

# Utjecaj okratoksina A na fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca

---

Romac, Anamarija

Master's thesis / Diplomski 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:159:984391>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Anamarija Romac

1258/PI

**UTJECAJ OKRATOKSINA A NA  
FERMENTACIJSKA SVOJSTVA  
ODABRANIH SOJEVA KVASACA**

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, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Željka Jakopovića mag.ing.

## **ZAHVALA**

*Veliku zahvalu dugujem mentorici prof. dr. sc. Kseniji Markov i mag. ing. Željku Jakopoviću, bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.*

*Ovaj rad želim posvetiti svojim roditeljima i obitelji. Hvala vam na podršci i bodrenju u boljim i lošijim trenucima, kroz cijelo moje školovanje. Hvala vam na svim oblicima potpore u nemjerljivim količinama. Neizostavan dio mog studiranja činili su i moji kolege, kojima veliko hvala na pomoći bez koje također ne bih bila gdje jesam. Na kraju, za moje prijatelje, hvala što ste uvijek uz mene.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ OKRATOKSINA A NA FERMENTACIJSKA SVOJSTVA ODABRANIH SOJEVA KVASACA

*Anamarija Romac, 1258/PI*

**Sažetak:** Okratoksin A je sekundarni metabolit plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, a klasificiran je kao potencijalni ljudski karcinogen. Istraživanja su pokazala da određeni sojevi kvasaca mogu smanjiti koncentraciju OTA u raznim medijima. Unatoč tome, utjecaj OTA na produkte fermentativnog metabolizma kvasaca nije istraživan. Stoga je cilj ovog rada istražiti utjecaj OTA na fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae* (5), *Saccharomyces cerevisiae* DMSZ, *Saccharomyces bayanus* (8), *Hanseniaspora uvarum* i *Pichia guilliermondii*, kao i na njihov rast. Pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) određeni su fermentativni produkti kvasaca, a sposobnost njihovog rasta ispitana je određivanjem broja živih stanica u prisutnosti OTA u koncentracijama 2, odnosno 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Iz dobivenih rezultata može se uočiti kako OTA najmanje inhibira fermentacijsku aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ. Najveći broj živih stanica zabilježen je kod kvasca *P. guilliermondii* nakon 24 sata uzgoja.

**Ključne riječi:** mikotoksini, okratoksin A, kvasac, fermentacijski produkti

**Rad sadrži:** 44 stranice, 16 slika, 1 tablicu, 107 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Jadranka Frece
2. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
3. Prof.dr.sc. Jasna Mrvčić
4. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić (zamjena)

**Datum obrane:** dan, rujna, 2020

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF OKRATOXIN A ON THE FERMENTATION PROPERTIES OF SELECTED YEAST STRAINS

*Anamarija Romac, 1258/PI*

**Abstract:** *Ochratoxin A is a secondary metabolite of molds that belong to Aspergillus and Penicillium genera, and is classified as a potential human carcinogen. Studies have shown that certain strains of yeasts can reduce the concentration of OTA in various media. However, the influence of OTA on the products of fermentative yeast metabolism has not been investigated, therefore the aim of this study is to investigate the influence of OTA on fermentation properties of selected yeast strains: Saccharomyces cerevisiae (5), Saccharomyces cerevisiae DMSZ, Saccharomyces bayanus (8), Hanseniaspora uvarum and Pichia guilliermondii, as well as on their growth. Yeast fermentation products were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), and their growth ability was examined by determining the number of living cells in the presence of OTA at concentrations of 2 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . From the obtained results it can be noticed that OTA least inhibits the fermentation activity of the yeast Saccharomyces cerevisiae DSMZ. The highest number of living cells was recorded in the yeast P. guilliermondii after 24 hours of cultivation.*

**Keywords:** *mycotoxins, ochratoxin A, yeast, fermentation products*

**Thesis contains:** 44 pages, 16 figures, 1 table, 107 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

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

**Technical support and assistance:** *Željko Jakopović, MSc.*

#### Reviewers:

1. PhD. *Jadranka Frece*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Markov*, Full professor
3. PhD. *Jasna Mrvčić*, Full professor
4. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** day September 2020.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>2</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. MIKOTOKSINI</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Okratoksin A (OTA).....	4
<b>2.2. KVASCI</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
2.2.2. <i>Saccharomyces bayanus</i> .....	8
2.2.3. <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	10
2.2.4. <i>Pichia guilliermondii</i> .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>14</b>
3.1.1. Mikroorganizmi .....	14
3.1.2. Hranjive podloge.....	14
3.1.3. Mikotoksin i kemikalije .....	15
3.1.4. Pribor i aparatura.....	15
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>16</b>
3.2.1. Standard OTA .....	16
3.2.2. Priprema kultura kvasaca.....	16
3.2.3. Određivanje fermentacijskih produkata kvasaca u prisutnosti OTA .....	16
3.2.4. Određivanje preživljavanja kvasaca u prisutnosti OTA.....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1. FERMENTACIJSKI METABOLITI KVASACA U PRISUTNOSTI OTA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2. PREŽIVLJAVANJE ODABRANIH SOJEVA KVASACA U PRISUTNOSTI OTA</b> .....	<b>27</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>32</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>33</b>



# 1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma toksikotvornih plijesni, do čije sinteze dolazi prilikom rasta plijesni na nizu različitih supstrata. Okratoksin A (OTA) se smatra jednim od najopasnijih mikotoksina te je prema IARC-u svrstan u skupinu 2B i klasificiran kao mogući ljudski karcinogen (IARC, 1993). Prisutnost OTA detektirana je u mnogim poljoprivrednim kulturama, kao što su žitarice, kakao, kava, soja i grožđe, a zbog izuzetne stabilnosti može biti prisutan i u njihovim proizvodima. Istraživanja su pokazala kako OTA posjeduje različita toksična svojstva (nefrotoksičnost, karcinogenost, mutagenost, neurotoksičnost) i povezan je s određenim bolestima urinarnog sustava u ljudi.

Kvasci imaju važnu primjenu u proizvodnji fermentirane hrane i pića te u biotehnološkoj proizvodnji npr. etanola. Međutim, brojni stresni faktori (uključujući mikotoksine) mogu imati utjecaj na fermentacijsku aktivnost kvasaca (Foszczyńska i Dziuba, 2007a). Prisutnost mikotoksina, osim usporavanja fermentacije, može utjecati i na količinu hlapljivih nusproizvoda fermentacije (Kłosowski i Mikulski, 2010). Unatoč tome, mnogi kvasci mogu se prilagoditi na nepovoljne uvjete (Foszczyńska i sur., 2008; Petruzzi i sur. 2015; Freire i sur., 2019).

Provedena su istraživanja o upotrebi kvasaca u biokontroli, biorazgradnji, uklanjanju ili vezanju mikotoksina, ali podaci o učincima mikotoksina na kvasce, njihovu morfologiju, parametre rasta te metaboličku aktivnost su rijetki. Posljednjih godina provodio se niz istraživanja kako bi se procijenila interakcija između toksina i stanica kvasaca. U većini njih pažnja je posvećena određivanju utjecaja toksina na rast kvasca. Dokazano je, između ostalog, da mikotoksini nepovoljno utječu na proliferaciju i održivost stanica kvasca (Boeira i sur., 2000). Međutim, malo je podataka o ponašanju kvasaca tijekom fermentacije medija kontaminiranog mikotoksinima, kao i o utjecaju mikotoksina na proizvode fermentacije. Neki autori izvijestili su da mikotoksini inhibiraju aktivnost alkohol-dehidrogenaze i posljedično fermentaciju te da utječu na proizvodnju hlapljivih nusprodukata fermentacije (Dziuba i sur., 2007; Kłosowski i sur., 2010; Kłosowski i Mikulski, 2010).

Cilj ovog rada je proširiti istraživanje i dosadašnje pokušaje u shvaćanju utjecaja OTA na fermentacijske proizvode odabranih sojeva kvasaca, kao i na njihov rast.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni metaboliti koje proizvode mnoge važne fitopatogene gljive i plijesni, uključujući i plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Alternaria* (IARC, 2002). Njihova biosinteza ovisi o vrsti toksikotvorne plijesni, o klimatskim i okolišnim uvjetima te fizikalno-kemijskim čimbenicima. Od dvjestotinjak do sada poznatih mikotoksina, kao kontaminanti hrane, najznačajniji su: aflatoksini (AFB<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>), okratoksini (OT), zearalenon (ZEA, F-2), fumonizini (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (HAPIH, 2013). Bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze, a mogu biti akutne i/ili kronične te pokazuju razne toksične učinke poput hepatotoksičnosti, nefrotoksičnosti, kancerogenosti, imunotoksičnosti i dermatotoksičnosti (Kłosowski i Mikulski, 2010). Zbog raznolikih toksičnih svojstava, mikotoksini mogu utjecati na fiziološke procese viših organizama (Diaz, 2005), a osim toga mogu utjecati i na mikroorganizme poput kvasca (Kłosowski i Mikulski 2010).

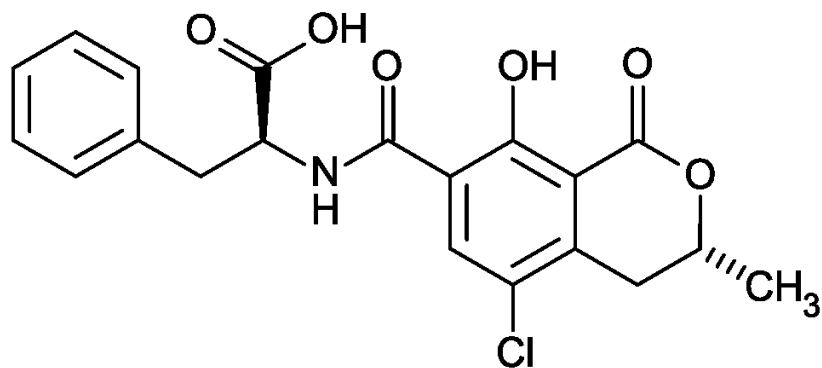
Najčešći izvori mikotoksina u hrani su: žitarice, brašno, kruh, mahunarke, riža, mlijeko i mliječni proizvodi, meso i suhomesnati proizvodi, masline i maslinovo ulje, kava, suho voće, vino, pivo, sokovi, začini i čajevi (HAPIH, 2013). Usjevi žitarica podložni su kontaminaciji prije i za vrijeme žetve, ali i tijekom skladištenja. Obzirom da su otporni na širok spektar okolišnih čimbenika, podvrgavaju se sporij degradaciji (Pfliegler i sur., 2015). Kontaminacija mikotoksinima i sinteza mikotoksina u hrani mogu se pojaviti u svim fazama proizvodnje i prerade, a ovise o čimbenicima kao što su temperatura, relativna vlaga, prisutnost insekata, primjena fungicida i pesticida, pH, prisutnost antimikrobnih tvari, dostupnost hranjivih tvari itd. (Freire i sur., 2019).

Najviše dopuštene količine mikotoksina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  jestivog dijela namirnice) u hrani i hrani za životinje u RH propisane su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/12) te Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/10, NN 111/10, NN 124/12). FAO (eng. *The Food and Agriculture Organization*) ističe da je oko 25 % svjetske proizvodnje žitarica kontaminirano mikotoksinima koji mogu ozbiljno utjecati na zdravlje životinja, odnosno zdravlje ljudi (Peraica i Domijan, 2001).

### 2.1.1. Okratoksin A (OTA)

Okratoksin A je sekundarni metabolit plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, a kemijski su opisani kao 3,4-dihidrometilizokumarinski derivati povezani amidnom vezom na aminoskupinu L-fenilalanina (Cole i Cox, 1981). Okratoksin A (OTA) je najzastupljeniji i najtoksičniji iz ove skupine mikotoksina, koja također uključuje okratoksin B (OTB), okratoksin C (OTC), 4-hidroksi-okratoksin A (OH-OTA), metil estere OTA, OTB i OTC te derivate poput dihidrometil-izokumarinske karboksilne kiseline (Ringot i sur., 2006).

Okratoksin A je izvorno opisan kao metabolit plijesni *Aspergillus ochraceus*, a povremeno ga može tvoriti *Aspergillus niger* te, nešto češće, *Aspergillus carbonarius* (Pitt, 2000). Okratoksin A bezbojan je kristaličan spoj, koji pod UV svjetlom pokazuje plavu fluorescenciju. Sastoji se od dihidroizokumarinske jezgre povezane s L-β-fenilalaninom preko 7-karboksilne skupine (Slika 1). Do njegove biosinteze može doći tijekom rasta navedenih toksikotvornih plijesni na žitaricama (primarno na onima koje prije uskladištenja nisu prikladno osušene), ali i u nekim drugim namirnicama biljnoga i animalnoga podrijetla (žitarice, pivo, svinjsko meso, sirova i pržena kava, kakao, crno vino, čaj i dr.) (Šarkanj i sur., 2010).



Slika 1. Strukturna formula okratoksina A (HAPIH, 2013.)

Međunarodna agencija za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer*) klasificirala je okratoksin A kao potencijalno kancerogen spoj za ljude (skupina 2B) (IARC, 1987; 1993). OTA uglavnom uzrokuje toksične učinke koji zahvaćaju bubrege i jetru, s imunosupresivnom, teratogenom te genotoksičnom aktivnošću, a utječe i na koagulaciju krvi i na metabolizam ugljikohidrata. OTA se često pronalazi u visokim koncentracijama u uzorcima krvi

ljudi koji žive u balkanskim zemljama te se smatra da je razlog tome balkanska endemska nefropatija, obostrana kronična bolest bubrega (Radovanović, 1991; Pfohl-Leszkowicz i sur., 2002; Gagliano i sur., 2006). Kao posljedica duže izloženosti, OTA može izazvati akutno zatajenje bubrega zbog oštećenja funkcije proksimalnih tubula, što uzrokuje smanjenje ili gubitak funkcije bubrega. Osim bolesti bubrega, višestruko su učestale maligne bolesti mokraćovoda i nakapnice.

