bez OTA iznosi 8,32 log CFU/mL, s dodatkom 2 µg/mL 7,80 log CFU/ml a uz 4 µg/mL, 8,58 log CFU/ml.

Prema dosadašnjim istraživanjima dokazano je da kvasci *S. cerevisiae* i *H. uvarum* imaju sposobnost biodegradacije okratoksina razaranjem amidne veze molekule OTA prilikom čega nastaje manje toksični OTα. *S. cerevisiae* i *S. bayanus* imaju sposobnost uklanjanja OTA apsorpcijom i to do 70% ukupno prisutnog mikotoksina. Osim toga uklanja se i prilikom fermentacijskih procesa (Pflieger i sur., 2015). Iz dobivenih rezultata kod sva tri kvasca vidljivo je da uzorci sa dodanim OTA prate porast broja stanica u kontrolnom uzorku koji ga ne sadržava. Stanice su rasle i pri većoj i pri manjoj koncentraciji mikotoksina i to svojstvo leži upravo u sposobnosti kvasca da degradira mikotoksin na manje toksične ili u potpunosti netoksične produkte koji nemaju negativnih utjecaja na rast i razmnožavanje kvasaca.

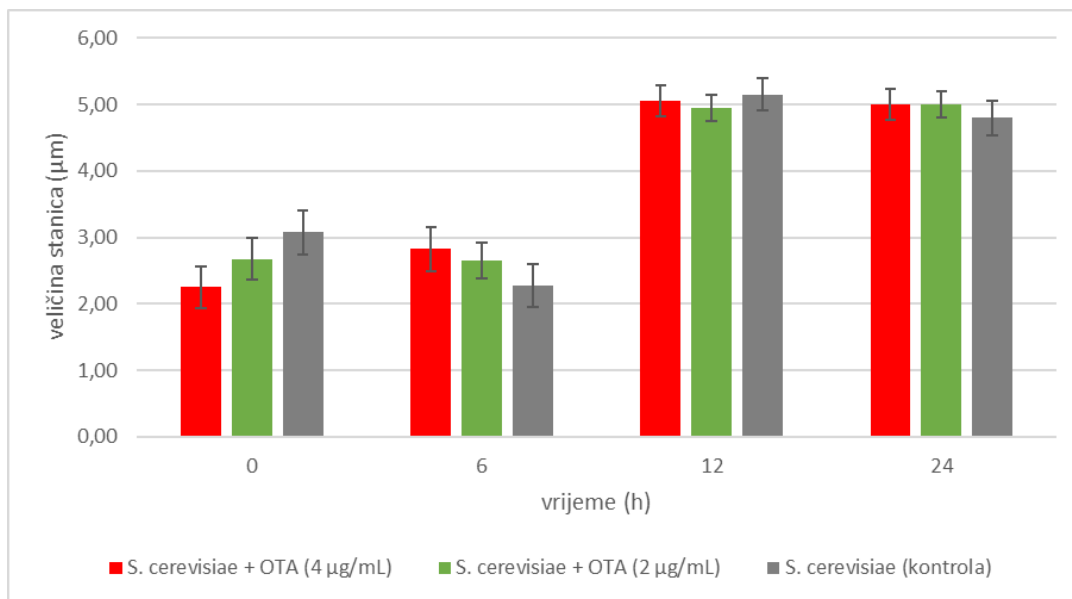
4.2 Utjecaj OTA na morfološke karakteristike kvasaca *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *H. uvarum*

Ispitivanje utjecaja OTA na veličinu stanica kvasaca provedeno je tijekom 24 sata odabirom nasumičnih stanica u mikroskopskim preparatima kontrolnih uzoraka i uzoraka s dodanim OTA. Nasumično je izabrano 100 stanica u paraleli čija veličina je određena pod ukupnim povećanjem od 400x uz upotrebu objektnog i okularnog mikrometra. Utvrđeno je da stanice mijenjaju veličinu u ovisnosti o duljini kontakta s okratoksinom A.

