

# Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasaca na vezanje, razgradnju i toksičnost okratoksina A u in vitro uvjetima

---

Jakopović, Željko

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:380714>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Željko Jakopović

**UTJECAJ ODABRANIH SOJEVA  
VINSKIH KVASACA NA VEZANJE,  
RAZGRADNJU I TOKSIČNOST  
OKRATOKSINA A U *IN VITRO*  
UVJETIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Željko Jakopović

**UTJECAJ ODABRANIH SOJEVA  
VINSKIH KVASACA NA VEZANJE,  
RAZGRADNJU I TOKSIČNOST  
OKRATOKSINA A U *IN VITRO*  
UVJETIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Željko Jakopović

**EFFECT OF SELECTED WINE YEAST  
STRAINS ON BINDING, DEGRADATION  
AND TOXICITY OF OCHRATOXIN A *IN  
VITRO***

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Ksenija Markov, Full Professor

Zagreb, 2021

*Informacije o mentoru: prof. dr. sc. Ksenija Markov*

## **ŽIVOTOPIS**

Prof. dr. sc. Ksenija Markov, rođena je u Zagrebu, gdje je 1982. godine upisala Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 1987. godine i iste godine zaposlila se u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, PBF-a kao pripravnik-postdiplomand. Akademski stupanj magistra biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija, stekla je 1991., a akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija, 2005. godine obranivši doktorski rad na PBF-u. Zvanje izvanredne profesorice stječe 2012. godine, a redovite profesorice 2017. godine. Od 2013. godine je pročelnica Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica PBF-a. Kao nastavnik sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima. Nositeljica je kolegija *Mikrobiologija*, *Mikologija* i *Mikrobni indikatori u kontroli kvalitete hrane*; a suradnica je na kolegijima *Mikrobiologija namirnica*, *Bakteriologija*, *Sustavi kontrole kvalitete* i *Mikrobiologija hrane*. Od 2019. godine voditeljica je poslijediplomskog specijalističkog studija „Upravljanje hranom“ na PBF-u. Znanstveno se usavršila iz područja mikrobiologije i mikotoksikologije, a završila je i programe usavršavanja visokoškolske nastave. Koautorica je četiri sveučilišna udžbenika, jedne znanstvene knjige, pet poglavlja u znanstvenim knjigama te tri stručne knjige. Pod njenim mentorstvom izrađena su 29 diplomskih rada i 21 završni rad te obranjena tri doktorska rada i 9 specijalističkih radova. Od 2012. godine član je Uredničkog odbora znanstveno-stručnog časopisa *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. Prof. dr. sc. Ksenija Markov je od 2007. godine članica brojnih odbora i povjerenstava na PBF-u, članica je Povjerenstva u Ministarstvu zdravlja (2014.-) i Ministarstvu poljoprivrede (2019.-), Stručne radne skupine za Codex alimentarius (2018.-), Povjerenstva za utvrđivanje kriterija i potvrdu izbora u zvanja VBT područja (2019.-2021.). Bila je članica brojnih znanstvenih i organizacijskih odbora. Sudjelovala je kao suradnica ili kao voditeljica u provedbi 19 domaćih i stranih znanstvenih projekata te kao konzultantica na jednom znanstvenom projektu. Rezultati znanstvenih istraživanja zaštićeni su s 3 nacionalna patenta, a objavila je ukupno 87 znanstvena rada od kojih su 44 rada klasificirana u a1 skupinu, 30 u a2 skupinu, 13 je radova s kongresa i skupova iz kategorije a3 i desetak stručnih radova. Članica je Društva sveučilišnih nastavnika i ostalih znanstvenika u Zagrebu, Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista i Hrvatskog mikrobiološkog društva. Od 2019. godine obnaša dužnost predstojnice Zavoda za biokemijsko inženjerstvo PBF-a.

## ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Kseniji Markov. Hvala na konstruktivnim savjetima, rješavanju problema, na ljubaznim riječima, toplini, brzi, podršci, mentoriranju i uloženom trudu tijekom izrade doktorskog rada.

Hvala prof. dr. sc. Jadranki Frece, na nesebičnoj pomoći, potpori i savjetima.

Hvala kolegama, Ivi Čanak i Deniju Kostelcu što svaki dan čine zabavnim, zanimljivim i izazovnim (u najboljem smislu riječi). Što uvijek uskaču, pomažu i budu prijatelji.

Hvala Ines Kuk i Vesni Jurišević na pomoći, podršci i ohrabrenjima.

Hvala izv. prof. dr. sc. Jelki Pleadin, na savjetima te znanstvenoj i analitičkoj podršci.

Hvala izv. prof. dr. sc. Bojanu Šarkanju na razgovorima, savjetima i pomoći.

Hvala prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na srdačnosti, idejama i podršci.

Hvala doc. Davoru Valingeru na nesebičnoj pomoći, savjetima, kritikama i izdvojenom vremenu.

Hvala svim profesorima i kolegama sa Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, kojima se uvijek mogu obratiti i s kojima uvijek mogu porazgovarati.

Veliko hvala mojim roditeljima, Božici i Vladimiru, koji su mi tijekom cijelog života pružali bezuvjetnu potporu, poticali me i hrabрили kada je bilo potrebno te omogućili napredovanje, u svakom smislu. Hvala sestrama, posebno Marijani na savjetima, potpori, razgovorima i motivaciji. Hvala Jeleni, što me sluša, trpi i ne žali se, što me potiče i gura prema ostvarenju zadanih ciljeva.

Hvala mojim prijateljima što su uvijek tu, a ne samo kad su potrebni.

***„You can't go back and change the beginning, but you can start where you are and change the ending.“***

**C.S. Lewis**

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 57.085:582.282.12:582.282.23(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

**UTJECAJ ODABRANIH SOJEVA VINSKIH KVASACA NA VEZANJE,  
RAZGRADNJU I TOKSIČNOST OKRATOKSINA A U *IN VITRO* UVJETIMA**

*Željko Jakopović, mag. ing. techn. aliment.*

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

**Kratki sažetak**

Okratoksin A (OTA) se u značajnim koncentracijama pojavljuje i u vinu pa se za njegovo uklanjanje primjenjuju različite strategije. Cilj ovog rada je bio odabrati sojeve vinskih kvasaca koji će razviti specifičan odgovor na OTA, pri čemu će ga razgraditi ili modificirati u manje toksične produkte. Dobiveni rezultati ukazuju da su kvasci razvili mehanizme prilagodbe na uvjete u kojima je prisutan mikotoksin, jer koncentracija OTA nije značajno utjecala na veličinu i broj živih stanica kvasaca kao ni na koncentraciju produkata fermentacije. Na parametre oksidativnog stresa u stanicama kvasaca djeluje prisutnost OTA u YPG mediju, a što se vidi iz povećanja koncentracija glutatona (GSH) i malondialdehida (MDA). Na njihove povećane koncentracije mogu utjecati i drugi parametri poput kombinacije vremena trajanja uzgoja i različitih sojeva kvasaca. Uočeno je da početna koncentracija OTA ima značajan utjecaj na koncentraciju OTA koji zaostaje u mediju. Kao najbolji soj za vezanje/uklanjanje OTA pokazao se *Saccharomyces cerevisiae* 5 koji je u ovisnosti o koncentraciji OTA (2, odnosno 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 24 sata uzgoja vezao 38, odnosno 36 % OTA. Nadalje, razgradnja OTA do okratoksina C (OTC) ovisna je o vremenu uzgoja, a početna koncentracija OTA ima značajan utjecaj na koncentraciju nastalog OTC. Najbolju sposobnost biorazgradnje OTA do OTC (0,737  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) nakon 12 sati uzgoja pokazao je kvasac *Saccharomyces uvarum*. OTA u koncentracijama 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  kao i nastali OTC nisu toksični prema Pk15 stanicama, budući da su stanice pokazale visoku stopu preživljenja (98 – 99 %).

**Broj stranica:** 133

**Broj slika:** 39

**Broj tablica:** 19

**Broj literaturnih navoda:** 242

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** biorazgradnja, okratoksin A, toksičnost, vezanje, vinski kvasci

**Datum obrane:** 8.10.2021.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Jadranka Frece
2. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
3. izv. prof. dr. sc. Jelka Pleadin
4. prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan (zamjenski član)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

PhD thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 57.085:582.282.12:582.282.23(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### EFFECT OF SELECTED WINE YEAST STRAINS ON BINDING, DEGRADATION AND TOXICITY OF OCHRATOXIN A IN VITRO

*Željko Jakopović, MSc Food Engineering*

Thesis performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb

Supervisor: PhD Ksenija Markov, Full Professor

#### Short Abstract

Ochratoxin A (OTA) also occurs in significant concentrations in wine, so various strategies are used to eliminate it. The aim of this study was to select strains of wine yeast that will develop a specific response to OTA, by degrading or modifying it into less toxic products. The obtained results indicate that yeasts have developed mechanisms of adaptation to conditions in which mycotoxin is present, because the concentration of OTA did not significantly affect the size and number of living yeast cells not the concentration of fermentation products. The parameters of oxidative stress in yeast cells are affected by the presence of OTA in the YPG medium, which can be seen from the increase in the concentrations of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). Their increased concentrations can be affected by other parameters such as the combination of cultivation time and different strains of yeast. It was observed that the initial OTA concentration has a significant effect on the residual OTA concentration in the medium. *Saccharomyces cerevisiae* 5 proved to be the best strain for binding/removing OTA, which, depending on the concentration of OTA (2 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) after 24 hours of cultivation, bound 38 and 36 % OTA, respectively. Furthermore, the degradation of OTA to ochratoxin C (OTC) is time-dependant, and the initial concentration of OTA has a significant effect on the concentration of the resulting OTC. The best ability to biodegrade OTA to OTC (0.737  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) after 12 hours of cultivation was shown by the yeast *Saccharomyces uvarum*. OTA at concentrations of 2 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  as well as the resulting OTC are not toxic to Pk15 cells, as the cells showed a high survival rate (98 – 99 %).

**Number of pages:** 133

**Number of figures:** 39

**Number of tables:** 19

**Number of references:** 242

**Original in:** Croatian

**Key words:** biodegradation, ochratoxin A, toxicity, binding, wine yeasts

**Date of the thesis defense:** 8.10.2021.

#### Reviewers:

1. PhD. Jadranka Frece, Full Professor
2. PhD. Jasna Mrvčić, Full Professor
3. PhD. Jelka Pleadin, Associate Professor
4. PhD. Vesna Zechner-Krpan, Full professor (substitute)

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb, University of Zagreb, Trg maršala Tita, Zagreb.



*Tema doktoacije prihvaćena je na 7. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta akademske godine 2019./2020. u Zagrebu održanoj 28. travnja 2020. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 14. srpnja 2020. godine na 11. redovitoj elektroničkoj sjednici u 351. akademskoj godini (2019./2020.).*

## SAŽETAK

Iako su žitarice i njihovi proizvodi glavni izvor okratoksina A (OTA), krajem prošlog stoljeća pronađene su značajne koncentracije OTA u vinu. Prisutnost OTA u vinima je zabrinjavajuća jer je dokazana povećana koncentracija OTA u krvi osoba koje su konzumirale crno vino te je procijenjeno da bi vino moglo biti odgovorno za 10 do 15 % od ukupnog dnevnog unosa OTA u organizam. Temeljem takvih saznanja zaključeno je kako je vino uz žitarice najčešći izvor izloženosti OTA u Europi pa je slijedom toga određena maksimalna dozvoljena koncentracija OTA u vinu od  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Činjenica je da konzumacija vina može znatno pridonijeti izloženosti ljudi okratoksinu A, a podaci u literaturi o njegovoj pojavnosti i toksičnosti, ali i učinkovitim metodama smanjivanja njegove koncentracije upućuju na potrebu za njihovim daljnjim istraživanjem. Fizikalne i kemijske metode smanjenja koncentracije OTA imaju ograničenu primjenu zbog nedovoljno saznanja o produktima degradacije, promjenama nutritivnog sastava i organoleptičkih svojstava hrane te se iz tog razloga mikrobiološke metode nameću kao adekvatna alternativa. Neki od najznačajnijih primjera mikrobioloških agenasa za detoksikaciju su bakterije mliječne kiseline (BMK) i kvasci. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj dviju koncentracija OTA ( $2$  i  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na veličinu stanica, broj živih stanica, fermentacijsku aktivnost i parametre oksidativnog stresa (koncentracije glutaciona i malondialdehida) odabranih sojeva vinskih kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae* 5, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* DSMZ, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora uvarum* i *Pichia guilliermondii*). Slijedeći koraci u istraživanju su bili odabiranje sojeva kvasaca te ispitivanje njihove sposobnosti biorazgradnje tj. smanjivanja koncentracije OTA u YPG mediju. A budući da je ciljano mjesto djelovanja OTA bubreg, što znači da je OTA nefrotoksičan, bilo je potrebno ispitati i toksičnosti nastalih biorazgradnih produkata na staničnoj liniji bubrega svinja (Pk15 stanice). Dobiveni rezultati pokazuju da OTA ima neznatan utjecaj na krivulju rasta kvasaca što sugerira da su kvasci razvili mehanizme prilagodbe na uvjete u kojima je prisutan mikotoksin. Nadalje, na veličinu stanica kvasaca utječe vrijeme izloženosti OTA kao i njegova koncentracija, pri čemu je *Kluyveromyces marxianus* pokazao najmanju osjetljivost. Povišene koncentracije glutaciona (GSH) i malondialdehida (MDA) upućuju na pojavu oksidativnog stresa tijekom uzgoja kvasaca u mediju s dodanim OTA, a što je u direktnoj ovisnosti o soju kvasca i vremenu izloženosti OTA. Kvasac s najvećim potencijalom za smanjenje koncentracije OTA u YPG mediju je *S. cerevisiae* 5, budući da je uklonio/vezao 38, odnosno 36 % OTA u uzorcima s dodanih 2, odnosno  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA te kao takav pokazuje najbolju mogućnost primjene. Od svih ispitanih kvasaca, *H. uvarum* i *S. uvarum* pokazali su nakon 12 sati uzgoja

najveću sposobnost biorazgradnje OTA do OTC. Sposobnost kvasaca da vežu OTA ili ga razgrade do OTC utječe i na toksičnost prema Pk15 stanicama, koje su nakon tretmana pokazale izuzetno visoku stopu preživljavanja (98 - 99 %), što upućuje da ispitivane koncentracije OTA, kao ni nastali OTC nisu toksični prema Pk15 stanicama.

**Ključne riječi:** biorazgradnja, okratoksin A, toksičnost, vezanje, vinski kvasci

## SUMMARY

Although cereals and their products are the main source of ochratoxin A (OTA), significant concentrations of OTA in wine were found at the end of the last century. The presence of OTA in wines is worrying because an increased concentration of OTA in the blood of people who consumed red wine has been proven and it is estimated that wine could be responsible for 10 to 15 % of the total daily intake of OTA in the body. Based on such findings, it was concluded that wine with cereals is the most common source of OTA exposure in Europe, and consequently the maximum permissible OTA concentration in wine of  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  was determined. The fact is that wine consumption can significantly contribute to human exposure to OTA, and data in the literature on its occurrence and toxicity, but also effective methods of reducing its concentration suggest the need for their further research. Physical and chemical methods of reducing OTA concentration have limited application due to insufficient knowledge of degradation products, changes in nutritional composition and organoleptic properties of food, and for this reason microbiological methods are imposed as an adequate alternative. Some of the most significant examples of microbiological detoxifying agents are lactic acid bacteria (LAB) and yeasts. Therefore, the aim of this study was to examine the effect of two concentrations of OTA ( $2$  and  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) on cell size, number of living cells, fermentation activity and oxidative stress parameters (glutathione and malondialdehyde concentrations) of selected wine yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* 5, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* DSMZ, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia guilliermondii*). The next steps in the research were the selection of yeast strains and the examination of their ability to biodegrade, i.e. to reduce the concentration of OTA in the YPG medium. And since the target site of action of OTA is the kidney, which means that OTA is nephrotoxic, it was necessary to examine the toxicity of the resulting biodegradation products on the porcine kidney cell line (Pk15 cells). The obtained results show that OTA has a negligible effect on the yeast growth curve suggesting that yeasts have developed mechanisms of adaptation to conditions in which mycotoxin is present. Furthermore, the size of yeast cells is affected by the time of exposure to OTA as well as its concentration, with *Kluyveromyces marxianus* showing the least sensitivity. Elevated concentrations of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) indicate the occurrence of oxidative stress during yeast cultivation in medium with added OTA, which is directly dependent on the yeast strain and the time of OTA exposure. The yeast with the greatest potential to reduce the OTA concentration in YPG medium is *S. cerevisiae* 5, as it removed/bound 38 and 36 % of OTA, respectively, in samples with added  $2$  and  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$

OTA, respectively, and as such shows the best applicability. Of all the yeasts tested, *H. uvarum* and *S. uvarum* showed the greatest ability to biodegrade OTA to OTC after 12 hours of cultivation. The ability of yeast to bind OTA or degrade it to OTC also affects the toxicity to Pk15 cells, which after treatment showed an extremely high survival rate (98 – 99 %), which indicates that the tested concentrations of OTA and the resulting OTC are not toxic to Pk15 cells.

**Key words:** biodegradation, ochratoxin A, toxicity, binding, wine yeasts

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Kvasci</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Vinski kvasci .....	3
2.1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
2.1.1.2. <i>Saccharomyces uvarum</i> .....	6
2.1.1.3. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	6
2.1.1.4. <i>Saccharomyces bayanus</i> .....	7
2.1.1.5. <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	8
2.1.1.6. <i>Pichia guilliermondii</i> .....	9
2.1.2. Oksidativni stres u kvasaca.....	10
<b>2.2. Mikotoksini</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Okratoksin A.....	11
2.2.1.1. Struktura i fizikalno kemijska svojstva okratoksina A .....	12
2.2.1.2. Plijesni producenti okratoksina A .....	14
2.2.1.3. Biosinteza i metabolizam okratoksina A .....	14
2.2.1.4. Mehanizam djelovanja okratoksina A.....	18
2.2.1.5. Toksični učinci okratoksina A u organizmu .....	20
2.2.1.6. Pojavnost okratoksina A u vinima .....	21
<b>2.3. Zakonska regulativa</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4. Metode smanjenja koncentracije i uklanjanja okratoksina A</b> .....	<b>25</b>
2.4.1. Mikrobiološke metode uklanjanja okratoksina A.....	26
2.4.1.1. Detoksikacija okratoksina A vezanjem.....	27
2.4.1.2. Degradacija ili biotransformacija OTA.....	29
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>31</b>
3.1.1. Mikroorganizmi .....	31
3.1.2. Hranjive podloge .....	31
3.1.3. Kemikalije, reagensi i otapala.....	31
3.1.4. Priprema otopina i pufera .....	32
3.1.5. Standard OTA.....	33
3.1.6. Pribor .....	33

3.1.7. Uređaji .....	34
3.1.8. Računalni programi .....	35
<b>3.2. METODE RADA.....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Priprema stanica kvasca.....	36
3.2.2. Priprema uzoraka.....	36
3.2.3. Određivanje utjecaja OTA na morfoloiju, rast i fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca u <i>in vitro</i> uvjetima.....	37
3.2.3.1. Određivanje veličine stanica kvasca u prisutnosti OTA .....	37
3.2.3.2. Određivanje broja živih stanica kvasaca u prisutnosti OTA.....	39
3.2.3.3. Određivanje produkata fermentacije kvasaca u prisutnosti OTA .....	39
3.2.4. Određivanje utjecaja OTA na parametre oksidativnog stresa u kvasaca.....	41
3.2.4.1. Određivanje koncentracije glutationa (GSH).....	41
3.2.4.2. Priprema uzoraka biomase kvasaca tretiranih s OTA za određivanje koncentracije GSH.....	41
3.2.4.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA).....	42
3.2.4.4. Priprema uzoraka biomase kvasaca tretiranih s OTA za određivanje koncentracije MDA .....	42
3.2.5. Određivanje koncentracije OTA HPLC-MS/MS metodom .....	43
3.2.5.1. Priprema uzorka .....	43
3.2.5.2. Kvantitativno određivanje OTA.....	43
3.2.6. Određivanje biorazgradnih produkata OTA .....	45
3.2.6.1. Priprema uzorka .....	45
3.2.6.2. Multimikotoksinska analiza pomoću UHPLC-MS/MS metode .....	45
3.2.7. Određivanje citotoksičnosti biorazgradnih produkata OTA na Pk15 stanicama MTT testom.....	46
3.2.7.1. Priprema uzorka .....	46
3.2.7.2. Uzgoj i održavanje Pk15 stanica u kulturi .....	46
3.2.7.3. Određivanje citotoksičnosti razgradnih produkata OTA MTT testom .....	47
3.2.8. Statistička obrada podataka .....	47
3.2.8.1. Umjetne neuronske mreže (ANN) .....	48
3.2.8.2. Metodologija odzivne površine (RSM) .....	48
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Utjecaj OTA na morfoloiju, rast i fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca u <i>in vitro</i> uvjetima .....</b>	<b>50</b>

4.1.1. Rezultati utjecaja OTA na morfologiju odabranih sojeva kvasaca .....	50
4.1.2. Rezultati utjecaja OTA na broj živih stanica odabranih sojeva kvasaca .....	54
4.1.3. Rezultati utjecaja OTA na fermentacijske produkte odabranih sojeva kvasaca.....	58
<b>4.2. Rezultati utjecaja OTA na parametre oksidativnog stresa vinskih kvasaca .....</b>	<b>61</b>
4.2.1. Rezultati utjecaja OTA na koncentraciju GSH.....	61
4.2.2. Rezultati utjecaja OTA na koncentraciju MDA .....	62
<b>4.3. Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasca na koncentraciju i biorazgradnju OTA u <i>in vitro</i> uvjetima .....</b>	<b>63</b>
4.3.1. Rezultati uklanjanja OTA iz medija pomoću odabranih sojeva vinskih kvasaca.....	63
4.3.2. Rezultati utjecaja odabranih sojeva vinskih kvasaca na biorazgradnju OTA.....	65
4.3.3. Rezultati citotoksičnosti biorazgradnih produkata OTA na Pk15 stanicama .....	71
<b>4.4. Statistička obrada.....</b>	<b>71</b>
4.4.1. Rezultati predviđanja neuronskih mreža .....	71
4.4.2. Rezultati metodologije odzivne površine (RSM) .....	76
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>84</b>
<b>5.1. Utjecaj OTA na morfologiju, rast i fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca u <i>in vitro</i> uvjetima .....</b>	<b>84</b>
5.1.1. Utjecaj OTA na morfologiju stanica odabranih sojeva kvasaca.....	84
5.1.2. Utjecaj OTA na broj živih stanica odabranih sojeva kvasaca .....	87
5.1.3. Utjecaj OTA na proizvodnju produkata fermentacije odabranih sojeva kvasaca.....	90
<b>5.2. Utjecaj OTA na parametre oksidativnog stresa u vinskim kvascima .....</b>	<b>96</b>
5.2.1. Utjecaj OTA na koncentraciju glutaciona (GSH) .....	96
5.2.2. Utjecaj OTA na koncentraciju malondialdehida (MDA) .....	98
<b>5.3. Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasca na koncentraciju i biorazgradnju OTA. 100</b>	
5.3.1. Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasca na koncentraciju OTA u mediju .....	100
5.3.2. Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasaca na biorazgradnju OTA .....	104
5.3.3. Toksičnost biorazgradnih produkata OTA .....	107
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>108</b>
<b>7. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>110</b>



## **1. UVOD**

Klimatske promjene i globalizacija tržišta hrane uzrokuju povećanu učestalost onečišćenja hrane plijesnima i njihovim sekundarnim toksičnim produktima, mikotoksinima, koji u prehrambeni lanac čovjeka ili životinja mogu ući izravnom ili neizravnom kontaminacijom. Kao jednim od ključnih proizvoda na tržištu i jednim od najvažnijih sastojaka mnogih europskih i mediteranskih kuhinja smatra se vino, proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim vrenjem masulja ili mošta grožđa vinove loze (*Vitis Viniferae L.*)

Svježe grožđe u svojem tkivu sadrži visoke  $a_w$ -vrijednosti te niži pH što podržava rast različitih mikroorganizama. Od ukupnog broja mikroorganizama koji se mogu naći na bobici grožđa, 95 - 98 % pripada plijesnima i bakterijama, a samo 2 - 5 % su kvasci, stoga se smatra da su plijesni najčešći uzročnici kvarenja grožđa (Mitchell i sur., 2004).

Devedesetih godina prošlog stoljeća pronađene su značajne koncentracije OTA u vinu i pivu, a pojava OTA u proizvodnom lancu vina je povezana s prisustvom takozvane „crne plijesan“ na grožđu tijekom uzgoja. „Crna plijesan“ podrazumijeva vrste *Aspergillus carbonarius* te *A. niger* i *A. tubingensis* koje su izolirane s bobica grožđa, tla i zraka na površinama vinograda. OTA se tijekom uzgoja vinove loze nakuplja na bobivama grožđa, a u procesu proizvodnje dospijeva i u vino (Visconti i sur., 2008).

Prisutnost OTA u vinima je postala zabrinjavajuća nakon što je dokazana povećana koncentracija OTA u krvi osoba koje su konzumirale crno vino budući da je procijenjeno da bi vino moglo biti odgovorno za 10 do 15 % od ukupnog dnevnog unosa OTA (Zimmerli i Dick, 1996; Mateo i sur., 2007; Covarelli i sur., 2012). Na osnovi takvih saznanja zaključeno je kako je vino uz žitarice najčešći izvor izloženosti ljudi OTA (Rotaru i sur., 2011). Stoga je, prema Europskoj komisiji (EC, uredba 123/2005) i Međunarodnoj organizaciji za vinogradarstvo i vinarstvo (OIV, franc. *L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*) (OIV, 2002) određena najveća dopuštena količina (NDK) OTA za vino od  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  odnosno  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

S obzirom na činjenicu da konzumacija vina može znatno pridonijeti izloženosti ljudi OTA, traže se moguća rješenja za smanjenje količine OTA u vinima, ali i u drugim proizvodima na bazi grožđa (npr. sokovi). Neki autori navode da je odgovarajućom vinogradarskom praksom, kontrolom biotičkih i abiotičkih parametara moguće značajno smanjiti koncentraciju OTA u vinima (Varga i Kozakiewicz, 2006; Covarelli, 2012; Somma i sur., 2012). Kako bi se smanjila mogućnost pojavljivanja OTA u vinu i olakšalo njegovo uklanjanje iz vina, primjenjuju se različite strategije koje se temelje na fizikalnim, kemijskim i (mikro)biološkim procesima (Quintela i sur., 2013). Upotreba bioloških metoda detoksikacije mikotoksina predstavlja obećavajuću strategiju, budući da obuhvaćaju upotrebu mikroorganizama i/ili enzima koji imaju sposobnost adsorpcije, transformiranja ili razgradnje mikotoksina do manje toksičnih

spojeva (Hathout i Aly, 2014; Commission Regulation 2015/786/EU). Iako, mikrobiološke metode razgradnje OTA nisu dovoljno istražene, pretpostavlja se da uključuju dva osnovna mehanizma: degradaciju (razgradnju) i adsorpciju OTA (Piotrowska i sur., 2013; Petruzzi i sur., 2014a). Mehanizam mikrobiološke razgradnje OTA podrazumijeva formiranje netoksičnih spojeva poput L- $\beta$ -fenilalanina i OT $\alpha$  hidrolizom amino veze, dok se adsorpcijski mehanizam vezanja temelji na fizikalnom vezanju OTA za staničnu stijenku kvasca. Dosadašnja znanstvena istraživanja ukazuju na obećavajuću primjenu vinskih kvasaca u uklanjanju OTA iz vina i proizvoda od grožđa (Petruzzi i sur., 2013; Piotrowska i sur., 2013; Petruzzi i sur., 2014a; Quintela i sur., 2013).

Kvasci su već dugi niz godina interesanti kao mikroorganizmi odgovorni za promjene u moštu, ali i kao mikroorganizmi koji predstavljaju jedinstvenu skupinu za biokontrolu mikotoksina. Međutim, brojni stresni faktori kao što su etanol, CO<sub>2</sub>, ali i mikotoksini, mogu utjecati na fermentacijsku aktivnost kvasaca (Foszyńska i Dziuba, 2007a), bilo usporavanjem fermentacije, bilo utjecajem na količinu hlapljivih nusproizvoda fermentacije (Kłosowski i Mikulski, 2010). O upotrebi kvasaca u biokontroli, biorazgradnji, uklanjanju ili vezivanju mikotoksina već se dosta zna. No, malo se zna o učincima mikotoksina kao agenasa stresa na kvasce, o ponašanju kvasaca tijekom fermentacije u medijima kontaminiranim mikotoksinima kao i o utjecaju mikotoksina na proizvode fermentacije. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti utjecaj OTA na rast, morfologiju, fermentacijske produkte i parametre oksidativnog stresa odabranih sojeva vinskih kvasaca kao i njihovu sposobnost vezanja ili razgradnje OTA u manje toksične produkte te toksičnost nastalih produkata na staničnu liniju bubrega svinje (Pk15 stanice).

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Kvasci

Kvasci se od davnina koriste u tradicionalnoj proizvodnji, ali također imaju važnu ulogu u industrijskoj proizvodnji fermentirane hrane i pića te u biotehnološkoj proizvodnji, na primjer etanola. Izuzetno su korisni i izvrsni modelni organizmi jer su kao jednostanični eukariotski organizmi vrlo jednostavni za uzgoj što omogućuje provedbu istraživanja u kontroliranim uvjetima, a odražavaju složenu staničnu građu viših eukariota. Po brojnosti čine ekonomski najznačajniju skupinu mikroorganizama (Sherman, 2002).

Kvasci su jednostanične, nefotosintetičke, fakultativno anaerobne, mikroskopske nemicelijske gljive koje imaju tipičan kuglast ili jajolik oblik. Kao eukariotski organizam stanica kvasca (blastospora ili blastokonidija) uključuje jezgru (okruženu jezgrenom membranom), staničnu stijenk, periplazmatski prostor, citoplazmatsku membranu, mitohondrije, ribosome, glikogenska zrnca, lipidne čestice, glatki i grubi endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, peroksisome i vakuole. 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 (Aranda i sur., 2011). Upravo se sposobnost fermentacije, pri kojoj nastaju CO<sub>2</sub> i etanol, koristi u proizvodnji vina, piva i kiselog tijesta.

Međutim, kvasci su izuzetno osjetljivi na promjene uvjeta u okolini. 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. 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 (Dziuba i sur., 2007; Foszyńska i Dziuba, 2007a,b).

### 2.1.1. Vinski kvasci

Sredinom 19. stoljeća otkrivena je uloga kvasca u alkoholnoj fermentaciji pa tako i u prevođenju grožđa u vino. U to vrijeme Louis Pasteur dokazuje da kvasci odgovorni za spontanu fermentaciju mošta ili masulja dolaze s površine grožđa i da fermentacija nije kemijski proces, već nastaje aktivnošću specifičnih mikroorganizama (Barnett, 2000). Kvasci kao najvažniji mikroorganizmi uključeni u proizvodnju vina, utječu na brzinu fermentacije, proizvodnju sekundarnih produkata kao i na aromatske karakteristike vina.

Kao izvor vinskih kvasaca, uz grožđe na kojem prevladavaju kvasci iz roda *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* i *Hansenula*, je i površina opreme u vinariji koja dolazi u kontakt s groždanim sokom i vinom te postaje mjesto razvoja tzv. "flore vinarije" u kojoj prevladava kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet i sur., 2003).

Tijekom godina znanstvena su se istraživanja bavila analiziranjem i identifikacijom kvasaca na površini grožđa (Fleet, 1990; De Adres-De Prado i sur., 2007), a pojedina istraživanja su potvrdila kako je kvasac *S. cerevisiae* na zdravom grožđu prisutan u vrlo niskoj koncentraciji (Martini, 1993; Pretorius, 2000). Najčešće izolirana autohtona vrsta kvasca s površine bobica grožđa je *Hanseniaspora uvarum*, koja može činiti više od 50 % ukupne flore izoliranih kvasaca. Također, zabilježen je određen broj drugih vrsta kvasaca poput *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* i *Rhodotorula* (Velázquez i sur., 1991; Sabate i sur., 2002). Međutim, potrebno je naglasiti kako mikroflora grožđa uvelike ovisi o zemljopisnom položaju, količini padalina, temperaturi, vrsti tla, upotrebi fungicida, starosti vinograda, sorti grožđa i načinu berbe (Pretorius i sur., 1999). Općenito, na nezrelim bobicama grožđa je otkriveno vrlo malo sojeva kvasaca (*Rhodotorula*, *Cryptococcus* i *Candida*) i u malom broju ( $10 \cdot 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>), ali se tijekom dozrijevanja grožđa broj prisutnih kvasaca povećava ( $10^4$ - $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>). U tom periodu, šećeri difundiraju iz unutarnjih tkiva grožđa na površinu, potičući tako rast kvasaca. Sa zrelih, zdravih bobica grožđa uglavnom je moguće izolirati kvasce iz rodova *Hanseniaspora* i *Metschnikowia*, dok su kod oštećenih bobica, uz navedene, uočene i razne vrste iz rodova *Candida*, *Saccharomyces* i *Zygosaccharomyces* (Fleet, 2003).

Fermentativni kvasci, među kojima dominira *S. cerevisiae*, su odgovorni za fermentaciju vina, a druge vrste poput *S. bayanus*, *S. pastorianus* ili *S. paradoxus* mogu biti prisutne i sudjelovati u procesu fermentacije (Arroyo Lopez i sur., 2010). Pored fermentativnih kvasaca, u moštu je moguće pronaći i kvasce koji su nevažni za sam proces fermentacije, kao što je *Aureobasidium pullulans* (crni kvasac) koji ne može fermentirati šećere, a ni preživjeti u vinu (Kantor i sur., 2015). Fermentacijska sposobnost nije dobro definirana taksonomska značajka i neke vrste se smatraju slabim fermentacijskim kvascima pa su tako vrste poput *Candida* spp., *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia* spp. ili *Pichia* spp. prisutne prije fermentacije ili na samom početku fermentacije mošta (Romano i sur., 1997). Nizak pH vina, visok sadržaj šećera, anaerobni uvjeti i prisutnost fenolnih spojeva stvaraju idealno okruženje za potporu rasta kvasaca i njihovo obogaćivanje (Fleet, 2003; Romano i sur., 1997). Tako je iz vina identificirano preko 20 različitih rodova kvasca (Renouf i sur., 2007), dok su na grožđu dominantni sojevi poput

*Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* i *Candida stellata* (Kantor i sur., 2015), a često je moguće izolirati i identificirati i druge vrste kvasaca.

Tijekom postupka proizvodnje vina različiti mikroorganizmi koegzistiraju i međusobno reagiraju te tako utječu na dominaciju i postojanost fermentacijskih kvasaca i analitičke profile vina. Upotreba *S. cerevisiae* kao starter kulture je najrasprostranjenija praksa u vinarstvu s ciljem poticanja pouzdane i brze fermentacije što rezultira vinom jednake kvalitete. Međutim, inokulacija mošta odabranim sojevima kvasca iz roda *Saccharomyces* ne osigurava njihovu dominaciju do kraja fermentacije (Capece i sur., 2010), stoga ne čudi podatak da između vrsta istih rodova kvasaca (Arroyo-Lopez i sur., 2011) kao i između sojeva iste vrste kvasca (Perrone i sur., 2013) postoji konkurentnost i nadmetanje. Kako se s razvojem analitičkih metoda i tehnologija ponovno procjenjuje uloga kvasaca koji nisu iz roda *Saccharomyces* u procesima alkoholne fermentacije, sve je veći interes za upotrebom različitih vrsta kvasaca u mješovitoj kulturi, gdje upravo interakcije između kvasaca igraju temeljnu ulogu pri formiranju konačne arome vina.

Raznolikost vrsta kvasaca i opseg njihovog rasta u ranim fazama fermentacije mošta može uvelike utjecati na senzorske karakteristike konačnog proizvoda. Tijekom prvih pet dana fermentacije u proces su obično uključene različite vrste kvasaca koji nisu iz roda *Saccharomyces*, a zatim, do kraja procesa alkoholne fermentacije, dominiraju vrste iz roda *Saccharomyces* (posebno *S. cerevisiae*) koje su tolerantnije na prisutnost alkohola (Fleet, 1990; Granchi i sur., 1998).

#### 2.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Enološka mikroflora u velikoj se mjeri sastoji od kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Budući da je ovaj kvasac rijetko moguće izolirati iz vinograda i bobica grožđa, odražava se njegova sklonost prema rastu u grožđanom soku i moštu odnosno tijekom fermentacije u mediju s visokom koncentracijom šećera (Kantor i sur., 2015). Ovaj kvasac pokazuje veću otpornost na visoke temperature pa nakon tri do četiri dana fermentacije postaje dominantna vrsta i u konačnici je odgovorna 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).

*S. cerevisiae* proizvodi etanol, ugljikov dioksid i brojne nusprodukte, uključujući više alkohole i estere (Rapp i Mandery, 1986). 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), a 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). Sojevi kvasca *S. cerevisiae* se smatraju učinkovitima u smanjenju koncentracije OTA, a smanjenje koncentracije OTA tijekom fermentacijskih procesa može biti povezano i sa snažnom adsorpcijom mikotoksina na stanične stijenke kvasca (Freire, 2019).

#### 2.1.1.2. *Saccharomyces uvarum*

Sojevi kvasca *S. uvarum* obično se nalaze u vinskim okruženjima, a opisani su kao interspecifični hibridni sojevi između više *Saccharomyces* vrsta povezanih s fermentacijom vina (Perez-Torrado i sur., 2015). Fermentacijski profil u moštu grožđa kvasca *S. uvarum* razlikuje se od onog kvasca *S. cerevisiae*: proizvodi manje octene kiseline i etanola, ali više glicerola (Bertolini i sur., 1996). Štoviše, *S. uvarum* proizvodi hlapljive fermentacijske spojeve poput feniletanola i njegovog acetata ili hlapljivih tiola (Masneuf-Pmarede i sur., 2010). *S. uvarum* je također često odgovoran za fermentaciju jabukovače, što je povezano s njegovom aktivnošću pri niskim temperaturama (Suárez-Valles i sur., 2007) te se iz tih razloga komercijalni sojevi *S. uvarum* koriste za proizvodnju nekoliko vrsta vina i jabukovače (Almeida i sur., 2014).

#### 2.1.1.3. *Kluyveromyces marxianus*

Iako je kvasac *K. marxianus* izvorno izoliran iz grožđa, različiti sojevi su izolirani iz velikog broja različitih staništa, što rezultira velikom metaboličkom raznolikošću. Duga povijest sigurnog povezivanja *K. marxianus* s prehrambenim proizvodima, pomogla je stjecanju GRAS (eng. *Generally Regarded As Safe*) i QPS (eng. *Qualified Presumption of Safety*) statusa u SAD-u odnosno u Europskoj Uniji. Zbog navedenih oznaka, ali i niske patogenosti te osjetljivosti na antimikotike (Papon i sur., 2013) ograničenja u primjeni su izuzetno mala, a potencijal primjene u biotehnološkom sektoru vrlo velik. *K. marxianus* je termotoleranta vrsta kvasca, koja može proizvoditi etanol i pri visokim temperaturama (> 40 °C) te pritom koristiti različite izvore ugljikohidrata (laktoza, glukoza, celuloza) (Brady i sur., 1994; Barron i sur., 1995). Zbog sposobnosti rasta pri temperaturama od čak 52 °C, različite sojeve *K. marxianus* je moguće svrstati u skupinu termofila, a zabilježena je i iznimna sposobnost proizvodnje etanola pri 45



°C (95 – 100 % maksimalnog teoretskog prinosa) (Banat i sur., 1992). Ovakve karakteristike upućuju na potencijalne prednosti za industrijsku proizvodnju etanola u toplijim regijama.

Važno je napomenuti kako sojevi kvasaca *K. marxianus* i *S. cerevisiae* mogu proizvoditi etanol pri višim temperaturama fermentacije (45 – 50 °C), ali samo sojevi *K. marxianus* mogu i rasti pri navedenim temperaturama, dok je kod *S. cerevisiae* proizvodnja etanola moguća isključivo zbog pripreme početnog inokuluma pri temperaturi od 30 °C (Banat i sur., 1992).

Specifične studije su pokazale da *K. marxianus* doprinosi senzorskom profilu hrane i pića, producirajući više alkohole povezane s mirisom ruže i estere koji su odgovorni za cvjetne, odnosno voćne senzorske attribute (Morrissey i sur., 2015; Reyes-Sanchez i sur., 2019). Povrh navedenog, kvasac *K. marxianus* može proizvoditi enzime kao što su inulinaze,  $\beta$ -galaktozidaze,  $\beta$ -glukozidaze, proteinske fosfataze, karboksipeptidaze, aminopeptidaze i endopoligalakturonidaze (Fonseca i sur., 2008; Serrat i sur., 2011). Vina proizvedena primjenom sirovog enzimskog ekstrakta *K. marxianus* posjeduju bolje karakteristike boje, poput intenziteta i nijanse (Piemolini-Barreto i sur., 2014) kao i veću raznolikost i bogatstvo aroma (Sieiro i sur., 2014).

S obzirom da posjeduje karakteristike poželjne za biotehnošku primjenu, poput asimilacije ključnih šećera (laktoze i inulina), izuzetno brzu stopu rasta (generacijsko vrijeme 70 min), termotolerancije, sposobnosti rasta na 52 °C te visoke sposobnosti sekrecije aromatskih spojeva, a ujedno je i izvor brojnih enzima, kvasac *K. marxianus* je prihvaćen za industrijsku upotrebu (Fonseca i sur., 2008).

#### 2.1.1.4. *Saccharomyces bayanus*

*Saccharomyces bayanus* spada u kategoriju kvasaca koji lako fermentiraju mošt bogat fruktozom, što ga čini čestim izborom u proizvodnji pjenušavih i voćnih vina (Money, 2016). Tijekom fermentacijskih procesa, prisutan je uz kvasac *Saccharomyces cerevisiae* što rezultira nastankom velikog broja novih hibrida (González i sur., 2006). Hladna fermentacija postaje sve popularnija jer daje vrlo zanimljiva aromatična svojstva proizvedenim vinima pa stoga kvasci vrste *S. bayanus* postaju sve interesantniji. To se događa zbog većeg zadržavanja hlapljivih tvari nastalih tijekom fermentacije te utjecaja temperature na metabolizam kvasca (Benítez i sur., 2011; González i sur., 2011). Osim toga, u proizvodnji vina su zanimljivi zbog visoke pektinolitičke aktivnosti (Naumova i sur., 2019).

Ovi kvasci dominiraju u vinima iz regija s kontinentalnom klimom (Fernández-Espinar, 2011), iako su izvorno 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. Doduše, hibridna priroda i raznolikost sojeva *S. bayanus* otežavaju predviđanje njihovih metaboličkih sposobnosti (Rainieri, 2006).

Proizvodnja vina ledene berbe, 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* (Masneuf-Pomarède i sur., 2010; Bellon i sur., 2015). U istraživanju Bedriñana i sur. (2017), 96 % ispitivanih autohtonih sojeva *S. bayanus*, od njih ukupno 74, klasificirani su kao niski ili srednji proizvođači octene kiseline i skoro nijedan nije prepoznat kao visoki proizvođač octene kiseline.

#### 2.1.1.5. *Hanseniaspora uvarum*

*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 zaostale šećere 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).

Proizvodnja octene kiseline apikulatnim vinskim kvascima široko je proučavana (Plata i sur., 2003; Rojas i sur., 2003; Romano i sur., 2003), a 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).

Broj stanica kvasca *Hanseniaspora guilliermondii* i *Hanseniaspora uvarum* može narasti do  $10^6$ - $10^8$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  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 grožđanom soku nisu tolerantne na koncentracije etanola veće od 4-7 % (Fleet, 2003).

#### 2.1.1.6. *Pichia guilliermondii*

Kvasci iz roda *Pichia* često tvore pseudomicelij s oskudnim brojem pravih hifa te mogu, ali i ne moraju, provoditi fermentaciju. Fonseca i sur. (2007) su pokazali kako *P. guilliermondii* uz postupnu proizvodnju etanola iz glukoze proizvodi glicerol i acetat u tragovima. Kvascima iz roda *Pichia* veće koncentracije glukoze pogoduju proizvodnji etanola, ali ne i proizvodnji glicerola (Petrovska i sur., 1999).

Velik broj sojeva kvasca *P. guilliermondii* izoliran je iz različitih supstrata povezanih s vinskim okruženjem (Sangorrin i sur., 2008; Lopes i sur., 2009) te se smatra odgovornim za prisutnost fenolnih aroma u vinima (Lopes i sur., 2007). Dokazano je kako *P. guilliermondii* stvara značajne količine hlapivih fenola kao na primjer etilfenola u sintetičkom mediju (Martorell i sur., 2006) i vinilfenola u soku od grožđa (Lopes i sur. 2009), ali ne i u vinima (Jensen i sur., 2009). Važno je napomenuti kako je sposobnost proizvodnje hlapivih fenola u sintetičkom mediju ovisna o korištenom soju (Martorell i sur., 2006), dok je proizvodnja male količine hlapivih spojeva u vinarskim uvjetima povezana isključivo s rastom kvasca u početnim fazama fermentacije zbog osjetljivosti na etanol (Barata i sur., 2006). Pri 12, odnosno 14 % etanola, kvasac *P. guilliermondii* ne može preživjeti, a nije zabilježen ni rast u crnom vinu (Jensen i sur., 2009). U istom su istraživanju autori dokazali kako je *P. guilliermondii* osjetljiv na temperaturu, budući da mu je nakon samo nekoliko dana fermentacije pri 21 °C broj stanica pao na  $< 30 \text{ CFU mL}^{-1}$ , dok je pri 15 °C vrlo brzo postigao broj  $> 10^6 \text{ CFU mL}^{-1}$ .

### **2.1.2. Oksidativni stres u kvasaca**

Dobro je poznata činjenica da većina živih organizama ovisi o kisiku kako bi preživjela. Međutim, zbog stvaranja reaktivnih vrsta kisika (RVS) kao što su superoksidni radikal, vodikov peroksid i hidroksilni radikal, stanice su razvile mehanizam antioksidativne obrane kako bi se zaštitile. Izloženost teškim metalima, UV zračenju, herbicidima, onečišćivačima zraka, ksenobioticima i drugim egzogenim čimbenicima također mogu potaknuti značajno stvaranje RVS-a (Xu i sur., 2011). Nakupljanje RVS-a neizbježno rezultira oksidativnim stresom, a oksidativni stres odražava neravnotežu između systemske manifestacije reaktivnih vrsta kisika i sposobnosti biološkog sustava da lako detoksicira reaktivne intermedijere ili popravi nastalu štetu. Poremećaji u normalnom redoks-stanju stanica mogu izazvati toksične učinke stvaranjem slobodnih radikala koji oštećuju sve komponente stanice, uključujući proteine, lipide i DNA (Chandra i sur., 2015).

Kao jedan od markera oksidativnog stresa u stanicama kvasaca koristi se glutation (GSH), koji je najrasprostranjenija molekula u stanicama odgovorna za „hvatanje“ slobodnih radikala stoga igra važnu ulogu u održavanju staničnog redoks stanja (Jamieson, 1998). Za vrijeme oksidativnog stresa, može se uočiti smanjenje ukupne razine glutationa i povećanje njegovog oksidiranog oblika (Lushchak, 2010).

Malondialdehid (MDA) je produkt lipidne peroksidacije, koja je posljedica „napada“ slobodnih radikala na višestruko nezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acid* – PUFA). PUFA-e su prisutne u staničnim membranama stoga su prve s kojima slobodni radikali stupaju u reakcije. Zbog svoje reaktivnosti i jednostavne reakcije s tiobarbiturnom kiselinom (TBA), MDA je vrlo popularan i pouzdan marker za određivanje lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa u stanicama (Ayala i sur., 2014).

Jedan od načina toksičnog djelovanja OTA je i izazivanje oksidativnog stresa, a u *in vitro* uvjetima OTA povećava koncentracije malondialdehida i smanjuje koncentracije staničnog glutationa (Petrik i sur., 2003).