Budući da je OTA topiv u mastima i ne izlučuje se lako, akumulira se u masnoćama životinja, a odatle se prenosi na ljude koji konzumiraju meso. Drugi potencijalni izvor zaraze je kruh izrađen od ječma ili pšenice koja sadrži OTA (Pitt, 2000). Što se tiče prehrambenog aspekta, OTA je uobičajen onečišćivač žitarica poput ječma, kukuruza, raži, pšenice i zobi (Meca i sur., 2010), a zabilježen je i u drugim biljnim proizvodima, uključujući zrna kave, grah, začine, orahe, masline, grožđe, grah i smokvu (O'Callaghan i sur., 2006).

OTA je stabilna molekula, koja može preživjeti većinu procesa obrade hrane poput pečenja, kuhanja ili prženja (Krogh i sur., 1974). Razvijeno je nekoliko kemijskih i fizikalnih metoda (hipokloritna obrada, amonizacija i toplinska obrada) za detoksikaciju OTA u stočnoj hrani ili alkoholnim pićima. Ostale metode detoksikacije sugeriraju upotrebu ozona, gama zračenja i alkalnog tretmana hidrogen peroksidom u žitaricama (Refai i sur., 1996; Janos i sur., 2000). Najčešće korištena tehnika smanjenja izloženosti mikotoksinima je smanjenje količine njihove bioraspoloživosti, što uključuje uporabu različitih sredstava za vezanje ili adsorbensa. Adsorbensi za uklanjanje okratoksina A mogu biti mineralni i organski kao aktivni ugljen, silikatni poput bentonita, sintetički polimeri kao polivinilpirolidon te biološki koji se pokazuju od najvećeg značaja (Jard i sur., 2011).

U posljednjih nekoliko desetljeća, provedena su različita ispitivanja vezana uz biološko uklanjanje OTA (Bejaoui i sur., 2004; El-Nezami i sur., 1998; Škrinjar i sur., 2002; Piotrowska i Zakowska, 2000). Istraživanja su pokazala da određeni sojevi kvasaca i njihove stanične stijenke mogu adsorbirati OTA (i neke druge mikotoksine) (Cecchini i sur., 2006). Pokazalo se da esterificirani glukomananski polimer ekstrahirani iz stanične stijenke kvasca veže OTA (Bejaoui i sur., 2004; Cecchini i sur., 2006; Angioni i sur., 2007) i kao takav predstavlja potencijalnu primjenu za smanjenje koncentracije OTA. Istraživanje Bejaoui i sur. (2004) pokazuje da su enološki sojevi kvasaca uspjeli ukloniti OTA iz različitih sintetičkih medija, točnije, izvijestili su

o 90 %-tnom smanjenju OTA sojevima kvasaca *Saccharomyces* na 30 °C tijekom 72 h. U istraživanju Cecchini i sur. (2006) pokazalo se kako su sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. bayanus* i *Schizosaccharomyces pombe* uspješno smanjili sadržaj OTA u crnom vinu. Pokazali su da je osim fenomena adsorpcije između OTA i stanica kvasca, moguća i neovisna interakcija OTA i ostalih metaboličkih spojeva, proizvedenih kvascem. Petruzzi i sur. (2015) pokazali su da uklanjanje OTA ovisi o primijenjenom soju, ali i da se OTA uklonjen iz medija može nakon adsorpcije otpustiti nazad u medij.

*Trichosporon mycotoxinivorans* je soj kvasca koji se razvija za komercijalnu upotrebu detoksikacije OTA u stočnoj hrani (Molnar i sur., 2004).

Razgradnja OTA mikroorganizmima je također zabilježena u literaturi, korištenjem *Acinetobacter calcoaceticus* i *Aspergillus* vrsta u alkoholnim medijima (Varga i sur., 2000), a u jogurtu i mlijeku korištenjem bakterija mliječne kiseline sojeva *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* (Škrinjar i sur., 2002; Hassan i sur., 2016). Određene bakterije, plijesni, kvasci i biljke mogu transformirati OTA u OTA $\alpha$ , manje toksičan spoj, koristeći enzime karboksipeptidaze (Abrunhosa i sur., 2002; Péteri i sur., 2007). Određene vrste plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Penicillium* posebno su učinkovite u uklanjanju OTA (Varga i sur., 2000; Abrunhosa i sur., 2002; Bejaoui i sur., 2005).

## 2.2. KVASCI

Kvasci su nefotosintetski jednostanični mikroorganizmi, ovalnog oblika te imaju više staničnih organela koji su karakteristični za eukariotske stanice, a uključuju jezgru okruženu nuklearnom ovojnicom, glatki i grubi endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, mitohondrije i vakuole (Aranda i sur., 2011).

Kvasci su izuzetno osjetljivi na promjene u uvjetima okoline. Nepovoljni uvjeti uzrokuju stres, a njegov učinak je smanjenje fermentacijske aktivnosti. Stres za kvasac predstavlja niska koncentracija kisika u početnoj fazi fermentacije, visoka temperatura, naglo hlađenje ili visoki osmotski tlak. Stresori su spojevi koji inhibiraju fiziološku aktivnost stanica, npr. etanol ili CO<sub>2</sub> izlučeni tijekom fermentacije. Takve tvari (stresori) mogu biti i mikotoksini (Foszyńska i Dziuba, 2007a).

OTA utječe na fiziološke procese kvasaca samo u prvoj fazi fermentacije te umanjuje metabolizam slobodnog amino dušika (eng. *Free Amino Nitrogen*), ovisno o odabranom soju kvasca (Foszyńska i Dziuba, 2007a,b; Dziuba i sur., 2007). Sojevi kvasca *S. cerevisiae* se smatraju učinkovitima u smanjenju koncentracije OTA. Smanjenje koncentracije OTA tijekom fermentacijskih procesa može biti povezano i sa snažnom adsorpcijom mikotoksina u stanične stijenke kvasca ili matrice (Freire, 2019).

### 2.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Stanice kvasca roda *Saccharomyces* imaju rigidnu staničnu stijenkicu što im omogućuje da se odupru promjenama osmotskog tlaka koji se može pojaviti u izvanstaničnom okruženju. Vakuole su važne za homeostazu, budući da su enzimi koji sudjeluju u razgradnji i oporavku staničnog sadržaja većinom ili isključivo lokalizirani u tim strukturama (Aranda i sur., 2011).

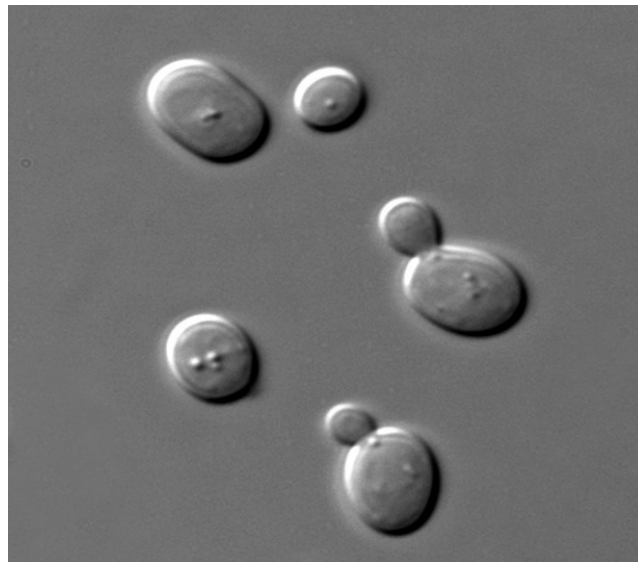
Kvasci roda *Saccharomyces* mogu formirati pseudomicelij ili biofilm na tekućim medijima, askospore su im najčešće sferičnog ili ovalnog oblika te fermentaciju provode intenzivno bez asimilacije nitrata. *Saccharomyces cerevisiae* fermentira galaktozu, saharozu, maltozu i rafinozu, ali ne fermentira škrob i melibiozu (Kreger-van Rij, 1984) te ne može koristiti laktozu kao izvor ugljika (Caballero i sur., 1995). Zbog visoke proizvodnje etanola, visoke tolerancije na etanol i sposobnosti fermentacije širokog raspona šećera, *Saccharomyces cerevisiae* uobičajeni je mikroorganizam u proizvodnji etanola (Sengupta i sur., 2020).

Flora povezana s vinarskom opremom u velikoj se mjeri sastoji od kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Ovaj soj kvasca pokazuje veću otpornost na visoke temperature pa nakon tri do četiri dana fermentacije postaju dominantna vrsta i u konačnici su odgovorni za alkoholno vrenje (Fleet i Heard, 1993, Moreira i sur., 2008). Ta promjena populacije kvasca povezana je sa sve većom prisutnošću etanola, anaerobnim uvjetima, prisutnošću sulfita te koncentracijom šećera, što doprinosi rastu *S. cerevisiae* (Aranda i sur., 2011).

Sadržaj dušika je bitan faktor jer ima tendenciju ograničavanja rasta *S. cerevisiae* i predstavlja glavni uzrok inhibirane fermentacije (Aranda i sur., 2011). Kada su prisutne iznad određenih koncentracija, masne kiseline kratkog do srednjeg lanca mogu djelovati kao inhibitori rasta i preživljavanja *S. cerevisiae*, također uzrokujući inhibiciju fermentacije (Fleet i Heard, 1993).

Tijekom procesa fermentacije, stanice kvasca su izložene raznim stresorima, poput nakupljanja etanola, visoke temperature, visokog osmotskog stresa, velike količine šećera i oksidacije. Pritom, nakupljanje etanola može biti glavni inhibitor procesa fermentacije. Stanice *S. cerevisiae* mogu preuređivati komponente ili strukture membrane kako bi se prilagodile etanolnom stresu (Wang i sur., 2015). *S. cerevisiae* može tolerirati koncentracije etanola do između 115 i 200 g L<sup>-1</sup> (Luong, 1985). Zearalenon i OTA su usporili sintezu etanola sa *S. uvarum* i *Kluyveromyces marxianus* u istraživanju Jakopović i sur. (2018), dok je *S. cerevisiae* pokazao najveću otpornost prema mikotoksinima tijekom fermentacije.

*S. cerevisiae* proizvodi etanol, ugljični dioksid i brojne nusprodukte, uključujući više alkohole i estere (Rapp and Mandery, 1986). Uz biomasu i CO<sub>2</sub>, glicerol je glavni metabolički nusprodukt tijekom alkoholne fermentacije sa *S. cerevisiae*. Metabolizam glicerola i etanola u *S. cerevisiae* usko je povezan, a proizvodnja etanola može se povećati nakon smanjenja metabolizma glicerola (He i sur., 2014). Velika količina glicerola proizvede se u ranim fazama fermentacije (Favale i sur., 2007).



Slika 2. *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymus 1, 2010)

### 2.2.2. *Saccharomyces bayanus*

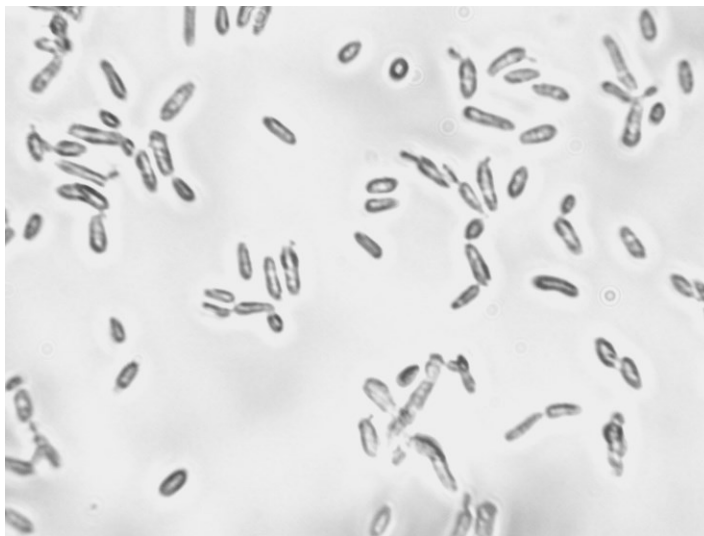
Kvasac *Saccharomyces bayanus* može fermentirati i melibiozu, ne asimilira nitrata i obično je kriofilan (Naumov, 2000) pa se tako razvija u moštu fermentiranim pri niskim

temperaturama (Benítez i sur., 2011). Hladna fermentacija postaje sve popularnija jer daje vrlo zanimljiva aromatična svojstva proizvedenim vinima pa kvasci vrste *S. bayanus* stoga postaju sve interesantniji. To se događa zbog većeg zadržavanja hlapljivih tvari nastalih tijekom fermentacije te utjecaja temperature na metabolizam kvasca (González i sur., 2011). Stoga temperatura za uzgoj, hibridizaciju i sporulaciju ne smije biti veća od 26 °C, a pretpostavlja se da sadrži nukleotidne sekvence tipične za gene *S. cerevisiae* (Naumov, 2000). Osim toga, u proizvodnji vina su zanimljivi zbog visoke pektinolitičke aktivnosti (Naumova i sur., 2019).