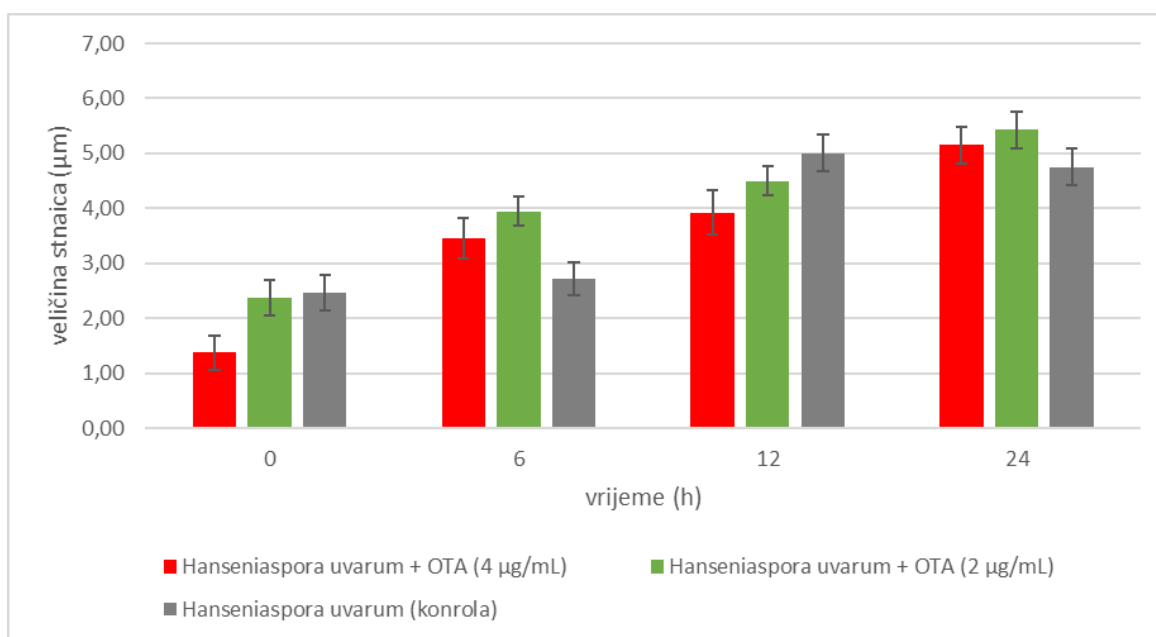
Utjecaj OTA na veličinu stanica kvasaca tijekom 24 sata je prikazan na slikama 11 do 13.



Slika 11. Utjecaj OTA u koncentracijama 2 µg/ml i 4 µg/ml na veličinu stanice kvasca *S. bayanus* tijekom 24 sata



Slika 12. Utjecaj OTA u koncentracijama 2 µg/ml i 4 µg/ml na veličinu stanica kvasca *S. cerevisiae* tijekom 24 sata



Slika 13. utjecaj OTA u koncentracijama 2 µg/ml i 4 µg/ml na veličinu stanica kvasca *H. uvarum* tokom 24 sata

Na slici 11 je prikazan utjecaj OTA na stanice kvasca *S. bayanus*. Vidljivo je da su već nakon 6. sati stanice koje su izložene djelovanju obiju koncentracija OTA (2 µg/mL i 4 µg/mL) veće od stanica kvasaca bez dodataka OTA. Kvasci *S. cerevisiae* i *H. uvarum* prate sličan trend uz neznatno manju razliku naspram kontrolnog uzroka što je prikazano slikama 12, odnosno 13.