## **2.2. Mikotoksini**

Mikotoksini, sekundarni metaboliti plijesni, prirodni su spojevi međusobno različitih kemijskih struktura i bioloških aktivnosti, a plijesni ih proizvode u stresnim uvjetima (Sforza i sur., 2006; Medina i sur., 2014; Pleadin i sur., 2018a). Nisu nužni za rast i razmnožavanje plijesni, ali pomažu plijesnima tijekom kolonizacije na biljno tkivo te kao obrana od insekata, nematoda, mikroorganizama, životinja ili kompetitivnih plijesni (Bosco i Mollea, 2012; Fletcher i Blaney,

2016). Do njihove biosinteze dolazi pod određenim okolišnim uvjetima: prikladnoj relativnoj vlažnosti, temperaturi i sadržaju kisika te ovisnosti o fizičkom oštećenju supstrata i prisutnosti same plijesni (Sforza i sur., 2006; Medina i sur., 2014; Pleadin i sur., 2014). Do danas je identificirano oko 300 vrsta toksikogenih plijesni koje sintetiziraju preko 1000 različitih mikotoksina i njihovih metabolita pri čemu snažan utjecaj na ljudsko zdravlje imaju aflatoksini, okratoksin A, trihoteceni, zearalenon i fumonizini (Markov i sur., 2013; Di Stefano i sur., 2014; Pleadin i sur., 2018b).

Mikotoksini se smatraju jednim od najpoznatijih i najčešćih onečišćivača hrane, a koje plijesni sintetiziraju tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog podrijetla te predstavljaju velik problem u području sigurnosti hrane kao i rizik za zdravlje ljudi i životinja. Zbog sveprisutnosti mikotoksina, kao i njihovih karcinogenih svojstava, donesene su zakonske regulative s ciljem kontroliranja hrane i hrane za životinje te su definirane najveće dopuštene količine (NDK) ili najveće preporučene količine mikotoksina u hrani za ljude i životinje (EC, 2002; 2006; 2010).

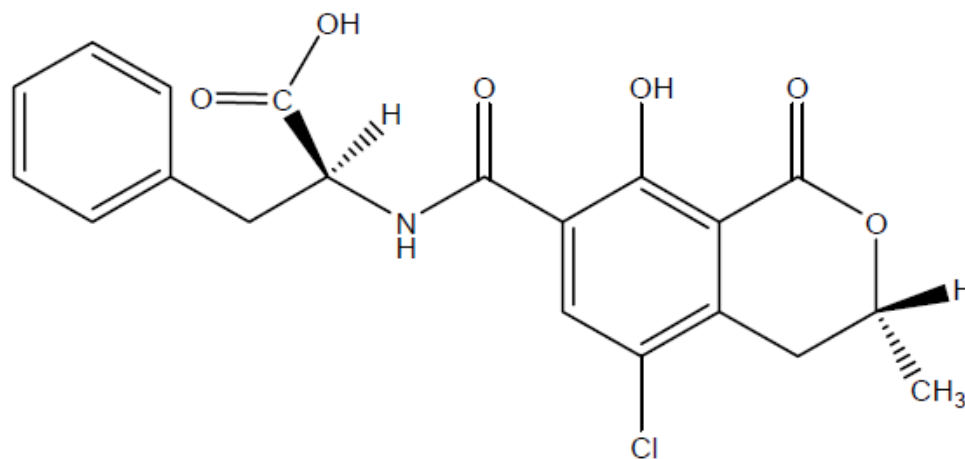
### **2.2.1. Okratoksin A**

Okratoksin A je toksični metabolit plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* izoliran 1965. godine u Južnoj Africi iz plijesni *Aspergillus ochraceus*. Nađen je u raznim namirnicama, kao što su žitarice, grah, začini, sušeno voće, orašasti plodovi i uljarice, u kavi, pivu, grožđu i vinu, a također se može naći u svinjskome mesu, iznutricama i mesnim proizvodima životinja koje su hranjene kontaminiranom stočnom hranom (Jørgensen, 2005).

To je snažan mikotoksin s hepatotoksičnim, nefrotoksičnim, kancerogenim i imunosupresivnim djelovanjem i smatra se jednim od najtoksičnijih predstavnika skupine okratoksina (Domijan i sur., 2015; Pleadin i sur., 2018b; Vettorazzi i sur., 2014). Taj mikotoksin je toksičan za sve životinje, posebice za organe kao što su bubrezi, jetra i krvožilni sustav, a pretpostavlja se da bi taj mikotoksin mogao biti odgovoran za Balkansku endemsku nefropatiju (BEN) - tešku, kroničnu, obostranu bolest bubrega te u korelaciji s time i tumora urinarnog trakta, čija se pojavnost prati u nekim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Bugarske, Rumunjske i Srbije (Delaš, 2010; Pleadin i sur., 2018b). Zbog navedenih svojstava, OTA je od strane IARC-a (eng. *International Agency for Research on Cancer*) svrstan u skupinu 2B i klasificiran kao mogući ljudski karcinogen (IARC, 1993).

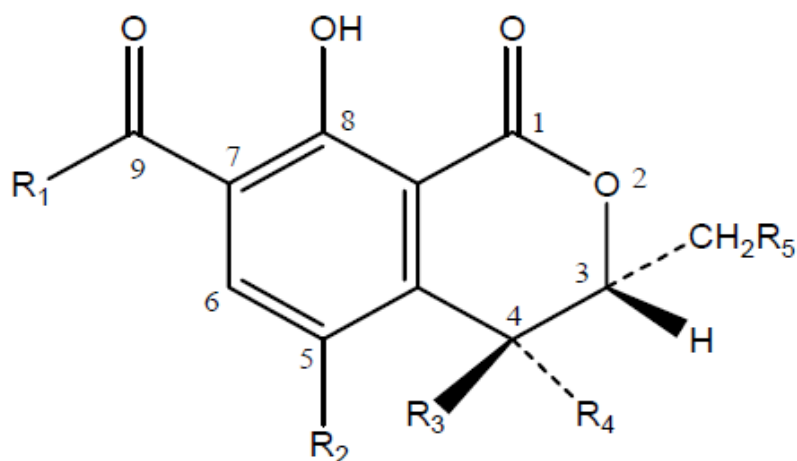
### 2.2.1.1. Struktura i fizikalno kemijska svojstva okratoksina A

OTA je pentaketid iz skupine dihidroizokumarina povezanom s  $\beta$ -fenilalaninom amidnom vezom. Kemijsko ime okratoksina A je L-fenilalanin-*N*[(5-klor-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-1 *H*-2-benzopiran-7-il) karbonil], a njegova kemijska struktura prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Kemijska struktura okratoksina A (OTA) (el Khoury i Atoui, 2010)

Razvojem modernih tehnologija posljednjih nekoliko desetaka godina okarakterizirani su i razni derivati OTA poput okratoksina B (OTB) koji je deklorirani analog OTA, zatim okratoksin C (OTC) koji je etilni ester, okratoksin  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) odnosno izokumarinski derivat OTA, kao i njegov deklorirani analog okratoksin  $\beta$  (OT $\beta$ ) te mnogi drugi. Na slici 2 prikazana je osnovna struktura metabolita OTA, dok su u tablici 1 prikazane karakteristične komponente deriviranih prirodnih i sintetskih metabolita okratoksina A.



**Slika 2.** Osnovna struktura metabolita OTA (el Khoury i Atoui, 2010)

**Tablica 1.** Karakteristični sastav deriviranih metabolita OTA (el Khoury i Atoui, 2010)

Naziv	R1	R2	R3	R4	R5
<b>Prirodni okratoksini</b>					
Okratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin B	Fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin C	Etil-ester, fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin A Metil-ester	Metil-ester, fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin B Metil-ester	Metil-ester, fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin B Etil-ester	Etil-ester, fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin $\alpha$	OH	Cl	H	H	H
Okratoksin $\beta$	OH	H	H	H	H
4-R-Hidroksiokratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	OH	H
4-S-Hidroksiokratoksin A	Fenilalanin	Cl	OH	H	H
10-Hidroksiokratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	H	OH
Tirozin analog OTA	Tirozn	Cl	H	H	H
Serin analog OTA	Serin	Cl	H	H	H
Hidroksiprolin analog OTA	Hiroksiprolin	Cl	H	H	H
Lizin analog OTA	Lizin	Cl	H	H	H
<b>Sintetski okratoksini</b>					
d-okratoksin A	d-fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin A etil amid	Etil amid, fenilalanin	Cl	H	H	H
O-metil okratoksin A	Fenilalanin, OHCH <sub>3</sub> na C-8	Cl	H	H	H

OTA je slaba organska kiselina molarne mase 403,8 g mol<sup>-1</sup>. S kristalnom strukturom koja varira od bezbojne do bijele boje, OTA fluorescira intenzivnu zelenu boju pod UV svjetlom u kiseloj te plavu boju u alkalnoj sredini. Pri kiselim i neutralnim pH vrijednostima, OTA je topljiv u polarnim organskim otapalima, kao što su alkoholi, ketoni i kloroform, a slabo je topljiv u vodi, dok je pri alkalnim pH vrijednostima topljiv u vodenoj otopini natrijevog bikarbonata. U etanolnoj otopini pohranjenoj na 4 – 8 °C, zaštićenoj od svjetla, stabilan je preko godinu dana, dok je u metanolnoj otopini pohranjen na -20 °C stabilan i nekoliko godina. OTA je poseban zbog visoke stabilnosti koja je potvrđena otpornošću na kisele uvjete i visoku temperaturu što ukazuje na to da jednom kada su namirnice kontaminirane okratoksinom A, teško ga je ukloniti. Iz tog razloga i predstavlja veliku zdravstvenu opasnost (el Khoury i Atoui, 2010).

#### 2.2.1.2. Plijesni producenti okratoksina A

OTA je mikotoksin kojeg proizvode određene vrste iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (Freire i sur., 2020) pa se one smatraju odgovornima za prisutnost OTA u grožđu te posljedično i u vinima (Ospital i sur., 1998).

Prisutnost OTA u vinima uglavnom je posljedica onečišćenja grožđa, koje je još uvijek u vinogradu ili u početnim fazama proizvodnje vina, plijesnima *A. carbonarius* i *A. niger*. Osim navedenih plijesni značajan producent OTA u grožđu je i *A. ochraceus*. Sve navedene plijesni su takozvane „crne plijesni“, a najčešće izolirana plijesan iz bobica grožđa je *A. carbonarius* (Cabanes i sur., 2002). S obzirom na to da plijesni iz roda *Penicillium* ne napadaju grožđe prije berbe, rijetko se mogu pronaći na samom grožđu, ali s druge strane *Penicillium* spp. je često moguće izolirati iz skladištenog grožđa s time da je *P. expansum* najčešći kontaminant (Snowdon, 1990). Uz navedenu vrstu, iz skladištenog grožđa izolirane su i vrste *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum* i *P. glabrum* (Pitt i Hocking, 2009).

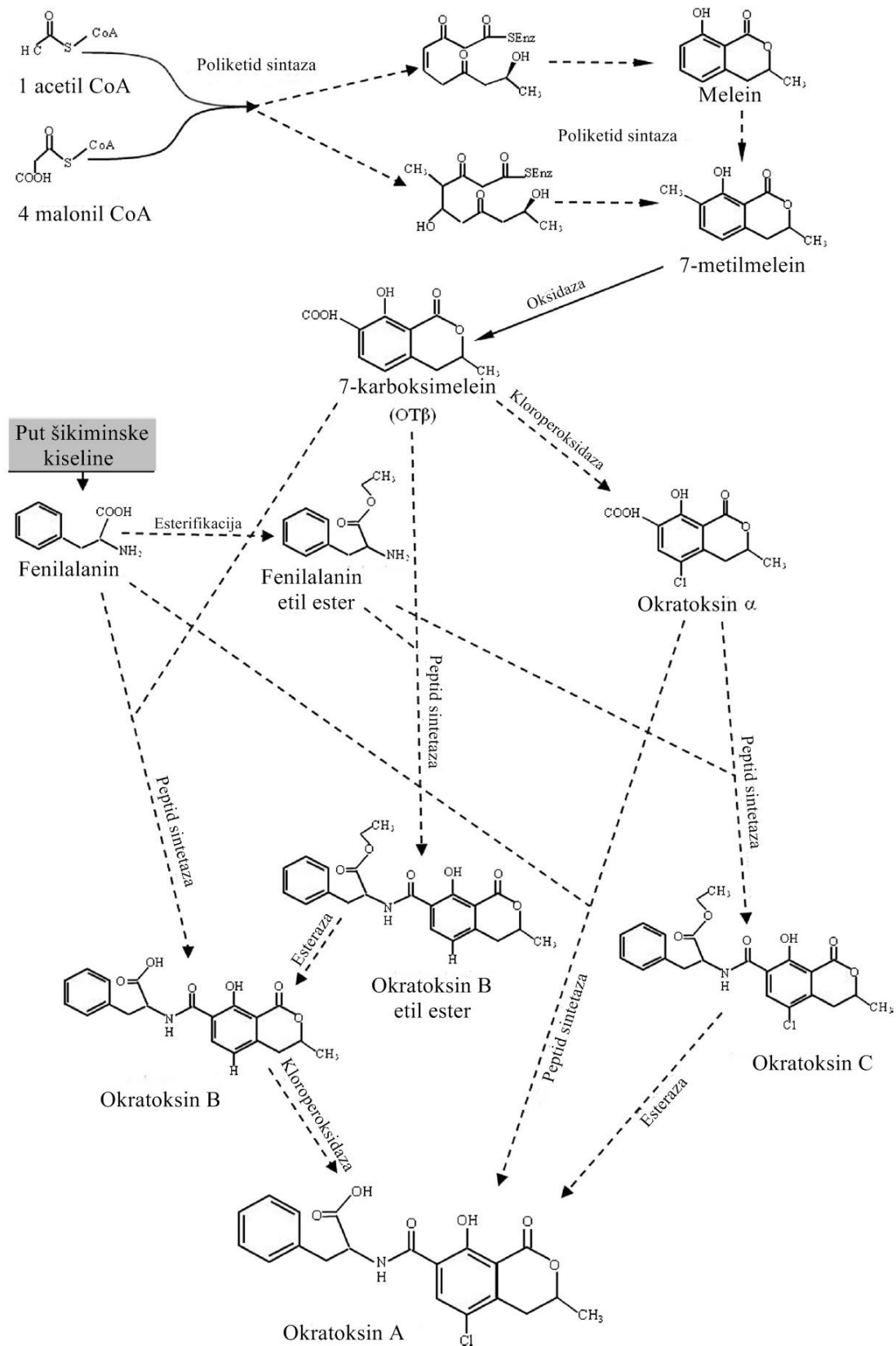
#### 2.2.1.3. Biosinteza i metabolizam okratoksina A

Biosinteza OTA ovisi o različitim faktorima kao što su temperatura, aktivitet vode ( $a_w$ ) i sastav medija koji utječu na fiziologiju plijesni koja sintetizira OTA.

Iako postoji mnogo informacija o različitim toksičnim svojstvima OTA, za razliku od drugih značajnih mikotoksina, ne zna se puno o njegovom biosintetskom putu (ni u jednoj vrsti plijesni). OTA je pentaketid i sastoji se od dihidroizokumarina povezanog s fenilalaninom koji nastaje zahvaljujući ciklusu šikiminske kiseline. Poznato je i da sinteza OTA uključuje

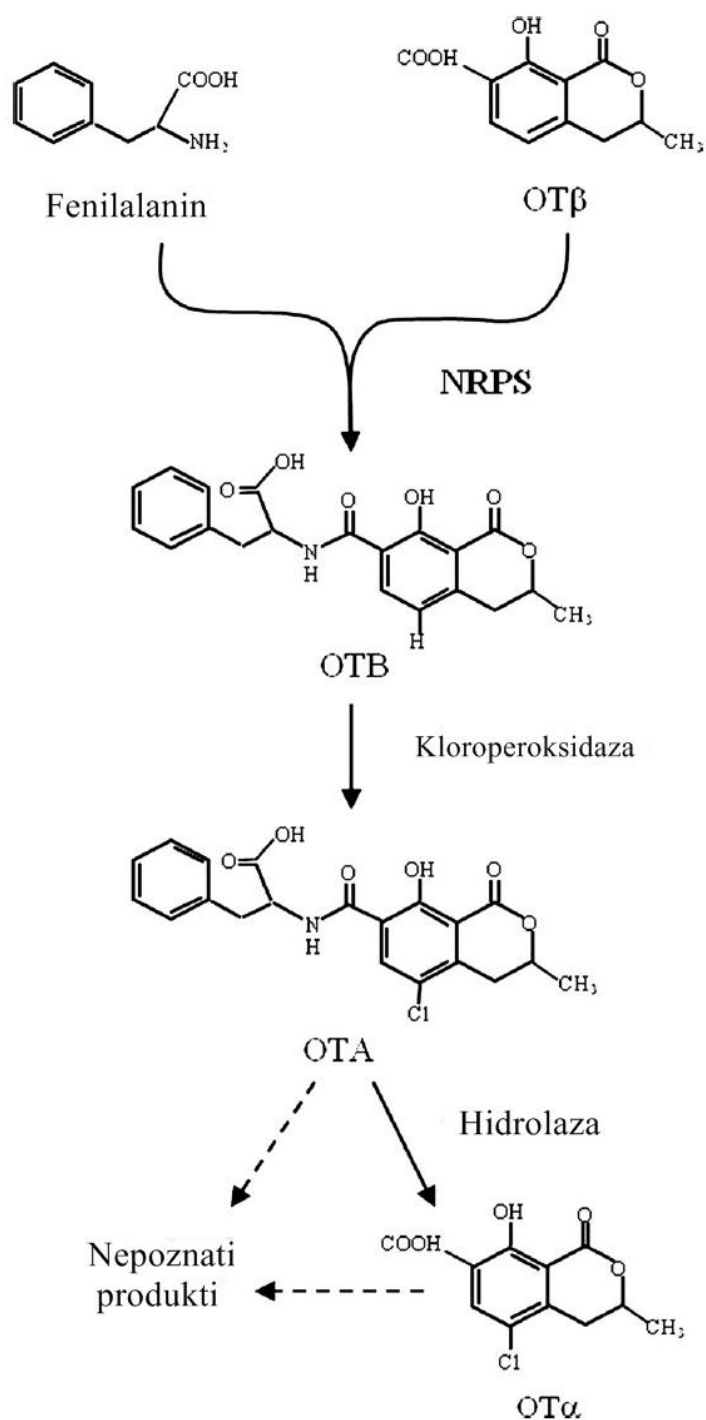


izokumarinsku skupinu za čiju sintezu je zaslužan enzim poliketid sintaza, ali redosljed odvijanja reakcija nije točno definiran. Pretpostavlja se da su i acetat i malonat prekursori biosinteze okratoksina A. Malonat može biti uključen u biosintezu izokumarinskog dijela, ali ne i u biosintezu fenilalanina, dok se acetat transformira i u fenilalanin i u izokumarinski dio. Iz tog razloga predloženo je nekoliko puteva biosinteze OTA, a shematski su prikazani na slici 3 (Gallo i sur., 2012).



Slika 3. Shematski prikaz predloženih reakcija prilikom biosinteze OTA (Gallo i sur., 2012)

Većina istraživanja vezana uz biosintezu OTA uključivala je reakcije odgovorne za sintezu izokumarinske skupine, no Gallo i suradnici su 2012. godine proveli niz pokusa manipulirajući genima plijesni *A. carbonarius* fokusirajući se na završne korake sinteze OTA. Na slici 4 prikazana je shema biosinteze OTA kako je predlažu Gallo i sur. (2012).



**Slika 4.** Shematski prikaz završnih koraka biosinteze OTA (Gallo i sur., 2012)

Metabolizam OTA proučavan je u *in vivo* i *in vitro* sustavima. *In vivo* biotransformacija OTA u životinja i ljudi je loša, a uklanjanje metabolita sporo. U organizmu, OTA je apsorbiran i veže se za proteine seruma, a zatim se nakuplja u jetri, bubrezima, mišićnom tkivu, testisima i drugim tkivima. Kod ljudi se OTA metabolizira vrlo sporo, s vremenom poluraspada od 30 dana (Roland i sur., 2014). Vezanje OTA za albuminsku frakciju u krvi omogućuje njegovu postojanost u tkivima kroz dulji period (Fuchs i Hult, 1992). Istraživanja provedena s ciljem razumijevanja metaboličkih puteva OTA pokazuju da jetra ima glavnu toksodinamičnu i toksokinetičku ulogu budući da se OTA metabolizira djelovanjem jetrenih mikrosoma te izlučuje putem žuči, urina i fecesa. Intestinalna mikroflora transformira OTA u manje toksični OT $\alpha$  koji se potom izlučuje s određenim količinama roditeljske molekule. Biotransformacija okratoksina A odvija se hidroksilacijom pomoću citokroma P450. OTB se brzo može eliminirati iz organizma i tako smanjiti toksične učinke OTA, dok OTC ima sličnu toksičnost kao OTA te se brzo transformira nazad u OTA (Wu i sur., 2011).

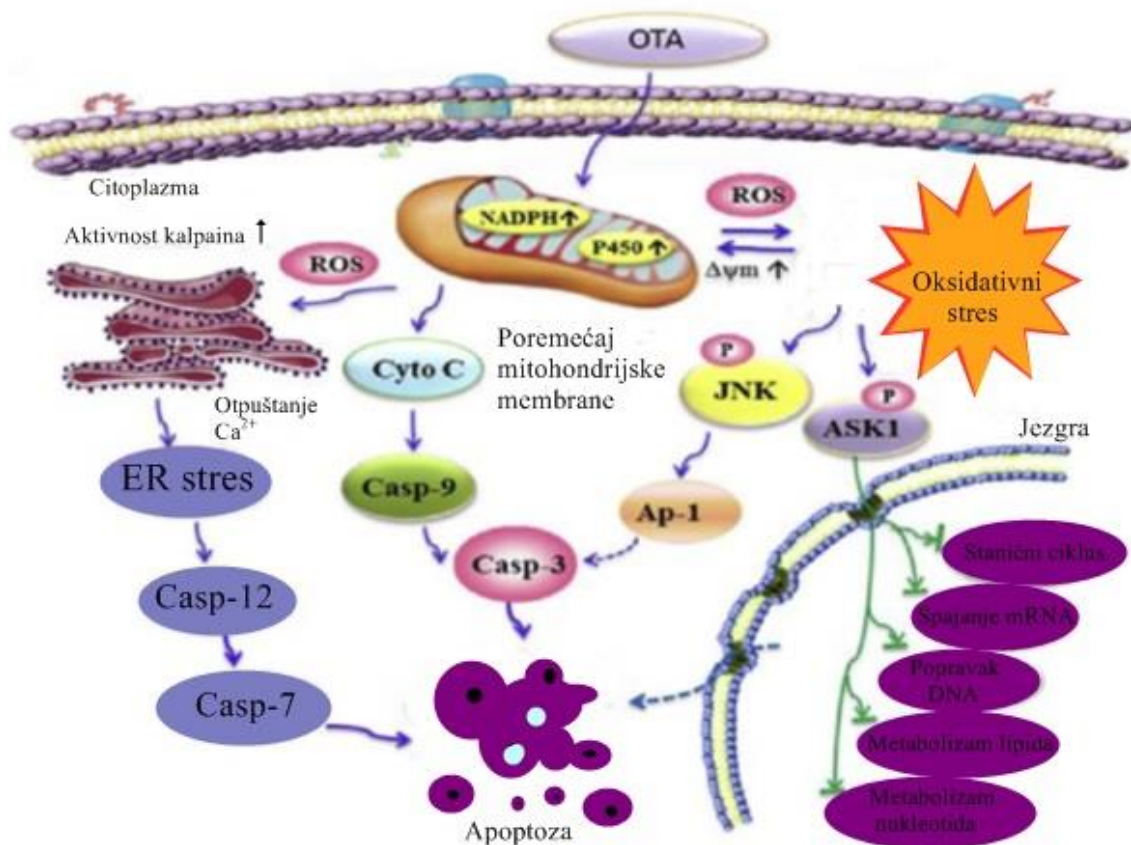
Tijekom metabolizma OTA odvija se samo djelomična detoksifikacija jer neki metaboliti kao što je OTA s otvorenim laktonskim prstenom (OP-OTA) imaju veću toksičnost od samog OTA. OP-OTA se smatra „otrovnim metabolitom“ jer je otrovniji od samog OTA pa je stoga i biološka reaktivnost OTA povezana s laktonskom karbonilnom skupinom izokumarinskog dijela. S obzirom na to da su u nekim istraživanjima pronađeni adukti DNA uzrokovani okratoksinom A i povezani su s uzrokovanjem genotoksičnosti (Pinelli i sur., 1999), a u nekima nisu pronađeni (Gross-Steinmeyer i sur., 2002), raspravlja se o tome da je genotoksičnost posljedica nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) djelovanjem OTA (Wu i sur., 2011).

Sve navedeno igra važnu ulogu u toksičnosti, kancerogenosti i specifičnosti djelovanja prema određenim organima (Mally i sur., 2004) stoga je poznavanje metaboličkih puteva OTA u ljudi i životinja vrlo korisno i štoviše, nužno kako bi se štetni učinci tih metabolita mogli umanjiti (Xiao i sur., 1996).

#### 2.2.1.4. Mehanizam djelovanja okratoksina A

Zbog sličnosti s fenilalaninom OTA inhibira sintezu proteina, a time i sintezu deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA), a može utjecati i na druge enzime koji koriste fenilalanin kao supstrat (npr. fenilalanin hidroksilaza), smanjiti koncentracije fosfoenolpiruvat karboksilaze kao ključnog enzima u glukoneogenezi te ometati metabolizam glukoze (Pleadin i sur., 2018b).

OTA uzrokuje oštećenja mitohondrija, lipidnu peroksidaciju, ometa oksidativnu fosforilaciju, a pripisuje mu se i nefrotoksično, neurotoksično, mutageno, karcinogeno, teratogeno i imunosupresijsko djelovanje (Tao i sur., 2018). Ujedno, sudjeluje i u staničnoj oksidaciji te stimulira sintezu malondialdehida (MDA), a MDA dalje reagira s gvanidinom tvoreći DNA adukte. OTA fragmentira DNA u jetri, bubrezima i slezeni, povećava lipidnu peroksidaciju vezanjem  $Fe^{3+}$  iona (čime olakšava redukciju u  $Fe^{2+}$ , a oni u prisutnosti kisika stvaraju aktivni kisik koji započinje lipidnu peroksidaciju). Navedeni procesi su izraženi u stanicama mitohondrija pa rezultiraju njihovim oštećenjem. Također, dokazan je i negativan učinak OTA na homeostazu kalcija u biološkim sustavima (Pleadin i sur., 2018b). Na slici 5 prikazana je stanična signalizacija i predloženi put induciranja apoptoze djelovanjem OTA (Tao i sur., 2018).



**Slika 5.** Apoptoza inducirana okratoksinom A i stanična signalizacija. OTA inducira porast NADPH i enzima P450, koji aktivira signalni put kaspaze i inducira apoptozu. Povećanje ROSa, izazvalo je oksidativni stres mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma, inducirajući osobađanje kalcija i inhibirajući stanični ciklus, spajanje mRNA, replikaciju DNA, metabolizam lipida i nukleotida (Tao i sur., 2018)

Smatralo se da sam toksin inducira citotoksičnost, genotoksičnost te *in vivo* i *in vitro* upale, ali je temeljem nedavnih istraživanja ta uloga dodijeljena ROS-u i oksidativnom stresu izazvanom okratoksinom A (Abd El-Haleem i sur., 2016; Costa i sur., 2016; Periasamy i sur., 2016; Abdel-Wahhab i sur., 2017).

#### 2.2.1.5. Toksični učinci okratoksina A u organizmu

Toksično djelovanje OTA i njegovih metabolita ovisi o brojnim čimbenicima, a najznačajniji su: doza (koncentracija), vrijeme izlaganja, način primjene te dob i spol domaćina. Glavno mjesto njegove toksične aktivnosti su bubrezi, ali u dovoljnim dozama može utjecati i na jetru. Velik broj istraživanja upućuje na različite epigenetske mehanizme OTA, uglavnom povezane s oksidativnim stresom, proliferacijom stanica te poremećajem stanične signalizacije i diobe (Marin-Kuan i sur., 2008; Marin i sur., 2013; Sorrenti i sur., 2013; Vettorazzi i sur., 2013). No, izravan genotoksični mehanizam koji uključuje bioaktivaciju OTA i stvaranje adukta DNA se još istražuje, iako su *in vivo* testiranja u skladu s navedenim mehanizmom (Vettorazzi i sur., 2013).

Tijekom godina, otkrivala su se razna štetna svojstva OTA pa su tako pokazana njegova nefrotoksična, hepatotoksična, neurotoksična, teratogena i imunotoksična svojstva u raznim životinjama te *in vitro* testovima. Unutar toksikološkog profila OTA, nefrotoksičnost je njegovo dominantno svojstvo, a prepoznato je neposredno prije nego je povezano s Balkanskom endemskom nefropatijom. S obzirom na to da je u krvnom serumu ljudi oboljelih od BEN pronađena i do 10 puta viša koncentracija OTA, u odnosu na zdrave osobe, smatra se kako OTA igra ulogu prilikom obolijevanja od ove bolesti (Otteneder i Majerus, 2000). Osim OTA, hrana često sadrži i druge nefrotoksine (citrinin, fumonizin) koji pokazuju sinergističko djelovanje te mogu imati ulogu u razvoju kroničnih bubrežnih bolesti (Pleadin i sur., 2018b).

Nefrotoksični učinak OTA, rezultat je poremećaja transportnog sustava organskih aniona koji se nalaze na bazolateralnoj membrani proksimalnih tubula, a dokazan je kod ptica i sisavaca, ali ne i kod odraslih preživača. Nefrotoksičnost se očituje bolovima u bubrezima, konzumiranjem prekomjerne količine vode s učestalim mokrenjem te smanjenim unosom hrane. Oslabljena funkcija bubrega rezultira glukozurijom i proteinurijom, a uočene su i tubularne degeneracije, atrofija i fibroza tkiva bubrega (Pleadin i sur., 2018b).

OTA može djelovati na endokrini sustav ometajući enzime koji sudjeluju u sintezi hormona, a posljedice endokrinih poremećaja su osteoporoza, mijelofibroza, adenom, koštane deformacije i reproduktivni poremećaji (Malir i sur., 2014).

Od otkrića provedena su brojna istraživanja koja su omogućila uspostavljanje različitih mehanizama nefrotoksičnosti i karcinogenosti OTA. Mehanizmi koji dovode do nefrotoksičnosti, hepatotoksičnosti i imunotoksičnosti OTA mogu se povezati s inhibicijom sinteze proteina, lipoperoksidacijom i modulacijom kaskade mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze, dok njegova karcinogenost nastaje nakon metaboličke aktivacije koja dovodi do formiranja DNA adukta (Malir i sur., 2016).

#### 2.2.1.6. Pojavnost okratoksina A u vinima

Vino i ostali proizvodi od grožđa skupina su proizvoda za koje je utvrđeno da mogu sadržavati značajne količine OTA. Zimmerli i Dick (1996) su prvi zabilježili pojavu OTA u vinu, a od tada sve je veći broj istraživanja o prisutnosti OTA u vinu, sušenim plodovima vinove loze (groždice ili cvebe) i soku od grožđa. Ekologija plijesni uključenih u sintezu OTA na vinovoj lozi usredotočena je na *Aspergillus niger* i *Aspergillus carbonarius* pa su česta istraživanja koja istražuju njihov rast na vinovoj lozi i ulogu koju imaju prilikom sinteze OTA (Battilani i Pietri, 2002; Belli i sur., 2004; Mitchell i sur., 2004).

Prema istraživanjima s početka 20. stoljeća, srednja vrijednost OTA u vinima iznosila je 0,36  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (1470 uzoraka), a sadržaj OTA bio je veći u vinima južne Europe u odnosu na vina sjeverne Europe. Također, u usporedbi s rosé i bijelim vinima, crna vina sadrže veće količine OTA. Prilikom usporedbe vina iz Sjeverne Amerike uočene su niže koncentracije OTA u odnosu na vina porijeklom iz Europe (Ng i sur., 2004).

U većini provedenih istraživanja se pokazalo da je razina OTA veća u crnim nego u ružičastim vinima, dok ga najmanje sadrže bijela vina, što je najvjerojatnije posljedica maceracije masulja s pokožicom grožđa kod crnih vina koja pospješuje ekstrakciju OTA iz pokožice (Esti i sur., 2012; Quintela i sur., 2013). Slatka vina i specijalne vrste vina također imaju veće koncentracije OTA u usporedbi sa suhim vinima (Esti i sur., 2012).

Kod proizvodnje desertnih vina koja nisu pojačana alkoholom grožđe se suši na suncu ili u komorama sve dok se ne postigne izrazito visoka razina šećera zbog čega je ono podložno povećanom razvoju plijesni. Osim toga, nepotpuna fermentacija šećera tijekom proizvodnje desertnih vina često dovodi do visokih koncentracija OTA u finalnim proizvodima (Covarelli i sur., 2012). Analizama konvencionalnih i organskih vina, utvrđeno je kako nema značajne razlike u prisutnosti OTA kod navedenih vina s obzirom na to da je 71 % konvencionalnih, odnosno 63 % organskih vina sadržavalo OTA (Chiodini i sur., 2006).

Flajs i sur. (2009) su istražili pojavu OTA i prisutnost pojedinih sojeva toksigenih plijesni u vinima na području Republike Hrvatske. Ispitano je šest vrsta moštova, šest uzoraka vina dobivenih od tih moštova i četiri uzorka flaširanog vina iz 2007. godine. Uočeno je da su svi uzorci mošta sadržavali OTA, što se povezuje s kontaminacijom grožđa tijekom prešanja i maceracije. Iako se OTA ne uklanja u potpunosti, njegov sadržaj se smanjuje tijekom fermentacije. U moštu i vinu nisu pronađeni sojevi najvećeg proizvođača mikotoksina *Aspergillus carbonarius* vjerojatno zbog prisutnosti drugih plijesni koje proizvode OTA poput *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus ochraceus* ili *Aspergillus niger* (Flajs i sur., 2009).

### **2.3. Zakonska regulativa**

Na temelju procjene opasnosti i izloženosti okratoksinu A Europska komisija je 2005. godine donijela odluku o maksimalnoj granici OTA od  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  za vino (EC, 2005). Tada je 2 do 4 % vina proizvedenih na području EU sadržavalo veće koncentracije OTA od dozvoljenih (Jørgensen, 2005). Prilikom istraživanja u sušenim plodovima vinove loze te u soku od grožđa uočene su koncentracije OTA u iznosu od  $3,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ , odnosno  $0,56 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Prema postavljenim maksimalnim granicama od strane Europske komisije, 7 % uzoraka sušenih plodova vinove loze, odnosno 5 % uzoraka soka od grožđa, prelazilo je postavljene granice (EC, 2002; 2005).

S obzirom na toksičnost, pojavnost i sveukupnu opasnost koju OTA predstavlja u prehrambenom lancu ljudi, Europska komisija (EC) je utvrdila maksimalne razine OTA za žitarice i proizvode od žitarica, sušeno voće od vinove loze, kavu, vino, sok od grožđa, prerađenu hranu na bazi žitarica i dječju hranu za dojenčad i malu djecu, dijetalnu hranu za posebne medicinske svrhe, posebno za dojenčad, začine i slatkiše, Uredbom Komisije (EC) broj 1881/2006 (European Commission, 2006) i naknadnim izmjenama (European Commission, 2010; European Commission, 2012; European Commission, 2015). Najviše dozvoljene koncentracije (NDK) OTA prikazane su u tablici 2.

Hrvatska je među državama koje imaju najstrože propise o dozvoljenim koncentracijama kontaminanata u hrani. Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim koncentracijama kontaminanata u hrani, koncentracije OTA kreću se u granicama od 0,5 do  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (NN 154/2008). Najveća dopuštena koncentracija OTA je u grožđicama i instant kavi ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), a najmanja dopuštena koncentracija OTA je u hrani koja je namijenjena dojenčadi, prerađenoj hrani na bazi žitarica i hrani za malu djecu ( $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Na temelju godišnjeg plana uzorkovanja provodi se sustavna kontrola namirnica biljnog i životinjskog podrijetla na



mikotoksine u ovlaštenim laboratorijima za kontrolu zdravstvene ispravnosti hrane (HAH, 2012), a s obzirom na uvedene propise, može se očekivati da bi poboljšanja u sklopu dobre poljoprivredne prakse, kao i dobre proizvođačke prakse, dovela do smanjenja razine OTA.

**Tablica 2.** Najviše dozvoljene koncentracije OTA u prehrambenim proizvodima propisanim od strane Europske Komisije (Huertas-Perez i sur., 2017; Pleadin i sur., 2018b)

	PREHRAMBENI PROIZVODI	NDK ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
1.	Neprerađene žitarice	5
2.	Svi proizvodi dobiveni iz neprerađenih žitarica, uključujući proizvode od obrađenih žitarica i žitarice namijenjene za izravnu prehranu ljudi s iznimkom za prehrambene proizvode pod rednim brojem 9., 10. i 13.	3
3.	Osušeno voće od vinove loze (ribizli, grožđice, sultanije)	10
4.	Pržena zrna kave i mljevena pržena kava, osim instant kave	5
5.	Topljiva kava (instant kava)	10
6.	Vino (uključujući pjenušavo vino, isključujući likerska vina i vina s udjelom alkohola od najmanje 15 vol.%) i voćna vina	2
7.	Aromatizirano vino, aromatizirana pića na bazi vina i aromatizirani kokteli od vinskih proizvoda	2
8.	Sok od grožđa, rekonstituirani koncentrirani sok od grožđa, groždani nektar, rekonstituiran groždani mošt i koncentrirani groždani mošt, namijenjeni izravnoj prehrani ljudi	2
9.	Prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za bebe za dojenčad i malu djecu	0,50
10.	Dijetalna hrana za posebne medicinske svrhe namijenjena posebno dojenčadi	0,50
11.	Začini, uključujući sušene začine:	
	<i>Piper</i> spp (plodovi istih, uključujući bijeli i crni papar) <i>Myristica fragrans</i> (muškatni oraščić) <i>Zingiber officinale</i> (đumbir) <i>Curcuma longa</i> (kurkuma)	15
	<i>Capsicum</i> spp. (sušeno voće, cijelo ili mljeveno, uključujući čili, čili u prahu, kajenski i papriku)	20
	Mješavine začina koje sadrže jedan od gore navedenih začina	15
12.	Sladić ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> i druge vrste)	
	12.1. Slatki korijen, sastojak biljnih infuzija	20
	12.2. Ekstrakt slatkog korijena za upotrebu u hrani, posebno u pićima i slastkišima	80
13.	Pšenični gluten koji se ne prodaje izravno potrošačima	8

## 2.4. Metode smanjenja koncentracije i uklanjanja okratoksina A

Za kontrolu prisutnosti plijesni i njihovih toksina razvijene su brze, osjetljive i precizne metode, ali još uvijek nisu pronađene točne, pouzdane i učinkovite strategije uklanjanja prisutnih mikotoksina, već se za smanjenje kontaminacije plijesnima pa time i mikotoksinima u pravilu koristi samo dobra agrotehnološka praksa (Giovati i sur., 2015; Pleadin i sur., 2018a). Međutim, jedinstvena metoda, ujedno djelotvorna za sve materijale i sve mikotoksine, ipak ne postoji (Pleadin i sur., 2018a).

Prisutnost OTA u vinu može se smanjiti i do 80 % kada se koristi odgovarajuća vinogradarska praksa (Varga i Kozakiewicz, 2006), kada se provodi kontrola biotičkih i abiotičkih agenasa i kada se provodi ispravno sušenje grožđa primjenom kontroliranih uvjeta atmosfere i primjena enoloških postupaka koji smanjuju razinu OTA u vinima. Postoji nekoliko različitih strategija u smanjenju razine OTA u vinima i detoksifikaciji ovog mikotoksina, a klasificiraju se kao fizikalni, kemijski i mikrobiološki pristupi (Quintela i sur., 2013).

*Fizikalne metode* uključuju mehaničko uklanjanje visoko onečišćenih frakcija iz sirovih materijala sortiranjem, čišćenjem, mljevenjem i ljuštenjem (Loi i sur., 2017; Pleadin i sur., 2018a). U početku se smatralo da se uklanjanjem pljesnivog grožđa prije nego uđe u proces vinifikacije može spriječiti nastanak OTA, međutim iako je ovo postupak koji smanjuje pojavu OTA i do 98 %, ekonomski je neprihvatljiv za vinsku industriju (Varga i Kozakiewicz, 2006). U svrhu smanjenja razine OTA vino se može i filtrirati čime se postiže smanjenje razine OTA i za 80 % kada se koriste membrane s veličinom pora od 0,45 µm. Ponovnim prolaskom kontaminiranog mošta ili vina kroz kominu koja ne sadrži OTA postiže se smanjenje OTA od 50-56 % dok toplinski tretmani vina (55 °C) ne utječu na razinu OTA (Quintela i sur., 2013).

*Kemijske metode* smanjenja razine OTA u vinima uključuju primjenu adsorbensa poput aluminosilikata, zeolita, bentonita i aktivnog ugljena koji mogu čvrsto vezati i imobilizirati mikotoksin. Međutim, njihova je primjena ograničena zbog čestog negativnog utjecaja na nutritivnu vrijednost i organoleptička svojstva proizvoda (Piotrowska i sur., 2013).

Fizikalne i kemijske metode imaju ograničenu primjenu zbog nedovoljno saznanja o produktima degradacije te zbog promjena nutritivnog sastava i organoleptičkih svojstava hrane (Pleadin i sur., 2019). Zbog navedenih nedostataka traže se alternativni načini smanjenja koncentracije OTA gdje do izražaja dolaze mikrobiološke metode. Mogućnosti uklanjanja mikotoksina mikrobnim kulturama i njihovim staničnim komponentama sve više se nameću kao moguća alternativa postojećim fizikalnim i kemijskim metodama detoksikacije (Pleadin i sur., 2019).

### 2.4.1. Mikrobiološke metode uklanjanja okratoksina A

Mikrobiološke metode detoksikacije definiraju se kao metode koje koriste mikroorganizme i/ili enzime koji mogu metabolizirati, uništiti ili deaktivirati toksine do stabilnih, manje toksičnih ili bezopasnih spojeva (EU, 2015). Biološka sredstva i njihovi enzimi, u usporedbi s kemijskim metodama korištenim za smanjenje koncentracije mikotoksina, omogućuju specifičan, najvjerojatnije nepovratan, ekološki prihvatljiv i učinkovit pristup s malim utjecajem na osjetilnu i nutritivnu kvalitetu hrane (Loi i sur., 2017). Međutim, važno je pritom istaknuti da su biološke metode, u odnosu na fizikalne i kemijske, znatno manje istraživane (Karlovsky i sur., 2016; Pleadin i sur., 2018a, Pleadin i sur., 2019). Bhatnagar i suradnici su još 1991. godine definirali biološku detoksikaciju kao enzimsku degradaciju ili biotransformaciju toksina pomoću mikroorganizama koji predstavljaju izvor enzima za detoksikaciju koja bi u konačnici rezultirala nastankom manje toksičnih produkata. Čiste kulture bakterija, kvasaca i plijesni koje detoksiciraju mikotoksine izolirane su iz složenih mikrobnih populacija, a primjena čistih kultura rezultira detoksikacijom brojnih mikotoksina (aflatoksina, okratoksina A, patulina, zearalenona, fumonizina, trihotecena i drugih) (Karlovsky, 1999). Za primjenu mikrobiološke detoksikacije važno je utvrditi točne grupe unutar kemijske strukture koje su odgovorne za toksičan učinak OTA. Toksičnost se uglavnom pripisuje njegovom izokumarinskom dijelu, dok karboksilna skupina fenilalaninskog dijela i Cl skupina pogoduju toksičnosti (Vanhoutte i sur., 2016).

Upotreba mikroorganizama za detoksikaciju mikotoksina u hrani zahtijeva određene uvjete (Jard i sur., 2011):

- prvi korak predstavlja identifikaciju potencijala degradacije mikotoksina pomoću određenog mikroorganizma,
- svaki produkt koji nastaje mora biti identificiran i njegova toksičnost treba biti ispitana,
- nastali produkti moraju biti netoksični,
- biotransformacija mora biti brza i mikroorganizmi moraju biti učinkoviti u različitim uvjetima prisutnosti kisika i pH vrijednosti, pogotovo kada se transformacija odvija tijekom probave,
- mikroorganizmi moraju biti nepatogeni,
- mikroorganizmi moraju biti aktivni u složenom okolišu i ne smiju biti inhibirani nutrijentima,
- učinkovitost transformacije mora se procijeniti *in vivo*.

Istraživanja su pokazala da upotreba mikroorganizama ima perspektivan učinak u degradaciji mikotoksina iz hrane i hrane za životinje, a zbog unaprjeđenja biotehnologije i kataboličkih sposobnosti mikrobnih populacija u budućnosti se može očekivati njihova sve značajnija primjena (Shanakhat i sur., 2018). Neki od najznačajnijih primjera bioloških agenasa za detoksikaciju mikotoksina u hrani i hrani za životinje, prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Primjena bioloških agenasa za detoksifikaciju mikotoksina u hrani i hrani za životinje (Shanakhat i sur., 2018)

<b>Biološki agens</b>	<b>Produkt</b>	<b>Mikotoksin</b>	<b>Literatura</b>
Bakterije mliječne kiseline (BMK)	Fermentirana hrana	aflatoksin M <sub>1</sub>	Ahlberg i sur., 2015.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentirana hrana	okratoksin A aflatoksini	Petruzzi i sur., 2014b
<i>Lactobacillus</i> spp	Kruh	aflatoksini	Saladino i sur., 2016
<i>Bacillus</i>	Hrana za životinje	trihoteceni	Zhu i sur., 2016
<i>Rhizopus oryzae</i>	Prerađena hrana	aflatoksini	Hackbart sur., 2014

Jedna od najčešće korištenih strategija detoksikacije/biorazgradnje mikotoksina uključuje izolaciju mikroorganizama koji mogu razgraditi određeni mikotoksin, a među tim mikroorganizmima kvasci i bakterije mliječne kiseline (BMK) pokazuju velik potencijal kao mogući mikofiksatori.

Biološka detoksikacija mikotoksina odvija se uglavnom pomoću dva glavna procesa, sorpcije (adsorpcije-vezanje i desorpcije-otpuštanje) i enzimske razgradnje (Pleadin i sur., 2019).

#### 2.4.1.1. Detoksikacija okratoksina A vezanjem

Dokazano je da i žive i mrtve stanice mikroorganizama mogu vezati mikotoksine stoga se pretpostavlja da su stanične komponente kao što su manani i  $\beta$ -glukan u kvasca, odnosno polisaharidi i peptidoglikan u bakterija, odgovorne za fizičko vezanje mikotoksina te da se u tim slučajevima ne radi o kovalentnom vezanju ili biotransformaciji mikotoksina.

Najvažniji faktor koji utječe na kapacitet adsorpcije OTA kod mikroorganizama je sastav stanične stijenke (Chen i sur., 2018). U posljednjih nekoliko godina znanstvena istraživanja usredotočena su na kvasac kao potencijalni adsorpcijski materijal za uklanjanje OTA. Smanjenje koncentracije OTA bazirano na adsorpcijskom mehanizmu rezultat je fizikalnog vezanja za staničnu stijenku kvasca. Za vezanje OTA na staničnu stijenku odgovorni su  $\beta$ -glukan, njegov esterificirani oblik te manoproteini stanične stijenke kvasca (Piotrowska i sur., 2013; Quintela i sur., 2013; Petruzzi i sur., 2014b; Pereyra i sur., 2015). Piotrowska i suradnici (2013) su korištenjem vinskih i pekarskih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dokazali kako je moguće smanjiti koncentraciju OTA u tekućem mediju za 35 %. Daljnjim ispitivanjima, dokazali su da uklanjanje OTA ovisi o mediju i soju primijenjenog kvasca. Tako su na primjer, korištenjem termički inaktivirane biomase kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uspješno uklonili do 64 % OTA iz različitih medija kao što su na primjer mošt bijelog grožđa i mošt crnog ribiza. Veći postotak dekontaminacije OTA korištenjem inaktiviranih stanica kvasca upućuje na fizičko vezanje i uklanjanje OTA iz medija.