Kvasci ove vrste dominiraju u vinima iz regija s kontinentalnom klimom (Fernández-Espinar, 2011), a izvorno su izolirani iz piva (González i sur., 2006). U Europi se obično povezuju s proizvodnjom bijelih, slatkih i pjenušavih vina, kao i jabučnog vina (cider) (Naumova i sur., 2019). *S. bayanus* posebno je otporan na nepovoljne uvjete kao što su prisutnost sumporovog dioksida, niske pH vrijednosti i niske temperature. Tolerantan je na visoki osmotski pritisak (visoke koncentracije šećera) i na visoke koncentracije alkohola (Anonymus 2, 2018). Doduše, hibridna priroda i raznolikost sojeva *S. bayanus* otežava predviđanje njihovih metaboličkih sposobnosti (Rainieri, 2006).

Proizvodnja vina ledene berbe (njemački: Eiswein), čiju fermentaciju provodi *S. bayanus*, povezana je s proizvodnjom visokih razina glicerola i octene kiseline u konačnom proizvodu (Pigeau i Inglis, 2005). Ova kriotolerantna vrsta stvara veće količine glicerola i manje octene kiseline od *S. cerevisiae* (Bellon i sur., 2015; Masneuf-Pomarède i sur., 2010). 96 % ispitivanih autohtonih sojeva *S. bayanus*, od 74 ukupnih, u istraživanju Bedriñana i sur. (2017) klasificirani su kao niski ili srednji proizvođači octene kiseline i skoro nijedan nije prepoznat kao visoki proizvođač octene kiseline.





Slika 3. *Saccharomyces bayanus* (Anonymus 2, 2018)

### 2.2.3. *Hanseniaspora uvarum*

Kvasci roda *Hanseniaspora* imaju stanice obično u obliku limuna, askospore u obliku šešira ili sferične te provode fermentaciju bez asimiliranja nitrata. *Hanseniaspora uvarum*, najprisutniji kvasac na grožđu (Fleet i Heard, 1993), umire tijekom fermentacije ili ubrzo nakon nje (Bisson i van de Water, 2010). Može fermentirati isključivo glukozu, ima nisku fermentativnu aktivnost (Jolly i sur., 2014), a asimilira celobiozu kao izvor ugljika (Kreger-van Rij, 1984). *H. uvarum* je jedan od najčešće izoliranih kvasaca koji koloniziraju zrelo voće i uzrokuju njihovo fermentacijsko kvarenje pa tako ovaj soj kvasca prevladava kao glavna vrsta kvasca u početku prirodnih fermentacija voćnih sokova (Cadez i Smith, 2011). Nekoliko autora predložilo je da njegova prisutnost u početnim fazama fermentacije vina pridonosi složenijoj aromi zbog velike proizvodnje aromatskih spojeva (Ciani i Maccarelli, 1997; Romano i sur., 1997). *H. uvarum* jedan je od sojeva koji proizvodi najviše izvanstaničnih enzima, a važan je i u proizvodnji vina gdje se također koristi zajedno sa *S. cerevisiae* zbog proizvodnje poželjne količine hlapljivih spojeva (Jolly i sur., 2014).

Metaboličke interakcije između vinskih kvasaca koji nisu *Saccharomyces* roda i *S. cerevisiae* tijekom fermentacije mogu pozitivno utjecati na rast i fermentacijsko ponašanje kvasaca, osobito *S. cerevisiae*. Fruktozofilni apikulatni (limoniformni) vinski kvasci, poput *H. uvarum*, zapravo bi trebali poboljšati potrošnju šećera od strane *S. cerevisiae* (koji je

glukozofilan), izbjegavajući moguće zaostatke šećera u vinu, posebno fruktoze (Ciani i Fatichenti, 1999).

*H. uvarum* ne provodi aerobnu alkoholnu fermentaciju u prisutnosti viših koncentracija glukoze, ali kao nusprodukte proizvodi glicerol i acetat (Venturin i sur., 1995). U istom radu, uočena je sekvencijalna proizvodnja metabolita; glicerol u prvoj fazi, glicerol i acetat u drugoj fazi i glicerol, acetat i etanol tijekom zadnje faze fermentacije. Također je primijećeno da proizvodnja acetata i glicerola utječe na pretvorbu ugljika u biomasu i smanjuje iskorištenje procesa.

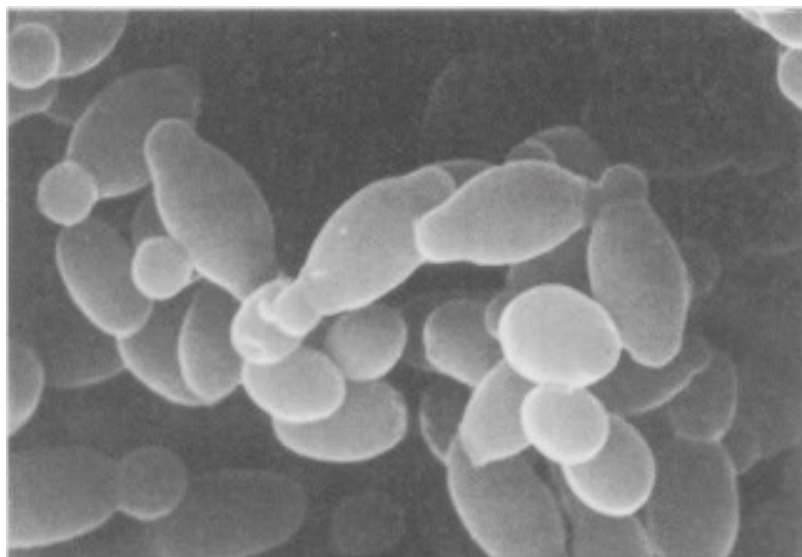
Ciani i Picciotti (1995) isključili su mogućnost upotrebe apikulatnih kvasaca u proizvodnji vina zbog proizvodnje velikih količina etil acetata i octene kiseline, kao i Plata i sur. (2003), Rojas i sur. (2003) te Romano i sur. (2003). Proizvodnja octene kiseline apikulatnim vinskim kvascima široko je proučavana; općenito, ovi kvasci proizvode visoku razinu octene kiseline u odnosu na količinu sintetiziranog etanola (Ciani i Picciotti, 1995; Ciani i Maccarelli, 1997). Temperatura fermentacije je još jedan važan čimbenik koji utječe na konačni prinos octene kiseline (Wang i sur., 2013).

*Hanseniaspora guilliermondii* i *Hanseniaspora uvarum* mogu narasti  $10^6$ - $10^8$  stanica mL<sup>-1</sup> tijekom prvih 4-6 dana fermentacije, nakon čega odumiru uglavnom kao rezultat povećane koncentracije etanola proizvedenog od strane *S. cerevisiae*, koji ima veću fermentacijsku aktivnost i toleranciju na etanol. Općenito, vrste *Hanseniaspora* koje se nalaze u soku od grožđa nisu tolerantne na koncentracije etanola veće od 4-7 % (Fleet, 2003). Nakon rane faze fermentacije, *S. cerevisiae*, s većom tolerancijom na etanol, postaje dominantan soj kvasca i zadržava svoju aktivnost do kraja fermentacije (Moreira i sur., 2008).

U istraživanju Moreira i sur. (2011), *H. uvarum* je potrošio šećer u potpunosti nakon 6-8 dana fermentacije, dostigavši konačnu koncentraciju etanola od 12,5 % (v/v). Rod *Hanseniaspora* smatra se manje učinkovitim u proizvodnji etanola od *Saccharomyces* roda (Diaz- Montaño i sur., 2008).

U istraživanju Moreira i sur. (2008) čista kultura *H. uvarum* dovela je do vina s najvišim sadržajem estera octene kiseline, dok taj spoj nije otkriven u vinima dobivenim čistom kulturom *S. cerevisiae* ili mješovitim kulturama apikulatnih kvasaca sa *S. cerevisiae*. U vinima

proizvedenim s apikulatnim kvascima poput *H. uvarum*, pronalazi se visoka razina etil acetata u zbog velike proizvodnje octene kiseline, kao i razine prozračivanja tijekom fermentacije. Etil acetat je glavni ester koji se pojavljuje u vinu i ima neugodan, octikav miris (Moreira i sur., 2011), a nastaje iz octene kiseline.

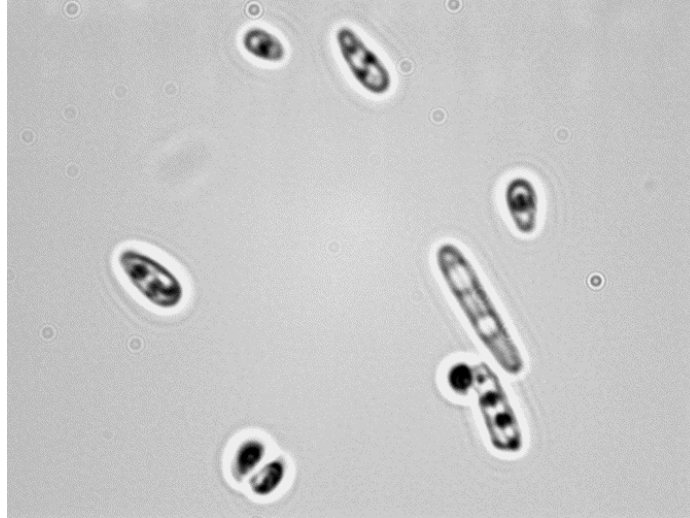


Slika 4. *Hanseniaspora uvarum* (Ribéreau-Gayon i sur., 2006)

#### 2.2.4. *Pichia guilliermondii*

Kvasci iz roda *Pichia* često tvore pseudomicelij s oskudnim brojem pravih hifa te mogu, ali i ne moraju provoditi fermentaciju. *Pichia guilliermondii* ne fermentira maltozu i laktozu (Kreger-van Rij, 1984), ne asimilira nitrate, ne proizvodi estere, ne sintetizira škrob te zahtijeva vanjski izvor vitamina (Wickerham, 1966). Također je biološko sredstvo za suzbijanje bolesti plodova poslije žetve pa tretman plodova s ovim kvascem učinkovito kontrolira pojavu truleži uzrokovanu plijesni iz roda *Rhizopus* i plave plijesni na plodovima breskve (Zhao i sur., 2020).

U radu Fonseca i sur. (2007), *P. guilliermondii* postupno je formirala etanol iz glukoze, ali i glicerol i acetat u tragovima. U kvascima iz roda *Pichia*, veće koncentracije glukoze pogodovale su proizvodnji etanola, a ne proizvodnji glicerola. (Petrovska i sur., 1999).



Slika 5. *Pichia guilliermondii* (Anonymus 3, 2018)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Prilikom ispitivanja utjecaja OTA na fermentacijska svojstva i preživljavanje kvasaca, korišteni su sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* (5), *Saccharomyces cerevisiae* DMSZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH), *Saccharomyces bayanus* (8), *Hanseniaspora uvarum* i *Pichia guilliermondii*, dobiveni iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Kulture kvasaca pohranjene su u glicerolu na -20 °C, a prije postavljanja pokusa, kulture kvasaca su revitalizirane tijekom 48 h pri 28 °C, kako bi se odredio početni broj živih stanica kvasaca.

##### 3.1.2. Hranjive podloge

Za uzgoj i praćenje preživljavanja kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* (5), *Saccharomyces cerevisiae* DMSZ, *Saccharomyces bayanus* (8), *Hanseniaspora uvarum* i *Pichia guilliermondii*, korišteni su YPG (eng. *Yeast Peptone Glucose*) bujon (Biolife, Italija) odnosno sladni agar (Biolife, Italija) pripremljeni iz dehidratiranih podloga u prahu, suspendiranjem u 1000 mL destilirane vode. Podloge su nakon otapanja sterilizirane u autoklavu na 121 °C tijekom 15 min.

YPG bujon sastava:

Kvašćev ekstrakt (10 g/L)

Pepton (10 g/L)

Glukoza (20 g/L)

Suspendirano u destiliranoj vodi, pH podloge iznosi 6,5.

Sladni agar sastava:

Sladni ekstrakt (30 g/L)

Agar (17 g/L)

### 3.1.3. Mikotoksin i kemikalije

Standard mikotoksina: OTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

Etanol 96 % (Grammol, Hrvatska)

Carrezov reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)

### 3.1.4. Pribor i aparatura

Prilikom eksperimentalnog rada korišten je sljedeći pribor i aparatura:

- Pribor:
  - Erlenmeyerove tikvice (250 mL)
  - Epruvete mikrobiološke (18x180 mm)
  - Mikrobiološke ušice
  - Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
  - Štapići po Drigalskom
  - Bunsenov plamenik
- Aparatura:
  - Termostat (Sutjeska, Beograd)
  - Autoklav (Sutjeska, Beograd)
  - Analitička vaga (Sartorius, Njemačka)
  - Vibromikser Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija)
  - Tresilica (KS 4000 (IKA, Njemačka)
  - Mikropipete (10-1000 µL; Eppendorf, Njemačka)
  - HPLC ProStar Varian 230 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
  - Prijenosna centrifuga Hettich Rotofix 32 (Merck, Darmstadt, Njemačka)
  - Brojač kolonija BZG30 (Weilheim, Njemačka)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Standard OTA

Okratoksin A u obliku kristala, otopljen je u etanolu kako bi se pripravile radne otopine u koncentracijama  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ , odnosno  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  koje su do upotrebe pohranjene na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kako bi se dobile konačne koncentracije OTA od 2, odnosno  $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  u tekuće hranjive podloge dodan je odgovarajući volumen radnih otopina OTA.