Stanice kvasca *S. bayanus* u prisutnosti 2 odnosno 4 µg/mL pokazuju najveću razliku u veličini stanica u 12.-tom i 24.-tom satu kad je vidljiv i pad u veličini stanica u prisutnosti OTA koncentracije 2 µg/mL. Kod *H. uvarum* povećanje veličine stanica se nastavlja nakon 12. sata, a *S. cerevisiae* zadržava istu veličinu stanica kao i kod 12. sata sa zanemarivim razlikama u veličini, što se može objasniti otpuštanjem mikotoksina sa stanične stjenke. Adsorpcijski kapacitet ovisi i o vrsti mikotoksina kao i o vrsti kvasca što uzrokuje razlike u veličini između pojedinih vrsta. Te promjene u veličini stanica kvasca u prisutnosti OTA mogu se možda objasniti mehanizmima vezanja mikotoksina za koje je predloženo da se odvija u dva procesa; vezanje (adsorpcija) te otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice mikroorganizma.

Razlika u veličini kvasaca *S. bayanus* u 24. satu u usporedbi s kontrolom iznosi 16%, odnosno 6% pri koncentraciji OTA od 4 µg/mL odnosno 2 µg/ml. *S. cerevisiae* pokazuje razliku od 4% prema kontroli pri obje koncentracije OTA, a *H. uvarum* razliku od 8% za koncentraciju od 4 µg/ml i 13% za koncentraciju 2 µg/ml.

Iz rezultata je vidljivo da okratoksin A ima različit utjecaj na stanice *S. bayanus*, *H. uvarum* i *S. cerevisiae*. Promjenu u veličini možemo objasniti sposobnošću membrane stanica kvasaca te membranskih komponenti (glukomana, β-D-glukana i manan-oligosaharida) da apsorbiraju brojne komponente iz okoliša pa tako i mikotoksine. Vezanjem i apsorpcijom mikotoksina kroz membranu dolazi do promjene staničnih uvjeta što dovodi do promjene u veličini stanice (Pflieger i sur., 2015; Jakopović i sur., 2017).

Korištenje kvasaca kao agenasa biokontrole protiv sekundarnih gljivičnih metabolita pokazalo se efektivno u uklanjanju i detekciji okratoksina A u svim fazama proizvodnje vina. Kontaminacija je dokazano manja za vrijeme fermentacijskih procesa u kojima su korišteni sojevi *S. bayanus* i *S. cerevisiae* kao najčešće zastupljeni u proizvodnji vina. Nežive stanice su se pokazale efikasnije u dekontaminaciji i sposobnost uklanjanja mikotoksina je bila povećana nakon tretmana stanica visokom temperaturom ili kiselinom sa obzirom da je uklanjanje povezano s adsorpcijom na staničnu stjenku. Danas postoje i brojni komercijalni pripravci koji sadržavaju stanične stjenke kvasaca i pročišćeni β- glukan koji su se pokazali kao najefikasniji u uklanjanju OTA (Pflieger i sur., 2015).

Ipak, djelotvornost živih stanica ne bi se trebala zanemariti. Žive stanice imaju sposobnost fermentacije i degradacije mikotoksina, sadrže probiotičke efekte, manje utječu na organoleptička svojstva. Slična istraživanja su provedena na patulinu, koji je najčešći kontaminant jabuka i proizvoda od jabuka, a dokazano je da neživi kvasci u potpunosti

uklanjaju ovaj mikotoksin, a paralelno ne utječu na parametre kvalitete i organoleptička svojstva proizvoda (Pflieger i sur., 2015).

Iz svih dobivenih rezultata o ponašanju mikotoksina u prisutnosti OTA, otprije poznatom znanju o genetici i biotehnološkim metodama aplikacije kvasaca te novim sortama nastalim genetskom manipulacijom nastaju organizmi još boljih funkcija za uklanjanje mikotoksina. Uz pojedine vrste bakterija, kvasci su organizmi koji najviše obećavaju u području prevencije i dekontaminacije mikotoksina u svim fazama uzgoja i proizvodnje.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

1. Okratoksin A u koncentracijama 2 µg/mL i 4 µg/mL ima slab utjecaj na rast i morfologiju kvasaca *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *H. uvarum*.
2. Utjecaj OTA na broj i veličinu kvasaca ovisi o vremenu izloženosti i koncentraciji OTA.
3. Povećanje veličine stanica može se objasniti adsorpcijom mikotoksina na površinu stanične stijenke kvasca prilikom čega dolazi do promjene u njenoj strukturi.
4. Kvasci *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *H. uvarum* su se prilagodili uvjetima u kojima je prisutan OTA.

