

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Adela Šain

6725/PT

**PROMJENE MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ODABRANIH VINSKIH KVASACA I
BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PRISUSTVU OKRATOKSINA A
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: Prof.dr.sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Promjene morfoloških karakteristika odabranih vinskih kvasaca i bakterija
mliječne kiseline u prisustvu okratoksina A**

Adela Šain, 0058203326

Sažetak: Jedan od važnijih problema današnjice je kontaminacija prehrambenih proizvoda mikotoksinima. Izuzev čovjeka, životinja i biljaka, toksično djelovanje mikotoksina dokazano je i na mikroorganizmima. Budući da postoji ograničen broj istraživanja o utjecaju mikotoksina na stanice bakterija i kvasaca, cilj ovog rada bio je odrediti djelovanje okratoksina A na krivulju rasta i morfološke osobine vinskih kvasaca *S.cerevisiae* i *S.bayanus* tijekom 168 sati, te na bakteriju *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata. Mikrobni rast prikazan u obliku krivulje rasta, određen je brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi, dok je veličina stanica, određena metodom mikrometrije upotrebom objektnog i okularnog mikrometra. Iz dobivenih rezultata može se uočiti da okratoksin A neznatno utječe na rast i morfologiju i *Lactobacillus plantarum* B i kvasce *S.cerevisiae* i *S.bayanus* što se može objasniti da su i bakterija i kvasci razvili određenu otpornost na toksičnost okratoksina A.

Ključne riječi: krivulja rasta; *Lactobacillus plantarum*; morfološke karakteristike; okratoksin A; *Saccharomyces bayanus*; *Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 28 stranica, 12 slika, 0 tablica, 56 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: Željko Jakopović, mag. ing.

Datum obrane: 19.rujan. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Changes in morphological characteristics of selected wine yeasts and lactic acid bacteria in the presence of ochratoxin A

Adela Šain, 0058203326

Summary: One of the most important problems today is the contamination of food products with mycotoxins. Apart from humans, animals and plants, toxicity of mycotoxins has been demonstrated in microorganisms. Since there is a limited number of studies on the effects of mycotoxins on bacteria and yeast cells, the goal of this study was to determine the effects of ochratoxin A on growth curve and morphological properties of wine yeasts *S.cerevisiae* and *S. bayanus* during 168 hours and on bacterium *Lactobacillus plantarum* B during 72 hours. The microbial growth shown in the form of growth curves was determined by counting the growing colonies on a solid nutrient medium, while the cell size was determined by a micrometric method using the stage and ocular micrometers. From the obtained results, it can be seen that ochratoxin A has a slight influence on growth and morphology and *Lactobacillus plantarum* B and yeasts *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. Which can be explained that both bacteria and yeasts developed a certain resistance to ochratoxin A.

Keywords: growth curve; *Lactobacillus plantarum*; morphological characteristics; ochratoxin A; *Saccharomyces bayanus*; *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 28 pages, 12 figures, 0 table, 56 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Ksenija Markov, Full professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, Research associate

Thesis delivered: September 19th 2017

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1 MIKOTOKSINI	2
2.1.1 Okratoksin A	3
2.2 BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	4
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	5
2.3. KVASCI	5
2.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.3.2 <i>Saccharomyces bayanus</i>	7
2.4 MIKROBNI RAST	8
2.2.1. Krivulja rasta mikroorganizama.....	9
3.MATERIJALI I METODE	11
3.1 MATERIJALI	11
3.1.1 Mikroorganizmi.....	11
3.1.2. Podloga za uzgoj bakterije <i>L. plantarum B</i>	11
3.1.3 Podloga za uzgoj kvasaca <i>S.cerevisiae</i> i <i>S.byanus</i>	12
3.1.4 Mikotoksini.....	12
3.1.5 Aparatura	12
3.1.6 Pribor	12
3.2 METODE RADA	13
3.2.1 Standard OTA	13
3.2.2 Priprema uzorka	13
3.2.3. Određivanje krivulje rasta	13
3.2.4. Mikrometrija.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1 UTJECAJ MIKOTOKSINA NA KRIVULJU RASTA <i>L.PLANTARUM B</i>	15
4.2 UTJECAJ MIKOTOKSINA NA KRIVULJU RASTA <i>S. CEREVISIAE</i> I <i>S. BAYANUS</i>	16
4.3 UTJECAJ MIKOTOKSINA NA MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE STANICA <i>L. PLANTARUM B</i>	19
4.4 UTJECAJ MIKOTOKSINA NA MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE STANICE KVASACA <i>S.CEREVISIAE</i> I <i>S. BAYANUS</i>	20
5. ZAKLJUČCI	23
6. LITERATURA	24