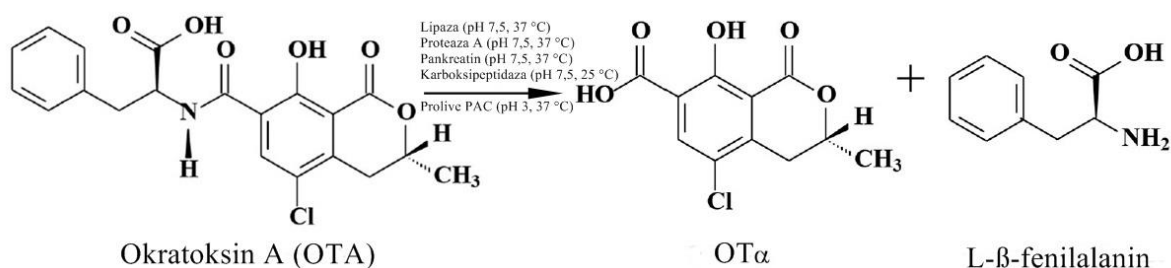
Nekoliko vinarskih praksi uključuje produljeni kontakt između kvasaca i vina, a istraživanja sugeriraju da bi kvasci mogli igrati značajnu ulogu u uklanjanju OTA na kraju procesa fermentacije (Petruzzi i sur., 2014b), a prisutnost OTA u vinu uglavnom je rezultat kontaminacije grožđa s toksikotvornim plijesnima prije i poslije berbe.

Bejaoui i suradnici (2004) su ispitivali sposobnost uklanjanja OTA iz vina korištenjem termički i kiselinski inaktiviranih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Njihovo istraživanje pokazalo je da tako inaktivirane stanice mogu vezati znatno veće količine OTA, u usporedbi sa živim stanicama kvasca. Zagrijavanje može uzrokovati denaturaciju proteina ili dovesti do stvaranja produkata Maillardovih reakcija. Kiseli uvjeti mogu utjecati na polisaharide oslobađanjem monomera koji se nakon propadanja glikozidnih veza dalje fragmentiraju u aldehide. Tako dolazi do povećanja površine za vezanje OTA i povećanja slobodnih mjesta adsorpcije u usporedbi sa živim stanicama. Također, smanjenje debljine stanične stijenke i/ili povećanje pora pod utjecajem temperature i kiseline mogu učiniti i druga mjesta u stanicama kvasca dostupnijima za adsorpciju OTA (El-Nezami i sur., 2002). Kinetička ispitivanja adsorpcije OTA pokazala su da je vezanje OTA brza reakcija budući da u prvih 5 minuta inkubacije veže 90 % OTA, a ostaje adsorbiran tijekom 72 sata. Slično su dokazali i Petruzzi i suradnici (2014a) pokazavši da termički inaktivirane stanice mogu u potpunosti ukloniti OTA u samo 5 minuta.

### 2.4.1.2. Degradacija ili biotransformacija OTA

Biotransformacija mikotoksina definira se kao „razgradnja mikotoksina u netoksične metabolite pomoću bakterija, plijesni ili (njihovih) enzima“ (Boudergue i sur., 2009). Mogućnost upotrebe živih mikroorganizama kao biokatalizatora za razgradnju mikotoksina predstavlja valjanu strategiju posebno ako su potrebne višestupanjske reakcije ili ako se mikroorganizam već koristi u industrijskim procesima prerade hrane (Hassan i sur., 2013; Hassan i sur., 2015). S druge strane, visoka koncentracija mikotoksina može promijeniti ili inhibirati rast i fiziologiju takvih mikroorganizama, što zahtijeva duže vrijeme za prilagodbu prije postizanja zadovoljavajuće razine dekontaminacije.

Dokazano je da neki mikroorganizmi proizvode enzime koji mogu promijeniti strukturu mikotoksina i/ili proteina koji ih mogu spajati, čineći ih manje aktivnim (Juodeikiene i sur., 2012). Mikroorganizmi poput aktinomiceta (rod *Streptomyces*), bakterija (*Bacillus licheniformis*, *Phenylbacterium immobile*, *Pediococcus parvulus*), filamentoznih gljiva (*Aspergillus niger*, *A. japonicus*, *Aspergillus tubingensis*) i kvasaca (rodovi *Trichosporon* i *Rhodotorula* te kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Hanseniaspora uvarum*) mogu razgraditi OTA. Najvažniji mehanizam biorazgradnje je razgradnja OTA do OT $\alpha$  (slika 6, Chen i sur., 2018). Produkti razgradnje su L- $\beta$ -fenilalanin i OT $\alpha$  koji nastaju hidrolizom amidne veze pomoću hidrolitičkih enzima kao što su karboksipeptidaza A, lipaza A, proteaza A, okratoksinaza.



**Slika 6.** Mehanizam biorazgradnje OTA enzimima (Chen i sur., 2018)

Rodrigues i suradnici (2009) su izvijestili da OT $\alpha$  nije toksičan ili da je barem 500 puta manje toksičan od OTA. Međutim, postoji i drugi, više hipotetski postupak, koji podrazumijeva razgradnju OTA hidrolizom laktonskog prstena. U ovom slučaju, konačni produkt razgradnje

je otvoreni laktonski oblik OTA koji je slične toksičnosti kao OTA kada se daje štakorima, ali je manje toksičan za miševе i bakteriju *Bacillus brevis*. Iako je ovo hipotetski, vjerojatno će se dogoditi budući da su mikrobiološke laktonohidrolaze koje provode sličnu transformaciju česte (Juodeikiene i sur., 2012).

U pogledu različitih sredstava za biokontrolu mikotoksina, kvasci se smatraju jednim od najmoćnijih mikroorganizama zbog svojih bioloških i netoksičnih svojstava (Pimenta i sur., 2009). Prvotna istraživanja bazirala su se na popularnom soju kvasca *S. cerevisiae*. Tako su Bohm i suradnici (2000) proveli istraživanje te zaključili kako je primjenom različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae* moguće razgraditi do 38 % OTA, no u istraživanju nisu potvrdili prisutnost razgradnih produkata. Nadalje, Molnar i suradnici (2004) su izolirali i identificirali novu vrstu kvasca *Trichosporon mycotoxinivorans* te su ispitali njegovu sposobnost razgradnje OTA u sintetskom mediju. Uočili su kako već nakon 2,5 sati uzgoja OTA nije bio prisutan u mediju, dok je OT $\alpha$  bio jasno vidljiv na kromatogramu. Peteri i suradnici (2007) su u svom istraživanju pokazali kako je upotrebom kvasca *P. rhodozyma* moguće razgraditi OTA do OT $\alpha$ , a navedena razgradnja je posredovana karboksipeptidazom. Yang i suradnici (2016) su pokazali kako kvasac *Yarrowia lipolytica* može značajno smanjiti koncentraciju OTA u sintetskom mediju. U svom su istraživanju pokazali kako sposobnost razgradnje OTA pomoću kvasca *Y. lipolytica* ovisi o vremenu uzgoja te koncentraciji dodanog OTA. U istom je istraživanju navedeno kako je degradacija OTA uspješnija primjenom većeg broja stanica kvasaca. Iako Abrunhosa i suradnici (2002) predlažu kako je karboksipeptidaza A ključan enzim za razgradnju OTA i nastajanje OT $\alpha$  i fenilalanina te je prisutnost navedenih spojeva dokaz sposobnosti razgradnje OTA, Angioni i suradnici (2007) su pokazali kako odsutnost OTA u biomasi ispitivanih kvasaca (*S. cerevisiae* i *H. uvarum*) isključuje adsorpcijski učinak ispitivanih kvasaca, dok odsutnost OT $\alpha$  i fenilalanina zapravo sugerira alternativne puteve razgradnje OTA.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Mikroorganizmi

Za određivanje utjecaja vinskih kvasaca na vezanje, razgradnju i toksičnost OTA, kao i utjecaja OTA na rast, morfologiju, fermentacijske produkte i parametre oksidativnog stresa kvasaca, odabrani su: *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces uvarum* 20 i *Saccharomyces bayanus* 8 (dobiveni iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica); *Kluyveromyces marxianus* DS12 (Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca); *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ 70468, *Hanseniaspora uvarum* S138 i *Pichia guilliermondii* ZIM 624 (Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina), Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Kulture kvasaca čuvane su na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u glicerolu, a prije postavljanja pokusa revitalizirane su tijekom 48 sati pri  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.2. Hranjive podloge

- Sladovina sastava: sladni ekstrakt (praškasti)  $20\text{ g L}^{-1}$ ; pepton  $6\text{ g L}^{-1}$ ; glukoza  $20\text{ g L}^{-1}$ ; voda (destilirana) 1 L; pH 5,5; sterilizacija pri  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 15 min.
- Sladni agar sastava: sladni ekstrakt (praškasti)  $20\text{ g L}^{-1}$ ; pepton  $6\text{ g L}^{-1}$ ; glukoza  $20\text{ g L}^{-1}$ ; agar  $15\text{ g L}^{-1}$ ; voda (destilirana) 1 L; pH 5,5; sterilizacija pri  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 15 min.
- YPG bujon (eng. *Yeast Peptone Glucose*) sastava: glukoza  $20\text{ g L}^{-1}$ ; kvaščev ekstrakt  $10\text{ g L}^{-1}$ ; pepton  $10\text{ g L}^{-1}$ ; voda (destilirana) 1 L; pH 6,5; sterilizacija pri  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 15 min.

#### 3.1.3. Kemikalije, reagensi i otapala

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće.

- etanol 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- cinkov sulfat 7-hidrat (Gram-Mol, Hrvatska)
- sumporna kiselina, UPLC čistoće (Merck, Njemačka)
- acetonitril, HPLC čistoće (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- metanol, HPLC čistoće (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- mravlja kiselina, HPLC čistoće (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- octena kiselina, HPLC čistoće (Honeywell, Offenbach, Njemačka)

- amonij acetat za masenu spektometriju (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- deionizirana i ultračista voda
- Tween 20, analitičke čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- NaCl (natrijev klorid) analitičke čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- KCl (kalijev klorid) analitičke čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (kalijev dihidrogenfosfat) analitičke čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (dinatrijev fosfat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Eagle's Minimal Essential Medium (Eagle's MEM) (Sigma-Aldrich, Merck, MO, SAD)
- Fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, Merck, MO, SAD)
- Penicillin-Streptomycin antibiotik (Sigma-Aldrich, Merck, MO, SAD)
- Tetrazolijeva sol MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, Merck, MO, SAD)
- fosfatni pufer (Phosphate Buffer Saline, PBS) (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (kalijev dihidrogenfosfat) (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (kalijev hidrogenfosfat) (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- TCA (trikloroctena kiselina) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- DTNB 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina) (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD)
- EDTA, etilendiamintetraoctena kiselina (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD)
- TBA, 2-tiobarbituratna kiselina (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD).

### 3.1.4. Priprema otopina i pufera

- 10 % trikloroctena kiselina (TCA) pripremljena je otapanjem 1 g TCA u odmjernoj tikvici od 10 mL dopunjenoj s destiliranom vodom.
- 0,3 M K-fosfatnog pufera pH 7,4 pripremljen miješanjem 0,3 M otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 0,3 M otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  do tražene pH vrijednosti. U 100 mL pufera dodana je odgovarajuća količina EDTA, kako bi otopina sadržavala 0,1 mM EDTA.
- 1 M K-fosfatnog pufera pH 7,4 je pripremljen tako da su 0,3 M otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 0,3 M otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pomiješane do tražene pH vrijednosti. U 100 mL pufera dodana je odgovarajuća količina EDTA, kako bi otopina sadržavala 0,1 mM EDTA.
- 1 mM otopina DTNB-a pripremljena je razrjeđenjem otopine 10 mM DTNB-a 10 puta.
- 0,6 otopina TBA pripremljena je otapanjem 0,6 g TBA u odmjernoj tikvici od 100 mL nadopunjene s destiliranom vodom uz blago zagrijavanje na grijaču/mješalici.
- 5M amonij acetat – 3,85 g amonij acetata otopljeno je u 10 mL ultračiste vode.

- Mobilna faza A: H<sub>2</sub>O/MeOH = 90/10 sa 5 mM NH<sub>4</sub>Ac i 1% CH<sub>3</sub>COOH - pomiješano 900 mL vode (ultračiste) i 100 mL metanola (HPLC grade), pipetom uzeto 11 mL te dodano 10 mL octene kiseline i 1 mL 5M amonij acetata.
- Mobilna faza B: MeOH/H<sub>2</sub>O = 97/3 sa 5 mM NH<sub>4</sub>Ac i 1% CH<sub>3</sub>COOH - pomiješano 970 mL metanola i 30 mL vode, pipetom uzeto 11 mL te dodano 10 mL octene kiseline i 1 mL 5M amonij acetata.
- 0,01 % Tween 20 u PBS – otopljeno 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 1,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> u 900 mL deionizirane vode, prema potrebi podešen pH na 7,4 sa 1 M NaOH, dodano 100 µL Tween 20 te nadopunjeno vodom do 1000 mL.
- PBS – otopljeno 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 1,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> u 900 mL deionizirane vode, prema potrebi podešen pH na 7,4 sa 1 M NaOH te nadopunjeno vodom do 1000mL.

### 3.1.5. Standard OTA

- Standard OTA; C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>6</sub>; Mr: 403,8 g mol<sup>-1</sup>; 5 mg (Sigma-Aldrich, Merck, MO, SAD).

Standard OTA nabavljen je u obliku kristala iz kojeg su pripravljene *stock* otopine u koncentracijama 2 mg mL<sup>-1</sup> i 4 mg mL<sup>-1</sup>, a koje su do upotrebe bile pohranjene na -20 °C. Za pokuse određivanja utjecaja OTA na morfologiju, sposobnost rasta, fermentacijska svojstva, parametre oksidativnog stresa kvasaca, kao i za dokazivanje citotoksičnosti razgradnih produkata OTA, otopine OTA pripravljene su u 96 %-tnom etanolu, a u acetonitrilu za određivanje %-tka vezanja i dokazivanja razgradnih produkata OTA.

Radne koncentracije OTA upotrebljene u pokusima pripravljene su u mediju za rast kvasaca.

### 3.1.6. Pribor

- Eppendorf tubice (2 mL)
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- jednokanalne pipete 10 – 5000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- štapići po Drigalskom
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- mikrobiološke ušice (200 mm)

- predmetnice (26x76 mm)
- pokrovnice (18x18 mm)
- okularni mikrometar
- objektni mikrometar
- Erlenmeyerove tikvice (100 mL, 50 mL)
- menzure, 50-1000 mL
- konusne epruvete, PTFE, s čepom za navoj (50 mL)
- vijali za HPLC, s i bez inserata (3 mL)
- čepovi za vijale
- oprema za filtraciju otopina (najlonski filter (0,20 µm, 47 mm; Sartorius, Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)

### 3.1.7. Uredaji

- analitička vaga Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- termostat (Mettler GmbH+Co.KG, Büchenbach, Njemačka)
- vibracijska mješalica, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)
- brojač kolonija BZG30 (WTW, Weilheim, Njemačka)
- svjetlosni mikroskop Olympus CX21 (Olympus, Tokio, Japan)
- tresilica IKA KS 4000 (IKA Werke GmbH & Co., Staufen im Breisgau, Njemačka)
- mini centrifuga (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- centrifuga s hlađenjem Z446K (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- UPLC (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD)
  - pumpa (G7104A 1290 Flexible Pump)
  - uzorkivač (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnica
  - analitička kolona (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex; 150×7,8 mm) s odgovarajućim predkolonama
    - detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID)
- centrifuga (SL 8R ThermoScientific; Waltham, Massachusetts, SAD)
- HPLC Infinity 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) opremljen s:
  - binarnom pumpom
  - otplinjačem (degazer)
  - autosamplerom
  - termostatiranim odjeljkom za kolonu

- maseni detektor QQQ 6410 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- kolona za tekućinsku kromatografiju Gemini, 150 x 4,6 mm x 5 µm (Phenomenex, Torrance, SAD)
- predkolona SecurityGuard™ Cartridges, Gemini C18 4 x 3,0 mm ID (Phenomenex, Torrance, SAD)
- imunoafinitetne kolonice OCHRAPREP® (R-Biopharm, Darmstadt, Njemačka)
- adapter/spremnik za imunoafinitetne kolonice – Reservoir tank (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- uređaj za pročišćavanje – Vacuum manifold (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- čitač mikrotitarskih pločica Victor™ (Perkin Elmer, MA, SAD)
- UHPLC sustav serije 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- QTRAP 5500 MS/MS sustav (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) opremljen s TurboV ionskim raspršivačem kao ionskim izvorom (ESI)
- Gemini® C18 kolona (Phenomenex, Torrance, CA, US) opremljena s odgovarajućom zaštitnom pretkolonom
- Grijač, G-Term 035 (Fratelli Galli, Milano, Italija)
- UV-Vis spektrometar, PG T70 (PG Instruments, Lutterworth, UK)
- Kiveta, Open-top UV-quartz cell (Agilent Technologies, CA, SAD)
- pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

### **3.1.8. Računalni programi**

- Microsoft Office 2016 – Excel (Microsoft, Redmond, WA, SAD)
- STATISTICA v. 13.0. software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD)
- OpenLAB CDS (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)
- MultiQuant™ 2.0.2 software (Sciex, Foster City, CA, USA).
- Design-Expert v. 13.0. (StatEase, Minneapolis, MN, SAD)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema stanica kvasca

Odabrani sojevi kvasaca, koji se čuvaju na -20 °C u sladovini (Biolife, Milan, Italija) s 30 % (v/v) glicerola, revitalizirani su naciepljivanjem u svježu sladovinu te inkubirani na 28 °C tijekom 48 sati. Zatim se za aktivirane kulture svakog soja kvasca odredio početni broj živih stanica, standardnom mikrobiološkom metodom određivanja broja stanica koje formiraju kolonije, odnosno CFU (eng. *Colony Forming Units*) vrijednost. Broj živih stanica kvasaca iznosio je  $10^7$ - $10^8$  st mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.2. Priprema uzoraka

Suspenzije stanica kvasaca naciepljene su u 3 x 100 mL YPG (eng. *Yeast Peptone Glucose*) bujona (Biolife, Milan, Italija) u koje je dodan OTA do konačne koncentracije 2 µg mL<sup>-1</sup> i 4 µg mL<sup>-1</sup>. Za svaki odabrani soj kvasca uzorci su pripremljeni kako slijedi:

- Tikvica A – u 100 mL YPG bujona dodan je 1 mL suspenzije odabranog soja kvasca te odgovarajući volumen OTA otopljenog u etanolu/acetoneutralu do konačne koncentracije od 2 µg mL<sup>-1</sup>.
- Tikvica B - u 100 mL YPG bujona dodan je 1 mL suspenzije odabranog soja kvasca te odgovarajući volumen OTA otopljenog u etanolu/acetoneutralu do konačne koncentracije od 4 µg mL<sup>-1</sup>.
- Tikvica C – u 100 mL YPG bujona dodan je 1 mL suspenzije odabranog soja kvasca te odgovarajući volumen etanola/acetoneutrala kao kontrolni uzorak.

Uzorci su inkubirani u aerobnim uvjetima pomoću tresilice IKA KS 4000 pri 120 okretaja min<sup>-1</sup> na 28 °C tijekom 24 sata.

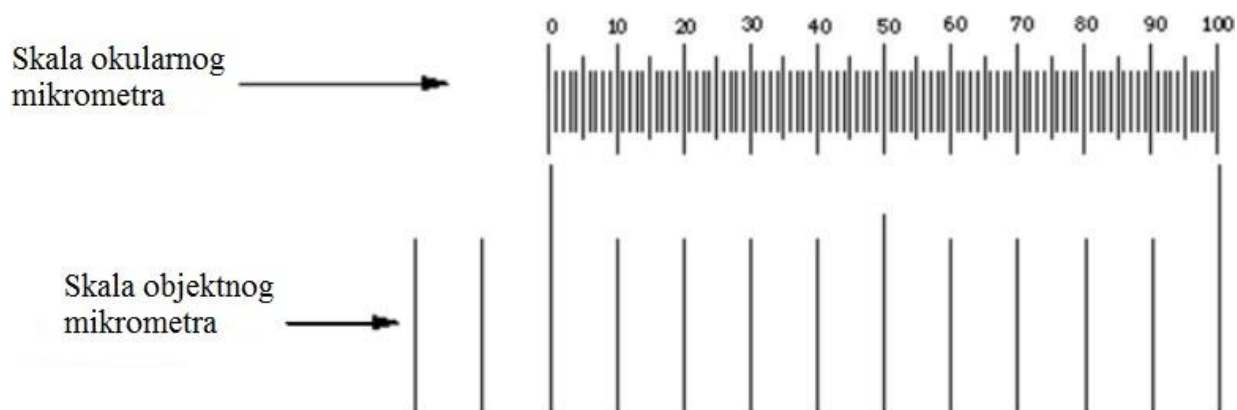
### 3.2.3. Određivanje utjecaja OTA na morfologiju, rast i fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca u *in vitro* uvjetima

#### 3.2.3.1. Određivanje veličine stanica kvasca u prisutnosti OTA

Za određivanje veličine stanica kvasca korištena je metoda mikrometrije kojom se mjerenje dimenzija stanica provodi svjetlosnim mikroskopom, okularnim i objektivnim mikrometrom.

Objektivni mikrometar je stakalce koje u centru ima ugraviranu skalu dugačku 1 mm podijeljenu na 100 jednakih podjeljaka. Stoga, razmak između dva manja podjeljka objektivnog mikrometra iznosi 0,01 mm (slika 7). Okularni mikrometar je stakalce koje u sredini sadrži ugraviranu skalu označenu brojevima (0-100), ali vrijednost svakog podjeljka na skali je nepoznata.

Prije mjerenja veličine stanica kvasaca, potrebno je izbaždariiti okularni mikrometar. Okularni mikrometar se stavi u okular, a objektivni mikrometar na stolić svjetlosnog mikroskopa. Baždarenje okulara provedeno je pri ukupnom povećanju od 400x i to tako da se odredi broj podjeljaka objektivne skale koji odgovara 100-tom podjeljku okularne skale (slika 7, Prtenjača, 2017). Faktor povećanja okularnog mikrometra dobiven je dijeljenjem broja podjeljaka objektivne skale sa 100 podjeljaka okularne skale i pomnožen s 10 (formula 1). A za svaku kombinaciju okularnog i objektivnog mikrometra i mikroskopa potrebno je provesti novo baždarenje.



**Slika 7.** Skala okularnog i objektivnog mikrometra (Prtenjača, 2017)

$$F_{400} = \frac{a}{b} \times 10 \quad [1]$$

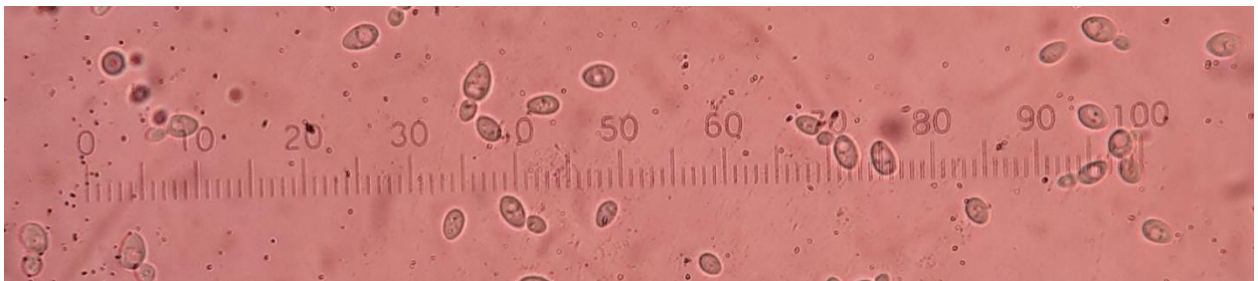
gdje je: a – broj podjeljaka objektivne skale  
b - broj podjeljaka okularne skale



Nakon završetka baždarenja okularnog mikrometra, okularni mikrometar ostaje u okularu, a objektni mikrometar se uklanja sa stolića mikroskopa te se stavlja mikroskopski preparat pojedinog soja kvasca.

Morfološke karakteristike kvasaca (veličina stanica kvasaca) u prisutnosti različitih koncentracija OTA određivane su nakon 0-tog (15 minuta nakon naciepljivanja), 6., 12. i 24. sata inkubacije metodom mikrometrije pri ukupnom povećanju 400x.

Tijekom uzgoja na tresilici u odabranim vremenskim intervalima uzimani su uzorci iz kojih su pripremljena po tri mikroskopska preparata u kojima se određivala veličina stanica kvasca tako da se broj podjeljaka koje stanica kvasca zauzima na okularnoj skali (slika 8) pomnoži s faktorom povećanja. Za svako je mjerenje nasumično izabrano 50 stanica kvasca u mikroskopskom preparatu te je izračunata srednja vrijednost veličine stanica.



**Slika 8.** Prikaz okularne skale prilikom mjerenja veličine stanica kvasaca (vlastita fotografija)

### 3.2.3.2. Određivanje broja živih stanica kvasaca u prisutnosti OTA

Utjecaj OTA u koncentracijama 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  na rast odabranih sojeva kvasaca u hranjivoj podlozi određen je metodom neizravnog (posrednog) određivanja broja živih stanica, odnosno jedinica koje formiraju kolonije tijekom 24 sata uzgoja. Uzorci su uzimani nakon 0. (15 minuta nakon naciepljivanja), 4., 6., 10., 12. i 24. sata, a iz uzoraka su načinjene serije decimalnih razrjeđenja u omjeru 1:10. Po 100  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg decimalnog razrjeđenja naciepljeno je na sladni agar, a nakon inkubacije na 28 °C tijekom 48 h, prebrojane su porasle kolonije i izračunata je CFU vrijednost prema izrazu:

$$CFU = \frac{N}{V} \times \text{recipročna vrijednost dec. razrjeđenja (st. mL}^{-1}) \quad [2]$$

gdje je: N – broj izbrojanih poraslih kolonija kvasaca

V – volumen naciepljenog uzorka suspenzije kvasaca (100  $\mu\text{L}$ )

recipročna vrijednost dec. razrjeđenja – recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja na kojem su se brojale porasle kolonije kvasaca

### 3.2.3.3. Određivanje produkata fermentacije kvasaca u prisutnosti OTA

Prisutnost produkata fermentacije odabranih sojeva kvasaca određivana je u YPG bujonu s i bez dodanog OTA nakon 12 i 24 sata uzgoja na tresilici. Za određivanje koncentracija šećera (zaostala glukoza) i produkata fermentacije (etanol, glicerol, octena i mravlja kiselina) korištena je tekućinska kromatografija ultra-visokih performansi (UPLC) uz RID detektor.

Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10  $\mu\text{L}$ , a protok mobilne faze (0,0025 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ .

Nakon izuzimanja uzorka, 10 mL je preneseno u plastičnu kivetu i centrifugirano 5 minuta pri 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ . Nakon centrifugiranja, 750  $\mu\text{L}$  uzorka supernatanta dodano je u 750  $\mu\text{L}$  otopine cinkovog sulfata heptahidrata koncentracije 100  $\text{g L}^{-1}$ , a tako dobivena otopina intenzivno je miješana 20 sekundi i ostavljena na sobnoj temperaturi kroz 10 minuta. Uzorci su zatim centrifugirani 10 minuta na 10 000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  kako bi se istaložili proteini i nečistoće. Tako dobiveni uzorci su razrijeđeni (750  $\mu\text{L}$  uzorka dodano u 750  $\mu\text{L}$  demineralizirane vode), profiltrirani kroz filter s porama veličine 0,20  $\mu\text{m}$  te su tako pripremljeni korišteni za UPLC analizu. Dobiveni kromatogrami obrađeni su pomoću računalnog programa OpenLAB CDS, a nepoznate koncentracije detektiranih spojeva u uzorcima određene su prema jednadžbama baždarnih pravaca (tablica 4).

**Tablica 4.** Jednadžbe baždarnih pravaca za određivanje koncentracije spojeva tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti (UPLC)

Spoj	Retencijsko vrijeme, $t_R$ (min)	Jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
Etanol	11,072	$y = 55421x + 1343$	1,0000
Glicerol	7,006	$y = 107908x + 955,97$	1,0000
Glukoza	4,821	$y = 135278x - 3377$	0,9997
Octena kiselina	7,816	$y = 57358x + 697,25$	1,0000
Mravlja kiselina	7,110	$y = 47328x + 53,595$	1,0000

### 3.2.4. Određivanje utjecaja OTA na parametre oksidativnog stresa u kvasaca

#### 3.2.4.1. Određivanje koncentracije glutationa (GSH)

Spektrofotometrijska metoda određivanja GSH temelji se na kolorimetrijskoj reakciji GSH s DTNB-om (5,5-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina)) ili Ellmanov reagens. U blago alkalnim uvjetima (pH 7-8) DTNB reagira s tiolnom skupinom (-SH) pri čemu nastaje 2-nitro-5-benzoatni anion (TNB<sup>2-</sup>). Nastali produkt žute je boje, a intenzitet obojenja moguće je izmjeriti pomoću UV-Vis spektrofotometra na valnoj duljini od 412 nm (Pastore i sur., 2003). Koncentraciju GSH u uzorku može se izračunati prema Lambert-Beerovom zakonu i poznatom apsorpcijskom koeficijentu,  $\epsilon=14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Eyer i sur., 2003).

#### 3.2.4.2. Priprema uzoraka biomase kvasaca tretiranih s OTA za određivanje koncentracije GSH

Nakon 12. i 24. sata, iz svake Erlenmeyerove tikvice izuzeto je po 10 mL uzorka. Izuzeti uzorci su najprije centrifugirani (7000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , 10 min) kako bi se odvojila biomasa kvasaca od supernatanta. Biomasa svakog uzorka, isprana je u dva navrata s destiliranom vodom. Potom je na biomasu dodano 10 % TCA te su uzorci homogenizirani i centrifugirani (7000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , 10 min) kako bi se uklonili proteini. Zatim je pažljivo odvojeno 50  $\mu\text{L}$  supernatanta te je njemu dodano 750  $\mu\text{L}$  1 M K-fosfatnog pufera, pH=7,4 i 100  $\mu\text{L}$  DTNB-a. Uz uzorke, pripremljen je i uzorak destilirane vode koji je služio kao slijepa proba. Pomoću UV-Vis spektrofotometra pri valnoj duljini 412 nm (prema slijepoj probi) izmjeren je intenzitet nastalog obojenog kompleksa GSH-DTNB.

Koncentracija GSH u uzorcima izračunata je pomoću Lambert-Beerovog zakona iz izmjerene apsorbancije i poznatog apsorpcijskog koeficijenta. Molarni apsorpcijske koeficijent  $\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) je konstantan za određeni spoj i valnu duljinu pri kojoj se mjeri (Nigović i sur., 2014). Prema Lambert-Beerovom zakonu, koncentracija GSH je izračunata kao omjer izmjerene apsorbancije i apsorpcijskog koeficijenta pomnoženog s duljinom puta svjetlosti kroz otopinu (formula 3).

$$c(\text{GSH}) = \frac{A}{\epsilon \times l} \quad [3]$$

gdje je:  $c(\text{GSH})$  – koncentracija GSH u uzorku  
 $A$  – izmjerena apsorbancija pri 412 nm  
 $\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent ( $14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )  
 $l$  – duljina puta koju svjetlost prolazi kroz otopinu (1 cm)

### 3.2.4.3. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Malondialdehid (MDA) u reakciji s TBA (2-tiobarbituratnom kiselinom) u kiselim uvjetima i pri povišenoj temperaturi daje intenzivno crveno obojeni adukt MDA-TBA<sub>2</sub>. Intenzitet obojenja kompleksa koji nastaje u reakciji nukleofilne adicije može se izmjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 532 nm. Pomoću Lambert-Beerovog zakona iz izmjerene apsorbancije i poznatog apsorpcijskog koeficijenta,  $\epsilon=156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  određuje se koncentracija MDA (Janero, 1990).

### 3.2.4.4. Priprema uzoraka biomase kvasaca tretiranih s OTA za određivanje koncentracije MDA

Nakon 12. i 24. sata, iz svake Erlenmeyerove tikvice izuzeto je po 10 mL uzorka. Izuzeti uzorci su najprije centrifugirani (7000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , 10 min) kako bi se odvojila biomasa kvasaca od supernatanta. Biomasa svakog uzorka, isprana je u dva navrata s destiliranom vodom. Potom je na biomasu dodano 10 % TCA te su uzorci homogenizirani i centrifugirani (7000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , 10 min) kako bi se uklonili proteini. Zatim je pažljivo odvojeno 100  $\mu\text{L}$  supernatanta u koji je dodano 800  $\mu\text{L}$  0,6 % TBA. Uz uzorke je pripremljena i slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Epice s reakcijskom smjesom su zagrijavane na temperaturi od 90 °C kroz 30 minuta u grijaćem bloku. Nakon zagrijavanja, epice su hlađene kako bi se zaustavila reakcija, a apsorbancija je izmjerena na UV-Vis spektrofotometru prema slijepoj probi pri valnoj duljini od 532 nm. Koncentracija MDA u uzorcima izračunata je prema Lambert-Beerovom zakonu i poznatom apsorpcijskom koeficijentu,  $\epsilon=156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Janero, 1990) (formula 4).

$$c(\text{MDA}) = \frac{A}{\epsilon \times l} \quad [4]$$

gdje je:  $c(\text{GSH})$  – koncentracija GSH u uzorku  
A – izmjerena apsorbancija pri 532 nm  
 $\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent ( $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )  
l – duljina puta koju svjetlost prolazi kroz otopinu (1 cm)

### 3.2.5. Određivanje koncentracije OTA HPLC-MS/MS metodom

#### 3.2.5.1. Priprema uzorka

Kako bi se odredila koncentracija OTA u YPG bujonu nakon 12. i 24. sata inkubacije s odabranim sojevima vinskih kvasaca, uzorci (10 mL) su centrifugirani pri 4000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Potom se 7 mL supernatanta svakog uzorka razrijedi s 49 mL 0,01 % Tween u PBS-puferu u tikvici volumena 100 mL te lagano promiješa. Tako pripremljeni uzorak (56 mL) aplicira se na imunoafinitetnu kolonicu, a svaka kolonica se ispiru s 10 mL PBS-pufera (dva puta po 5 mL). Tijekom 4 minute, kolonice su osušene primjenom vakuuma. Nakon sušenja, kolonice su eluirane s 1500  $\mu\text{L}$  metanola HPLC čistoće, a dobiveni eluat je još 3 puta propušten kroz kolonicu. Na kolonicu se zatim doda 1500  $\mu\text{L}$  ultračiste vode uz primjenu vakuuma. Dobiveni uzorci su zatim vorteksirani i stavljeni u vijale i tako pripremljeni za analizu. Uzorci koji su sadržavali 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dodanog OTA dodatno su razrijeđeni četiri puta (u omjeru 1:1) s 50 %-tnim metanolom.

#### 3.2.5.2. Kvantitativno određivanje OTA

Potvrдна metoda za detekciju i kvantifikaciju OTA validirana je prema smjernicama europske regulative (Wenzl i sur., 2016), a validacijom su određeni parametri koeficijenta korelacije, limita detekcije i limita kvantifikacije te iskorištenje (tablica 5).

**Tablica 5.** Parametri validacije

Parametar	Rezultat
Selektivnost	zadovoljava
Iskorištenje	80 - 84,6 %
Linearnost	0,999
Granica detekcije (LOD)	0,19
Granica kvantifikacije (LOQ)	0,63

Određivanje koncentracije OTA provedeno je primjenom spregnutih tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (HPLC-MS/MS). Maseni spektrometar, opremljen je s trostrukim kvadrupol masenim detektorom s izvorom elektrosprej

ionizacije (eng. *Electro Spray Ionization*, ESI). Kromatografsko razdvajanje spojeva provedeno je na Gemini<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-koloni, dimenzija 150 x 4,6 mm, veličine čestica 5 μm, koja je opremljena s odgovarajućom zaštitnom SecurityGuard<sup>™</sup> Cartridges, Gemini<sup>®</sup> C<sub>18</sub> pretkolumnom. Kao mobilna faza korištene su dvije otopine: 0,1 %-tna mravlja kiselina (mobilna faza A) i metanol (mobilna faza B) u modelu gradijenta pri brzini protoka od 1 mL min<sup>-1</sup> i temperaturi od 25 °C.

Analize su provedene pri sobnoj temperaturi, uz ukupno vrijeme trajanja analize od 22 min. Injektiranje je provedeno uz ispiranje igle otapalom A i otapalom B kako bi se spriječila moguća unakrsna kontaminacija.

Masenom spektrometrijom praćen je ion OTA u uvjetima prikazanim u tablici 6. Praćen je prekursor ion  $m/z = 404$  te dva produkt iona ( $m/z = 357,9$  i  $m/z = 239$ ) (tablica 6).

**Tablica 6.** Ionski prijelazi OTA

Analit	OTA	
Prekursor ion	404	
Napon fragmentora (V)	130	
Produkt ioni	357,9	239
Energija kolizije (eV)	10	25

Koncentracije OTA izračunate su na temelju kalibracijske krivulje izrađene u pet točaka, uzimajući u obzir faktor razrjeđenja i prosječne vrijednosti iskorištenja metode. Faktor razrjeđenja kod uzoraka s 2 μg mL<sup>-1</sup> OTA iznosio je 2,33, dok je kod uzoraka s 4 μg mL<sup>-1</sup> faktor razrjeđenja bio 9,32.

### 3.2.6. Određivanje biorazgradnih produkata OTA

#### 3.2.6.1. Priprema uzorka

Kako bi se odredila prisutnost biorazgradnih produkata OTA u YPG bujonu nakon 12., odnosno 24. sata inkubacije s odabranim sojevima vinskih kvasaca, uzorci (10 mL) su centrifugirani pri 4000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Potom se 100  $\mu\text{L}$  supernatanta svakog uzorka razrijedi u 900  $\mu\text{L}$  otopine za razrjeđenje, koja se sastoji od 49,5 % acetonitrila, 49,5 % ultra čiste vode i 1 % octene kiseline. Tako pripremljeni uzorci su vorteksirani i zamrznuti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do provođenja analize.

#### 3.2.6.2. Multimikotoksinska analiza pomoću UHPLC-MS/MS metode

Mjerenje koncentracija biorazgradnih produkata OTA provedeno je prema validiranoj metodi (Sulyok i sur., 2020). Tijekom analize uzoraka, LOD i LOQ za OTA su iznosili  $0,14\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$  i  $0,47\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ , odnosno za OTC  $0,01\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$  i  $0,05\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ . Za analizu je upotrijebljen QTRAP 5500 MS/MS sustav opremljen s TurboV ionskim raspršivačem kao ionskim izvorom (ESI) i UHPLC sustavom serije 1290. Kromatografsko razdvajanje provedeno je pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  na Gemini<sup>®</sup> C<sub>18</sub>-koloni opremljenom s odgovarajućom zaštitnom pretkolonom. Gradijentno eluiranje provedeno je pomoću dvije mobilne faze s brzinom protoka u iznosu od  $1000\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ . Obje mobilne faze sadržavale su 5 mM amonijevog acetata i sastojale su se od smjese metanola/vode/octene kiseline u omjeru 10:89:1 (v/v/v; eluens A) i u omjeru 97:2:1 (v/v/v; eluens B). Tijekom 2 minute eluens A je bio 100 %, nakon čega je postotak eluensa B linearno povećan 50 % unutar 3 min. Daljnje linearno povećanje eluensa B do 100 % unutar 9 minuta bilo je praćeno zadržavanjem od 4 min na 100 % eluensa B. Sljedeće 2,5 minute kolona je vraćena u ravnotežu dovodeći 100 % eluensa A.

Za svaki mikotoksin analiziran je jedan prekursor ion i dva produkt iona te je za potvrđivanje analita korišten kriterij ionskog omjera i vremena zadržavanja. Analiti su kvantificirani u pozitivnom i negativnom sMRM (eng. *scheduled Multiple Reaction Monitoring*) modu. Kvalitativna i kvantitativna obrada podataka izrađena je pomoću softvera MultiQuant<sup>™</sup> 2.0.2 softvera, a uvjeti analize prikazani su u tablici 7.



**Tablica 7.** Ionski prijelazi OTA i OTC

Analit	OTA		OTC	
Prekursor ion	404		432	
Napon fragmentora (V)	130		130	
Produkt ioni	102	239	358,1	239
Energija kolizije (eV)	105	37	23	39

### 3.2.7. Određivanje citotoksičnosti biorazgradnih produkata OTA na Pk15 stanicama MTT testom

#### 3.2.7.1. Priprema uzorka

Kako bi se odredila citotoksičnost biorazgradnih produkata OTA na Pk15 stanicama, stanice su tretirane supernatantom dobivenim centrifugiranjem nakon 12. i 24. sata inkubacije u YPG podlozi. Po 1 mL svakog uzorka je centrifugiran kako bi se odvojila kvašćeva biomasa, a dobiveni supernatant je izdvojen i zamrznut na -20 °C do početka pokusa.

#### 3.2.7.2. Uzgoj i održavanje Pk15 stanica u kulturi

Pk15 stanice čuvaju se pohranjene u ampulama ( $5 \times 10^6$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  medija za uzgoj,  $V = 1 \text{ mL}$ ) u zamrzivaču na -80 °C u mediju za smrzavanje koji se sastoji od 85 % Eagle's MEM, 10 % FBS-a te 5 % DMSO-a. Rad s kulturama životinjskih stanica mora se odvijati u aseptičkim uvjetima koji se osiguraju radom u komori za sterilan rad, odnosno laminaru. Uzgoj i održavanje Pk15 stanica započinje naglim odmrzavanjem stanica na 37 °C nakon čega se stanice resuspendiraju u 10 mL medija za uzgoj (90 % Eagle's MEM i 10 % FBS-a) u T-boci površine  $25 \text{ cm}^2$  te stavljaju u  $\text{CO}_2$  inkubator s kontroliranom atmosferom (37 °C, 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$ ). Nakon 24 sata, uklanja se medij za uzgoj s ostacima medija za smrzavanje te se na stanice prihvaćene za dno boce dodaje jednak volumen svježeg medija za uzgoj kako bi se nastavio uzgoj. Medij za uzgoj je potrebno redovito mijenjati kako bi se stanicama osiguralo dovoljno mjesta za rast. Prije precjepljivanja (subkultivacije), potrebno je stanice odvojiti od površine na kojoj rastu. Stanice su dvaput isprane s 0,25 % (m/v) tripsin-0,53 mM EDTA otopinom kako bi se uklonili svi tragovi seruma koji sadrže inhibitor tripsina. Zatim je u T-bocu dodano 2 mL otopine tripsin-EDTA, a stanice su pod inverznim mikroskopom promatrane dok se stanični sloj nije odvojio. Nakon što je stanični sloj odvojen, dodano je 6 mL svježeg medija

(90 % Eagle's MEM te 10 % FBS-a) kako bi se stanice resuspendirale. Odgovarajući alikvoti stanične suspenzije prebačeni su u nove T-boce i inkubirane pri temperaturi od 37 °C u svrhu daljnjeg uzgoja.

### 3.2.7.3. Određivanje citotoksičnosti razgradnih produkata OTA MTT testom

Tetrazolijeva sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) je sol žute boje koja se djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama prevodi u ljubičasto obojene kristale formazana (sukcinat dehidrogenaza cijepa tetrazolijev prsten) pa je njezinom primjenom moguće odrediti aktivnost enzima. Tetrazolijeva sol prima elektrone od oksidiranih supstrata ili prikladnih enzima (NADH ili NADPH (Supino, 1995)), a formazan ne može proći kroz staničnu membranu te se zbog toga nakuplja u živim stanicama. Radi se o brznoj kolorimetrijskoj metodi za praćenje stanične proliferacije i citotoksičnosti.

Kako bi se istražilo toksično djelovanje razgradnih produkata OTA na Pk15 stanice, iste su uzgajane u Eagle's MEM uz dodatak 10 % FBS-a te 1 % otopine antibiotika Penicillin-Streptomycin. Pk15 stanice prvo su nacijepljene na *multitwell* ploče (96 jažica) u koncentraciji  $8 \times 10^4$  st mL<sup>-1</sup> u volumenu od 100 µL po jažici, prilikom čega su tri jažice ostavljene prazne za slijepu probu. Tako nacijepljene stanice ostavljene su preko noći na inkubaciji u CO<sub>2</sub> inkubatoru na 37 °C. Sljedećeg dana, medij u kojem su stanice rasle zamijenjen je sa 180 µL novog medija, uz dodatak 20 µL pripremljenog supernatanta (u kojem se nalaze razgradni produkti OTA) i inkubirano tijekom 24 sata. Nakon 24 sata, dodano je 40 µL po jažici MTT *stock* otopine, razrijeđene 10x u sterilnom zagrijanom mediju i inkubirano tijekom 4 sata na 37 °C. Nakon 4 sata inkubacije, iz jažica *multiwell* ploča, uklonjen je medij, pazeći da se ne uklone i nastali kristali formazana. Kristali formazana otapaju se dodavanjem 170 µL DMSO-a, uz inkubaciju od 30-35 minuta, na tresilici kako bi se boja ravnomjerno rasporedila i kako bi nestali eventualni mjehurići zraka koji mogu povećati apsorbanciju. Intenzitet nastalog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 570 nm u odnosu na slijepu probu pomoću čitača mikrotitarskih ploča. Od izmjerene apsorbancije, oduzeta je vrijednost slijepe probe te je izračunat relativan broj stanica u odnosu na kontrolu.

### 3.2.8. Statistička obrada podataka

Tijekom eksperimentalnog dijela dokorskog rada, svi pokusi su provedeni u triplikatu. Za obradu podataka metodologijom odzivnih površina (RSM) korišten je program Design Expert v. 13.0., dok je za umjetne neuronske mreže (ANN) korišten program Statistica v. 13.0. Prije

statističke obrade podataka, rezultati dobiveni tijekom istraživanja pripremljeni su i uređeni u programu Microsoft Office Excel 2016. Tijekom obrade podataka, ANOVA testovi su rađeni s kvadratnim modelom, a statistički značajnim (signifikantnim) rezultatom se smatra rezultat gdje je  $p < 0,05$  (Stahle i Wold, 1989). Uspoređene su srednje vrijednosti veličine stanica, broja živih stanica kvasaca, fermentacijskih produkata, koncentracije GSH i MDA, preostale koncentracije OTA te koncentracije OTC u uzorcima bez i s dodatkom OTA u dvije različite koncentracije.

#### 3.2.8.1. Umjetne neuronske mreže (ANN)

Umjetne neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Network*, ANN) su multivarijantni nelinearni modeli, gdje su analizirani podaci mapirani od ulaznih varijabli preko nekoliko slojeva obrade podataka. Članovi mreže postupno se prilagođavaju, često u fazi učenja, gdje neuronske mreže proučavaju podatke i pokušavaju odrediti uzorke po kojima se ulazni podaci ponašaju te nakon nekoliko slojeva mreža može predvidjeti specifične izlazne varijable. U ovom doktorskom radu ANN su primijenjene kako bi se predvidio učinak vremena uzgoja, vrste kvasca i koncentracije OTA kao ulaznih parametara na izlazne parametre (veličina stanica kvasca, broj živih stanica, koncentracija proizvedenog etanola, koncentracija preostalog OTA, koncentracija OTC te koncentracije GSH i MDA). Primjenom ANN objašnjen je utjecaj ulaznih parametara na pojedini ili više izlaznih parametara. U tu svrhu, nasumična podjela podataka za neuronske mreže bila je testirana na više različitih omjera (60:20:20, 70:15:15, 50:30:20, 70:20:10) za treniranje, testiranje i validaciju, pri čemu se najboljim omjerom pokazao 60:20:20. Najbolji modeli su procijenjeni na temelju  $R^2$  vrijednosti i srednjih vrijednosti kvadrata pogrešaka za trening, testiranje i validaciju.

#### 3.2.8.2. Metodologija odzivne površine (RSM)

Metodologija odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology*, RSM), sažetak je matematičkih i statističkih metoda kojima se modeliraju i analiziraju utjecaji nekoliko faktora na promatrani odziv, a odzivna površina se prikazuje grafički u cijelom eksperimentalnom području, s ciljem optimiziranja odziva (Montgomery, 2013). Primjenjuje se u slučajevima kada više varijabli utječe na ispitivani proces i prije primjene metode potrebno je izabrati odgovarajući dizajn eksperimenta iz ispitivanog područja kojim će se definirati eksperimenti. Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta, dobiva se kontinuirana odzivna ploha koja spaja visine vrijednosti određene modelom.