### 3.2.2. Priprema kultura kvasaca

Odabrani sojevi kvasaca revitalizirani su u tekućem hranjivom bujonu (YPG bujonu) tijekom 48 h pri  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon revitalizacije, po 1 mL suspendirane kvaščeve kulture ponovno je precijepljen u YPG bujon te inkubiran tijekom 24 h pri  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, u 25 mL tekuće YPG podloge dodane su odgovarajuće kulture kvasaca kao i OTA. U jednu tikvicu dodan je OTA do konačne koncentracije  $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , u drugu tikvicu dodan je OTA do konačne koncentracije  $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , dok je u treću tikvicu dodan etanol i taj uzorak je služio kao kontrola.

### 3.2.3. Određivanje fermentacijskih produkata kvasaca u prisutnosti OTA

Prisutnost fermentacijskih produkata odabranih sojeva kvasaca uz dodatak otopine OTA u YPG mediju, određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) u dvije točke (12 i 24 sata) tijekom uzgoja na tresilici. Uzorci su centrifugirani na prijenosnoj centrifugi (Hettich Rotofix 32, Merck, Darmstadt, Njemačka) na  $3500g$  tijekom 10 minuta. Carrezov reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka) dodan je u supernatant, a proteini su uklonjeni filtracijom. Koncentracije metabolita izmjere su pomoću ProStar Varian 230 analitičkog HPLC uređaja, koji je opremljen s Varian ProStar 330 PDA (eng. *Photodiode array*) detektorom te Varian Pro Star 350 RI (eng. *Refractive index*) detektorom. Za odvajanje sojeva korištena kolona Barian MetaCarb 87H ( $300 \times 6,5 \text{ mm}$ ), zagrijana na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  uz konstantan protok od  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Octena i mravlja kiselina su praćene i kvantificirane pomoću PDA detektora, a etanol i glukoza pomoću RI detektora. Svi su uzorci analizirani u triplikatu.

### 3.2.4. Određivanje preživljavanja kvasaca u prisutnosti OTA

Tijekom uzgoja neizravnim metodom određivanja broja živih stanica (eng. CFU, *Colony Forming Units*) praćeno je preživljavanje kvasaca u prisutnosti dviju različitih koncentracija OTA. Na čvrstu hranjivu podlogu (sladni agar) nacijepljen je poznati volumen (0,1 mL) odgovarajućeg decimalnog razrjeđenja kulture kvasca, nakon čega slijedi inkubacija na odgovarajućoj temperaturi (28 °C) tijekom 24 sata. Nakon inkubacije na podlozi je vidljiv porast pojedinačnih kolonija koje je moguće prebrojati, a dobivene vrijednosti izražene su kao jedinice koje tvore kolonije log CFU mL<sup>-1</sup>.

Broj živih stanica kvasaca praćen je tijekom 24 h uzgoja (0., 12. i 24. h). Broj živih stanica svake kvašćeve kulture pratio se bez dodatka OTA te s dodatkom otopine OTA u koncentracijama 2 µg mL<sup>-1</sup>, odnosno 4 µg mL<sup>-1</sup>. Iz pripremljenih uzoraka, nakon 0., 12. i 24. sata uzgoja, načinjene su serije decimalnih razrjeđenja u omjeru 1:10. Za svaki uzorak načinjeno je 6 decimalnih razrjeđenja, a u Petrijeve zdjelice sa sladnim agarom nacijepljeno je po 0,1 mL 4., 5. i 6. decimalnog razrjeđenja. Korištenjem štapića po Drigalskom nacijepljeni volumen uzorka raširen je po cijeloj površini sladnog agara kako bi se porasle kulture lakše prebrojale. Nacijepljeni uzorci inkubirani su na 28 °C tijekom 48 h, a porasle kolonije prebrojane su na brojaču kolonija. CFU je određen pomoću formule 1:

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen nacijepljenog uzorka}} * \text{recipr. vrijednost dec. razrjeđenja (jed mL}^{-1}) \quad [1]$$

Određivanje broja stanica kvasaca u prisutnosti dviju koncentracija OTA mjereno je u triplikatu.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

OTA je proizvod sekundarnog metabolizma plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Budući da navedene plijesni rastu na širokom geografskom području, OTA je sveprisutan. Kao glavni izvori OTA u ljudskoj prehrani navode se žitarice i vino, a nedavna istraživanja pokazala su visoke koncentracije OTA u vinima, moštu i sokovima od grožđa (El Khoury i Atoui, 2010; Pleadin i sur., 2018). Istraživanja provedena na OTA pokazala su njegova nefrotoksična, karcinogena, imunotoksična i neurotoksična djelovanja. Kako je u dostupnoj literaturi izuzetno malen broj istraživanja koja proučavaju utjecaj OTA na fermentacijska svojstva kvasaca, kao i ograničen broj literaturnih radova koji proučavaju utjecaj OTA na broj živih stanica kvasaca, cilj ovog rada je ispitati utjecaj dviju različitih koncentracija OTA na fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae* (5), *Saccharomyces cerevisiae* DMSZ, *Saccharomyces bayanus* (8), *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia guilliermondii*), kao i utjecaj OTA na preživljavanje kvasaca tijekom uzgoja od 24 h.

Za određivanje produkata fermentacije odabranih sojeva kvasaca pod utjecajem OTA korišten je HPLC ProStar Varian 230 uređaj, a broj živih stanica kvasca određen je neizravnom metodom nacjepljivanjem na hranjivu podlogu nakon 12 i 24 sata uzgoja.

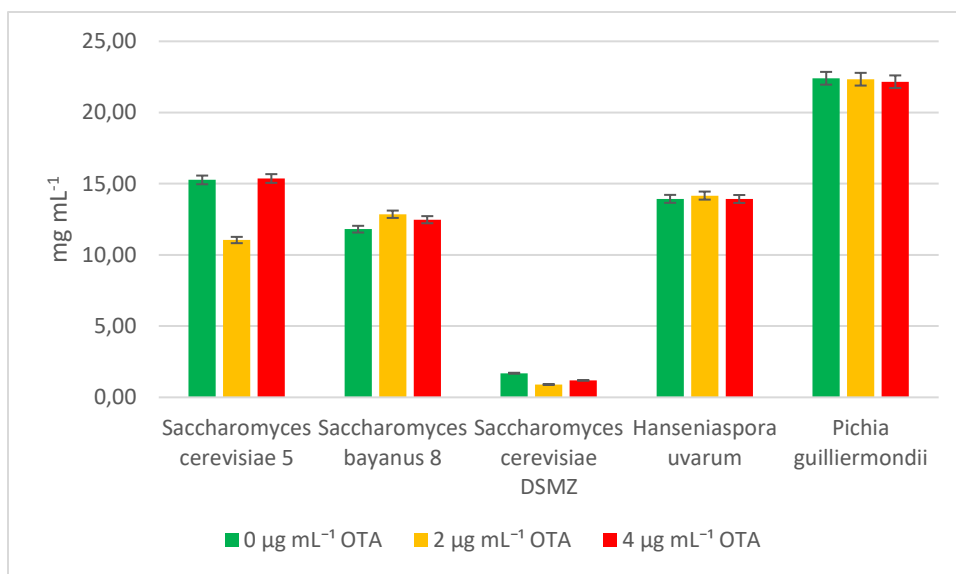
Ispitivana je fermentacijska sposobnost kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* (5), *Saccharomyces cerevisiae* DMSZ, *Saccharomyces bayanus* (8), *Hanseniaspora uvarum* i *Pichia guilliermondii* kao i sposobnost njihovog rasta u prisutnosti OTA u koncentracijama 2, odnosno 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Navedene koncentracije OTA odabrane su prema dostupnoj literaturi, a također, predstavljaju vrijednost OTA koja se potencijalno može pojaviti u prehrambenim proizvodima. Podaci o utjecaju OTA na fermentacijska svojstva kvasaca su oskudni, a većinom se ispituju mikotoksini poput AFB<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub> ili fumonizini. Također, istraživanja vezana uz utjecaj OTA na preživljavanje kvasaca su vrlo rijetka. Odabrani sojevi kvasaca predstavljaju širok spektar mikroorganizama koji se mogu prirodno pojaviti u namirnicama ili preko određenih biotehnoloških procesa, a imaju potencijalnu primjenu u biodetoksikaciji OTA.

#### 4.1. FERMENTACIJSKI METABOLITI KVASACA U PRISUTNOSTI OTA

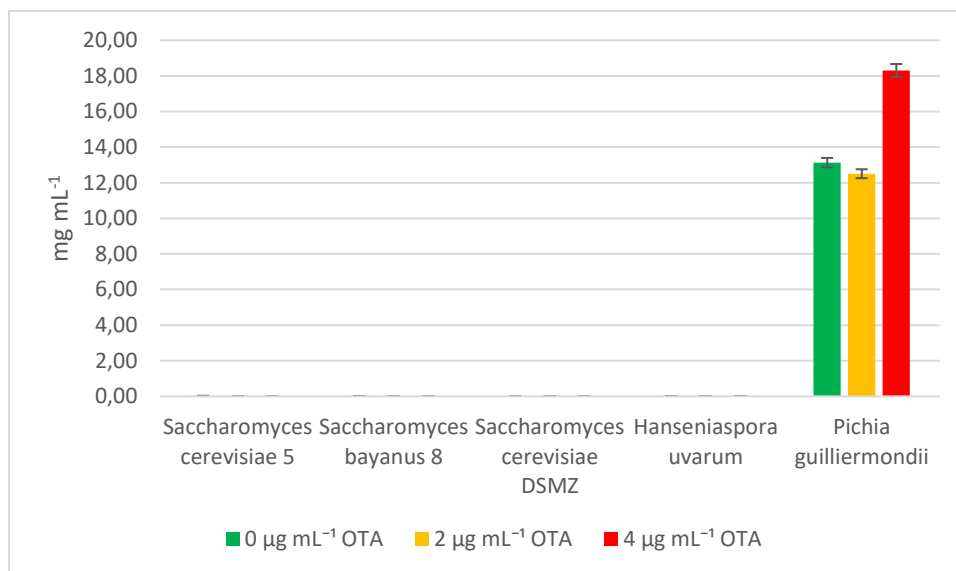
U alkoholnoj fermentaciji koju provode kvasci, osim etanola, nastaju i mnogi spojevi kao nusprodukti biokemijskih i kemijskih procesa. Mikotoksini, poput okratoksina A, utječu na količinu hlapljivih nusproizvoda fermentacije. Također, kontaminacija sirovine s aflatoksinima, okratoksinom A, zearalenonom, deoksinivalenolom, fumonizinom B<sub>1</sub> može utjecati na količinu hlapljivih nusproizvoda fermentacije (Kłosowski i Mikulski, 2010).

Rezultati fermentacijskih učinaka istraživanja Petruzzi i sur. (2015) pokazuju visoke prinose etanola povezane s učinkovitom pretvorbom šećera (na kraju fermentacije količina alkohola bila je od 83,2 do 109,1 g L<sup>-1</sup>), proizvodnju glicerola veću od 5,2 g L<sup>-1</sup> i koncentracije hlapljivih kiselina <1,2 g L<sup>-1</sup> u 5 pet genetski različitih sojeva *Saccharomyces cerevisiae* korištenih prilikom istraživanja.

Prilikom provedenog istraživanja nakon 12 i 24 sata uzgoja određena je koncentracija glukoze kao osnovnog izvora ugljika (slika 6 i 7).



Slika 6. Koncentracija glukoze u mediju nakon 12 sati fermentacije pomoću odabranih sojeva kvasaca bez prisustva i u prisustvu 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA



Slika 7. Koncentracija glukoze u mediju nakon 24 sata fermentacije pomoću odabranih sojeva kvasaca bez prisustva i u prisustvu 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA

Koncentracije glukoze izmjerene pri fermentaciji sa sojevima kvasaca *S. cerevisiae* (5), *S. cerevisiae* DSMZ, *S. bayanus* (8), *H. uvarum* i *P. guilliermondii* nakon 12 sati pokusa prikazane su na slici 6, uzimajući u obzir dodane koncentracije okratoksina A i kontrolu (bez OTA). Iz njih možemo vidjeti kako je *S. cerevisiae* DSMZ potrošio gotovo svu glukožu već nakon 12 sati, dok je *P. guilliermondii* pokazao najmanji afinitet za previranje glukoze; nakon 12 sati preostalo je više od 20 mg mL<sup>-1</sup> glukoze u svim uzorcima. Ono što je zanimljivo za istaknuti jest to da okratoksin A nije pretjerano utjecao na fermentaciju glukoze kod *P. guilliermondii* ni kod *H. uvarum*, dok je njegova prisutnost u manjoj koncentraciji (2 µg mL<sup>-1</sup>) čak uzrokovala veću potrošnju glukoze kod *S. cerevisiae* (5), vidljivo iz preostalih 11,05 mg mL<sup>-1</sup> glukoze nakon 12 sati uzgoja. Što se tiče *S. bayanus* (8), najbolje je fermentirao glukožu bez prisutnosti OTA, dok je pri većoj koncentraciji OTA (4 µg mL<sup>-1</sup>) potrošio neznatno više glukoze nego pri manjoj koncentraciji, što nije očekivano. Slika 7. prikazuje koncentraciju glukoze nakon 24 sata pokusa, iz čega je vidljivo kako jedino kvasac *P. guilliermondii* nije potrošio svu glukožu. Najmanje glukoze je potrošio u prisutnosti veće koncentracije OTA (4 µg mL<sup>-1</sup>), a najviše u prisustvu manje koncentracije OTA (2 µg mL<sup>-1</sup>), iako je bilo očekivano da će najviše glukoze potrošiti u uzorku bez prisutnog OTA.

U ispitivanim uzorcima nije bilo moguće kvantificirati etanol, no tablica 1 prikazuje vrijednosti površina pikova koje odgovaraju retencijskom vremenu etanola, dobivene iz kromatograma analiziranih uzoraka.