6. LITERATURA

Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A. (2009) Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* **20**: 326–333

Anli, E., Bayram, M. (2009) Ochratoxin A in Wines. *Food Reviews International* **25**: 214-232

Anli, E., Mert Alkis, İ. (2010) Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. *Journal of the Institute of Brewing* **116**: 23-32

Anonymus 1 (2007) Ochratoxin A,

<<http://hozir.org/prirodni-toksikanti-biljnog-podrijetla.html?page=4>>Pristupljeno 18.travnja.2020

Anonymus 2 (2020) *Saccharomyces cerevisiae* yeast,

<https://www.123rf.com/photo_108106432_stock-illustration-saccharomyces-cerevisiae-yeast-3d-illustration-microscopic-fungi-bakers-or-brewers-yeast-are-used-as.html>Pristupljeno 18.travnja.2020

Anonymus 3 (2018) Viticulture & enology; *Saccharomyces bayanus*,

<<https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/saccharomyces-bayanus>>Pristupljeno 18. travnja. 2020

Anonymus 4 (2010) *Hanseniaspora uvarum*,

<<https://terroirists.wordpress.com/2010/09/27/microbe-of-the-week-monday-hanseniaspora-uvarum/>>Pristupljeno 21. travnja. 2020

Anonymus 5 (2004) Microbial growth curve,

<<https://microbialgrowth101.weebly.com/growth-curve-of-bacterial-growth-in-phases.html>>Pristupljeno 4. svibnja. 2020

Anonymus 6 (2019) Serial dilution,

<<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/how-microbes-grow/>>Pristupljeno 11. svibnja. 2020

Armando, M. R., Pizzolitto, R. P., Dogi, C. A., Cristofolini, A., (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*, **113**: 256–264.

Bennett, J. W., Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* , **16**: 497–516

Cai, Z., Yang, R., Xiao, H., Qin, X., Si, L. (2012) Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. *Postharvest Biology and Technology* , **100**: 52-58

Cheng, C., Zhang, M., Xue, C., Bai, F., Zhao, X. (2017) Development of Stress Tolerant *Saccharomyces Cerevisiae* Strains by Metabolic Engineering: New Aspects From Cell Flocculation and Zinc Supplementation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , **123**:141-146

Du Plessis, H., Du Toit, M., Nieuwoudt, H., Van der Rijst, M., Hoff, J., Jolly, N. (2019) Modulation of Wine Flavor using *Hanseniaspora uvarum* in Combination with Different *Saccharomyces cerevisiae*, Lactic Acid Bacteria Strains and Malolactic Fermentation Strategies. *Fermentation* , **5**:64

Duraković, S. (1991) Prehrambena mikrobiologija, 1. izd., Medicinska naklada, Zagreb

Duraković, S. (1996) Primjenjena mikrobiologija, 1. izd., Durieux, Zagreb

Duraković, S., Duraković, L. (2001) Mikrobiologija namirnica-osnove i dostignuća. Kugler, Zagreb

Duraković , S., Redžepović, S. (2002) Uvod u opću mikrobiologiju. Knjiga prva. str. 8-368

Duraković, S., Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, 1.izdr., Kugler.

Emmanouil-Nikoloussi, E. Kanellaki-Kyparissi, M. Papavassiliou, P., Koliakos, K., Dermentzopoulou, M., Foroglou, C. (1994). "*Hanseniaspora uvarum*" the ultrastructural morphology of a rare ascomycete, isolated from oral thrush. *Bull. Group. Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol.*, **37**:13–17.