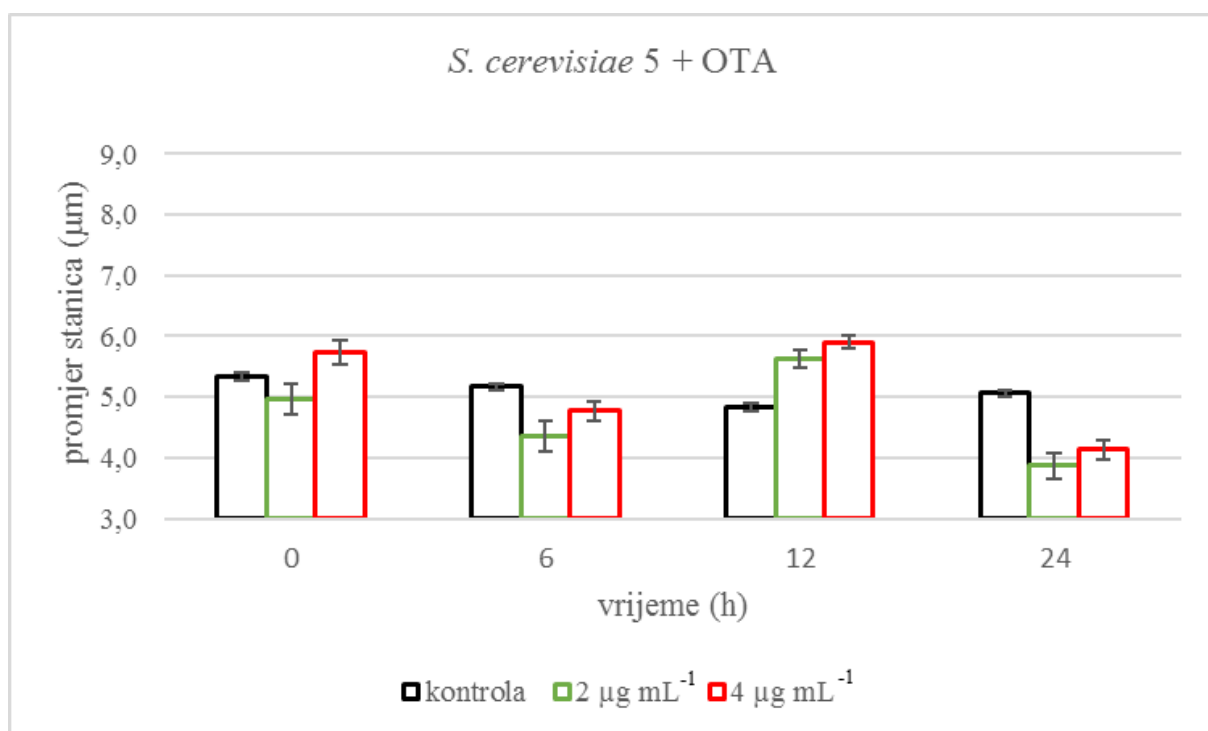
## **4. REZULTATI**

Sukladno ciljevima doktorskog rada rezultati istraživanja podijeljeni su u više dijelova koji se međusobno tematski nadovezuju. Prvi dio obuhvaća utjecaj OTA na morfologiju, rast i fermentacijske produkte odabranih sojeva vinskih kvasaca budući da se malo zna o učincima mikotoksina kao agenasa stresa na kvasce i malo je podataka o ponašanju kvasaca u prisutnosti OTA. U drugom dijelu su prikazani rezultati utjecaja OTA na parametre oksidativnog stresa (koncentracije GSH i MDA) odabranih vinskih kvasaca, dok su u trećem dijelu prikazani rezultati sposobnosti kvasaca prema uklanjanju (vezanjem ili razgradnjom) OTA iz medija te toksičnost potencijalnih razgradnih produkata OTA.

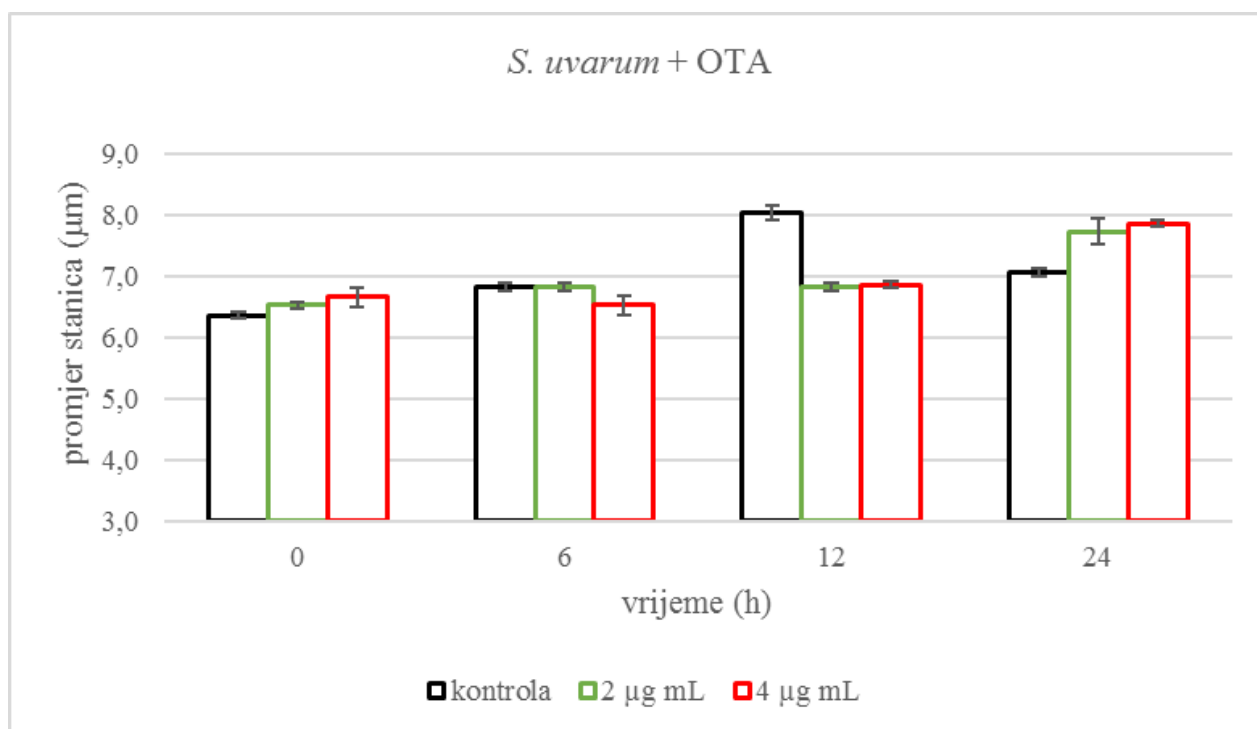
#### 4.1. Utjecaj OTA na morfologiju, rast i fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca u *in vitro* uvjetima

##### 4.1.1. Rezultati utjecaja OTA na morfologiju odabranih sojeva kvasaca

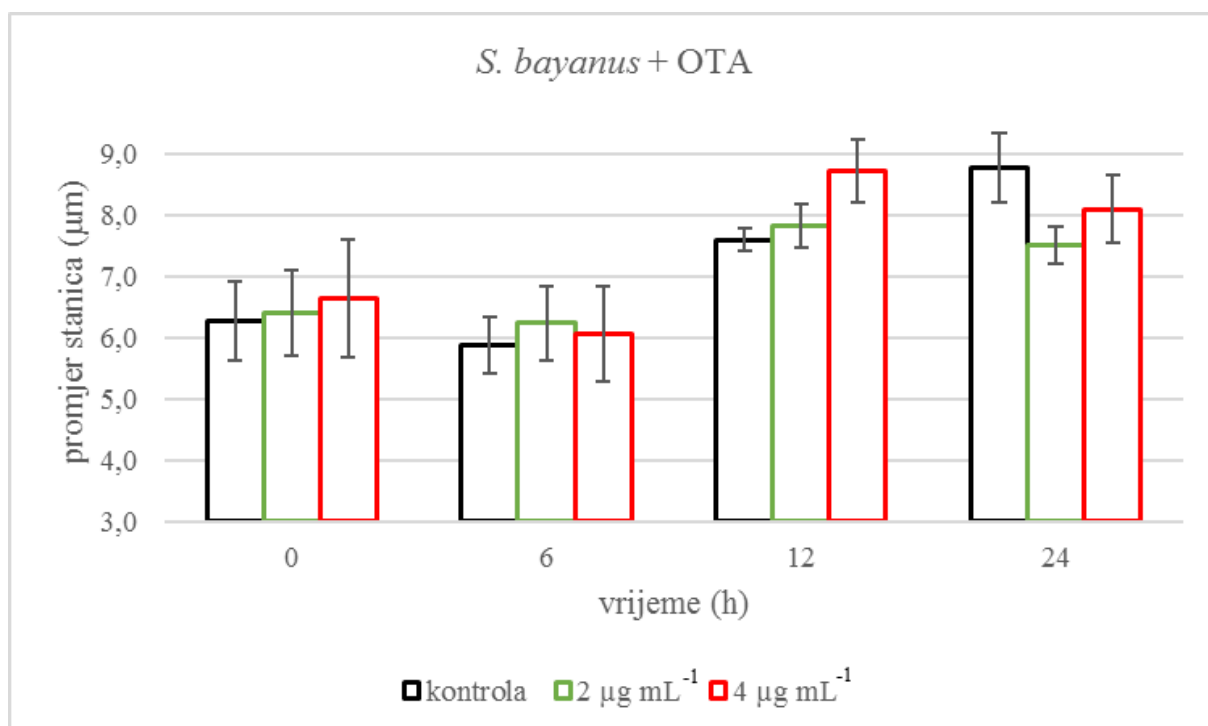
Kako bi se istražio utjecaj OTA na morfologiju stanica kvasaca odabrano je 7 sojeva vinskih kvasca. U definiranim vremenskim intervalima 0. (15-ak minuta nakon nacjepljivanja) 6., 12. i 24. sat inkubacije pripremljeni su mikroskopski preparati i metodom mikrometrije određivana je veličina stanica, mjerenjem promjera stanice. Rezultati su prikazani na slikama 9 - 15.



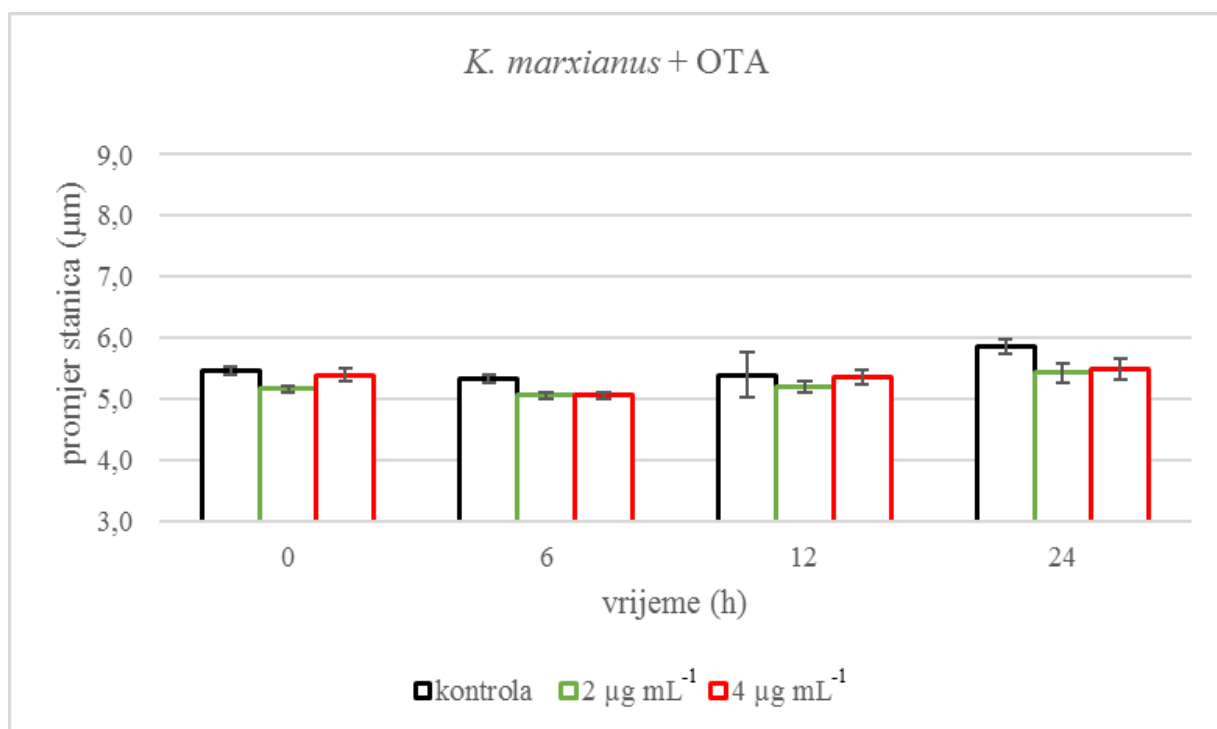
**Slika 9.** Veličina stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 5 u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4 μg mL<sup>-1</sup> tijekom 24 sata uzgoja



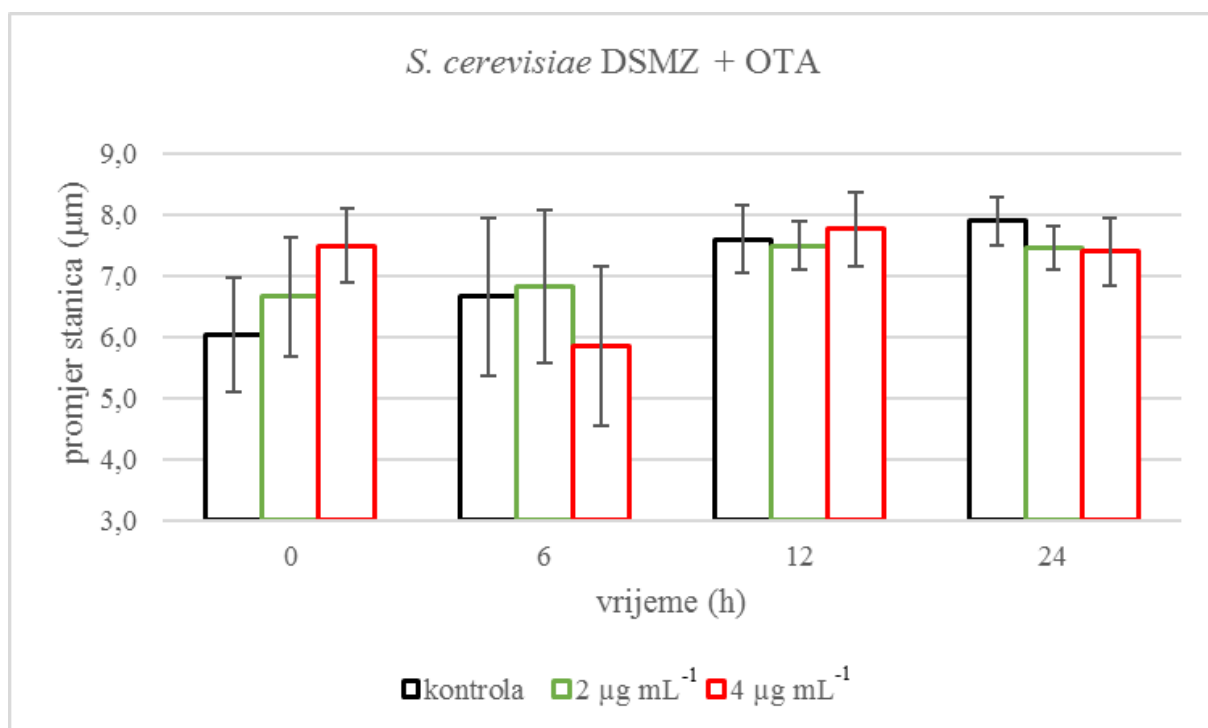
**Slika 10.** Veličina stanica kvasca *Saccharomyces uvarum* u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tijekom 24 sata uzgoja



**Slika 11.** Veličina stanica kvasca *Saccharomyces bayanus* u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tijekom 24 sata uzgoja

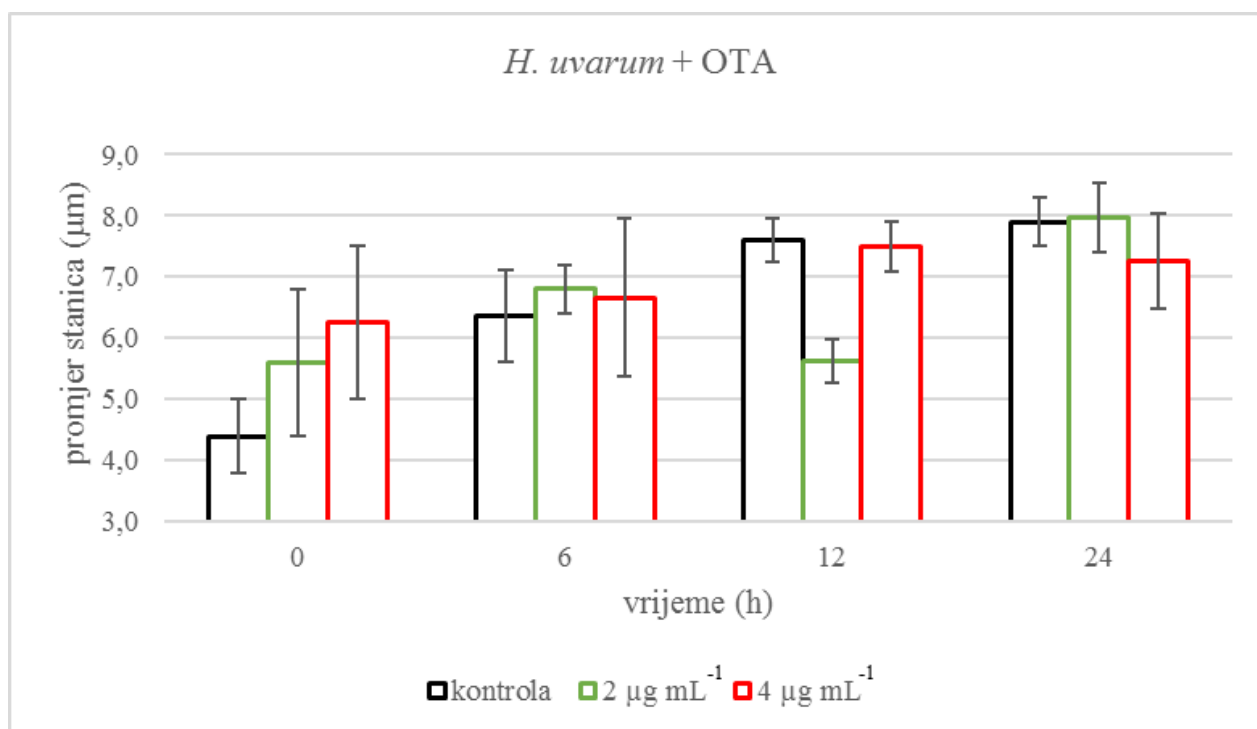


**Slika 12.** Veličina stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> tijekom 24 sata uzgoja

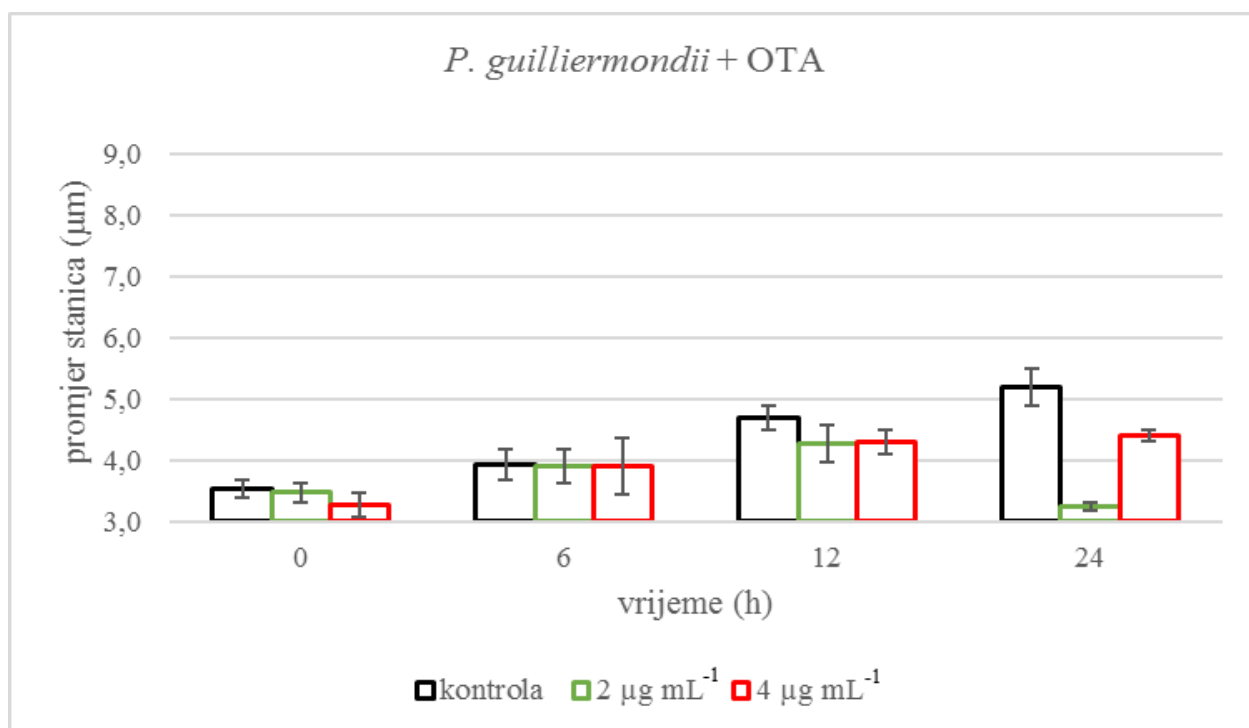


**Slika 13.** Veličina stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> tijekom 24 sata uzgoja





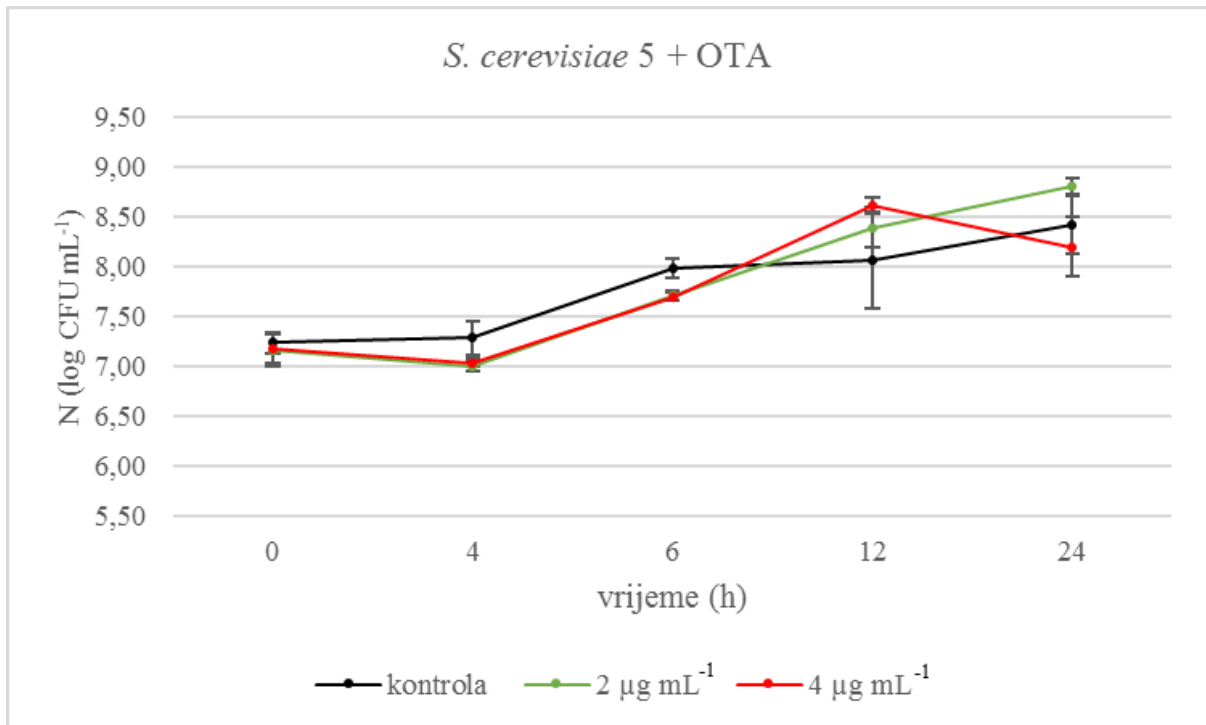
**Slika 14.** Veličina stanica kvasca *Hanseniaspora uvarum* u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> tijekom 24 sata uzgoja



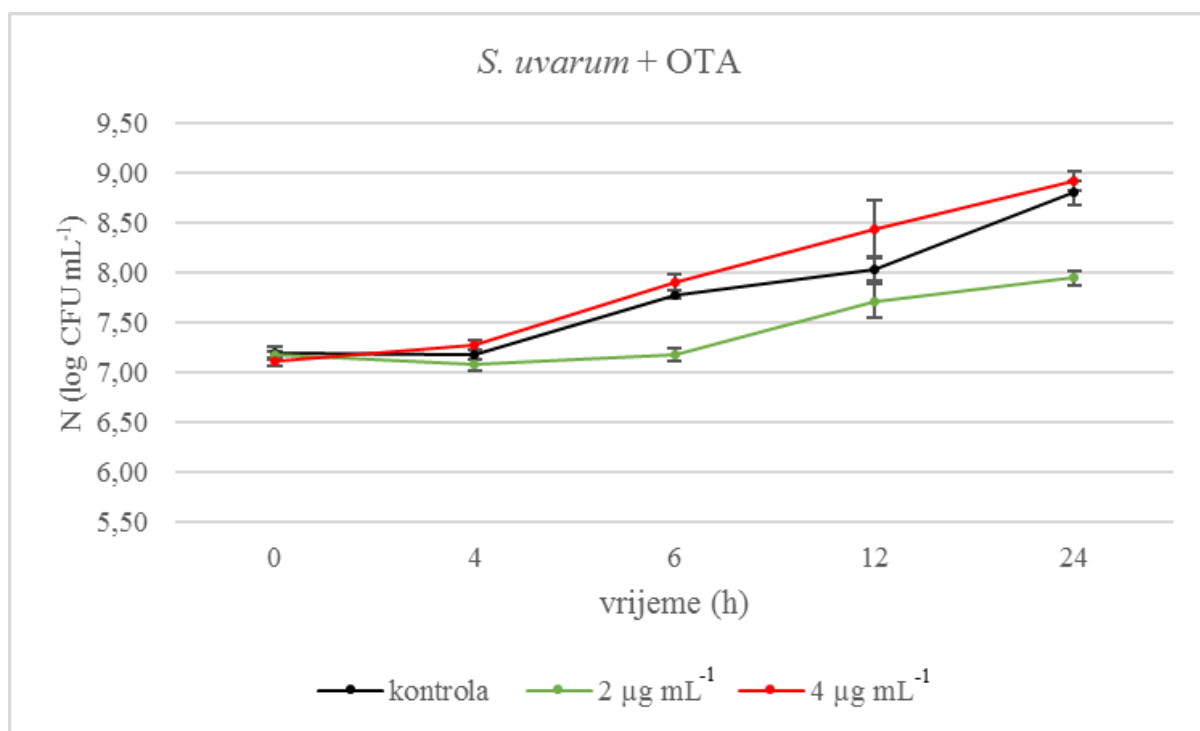
**Slika 15.** Veličina stanica kvasca *Pichia guilliermondii* u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> tijekom 24 sata uzgoja

#### 4.1.2. Rezultati utjecaja OTA na broj živih stanica odabranih sojeva kvasaca

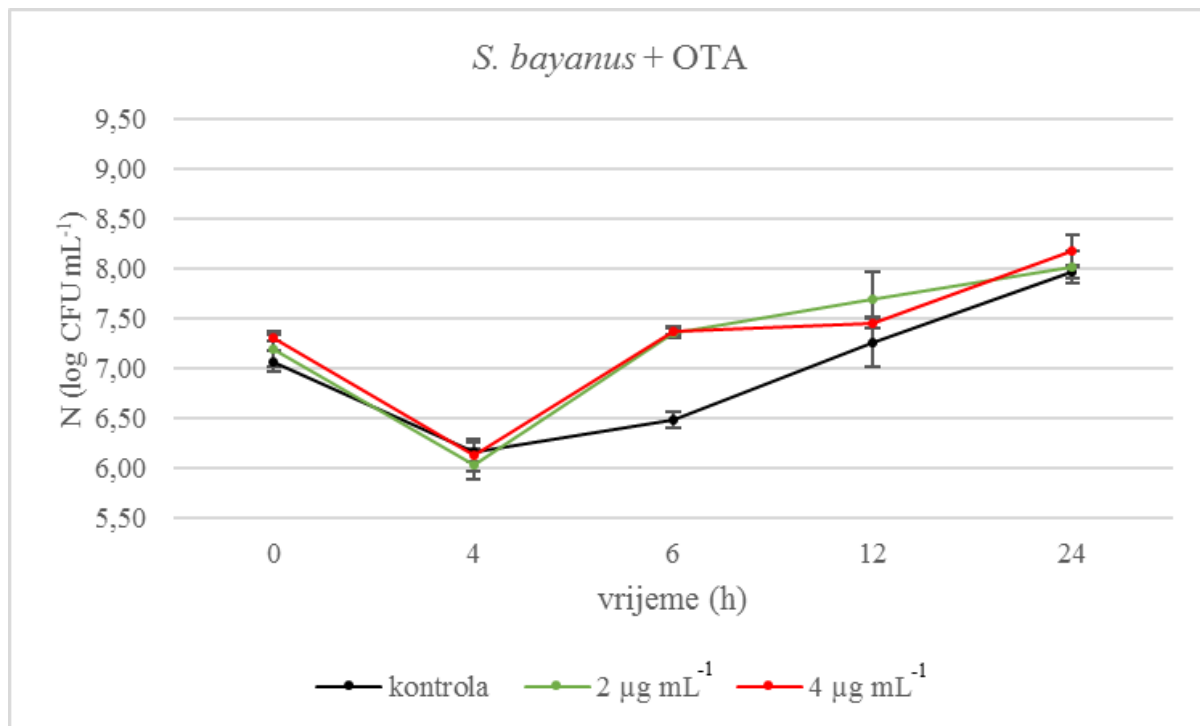
U ovom poglavlju, prikazani su rezultati utjecaja dviju koncentracija OTA na broj živih stanica odabranih sojeva vinskih kvasaca. Na početku eksperimenta (15-ak minuta nakon nacjepljivanja) te nakon 4., 6., 12. i 24. sata inkubacije izuzimani su uzorci te su klasičnom mikrobiološkom metodom određivanja ukupnog broja živih stanica izbrojane stanice kvasaca i formirane krivulje rasta, a rezultati su prikazani na slikama 16-22.



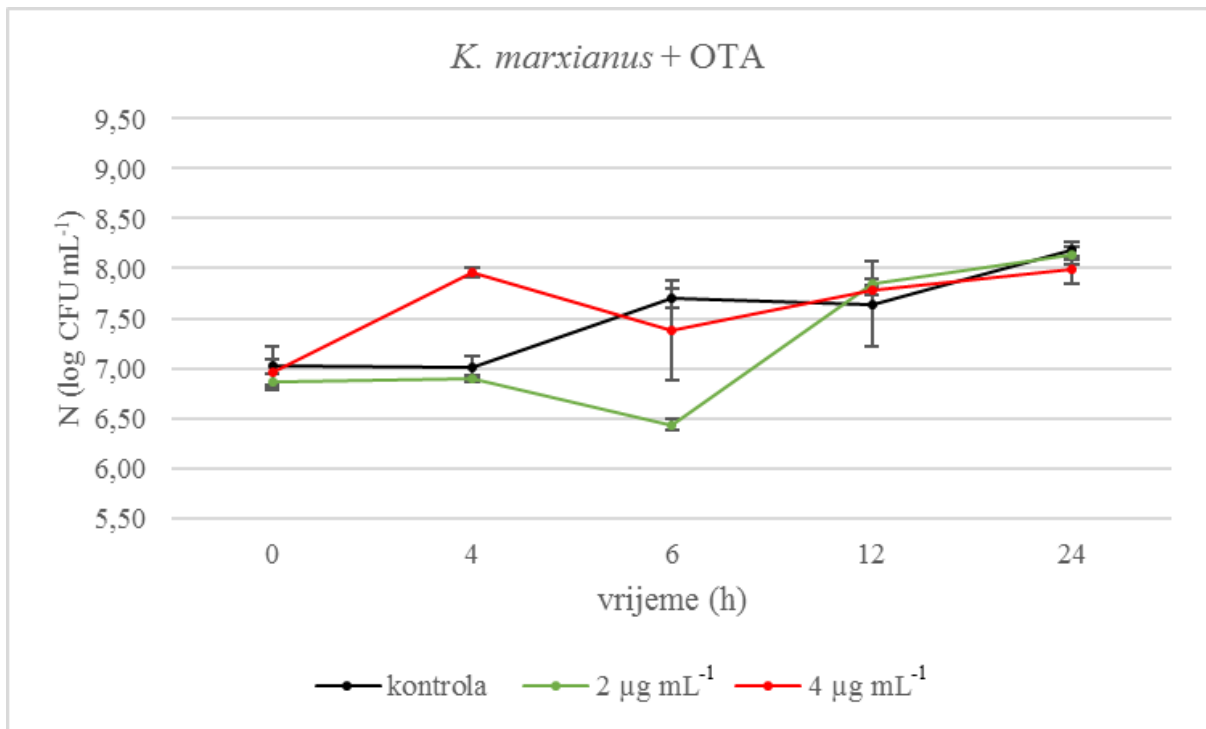
**Slika 16.** Broj živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 5 u prisutnosti 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA tijekom 24 sata uzgoja



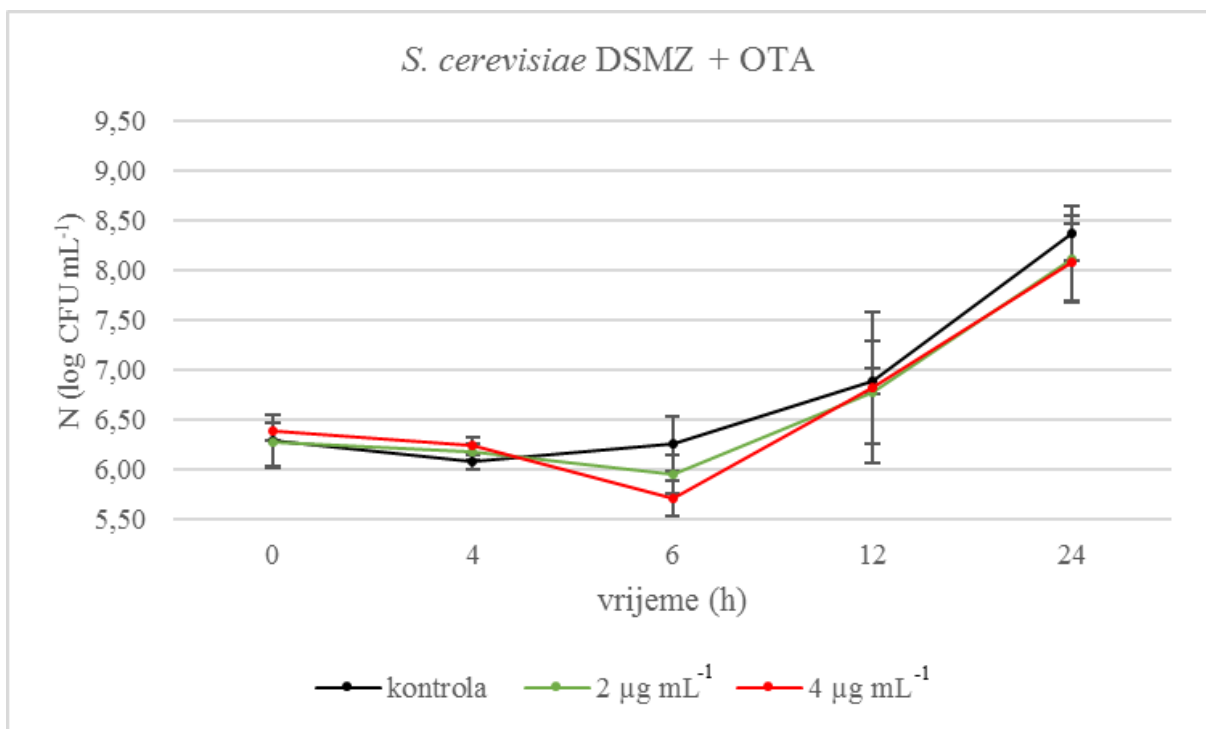
**Slika 17.** Broj živih stanica kvasca *Saccharomyces uvarum* u prisutnosti 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA tijekom 24 sata uzgoja



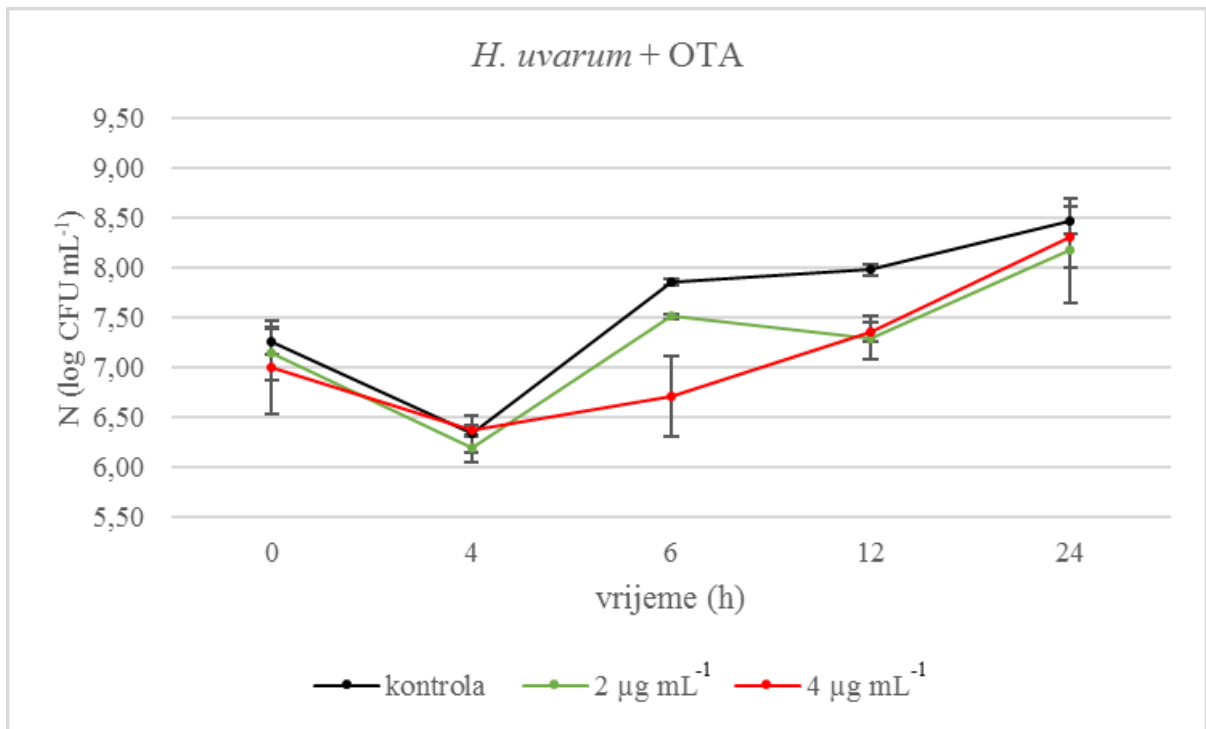
**Slika 18.** Broj živih stanica kvasca *Saccharomyces bayanus* u prisutnosti 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA tijekom 24 sata uzgoja



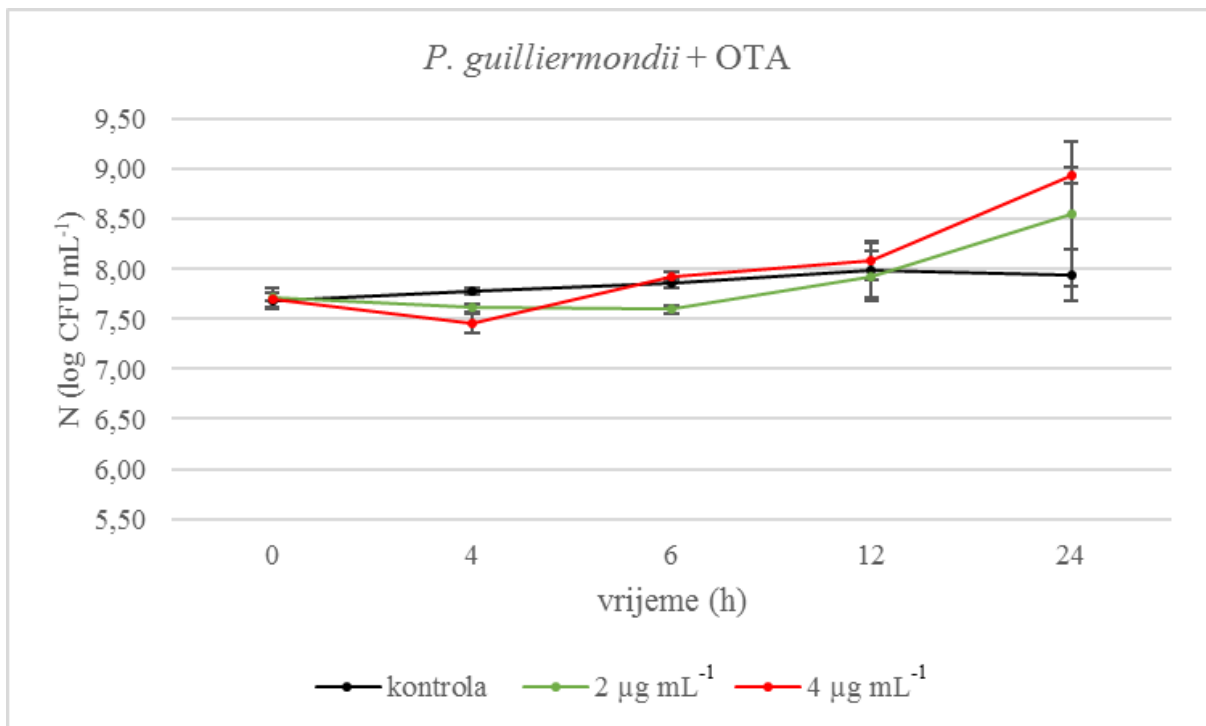
**Slika 19.** Broj živih stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* u prisutnosti 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA tijekom 24 sata uzgoja



**Slika 20.** Broj živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ u prisutnosti 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA tijekom 24 sata uzgoja



**Slika 21.** Broj živih stanica kvasca *Hanseniaspora uvarum* u prisutnosti 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA tijekom 24 sata uzgoja



**Slika 22.** Broj živih stanica kvasca *Pichia guilliermondii* u prisutnosti 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA tijekom 24 sata uzgoja

#### 4.1.3. Rezultati utjecaja OTA na fermentacijske proizvode odabranih sojeva kvasaca

Nakon 12, odnosno 24 sata inkubacije, iz uzoraka bez dodanog OTA kao i iz uzoraka s dodanim OTA pomoću UPLC metode određivane su koncentracije etanola, glicerola, mravlje i octene kiseline te preostale glukoze. Rezultati su prikazani u tablicama 8 i 9.

**Tablica 8.** Koncentracije etanola ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) nakon 12 i 24 sata uzgoja odabranih sojeva vinskih kvasaca u prisutnosti OTA

Uzorak	$\gamma$ OTA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	12 h	24 h
<i>S. cerevisiae</i> 5	0	0,840 $\pm$ 0,040	1,990 $\pm$ 0,020
	2	0,700 $\pm$ 0,030	1,961 $\pm$ 0,007
	4	0,760 $\pm$ 0,050	1,970 $\pm$ 0,010
<i>S. uvarum</i>	0	0,288 $\pm$ 0,370	1,923 $\pm$ 0,004
	2	0,620 $\pm$ 0,020	1,920 $\pm$ 0,010
	4	0,580 $\pm$ 0,010	1,920 $\pm$ 0,020
<i>S. bayanus</i>	0	4,415 $\pm$ 0,092	7,050 $\pm$ 0,028
	2	4,525 $\pm$ 0,035	7,020 $\pm$ 0,028
	4	4,375 $\pm$ 0,007	6,870 $\pm$ 0,057
<i>K. marxianus</i>	0	1,603 $\pm$ 0,007	1,952 $\pm$ 0,007
	2	1,529 $\pm$ 0,009	1,948 $\pm$ 0,008
	4	1,320 $\pm$ 0,030	1,940 $\pm$ 0,010
<i>S. cerevisiae</i> DSMZ	0	9,185 $\pm$ 0,120	6,715 $\pm$ 0,007
	2	9,210 $\pm$ 0,113	6,570 $\pm$ 0,042
	4	9,150 $\pm$ 0,042	6,275 $\pm$ 0,078
<i>H. uvarum</i>	0	1,390 $\pm$ 0,113	7,365 $\pm$ 0,134
	2	1,305 $\pm$ 0,035	7,490 $\pm$ 0,071
	4	1,205 $\pm$ 0,064	7,410 $\pm$ 0,042
<i>P. guilliermondii</i>	0	0,620 $\pm$ 0,113	2,605 $\pm$ 0,021
	2	0,430 $\pm$ 0,071	3,845 $\pm$ 0,049
	4	0,545 $\pm$ 0,064	3,295 $\pm$ 0,120

**Tablica 9.** Koncentracije glicerola, mravlje kiseline, octene kiseline i preostale glukoze u mediju ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) nakon 12 i 24 sata uzgoja odabranih sojeva vinskih kvasaca u prisutnosti OTA

Uzorak	$\gamma$ OTA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\gamma$ glicerola ( $\text{mg mL}^{-1}$ )		$\gamma$ mravlje kis. ( $\text{mg mL}^{-1}$ )		$\gamma$ octene kis. ( $\text{mg mL}^{-1}$ )		$\gamma$ glukoze ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	
		12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
<i>S. cerevisiae</i> 5	0	n.d.	0,090±0,001	n.d.	n.d.	0,062±0,005	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	0,070±0,015	n.d.	0,060±0,010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	4	n.d.	0,080±0,010	n.d.	0,080±0,020	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. uvarum</i>	0	n.d.	0,120±0,020	n.d.	0,057±0,005	n.d.	0,150±0,020	n.d.	n.d.
	2	n.d.	0,080±0,030	n.d.	0,100±0,030	n.d.	0,062±0,003	n.d.	n.d.
	4	n.d.	0,100±0,020	n.d.	0,150±0,020	n.d.	0,058±0,008	n.d.	n.d.
<i>S. bayanus</i>	0	0,020±0,001	n.d.	n.d.	n.d.	0,030±0,014	n.d.	9,545±0,021	n.d.
	2	0,030±0,001	0,002±0,002	0,025±0,007	n.d.	n.d.	n.d.	9,035±0,078	n.d.
	4	0,020±0,014	0,005±0,007	0,020±0,001	n.d.	n.d.	n.d.	9,400±0,085	0,060±0,057
<i>K. marxianus</i>	0	n.d.	0,062±0,005	n.d.	0,074±0,009	n.d.	0,090±0,01	n.d.	n.d.
	2	n.d.	0,080±0,010	n.d.	0,097±0,007	n.d.	0,057±0,008	n.d.	n.d.
	4	n.d.	0,090±0,020	n.d.	0,100±0,020	n.d.	0,083±0,009	n.d.	n.d.

n.d. – nije detektirano

**Tablica 9.** Koncentracije glicerola, mravlje kiseline, octene kiseline i preostale glukoze u mediju (mg mL<sup>-1</sup>) nakon 12 i 24 sata uzgoja odabranih sojeva vinskih kvasaca u prisutnosti OTA - nastavak

Uzorak	$\gamma$ OTA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$\gamma$ glicerola (mg mL <sup>-1</sup> )		$\gamma$ mravlje kis. (mg mL <sup>-1</sup> )		$\gamma$ octene kis. (mg mL <sup>-1</sup> )		$\gamma$ glukoze (mg mL <sup>-1</sup> )	
		12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
<i>S. cerevisiae</i> DSMZ	0	0,065±0,007	n.d.	0,585±0,007	0,210±0,014	0,115±0,007	0,425±0,007	n.d.	0,115±0,021
	2	0,065±0,007	n.d.	0,095±0,007	0,310±0,042	0,590±0,001	0,200±0,042	n.d.	n.d.
	4	0,041±0,027	n.d.	0,125±0,007	0,245±0,049	0,575±0,007	0,230±0,042	n.d.	0,025±0,035
<i>H. uvarum</i>	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,105±0,007	16,67±0,127	0,045±0,021
	2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,25±0,064	0,050±0,014
	4	n.d.	n.d.	n.d.	0,085±0,035	n.d.	n.d.	16,79±0,071	0,065±0,007
<i>P. guilliermondii</i>	0	n.d.	0,005±0,007	n.d.	n.d.	0,100±0,001	n.d.	17,20±0,198	8,145±0,502
	2	n.d.	0,030±0,028	0,090±0,014	0,015±0,021	n.d.	n.d.	16,95±0,240	5,890±0,127
	4	n.d.	0,025±0,007	0,055±0,007	0,860±0,416	n.d.	n.d.	17,16±0,283	6,050±0,113

n.d. – nije detektirano



## 4.2. Rezultati utjecaja OTA na parametre oksidativnog stresa vinskih kvasaca

Rezultati određivanja koncentracija glutationa (GSH) i malondialdehida (MDA) u stanicama odabranih vinskih kvasaca tijekom 24 sata uzgoja pri 28 °C u prisutnosti OTA u koncentracijama 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prikazani su u tablicama 10 i 11. Koncentracije GSH i MDA u stanicama kvasca određene su u 12. i 24. satu inkubacije spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije uzoraka bez i s dodanim OTA.