**Tablica 1.** Površine pikova iz kromatograma koje odgovaraju retencijskom vremenu etanola

Uzorak	Površina pika u kromatogramu nakon 12 h	Površina pika u kromatogramu nakon 24 h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (5)	410,98	860,64
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (5) + 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	240,81	403,11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (5) + 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	353,44	1433,38
<i>Saccharomyces bayanus</i> (8)	301,7	812,4
<i>Saccharomyces bayanus</i> (8) + 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	609,01	720,36
<i>Saccharomyces bayanus</i> (8) + 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	945,53	332,38
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSMZ	n.d.	569,36
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSMZ + 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	n.d.	1223,77
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSMZ + 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	n.d.	313,49
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	172,31	1038,69
<i>Hanseniaspora uvarum</i> + 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	1052,7	1632,92
<i>Hanseniaspora uvarum</i> + 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	161,4	1558,25
<i>Pichia guilliermondii</i>	237,54	421,97
<i>Pichia guilliermondii</i> + 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	193,31	1631,59
<i>Pichia guilliermondii</i> + 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OTA	76,81	299,58

\*površina pika u uzorku samo s etanolom iznosila je 182,87

n.d. – nije detektirano

Prema podacima prikazanim u tablici 1 vidljivo je kako kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (5) uz dodatak veće koncentracije OTA (4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 24 sata pokazuje najveću sposobnost proizvodnje etanola, dok nakon 12 sati pokusa, obje ispitivane koncentracije OTA djeluju inhibitorno na proizvodnju etanola. S druge strane, dodatak OTA (u manjoj i većoj koncentraciji) mediju s kvascem *Saccharomyces bayanus* (8) djeluje pozitivno na sposobnost proizvodnje etanola nakon prvih 12 sati, ali nakon 24. sata je vidljivo da veća koncentracija OTA inhibira proizvodnju etanola. Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ je vidljivo kako do proizvodnje etanola dolazi nakon 24. sata, što se može objasniti činjenicom da je tek nakon 24 sata, kvasac ušao u stacionarnu fazu rasta. Kvasac *Hanseniaspora uvarum* je uz dodatak manje koncentracije OTA (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 12. sata pokazao značajno veću sposobnost sinteze

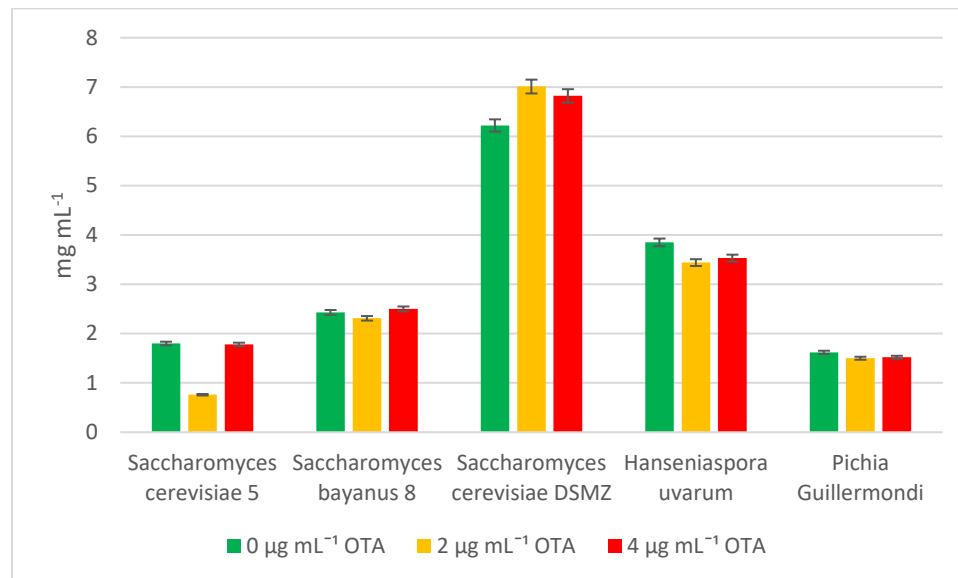
etanola, usporedno s kontrolnim uzorkom, kao i uzorkom s većom koncentracijom dodanog OTA. Nakon 24 sata, vrijednosti koje ukazuju na proizvodnju etanola s dodatkom OTA su podjednake, dok je najmanja vrijednost upravo ona bez OTA. *Pichia guilliermondii* nakon 12 sati fermentacije pokazuje kako kultura bez dodatka OTA ima mogućnost najveće proizvodnje etanola, u usporedbi s kulturama kojima je dodan OTA. Nakon 24 sata, ipak je došlo do značajne promjene i pokazalo se da dodatak OTA u koncentraciji od  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  povoljno utječe na sintezu etanola. S druge strane, Petruzzi i sur. (2015) su pokazali da između kontrolnih uzoraka i uzoraka s dodatkom OTA nema značajne razlike u proizvodnji etanola. Budući da je eksperiment trajao 8 dana, njihovi rezultati upućuju na nisku toksičnost OTA ili na prilagodbu kvasaca tijekom vremena.

Pokazalo se da slabe organske kiseline negativno utječu na rast i metabolizam mikroba te prinos etanola (van Maris i sur., 2006). Iako je mravlja kiselina tipično prisutna u nižim koncentracijama od acetata, toksičnija je za *S. cerevisiae* (Hasunuma i sur., 2011).

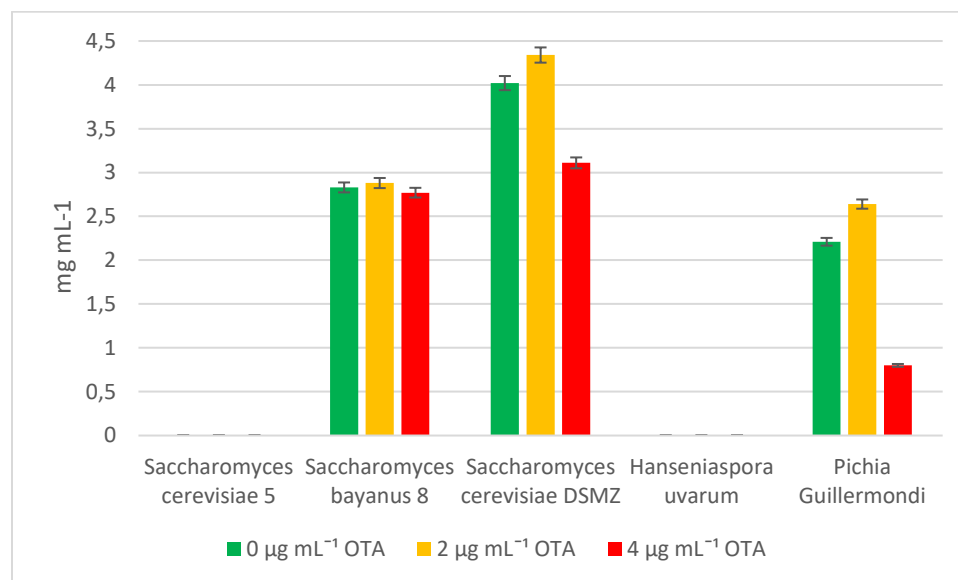
Mravlja kiselina je slaba kiselina koja može izazvati oksidativni stres. Niska koncentracija mravlje kiseline izaziva apoptozu tj. smrt stanica kvasca *S. cerevisiae*, a ovaj aktivni proces je popraćen „respiracijskim praskom“, uz oslobađanje reaktivnih kisikovih vrsta (Du i sur., 2008). Stanice u stacionarnoj fazi u istraživanju Du i sur. (2008) bile su otpornije na tretman mravljom kiselinom nego one u fazi srednjeg eksponencijalnog stanja, što ukazuje da brzina staničnog preživljavanja ovisi o temperaturi i fazi rasta za vrijeme tretmana mravljom kiselinom. Postotak preživljavanja, izražen kao CFU vrijednost, smanjio se s povećanom koncentracijom mravlje kiseline. Smrt stanica uzrokovana mravljom kiselinom popraćena je promjenama integriteta citoplazmne membrane.

Babel i sur. (1983) su zaključili kako mravlja kiselina ima inhibirajući učinak na rast kvasca *Hansenula polymorpha*, jer priljev mravlje kiseline izazvan snižavanjem pH, prelazi oksidacijski kapacitet, pa bi akumulacija mravlje kiseline/formijata u citoplazmi trebala snažno ometati očuvanje energije uklanjanjem gradijenta protona između citoplazme i mitohondrijskog prostora. Konačno, to rezultira prekidom proizvodnje ATP-a i zaustavlja rast (Babel i sur., 1983). Potonje je uočeno i kod *Candida utilis* u prisutnosti acetata i nazvano je "traumatičnim učinkom" (Huetting i Tempest, 1977).

Podaci i istraživanja vezanih uz mravlju kiselinu su izuzetno rijetki i ograničeni, što daje podacima u ovom radu na značaju.



Slika 8. Koncentracija mravlje kiseline nakon 12 sati fermentacije pomoću odabranih sojeva kvasaca bez prisustva i u prisustvu 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA



Slika 9. Koncentracija mravlje kiseline nakon 24 sata fermentacije pomoću odabranih sojeva kvasaca bez prisustva i u prisustvu 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA

Koncentracija mravlje kiseline izmjerene u uzorcima sa odabranim kvascima, nakon 12 sati pokusa prikazana je na slici 8. Najviša izmjerena koncentracija mravlje kiseline iznosi 7,01 mg mL<sup>-1</sup>, a najmanja 0,76 mg mL<sup>-1</sup>. *S. cerevisiae* DSMZ proizveo je najviše mravlje kiseline i to u prisutnosti manje koncentracije OTA, a nakon njega *H. uvarum*. Kvasci *P. guilliermondii* i *S. bayanus* (8) nisu pokazali velike razlike u proizvodnji mravlje kiseline obzirom na prisutnost OTA. *S. cerevisiae* (5) proizveo je najviše mravlje kiseline bez prisutnosti OTA, ali skoro jednako mnogo i s većom koncentracijom OTA. Zanimljivo je napomenuti kako je *S. bayanus* (8) najviše mravlje kiseline, 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, proizveo pri većoj koncentraciji OTA.

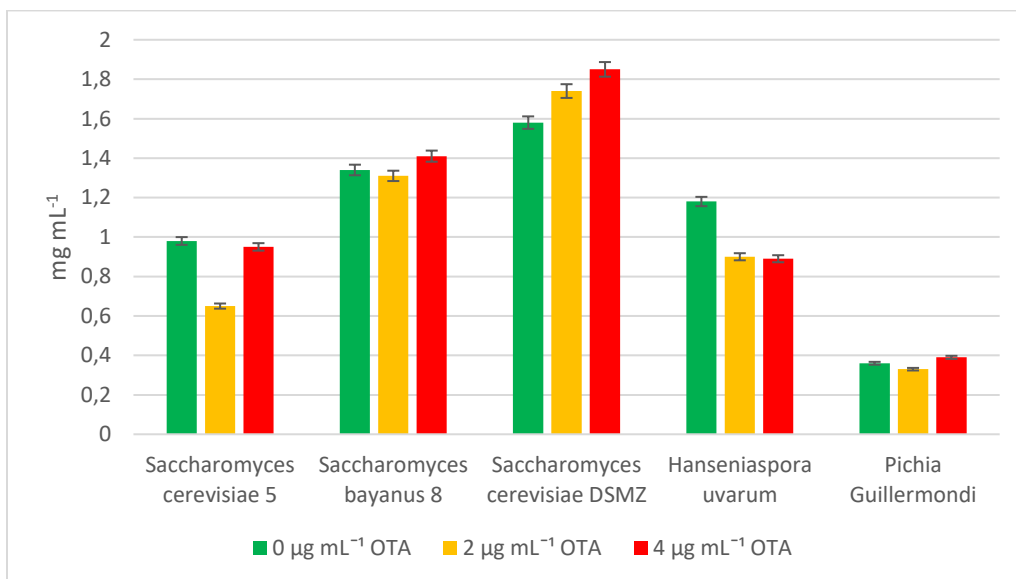
Koncentracije mravlje kiseline izmjerene nakon 24 sata pokusa, prikazane na slici 9, pokazuju drukčije rezultate, pri čemu nije bilo zabilježene proizvodnje mravlje kiseline od strane sojeva *H. uvarum* i *S. cerevisiae* (5). *S. cerevisiae* DSMZ i dalje je proizveo najveće količine mravlje kiseline, ali mnogo manje nego nakon 12 sati (4,34 mg mL<sup>-1</sup>) i to u prisutnosti manje koncentracije OTA. Od 3 soja koja su jedina pokazivala proizvodnju mravlje kiseline nakon 24 sata, *S. bayanus* (8), *S. cerevisiae* DSMZ i *P. guilliermondii*, svi su proizveli više nusprodukta u prisutnosti manje koncentracije OTA, čak i u usporedbi bez prisutnog OTA.

Tijekom početnih faza fermentacije, aktivnost kvasaca koji nisu roda *Saccharomyces*, doprinosi proizvodnji spojeva poput octene kiseline, glicerola i raznih estera (Ciani and Maccarelli, 1997; Romano i sur., 2003). To može imati značajan utjecaj na aromu vina (Eglinton i sur., 2000; Soden i sur., 2000). Na primjer, neki sojevi kvasca *Kloeckera apiculata* mogu potencijalno proizvesti do 25 puta veću količinu octene kiseline koju obično proizvodi *S. cerevisiae*. *K. apiculata* može inhibirati neke sojeve *S. cerevisiae* da završe fermentaciju (Velázquez i sur., 1991), vjerojatno zbog proizvodnje octene kiseline, oktanske i dekanske kiseline ili „killer“ faktora.