1.UVOD

Mikotoksini odavna predstavljaju globalni problem za ljudsko i životinjsko zdravlje. Prijetnja ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka povećava se većom potražnjom za hranom što je posljedica rasta svjetske populacije (Leslie i sur., 2008). Među stotinama poznatih mikotoksina, aflatoksin B₁, zearalenon, fumonizini i okratoksin A, ističu se kao najčešći onečišćivači hrane i hrane za životinje, primarno žitarica i njihovih proizvoda. Danas je poznato, da se većina mikotoksigenih plijesni ili njihovi sekundarni metaboliti, ako su prisutni u stočnoj hrani koja se koristi u hranidbi farmskih životinja, prenose u hranu životinjskog podrijetla putem tzv. „carry-over“ efekta (Markov i sur. 2013; Pleadin i Kovačević, 2016). Mikotoksini predstavljaju u malim količinama veliku opasnost za ljude, te zahvaljujući svojoj stabilnosti, ne dolazi do njihove inaktivacije tijekom tehnološke obrade (Markov i sur., 2010; Sokolović, 2005). U cilju sprječavanja ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka, razvijene su nove, ekonomičnije, efikasnije i modernije metode njihovog detektiranja (Pleadin i sur., 2015; Giovati i sur., 2015). Provedena su razna istraživanja, koja nam dokazuju da različiti mikroorganizmi mogu reducirati ili u potpunosti ukloniti mikotoksine u hrani i krmu (Markov i sur., 2010). Od značajne važnosti su bakterije mliječne kiseline (BMK), posebice iz roda *Lactococcus* i *Lactobacillus* (Giovati i sur., 2015), a kao najznačajnija metoda dekontaminacije, pokazala se primjena bioloških adsorbensa proizvedenih od stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Sokolović, 2005). BMK koriste se u proizvodnji fermentiranih mliječnih i mesnih proizvoda kao starter kulture te su prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje, a dodijeljen im je i GRAS (*eng.* Generally Recognized As Safe) status jer je raznim istraživanjima dokazano da imaju pozitivan učinak na crijevnu mikrofloru čovjeka. Zbog svoje prisutnosti u hrani, gdje produžuju trajnost proizvoda, koriste se u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda (Markov i sur., 2010). Međutim, kvasci su našli široku primjenu u industriji vina, piva i pekarskih proizvoda. Dokazano je da su kvasci nosioci alkoholne fermentacije te svojim metabolizmom sudjeluju u mnogim biokemijskim reakcijama, zbog toga su sve više traženi selekcionirani kvasci koji su otporniji na nepovoljne uvijete kao što su alkohol, pH vrijednosti i niske temperature (Grba, 2010). Aktivnost kvašćevih stanica može biti od velike važnosti, no može biti narušena djelovanjem mikotoksina. U ovom radu je istražen utjecaj okratoksina A (OTA) na rast i morfološke osobine bakterije *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata i vinskih kvasaca (*S.cerevisiae* i *S.bayanus*) tijekom 168 sati uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 MIKOTOKSINI

Od gotovo 100 000 otkrivenih vrsta plijesni i kvasaca većina ih zauzima važnu ulogu u proizvodnji vina, piva, fermentiranih mliječnih proizvoda i antibiotika. No, neke vrste ipak djeluju negativno na ljudsko i životinjsko zdravlje. Sve do nedavno smatralo se da su plijesni bezopasne, no zdravlje čovjeka i životinje može biti ugroženo fungalnim infekcijama, ali i toksičnim metabolitima plijesni, točnije mikotoksinima (Sokolović, 2015; Duraković i Duraković, 2003).