### 4.2.1. Rezultati utjecaja OTA na koncentraciju GSH

Koncentracije GSH izračunate su nakon mjerenja apsorbancija u uzorcima na spektrofotometru pri valnoj duljini 412 nm. Rezultati su prikazani u tablici 10.

**Tablica 10.** Koncentracije GSH nakon 12 i 24 sata uzgoja u prisutnosti dviju koncentracija OTA

Uzorak	$\gamma$ OTA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	koncentracija GSH ( $\mu\text{M}$ )	
		12 h	24 h
<i>S. cerevisiae</i> 5	0	12,23 $\pm$ 0,35	12,76 $\pm$ 0,18
	2	13,92 $\pm$ 0,21	14,59 $\pm$ 0,11
	4	15,37 $\pm$ 0,39	13,39 $\pm$ 0,18
<i>S. uvarum</i>	0	12,49 $\pm$ 0,08	12,90 $\pm$ 0,04
	2	14,03 $\pm$ 0,74	13,99 $\pm$ 0,57
	4	14,91 $\pm$ 0,64	15,23 $\pm$ 0,88
<i>S. bayanus</i>	0	11,98 $\pm$ 0,04	12,26 $\pm$ 0,11
	2	16,15 $\pm$ 0,11	14,84 $\pm$ 0,28
	4	13,36 $\pm$ 0,00	15,41 $\pm$ 1,30
<i>K. marxianus</i>	0	11,84 $\pm$ 0,04	11,98 $\pm$ 0,04
	2	15,19 $\pm$ 0,14	13,60 $\pm$ 0,46
	4	14,10 $\pm$ 0,11	13,57 $\pm$ 0,14
<i>S. cerevisiae</i> DSMZ	0	11,77 $\pm$ 0,04	12,47 $\pm$ 0,18
	2	14,66 $\pm$ 0,18	14,01 $\pm$ 0,04
	4	14,52 $\pm$ 0,11	16,01 $\pm$ 0,04
<i>H. uvarum</i>	0	12,05 $\pm$ 0,04	12,69 $\pm$ 0,04
	2	16,43 $\pm$ 0,32	16,54 $\pm$ 0,64
	4	14,31 $\pm$ 0,04	13,78 $\pm$ 0,07
<i>P. guilliermondii</i>	0	12,12 $\pm$ 0,04	12,83 $\pm$ 0,04
	2	13,57 $\pm$ 0,71	15,65 $\pm$ 0,18
	4	13,99 $\pm$ 0,07	15,41 $\pm$ 0,05

#### 4.2.2. Rezultati utjecaja OTA na koncentraciju MDA

U tablici 11 prikazane su koncentracije MDA izračunate nakon mjerenja apsorbancija u uzorcima na spektrofotometru pri valnoj duljini 532 nm.

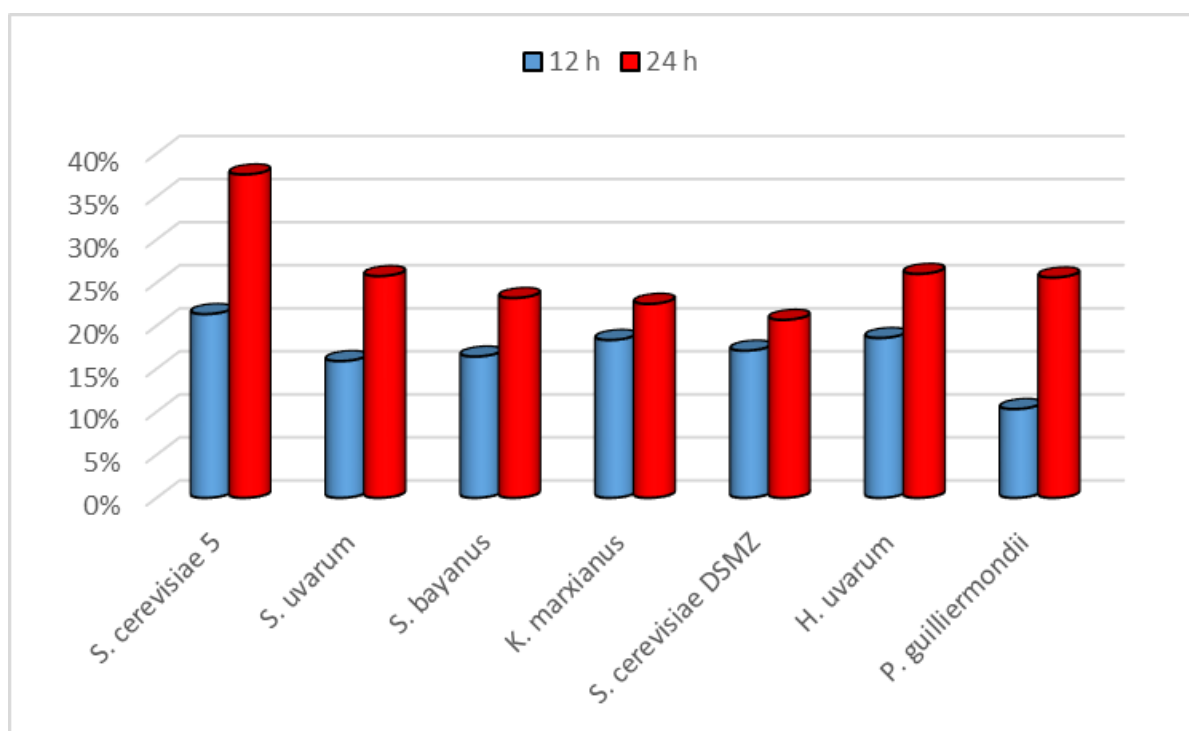
**Tablica 11.** Koncentracije MDA nakon 12 i 24 sata uzgoja u prisutnosti dviju koncentracija OTA

Uzorak	$\gamma$ OTA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	koncentracija MDA ( $\mu\text{M}$ )	
		12 h	24 h
<i>S. cerevisiae</i> 5	0	0,92 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,06
	2	1,13 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,01
	4	1,00 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,01
<i>S. uvarum</i>	0	0,92 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,01
	2	1,14 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,04
	4	0,92 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,04
<i>S. bayanus</i>	0	0,92 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,07
	2	0,83 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,03
	4	0,88 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,01
<i>K. marxianus</i>	0	0,92 $\pm$ 0,00	0,78 $\pm$ 0,01
	2	0,97 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,01
	4	1,05 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,07
<i>S. cerevisiae</i> DSMZ	0	0,92 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,07
	2	0,97 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,07
	4	1,13 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,04
<i>H. uvarum</i>	0	0,93 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,01
	2	0,83 $\pm$ 0,00	1,09 $\pm$ 0,02
	4	1,07 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,04
<i>P. guilliermondii</i>	0	0,92 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,08
	2	0,73 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,06
	4	1,01 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,03

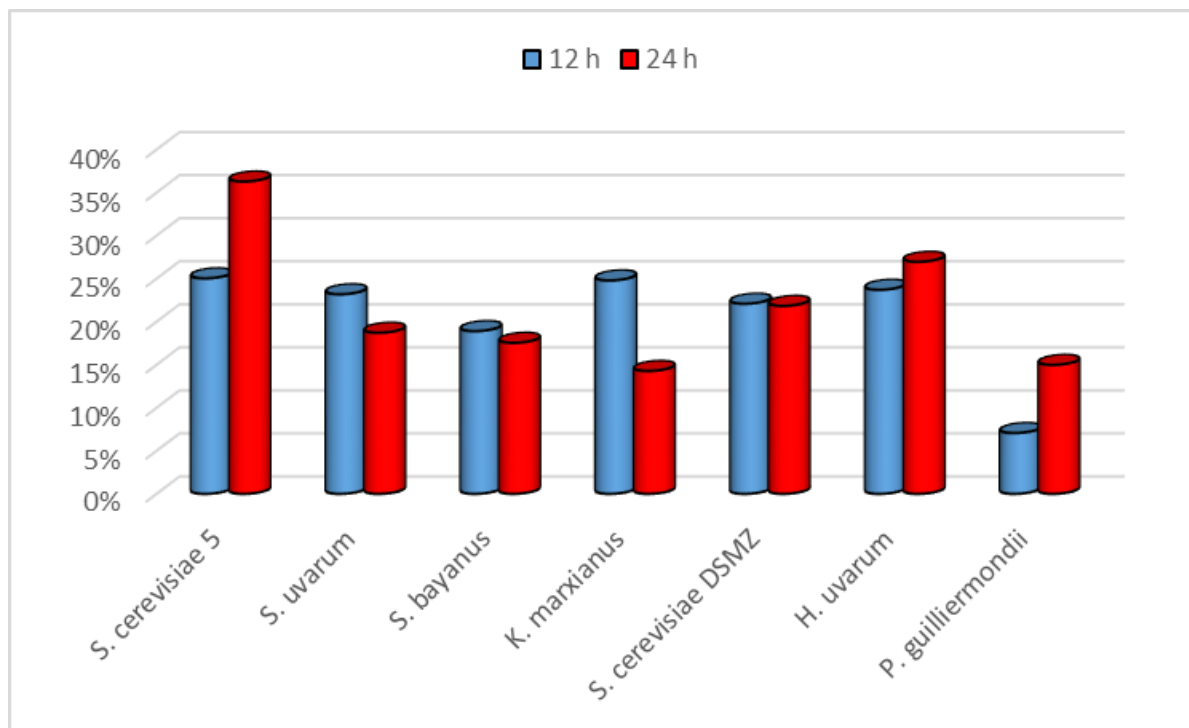
### 4.3. Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasaca na koncentraciju i biorazgradnju OTA u *in vitro* uvjetima

#### 4.3.1. Rezultati uklanjanja OTA iz medija pomoću odabranih sojeva vinskih kvasaca

Kako bi se istražila sposobnost odabranih sojeva vinskih kvasaca da vežu/uklanjaju OTA iz medija nakon 12 odnosno 24 sata uzgoja, uzimani su uzorci bez i s dodanim OTA te je pomoću HPLC-MS/MS metode određena koncentracija preostalog OTA u mediju. Rezultati su izraženi kao % vezanja OTA, a prikazani su na slikama 23 i 24.



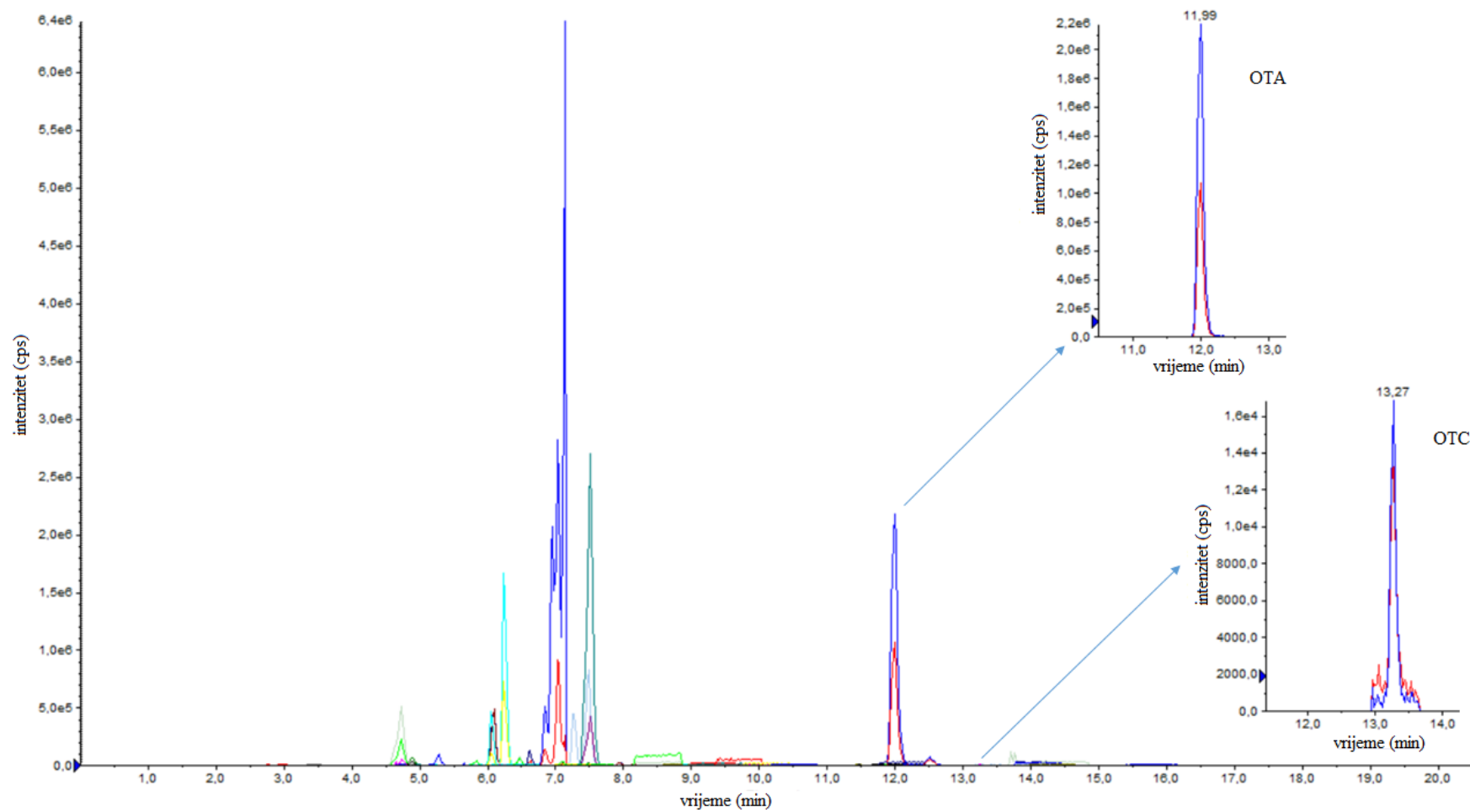
**Slika 23.** Postotak vezanja OTA (koncentracije  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) s odabranim sojevima vinskih kvasaca nakon 12 i 24 sata inkubacije



**Slika 24.** Postotak vezanja OTA (koncentracije  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) s odabranim sojevima vinskih kvasaca nakon 12 i 24 sata

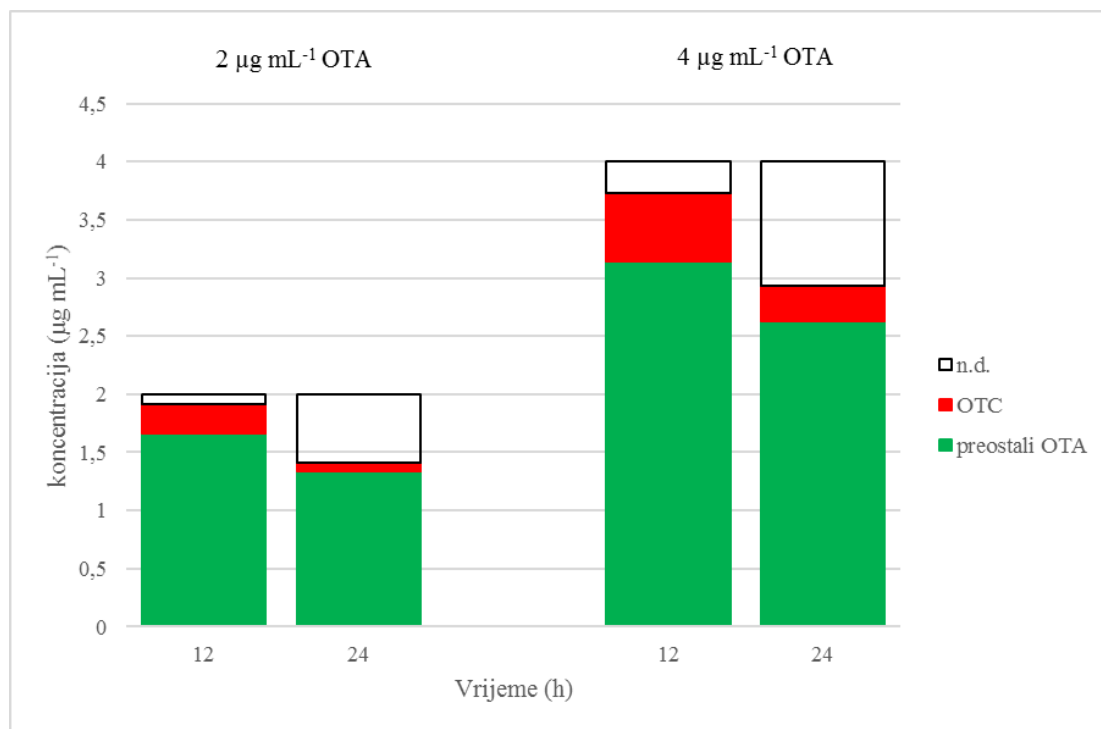
#### **4.3.2. Rezultati utjecaja odabranih sojeva vinskih kvasaca na biorazgradnju OTA**

Dokazivanje biorazgradnih produkata OTA provedeno je multimikotoksinskom UHPLC-MS/MS analizom (slika 25). Kao produkt biorazgradnje OTA odabranim sojevima vinskih kvasaca detektiran je samo OTC, dok ostali potencijalni produkti razgradnje OTA nisu detektirani, odnosno, njihova koncentracija je ispod limita detekcije.



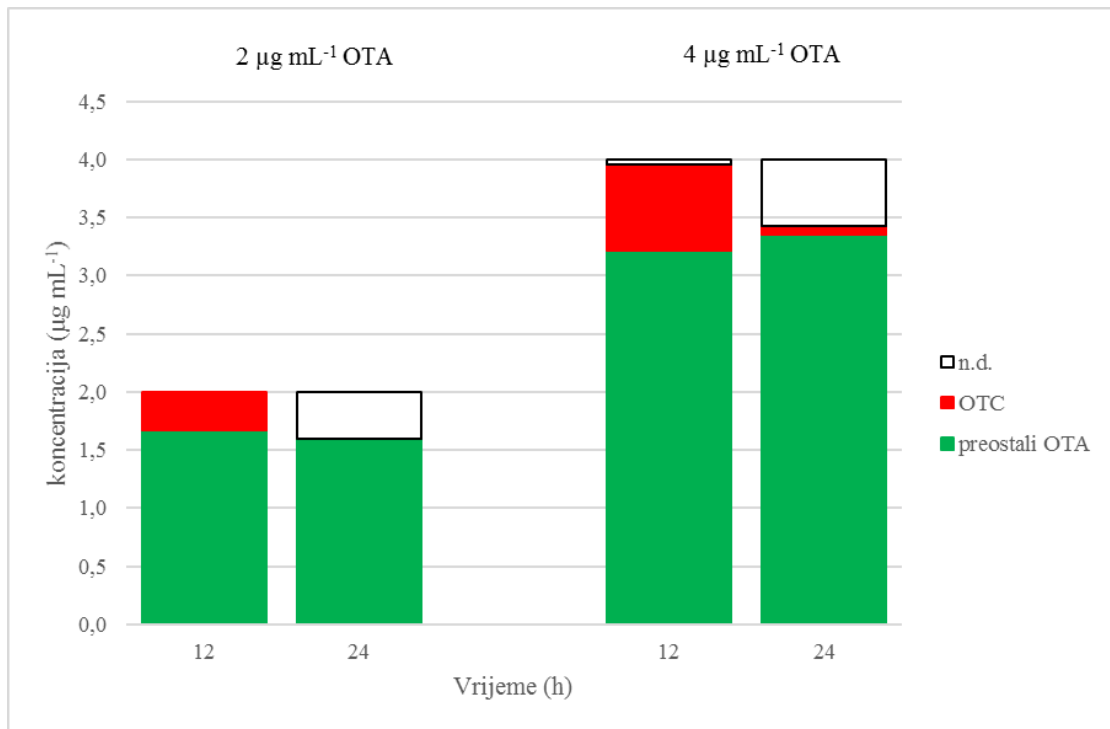
**Slika 25.** Primjer UHPLC-MS/MS kromatograma tijekom određivanja koncentracije OTA i njegovih biorazgradnih produkata

Rezultati utjecaja kvasaca na sposobnost biorazgradnje OTA prikazani su na slikama 26 – 32 kao usporedbe koncentracija nastalog biorazgradnog produkta (OTC), preostalog OTA i koncentracije ne definiranih spojeva.



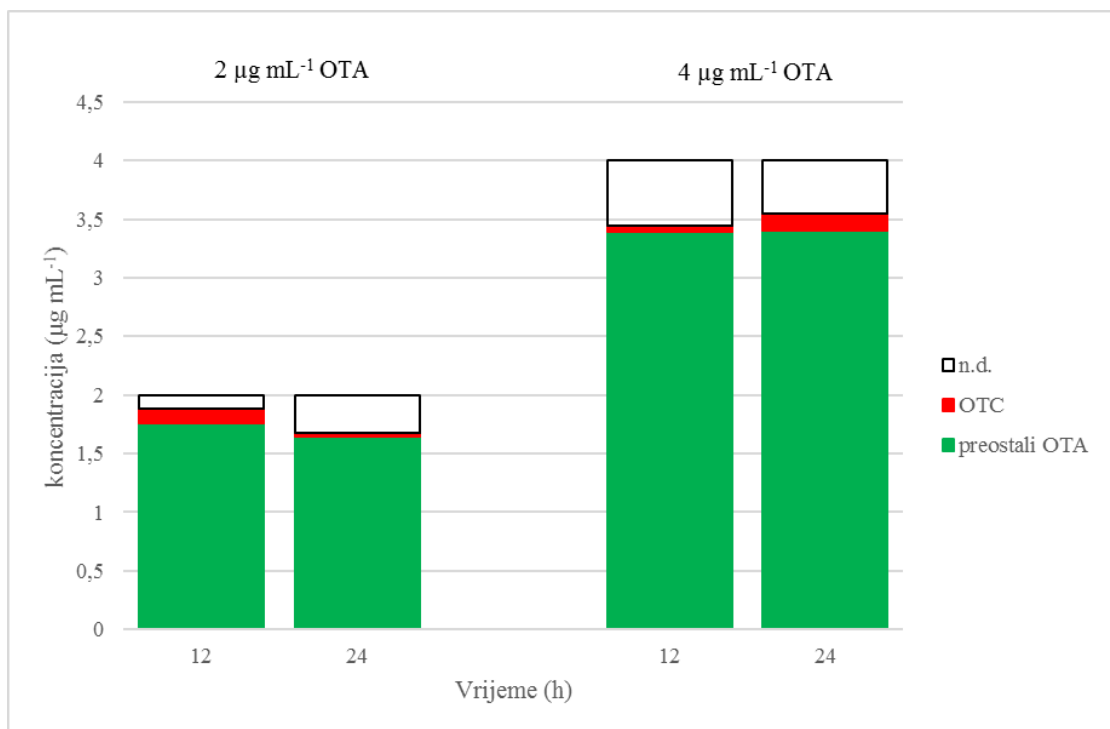
n.d. – nije definirano

**Slika 26.** Usporedni prikaz koncentracija biorazgradnog produkta OTC i preostalog OTA u prisutnosti kvasca *S. cerevisiae* 5



n.d. – nije definirano

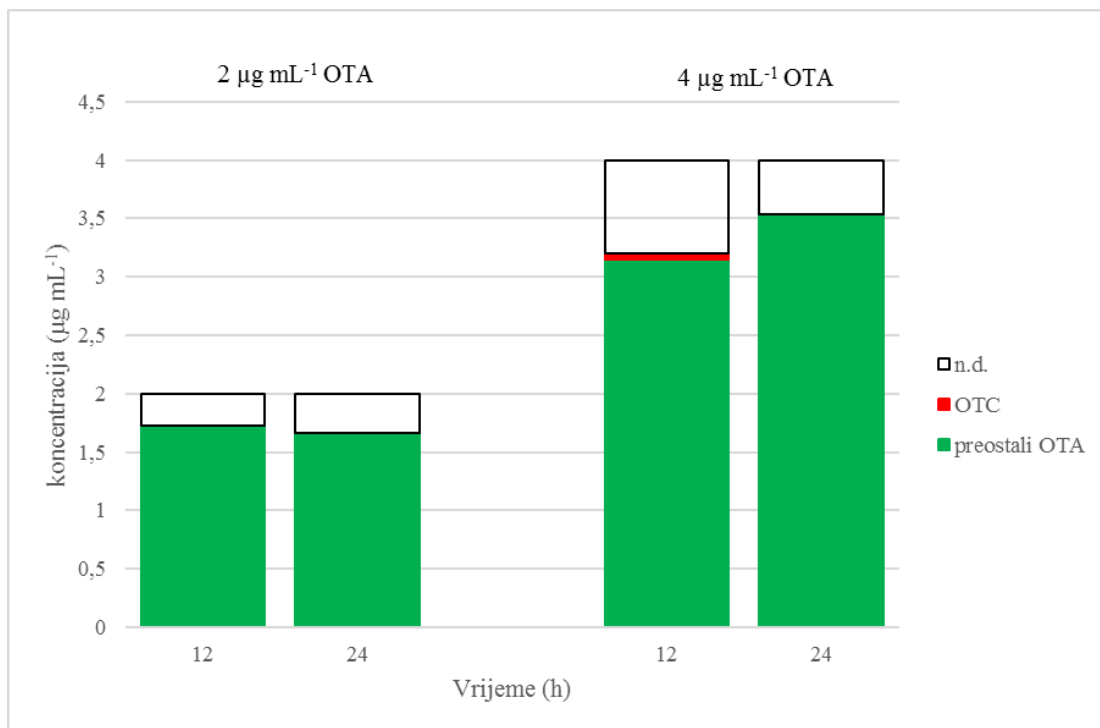
**Slika 27.** Usporedni prikaz koncentracija biorazgradnog produkta OTC i preostalog OTA u prisutnosti kvasca *S. uvarum*



n.d. – nije definirano

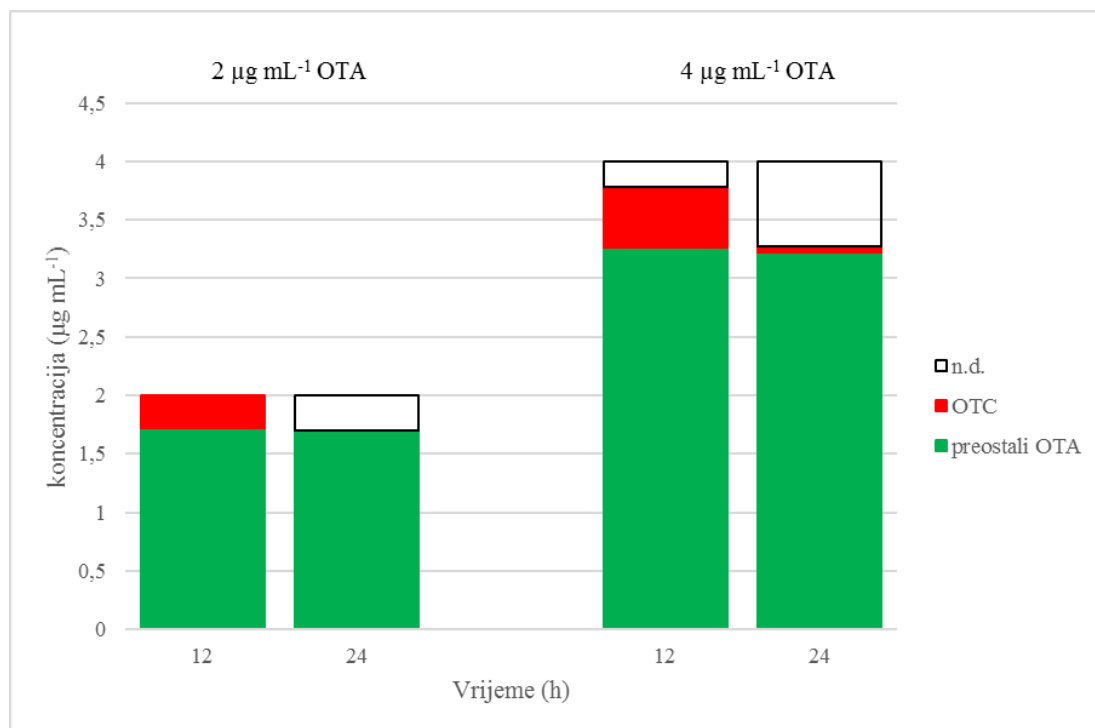
**Slika 28.** Usporedni prikaz koncentracija biorazgradnog produkta OTC i preostalog OTA u prisutnosti kvasca *S. bayanus*





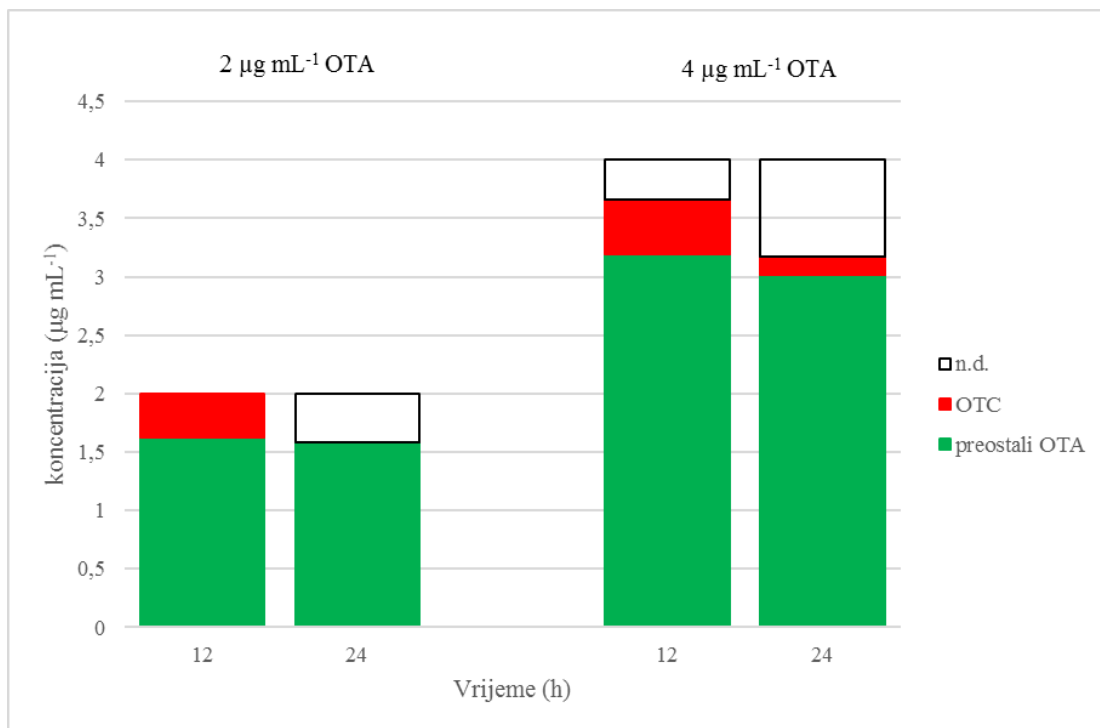
n.d. – nije definirano

**Slika 29.** Usporedni prikaz koncentracija biorazgradnog produkta OTC i preostalog OTA u prisutnosti kvasca *K. marxianus*



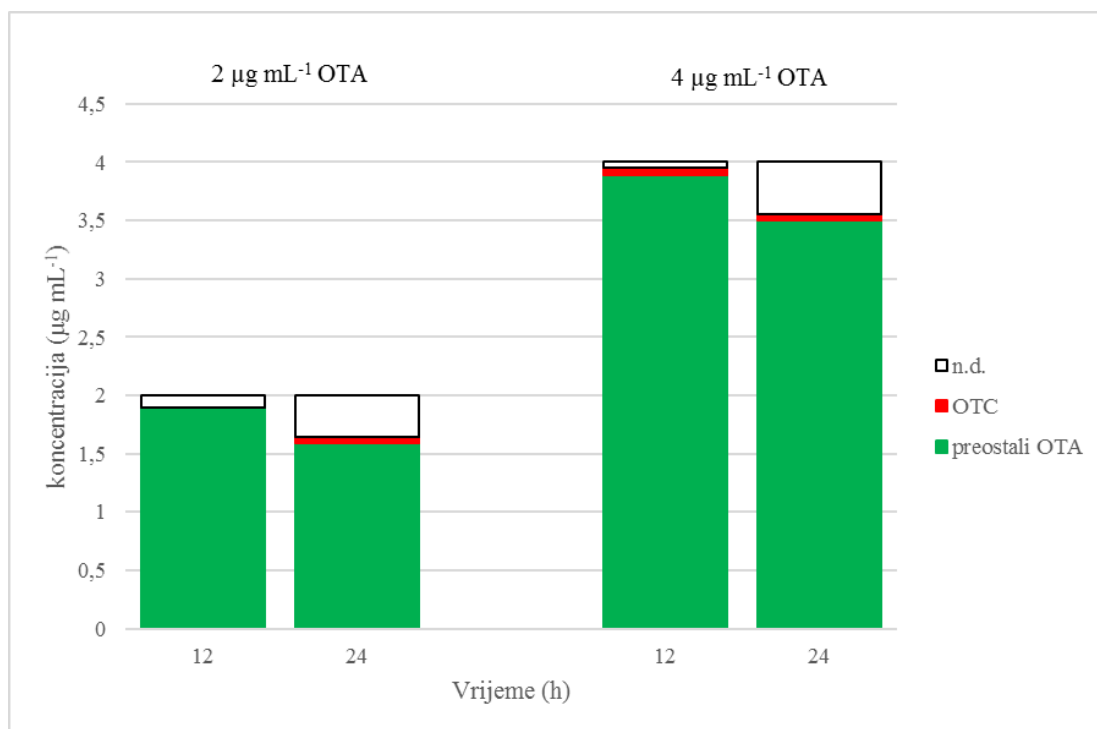
n.d. – nije definirano

**Slika 30.** Usporedni prikaz koncentracija biorazgradnog produkta OTC i preostalog OTA u prisutnosti kvasca *S. cerevisiae* DSMZ



n.d. – nije definirano

**Slika 31.** Usporedni prikaz koncentracija biorazgradnog produkta OTC i preostalog OTA u prisutnosti kvasca *H. uvarum*



n.d. – nije definirano

**Slika 32.** Usporedni prikaz koncentracija biorazgradnog produkta OTC i preostalog OTA u prisutnosti kvasca *P. guilliermondii*

### **4.3.3. Rezultati citotoksičnosti biorazgradnih produkata OTA na Pk15 stanicama**

Nakon provedenih pokusa ispitivanja citotoksičnosti razgradnih produkata OTA koji nastaju djelovanjem kvasaca, utvrđeno je kako nema razlike u vijabilnosti stanica za ispitivane koncentracije razgradnih produkata (podaci nisu prikazani). Također, ustanovljeno je da OTA u koncentracijama  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  odnosno  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  ne utječe na vijabilnost Pk15 stanica.

## **4.4. Statistička obrada**

Svi pokusi provedeni su u triplikatu. Prije statističke obrade rezultati istraživanja su uređeni u programu Microsoft Office Excel 2016, a tijekom statističke obrade podataka korišteni su programi STATISTICA v. 13.0 za kreiranje neuronskih mreža te Design-Expert v. 13.0. za kreiranje odzivnih površina s ciljem optimiranja procesa.

### **4.4.1. Rezultati predviđanja neuronskih mreža**

Kao dobar alat za obradu i predviđanje podataka kod kojih postoji složena (nelinearna) veza između ulaza i izlaza koriste se umjetne neuronske mreže (eng. ANN – *Artificial Neural Network*). Upotreba neuronskih mreža zahtjeva sljedeće korake:

- treniranje (učenje) mreže gdje je potrebno definirati ulazne i izlazne podatke, odrediti aktivacijsku funkciju, težinske koeficijente i slično
- testiranje mreže na nekim novim podacima kako bismo dobili izlazni podatak i
- validacija (ocjenjivanje) mreže izračunavanjem greške i usporedbom izlaza mreže stvarnim izlazima tj. eksperimentalnim rezultatima.

Rezultati analiza su prikazani u tablicama 12 – 18 i na slici 33.

Kako bi se dobila predikcija pomoću umjetnih neuronskih mreža eksperimentalni podaci su podijeljeni u tri programski nasumično izabrane skupine i to u omjeru 60:20:20 gdje je 60 % nasumično izabranih podataka korišteno za treniranje, 20 % za testiranje i 20 % za validaciju ANN. Ulazni parametri ANN bili su vrijeme uzgoja, vrsta kvasca i koncentracija OTA dok su veličina stanica,  $\log \text{CFU mL}^{-1}$  i koncentracija etanola bili izlazni parametri. Prilikom razvoja ANN korišten je jedan skriveni sloj u kojem je broj neurona bio postavljen od 3 do 11. Najbolje neuronske mreže izabrane su na temelju najviše  $R^2$  vrijednosti i najniže RMSE pogreške za treniranje, testiranje i validaciju. U tablici 12 prikazana je ANN za predikciju eksperimentalnih podataka s tri ulaza (vrijeme uzgoja, vrsta kvasca i koncentracija OTA) i tri izlazna (veličina

stanica, log CFU mL<sup>-1</sup> i koncentracija etanola) parametra. Kako je vidljivo iz arhitekture mreže prvi broj 3 označava broj ulaznih varijabli, zadnji broj 3 označava broj izlaznih varijabli, a središnji broj 10 označava koliko je neurona bilo u skrivenom sloju. Na temelju dobivenih R<sup>2</sup> vrijednosti za treniranje, testiranje i validaciju dobiveni model spada u skupinu dobrih modela, budući da su kriteriji za ocjenjivanje izvedbe modela sljedeći: R<sup>2</sup> vrijednosti ispod 0,7 ukazuju na to da model može razlikovati samo niske-srednje-visoke vrijednosti; R<sup>2</sup> vrijednosti između 0,7 i 0,9 ukazuju na to da se modeli mogu smatrati točnim; dok R<sup>2</sup> vrijednosti iznad 0,9 označuju dobar model (Liu i sur., 2011).

**Tablica 12.** Neuronska mreža za predikciju eksperimentalnih podataka s tri ulazna (vrijeme uzgoja, vrsta kvasca i koncentracija OTA) i tri izlazna (veličina stanice, log CFU mL<sup>-1</sup> i koncentracija etanola) parametra

Arhit. mreže	R <sup>2</sup> tren.	R <sup>2</sup> test.	R <sup>2</sup> valid.	Pogr. tren.	Pogr. test.	Pogr. valid.	Skrivena aktivacija	Izlazna aktivacija
3-10-3	0,9348	0,9343	0,8766	0,0115	0,0111	0,0232	Tanh	Logistic

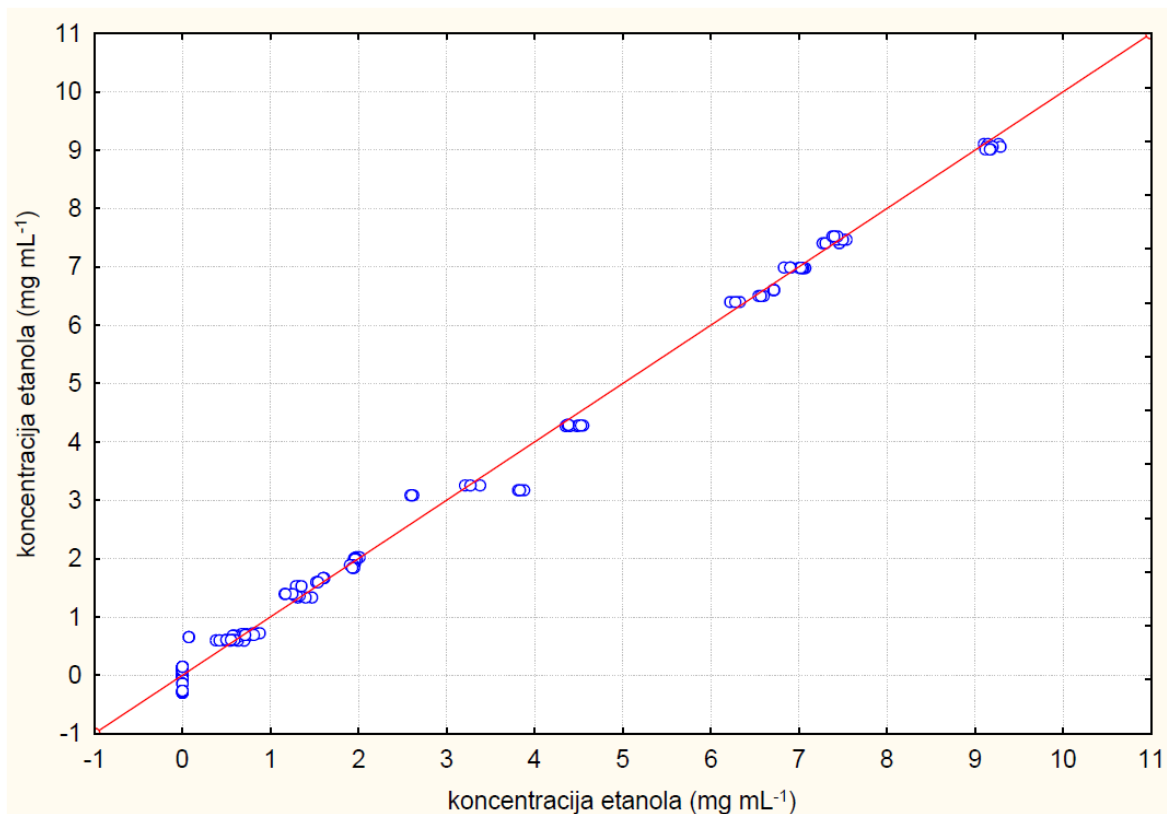
**Tablica 13.** R<sup>2</sup> vrijednosti za treniranje, testiranje i validaciju pojedinog izlaznog parametra

Parametar	R <sup>2</sup> tren.	R <sup>2</sup> test.	R <sup>2</sup> valid.
veličina stanica	0,9252	0,9178	0,8016
log CFU mL <sup>-1</sup>	0,8993	0,9097	0,8539
koncentracija etanola	0,9798	0,9754	0,9741

Kako bi se bolje vidjela predviđanja ANN pojedinih izlaznih parametara u tablici 13 su prikazane R<sup>2</sup> vrijednosti za treniranje, testiranje i validaciju svakog pojedinog izlaznog parametra. U tablici 14 su prikazane dobivene predikcije umjetnih neuronskih mreža s 3 ulaza i po jednim izlazom (ANN 1 – veličina stanica; ANN 2 – broj stanica; ANN 3 – koncentracija etanola).

**Tablica 14.** Neuronska mreža za predikciju eksperimentalnih podataka s tri ulazna i po jednim izlaznim parametrom (veličina stanica – ANN 1, log CFU mL<sup>-1</sup> – ANN 2 i koncentracija etanola – ANN 3)

Broj mreže	Arhit. mreže	R <sup>2</sup> tren.	R <sup>2</sup> test.	R <sup>2</sup> valid.	Pogr. tren.	Pogr. test.	Pogr. valid.	Skrivena aktivacija	Izlazna aktivacija
ANN 1	3-8-1	0,9079	0,8844	0,8256	0,0045	0,0054	0,0114	Logistic	Tanh
ANN 2	3-6-1	0,8831	0,8791	0,8592	0,0047	0,0043	0,0059	Tanh	Tanh
ANN 3	3-8-1	0,9987	0,9986	0,9971	0,0001	0,0002	0,0003	Tanh	Identity



**Slika 33.** Prikaz i predviđanja neuronske mreže na temelju izmjenjenih podataka za koncentraciju etanola

S obzirom na to da je jedan o ciljeva doktorskog rada bio ispitati utjecaj OTA na pojavu parametara oksidativnog stresa kod kvasaca, izmjerene koncentracije GSH i MDA korištene su kao izlazni parametri, a vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA kao ulazni parametri. Kako bi se dobila predikcija pomoću ANN, podaci su također podijeljeni u tri nasumične skupine (60:20:20), a prilikom razvoja ANN korišten je jedan skriveni sloj u kojem je broj neurona bio postavljen od 3 do 11. Najbolje neuronske mreže izabrane su na temelju najviše  $R^2$  vrijednosti i najniže RMSE pogreške za treniranje, testiranje i validaciju, a tablica 15 prikazuje takvu ANN.

**Tablica 15.** Neuronska mreža za predikciju eksperimentalnih podataka s tri ulazna (vrijeme uzgoja, vrsta kvasca i koncentracija OTA) i dva izlazna (konc. GSH i MDA) parametra

Arhit. mreže	$R^2$ tren.	$R^2$ test.	$R^2$ valid.	Pogr. tren.	Pogr. test.	Pogr. valid.	Skrivena aktivacija	Izlazna aktivacija
3-10-2	0,9209	0,9049	0,8863	0,0097	0,0126	0,0177	Tanh	Logisitc

**Tablica 16.**  $R^2$  vrijednosti za treniranje testiranje, i validaciju svakog pojedinog izlaznog parametra (koncentracije GSH, odnosno koncentracije MDA)

Parametar	$R^2$ tren.	$R^2$ test.	$R^2$ valid.
koncentracija GSH	0,9092	0,8849	0,8871
koncentracija MDA	0,9328	0,9249	0,8856

Izmjerena koncentracija OTA, odnosno koncentracija OTC, su eksperimentalni podaci koji su korišteni za određivanje vezanja i razgradnje OTA te su prilikom formiranja ANN korišteni kao izlazni parametri, dok su ulazni parametri bili vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA. Tako je dobivena predikcija neuronskih mreža, a podaci su kao i u prethodnom slučaju podijeljeni u tri nasumične skupine (60:20:20). Prilikom razvoja ANN korišten je jedan skriveni sloj u kojem je broj neurona bio postavljen od 3 do 11.

**Tablica 17.** Neuronska mreža za predikciju eksperimentalnih podataka s tri ulazna (vrijeme uzgoja, vrsta kvasca i koncentracija OTA) i dva izlazna (konc. OTA i OTC) parametra

Arhit. mreže	$R^2$ tren.	$R^2$ test.	$R^2$ valid.	Pogr. tren.	Pogr. test.	Pogr. valid.	Skrivena aktivacija	Izlazna aktivacija
3-10-2	0,9516	0,9512	0,9420	0,0075	0,0058	0,0088	Tanh	Identity

**Tablica 18.**  $R^2$  vrijednosti za treniranje, testiranje i validaciju svakog pojedinog izlaznog parametra (koncentracije OTA, odnosno koncentracije OTC)

Parametar	$R^2$ tren.	$R^2$ test.	$R^2$ valid.
koncentracija OTA	0,9641	0,9947	0,9705
koncentracija OTC	0,9393	0,9077	0,9135

#### 4.4.2. Rezultati metodologije odzivne površine (RSM)

Metoda odzivnih površina je skup matematičkih i statističkih metoda koje se temelje na aproksimaciji eksperimentalnih podataka te optimiranju ulaznih varijabli kako bi se dobile što bolje vrijednosti izlaznih varijabli tj. rezultata istraživanja. U ovom istraživanju je analiziran utjecaj nezavisnih varijabli: vrsta kvasca ( $X_1$ ), vrijeme uzgoja ( $X_2$ ), i koncentracije OTA ( $X_3$ ) na veličinu stanica kvasaca, broj živih stanica, koncentraciju proizvedenog etanola, koncentracije GSH i MDA, koncentraciju preostalog OTA i koncentraciju OTC. Utjecaj ispitivanih nezavisnih varijabli na zavisne varijable opisan je polinomom drugog stupnja (formula 5):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i * X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} * X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} * X_i * X_j \quad (5)$$

gdje  $Y$  predstavlja zavisnu varijablu,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  i  $\beta_{ij}$ , su regresijski koeficijenti za slobodan, linearan, kvadratni i interakcijski član.