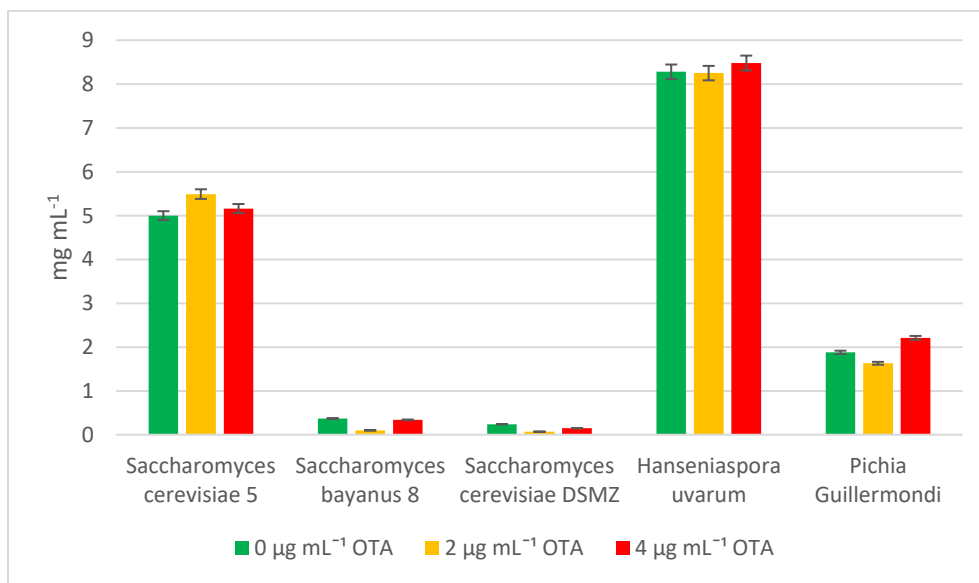
Dodavanje OTA i AF uzrokovalo je najveće povećanje koncentracije acetaldehida u radu Kłosowski i Mikulski (2010). Povećana koncentracija mikotoksina u fermentacijskom mediju, zajedno s povećanjem koncentracije acetaldehida, može ukazivati na to da mikotoksini utječu na puteve alkoholne fermentacije gdje je acetaldehid jedan od glavnih međuprodukata. Također, zabilježena je značajno viša kiselost kod skupina kontaminiranih OTA, što upućuje na formiranje veće količine octene kiseline. Unatoč tome, Petruzzi i sur. (2015) nisu pronašli statistički

značajne razlike između kontrolnih uzoraka i onih s dodanim OTA, što bi moglo ukazivati na nisku toksičnost OTA prema kvascima ili prilagodbu kvasca tijekom vremena.

Na slikama 10 i 11 prikazane su koncentracije octene kiseline bez prisustva i uz prisustvo različitih koncentracija OTA.



Slika 10. Koncentracija octene kiseline nakon 12 sati fermentacije pomoću odabranih sojeva kvasaca bez prisustva i u prisustvu 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA



Slika 11. Koncentracija octene kiseline nakon 24 sata fermentacije pomoću odabranih sojeva kvasaca bez prisustva i u prisustvu 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA



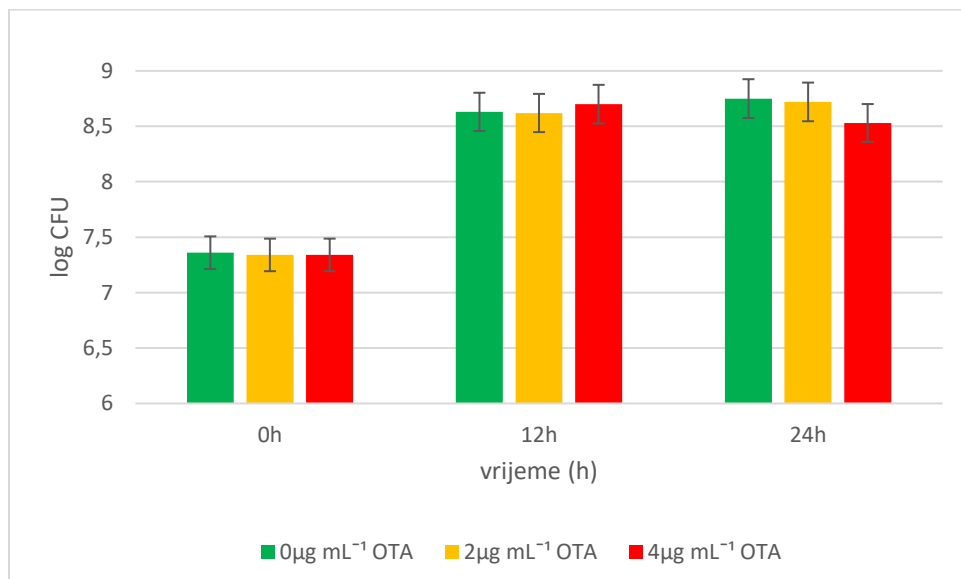
Svih 5 sojeva kvasaca proizvelo je octenu kiselinu nakon 12 sati pokusa u koncentraciji < 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (slika 10). Paraggio i Fiore (2004) ispitivali su sposobnost proizvodnje octene kiseline pomoću 80 različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae*, izoliranih iz različitih vrsta grožđa. Prema njihovim rezultatima, proizvodnja octene kiseline kretala se od 0,13-0,98 mg mL<sup>-1</sup>. Od 80 ispitivanih sojeva, samo tri soja su se pokazala povoljna i primjerena upotrebi za proizvodnju vina, budući da su proizveli niske koncentracije octene kiseline (<0,2 mg mL<sup>-1</sup>), a octena kiselina negativno utječe na profil vina ukoliko je njena koncentracija veća od 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Tijekom ovog pokusa, nakon 12 sati, *S. cerevisiae* DSMZ je proizveo najveću količinu octene kiseline, 1,85 mg mL<sup>-1</sup>, u prisustvu veće koncentracije OTA. Na *S. bayanus* (8) i *P. guilliermondii* prisutnost OTA nije pretjerano utjecala pa su koncentracije proizvedene octene kiseline blizu vrijednostima uzoraka bez dodanog okratoksina A, iako najviše koncentracije proizvedenog nusprodukta pokazuju u prisustvu veće koncentracije OTA. Kod *S. cerevisiae* i *H. uvarum* je vidljivo da je najviše proizvedene octene kiseline u kontrolnim uzorcima bez OTA. Zanimljivo je što *S. bayanus* (8) i *S. cerevisiae* DSMZ, koji su nakon 12 sati proizveli najviše octene kiseline, nakon 24 sata proizvode najmanje octene kiseline. Na slici 11 vidljivo je kako su porasle vrijednosti za ostale sojeve doduše, najviše za *H. uvarum* koja je nakon 12 sati proizvela najviše 1,18 mg mL<sup>-1</sup> bez prisustva OTA, a nakon 24 sata čak 8,48 mg mL<sup>-1</sup> i to u prisustvu veće koncentracije OTA. Kvasac *P. guilliermondii* je proizveo najviše octene kiseline u prisustvu veće koncentracije OTA, a *S. cerevisiae* (5) u prisustvu manje koncentracije OTA. Vidljivo je kako gotovo niti jedan soj u kontroli nakon 24 sata fermentacije ne proizvodi više octene kiseline u odnosu na uzorke s dodanim OTA (*S. bayanus* (8) iznimno), što može voditi zaključku da OTA pospješuje proizvodnju octene kiseline u određenim sojevima. Slični rezultati su dobiveni i nakon 12 sati pokusa; jedino *H. uvarum* je proizvela znatno više metabolita bez prisustva OTA.

Malo je radova koji istražuju učinke OTA na fermentacijski proces. Istraživanje Whitehead i Flannigan (1989) pokazalo je da *S. cerevisiae* pokazuje sposobnost detoksikacije fuzarijskih mikotoksina poput deoksinivalenola, T-2 toksina, diacetoksiscirpenola i zearalenona. Čak i u visokim koncentracijama, deoksinivalenol ima zanemariv učinak na održivost i rast kvasca, a *S. cerevisiae* se može oporaviti od početnih učinaka T-2 toksina i diacetoksiscirpenola, što također ukazuje na to da kvasac ima sposobnost detoksikacije tih toksina. Istraživanje Jakopović i sur. (2018) podupire pretpostavku da se određeni sojevi kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida utilis* i *Kluyveromyces marxianus*) mogu prilagoditi

u prisutnosti mikotoksina. Njihovi rezultati također sugeriraju da su svi proučeni sojevi kvasca razvili specifičan adaptivni odgovor na mikotoksine, što bi moglo sugerirati da se određeni kvasci mogu koristiti za kontrolu koncentracija mikotoksina u proizvodnji fermentirane hrane i pića. Stanice kvasca i njihovi važni enzimi pokazuju određenu osjetljivost na mikotoksine, ali također se mogu prilagoditi. Mikotoksini, s druge strane, mogu inhibirati enzime fermentacije, odgoditi rast i uzrokovati oksidativni stres (Kłosowski i sur., 2010). Svi ti učinci usporavaju rast kvasca i, posljedično, fermentaciju.

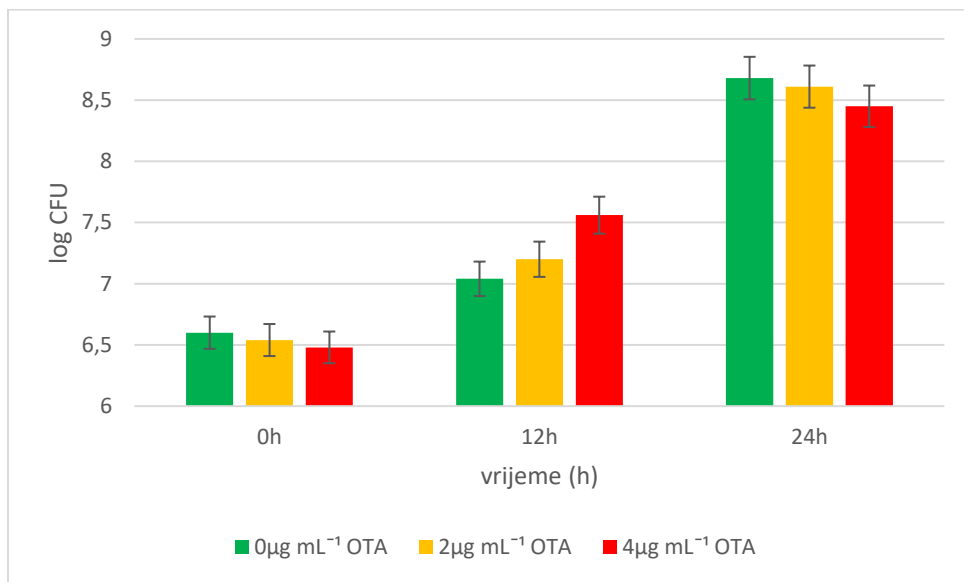
#### 4.2. PREŽIVLJAVANJE ODABRANIH SOJEVA KVASACA U PRISUTNOSTI OTA

Neizravnom metodom određivanja broja živih stanica praćeno je preživljavanje odabranih sojeva kvasaca (*S. cerevisiae* (5), *S. cerevisiae* DSMZ, *S. bayanus* (8), *H. uvarum* i *P. guilliermondii*) u prisutnosti dviju koncentracija OTA ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) tijekom 24 sata uzgoja (mjerena su provedena u 0-tom satu pokusa, nakon 12 sati te nakon 24. sata pokusa), a rezultati su prikazani na slikama 12 – 16.



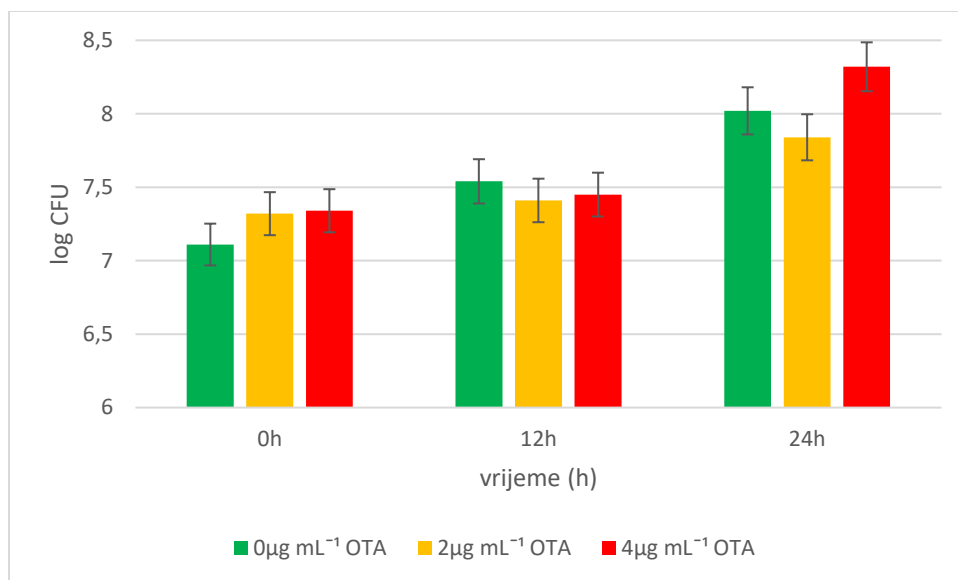
Slika 12. Log broj živih stanica kvasca *S. cerevisiae* (5) u podlozi nakon različitog vremena fermentacije bez prisustva i u prisustvu 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA

Prema slici 12, vidljivo je kako je najveći broj izbrojanih stanica kvasca prisutan nakon 24 sata pokusa u kontrolnom uzorku, bez prisutnog okratoksina A, dok pri koncentraciji OTA od  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  nije statistički značajno manji broj stanica kvasca. Nakon 12 sati pokusa, kvasci izbrojani u prisutnosti veće koncentracije OTA od  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , su dokazani u nešto većem broju. Kao što je već spomenuto u prethodnim poglavljima, mikotoksini obično imaju negativan utjecaj na kvasce, stoga je taj rezultat neočekivan. Međutim, razlike u rezultatima preživljavanja stanica kvasca sa i bez OTA nisu velike pa možemo zaključiti da okratoksin A nije imao značajan utjecaj na rast kvasca *S. cerevisiae* (5).