Erten, H., Ağırman, B. , Pelin, C. ,Gündüz, B. , Çarşamba, E. , Sert, S. , Bircan, S. , Tangüler, H. (2014) Food Processing: Strategies for Quality Assessment (Food Engineering Series), 1. izd., Springer. str. 351- 368

Fleet G. H. (1990) Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research*, **3**: 211- 223

García-Martos P., Hernandez-Molina J., Gal M. F. , Ruiz- Henestrosa J., García-Agudo R., Palomo M. J., Mira J. (1999) Isolation of *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) in humans Mycopathologia. *Mycopathologia*, **144**: 73–75

Gonzalez, S. S. , Barrio, E., Gafner, J., Querol, A. (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res* , **6**: 1221–1234

Gospodarski list (2015) Voćna vina, <<http://www.gospodarski.hr/Publication/2015/10/prilogbroja-vona-vina/8241#.WakqwPkgXIU>> Pristupljeno: 21.4.2020.

Gospodarski list (2002) Teškoće u vrenju mošta <<https://gospodarski.hr/uncategorized/teskoce-kod-vrenja-mosta/>> Pristupljeno: 21.4.2020.

HAH (2013) Što su mikotoksini?. HAH - Hrvatska agencija za hranu, <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>> Pristupljeno 18. travnja. 2020.

Herskowitz, I (1988) Life Cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiological reviews*, **52**: 536-553

Hong, Y., Park, H. D. (2013) Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food Microbiology* , **34**: 207-214

Jakopović, Ž., Hanousek Čiča, K., Mrvčić, J., Pucić, I., Čanak, I., Frece, J., Pleadin, J., Stanzer, D. , Zjalić, S., Markov, K. (2017) Properties and Fermentation Activity of Industrial Yeasts

Saccharomyces cerevisiae, *S. uvarum*, *Candida utilis* and *Kluyveromyces marxianus* Exposed to AFB1, OTA and ZEA. *Food Technology & Biotechnology* , **56**: 208-217

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5. izd., Elsevier Science. str. 21-44.

Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* , **34**: 312- 317

Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2008) Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, **124**: 231–238

Ostergaard, S, Olsson, L., Nielsen, J. (2000) Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular biology reviews*, **64**:34-50

Pepeljnjak, S. Cvetnić, Z., Šegvić Klarić, M. (2008.) Okratoksin A i zearalenon : kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977- 2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva*, **3**: 147-159

Petzinger, E. , Weidenbach, A. (2002) Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, **76**: 245–250

Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2015) Mycotoxins– prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology* , **54**: 1-14

Pleadin, J., Frece, J., Vasilj, V., Markov, K. (2015) Fusarium mycotoxins in food and feed. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **10**(1-2): 6-13

Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., Ashikari, T. (2006) Pure and Mixed Genetic Lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and Their Contribution to the Lager Brewing Strain Genome. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(6): 3968-3974

Remiro, R., Ibáñez-Vea, M., González-Penas, E., Lizarraga, E. (2010) Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. *Journal of Chromatography A* , **1217**: 8249–8256

Remiro, R. , González-Peñas, E., Lizarraga, E. , López de Cerain, A. (2012) Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines. *Food Control*, **27**: 139- 145

Varga, J., Kozakiewicz, Z. (2006) Ochratoxin A in grapes and grape – derived products. *Trends in Food Science & Technology*, **17**: 72-81

Vuković, L., Noordzij, I., Jager, M., Rački, K., Bašić Jukić, S., Leko, N., Teskera, N. Jelaković, B. (2014) Endemska (balkanska) nefropatija - međunarodni registar EN REG - preliminarni podaci iz ERA EDTA registra i dva endemska žarišta. *Acta Medica Croatica*, **68** :213-214

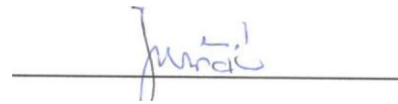
Zeidan, R. , Ul-Hassan, Z., Al-Thani, R., Balmas, V., Jaoua, S. (2018) Application of Low-Fermenting Yeast *Lachancea thermotolerans* for the Control of Toxigenic Fungi *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum* and *Fusarium graminearum* and Their Mycotoxins. *Toxins*, **10**: 242

Wang, C. , Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. (2015) Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **206**: 67-74

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjav/ujem daje ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



ime i prezime studenta