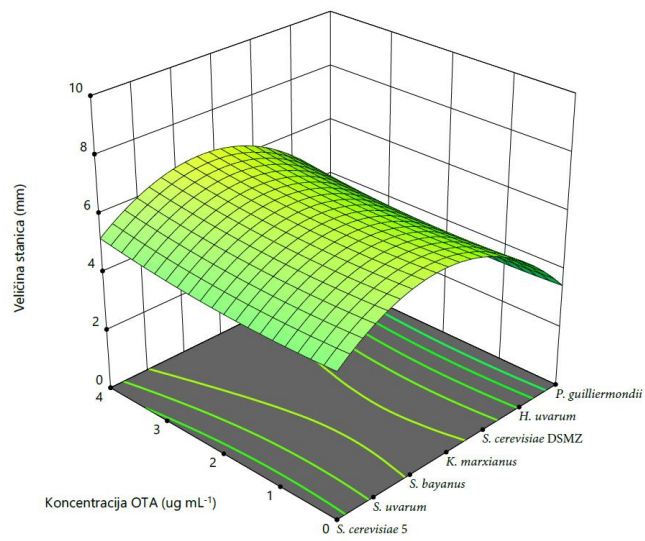
Rezultati su prikazani u tablici 19 te na slikama 34 – 39.



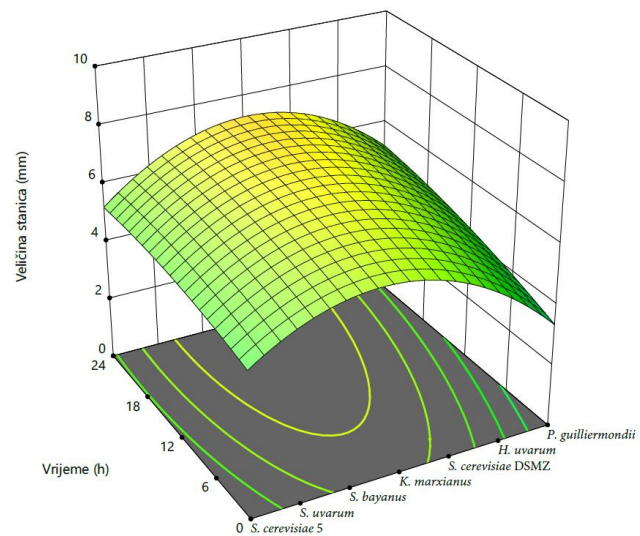
**Tablica 19.** Modeli odzivnih površina za opis veličine stanica ( $Y_1$ ), broj živih stanica kvasaca ( $Y_2$ ), koncentraciju proizvedenog etanola ( $Y_3$ ), koncentraciju preostalog OTA ( $Y_4$ ), koncentraciju OTC ( $Y_5$ ), koncentracije GSH ( $Y_6$ ) i MDA ( $Y_7$ ). Član  $X_1$  je vezan uz vrstu kvasca,  $X_2$  uz vrijeme uzgoja, a  $X_3$  uz koncentraciju dodanog OTA.

Modeli odzivnih površina za opis veličine stanica ( $Y_1$ ), broj živih stanica kvasaca ( $Y_2$ ), koncentraciju proizvedenog etanola ( $Y_3$ ), koncentraciju preostalog OTA ( $Y_4$ ), koncentraciju OTC ( $Y_5$ ), koncentracije GSH ( $Y_6$ ) i MDA ( $Y_7$ )	$R^2$
$Y_1 = 7,000 - \mathbf{0,350} * X_1 + \mathbf{0,490} * X_2 - 0,020 * X_3 - \mathbf{2,070} * X_1^2 - 0,240 * X_2^2 + 0,230 * X_3^2 + \mathbf{0,320} * X_1 * X_2 - 0,027 * X_1 * X_3 - 0,210 * X_2 * X_3$	0,4272
$Y_2 = 7,140 - \mathbf{0,098} * X_1 + \mathbf{0,718} * X_2 + 0,015 * X_3 + \mathbf{0,784} * X_1^2 + 0,045 * X_2^2 + \mathbf{0,129} * X_3^2 - 0,055 * X_1 * X_2 - 0,057 * X_1 * X_3 + 0,021 * X_2 * X_3$	0,5998
$Y_3 = 3,632 + \mathbf{0,713} * X_1 + \mathbf{2,143} * X_2 - 0,007 * X_3 - \mathbf{2,232} * X_1^2 - 0,456 * X_2^2 - 0,062 * X_3^2 + \mathbf{0,768} * X_1 * X_2 + 0,018 * X_1 * X_3 + 0,004 * X_2 * X_3$	0,5345
$Y_4 = 1,780 + 0,076 * X_1 - 0,170 * X_2 + \mathbf{1,570} * X_3 - 0,066 * X_1^2 - 0,003 * X_1 * X_2 + 0,130 * X_1 * X_3 + 0,080 * X_2 * X_3$	0,9224
$Y_5 = 0,165 - 0,075 * X_1 - \mathbf{0,172} * X_2 + \mathbf{0,188} * X_3 + 0,064 * X_1^2 + 0,082 * X_1 * X_2 - \mathbf{0,102} * X_1 * X_3 - 0,096 * X_2 * X_3$	0,5776
$Y_6 = 14,643 - 0,118 * X_1 + 0,238 * X_2 + \mathbf{1,150} * X_3 + 0,097 * X_1^2 - \mathbf{1,388} * X_3^2 + \mathbf{0,521} * X_1 * X_2 + 0,026 * X_1 * X_3 - 0,085 * X_2 * X_3$	0,6711
$Y_7 = 0,938 - 0,038 * X_1 - \mathbf{0,064} * X_2 + 0,044 * X_3 + 0,032 * X_1^2 + 0,008 * X_3^2 + 0,033 * X_1 * X_2 + 0,002 * X_1 * X_3 + 0,017 * X_2 * X_3$	0,2613

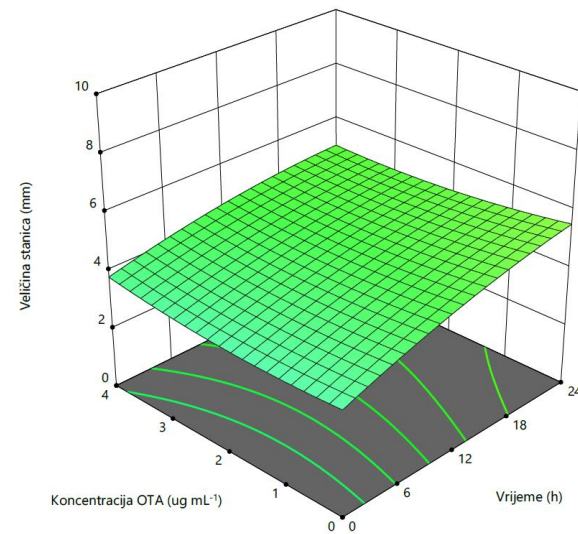
Signifikantni koeficijenti modela odzivnih površina označeni su podebljano u tablici 19.



a)

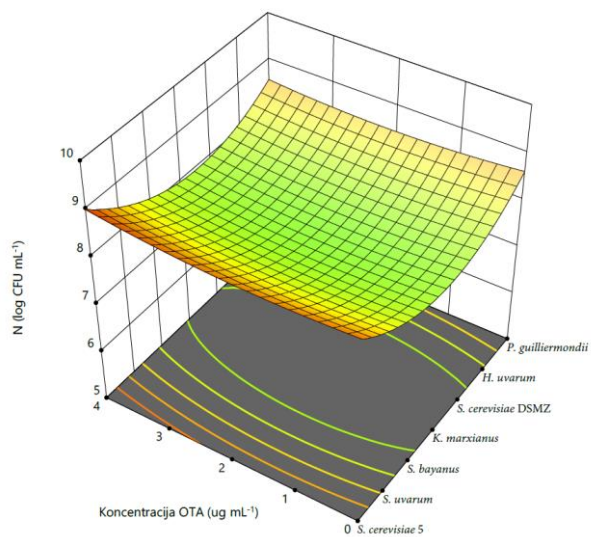


b)

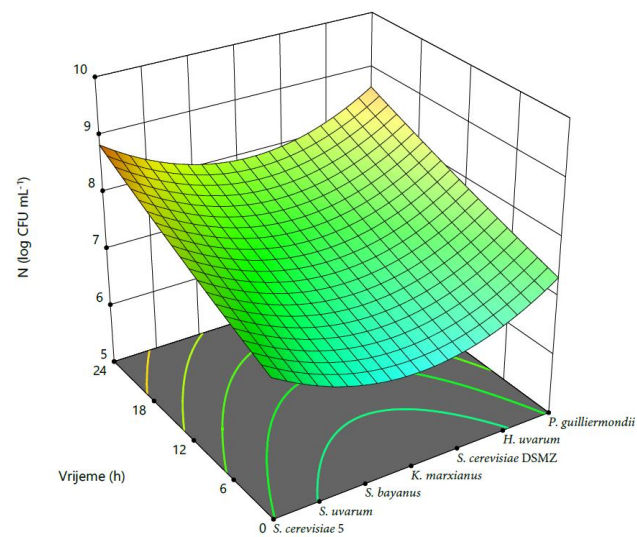


c)

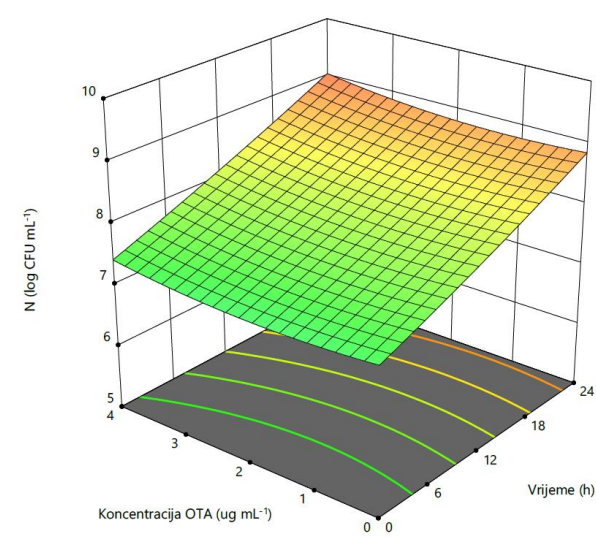
**Slika 34.** Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za veličinu stanica kvasca u ovisnosti o: (a) koncentraciji OTA i vrsti kvasca; (b) vremenu uzgoja i vrsti kvasca; (c) koncentraciji OTA i vremenu uzgoja



a)

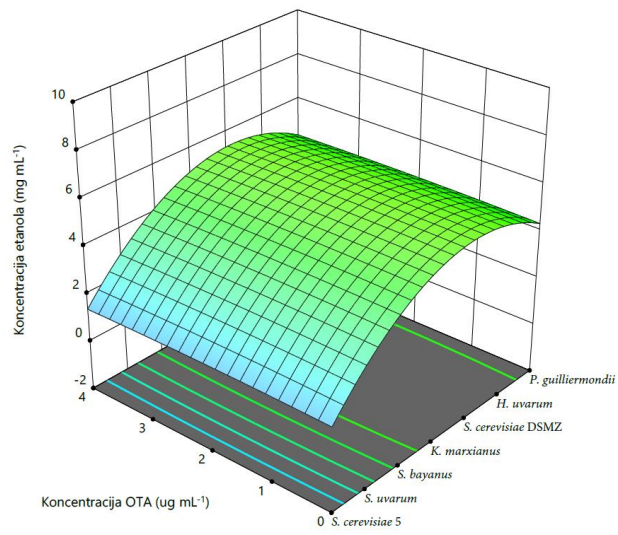


b)

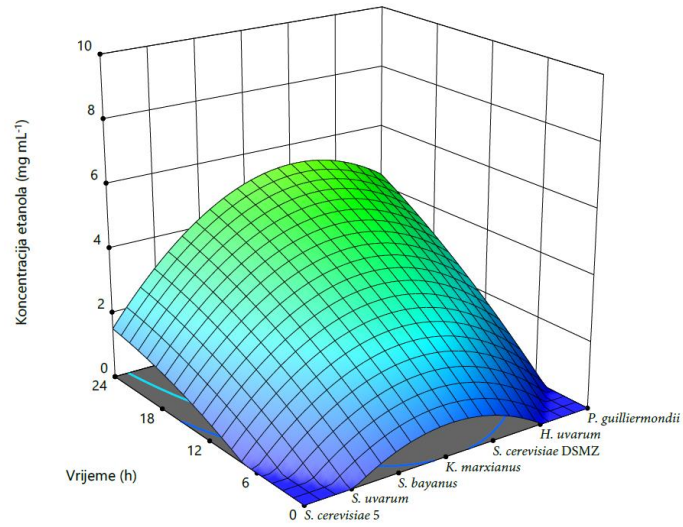


c)

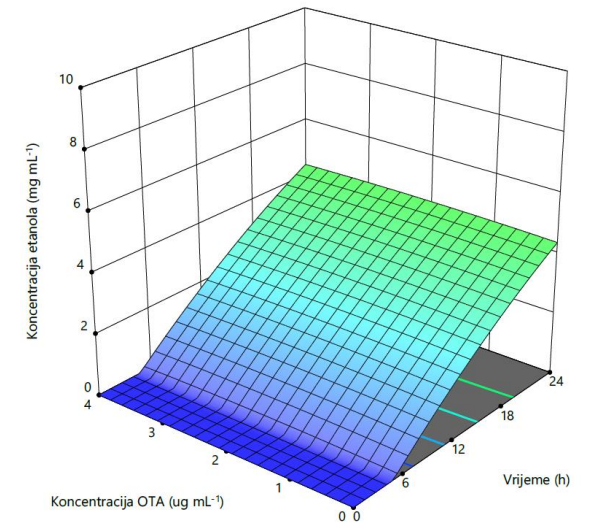
**Slika 35.** Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za broj stanica kvasca u ovisnosti o: (a) koncentraciji OTA i vrsti kvasca; (b) vremenu uzgoja i vrsti kvasca; (c) koncentraciji OTA i vremenu uzgoja



a)

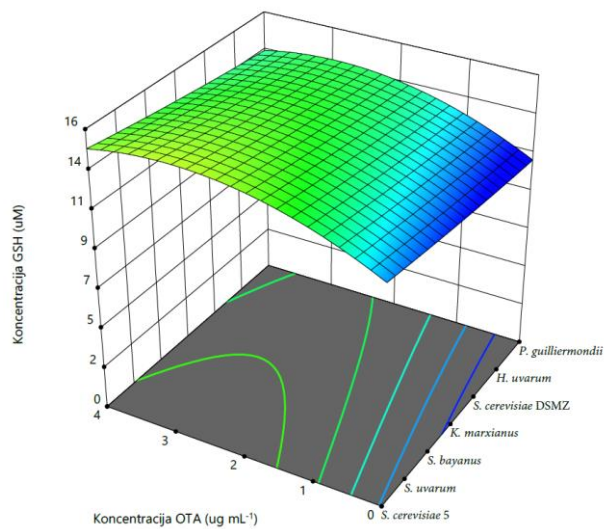


b)

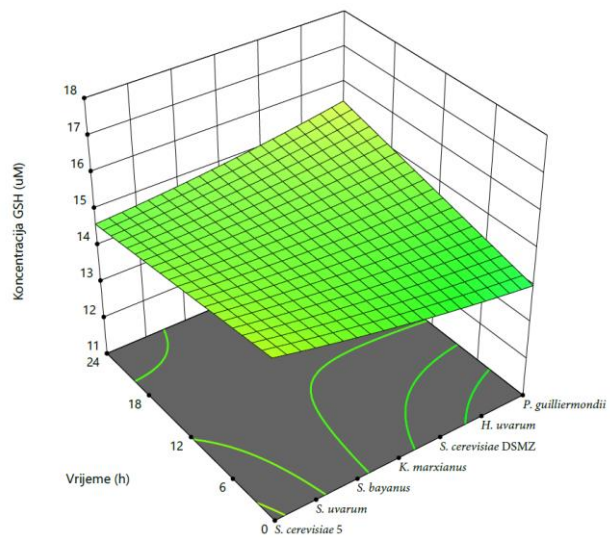


c)

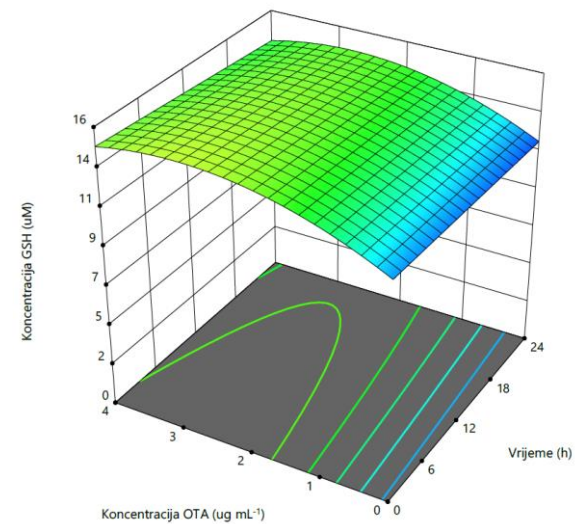
**Slika 36.** Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju etanola u ovisnosti o: (a) koncentraciji OTA i vrsti kvasca; (b) vremenu uzgoja i vrsti kvasca; (c) koncentraciji OTA i vremenu uzgoja



a)



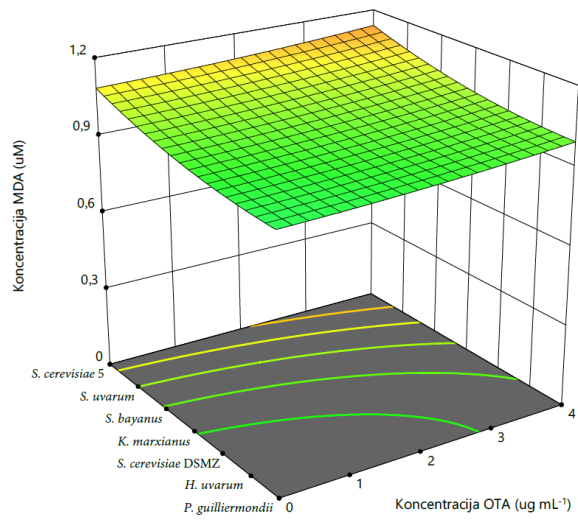
b)



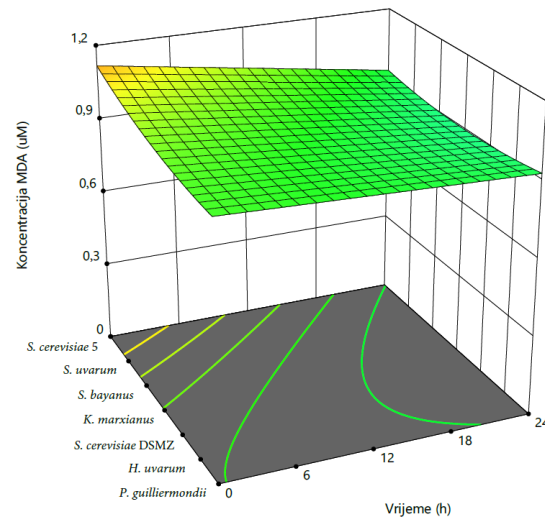
c)

**Slika 37.** Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju GSH u ovisnosti o: (a) koncentraciji OTA i vrsti kvasca; (b) vremenu uzgoja i vrsti kvasca; (c) koncentraciji OTA i vremenu uzgoja

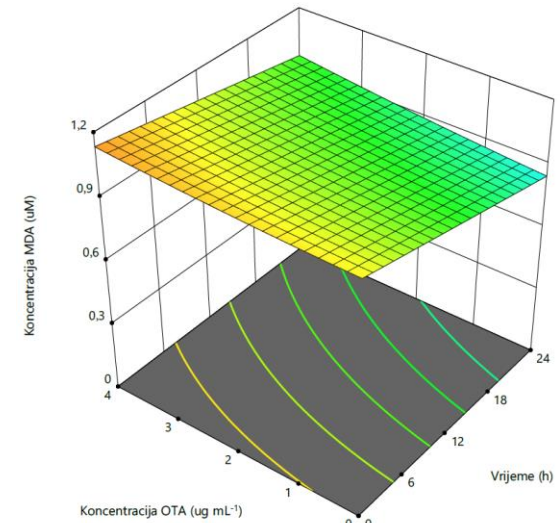




a)

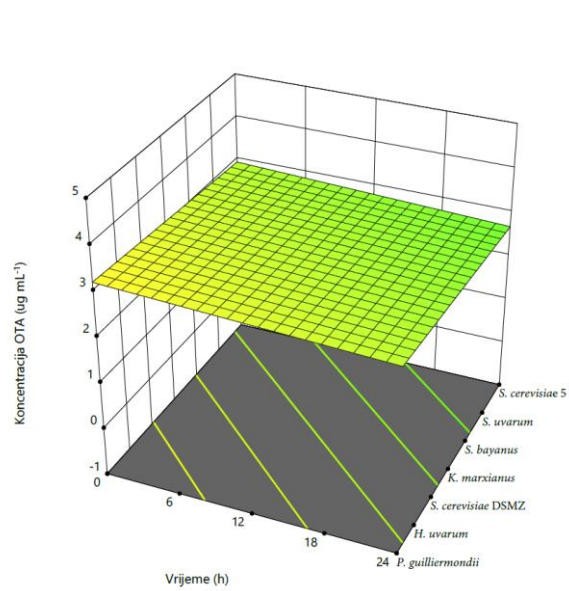


b)

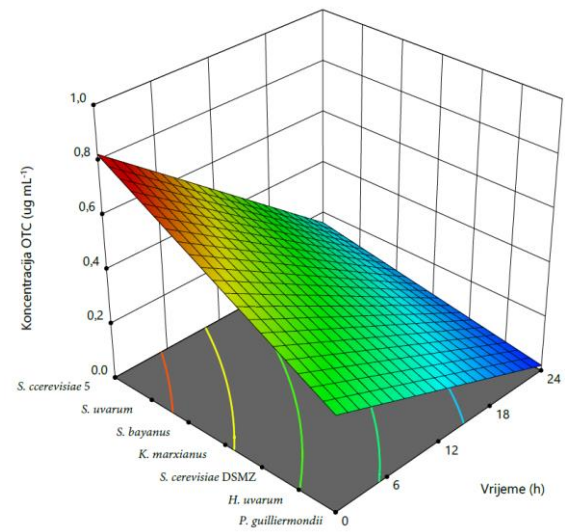


c)

**Slika 38.** Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentraciju MDA u ovisnosti o: (a) koncentraciji OTA i vrsti kvasca; (b) vremenu uzgoja i vrsti kvasca; (c) koncentraciji OTA i vremenu uzgoja



a)



b)

**Slika 39.** Trodimenzionalni prikazi odzivnih površina za koncentracije OTA (a) i OTC (b) u ovisnosti o vremenu uzgoja i vrsti kvasca

## **5. RASPRAVA**



S obzirom na činjenicu da konzumacija vina može znatno pridonijeti izloženosti OTA i da se vino uz žitarice i proizvode na bazi žitarica smatra drugim najvažnijim izvorom OTA u prehrani ljudi, cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj OTA na parametre rasta i morfološke karakteristike odabranih sojeva vinskih kvasaca, sposobnost kvasaca prema uklanjanju OTA iz medija, dokazati razgradne produkte OTA te toksičnost potencijalnih razgradnih produkata prema Pk15 stanicama.

## **5.1. Utjecaj OTA na morfologiju, rast i fermentacijska svojstva odabranih sojeva kvasaca u *in vitro* uvjetima**

Budući da se malo zna o učincima mikotoksina kao agenasa stresa na kvasce i da je malo istraživanja vezano uz utjecaj mikotoksina na morfologiju, parametre rasta i metaboličku aktivnost kvasaca, u ovom dijelu rada želio se ispitati utjecaj OTA primijenjenog u dvije različite koncentracije na morfološke i fiziološke karakteristike kvasaca te vidjeti u kojoj mjeri ispitivani kvasci razvijaju specifičan odgovor na utjecaj OTA i prilagoditi se stresnim uvjetima.

### **5.1.1. Utjecaj OTA na morfologiju stanica odabranih sojeva kvasaca**

S obzirom na brojna toksična svojstva OTA i činjenicu da je broj istraživanja o učincima OTA na kvasce izuzetno malen, jedan od ciljeva ovog doktorskog rada bio je ispitati utjecaj dviju koncentracija OTA na veličinu stanica različitih sojeva vinskih kvasaca.

Veličina stanica kvasaca može uvelike varirati jer ovisi o vrsti i uvjetima rasta, no u prosječnim mjerenjima veličina je od 5 do 7  $\mu\text{m}$  u promjeru, iako neki kvasci mogu doseći i 20 – 50  $\mu\text{m}$ .

Kvasci iz roda *Saccharomyces* među najbolje su istraženim kvascima koji imaju široku primjenu u biotehnologiji i od velikog su industrijskog i ekonomskog značaja. Stanice su ovalnog ili elipsoidnog oblika promjera 1 – 5  $\mu\text{m}$  budući da veličina stanica varira unutar faza rasta i od soja do soja.

Kvasac *S. cerevisiae* dolazi u dva oblika: diploidnom i haploidnom. Diploidne stanice imaju elipsoidni oblik 5 x 6  $\mu\text{m}$ , dok su haploidne stanice ovalnog oblika promjera približno 4  $\mu\text{m}$  (Sherman, 2002). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju su u suglasju s literaturnim podacima jer je u kontrolnim uzorcima dokazana veličina stanica *S. cerevisiae* 5 oko 5  $\mu\text{m}$  (slika 9), dok je kod standardnog soja *S. cerevisiae* DSMZ veličina stanica oko 7  $\mu\text{m}$  (slika 13). U istim uvjetima uzgoja, ali uz dodatak OTA, vidljivo je da uz 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA dolazi do promjene u veličini stanica *S. cerevisiae* 5 već nakon 6 h inkubacije kada je prosječni promjer iznosio manje od 4,5  $\mu\text{m}$  (slika 9). Takva promjena upućuje na nastanak stresnih uvjeta okoliša u kojima se

kvasac nalazi. Nakon 12 sati inkubacije uočeno je povećanje promjera stanica kvasaca te srednja vrijednost promjera stanice kvasca iznosi više od 5,5  $\mu\text{m}$ . Povećanje promjera stanice kvasca upućuje na promjene u konformaciji sadržaja stanične stijenke kvasca, prvenstveno manoproteina i  $\beta$ -glukana. Pucanjem tih veza može doći do povećanja površine same stanice kvasca, a time se otvaraju pore što omogućuje vezanje molekula OTA na površinu stanica kvasca. Zanimljivo je kako nakon 24 sata inkubacije ponovno dolazi do značajnog smanjenja promjera stanica kvasca budući da se promjer stanica smanjio ispod 4  $\mu\text{m}$ . Takav slijed događaja se može povezati s ulaskom molekula OTA u samu stanicu i negativnim utjecajem na samu stanicu, između ostalog i na promjer. S obzirom na toksična svojstva OTA moguća je pojava stresnih uvjeta, a time i pojava određenih negativnih učinaka na rast stanica kvasaca. Utjecaj veće koncentracije OTA (4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) na veličinu stanica kvasca *S. cerevisiae* 5 je također prikazan na slici 9 te su posljedice slične, uz napomenu kako nema značajnih razlika između vrijednosti promjera stanica kvasaca u prisutnosti 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  odnosno 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA (slika 34). Kao i kod soja *S. cerevisiae* 5 u pokusima sa standardnim sojem *S. cerevisiae* DSMZ na početku pokusa vidljiv je značajan utjecaj OTA na promjer stanica kvasca. Posebno je značajan utjecaj 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA budući da u navedenom uzorku dolazi do povećanja veličine stanica za 1,5  $\mu\text{m}$ , dok su nakon 6 sati uzgoja stanice manje u usporedbi sa stanicama iz kontrolnog uzorka. Duljim izlaganjem (12 i 24 sata) kvasca okratoksinu A promjene u promjeru stanica upućuju na prilagodbu stanica na stresne uvjete budući da nisu zabilježene značajne promjene (slike 13, 34).

Na slici 10 prikazan je utjecaj OTA na promjer stanica kvasca *S. uvarum*. Vidljivo je kako promjer stanica u kontrolnom uzorku raste do 12. sata inkubacije nakon čega je uočeno smanjenje veličine stanica. Do 12. sata utjecaj obje koncentracije OTA nema značajan utjecaj na promjer stanica (slike 3a, 34b), ali u 12-om satu je vidljiva značajna razlika u veličini promjera stanica između kontrolnog uzorka i uzoraka tretiranih s obje koncentracije OTA. Ipak, nakon 24 sata uzgoja, uočeno je povećanje stanica kvasca *S. uvarum* u prisutnosti OTA (2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ali je utjecaj koncentracije OTA neznačajan na veličinu stanica.

Utjecaj dviju koncentracija OTA na promjer stanica kvasca *S. bayanus* prikazan je na slici 11. Vidljivo je kako se promjer stanica mijenja u kontrolnom uzorku i u uzorcima s dodatkom OTA te da značajnih promjena nema sve do 12. sata uzgoja kada je uočeno povećanje promjera stanica kvasca u prisutnosti 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA. Nasuprot tome, nakon 24 sata inkubacije vidljivo je kako u prisutnosti manje koncentracije OTA (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dolazi do značajnog smanjenja veličine stanica kvasca u usporedbi sa stanicama u kontrolnom uzorku što je zapravo pokazatelj

inhibicijskog utjecaja manje koncentracije OTA na promjer stanica kvasca *S. bayanus* (slika 34c).

Ispitivanjem utjecaja OTA na promjer stanica kvasca *K. marxianus* (slika 12) pokazalo se kako obje koncentracije OTA nemaju značajan utjecaj na veličinu stanica kvasca budući da su razlike u veličini stanica kontrolnog uzorka i uzoraka s dodanim OTA minimalne. Takvi rezultati upućuju na izuzetnu otpornost i prilagodbu kvasca *K. marxianus* na prisutnost OTA (tablica 19, slika 34).

Slika 14 pokazuje utjecaj OTA na veličinu stanica kvasca *H. uvarum*. Uočljivo je kako odmah nakon dodatka OTA (0-ti sat) i povećanja promjera stanica dolazi do stabilizacije i prilagodbe stanica na prisutnost OTA u mediju (tablica 14 i slika 34). Jedini i značajni izuzetak je vidljiv u uzorku s  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA nakon 12 sati gdje je veličina stanica kvasca smanjena za više od  $2 \mu\text{m}$ .

Kvasac *Pichia guilliermondii* je pokazao izuzetnu otpornost i prilagodbu na prisutnost dviju koncentracija OTA, s obzirom na to da sve do 24. sata uzgoja nema značajne promjene u veličini stanica. Iz slike 15 je vidljivo kako OTA u koncentraciji od  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  značajno utječe na veličinu stanica nakon 24 sata uzgoja budući da je manja za čak  $2 \mu\text{m}$  (slika 34c). Iako OTA u koncentraciji  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  također negativno utječe na veličinu stanica, ono nije značajno.

Upotrebom neuronskih mreža i metodom odzivnih površina određen je utjecaj različitih parametara kao što su vrijeme uzgoja, vrsta kvasca i koncentracija OTA na morfologiju stanica kvasaca. Iz tablice 12 je vidljivo da je ANN građena od 3 ulaza, 3 izlaza i 10 neurona u skrivenom sloju. S obzirom na dobivene  $R^2$  vrijednosti za trening, testiranje i validaciju (tablica 13), jasno je vidljivo kako pojedini izlazni parametar utječe na formiranje neuronske mreže te su stoga napravljene zasebne analize, odnosno neuronske mreže sa svakim pojedinim izlaznim parametrom.

Iz tablice 14 je vidljivo kako je ANN 1 građena od 3 ulazna parametra (vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA), jednog izlaznog (veličina stanica) te 8 neurona u skrivenom sloju, a  $R^2$  vrijednosti se kreću ispod 90 %. Takvi rezultati upućuju da je teško moguće predvidjeti utjecaj ulaznih parametara na veličinu stanica. Ali, svakako treba uzeti u obzir da se radi o različitim vrstama kvasaca koji nisu jednakih morfoloških karakteristika.

Kako pokazuje jednadžba u tablici 19, vrijeme uzgoja ( $X_2$ ) zasebno kao i vrsta kvasca tijekom vremena uzgoja ( $X_1 * X_2$ ) imaju značajan pozitivan učinak na veličinu stanica kvasca, što je i očekivano, s obzirom na to da se radi o živim mikroorganizmima.

Prema slici 34 može se zaključiti kako veličina stanica kvasaca ponajviše ovisi o soju korištenog kvasca što je u skladu s rezultatima u tablici 19. Ako se uspoređuje utjecaj OTA, odnosno

vrijeme sa sojem primijenjenog kvasca, vidljivo je kako ni koncentracija OTA a ni vrijeme uzgoja ne utječu značajno na povećanje stanica, već navedeni parametar ovisi o soju primijenjenog kvasca (slike 34a i 34b). No, ipak, slika 34c pokazuje kako pri manjim koncentracijama OTA vrijeme uzgoja ima ulogu na morfologiju stanica kvasaca, dok uz povećanje koncentracije OTA ne dolazi do značajne promjene veličine stanica s vremenom uzgoja. Prilikom optimiranja parametara zadane ulazne varijable su vrsta kvasca, vrijeme i koncentracija OTA, a izlazna varijabla je veličina stanice. Dobiveni rezultat predikcije koji ima poželjnost (eng. *desirability*) od 63 % pokazuje kako bi najmanja veličina stanica od 3,50  $\mu\text{m}$  bila dobivena s kvascem *P. guilliermondii* na početku uzgoja uz dodanu koncentraciju OTA 1,28  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.1.2. Utjecaj OTA na broj živih stanica odabranih sojeva kvasaca

Za analizu utjecaja kemijskih i fizikalnih faktora na mikroorganizme najčešće se koristi metoda neizravnog (posrednog) određivanja broja živih stanica u populaciji (vijabilnost stanica), odnosno jedinica koje formiraju kolonije (CFU). Kako bi se proučila toksičnost OTA na ispitivane sojeve vinskih kvasaca tijekom 24 sata određen je broj živih stanica kvasaca, a rezultati mjerenja izraženi su kao log CFU  $\text{mL}^{-1}$  (slike 16 – 22).

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je nakon 24 sata uzgoja u kontrolnim uzorcima maksimalan broj živih stanica za sve odabrane kvasce iznosio oko 8 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ .

Kinetika rasta kvasaca prati krivulju rasta s lag fazom tijekom koje se stanice prilagođavaju novom okruženju. U kontrolnim uzorcima lag faza za sve kvasce iznosi 4 sata, dok je u prisutnosti OTA (2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) za *S. uvarum*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* DSMZ i *P. guilliermondii* produžena na 6 sati. Nakon lag faze slijedi log faza u kojoj se broj stanica eksponencijalno povećava, a iz prikazanih rezultat je vidljivo da log faza traje do 24 sata. Tijekom log faze počinje iscrpljivanje hranjivih tvari, a akumulacija toksičnih produkata rezultira fazom usporavanja, nakon čega započinje stacionarna faza u kojoj je stopa rasta jednaka stopi smrti. Međutim ni u jednom uzorku nije zabilježena stacionarna faza kao ni faza odumiranja (slike 16 – 22). Iz određenih broja živih stanica kvasaca prikazanih na slikama 16 i 20 vidljivo je da dodatak OTA nema značajan utjecaj na broj živih stanica kvasca (slika 35a) i da se do kraja pokusa broj živih stanica u kontrolnom uzorku i u uzorcima s dodanim OTA nije značajno razlikovao. Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima Angioni i suradnici (2007) koji su pokazali kako dodatak OTA (0,2 – 6  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) u sintetski medij u kojem su kvasci *S. cerevisiae* i *K. apiculata* nema značajan utjecaj na broj živih stanica kvasaca tijekom cijelog

vremena uzgoja (20 dana). Prema Freire i suradnicima (2019), prisutnost OTA nije utjecala na kinetiku rasta *S. cerevisiae*, već je dovela do stvaranja modificiranih okratoksina poput OTA.

Slika 17 prikazuje broj živih stanica kvasca *S. uvarum* s i bez dodanim OTA. Iz slike je jasno vidljivo kako se nakon 4 sata uzgoja broj stanica u kontrolnom uzorku i uzorku s dodanih 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA povećava i postiže maksimum na kraju pokusa (8,80 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ , odnosno 8,92 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). Suprotno tome, uočeno je produljenje lag faze u uzorku s dodanih 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA budući da se broj stanica kvasca nije povećavao sve do 6-tog sata uzgoja. Iako se do kraja pokusa broj stanica u navedenom uzorku povećao, maksimum je ipak znatno manji (7,95 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) u usporedbi s brojem stanica u kontrolnom uzorku i uzorku s 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA. Istraživanja Jakopovića i suradnika (2018) također su dokazala da dodatak OTA u koncentracijama 2 odnosno 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  produžuje trajanje lag faze kvasaca *S. uvarum* odnosno *K. marxianus* i da se broj živih stanica do kraja uzgoja značajno ne razlikuje u usporedbi s kontrolnim uzorcima. U istim uvjetima uzgoja vidljivo je da kod kvasca *S. bayanus* u pokusima s i bez dodatka OTA, nakon početnog procesa prilagodbe stanica novim uvjetima (dodatku OTA), dolazi do značajne razlike u povećanju broja stanica nakon 6 sati uzgoja uz dodatak 2, odnosno 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA. Do kraja pokusa, broj stanica u svim uzorcima je dosegao približno slične vrijednosti (7,97 – 8,18 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) (slike 18 i 35).

Na slici 19 prikazane su krivulje rasta kvasca *K. marxianus* bez i s dodatkom OTA. Iz slike je vidljivo kako dodatak OTA u koncentraciji 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  odmah na početku uzgoja utječe na broj živih stanica kvasca smanjivši ga, dok je broj živih stanica kvasca *K. marxianus* u kontrolnom uzorku i u uzorku s dodanih 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA gotovo identičan. Nakon 4 sata uzgoja, uočena je značajna razlika između broja živih stanica u kontrolnom uzorku (7,01 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) i uzorku s dodanih 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA (7,96 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ), dok je nakon 6 sati uzgoja, uočena značajna razlika između broja živih stanica u kontrolnom uzorku (7,70 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) i uzorku s dodanih 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA (6,44 CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). Do kraja pokusa, broj živih stanica kvasca u svim uzorcima se nije značajno razlikovao te su postignute maksimalne vrijednosti od 7,99 log CFU  $\text{mL}^{-1}$  do 8,18 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ .

U početnim fazama uzgoja kvasca *H. uvarum* bez i s dodatkom OTA nema značajne razlike između broja živih stanica (slika 35a), ali je nakon 6 sati uočena značajna razlika između broja živih stanica u kontrolnom uzorku (7,85 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) i uzorku s dodanih 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA (6,71 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). S druge strane, dodatak 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA utjecao je na smanjenje broja živih stanica kvasca nakon 12 sati uzgoja (7,29 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) u odnosu na broj živih stanica u kontrolnom uzorku (7,98 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ ). Do kraja pokusa, broj živih stanica u svim uzorcima

je približno jednak što pokazuje određenu prilagodbu kvasca na prisutnost OTA u mediju (slika 21).

Od svih istraživanih kvasaca *P. guilliermondii* je pokazao najveću otpornost na prisutnost OTA što je posebice izraženo nakon 24 sata uzgoja. Na slici 22 je vidljivo kako se tijekom uzgoja mijenja broj živih stanica kvasca u kontrolnom uzorku i u uzorcima s dodanim OTA. Sve do 24 sata uzgoja nema značajnih promjena u broju živih stanica kada je zabilježena razlika od 1 log jedinice između uzorka s dodanih  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA i kontrolnog uzorka. Također, dodatak  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA je utjecao na povećanje broja živih stanica nakon 24 sata ( $8,55 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ) u odnosu na broj živih stanica u kontrolnom uzorku, što upućuje na otpornost i mogućnost prilagodbe kvasca *P. guilliermondii* na prisutnost OTA (slika 35). Jedno od rijetkih istraživanja koje se dotaklo ove tematike (Patharajan i sur., 2011) pokazalo je kako dodatak OTA u koncentracijama  $5 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ima slab utjecaj na broj živih stanica kvasaca *Rhodococcus erythropolis* (AR14), *Metschnikowia pulcherrima* (MACH1) i *Pichia guilliermondii* (M8) tijekom 15 dana uzgoja. U navedenom istraživanju, početni broj kvasaca iznosio je  $8 \log \text{CFU mL}^{-1}$ . Kada je riječ o kvascu *M. pulcherrima* maksimalan broj živih stanica u prisutnosti OTA određen je nakon 24 sata te nakon 3 dana uzgoja i iznosio je 9,08 odnosno 9,23  $\log \text{CFU mL}^{-1}$ . Broj živih stanica ostalih ispitivanih kvasaca dosegao je maksimum nakon 3 dana uzgoja i iznosio je 9,00 i 9,14  $\log \text{CFU mL}^{-1}$  za *R. erythropolis* odnosno *P. guilliermondii*. Rezultati istraživanja Patharajana i suradnika (2011) slični su rezultatima dobivenim u ovom radu te upućuju na slab utjecaj OTA na rast i razmnožavanje kvasaca u tekućem mediju, odnosno kvasci su sposobni prilagoditi se novonastalim uvjetima i preživjeti. Iako tijekom trajanja pokusa dolazi do razlika u broju živih stanica kvasaca između kontrolnih uzoraka i uzoraka u kojima je dodan OTA, konačan broj živih stanica nakon završetka pokusa, često je velik i neovisan je o utjecaju OTA (tablica 19, slika 35a).

Kao što je u prethodnom poglavlju navedeno, jasno je vidljiv utjecaj izlaznih parametara na predikciju neuronske mreže te su napravljene zasebne analize za svaki pojedini izlazni parametar. Iz tablice 14 se može vidjeti da je ANN 2 građena od 3 ulaza (vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA), jednog izlaza (broj stanica izražen kao  $\log \text{CFU mL}^{-1}$ ) te 6 neurona u skrivenom sloju. Podaci koji se svakako ističu su  $R^2$  vrijednosti treninga, testiranja i validacije neuronske mreže i vidljivo je da su niske te se kreću oko 87 %. Također, uočljiva je i relativno visoka vrijednost pogrešaka treninga, testa i validacije. Takvi rezultati upućuju na slabu povezanost podataka, odnosno da neuronska mreža ne može precizno predvidjeti što će se događati s brojem stanica u zadanim uvjetima. S druge strane, radi se o živim organizmima

koji su korišteni tijekom uzgoja pa je s obzirom na njihovu raznolikost donekle razumljiva nepovezanost podataka.

Iz tablice 19 je uočljiv značajan pozitivan utjecaj vremena uzgoja ( $X_2$ ) te vrste kvasca ( $X_1^2$ ) i koncentracije OTA ( $X_3^2$ ) na broj živih stanica ispitivanih kvasaca. Broj živih stanica kvasaca prikazan je kao odziv na slici 35. Iz slike 35a je vidljivo kako povećanje koncentracije OTA ne utječe značajno na broj živih stanica kvasca, već ono ovisi o soju korištenog kvasca. Međutim, prema slici 35b može se zaključiti kako broj živih stanica kvasaca ovisi i o vremenu uzgoja te da je najviše izražen kod kvasaca *S. cerevisiae* 5, *S. uvarum*, *H. uvarum* i *P. guilliermondi* jer je s povećanjem vremena uzgoja broj stanica navedenih kvasaca najveći. Činjenica da je vrijeme uzgoja ključan faktor za određivanje broja živih stanica kvasaca potvrđena je i slikom 35c iz koje je vidljivo kako se neovisno o koncentraciji dodanog OTA broj stanica kvasaca povećava s povećanjem vremena uzgoja. U skladu s navedenim, tijekom optimiranja parametara, zadane ulazne varijable su, kao i svaki puta do sada, bile vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA, dok je broj živih stanica kvasaca zadana izlazna varijabla. Kako bi broj živih stanica kvasca bio najveći ( $8,88 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ), rezultat predikcije koji ima poželjnost 94 % pokazuje da je tijekom 24 sata uzgoja, bez dodanog OTA potrebno koristiti kvasac *S. cerevisiae* 5.

Malen broj provedenih istraživanja s navedenom tematikom upućuje na potrebu za dodatnim i detaljnim istraživanjima kako bi se uočio toksičan utjecaj OTA na stanice kvasaca odnosno njihovu sposobnost prilagodbe tj. rasta i razmnožavanja u prisutnosti OTA. No, do sada prikupljeni podaci upućuju na otpornost pojedinih kvasaca prema štetnim utjecajima OTA (Angioni i sur., 2007; Jakopović i sur., 2018; Patharajan i sur., 2011).

### **5.1.3. Utjecaj OTA na proizvodnju produkata fermentacije odabranih sojeva kvasaca**

Tijekom alkoholne fermentacije kvasci, osim etanola, sintetiziraju i druge spojeve kao nusproizvode biokemijskih i kemijskih procesa, a dokazano je kako kontaminacija sirovina raznim mikotoksinima, kao što su aflatoksini, OTA, zearalenon, deoksinivalenol ili fumonizinom B<sub>1</sub> može utjecati na količinu hlapljivih nusproizvoda fermentacije (Kłosowski i Mikulski, 2010).

Broj radova koji istražuje učinke mikotoksina na fermentacijski proces je izuzetno ograničen. Pokazalo se međutim, kako kvasci i njihovi enzimi pokazuju određenu osjetljivost na mikotoksine, ali i mogućnost prilagodbe toksičnim uvjetima. Mikotoksini, s druge strane, mogu

inhibirati enzime fermentacije, odgoditi rast i uzrokovati oksidativni stres (Kłosowski i sur., 2010). Svi ti učinci potencijalno usporavaju rast kvasca i posljedično, fermentaciju.

Budući da je malo podataka o ponašanju kvasaca tijekom fermentacije medija kontaminiranog mikotoksinima, u ovom radu su tijekom uzgoja odabranih sojeva vinskih kvasaca s ili bez dodatka OTA određivane koncentracije etanola, glicerola, mravlje i octene kiseline te preostale glukoze, a rezultati su prikazani u tablicama 8 i 9.

Vidljivo je kako su nakon 12 sati uzgoja značajne koncentracije etanola detektirane samo u uzorcima s kvascima *S. bayanus* (4,375 - 4,525 mg mL<sup>-1</sup>) i *S. cerevisiae* DSMZ (9,150 – 9,210 mg mL<sup>-1</sup>), dok su u ostalim uzorcima detektirane niske koncentracije (tablica 8). Iako je primijećeno da OTA, u obje istraživane koncentracije, utječe na fermentacijsku aktivnost kvasaca, jer je u svim uzorcima osim u uzorku s kvascem *S. uvarum* izmjerena manja koncentracija etanola u usporedbi s kontrolnim uzorcima, dodatak OTA nema značajni utjecaj na proizvodnju etanola (tablica 8 i 19, slika 36a i 36c). U uzorcima u kojima je naciepljen kvasac *S. uvarum* uz dodatak 2, odnosno 4 μg mL<sup>-1</sup> OTA detektirana je koncentracija etanola od 0,62 odnosno 0,58 mg mL<sup>-1</sup>, a budući da je u kontrolnom uzorku izmjerena koncentracija etanola od samo 0,288 mg mL<sup>-1</sup> dalo bi se zaključiti kako prisutnost OTA ima pozitivan utjecaj na fermentacijska svojstva kvasca *S. uvarum* (tablica 8).