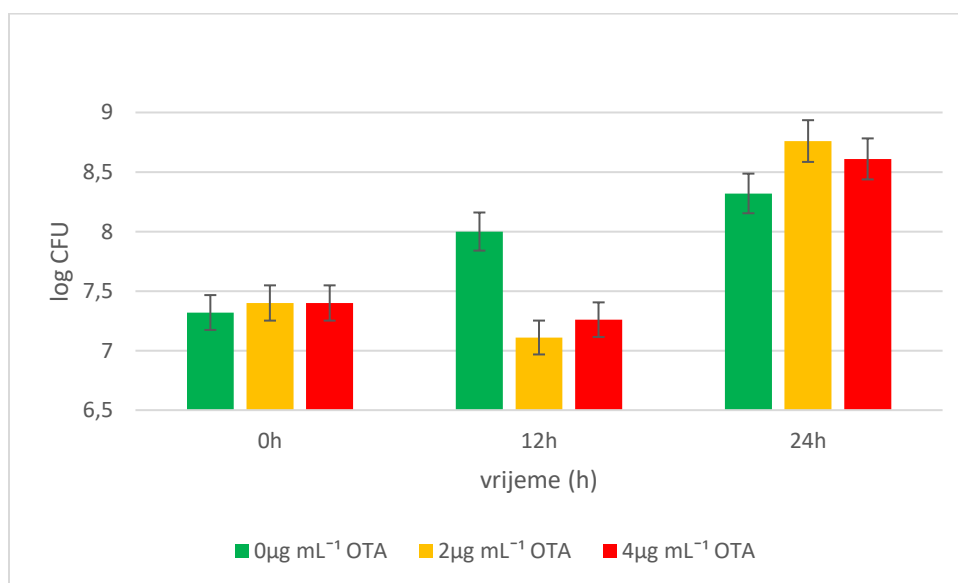
Slika 13. Log broja živih stanica kvasca *S. cerevisiae* DSMZ u podlozi nakon različitog vremena fermentacije bez prisustva i u prisustvu 2 i  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA

Slika 13 prikazuje preživljavanje stanica kvasca *S. cerevisiae* DSMZ. Nakon 12 sati pokusa najviše je kvasca poraslo u prisutnosti  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA, dok je nakon 24 sata najviše stanica izbrojano u kontrolnom uzorku, bez dodatka OTA. Obzirom da razlika između broja stanica, nakon 12 sati pokusa, bez prisutnosti OTA od  $7,04 \log \text{CFU mL}^{-1}$  i s većom koncentracijom OTA od  $7,56 \log \text{CFU mL}^{-1}$  nije zanemariva, možemo zaključiti kako  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA ima pozitivan utjecaj na rast ovog soja kvasca. Nakon 24 sata pokusa, OTA više nema pozitivan utjecaj na broj stanica.



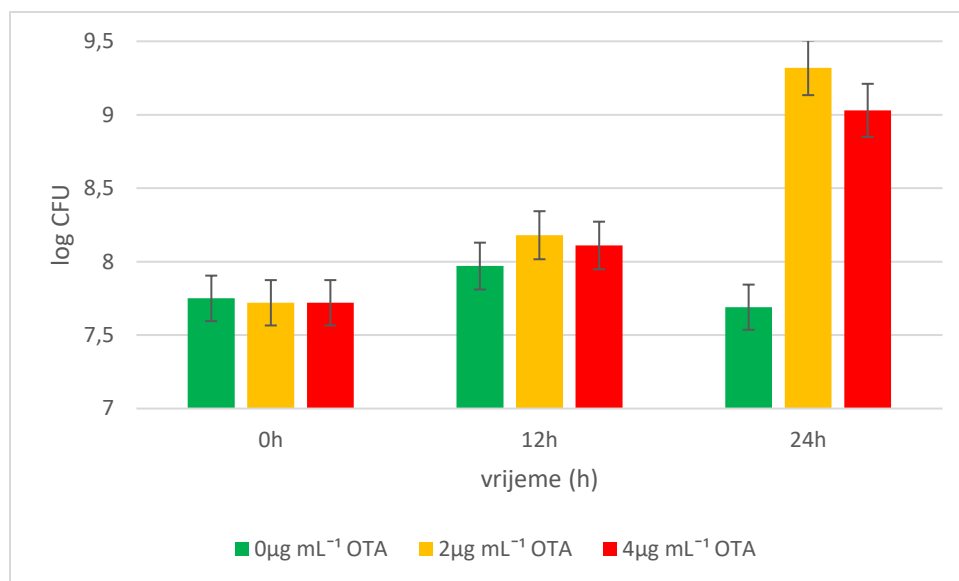
Slika 14. Log broja živih stanica kvasca *S. bayanus* (8) u podlozi nakon različitog vremena fermentacije bez prisustva i u prisustvu 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA

Kod *S. bayanus* (8), prikazanog na slici 14, vidljivo je da nakon 12 sati OTA pokazuje slabi inhibitorski učinak na rast kvasca, dok nakon 24 sata pokusa, u prisutnosti veće koncentracije OTA dolazi do stimulacije rasta i zabilježen je rast stanica kvasca u iznosu od 8,32 log CFU mL<sup>-1</sup>.



Slika 15. Log broja živih stanica kvasca *H. uvarum* u podlozi nakon različitog vremena fermentacije bez prisustva i u prisustvu 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA

Rast stanica kvasca *H. uvarum*, prikazan je na slici 15. Nakon 12 sati uzgoja vidljivo je da OTA inhibira rast kvasca za oko 1 log jedinicu, dok rezultati nakon 24 sata pokazuju bolji rast kvasca u prisutnosti obje koncentracije OTA u odnosu na kontrolni uzorak.



Slika 16. Log broja živih stanica kvasca *P. guilliermondii* u podlozi nakon različitog vremena fermentacije bez prisustva i u prisustvu 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA

Na slici 16 prikazani su rezultati preživljavanja kvasca *P. guilliermondii* u prisutnosti OTA. Iz rezultata je vidljivo da se kvasac *P. guilliermondii* prilagodio uvjetima rasta u prisutnosti obje odabrane koncentracije OTA, jer je primijećen bolji rast kvasca u odnosu na kontrolu. Nakon 12 sati uočen je neznatni porast stanica kvasca, dok je nakon 24 sata uočen porast stanica za 1,5 log jedinicu u prisustvu 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA.

Od svih odabranih kvasaca, kvasac *P. guilliermondii* se pokazao kao najmanje osjetljivi kvasac na utjecaj OTA jer je zabilježen rast od 9,32 log CFU  $\text{mL}^{-1}$  u prisutnosti 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA, odnosno 9,03 log CFU  $\text{mL}^{-1}$  u prisutnosti 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nakon 24 sata. Iz prikazanih rezultata (slike 12-15), može se zaključiti kako je OTA pozitivno utjecao na rast i *S. bayanus* (8) (u većoj koncentraciji nakon 24 sata), *H. uvarum* (u obje koncentracije, nakon 24 sata), *S. cerevisiae*

DSMZ (u obje koncentracije, nakon 12 sati). Osim u tim slučajevima, rezultati ukazuju kako prisustvo OTA ne čini veliku razliku u rastu broja kvasaca. Blagi inhibirajući učinak imao je na *S. cerevisiae* (5) nakon 24 sata pokusa, *S. bayanus* (8) nakon 12 sati pokusa te kod *S. cerevisiae* DSMZ nakon 24 sata. Prisutnost OTA imala je najizraženiji inhibirajući faktor na kvascu *H. uvarum*, nakon 12 sati pokusa. Uzevši sve u obzir, čini se kako ovisnost rasta kvasca u odnosu na prisutnost određene koncentracije okratoksina A u ovisnosti o proteklom vremenu uvelike ovisi o soju kvasca. Daljnje istraživanje bi otkrilo potencijal utjecaja OTA na rast *P. guilliermondii* kvasca, koji pokazuje obećavajuće rezultate. Drugi autori navode kako je OTA imao blagi učinak na rast sojeva kvasca (Patharajan i sur., 2011). Nisu primijetili veće razlike u koncentraciji stanica kvasca nakon dodavanja različitih koncentracija OTA (5 i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) u tekućem mediju. Prema Freire i sur. (2019), prisutnost okratoksina A nije utjecala na kinetiku rasta *S. cerevisiae*, već je dovela do stvaranja modificiranih okratoksina poput OT $\alpha$ .

Osjetljivost kvasca na mikotoksine varira sa strukturnim sastavom stanične stijenke i sposobnošću mikotoksina da se vežu na staničnu stijenkicu i prodiru u stanicu (Piotrowska i Masek, 2015; Boeira i sur., 2000). Kinetika rasta kvasaca prati krivulju rasta s lag fazom kao početnom fazom, tijekom koje se stanice prilagođavaju novom okruženju. Nakon lag faze, slijedi log faza u kojoj se stanična masa i broj stanica povećava eksponencijalno i tada počinje iscrpljivanje hranjivih tvari što dovodi do faze usporavanja rasta. Akumulacija toksičnih produkata rezultira fazom usporavanja, nakon čega započinje stacionarna faza u kojoj je stopa rasta jednaka stopi smrti (Sakthiselvan i sur., 2019).

U istraživanju Scott i sur. (1995), tijekom fermentacije sladovine nije primijećen inhibitorni utjecaj na broj kvasaca u prisutnosti OTA. Također, pri fermentaciji sladovine s dodanim OTA, *S. cerevisiae* nije prouzrokovao smanjenje količine toksina. Međutim, za drugi soj *S. cerevisiae* i za soj *S. bayanus* zabilježeno je smanjenje koncentracije OTA od 13 odnosno 9 %, tijekom razdoblja od 8 dana. Također je zaključeno kako, kroz neko vrijeme, kvasac preuzima dio toksina, dok je istraživanje Angioni i sur. (2007) ukazalo na odsutnost pojave adsorpcije mikotoksina kvascem te kako ostaci OTA nisu utjecali na fermentacijski proces i aktivnost *S. cerevisiae* i *K. apiculata*.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Okratoksin A u koncentracijama od  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  kroz 24 sata nije značajno djelovao na fermentacijsku aktivnost odabranih sojeva kvasaca, iako u ovisnosti o vremenu uzgoja i soju kvasca postoje određena odstupanja.
2. Kao najmanje osjetljiv kvasac na utjecaj OTA na proizvodnju metabolita (mravlje i octene kiseline) pokazao se kvasac *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ nakon 12 sati uzgoja.
3. Svi odabrani sojevi kvasaca, osim *P. guilliermondii*, potrošili su glukozu iz medija u kojem su uzgajani tijekom 24 sata.
4. Najbolju sposobnost prilagodbe na prisutnost okratoksina A, obzirom na broj živih stanica kvasca nakon 24 sata ( $9,32 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ), pokazao je kvasac *Pichia guilliermondii*.
5. Iako su kvasci osjetljivi na promjene u uvjetima okoline, iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su se svi odabrani kvasci prilagodili uvjetima u kojima je prisutan OTA.

## 6. POPIS LITERATURE

Abrunhosa, L., Serra, R., Venâncio, A. (2002) Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agr. Food Chem.* **50(25)**, 7493-7496.

Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., Cabras, P. (2007) In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saracchomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *J. Agr. Food Chem.* **55(5)**, 2043-2048.

Anonymus 1 (2020) *Saccharomyces cerevisiae*, <[https://species.wikimedia.org/wiki/Saccharomyces\\_cerevisiae](https://species.wikimedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)> Pristupljeno 22. travnja 2020.

Anonymus 2 (2018) *Saccharomyces bayanus* <<https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/saccharomyces-bayanus>> Pristupljeno 14. srpnja 2020.

Anonymus 3 (2018) *Pichia guilliermondii*, < <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/pichia-guilliermondii>> Pristupljeno 23. travnja 2020.

Aranda, A., Matallana, E., Del Olmo, M. (2011) *Saccharomyces* yeasts I: primary fermentation. *Mol. Wine Microbiol.*, 1-31.

Babel, W., Müller, R. H., Markuske, K. D. (1983) Improvement of growth yield of yeast on glucose to the maximum by using an additional energy source. *Arch. Microbiol.* **136(3)**, 203-208.

Bedriñana, R. P., Alonso, J. M., Valles, B. S. (2017) Evaluation of autochthonous *Saccharomyces bayanus* strains under stress conditions for making ice ciders. *LWT-Food Sci. Technol.* **81**, 217-225.



- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. (2004) Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* stains. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1038–1044.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. (2005) Conidia of black *Aspergilli* as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. *J. Agr. Food Chem.* **53(21)**, 8224-8229.
- Bellon, J. R., Yang, F., Day, M. P., Inglis, D. L., Chambers, P. J. (2015) Designing and creating *Saccharomyces* interspecific hybrids for improved, industry relevant, phenotypes. *Appl. Microbiol. Biot.*, **99**, 8597-8609.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Codón, A. C. (2011) Yeasts Used in Biologically Aged Wines, U: Molecular wine microbiology, (Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., ured.), Elsevier, str. 85-110.
- Boeira, L. S., Bryce, J. H., Stewart, G. G., Flannigan, B. (2000) The effect of combinations of *Fusarium* mycotoxins (deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin B1) on growth of brewing yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **88(3)**, 388-403.
- Bisson, L., van de Water, L. (2010) *Brettanomyces* infection in wine. U: Winemaking Problems Solved, (Butzke, C.E., ured.), Elsevier, str. 290-344.
- Caballero, R., Olgún, P., Cruz-Guerrero, A., Gallardo, F., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L. (1995) Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Res. Int.* **28(1)**, 37–41.
- Cadez, N., Smith, M.T. (2011) *Hanseniaspora* Zikes (1912), U: The Yeasts, (Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T., ured.), Elsevier, str. 421-434.
- Cecchini, F., Morassut, M., Garcia Moruno, E., Di Stefano, R. (2006) Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.* **23(5)**, 411-417.

- Ciani, M., Faticenti, F. (1999) Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Lett. appl. Microbiol.* **28(3)**, 203-206.
- Ciani, M., Maccarelli, F. (1997) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14(2)**, 199-203.
- Ciani, M., Picciotti, G. (1995) The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol. Lett.* **17**, 1247–1250.
- Cole, R.J., Cox, R.H. (1981) *Handbook of Toxic and Fungal Metabolites*, Academic Press, New York
- Diaz, D.E., (2005) *The Mycotoxin Blue Book*, Nottingham University Press, 279-295.
- Díaz-Montaño, D. M., Délia, M. L., Estarrón-Espinosa, M., Strehaiano, P. (2008) Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice. *Enzyme Microb. Tech.* **42(7)**, 608-616.
- Du, L., Su, Y., Sun, D., Zhu, W., Wang, J., Zhuang, X., Zhou, S., Lu, Y. (2008) Formic acid induces Yca1p-independent apoptosis-like cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8(4)**, 531-539.
- Dziuba, E., Foszczyńska, B., Zarychta, P. (2007) The effect of mycotoxins on FAN metabolism and formation of volatile compounds in malt worts. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **6(3)**, 15–26.
- Eglinton, J. M., McWilliam, S. J., Fogarty, M. W., Francis, I. L., Kwiatkowski, M. J., Høj, P. B., Henschke, P. A. (2000) The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine R.* **6(3)**, 190-196.
- El Khoury, A., Atoui, A. (2010) Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* **2(4)**: 461-493.

El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 321–326.

Favale, S., Pietromarchi, P., Ciolfi, G. (2007) Metabolic activity and interactions between two strains, *Saccharomyces cerevisiae* rf bayanus (SBC2) and *Saccharomyces cerevisiae* rf uvarum (S6u), in pure and mixed culture fermentations. *Vitis* **46(1)**, 39-43.

Fernández-Espinar, M. T., Llopis, S., Querol, A., Barrio, E. (2011) Molecular identification and characterization of wine yeasts, U: Molecular wine microbiology, (Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., ured.), Elsevier, str. 112-129.

Fleet, G. H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 11-22.

Fleet, G.M., Heard, G.M. (1993) Yeasts-growth during fermentation, U: Wine Microbiology and Biotechnology, (Fleet, G.M. ured.), Harword Academic Publishers, str. 27-54.

Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B. (2007) L-arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603 T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. *Appl. Microbiol. and Biot.* **75(2)**, 303-310.

Foszczyńska, B., Dziuba, E. (2007a) Physiological status of brewing yeast during fermentation of worts contaminated with mycotoxins, P. 1: T-2 and ZEA. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **6 (1)**, 3–12.

Foszczyńska, B., Dziuba, E. (2007b) Physiological status of brewing yeast during fermentation of worts contaminated with mycotoxins, P. 2: DAS and OTA. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **6 (2)**, 25–34.

Foszczyńska, B., Dziuba, E., Chmielewska, J., Kawa-Rygielska, J. (2008) Effect of DAS, ZEA and OTA mycotoxins on the fermentation activity of brewing yeast. *EJPAU* **11(1)**.

Freire, L., Furtado, M. M., Guerreiro, T. M., da Graça, J. S., da Silva, B. S., Oliveira, D. N., Catharino, R. R., Sant’Ana, A. S. (2019) The presence of ochratoxin A does not influence

*Saccharomyces cerevisiae* growth kinetics but leads to the formation of modified ochratoxins. *Food Chem. Toxic.* **133**, 110756.

Gagliano, N., Dalle Donne, I., Torri, C., Migliori, M., Grizzi, F., Milzani, A. (2006) Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: A morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology* **225**, 214–224.

González, R., Muñoz, R., Carrascosa, A. V. (2011) Production of Wine Starter Cultures, U: Molecular wine microbiology, (Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., ured.), Elsevier, str. 279-298.

González, 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(8)**, 1221-1234.

HAPIH (2013) Što su mikotoksini?, HAPIH – Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>> Pristupljeno 6.4.2020.

Hassan, Y. I., Zhou, T., Bullerman, L. B. (2016) Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Sci. Technol. Int.* **22(1)**, 79-90.

Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., Kondo, A. (2011) Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **10(1)**, 2.

He, W., Ye, S., Xue, T., Xu, S., Li, W., Lu, J., Cao, L., Ye, B., Chen, Y. (2014) Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol. *Biotechnol. Lett.* **36(3)**, 523-529.

Huetting, S., Tempest, D. W. (1977) Influence of acetate on the growth of *Candida utilis* in continuous culture. *Arch. Microbiol.* **115(1)**, 73-78.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, *IARC Monogr. Eval. Carc.* **7**, 1–440.

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 Carcinogenic Risks to Humans* **56**: 245-395.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2002) Aflatoxins, *IARC Monogr. Eval. Carc.* **82**, Lyon, France: World Health Organization, str. 171.

Jakopović, Ž., Hanousek Čiča, K., Mrvčić, J., Pucić, I., Čanak, I., Frece, J., Pleadin, J., Stanzer, D., Zjalić, S., Markov, K. (2018) Properties and fermentation activity of industrial yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *Candida utilis* and *Kluyveromyces marxianus* exposed to AFB1, OTA and ZEA. *Food Technol. Biotech.* **56(2)**, 208-217.

Janos, V., Rigoa, K., Terenb, J. (2000) Degradation of ochraoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 1–7.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarch, A., Lebrihi, A. (2011) Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam. A.* **28 (11)**, 1590–1609.

Jolly, N. P., Varela, C., Pretorius, I. S. (2014) Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* **14(2)**, 215-237.

Kłosowski, G., Mikulski, D. (2010) The effect of raw material contamination with mycotoxins on the composition of alcoholic fermentation volatile by-products in raw spirits. *Bioresource Technol.* **101(24)**, 9723-9727.

Kłosowski, G., Mikulski, D., Grajewski, J., Błajet-Kosicka, A. (2010) The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. *Bioresource Technol.* **101(9)**, 3147-3152.

Kreger-van Rij, N. J. W. (1984) *The Yeasts*, Amsterdam: Elsevier, str. 1-44.

- Krogh, P., Hald, B., Giersten, P., Myken, F. (1974) Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments, *Mycopathologia* **134**, 171–176.
- Luong, J. H. T. (1985) Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 280–285.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D. (2010) Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* **139(1-2)**, 79-86.
- Meca, G., Blaiotta, G., Ritieni, A. (2010) Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* **21**, 579-583.
- Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E., Prillinger, H. (2004) *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Syst. Appl. Microbiol.* **7(6)**, 661-671.
- Moreira, N., Mendes, F., de Pinho, P. G., 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. *Int. J. Food Microbiol.* **124(3)**, 231-238.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2011) Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* **22(5)**, 662-667.
- Naumov, G. I. (2000) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis. *Microbiology+* **69(3)**, 338-342.
- Naumova, E. S., Shalamitskiy, M. Y., Naumov, G. I. (2019) Molecular Polymorphism of Pectinase Genes PGU of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* Yeast. *Appl. Biochem. Micro+* **55(9)**, 882-887.

O'Callaghan, A., Patricia, C., Stapleton, A., Alan, D. W., Dobson, A. B. (2006) Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology* **43**, 213–221.

Paraggio, M., Fiore, C. (2004) Screening of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains for the production of acetic acid. *World J. Microb. Biot.* **20(7)**, 743-747.

Patharajan, S., Reddy, K. R. N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2011) Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. *Food control* **22(2)**, 290-296.

Peraica, M., Domijan, A.M. (2001) Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **52**, 23-35.

Péteri, Z., Téren, J., Vágvölgyi, C., Varga, J. (2007) Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol.* **24(3)**, 205-210.

Petrovska, B., Winkelhausen, E., Kuzmanova, S. (1999) Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Can. J. Microbiol.* **45(8)**, 695-699.

Petruzzi, L., Corbo, M.R., Baiano, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2015) In vivo stability of the complex ochratoxin A - *Saccharomyces cerevisiae* starter strains. *Food Control* **50**, 516–520.

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

Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M. (2002) Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors: a review on etiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Addit. Contam.* **19 (3)**, 282-302.

Pigeau, G. M., Inglis, D. L. (2005) Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during icewine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 112-125.

- Piotrowska, M., Zakowska, Z. (2000) The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Food Biotechnol.* **17**, 307–310.
- Piotrowska, M., Masek, A. (2015) *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin A decontamination. *Toxins* **7(4)**, 1151-1162.
- Pitt, J.I. (2000) Toxicogenic fungi and mycotoxins. *Brit. Med. Bull.* **56**, 184-192.
- Plata, C., Millan, C., Mauricio, J. C., Ortega, J. M. (2003) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* **20(2)**, 217-224.
- Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018) Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija. Sveučilište u Mostaru, Mostar.
- Pravilnik o izmjenama pravilnika o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje kojim se provode uredbe europske komisije o izmjenama direktive 2002/32/ez europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (2012), *Narodne novine* **124** (NN 124/12)
- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2012), *Narodne novine* **146** (NN 146/12)
- Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (2010), *Narodne novine* **80** (NN 80/10)
- Pravilnik o stavljanju na tržište i korištenju hrane za životinje (2010), *Narodne novine* **111** (NN 111/10)
- Radovanović, Z. (1991) Epidemiological characteristics of Balkan endemic nephropathy in eastern regions of Yugoslavia. *IARC sci. publ.* **115**, 11-20.
- 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. *Appl. Environ Microb.* **72(6)**, 3968-3974.
- Rapp, A., Mandery, H. (1986) Wine aroma, *Experientia* **42(8)**, 873-884.



- Refai, M. K., Aziz, N. H., El-Far, F., Hassan, A. A. (1996) Detection of ochratoxin produced by *A. Ochraceus* in feedstuffs and its control by g radiation. *Appl. Radiat. Isotopes* **47**, 617–621.
- Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud (2006) Handbook of Enology, 1. izd.: The Microbiology of Wine and Vinifications, John Wiley & Sons, str. 24.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., Larondelle, Y. (2006) Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem-Biol Interact.* **59**, 18–46.
- Rojas, V., Gil, J., Piñaga, F., Manzanares, P. (2003) Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 181–188.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003) Function of yeasts species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 169–180.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M. (1997) Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **82(5)**, 615-618.
- Sakthiselvan, P., Meenambiga, S. S., Madhumathi, R. (2019) Kinetic Studies on Cell Growth. U: Cell Growth, (Vikas, B., Fasullo, M., ured.), IntechOpen, str. 1-9.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lawrence, G. A., Daley, E. F., Farber, J. M. (1995) Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Addit. Contam.* **12(1)**, 31-40.
- Sengupta, S., Deb, M., Nath, R., Saha, S. P., Bhattacharjee, A. (2020) Optimization of Ethanol Production using Nitrosative Stress Exposed *S. cerevisiae*. *Cell Biochem. Biophys.* **78(1)**, 101-110.
- Soden, A., Francis, I. L., Oakey, H., Henschke, P. A. (2000) Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine R.* **6(1)**, 21-30.

Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić–Rački, Đ., Delaš, F., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapac, T. (2010) Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek.

Škrinjar, M., Rašić, J.L., Stojičić, V. (1996) Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacterial. *Folia Microbiol.* **41**, 26–28.

van Maris, A. J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek* **90(4)**, 391-418.

Varga J., Rigó K., Téren, J. (2000) Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 1–7.

Velázquez, J. B., Longo, E., Sieiro, C., Cansado, J., Calo, P., Villa, T. G. (1991) Improvement of the alcoholic fermentation of grape juice with mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* wild strains. Negative effect of *Kloeckera apiculata*. *World J. Microb. and Biot.* **7(4)**, 485-489.

Venturin, C., Boze, H., Moulin, G., Galzy, P. (1995) Glucose metabolism, enzymic analysis and product formation in chemostat culture of *Hanseniaspora uvarum*. *Yeast* **11(4)**, 327-336.

Wang, Y., Zhang, S., Liu, H., Zhang, L., Yi, C., Li, H. (2015) Changes and roles of membrane compositions in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. *J. Basic Microb.* **55(12)**, 1417-1426.

Wang, Z., Yan, M., Chen, X., Li, D., Qin, L., Li, Z., Yao, J., Liang, X. (2013) Mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* for acetic acid production. *Biochem. Eng. J.* **79**, 41-45.

Whitehead, M. P., Flannigan, B. (1989) The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol and yeast growth and fermentation. *J. I. Brewing* **95(6)**, 411-413.

Wickerham, L. J. (1966) Validation of the species *Pichia guilliermondii*. *J. bacterial.* **92(4)**, 1269.

Zhao, Y., Li, Y., Zhang, B. (2020) Induced resistance in peach fruit as treated by *Pichia guilliermondii* and their possible mechanism. *Int. J. Food Prop.* **23(1)**, 34-51.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Ime i prezime studenta