Usporedbom s rezultatima nakon 12 sati uzgoja, rezultati nakon 24 sata se ipak razlikuju, jer kako je i očekivano, detektirane su veće koncentracije etanola. Prema jednadžbi prikazanoj u tablici 19, može se vidjeti kako vrsta kvasca ( $X_1$ ) i vrijeme uzgoja ( $X_2$ ) zasebno imaju značajan utjecaj na koncentraciju etanola, ali i ako su ta dva parametra povezana ( $X_1 * X_2$ ). Najviše koncentracije etanola izmjerene su u uzorcima s kvascima *S. bayanus* (6,87 – 7,05 mg mL<sup>-1</sup>), *S. cerevisiae* DSMZ (6,275 – 6,715 mg mL<sup>-1</sup>) i *H. uvarum* (7,365 – 7,49 mg mL<sup>-1</sup>), a najniže u uzorcima s kvascima *S. cerevisiae* 5, *S. uvarum* i *K. marxianus*. Iz tablice 8 i slike 36a je vidljivo kako nema značajne razlike u izmjerenoj koncentraciji etanola između kontrolnog uzorka i uzoraka s dodanim OTA. Jedino je u uzorcima s kvascem *P. guilliermondii* vidljiva značajna razlika u koncentraciji izmjerenog etanola, budući da je u kontrolnom uzorku detektirano 2,605 mg mL<sup>-1</sup> etanola, dok je u uzorcima s dodanih 2 i 4 μg mL<sup>-1</sup> OTA detektirano 3,845, odnosno 3,295 mg mL<sup>-1</sup> etanola. Kao i u slučaju s kvascem *S. uvarum* nakon 12 sati uzgoja čini se kako dodatak OTA stimulira proizvodnju etanola kod kvasca *P. guilliermondii*.

Kako bi se dobila predikcija etanola kao izlaznog parametra, ulazni parametri za ANN 3 su bili vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA. Iz tablice 14 je vidljivo kako je neuronska mreža (ANN 3), građena od 3 ulaza i 8 neurona u skrivenom sloju, a R<sup>2</sup> vrijednosti su izuzetno visoke, što upućuje da je temeljem ovih podataka s vrlo precizno moguće predvidjeti kakav će



biti utjecaj navedenih ulaznih parametara na koncentraciju etanola. Kao dokaz tome, na slici 26 prikazano je predviđanje neuronske mreže na temelju izmjerenih podataka.

Kako je prikazano na slici 36, koncentracija dodanog OTA ne utječe značajno na koncentraciju proizvedenog etanola, već je jasno vidljivo kako su soj primijenjenog kvasca, odnosno vrijeme uzgoja ključni faktori koji utječu na proizvodnju etanola (slike 36b i 36c). Na početku uzgoja, koncentracija etanola je 0 ili je minimalna, što može biti posljedica dodatka OTA koji je otopljen u etanolu, a uređaj kojim je mjerena koncentracija etanola je dovoljno precizan, odnosno limit detekcije je vrlo nizak. Iz slike 36b je također vidljivo kako kvasci *K. marxianus*, *S. cerevisiae* DSMZ, *H. uvarum* i *P. guilliermondii* proizvode veće koncentracije etanola kako se povećava vrijeme njihovog uzgoja. Dok slika 36c pokazuje kako koncentracija OTA nema značajan učinak na koncentraciju etanola, već je povećanje koncentracije etanola ovisno o vremenu uzgoja. Budući da je izlazna varijabla koncentracija etanola, dok su ulazne vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA, prilikom optimiranja procesa, s poželjnošću od 77 %, najveću koncentraciju etanola moguće bi bilo dobiti primjenom kvasca *S. cerevisiae* DSMZ, tijekom uzgoja od 24 sata i to bez dodatka OTA.

Dobiveni rezultati mogu se usporediti s istraživanjima drugih autora. Tako su Angioni i suradnici (2007) u svom istraživanju koristili kvasce *K. apiculata* i *S. cerevisiae* te su odredili postotak proizvedenog etanola na kraju fermentacije uz dodatak različitih koncentracija OTA (0,2, 0,6, 3 i 6  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Prema njihovim rezultatima, dodatak OTA nije utjecao na proizvodnju etanola što dodatno ukazuje na činjenicu da su kvasci sposobni prilagoditi se prisutnosti OTA i relativno neometano provoditi metaboličke procese. Petruzzi i suradnici (2015) su u svojem istraživanju koristili pet genetski različitih sojeva kvasca *S. cerevisiae*, a rezultati njihovog istraživanja nedvojbeno su pokazali visoke prinose etanola (8,32 – 10,91  $\text{mg mL}^{-1}$ ) u prisutnosti OTA (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sojevi kvasca *S. cerevisiae* su tijekom 5-8 dana fermentacije smanjili razinu šećera ispod razina detekcije (što je s obzirom na proizvodnju etanola i očekivano), a broj živih stanica kvasca je održan na 6 log CFU  $\text{mL}^{-1}$ . Također, nije pronađena statistički značajna razlika između kontrolnih uzoraka i uzoraka s dodanim OTA, što upućuje na nisku toksičnost OTA prema kvascima ili prilagodbu kvasaca tijekom vremena fermentacije. Svakako, treba uzeti u obzir i činjenicu da su kvasci korišteni u istraživanju Petruzzi i sur. (2015) genetski modificirani, što može pospješiti njihovu otpornost prema OTA.

Iz dobivenih rezultata i rezultata drugih autora očito je da fermentacijska aktivnost ovisi o soju korištenog kvasca budući da *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *K. marxianus*, *H. uvarum* i *P. guilliermondii* proizvode vrlo male količine etanola s naglaskom da *H. uvarum* nakon 24 sata ipak proizvode značajne količine (do 7,49  $\text{mg mL}^{-1}$ ). S druge strane, tijekom uzgoja kvasaca *S.*

*cerevisiae* DSMZ i *S. bayanus* detektirane su slične koncentracije etanola kao i kod sojeva kvasca *S. cerevisiae* korištenih u radu Petruzzi i suradnika (2015).

Uz određivanje koncentracije proizvedenog etanola tijekom uzgoja kvasaca bez i s dodatkom OTA određivane su i koncentracije preostale glukoze, glicerola, mravlje i octene kiseline nakon 12 i 24 sata, a rezultati su prikazani u tablici 9.

Iz tablice 9 je vidljivo kako su kvasci *S. cerevisiae* 5, *S. uvarum*, *K. marxianus* i *S. cerevisiae* DSMZ nakon 12 sati uzgoja potrošili gotovo svu glukozu budući da je nije bilo moguće detektirati te je s obzirom na to u navedenim uzorcima očekivana visoka koncentracija etanola. No jedino je u uzorku s kvascem *S. cerevisiae* DSMZ zabilježen takav slučaj i to bez obzira na koncentraciju dodanog OTA (tablica 8). Zanimljiva je i činjenica da je unatoč visokoj koncentraciji proizvedenog etanola, u kontrolnom uzorku zabilježena i najviša koncentracija mravlje kiseline ( $0,585 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (tablica 9), što ukazuje na činjenicu da kvasac *S. cerevisiae* DSMZ ne troši glukozu samo za alkoholnu fermentaciju, već ima sposobnost provođenja nekoliko metaboličkih puteva i proizvodnje više različitih metabolita. Također, u uzorcima s dodanih 2 i  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA, zabilježene su i najviše koncentracije octene kiseline ( $0,590$  odnosno  $0,575 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Kod preostalih navedenih kvasaca, nakon 12 sati uzgoja glicerol, kao ni mravlja ni octena kiselina nisu detektirani (tablica 9), uz izuzetak *S. cerevisiae* 5, kod kojeg je detektirana vrlo niska koncentracija octene kiseline ( $0,062 \text{ mg mL}^{-1}$ ). S druge strane, jasno je vidljivo kako kvasci *H. uvarum* i *P. guilliermondii* nakon 12 sati uzgoja nisu iskoristili svu glukozu. Štoviše, potrošili su svega oko  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  dostupne glukoze za proizvodnju etanola, budući da su koncentracije glicerola, mravlje i octene kiseline izuzetno niske, ili su ispod razine detekcije (tablica 9). S obzirom na to da je broj živih stanica navedenih kvasaca relativno visok (slika 21, 22), potrošnja glukoze mala i ne razlikuje se značajno o dodanoj koncentraciji OTA, moguće je da navedeni kvasci jednostavno imaju slabiji afinitet prema glukozu ili je alkoholna fermentacija inhibirana nekim drugim faktorom. Slično kao i u slučaju s kvascima *H. uvarum* i *P. guilliermondii*, u uzorcima s kvascem *S. bayanus* se može uočiti slabija potrošnja glukoze, iako je u odnosu na navedene kvasce, *S. bayanus* potrošio značajno više glukoze (tablica 9) te je pritom detektirana i veća koncentracija proizvedenog etanola (tablica 8). S obzirom na to da su koncentracije glicerola, mravlje i octene kiseline niske ili ispod limita detekcije, može se zaključiti kako je potrošnja glukoze usmjerena prema proizvodnji etanola. Kod svih kvasaca koji nakon 12 sati nisu potrošili svu glukozu, odnosno nisu je potrošili do ispod razine detekcije, vidljivo je kako u kontrolnim uzorcima i u uzorcima s dodanih  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA zaostaje ipak nešto više glukoze nego u uzorcima s dodanih  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA. Iako ta razlika nije značajna,

ipak upućuje na to da stanice kvasaca pružaju otpor štetnom djelovanju OTA i manje ili više uspješno metaboliziraju glukozu.

Ako pogledamo vrijednosti preostale glukoze nakon 24 sata uzgoja s ispitivanim kvascima, vidljivo je kako su kvasci *S. cerevisiae* 5, *S. uvarum* i *K. marxianus* potrošili svu glukozu (tablica 9), odnosno, u navedenim uzorcima koncentracija glukoze je ispod limita detekcije, a s obzirom na to da nije proizvedeno više od 2 mg mL<sup>-1</sup> etanola (tablica 8), sposobnost iskorištenja glukoze navedenih kvasaca je prilično slaba. Uz to, koncentracije glicerola, mravlje i octene kiseline u navedenim uzorcima su vrlo niske, što samo ide u prilog slaboj fermentacijskoj aktivnosti navedenih kvasaca, a dodatak OTA ne utječe značajno na koncentracije navedenih metabolita. Nadalje, u uzorcima s kvascem *S. cerevisiae* DSMZ, nakon 24 sata uzgoja detektirane su vrlo male koncentracije preostale glukoze, s izuzetkom uzorka u kojem je dodano 2 µg mL<sup>-1</sup> OTA, gdje glukoza nije detektirana, a takvo iskorištenje glukoze upućuje na povećane koncentracije proizvedenog etanola, što je i slučaj (tablica 8). Glicerol nakon 24 sata uzgoja navedenog kvasca nije detektiran dok su izmjerene koncentracije mravlje i octene kiseline relativno niske (tablica 9). Kao i u uzorcima s kvascem *S. cerevisiae* DSMZ, u uzorcima s kvascem *H. uvarum* detektirane su vrlo niske koncentracije preostale glukoze. S obzirom na to da su koncentracije glicerola, mravlje i octene kiseline ispod limita detekcije (tablica 9), a koncentracije proizvedenog etanola prilično visoke, jasno je da se kvasac *H. uvarum* prilagodio prisutnosti OTA i u velikoj mjeri prilično uspješno proizvodi etanol (tablica 8). Kvasac *S. bayanus* je nakon 24 sata uzgoja iskoristio svu glukozu što je usko povezano s proizvedenom koncentracijom etanola koja je visoka (tablica 8). No, najniža koncentracija proizvedenog etanola pomoću kvasca *S. bayanus* detektirana je upravo u uzroku s dodanim 4 µg mL<sup>-1</sup> OTA, u kojem je i detektirana preostala glukoza (tablica 9). Budući da su koncentracije glicerola, mravlje kiseline i octene kiseline vrlo niske ili su ispod limita detekcije, jasno je kako kvasac *S. bayanus*, unatoč dodatku OTA, ipak uspješno prevodi glukozu do etanola. Nasuprot navedenome, kvasac *P. guilliermondii* pokazuje prilično slabu sposobnost potrošnje glukoze s obzirom na preostale količine (tablica 9). Zanimljivo je da su u uzorcima u kojima je dodan OTA (2 i 4 µg mL<sup>-1</sup>) izmjerene manje koncentracije preostale glukoze (5,890, odnosno 6,050 mg mL<sup>-1</sup>) u odnosu na kontrolni uzorak (8,145 mg mL<sup>-1</sup>). S obzirom na to, očekivano, u kontrolnom uzorku izmjerena je manja koncentracija etanola u usporedbi s uzorcima u kojima je dodan OTA (tablica 8). Navedeni podaci upućuju na to da se kvasac *P. guilliermondii*, nakon određenog vremena, može prilagoditi prisutnosti OTA te čak uspješnije proizvoditi etanol. Octena kiselina nije detektirana dok su koncentracije glicerola vrlo niske. No, uočena je

relativno visoka koncentracija mravlje kiseline u uzorku s dodanim  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA, što bi moglo upućivati da osim alkoholne fermentacije kvasac *P. guilliermondii* u stresnim uvjetima provodi i druge oblike fermentacije.

Pokazalo se da slabe organske kiseline negativno utječu na rast i metabolizam mikroorganizama kao i na prinos etanola (van Maris i sur., 2006). Mravlja kiselina je slaba kiselina koja može izazvati oksidativni stres te iako je tipično prisutna u niskim koncentracijama, toksična je za *S. cerevisiae* (Hasunuma i sur., 2011). 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 (RVS) (Du i sur., 2008). U istraživanju Du i sur. (2008) stanice u stacionarnoj fazi rasta su bile otpornije na tretman mravljom kiselinom u usporedbi sa stanicama u fazi eksponencijalnog rasta, što ukazuje da preživljavanje stanica ovisi o temperaturi i fazi rasta za vrijeme tretmana mravljom kiselinom. Postotak preživljavanja stanica smanjio se s povećanjem koncentracije mravlje kiseline. 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 akumulacija mravlje kiseline u citoplazmi ometa očuvanje energije uklanjanjem gradijenta protona između citoplazme i mitohondrijskog prostora. U konačnici, takva situacija rezultira prekidom proizvodnje ATP-a i zaustavlja rast stanica.

Tijekom početnih faza fermentacije, aktivnost kvasaca koji nisu iz roda *Saccharomyces*, doprinosi proizvodnji spojeva poput octene kiseline, glicerola i raznih estera (Ciani i 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*, a prisutnost kvasca *K. apiculata* može inhibirati fermentacijska svojstva nekih sojeva *S. cerevisiae* (Velázquez i sur., 1991), vjerojatno zbog proizvodnje octene kiseline, oktanske i dekanske kiseline ili „killer“ faktora. Tijekom istraživanja Petruzzi i suradnika (2015) koncentracije octene kiseline nisu prelazile  $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$  što je postavljena gornja granica od strane EU (Vilela i sur. 2013), dok je koncentracija glicerola prelazila  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , što prelazi graničnu razinu slatkoće.

Prisutnost mikotoksina (OTA i AF) u fermentacijskom mediju može utjecati na puteve alkoholne fermentacije, a zabilježena je i značajno viša kiselost kod uzoraka kontaminiranih s OTA, što upućuje na formiranje veće količine octene kiseline (Kłosowski i Mikulski, 2010).

## 5.2. Utjecaj OTA na parametre oksidativnog stresa u vinskih kvascima

Učinak djelovanja različitih koncentracija OTA na parametre oksidativnog stresa u stanicama odabranih sojeva vinskih kvasaca određen je na dva načina: mjerenjem koncentracije GSH kao izravnog pokazatelja obrane stanica protiv oksidativnog stresa te mjerenjem koncentracije MDA kao pokazatelja peroksidacije lipida.

### 5.2.1. Utjecaj OTA na koncentraciju glutathiona (GSH)

GSH je najrasprostranjenija redoks molekula u eukariotskim stanicama, pa je njezina uloga u održavanju staničnog redoks stanja iznimno važna, a istraživanja su pokazala kako je upravo GSH izuzetno važna antioksidativna molekula u kvascima (Jamieson, 1998). Prisutnost GSH, povećanje njegove koncentracije i njegove reakcije sa štetnim spojevima smatraju se mehanizmom stanične zaštite (Sorrenti i sur., 2013). U stanicama kvasca *S. cerevisiae* identificirani su geni odgovorni za biosintezu GSH (Ohtake i sur. 1990; Ohtake i Yabuuchi, 1991), stoga kvasci mogu koristiti GSH kao obrambeni mehanizam od stresa i oksidativnih oštećenja (Zimdars i sur., 2019). U novije vrijeme sve veća pažnja se pridaje upotrebi GSH kao antioksidansa u moštu i vinu (Kritzinger i sur., 2013) budući da je utvrđeno njegovo inhibitorno djelovanje protiv oksidacijskog posmeđivanja, a dodatak GSH može pozitivno utjecati na stabilnost arome i boje vina (Ugliano i sur., 2011; Sonni i sur., 2011). Međutim, GSH također može imati ulogu u stvaranju sumpornih spojeva ili promjeni boje bijelih vina (Wegmann-Herr i sur., 2015). Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se dobili odgovori o složenim interakcijama između kvasaca, GSH i potencijalnih stresnih faktora.

U pravilu, koncentracija GSH u stanicama je oko 5 mM (Pizzorno, 2014), a prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 10 vidljivo je kako su koncentracije GSH prilično niske, ali valja uzeti u obzir i vrijeme uzgoja kvasaca jer s povećanjem vremena uzgoja povećava se i koncentracija GSH. Iz tablice 10 vidljivo je kako se koncentracija GSH razlikuje ovisno o soju ispitivanog kvasca, a veća koncentracija GSH proporcionalna je s povećanjem broja stanica (slike 16-22).

Pogledamo li rezultate koncentracije GSH nakon 12 i 24 sata uzgoja može se uočiti da je u kontrolnim uzorcima koncentracija GSH oko 12  $\mu\text{M}$ , dok se dodatkom 2 i 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA, povećava i zabilježena je vrijednost i do oko 16  $\mu\text{M}$ .

Kako bi se vidjelo kakav je utjecaj vremena uzgoja, vrste kvasca i koncentracije OTA na koncentraciju GSH primijenjene su neuronske mreže. Tablica 15 prikazuje neuronsku mrežu građenu od 3 ulaza (vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA), 2 izlaza (koncentracija

GSH i MDA) te 10 neurona u skrivenom sloju. Kako bi se bolje vidjela predviđanja ANN pojedinih izlaznih parametara (koncentracije GSH odnosno MDA) u tablici 16 su prikazane  $R^2$  vrijednosti za treniranje, testiranje i validaciju svakog pojedinog izlaznog parametra. S obzirom na dobivene rezultate prikazane u tablici 16 uočljivo je kako koncentracija GSH negativno utječe na predviđanje neuronske mreže, odnosno budući da su sve  $R^2$  vrijednosti ispod 90 %, manja je mogućnost predikcije izlaznog parametra (koncentracije GSH) neuronske mreže.

Iz tablice 19 je vidljivo kako koncentracija OTA ( $X_3$ ), ali i zajednički učinak vrste kvasca i vremena uzgoja ( $X_1 * X_2$ ) imaju značajan pozitivan utjecaj na koncentraciju GSH, odnosno navedene varijable utječu na povećanje GSH u stanicama kvasaca pa je očekivano da ovisi o dodatku vanjskog agensa stresa, odnosno o kombinaciji vremena uzgoja i vrste kvasca.

Prema slici 37a, vidljivo je kako je koncentracija GSH ovisna o koncentraciji OTA koji je dodan u pojedini uzorak budući da povećanjem koncentracije OTA u svim uzorcima dolazi do povećanja koncentracije GSH. Iz slike 37b je vidljivo kako se koncentracija GSH u određenim vremenima uzgoja mijenja ovisno o soju primijenjenog kvasca, a sve je to u skladu s podacima iz tablice 19. Tako je na primjer, na početku pokusa najviša koncentracija GSH izmjerena kod kvasca *S. cerevisiae* 5, dok je najmanja kod *P. guilliermondii*. Suprotno tome, nakon 24 sata uzgoja, koncentracija GSH je najmanja kod kvasca *S. cerevisiae*, a najveća kod *P. guilliermondii*. Kako je koncentracija GSH jedan od pokazatelja oksidativnog stresa, prema slici 37c također je moguće zaključiti kako povećanje koncentracije OTA dovodi i do povećanja koncentracije GSH neovisno o vremenu uzgoja jer bez dodatka stresora, stanica neće morati dodatno sintetizirati GSH pa time ni povećavati njegovu koncentraciju. Tijekom optimiranja parametara, zadane ulazne varijable su vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA, dok je izlazna varijabla koncentracija GSH. Dobiveni rezultat predikcije, koji ima poželjnost 0,75 % pokazuje kako bi najveću koncentraciju GSH od 15,386  $\mu\text{M}$  bilo moguće dobiti s kvascem *S. cerevisiae* 5 na početku uzgoja s dodatkom 3,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA.

Također, potrebno je naglasiti kako u dostupnoj literaturi nema podataka o djelovanju OTA na koncentraciju GSH u stanicama kvasca, već se slična istraživanja provode na staničnim linijama *in vitro* ili *in vivo* izlaganjem laboratorijskih životinja različitim koncentracijama OTA (Kamp i sur., 2005; Liu i sur., 2015; Garcia-Perez, 2021). Zimdars i suradnici (2019) su proučavali utjecaj bakra na dva različita soja *S. cerevisiae* tijekom fermentacije mošta bijelog grožđa, budući da visoke koncentracije bakra izazivaju oksidativni stres smanjujući broj stanica kvasca, a utječu i na aktivnost enzima. Tijekom fermentacije, koncentracije GSH su u pravilu rasle uz pojedine izuzetke, budući da u određenim uzorcima uz dodatak visokih koncentracija bakra, GSH nije detektiran ili su izmjerene vrlo male koncentracije. Takva je pojava objašnjena

činjenicom da je u prisutnosti bakra, oksidacija GSH ubrzana što dovodi do formiranja kompleksa s glutation disulfidom (GSSH) pa nije moguće detektirati GSH. Također, metabolizam kvasaca utječe na koncentraciju GSH s obzirom na to da njegova uloga kao važnog čimbenika odgovora na stres tijekom nedostatka sumpora i dušika, oksidativnog stresa ili detoksikacije teških metala određuje omjer njegove asimilacije ili izlučivanja (Zimdars i sur., 2019).

### 5.2.2. Utjecaj OTA na koncentraciju malondialdehida (MDA)

Budući da je oksidativni stres jedan od predloženih mehanizama toksičnosti OTA, tijekom izrade ovog rada mjerena je i koncentraciju MDA kao parametra peroksidacije lipida.

Iz tablice 11 je vidljivo kako se koncentracija malondialdehida mijenja ovisno o soju korištenog kvasca, koncentraciji mikotoksina i vremenu uzgoja. Tako je najmanja koncentracija MDA nakon 12 sati uzgoja izmjerena u uzorku s kvascem *P. guilliermondii* uz dodatak  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA ( $0,73 \mu\text{M}$ ), a najviša u uzorku s kvascem *S. uvarum* uz dodatak  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA ( $1,14 \mu\text{M}$ ). Usporede li se vrijednosti koncentracija MDA u ispitivanim uzorcima nakon 12 i 24 sata uzgoja mogu se primijetiti određene razlike. Vidljivo je da je u gotovo svim uzorcima nakon 24 sata uzgoja koncentracija MDA manja u odnosu na 12 sati. U nekim slučajevima, kao na primjer kod *S. cerevisiae* 5, razlike nisu značajne, ali unatoč tome, takvi rezultati upućuju da kvasci stvaraju određenu otpornost prema OTA. No, postoje izuzetci, jer je u uzorcima s kvascem *S. bayanus* vidljivo povećanje koncentracije MDA što govori da je navedeni kvasac i dalje podložan toksičnom utjecaju OTA. Slična je situacija uočljiva i kod kvasaca *H. uvarum* i *P. guilliermondii*, uz dodatak 2, odnosno  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA. Povećana koncentracija MDA ukazuje na peroksidaciju lipida odnosno oštećenje stanice. Najotpornijim kvascima pokazali su se *K. marxianus* i *S. cerevisiae* DSMZ budući da se nakon 24 sata izloženosti  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA, koncentracija MDA smanjila čak i ispod koncentracije u kontrolnim uzorcima (tablica 11).

S obzirom na dobivene rezultate predikcije neuronske mreže, odnosno  $R^2$  vrijednosti treninga, testa i validacije koncentracije MDA kao izlaznog parametra, vidljivo je kako ANN preciznije predviđa i bolje povezuje podatke kada je riječ o koncentraciji MDA (tablica 16).

U tablici 19 je prikazano kako samo vrijeme uzgoja ( $X_2$ ) ima značajan utjecaj na koncentraciju MDA, no potrebno je spomenuti kako je koeficijent determinacije izuzetno nizak (0,2612) što znači da slaganje između modela i samog eksperimenta nije dobro.

Iz slike 38a je vidljivo kako se koncentracija MDA mijenja ovisno o soju primijenjenog kvasca, dok dodatak različitih koncentracija OTA nije značajan. Prema slici 38b može se zaključiti kako

kod većine kvasaca s obzirom na vrijeme uzgoja ne dolazi do značajne promjene u koncentraciji MDA. Međutim, vidljiva je razlika u koncentraciji izmjenjenog MDA u uzorcima s kvascima *S. cerevisiae* 5 i *S. uvarum* koji na kraju uzgoja pokazuju manje koncentracije MDA, u odnosu na početak uzgoja. Ako se uzmu u obzir koncentracije dodanog OTA, iz slike 38c se može zaključiti kako koncentracija MDA ovisi o vremenu uzgoja, jer neovisno o dodanoj koncentraciji OTA, koncentracija MDA opada, što odgovara rezultatima u tablici 19. Tijekom optimiranja parametara, u programu su vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA zadane ulazne varijable, a koncentracija MDA predstavlja izlaznu varijablu. Dobiveni rezultat predikcije, koji ima poželjnost 0,75 % pokazuje kako bi najmanju koncentraciju MDA od 1,121  $\mu\text{M}$  bilo moguće dobiti s kvascem *S. cerevisiae* 5, na početku uzgoja s dodatkom 3,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  OTA.

Kao i u slučaju s GSH, nema literaturnih podataka o utjecaju OTA na koncentraciju MDA u stanicama kvasaca, već se istraživanja baziraju na pojavi parametara oksidativnog stresa (GSH i MDA) na staničnim linijama ili u *in vivo* pokusima na životinjama (Gautier i sur., 2001). Kako je MDA konačni produkt lipidne peroksidacije i smatra se biomarkerom oksidativnog stresa i staničnog oštećenja, nemogućnost detekcije MDA ili detekcija niskih koncentracija MDA može biti rezultat niskih doza stresora (u ovom slučaju OTA) ili loše osjetljivosti metode korištene prilikom istraživanja (Del Rio i sur., 2005). Iako se radi o drugačijem tipu istraživanja, Gautier i suradnici (2001) su pokazali kako povećanje koncentracije GSH može negativno utjecati na koncentraciju MDA u tkivima jetre što se zapravo podudara s većinom rezultata prikazanim u tablicama 10, odnosno 11.



### **5.3. Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasca na koncentraciju i biorazgradnju OTA**

Prisutnost OTA u vinima i sokovima od grožđa zabilježena je još 1996. godine (Zimmerli i Dick, 1996). Kasnijih godina su provedena istraživanja kako bi se procijenila koncentracija OTA u sokovima i vinima diljem Europe i svijeta (Otteneder i Majerus, 2000). Rezultati tih istraživanja su pokazali kako se u bijelim vinima može pronaći do  $7 \mu\text{g L}^{-1}$  OTA, a u crvenim i rosé vinima, proizvedenim u Europi i Južnoj Africi čak i više (Belli i sur., 2004; Burdaspal i Legarda, 1999; Pietri i sur., 2000; Sage i sur., 2002; Shepard i sur., 2003; Stefanaki i sur., 2003). Međunarodna organizacija za lozu i vino (eng. *International Organisation of Vine and Wine*, OIV) utvrdila je 2002. godine maksimalnu koncentraciju OTA od  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  za vina počevši od berbe 2005. godine zadržavajući mogućnost snižavanja postavljene granice. Kako bi se zaštitilo zdravlje potrošača od rizika izloženosti okratoksinu A, poželjna je primjena metoda koje bi smanjile koncentracije OTA. Nekoliko se istraživanja usredotočilo na smanjenje OTA u moštu i vinima, a predloženi su postupci dekontaminacije koji se temelje na fizikalnom, kemijskom ili biološkom uklanjanju (Castellari i sur., 2001; Gambuti i sur., 2005; Garcia Moruno i sur., 2005).

#### **5.3.1. Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasca na koncentraciju OTA u mediju**

Sve je više znanstvenih istraživanja usmjereno na uklanjanje mikotoksina mikrobnim kulturama, a među tim potencijalnim mikroorganizmima sposobnost stanica kvasaca da apsorbiraju mikotoksine (Yiannikouris i sur., 2003; 2004) potaknula je znanstvenike i usmjerila istraživanja vezana uz uklanjanje OTA iz različitih medija u smjeru primjene kvasaca kao sredstava biološke dekontaminacije OTA.

Budući da mikrobiološke metode razgradnje OTA nisu dovoljno istražene, predložen je model prema koje se mehanizam vezanja mikotoksina odvija u dva procesa: vezanje (adsorpcija) i otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice, a efikasnost vezanja ovisi o soju mikroorganizama, količini mikotoksina, okolišnim uvjetima (pH vrijednost) i stabilnosti mikroorganizam-mikotoksin kompleksa.

Jedan od ciljeva ovog doktorskog rada bio je ispitati sposobnost uklanjanja OTA različitim sojevima vinskih kvasaca u *in vitro* uvjetima tijekom 24 sata uzgoja u YPG mediju. Rezultati su prikazani na slikama 23 i 24. Početna koncentracija OTA u YPG mediju iznosila je 2, odnosno  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Prema rezultatima na slici 23 je vidljivo kako sposobnost vezanja OTA ovisi o vremenu uzgoja i soju primijenjenog kvasca. Primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 5, nakon 24 sata početna koncentracija OTA ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) je smanjena za 37,6 %, dok je istim kvascem nakon 12 sati inkubacije, vezano 21,3 % OTA. Također, vidljivo je kako se povećanjem postotka vezanja OTA (slika 23) smanjuje promjer stanica kvasca *S. cerevisiae* 5 nakon 12 odnosno 24 sata uzgoja (slika 9) dok se broj živih stanica (slika 16) u prisutnosti  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA povećava.

Ista je situacija kada se radi o promjeru i broju živih stanica, uočena u uzorku s kvascem *P. guilliermondii* (slika 15 i 22). Vidljivo je također kako u uzorcima s kvascima *S. uvarum* i *H. uvarum* tijekom povećanja vezanja OTA ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) s vremenom uzgoja, dolazi i do povećanja promjera i broja stanica (slike 10, 14, 17 i 21). Kod preostalih kvasaca, *S. bayanus*, *K. marxianus* i *S. cerevisiae* DSMZ je vidljivo da porast broja živih stanica (slike 18, 19 i 20) ne dovodi do značajne razlike u postotku vezanja OTA nakon 12 i 24 sata uzgoja, dok je promjer stanica navedenih kvasaca gotovo jednak (slike 11, 12 i 13). S obzirom na to da su izmjerene koncentracije proizvedenog etanola u svim uzorcima veće nakon 24 sata u odnosu na 12 sati uzgoja uz dodatak  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA (tablica 8), vidljivo je kako vezanje OTA na stanice kvasca nema značajan utjecaj na proizvodnju etanola (slika 23). Jedini izuzetci su uzorci s kvascem *S. cerevisiae* DSMZ u kojima je nakon 24 sata izmjerena manja koncentracija etanola u usporedbi s 12 sati (tablica 8) što bi značilo da je unatoč maloj razlici u postotku vezanja OTA (slika 23), kvasac *S. cerevisiae* DSMZ ipak osjetljiviji od preostalih ispitivanih kvasaca.

Kada je riječ o ispitivanju utjecaja kvasaca na OTA koncentracije  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , vidljivo je da i u ovom slučaju kvasac *S. cerevisiae* 5 pokazuje najveću sposobnost vezanja OTA, 25 % nakon 12 sati, odnosno 36,3 % nakon 24 sata (slika 24). Zanimljivo je kako nakon 24 sata uzgoja dolazi do boljeg vezanja OTA dok se promjer i broj stanica kvasca *S. cerevisiae* DSMZ smanjuje (slike 9 i 16). Od preostalih ispitivanih uzoraka ističe se kvasac *K. marxianus* koji je vezao značajno više OTA nakon 12 sati (25 %) u odnosu na 24 sata (14 %) te nije došlo do promjene veličine stanica (slika 12) dok je broj živih stanica bio neznajno manji nakon 12 h uzgoja (slika 19), što dovodi do zaključka kako broj živih stanica nema značajan utjecaj na sposobnost vezanja OTA. Kvasci *S. bayanus* i *S. cerevisiae* DSMZ pokazuju neznatnu razliku u vezanju OTA nakon 12 i 24 sata uzgoja iako se promjer stanica smanjuje (slika 11 i 13), a broj živih stanica raste (slika 18 i 20). Štoviše, ovakvi podaci upućuju na sposobnost navedenih kvasaca prema biotransformaciji OTA. Iako je postotak vezanja OTA u uzorcima s kvascem *P. guilliermondii* manji u usporedbi s preostalim kvascima, vidljivo je kako nakon 12 odnosno 24 sata uzgoja *P. guilliermondii* veže 7, odnosno 14 % OTA što predstavlja značajnu razliku u vezanju (slika 24). Kako se promjer stanica značajno ne mijenja (slika 15), a broj živih stanica se povećava (slika

22), moglo bi se zaključiti kako je u ovom slučaju vezanje OTA uvjetovano brojem živih stanica kvasca. Kada se uspoređuje sposobnost vezanja OTA sa sposobnošću kvasaca da proizvode etanol uz dodatak OTA vidljivo je kako sposobnost vezanja OTA ispitivanih kvasaca nije povezana s njihovom sposobnošću proizvodnje etanola budući da su u svim uzorcima nakon 24 sata uočene više koncentracije etanola, uz izuzetak uzorka s kvascem *S. cerevisiae* DSMZ koji je uz neznčajnu razliku u vezanju OTA nakon 24 sata uzgoja ipak proizveo znatno manje koncentracije etanola (tablica 8).

Kako je vidljivo iz tablice 17, ANN je građena od 3 ulaza, 2 izlaza i 10 neurona u skrivenom sloju dok su u tablici 18 prikazane  $R^2$  vrijednosti za treniranje, testiranje i validaciju svakog pojedinog izlaznog parametra kako bi se bolje vidjela predviđanja ANN pojedinih izlaznih parametara (koncentracije OTA). Prema dobivenim rezultatima vidljivo je kako ANN može povezati eksperimentalne podatke i preciznije predvidjeti što će se događati s koncentracijom OTA u postavljenim uvjetima.

Iz tablice 19 je uočljivo da početna koncentracija OTA ( $X_3$ ) ima pozitivna značajan utjecaj na koncentraciju preostalog OTA u mediju te je koeficijent determinacije vrlo visok (0,9224) što znači da između modela i eksperimenta postoji izuzetno visoko slaganje, odnosno, pomoću korištenog modela moguće je predvidjeti koliko će se OTA vezati/ukloniti iz medija.

S obzirom na rezultate metodologije odzivnih površina prikazanih na slici 39a, vidljivo je kako sposobnost vezanja OTA ovisi o vrsti primijenjenog kvasca, budući da se tijekom 24 sata uzgoja koncentracija OTA smanjuje ovisno o vrsti primijenjenog kvasca.

Kada se radi o biološkom uklanjanju OTA iz različitih laboratorijskih medija ili prehrambenih medija, postoji nekoliko istraživanja koja su pokazala obećavajuće rezultate s potencijalnom industrijskom primjenom (Piotrowska i Zakowska, 2000; Skrinjar i sur., 2002). Daljnjim su istraživanjima ispitivane sposobnosti različitih sojeva vinskih kvasaca za uklanjanje OTA iz različitih medija. Tako su Piotrowska i suradnici (2013) pokazali kako je primjenom komercijalnih sojeva vinskih kvasca iz roda *Saccharomyces* moguće smanjiti koncentraciju OTA za više od 80 % ako se proces odvija u prirodnom mediju, konkretno soku od grožđa. Istovremeno, pokazali su kako je u YPG mediju moguće smanjiti koncentraciju OTA za 21 – 35 %, što se podudara s podacima ovog istraživanja (slika 23 i 24). Uz to, istražili su mogućnost smanjenja koncentracije OTA u soku crnog ribiza i uočili značajnu razliku između dva primijenjena soja te su zaključili kako smanjenje koncentracije OTA ovisi o soju upotrijebljenog kvasca i mediju u kojem se ispituje. Bejaoui i suradnici (2004) su paralelno istraživali utjecaj termičkog tretmana stanica kvasaca iz roda *Saccharomyces* na njihovu sposobnost smanjenja koncentracije OTA u YPG mediju. Pokazali su kako termički tretirane

stanice pokazuju veći utjecaj na sposobnost smanjenja koncentracije OTA (90 %) u usporedbi s ne tretiranim stanicama (35 %) te su tako ukazali da se radi o fizičkom vezanju OTA na stanice kvasca, a da pri tom gustoća stanica igra značajnu ulogu u smanjenju koncentracije OTA. Taheur i suradnici (2017) su nakon svog istraživanja u kojem su ispitali sposobnosti vezanja, biotransformacije i otpuštanja različitih mikotoksina, zaključili kako fizičko vezanje mikotoksina ovisi o egzopolisaharidima proizvedenim od strane korištenih mikroorganizama ili o sastavu stanične stijenke samih mikroorganizama, ali i o mediju u kojem se provodi ispitivanje, karakteristikama soja te na posljetku i o tipu mikotoksina. Također, pokazali su kako je proces vezanja mikotoksina reverzibilan, no unatoč tome, soj kvasca koji je korišten tijekom istraživanja (*Kazachstania sevazii* KFGY7) zadržao je oko 50 % dodanog OTA, a autori predviđaju kako njihov ispitivani soj kvasca može zadržati OTA dovoljno dugo, kako bi u konačnici bio izbačen putem fecesa.

Da komponente stanične stijenke kvasca igraju značajnu ulogu u vezanju mikotoksina pokazano je proučavanjem *in vitro* biosorpcije OTA vinazom koja sadrži stanične stijenke kvasca, pročišćenim  $\beta$ -glukanom kvasca i frakcijama stanične stijenke sušenog kvasca (Ringot i sur., 2005). Frakcije stanične stijenke sušenog kvasca pokazale su se najučinkovitijim u adsorpciji OTA, a takvu pojavu autori su povezali s prisutnošću  $\beta$ -D-glukana (Yiannikouris i sur., 2006), glukomanana (Raju i Devegowda, 2002) te manoproteina i manooligosaharida (Oguz i Parlat, 2004). Termički tretman stanica kvasaca može prouzročiti promjene u površinskim svojstvima stanica poput denaturacije proteina ili stvaranja produkata Maillardovih reakcija, a takve stanice bi posljedično mogle posjedovati više mjesta za adsorpciju mikotoksina u usporedbi s netretiranim stanicama (Piotrowska i sur., 2013).

Nadalje, postoje radovi koji pokazuju kako kvasci mogu smanjiti koncentraciju OTA tijekom alkoholne fermentacije poput vrenja ili vinifikacije. Cecchini i suradnici (2006) su proveli istraživanje u kojem su pratili utjecaj različitih sojeva kvasaca na koncentraciju OTA tijekom proizvodnje bijelog i crnog vina, odnosno tijekom fermentacije bijelog i crnog mošta. Uočili su kako je koncentracija OTA smanjena do 52 % u bijelom, odnosno 70 % u crnom vinu. Budući da se na kraju fermentacije početni sadržaj OTA značajno smanjio, a tijekom procesa nisu pronađeni razgradni produkti OTA, autori su zaključili kako je koncentracija OTA smanjena zahvaljujući fizičkom vezanju na površinu stanica kvasaca. Dobiveni rezultati se mogu usporediti s istraživanjima drugih autora (Garcia Moruno i sur., 2005) koji su pokazali da primjena aktivnog suhog kvasca u crvenim vinima smanjuje koncentraciju OTA za 23,2 % nakon tretmana od 24 sata. Značajno je kako su Garcia Moruno i sur. (2005) dokazali da smanjenje koncentracije OTA u crnom vinu ovisi o količini primijenjenog aktivnog suhog

kvasca. Tako su, primijenivši 4 g L<sup>-1</sup> aktivnog suhog kvasca smanjili koncentraciju OTA za 80%, ali je tretman trajao 80 dana. Nasuprot tome, primjenom 1 g L<sup>-1</sup> aktivnog suhog kvasca smanjili su koncentraciju OTA za 36,8 % tijekom tretmana od 55 dana.

### 5.3.2 Utjecaj odabranih sojeva vinskih kvasaca na biorazgradnju OTA

Biorazgradnja OTA od strane mikroorganizama vrlo je učinkovit, specifičan i ekološki prihvatljiv način koji predstavlja obećavajuću strategiju za kontrolu OTA u hrani i hrani za životinje. Najvažniji mehanizam biorazgradnje OTA je nastajanje netoksičnih spojeva L-β-fenilalanin i OTα koji nastaju hidrolizom amidne veze, ali može doći i do hidrolize laktoskog prstena pri čemu nastaje OTA s otvorenim laktoskim prstenom (OP-OTA) koji je slične toksičnosti kao OTA (Karlovsy, 1999; Li i sur., 1997; Xiao i sur., 1996).

Iako se OTA osim u OTα i OP-OTA može biotransformirati i u druge produkte, u ovom istraživanju je multimikotoksinskom analizom dokazana prisutnost samo OTC kao biorazgradnog produkta OTA. U nekim uzorcima nije bilo moguće kvantificirati razgradne produkte što ne znači nužno da nisu prisutni, već da su ispod limita detekcije (slike 26 – 32).

U ovom istraživanju u pokusima s 2 μg mL<sup>-1</sup> OTA u podlozi, samo su kvasci *S. cerevisiae* 5 i *S. bayanus* pokazali sposobnost razgradnje OTA do OTC i nakon 12 i nakon 24 sata uzgoja. Na slikama 26 i 28 je prikazan usporedni prikaz koncentracije OTC kao biorazgradnog produkta OTA, preostala koncentracija OTA te koncentracija nedefiniranih spojeva. S obzirom na to da je nakon 12 h uzgoja kvasca *S. cerevisiae* 5 vezano manje OTA u odnosu na 24 sata (slika 23) logično je da je koncentracija OTC veća nakon 12 sati uzgoja (0,254 μg mL<sup>-1</sup>), u odnosu na 24 sata (0,081 μg mL<sup>-1</sup>), jer je više OTA dostupno za biorazgradnju (slika 26). Ista je situacija uočena u uzorcima s kvascem *S. bayanus* iako su postotci vezanja OTA (slika 23), a samim time i koncentracije OTC (0,115, odnosno 0,030 μg mL<sup>-1</sup>), manje (slika 28). U uzorcima s kvascima *S. uvarum*, *S. cerevisiae* DSMZ te *H. uvarum* detektirana je prisutnost OTC (0,333, 0,276 odnosno 0,374 μg mL<sup>-1</sup>) samo nakon 12 sati uzgoja (slika 27, 30 i 31). Vidljivo je kako se postotak vezanog OTA povećava s vremenom uzgoja (slika 23), kako se koncentracija preostalog OTA u mediju smanjuje (slika 27, 30 i 31). Također, s obzirom na to da je manje OTA vezano nakon 12 sati uzgoja, detektiran je i OTC kao razgradni produkt. Ovakvi rezultati upućuju na sposobnost kvasaca prema razgradnji OTA do OTC u kratkom periodu (12 sati), dok se povećanjem vremena uzgoja (24 sata), a samim time i kontakta između kvasaca i OTA, mogućnost njegove razgradnje do OTC smanjuje, što su pokazali i rezultati dobiveni metodom odzivnih površina (slika 39b). Produkti koji su nastali nakon 24 sata uzgoja, a nisu definirani,

ispod su razina detekcije (slika 25). Zanimljivo je kako kvasac *K. marxianus* ne pokazuje sposobnost razgradnje OTA do OTC (slika 29) iako su postotci vezanja OTA približno slični kvascima *S. bayanus* i *S. cerevisiae* DSMZ pa čak i *H. uvarum* (slika 23). S druge strane, u uzorku s kvascem *P. guilliermondii*, OTC je detektiran tek nakon 24 sata uzgoja ( $0,043 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), a s obzirom na rezultate vezanja OTA (slika 23), može se zaključiti kako navedeni kvasac, nakon 12 sati uzgoja ima vrlo malu sposobnost vezanja OTA, uz minimalnu razgradnju do OTC nakon 24 sata (slika 32).

Istovremeno se ispitivao utjecaj kvasaca na koncentraciju  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  OTA u mediju. Prema prikazanim rezultatima, najveća koncentracija OTC nakon 12 sati uzgoja ( $0,737 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) detektirana je u uzorku s kvascem *S. uvarum* (slika 27). S obzirom na to da su postotci vezanja OTA nakon 12 sati uzgoja približno slični s uzorcima u kojima su korišteni kvasci *S. cerevisiae* DSMZ i *H. uvarum* (slika 24), očekivana je i slična koncentracija OTC. Ipak, budući da se radi o različitim vrstama kvasaca, različite su i koncentracije detektiranog OTC ( $0,520$ , odnosno  $0,466 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (slika 30 i 31). No u svim navedenim uzorcima zabilježen je značajan pad u koncentraciji OTC nakon 24 sata uzgoja (slika 27, 30 i 31) iako se postotak vezanog OTA nije značajno smanjio (slika 24). S obzirom na prikazanu sposobnost vezanja OTA pomoću kvasca *S. cerevisiae* 5, detektirane su i određene koncentracije OTC. Kako je nakon 24 sata uzgoja zabilježen veći postotak vezanog OTA, tako je uočena i manja koncentracija OTC, usporede li se iste vrijednosti nakon 12 sati uzgoja (slika 24 i 26). Kvasac *S. bayanus*, prema prikazanim rezultatima vezanja OTA (slika 24) pokazuje osrednju sposobnost vezanja OTA, a isto tako i razgradnje OTA do OTC ( $0,253$ , odnosno  $0,147 \mu\text{g mL}^{-1}$  nakon 12 odnosno 24 sata uzgoja) (slika 28). Kvasac *K. marxianus* pokazuje relativno uspješno vezanje OTA nakon 12 sati (slika 24) te je detektirana vrlo niska koncentracija OTC ( $0,051 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), dok s produljenjem vremena uzgoja, sposobnost vezanja OTA i razgradnje OTA opada (slika 24 i 29). Na posljetku, iz slike 24 je jasno vidljiva slaba sposobnost vezanja OTA pomoću kvasca *P. guilliermondii*, a detektirane su i vrlo niske koncentracije OTC ( $0,061$ , odnosno  $0,047 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (slika 32).

Iz tablice 19 je uočljivo da početna koncentracija OTA ( $X_3$ ) ima pozitivan značajan utjecaj na koncentraciju OTC, što znači da veća koncentracija OTA direktno omogućuje i veću koncentraciju OTC kao razgradnog produkta.

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je kako ANN može povezati eksperimentalne podatke i predvidjeti što će se dogoditi s koncentracijom OTC u postavljenim uvjetima, no u usporedbi s predikcijom vezanja/uklanjanja OTA, promjene koncentracije OTC nije moguće tako precizno predvidjeti. Također, budući da su  $R^2$  vrijednosti treninga, testa i validacije za koncentraciju

OTC manje nego za koncentraciju OTA, jasno je kako one direktno utječu na pogreške treninga, testa i validacije ANN te negativno utječu na predviđanje mreže (tablica 18).

Slika 39b pokazuje kako je koncentracija razgradnje OTA do OTC ovisna o vremenu uzgoja, s obzirom na to da su koncentracije OTC najviše na početku uzgoja kod svih korištenih sojeva kvasaca, a s povećanjem vremena uzgoja, značajno se smanjuje. Budući da se koncentracije OTC na početku uzgoja značajno razlikuju u ovisnosti o primijenjenom soju kvasca, prilikom optimiranja procesa razgradnje OTA do OTC, valja uzeti u obzir i vrstu kvasca te što manje vrijeme uzgoja. Prilikom optimiranja parametara u programu je bilo zadano da su ulazne varijable vrsta kvasca, vrijeme uzgoja i koncentracija OTA, dok su izlazne varijable bile koncentracija preostalog OTA te koncentracija OTC nastalog razgradnjom OTA. Dobiveni rezultat predikcije koji ima poželjnost (eng. *desirability*) 100% pokazuje kako bi najmanju koncentraciju preostalog OTA, odnosno najveću sposobnost razgradnje OTA do OTC bilo moguće dobiti primjenom kvasca *S. cerevisiae* 5, tijekom uzgoja od 36 minuta ako je početna koncentracija OTA od 3,85  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Velik broj kvasaca, a među njima i *S. cerevisiae*, su opisani kao agensi za biorazgradnju, ali u većini istraživanja zapravo dolazi do mehanizma adsorpcije OTA za staničnu stijenkku kvasca. Tako su Piotrowska i Zakowska (2000) naveli kako kvasac *S. cerevisiae* može biorazgraditi 41% od 0,3 mg L<sup>-1</sup> OTA nakon 24 sata na 30 °C, ali nisu naveli detalje o uključenom mehanizmu. Slično, Böhlm i suradnici (2000) su bez opisa rezultirajućih razgradnih metabolita naveli kako neki sojevi kvasaca *S. cerevisiae* mogu razgraditi do 38 % OTA. Rezultati ovog istraživanja razlikuju se od rezultata drugih autora jer je razgrađeno najviše 18% od dodanog OTA. S druge strane, neka su istraživanja naglasila utjecaj mehanizma biorazgradnje OTA pa tako na primjer, kvasci iz rodova *Trichosporon*, *Rhodotorula* i *Cryptococcus* pokazuju sposobnost razgradnje OTA cijepanjem amidne veze i oslobađanjem OTα (Schatzmayr i sur., 2003). U navedenom istraživanju najefikasniji soj je razgradio 100 % od dodanog OTA (0,2 mg L<sup>-1</sup>) nakon samo 5 sati inkubacije na 35 °C. Zbog svoje izvanredne sposobnosti detoksikacije OTA, ali i zearalenona, kvasac *Trichosporon mycotoxinivorans* je naknadno klasificiran kao nova vrsta (Molnar i sur., 2004). Navedeni soj kvasca je uspješno suzbio neke od toksičnih učinaka OTA na domaću stoku, poput smanjenja težine (Hofstetter i sur., 2006 ) i narušavanja imunološkog sustava (Politis i sur., 2005), međutim, novije istraživanje definiralo je *T. mycotoxinivorans* kao novi ljudski patogen povezan s cističnom fibrozom i smrću pacijenta s dokumentiranom trihosporonoskom upalom pluća. Iz tog su se razloga postavila sigurnosna pitanja i praktična upotreba navedenog kvasca (Hickey i sur., 2009). U svom istraživanju Peteri i sur. (2007) su pokazali kako *Phaffia rhodozyma* može razgraditi 90%

dodanog OTA ( $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) nakon 15 dana na  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  budući da su provjerili transformaciju OTA u OT $\alpha$  kao i adsorpciju OTA živim i termički obrađenim stanicama. Također, otkriveno je da sveprisutni kvasac *Aureobasidium pullulans* razgrađuje OTA hidrolizom amidne veze budući da je pronađen OT $\alpha$ , a njegova upotreba kao kvasca za biološku kontrolu je razmatrana budući da smanjuje koncentraciju OTA u grožđu i vinu (de Felice i sur., 2008). No, *A. pullulans* predstavlja zdravstveni rizik prema ljudima pa općenitija upotreba ovog kvasca nije preporučena (Hawkes i sur., 2005).

U literaturi su zabilježeni brojni mikroorganizmi koji mogu razgraditi, adsorbirati i detoksicirati OTA, a čak su razvijeni i neki praktični postupci, no oni uglavnom uključuju primjenu izoliranih i pročišćenih raznih proteolitičkih enzima.

### **5.3.3. Toksičnost biorazgradnih produkata OTA**

S obzirom na brojna toksična svojstva OTA tijekom izrade ovog doktorskog rada ispitana je toksičnost biorazgradnih produkata OTA. Iako OTC, kao razgradni produkt OTA, nije detektiran u svim istraživanim uzorcima (tablice 12 i 13), ispitana je toksičnost svih uzoraka. Visoka stopa preživljavanja Pk15 stanica (>98 %) nakon tretmana svim ispitivanim uzorcima (rezultati nisu prikazani), upućuje na: (i) izuzetnu otpornost Pk15 stanica, što je moguće ovisno o njihovom uzgoju i mutaciji odnosno (ii) primijenjena doza OTA nije toksična pa je potrebno analizirati veći raspon koncentracija OTA, po mogućnosti izložiti Pk15 stanice višim koncentracijama OTA. No valja naglasiti, kako je i vidljivo na slikama 26-32, da je koncentracija OTA u uzorcima nakon 12 i 24 sata uzgoja manja u odnosu na izvorno dodanu koncentraciju OTA pa je i to jedan od faktora koji doprinose visokoj stopi preživljavanja Pk15 stanica. Također, koncentracija OTC u uzorcima ili nije detektirana ili je detektirana u malim količinama, ovisno o početnoj koncentraciji dodanog OTA. Istraživanja Šegvić Klarić i sur. (2007) potvrđuju da je Pk15 stanice potrebno izložiti višim koncentracijama OTA pa su istraživanja proveli kombinacijom mikotoksina FB<sub>1</sub>, BEA (beauvericin) i OTA u koncentracijama  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  i postigli smanjenje preživljavanja Pk15 stanica za 35%.



## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave, izvedeni su sljedeći zaključci:

- 1) U prisutnosti OTA kvasci su pokazali određenu osjetljivost, ali su se i prilagodili stresnim uvjetima, jer OTA nije imao značajan utjecaj na veličinu stanica kvasca, broj živih stanica kvasca te na koncentraciju fermentacijskih produkata.
- 2) Kvasci *Kluyveromyces marxianus* i *Pichia guilliermondii* su pokazali otpornost i prilagodbu na prisutnost OTA budući da se veličina stanica tijekom cijelog vremena uzgoja u odnosu na kontrolni uzorak nije značajno mijenjala, dok je kod ostalih kvasaca utjecaj OTA na veličinu stanica ovisio o soju kvasca, vremenu uzgoja i koncentraciji dodanog OTA.
- 3) Utjecaj OTA na broj živih stanica kvasaca se očituje kroz produljenje lag faze koja se u ovisnosti o soju kvasca i koncentraciji OTA kretala od 6. do 12. sata, dok se do kraja pokusa broj živih stanica u uzorcima s dodanim OTA u odnosu na kontrolu nije značajno razlikovao.
- 4) Prisutnost OTA u mediju nema značajan učinak na sposobnost proizvodnje etanola i ostalih fermentacijskih produkata iako je kod kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ i *Pichia guilliermondii* u prisutnosti OTA, za razliku od kontrole, primijećena proizvodnja octene odnosno mravlje kiseline u koncentracijama 0,590 mg mL<sup>-1</sup>, odnosno 0,860 mg mL<sup>-1</sup>.
- 5) Budući da je prvi puta ispitivan utjecaj OTA na koncentraciju parametara oksidativnog stresa (GSH i MDA) u stanicama kvasaca, dokazano je da pri većim koncentracijama OTA dolazi do pojave oksidativnog stresa što se očituje u povećanju koncentracija GSH i MDA, no dužim vremenom uzgoja kvasci razvijaju adaptivni odgovor.
- 6) Svi odabrani vinski kvasci su pokazali sposobnost vezanja/uklanjanja OTA iz medija, a kao najbolji kvasac pokazao se *Saccharomyces cerevisiae* 5, koji je vezao između 21 – 38 % OTA.
- 7) Multimikotoksinskom analizom detektirana je prisutnost samo OTC kao biorazgradnog produkta OTA. Od odabranih vinskih kvasaca samo su kvasci *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ, *Hanseniaspora uvarum* i *Saccharomyces uvarum* pokazali sposobnost biorazgradnje OTA do OTC, pri čemu vrijeme uzgoja igra ključnu ulogu u biorazgradnji OTA.
- 8) OTA u koncentracijama 2 i 4 µg mL<sup>-1</sup> kao i nastali OTC nisu toksični za Pk15 stanice budući da su stanice pokazale visoku stopu preživljenja od 98 – 99 %.
- 9) Dijagrami metodologije odzivnih površina (RSM) te predikcija optimalnih uvjeta dobro opisuju eksperimentalne podatke i uvjete koji bi trebali biti optimalni u provedenim pokusima.

10) Umjetne neuronske mreže (ANN) pokazale su se uspješnima pri koreliranju ulaznih i izlaznih parametara pokusa te je dobivena baza podataka na temelju koje se u sljedećim eksperimentima mogu predvidjeti određene vrijednosti izlaznih varijabli.

11) Dobiveni rezultati su pokazali da odabrani sojevi vinskih kvasaca pokazuju potencijalnu primjenu s ciljem uklanjanja i biorazgradnje OTA.

## **7. POPIS LITERATURE**

- Abd El-Haleem, M.R., Kattaia, A.A.A., Abd El-Baset, S.A., Mostafa, H.E. (2016) Alleviative effect of myricetin on ochratoxin A-induced oxidative stress in rat renal cortex: histological and biochemical study. *Histology and Histopathology*, **31**, 441–451.
- Abdel-Wahhab, M.A., Aljawish, A., El-Nekeety, A.A., Abdel-Aziem, S.H., Hassan, N.S. (2017) Chitosan nanoparticles plus quercetin suppress the oxidative stress, modulate DNA fragmentation and gene expression in the kidney of rats fed ochratoxin A contaminated diet. *Food and Chemical Toxicology*, **99**, 209–221.
- Abrunhosa, L., Serra, R., Venancio, A. (2002) Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 7493-7496.
- Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V. Korhonen, H.J. (2015) Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, **207**, 87–102.
- Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., Hittinger, C.T., Gonçalves, P., Sampaio, J.P. (2014) A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nature Communications*, **5**, 4044.
- Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., Carbas, P. (2007) *In vitro* interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 2043-2048.
- Aranda, A., Matallana, E., Del Olmo, M. (2011) *Saccharomyces* yeasts I: Primary fermentation. U: Carrascosa, A., Munoz, R., González, R. (ured.) *Molecular wine microbiology*, Elsevier, str. 1-31.
- Arroyo-López, F.N., Pérez-Través, L., Querol, A., Barrio, E. (2011) Exclusion of *Saccharomyces kudriavzevii* from a wine model system mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **28**, 423–435.
- Arroyo-López, F.N., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Guillamón, J.M., Barrio, E., Querol, A. (2010) Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast*, **27**, 1005-1015.

- Ayala, A., Muñoz, M., Argüelles, S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, **2014**, 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. *Archives of Microbiology*, **136**, 203-208.
- Bachhawat, A.K., Ganguli, D., Kaur, J., Thakur, N.K.A., Kaur, H., Kumar, A., Yadav, A. (2009) Glutathione production in yeast. U: Yeast biotechnology: diversity and applications, Springer, 259-280.
- Banat, I.M., Nigam, P., Marchant, R. (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**(3), 259–263.
- Barata, A., Nobre, A., Correia, P., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2006) Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57**, 133-138.
- Barnett, J.A. (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. Review. *Yeast*, **16**(8), 755-771.
- Barron, N., Marchant, R., McHale, L., McHale, A. P. (1995) Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol formation from cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, 518–520.
- Battilani, P., Pietri, A. (2002) Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 639–643.
- Bedriñana, R.P., Alonalmeidaso, J.M., Valles, B.S. (2017) Evaluation of autochthonous *Saccharomyces bayanus* strains under stress conditions for making ice ciders. *LWT-Food Science and Technology*, **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* strains. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 1038-1044.

- Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S. (2004) Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, **38**,72–77.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 8597-8609.
- Bertolini, L., Zambonelli, C., Giudici, P., Castellari, L. (1996) Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**, 343–345.
- Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., Bennett, J.W. (1991) Biological detoxification of mycotoxins. U: Smith, J.E., Henderson, R.S. (ured.) *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press, str. 816–826.
- Bisson, L., van de Water, L. (2010) *Brettanomyces* infection in wine. U: Butzke, C.E., (ured.) *Winemaking Problems Solved*, Elsevier, str. 290-344.
- Böhm, J., Grajewski, J., Asperger, H., Cecon, B., Rabus, B., Razzazi, E. (2000) Study on biodegradation of some A- and B-trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin Research*, **16**(1), 70-74.
- Bosco, F., Mollea, C. (2012) *Mycotoxins in Food*. U: Valdez, B. (ured.) *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*, IntechOpen, str. 169-200.
- Boudergue, C., Burel, C., Dragacci, S., Favrot, M., Fremy, J., Massimi, C., Prigent, P., Debongnie, P., Pussemier, L., Boudra, H. Morgavi, D., Oswald, I., Perez, A., Avantaggiato, G. (2009) Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications*, **6**(9), 110-111.
- Brady, D., Marchant, R., McHale, L., McHale, A. (1994) Production of ethanol by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. *Biotechnology Letters*, **16**, 737–740.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. (1999) Ochratoxin A in wines and grapes products originating from Spain and other European countries. *Alimentaria*, **36**, 107–113.

Cabanes, F.J., Accensi, F., Bragualt, M.R., Abarca, M.L., Minguez, G., Pons, S. (2002) What is the source of ochratoxin A in wine. *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 213-215.

Cadez, N., Smith, M.T. (2011) *Hanseniaspora* Zikes (1912), U: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (ured.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Elsevier, str. 421-434.

Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P. (2010) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **144**, 187–192.

Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G.P., Galassi, S. (2001) Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3917–3921.

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 Microbiology*, **23**(5), 411-417.

Chandra, K., Salman, A.S., Mohd, A., Sweet, R., Ali, K.N. (2015) Protection Against FCA Induced Oxidative Stress Induced DNA Damage as a Model of Arthritis and *In vitro* Anti-arthritic Potential of *Costus speciosus* Rhizome Extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **7**(2), 383-389.

Chen, W., Li, C., Zhang, B., Zhou, Z., Shen, Y., Liao, X., Yang, J., Wang, Y., Li, X., Li, Y., Shen, X.L. (2018) Advances in Biodetoxification of Ochratoxin A-A Review of the Past Five Decades. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1-11.

Chiodini, A.M., Scherpenisse, P., Bergwerff, A.A. (2006) Ochratoxin A Contents in Wine: Comparison of Organically and Conventionally Produced Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(19), 7399-7404.

Ciani, M., Fatichenti, F. (1999) Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, **28**(3), 203-206.



Ciani, M., Maccarelli, F. (1997) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**(2), 199-203.

Ciani, M., Picciotti, G. (1995) The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, **17**, 1247–1250.

Commission Regulation 2015/786/EU Defining Acceptability Criteria for Detoxification Processes Applied to Products Intended for Animal Feed as Provided for in Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council. Available online: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/eur144560.pdf> (pristupljeno 3. listopada, 2020).

Costa, J.G., Saraiva, N., Guerreiro, P.S., Louro, H., Silva, M.J., Miranda, J.P., Castro, M., Batinic-Haberle, I., Fernandes, A.S., Oliveira, N.G. (2016) Ochratoxin A-induced cytotoxicity, genotoxicity and reactive oxygen species in kidney cells: an integrative approach of complementary endpoints. *Food and Chemical Toxicology*, **87**, 65–76.

Covarelli, L., Beccari, G., Marini, A., Tosi, L. (2012) A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. *Food Control*, **26**(2), 347-356.

De Andrés-De Prado, R., Yuste-Rojas, M., Sort, X., Andrés Lacueva, C., Torres, M., Lamuela-Raventós, R.M. (2007) Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L. cv. Grenache in commercial vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(3), 779-786.

de Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., Castoria, R. (2008) Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, **98**, 1261–1270.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **15**(4), 316-328.

Delaš, F. (2010) Mikrobni toksini. U: Hrvatska agencija za hranu: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Grafika, 31-49.

- Di Stefano, V., Pitonzo, R., Cicero, N., D'Oca, M.C. (2014) Mycotoxin contamination of animal feedstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **31**(12), 2034-2039.
- Domijan, A.M., Marjanović Čermak, A.M., Vulić, A., Tartaro Bujak, I., Pacičić, I., Pleadin, J., Markov, K., Mihaljević, B. (2019) Cytotoxicity of gamma irradiated aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **54**, 155-162.
- Domijan, A.-M., Pleadin, J., Mihaljević, B., Vahčić, N., Frece, J., Markov, K. (2015) Reduction of ochratoxin A in dry-cured meat products using gamma irradiation. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **32**(7), 1185-1191.
- 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 Research*, **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 Scientiarum Polonorum Biotechnologia*, **6**(3), 15–26.
- EC (2015) Commission Regulation 2015/786(EU), Defining Acceptability Criteria for Detoxification Processes Applied to Products Intended for Animal Feed as Provided for in Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council, *Official Journal of the European Union*, L123/10. Dostupno na: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/eur144560.pdf>. (pristupljeno 24.02.2020.).
- Eglinton, J.M., McWilliam, S.J., Fogarty, M.W., Leigh Francis, I., Kwiatkowski, M.J., Høj, P.B., Henschke, P.A. (2000) The effect of *Saccharomyces byanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **6**(3), 190-196.
- el Khoury, A., Atoui, A. (2010) Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, **2**, 461-493.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., Mykkänen, H. (2002) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3545–3549.

Esti, M., Benucci, I., Liburdi, K., Acciario, G. (2012) Monitoring of ochratoxin A fate during alcoholic fermentation of wine-must. *Food Control*, **27**(1), 53-56.

European Commission (2002) SCOOP task 3.2.7. Assessment of dietary intake by the population in EU Member States. European Commission, January 2002.

European Commission (2005) Commission regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, **25**, 3–5.

European Commission (2006) Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **364**: 5–24.

European Commission (2010) Regulation (EC) No. 105/2010 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union* **35**, 7–8.

European Commission (2012) Regulation (EC) No. 594/2012 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non-dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, **176**, 43–45.

European Commission (2015) Regulation (EU) No. 1137/2015 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards the maximum level of ochratoxin A in *Capsicum* spp. spices. *Official Journal of the European Union*, **185**, 11–12.

Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry*, **312**(2), 224-227.

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: Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., (ured.) *Molecular wine microbiology*, Elsevier, str. 112-129.

Flajs, D., Domijan, A.M., Ivić, D., Cvjetković, B., Peraica, M. (2009) ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control*, **20**(6), 590-592.

Fleet, G. H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 11-22.

Fleet, G.H. (1990) Growth of yeasts during wine fermentations. *Journal of Wine Research*, **1**, 211-223.

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

Fletcher, M.T., Blaney, B.J. (2016) Mycotoxins. U: Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K., (ured.) *Encyclopedia of Food Grains (2nd Edition)* Oxford Academic Press, str. 290–296.

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

Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**, 339–354.

Foszczyńska, B., Dziuba, E. (2007a) Physiological status of brewing yeast during fermentation of worts contaminated with mycotoxins, P.1: T-2 and ZEA. *Acta Scientarum Polonorum Biotechnologia*, **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 Scientarum Polonorum Biotechnologia*, **6**(2), 25–34.

Freire, L., Braga, P.A.C., Furtado, M.M., Delafiori, J., Dias-Audibert, F.L., Pereira, G.E., Sant’Ana, A.S. (2020) From grape to wine: Fate of ochratoxin A during red, rose, and white winemaking process and the presence of ochratoxin derivatives in the final products. *Food Control*, **113**, 107167.

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 and Chemical Toxicology*, **133**, 110756.

- Fuchs, R., Hult, K. (1992) Ochratoxin A in blood and its pharmacokinetic properties. *Food and Chemical Toxicology*, **30**(3), 201-204.
- Gallo, A., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mule, G., Visconti, A., Baker, S.E. (2012) New insight in the ochratoxin A biosynthetic pathway by deletion of an nrps gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(23), 8208-8218.
- Gambutì, A., Strollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A., Moio, L. (2005) Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **56**, 155–162.
- García Moruno, E., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., Di Stefano, R. (2005) Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **56**, 73–76.
- García-Pérez, E., Ryu, D., Lee, C., Lee, H.J. (2021) Ochratoxin A induces oxidative stress in HepG2 Cells by impairing the gene expression of antioxidant enzymes. *Toxins*, **13**, 271.
- Gautier, J.C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B., Turesky, R. J. (2001). Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, **30**(10), 1089–1098.
- Giovati L., Magliani W., Ciociola T., Santinoli C., Conti S., Polonelli L. (2015) AFM<sub>1</sub> in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins*, **7**, 4330-4349.
- González, R., Muñoz, R., Carrascosa, A. V. (2011) Production of Wine Starter Cultures, U: Carrascosa, A. V., Muñoz, R., González, R., (ured.) *Molecular wine microbiology*, 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 Research*, **6**(8), 1221-1234.
- Granchi, L., Ganucci, D., Messini, A., Rosellini, D., Vincenzini, M. (1998) Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of *Brunello di Montalcino* wines. *Food Technology and Biotechnology*, **36**, 313-318.

- Gross-Steinmeyer, K.G., Weymann, J., Hege, H.G., Metzler, M. (2002) Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 938-945.
- Hackbart, H.C.S., Machado, A.R., Christ-Ribeiro, A., Prietto, L., Badiale-Furlong, E. (2014) Reduction of aflatoxins by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*. *Mycotoxin Research*, **30**, 141–149.
- HAH (2012) Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatska <<https://www.hah.hr/znanstveno-misljenje-mikotoksini-u-hrani-za-zivotinje/>> (pristupljeno 27. ožujka 2021).
- Hassan, Y.I., Bullerman, L.B. (2013) Cell-surface binding of deoxynivalenol to *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from sourdough starter culture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **2**, 2323–2325.
- Hassan, Y.I., Zhou, T., Bullerman, L.B. (2015) Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology International*, **22**, 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*. *Microbial Cell Factories*, **10**(2), 1-13.
- Hathout, S.A., Aly, S.E. (2014) Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology*, **64**(3), 905-909.
- Hawkes, M., Rennie, R., Sand, C., Vaudry, W. (2005) *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **51**, 209–213.
- 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. *Biotechnology Letters*, **36**(3), 523-529.
- Hickey, P.W., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., Wickes, B.L., Schmidt, H.J., Walsh, T.J. (2009) *Trichosporon mycotoxinivorans*: A novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**, 3091–3097.

Hofstetter, U., Schatzmayr, D., Schatzmayr, G., Binder, E.M. (2006) Successful detoxification of ochratoxin A in weaning piglets. *Journal of Animal Science*, **84**, 308.

Huertas-Perez J.F., Arroyo-Manzanares N., Garcia-Campana A.M., Gamiz-Garcia L (2017) Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **57**(16), 3405-3420.

IARC (International Agency for Research on Cancer) 56/93, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. U: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

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 AFB<sub>1</sub>, OTA and ZEA. *Food Technology and Biotechnology*, **56**(2), 208-217.

Jamieson, D.J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 1511-1527.

Janero, D.R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, **9**, 515-540.

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 Additives and Contaminants: Part A*, **28**, 1590-1609.

Jensen, S.L., Umiker, N.L., Arneborg, N., Edwards, C.G. (2009) Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. *Food Microbiology*, **26**, 915-921.

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

Jørgensen, K. (2005) Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – A review of EU occurrence data, *Food Additives and Contaminants*, **22**, 26-30.

- Juodeikiene, G., Basinskiene, L., Bartkiene, E., Matusevicius, P. (2012) Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes. U: Structure and Function of Food Engineering (Ayman A.E., ured.), InTech, str. 171-204.
- Kamp, H.G., Eisenbrand, G., Schlatter, J., Würth, K., Janzowski, C. (2005) Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology*, **206**(3), 413-25.
- Kantor, A., Kačaniova, M., Kluz, M. (2015) Natural microflora of wine grape berries. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **4**(1), 32-36.
- Karlovsky, P. (1999) Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, **7**, 1–23.
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., Dussort, P. (2016) Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, **32**, 179-205.
- 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 Technology*, **101**(24), 9723-9727.
- Kreger-van Rij, N. J. W. (1984) *The Yeasts*, Amsterdam, Elsevier, str. 1-44
- Kritzinger, E.C., Bauer, F.F., Du Toit, W.J. (2013) Role of glutathione in winemaking: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 269–277.
- L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) (2002) *Reduction de L'Ochratoxine A dans les Vins*, Resolution CST 1/2002, Office International de la Vigne et du Vin, Paris, France.
- Li, S., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Crow, G. (1997) Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **145**, 82–90.
- Liu, F., He., Y., Wang., L., Sun., G. (2011) Detection of organic acids and pH of fruit vinegars using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Food and Bioprocess Technology*, **4**(8), 1331-1340.



- Liu, J., Wu, S., Shen, H., Cui, J., Wang, Y., Xing, L., Wang, J., Yan, X., Zhang, X. (2015) Ochratoxin A induces DNA damage and G2 phase arrest in human esophageal epithelium Het-1A cells *in vitro*. *Journal Toxicological Sciences*, **40**(5), 657-65.
- Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V.C., Logrieco, A.F., Mulè, G. (2017) Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins*, **9**(4), 1-31.
- Lopes, C.A., Jofré, V., Sangorrin, M.P. (2009) Spoilage yeasts in Patagonian winemaking molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. *Revista Argentina de Microbiologia*, **41**, 177-184.
- Lopes, C.A., Rodriguez, M.E., Sangorrin, M.P., Querol, A., Caballero, A.C. (2007) Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, **34**, 139-149.
- Lushchak, V.I. (2010) Oxidative stress in yeast. *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 281-296.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., Toman, J. (2016) Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*, **8**(7), 191.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Novotna, E. (2014) Ochratoxin A: Developmental and Reproductive Toxicity – An Overview. *Birth Defects Research (Part B)*, **98**, 493-502
- Mally, A., Zepnik, H., Wanek, P., Eder, E., Dingley, K., Ihmels, H., Volkel, W., Dekant, W. (2004) Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chemical Research in Toxicology*, **17**, 234-242.
- Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, **60**, 218–237.
- Marin-Kuan, M., Cavin, C., Delatour, T., Schilter, B. (2008) Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. *Toxicon*, **52**, 195–202.
- Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, **34**(2), 312-317.

- Martini, A. (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, **4**, 165-176.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M.T., Loureiro, V., Querol, A. (2006) Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, **106**, 79-84.
- Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., Dubourdiou, D. (2010) Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, **139**, 79–86.
- Mateo R., Medina A., Mateo E.M., Mateo F., Jimenez M. (2007) An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, **119**(1–2), 79-83.
- Medina, A., Rodriguez, A., Magan, N. (2014) Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B<sub>1</sub> production. *Frontiers in Microbiology*, **5**, 1-7.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N. (2004) Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 439–445.
- Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E., Prillinger, H. (2004) *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**, 661-671.
- Money N. P. (2016) *The Rise of Yeast: How the Sugar Fungus Shaped Civilisation*. Oxford University Press, str. 180-188.
- Montgomery, D.C. (2013) *Design and Analysis of Experiments. Student Solutions Manual*, 8. izd., John Wiley & Sons, str. 478-511.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, **124**(3), 231-238.
- Morrissey, J.P., Etschmann, M.M.W., Schrader, J., de Billerbeck, G.M. (2015) Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast*, **32**, 3–16.

- Naumova, E.S., Shalamitskiy, M.Y., Naumov, G.I. (2019) Molecular Polymorphism of Pectinase Genes PGU of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* Yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **55**(9), 882-887.
- Ng, W., Mankotia, M., Pantazopoulos, P., Neil, R.J., Scott, P.M. (2004) Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. *Food Additives and Contaminants*, **21**, 971–981.
- Nigović, B., Jurišić Grubešić, R., Vuković Rodriguez, J., Mornar Turk, A., Sertić, M. (2014) Analitika lijekova-Praktikum. Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, str. 36.
- Oguz, H., Parlat, S.S. (2004) Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis. *South African Journal of Animal Science*, **34**, 144–148.
- Ohtake, Y., Satou, A., Yabuuchi, S. (1990) Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**, 3145–3150.
- Ohtake, Y., Yabuuchi, S. (1991) Molecular cloning of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 953–961.
- Ospital, M., Cazabeil, J.M., Betbender, A.M., Tricard, C., Creppy, E.E., Medina, B. (1998) Ochratoxin A in wines. *Revue Française d'Oenologie*, **169**, 16-18.
- Otteneder, H., Majerus, P. (2000) Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, **17**(9), 793–798.
- Papon, N.; Courdavault, V.; Clastre, M.; Bennett, R.J. (2013) Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: Beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens*, **9**(9), e1003550.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003) Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333(1-2), 19-39.
- Patharajan, S., Reddy, K.R.N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M.L., Garibaldi, A. (2011) Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. *Food Control*, **22**(2), 290-296.

- Pereyra, C.M., Cavaglieri, L.R., Keller, K.M., Chiacchera, S.M., Rosa, C.A.D.R., Dalcero A.M. (2015) *In vitro* Ochratoxin A adsorption by commercial yeast cell walls. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, **37**(1), 1-4.
- Pérez-Torrado, R., González, S. S., Combina, M., Barrio, E., Querol, A. (2015) Molecular and enological characterization of a natural *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, **204**, 101–110.
- Periasamy, R., Kalal, I.G., Krishnaswamy, R., Viswanadha, V. (2016) Quercetin protects human peripheral blood mononuclear cells from OTA-induced oxidative stress, genotoxicity, and inflammation. *Environmental Toxicology*, **31**, 855–865.
- Perrone, B., Giacosa, S., Rolle, L., Cocolin, L., Rantsiou, K. (2013) Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **165**, 156–162.
- Peteri, Z., Teren, J., Vagvikgyi, C., Varga, J. (2007) Ochratoxin A degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, **24**, 205-210.
- Peteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C., Varga, J. (2007) Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, **24**, 205–210.
- Petrik, J., Zanic-Grubisic, T., Barisic, K., Pepeljnjak, S., Radic, B., Ferencic, Z., Cepelak, I. (2003) Apoptosis and oxidative stress induced by Ochratoxin A in rat kidney. *Archives of Toxicology*, **77**, 685–693.
- 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., Sinigaglia M., Bevilacqua A. (2014a) Yeast cells as adsorbing tools to remove ochratoxin A in a model wine. *International Journal of Food Science and Technology*, **49**(3), 936–940.
- Petruzzi, L., Bevilacqua, A., Baiano, A., Beneduce, L., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. (2014b) *In vitro* removal of ochratoxin a by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and their performances under fermentative and stressing conditions. *Journal of Applied Microbiology*, **116**, 60–70.

- Petruzzi, L., Corbo, M.R., Baiano, A., Beneduce, L., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2015) *In vivo* stability of complex ochratoxin A – *Saccharomyces cerevisiae* starter strains. *Food Control*, **50**, 516-520.
- Petruzzi, L., Sinigaglia, M., Corbo, R.M., Beneduce, L., Bevilacqua, A. (2013) Ochratoxin A removal by *Saccharomyces cerevisiae* strains: effects of wine-related physicochemical factors, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**(9), 2110-2115.
- Piemolini-Barreto, L.T., Zacaria, J., Delamare, A.P.L., Antonio, R.V., Echeverrigaray, S. (2014) Variation in phenolic compounds, anthocyanins, and color in red wine treated with enzymatic extract of *Kluyveromyces marxianus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **30**(5), 1541–1547.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. (2001) Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*, **18**(7), 647–654.
- Pigeau, G. M., Inglis, D. L. (2005) Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during icewine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 112-125.
- Pimenta, R., Morais, P., Rosa, C., Corrêa Jr., A. (2009) Utilization of yeasts in biological control programs. U: Yeast biotechnology: diversity and applications, (Satyanarayana, T., Kunze, G., ured.). Springer Verlag, str. 199-214.
- Pinelli, E., Adlouni, C.E., Pipy, B., Quartulli, F., Pfohl-Leszkowicz, A. (1999) Roles of cyclooxygenase and lipoxygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **7**, 95-107.
- Piotrowska M., Nowak A., Czyzowska A. (2013) Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *European Food Research and Technology*, **236**(3), 441–447.
- Piotrowska, M., Zakowska, Z. (2000) The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. U: Progress in Biotechnology (Food Biotechnology), (Bielecki, S., Tramper, J., Polak, J., ured), Elsevier, **17**, str. 307–310.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009) Fungi and Food Spoilage, (3<sup>rd</sup> Edition), Blackie Academic and Professional, str. 169-273.
- Pizzorno, J. (2014) The Path Ahead – Glutathione. *Integrative medicine*, **13**(1), 8-12.

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 Microbiology*, **20**(2), 217-224.

Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2014) Aflatoksini – onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **9**(3-4), 75-82.

Pleadin, J., Kiš, M., Frece, J., Markov, K. (2018a) Primjena fizikalnih i kemijskih metoda u uklanjanju mikotoksina iz hrane i hrane za životinje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **13**(1-2), 24-31.

Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018b) Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija, Sveučilište u Mostaru, str. 1-192.

Pleadin, J., Zadavec, M., Frece, J., Rezič, T., Kmetič, I., Markov, K. (2019) Biološka detoksifikacija mikotoksina: dosadašnje spoznaje i budući aspekti. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **14**(1-2), 39-46.

Politis, I., Fegeros, K., Nitsch, S., Schatzmayr, G., Kantas, D. (2005) Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to suppress the effects of ochratoxycosis on the immune system of broiler chicks. *British Poultry Science*, **46**, 58–65.

Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2008) *Narodne novine* **154** (NN 154/2008).

Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, **16**, 675-729.

Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H. (1999) Yeast diversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **20**, 61-74.

Prtenjača, J. (2017) Utjecaj mikotoksina na parametre rasta bakterija mliječne kiseline, potencijalnih starter kultura za proizvodnju fermentiranih namirnica. Diplomski rad, 13-15.

Quintela, S., Villaran, M.C., de Armentia, I.L., Elejalde, E. (2013) Ochratoxin A removal in wine: a review. *Food Control*, **30**(2), 439-445.

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.

Raju, M.V.L.N., Devegowda, G. (2002) Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: Evaluation of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, **15**, 1051–1056.

Rapp, A., Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia*, **42**(8), 873-884.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**, 149-164.

Reyes-Sánchez, F., Páez-Lerma, J.B., Rojas-Contreras, J.A., López-Miranda, J., Soto-Cruz, N.Ó., Reinhart-Kirchmayr, M.R. (2019) Study of the Enzymatic Capacity of *Kluyveromyces marxianus* for the Synthesis of Esters. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **29**, 1–9.

Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Oriol, E., Larondelle, Y. (2005) Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry*, **40**, 3008–3016.

Rodrigues, I., Bidner, E.M., Schatzmayr, G. (2009) Microorganisms and their enzymes for detoxifying mycotoxins posing a risk to livestock animals. U: Mycotoxin prevention and Control in Agriculture, 1. izd., (Appell, M., Kendra, D.F., Trucksess, M.W., ured.), American Chemical Society, str. 107-117.

Rojas, V., Gil, J., Piñaga, F., Manzanares, P. (2003) Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 181–188.

Roland, A., Bros, P., Bouisseau, A., Cavelier, F., Schneider, R. (2014) Analysis of ochratoxin A in grapes, musts and wines by LC-MS/MS: First comparison of stable isotope dilution assay and diastereomeric dilution assay methods. *Analytica Chimica Acta*, **818**, 39-45.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003) Function of yeasts species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 169–180.

- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M. (1997) Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **82**(5), 615-618.
- Rotaru, S., Israel-Roming, F., Campeanu, G., Deciu, G. (2011) Correlation of ochratoxin A level in wine with vine environment. *Romanian Biotechnological Letters*, **16**(6), 126-130.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.-M. (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, **157**(4), 267-274.
- Sage, L., Krivobok, L., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E. (2002) Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1306–1311.
- Saladino F, Luz C, Manyes L, Fernandez-Franz M and Meca G, In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control* 67:273–277 (2016).
- Sangorrin, M.P., Lopes, C.A., Jofré, V., Querol, A., Caballero, A.C. (2008) Spoilage yeasts associated with Patagonian cellars, characterization and potential biocontrol based on killer interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**, 945-953.
- Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Nitsch, S., Mohn, M., Taubel, M., Loibner, A.P., Braun, R., Binder, E.M. (2003) Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin Research*, **19**(2), 124-128.
- Serrat, M., Rodríguez, O., Camacho, M., Vallejo, J.A., Ageitos, J.M., Villa, T.G. (2011) Influence of nutritional and environmental factors on ethanol and endopolygalacturonase co-production by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. *International Microbiology*, **14**(1), 41–49.
- Sforza, S., Dall'Asta, C., Marchelli, R. (2006) Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**(1), 54-76.



- Shanakhat, H., Sorrentino, A., Raiola, A., Romano, A., Masia, P., Cavella, S. (2018) Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **98**, 4003-4013.
- Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockensstrom, S., Mshicileli, N., Sewram, V. (2003) Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1102–1106.
- Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, **350**, 3-41.
- Sieiro, C., Villa, T.G., Da Silva, A.F., García-Fraga, B., Vilanova, M. (2014) Albariño wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Chemistry*, **145**, 179–185.
- Skrinjar M.R., Sedej I.J., Pesic-Mikulec D.M. (2002), Detoksikacija ohratoksina A u jogurtu pomoću *Lactobacillus acidophilus*. *Prehrambena industrija – mleko i mlečni proizvodi*, **13**, 28–30.
- 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. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **6**(1), 21-30.
- Somma, S., Perrone, G., Logrieco, A. (2012) Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathologia Mediterranea*, **51**(1), 131-147.
- Sonni, F., Clark, A.C., Prenzler, P.D., Riponi, C., Scollary, G.R. (2011) Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 3940–3949.
- Sorrenti, V., di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M., Galvano, F. (2013) Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review. *Toxins*, **5**, 1742–1766.
- Stahle, L., Wold, S. (1989) Analysis of Variance (ANOVA). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **6**(4), 259-272.
- Stefanaki, I., Foufa, E., Tsatsou-Dritsa, A., Dais, P. (2003) Ochratoxin A concentration in Greek domestic wines and dried wine fruits. *Food Additives and Contaminants*, **20**, 74–83.

Suárez-Valles, B., Bedriñana, R.P., Fernández Tascón, N., Querol, A., Rodríguez Madrera, R., (2007) Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, **24**, 25–31.

Šegvić Klarić, M., Pepeljnjak, S., Domijan, A.M., Petrik, J. (2007) Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B<sub>1</sub>, beauvericin and ochratoxin A. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, **100**, 157–164.

Taheur, F.B., Fedhila, K., Chaieb, K., Kouidhi, B., Bakhrouf, A., Abrunhosa, L. (2017) Adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, **251**, 1–7.

Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., Yuan, Z (2018) Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, **122**, 320-331.

Ugliano, M., Kwiatkowski, M., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J.-B., Aagaard, O., Waters, E. J. (2011) Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 2564–2572.

van Maris, A.J.A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A.H., 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**, 391-418.

Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L. (2016) Biodegradation of Mycotoxins: Tales from Known and Unexplored Worlds. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1-20.

Varga, J., Kozakiewicz, Z. (2006) Ochratoxin-A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology*, **17**(2), 72-81.

Velázquez, J.B., Longo, E., Cansado, J., Villa, T.G., Sieiro, C., Calo, P. (1991) Improvement of the alcoholic fermentation of grape juice with mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* wild strains. Negative effect of *Kloeckera apiculata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **7**, 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.
- Vettorazzi, A., González-Penas, E., López de Cerain, A. (2014) Ochratoxin A kinetics: a review of analytical methods and studies in rat model, *Food and Chemical Toxicology*, **72**, 273-288.
- Vettorazzi, A., van Delft, J., López de Cerain, A. (2013) A review on ochratoxin A transcriptomic studies. *Food and Chemical Toxicology*, **59**, 766–783.
- Vilela, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Corte-Real, M. (2013) Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 4991-5000.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M. (2008) Managing ochratoxin A risk in the grape wine food chain. *Food Additives and Contaminants: Part A*, **25**(2), 193-202.
- 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. *Biochemical Engineering Journal*, **79**, 41-45.
- Wegmann-Herr, P., Berner, M., Dickescheid, C., von Waldbrunn, C., Nickolaus, P., Durner, D. (2015) Influence of ascorbic acid, sulfur dioxide and glutathione on oxidation product formation in Winelike Systems, BIO Web Conferences 5: 38th World Congress of Vine and Wine.
- Wenzl, T., Haedrich, J., Schaechtele, A., Robouch, P., Stroka, J. (2016) Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food, EUR 28099, *Publications Office of the European Union*.
- Whitehead, M.P., Flannigan, B. (1989) The fusarium mycotoxin deoxynivalenol and yeast growth and fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, **95**(6), 411-413.
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Wand, X., CHen, G., Yuan, Z. (2011) Metabolic pathways of Ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, **12**(1), 1-10.
- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kempainen, B. W. (1996) Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **137**, 182-192.

- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kemppainen, B.W. (1996) Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structureactivity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **137**, 182–192.
- Xu, B., Chen, S., Luo, Y., Chen, Z., Liu, L., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Chen, L., Huang, S. (2011) Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS ONE*, **6**, e19052.
- Yang, Q., Wang, J., Zhang, H., Li, C., Zhang, X. (2016) Ochratoxin A is degraded by *Yarrowia lipolytica* and generates non-toxic degradation products. *World Mycotoxin Journal*, **9**(2), 269-278.
- Yiannikouris, A., Andre, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P. (2006) Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with  $\beta$ -D-glucans. *Biomacromolecules*, **7**, 1147–1155.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany, J.P. (2004) Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -d-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection*, **67**, 1195-1200.
- Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C.G., François, J., Bertin, G., Jouany, J.P. (2003) A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: Application to zearalenone. *Biotechnology Letters*, **25**, 783-789.
- Zhu, Y., Hassan, Y.I., Watts, C., Zhou, T. (2016) Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients: a review of recent patents. *Animal Feed Science and Technol*, **216**, 19–29.
- Zimdars, S., Schrage, L., Sommer, S., Schieber, A., Weber, F. (2019) Influence of glutathione on yeast fermentation efficiency under copper stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **67**, 10913-10920.
- Zimmerli, B., Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grape juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and contaminants*, **13**(6), 655-668.

## Životopis

Željko Jakopović, rođen je 29. svibnja 1990. u Zagrebu. Osnovnu školu završio je u Gornjoj Stubici, a opću gimnaziju A.G. Matoš u Zaboku. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu završio je 2014. godine i stekao zvanje magistra inženjera prehrambenog inženjerstva (*mag. ing. techn. aliment.*). Od siječnja do listopada 2015. godine radio je u prehrambenoj industriji Vindija d.o.o. i Koka d.o.o., a od listopada 2015. godine zaposlen je kao asistent u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Koautor je 15 znanstvenih radova od kojih je 7 iz a1 skupine, 7 iz a2 te 1 iz a3 skupine. Sudjelovao je na 15 znanstvenih skupova te je koautor jednog sveučilišnog udžbenika i poglavlja u knjizi, a uz to je i koautor stručnog obrazovnog materijala. Usavršavao se na brojnim domaćim i međunarodnim tečajevima i radionicama („Radionica SEM-EDS“; „Osnove proteomike“; „Eksperimentalni pristupi u proteomici“; „Primijenjena genomika – precizna medicina“; „Uvod u LC-MS“; „Genomske tehnologije“; „Food and Indoor Mycology“; DNA based Identification of Fungi“). Do sada je aktivno sudjelovao na jednom projektu Hrvatske zaklade za znanost („Inovativni postupci uklanjanja AFM1 biofiksatorima iz mlijeka“) i četiri Potpore Sveučilišta, a trenutno je aktivan na jednoj Potpori Sveučilišta, 2 projekta Hrvatske zaklade za znanost („Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ i „Mikotoksini u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima: molekularna identifikacija plijesni producenata i procjena izloženosti potrošača“) te na projektima „Integrirani sustav uzgoja alternativnih vrsta školjkaša u uvjetima klimatskih promjena“ i „Istraživanje utjecaja klimatskih promjena na razvoj plijesni, mikotoksina i kvalitetu žitarica s prijedlogom mjera“ koji su financirani iz fondova Europske unije. Osim znanstvene aktivnosti, kao suradnik sudjeluje na predmetima Mikrobiologija, Mikrobiologija namirnica, Bakteriologija i Mikologija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu te na predmetu Mikrobiološka kontrola ambalaže na Sveučilištu Sjever u Koprivnici.

## Znanstveni radovi iz skupine a1:

Kostelac, D., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A.M., Čanak, I., **Jakopović, Ž.**, Svetec, I.K., Žunar, B., Frece, J. (2021) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal*, **112**, 104828.

Kostelac, D., Vrdoljak, M., Markov, K., Delaš, I., Jug, T., Gajdoš Kljusurić, J., **Jakopović, Ž.**, Čanak, I., Jelić, M., Frece, J. (2020). SPME-GC-MS and multivariate analysis of sensory properties of cheese in a sack matured with probiotic starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, **58**(2), 128- 137.

Markov, K., Frece, J., Pleadin, J., Bevardi, M., Barišić, L., Gajdoš Kljusurić, J., Vulić, A., **Jakopović, Ž.**, Mrvčić, J. (2019) *Gluconobacter oxydans* – potential biological agent for binding or biotransformation of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, **12**(2), 153-161.

Čanak, I., Markov, K., Melvan, E., Starčević, A., Živković, M., Zdravec, M., Pleadin, J., **Jakopović, Ž.**, Kostelac, D., Frece, J. (2018) Isolation and characterisation of *L. plantarum* O1 producer of plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food Technology and Biotechnology*, **56**(4), 581-589.

Kuharić, Ž., **Jakopović, Ž.**, Čanak, I., Frece, J., Bošnjir, J., Pavlek, Ž., Ivešić, M., Markov, K., (2018) Removing aflatoxin M<sub>1</sub> from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, **69**(4), 334-339.

**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 AFB<sub>1</sub>, OTA, and ZEA. *Food Technology and Biotechnology*, **56**(2), 208-217.

Frece, J., Vrdoljak, M., Filipčić, M., Jelić, M., Čanak, I., **Jakopović, Ž.**, Pleadin, J., Gobin, I., Landeka Dragičević, T., Markov, K. (2016) Microbiological quality and variability of natural microbiota in Croatian cheese maturing in lambskin sacks. *Food Technology and Biotechnology*, **54**(2), 129-134.

## Znanstveni radovi iz skupine a2:

Zadavec, M., Markov, K., Frece, J., Perković, I., **Jakopović, Ž.**, Lešić, T., Mitak, M., Pleadin, J. (2019) Toxicogenic fungi and the occurrence of mycotoxins in traditional meat products. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, **11**(2), 272-282.

**Jakopović, Ž.**, Čanak, I., Frece, J., Bošnjir, J., Ivešić, M., Kuharić, Ž., Pavlek, Ž., Markov, K. (2018) Uklanjanje kompleksa  $\beta$ -glukan-AFM<sub>1</sub> iz mlijeka, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **14**(3-4), 136-139.

Čanak, I., Markov, K., Gavrilović, A., Bosanac, P., Jug- Dujaković, J., **Jakopović, Ž.**, Kostelac, D., Pleadin, J., Frece, J. (2018) Mikrobiološki i kemijski parametri ribe i školjkaša. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **13**(1-2), 44-51.

**Jakopović, Ž.**, Čanak, I., Romac, A., Kuharić, Ž., Bošnjir, J., Ivešić, M., Frece, J., Pavlek, Ž., Markov, K. (2018) Usporedba vezanja AFM<sub>1</sub> iz mlijeka živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **13**(1-2), 32-37.

Marušić Radovčić, N., **Jakopović, Ž.**, Petrović, M., Tomljanović, K., Grubešić, M., Medić, H. (2017) Fizikalno-kemijske karakteristike prsnog mišića kamenjarki (*Alectoris graeca*). *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **12**(1-2), 14-18.

**Jakopović, Ž.**, Čanak, I., Lešić, T., Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2016) Usporedba osnovnog kemijskog i masno-kiselinskog sastava te mikrobiološke ispravnosti guščjih, kokošnjih, pačjih i purećih jaja. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **11**(3-4), 152-158.

Markov, K., Sokolić, D., Čanak, I., **Jakopović, Ž.**, Frece, J. (2016) Prisutnost aflatoksina i okratoksina A u proizvodima na bazi kakaovca. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **11**(1-2), 65-70.

### **Znanstveni radovi iz skupine a3:**

Čanak, I., Markov, K., **Jakopović, Ž.**, Kostelac, D., Čolak, S., Mejdandžić, D., Živković, M., Ježek, D. (2019). *In vitro* Characterization of *Lactobacillus plantarum* O1 isolated from gut of sea bream (*Sparus aurata*) as potential fish probiotic. Proceedings of 4th I.C. FABE. Petros, K., Leontopoulos, S. (ur.), Kreta, Grčka: University of Thessaly, 170-175.