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma plijesni koji se sintetiziraju tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog porijekla pa su tako glavni izvor mikotoksina za ljude, žitarice i njihovi proizvodi, mlijeko i mliječni proizvodi, meso, voće, orašasti plodovi, vino, pivo, kava i drugo (HAH, 2013). Predstavljaju glavne kontaminante hrane i krmiva, uzrokujući velike ekonomske gubitke tijekom procesa proizvodnje i skladištenja (Pleadin i sur., 2015). Osim ekonomskih gubitaka, male količine mikotoksina mogu gutanjem, udisanjem ili dodiranjem izazvati po domaćina opasne bolesti koje nazivamo mikotoksikozama (Duraković i Duraković, 2003).

Neke plijesni imaju sposobnost sinteze više od jednog mikotoksina dok neke mikotoksine može proizvoditi više vrsta plijesni (Duraković, 1991). Mikotoksini su termostabilni spojevi, različite kemijske strukture i biološkog djelovanja pa se termička obrada hrane rijetko koristi kao metoda dekontaminacije (Pepeljnjak i sur., 2008). Do sad je otkriveno više od četiristo vrsta mikotoksina, a najviše se ističu aflatoksini (AFB₁, AFM₁), okratoksin A (OTA), zearalenon (ZEA), fumonizini (FB₁, FB₂), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (HAH, 2013).

Zagađenost mikotoksinima veća je u tropskim i suptropskim krajevima, no poznato je da plijesni mogu proizvoditi mikotoksine u svim klimatskim područjima (Peraica i sur., 2012). Ulaskom mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka prvenstveno se narušava ljudsko zdravlje te može izazvati ozbiljne probleme, posljedično tome povećavaju se troškovi zdravstvene skrbi, zbrinjavanja onečišćene hrane i hrane za životinje te troškovi ulaganja u nova znanstvena istraživanja u cilju poboljšavanja dekontaminacije i redukcije mikotoksina u hrani (Pleadin i sur., 2015).

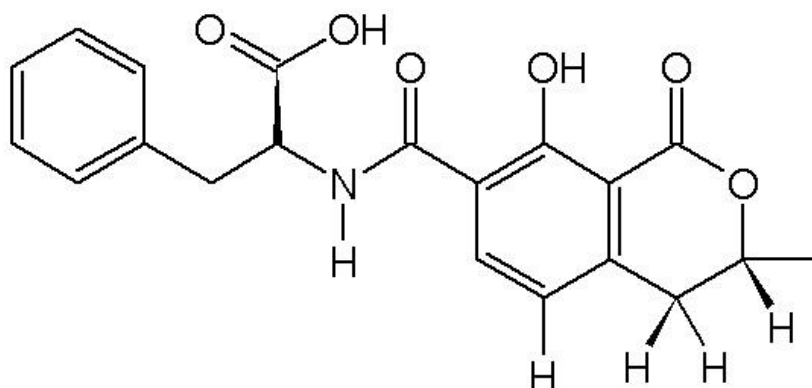
2.1.1 Okratoksin A

Skupina okratoksina uključuje okratoksin A, okratoksin B, okratoksin C, 4-hidrookratoksin A i okratoksin α , a sintetiziraju ih plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* koji često kontaminiraju uskladištene žitarice (Størmer, 1992). Okratoksin A (slika 1) prvi put je otkriven kao sekundarni metabolit plijesni *Aspergillus ochraceus* (po kojoj je i dobio ime) 1965. godine prilikom istraživanja koje se organiziralo s ciljem otkrivanja novih mikotoksina na gljivičnim metabolitima (Merwe i sur., 1965). Danas je sveprisutan u raznovrsnoj hrani i piću, mahunarkama, grožđu, grožđicama, vinu (Abarca i sur., 2001; Duraković i Duraković, 2003; Šošo i sur., 2012), pivu, kakau, kavi i začинима (Aziz i sur., 1998), a pronađen je i u ječmu, pšenici, raži, kukuruzu i riži (Shotwell i sur., 1969). Također može se pronaći i u hrani životinjskog podrijetla kao što je kravlje mlijeko, svinjsko i pileće meso, a posebno svinjskim bubrezima, jetri i kobasicama (Peraica i sur., 2012; Jorgensen, 1998).

Umnogobrojnim *in vivo* pokusima na različitim životinjskim vrstama, dokazana je embriotoksičnost i teratogenost te imunosupresivni učinci OTA, a prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka klasificiran je kao mogući kancerogen kod ljudi (Duraković i Duraković, 2003; Cubaiu i sur., 2012; IARC, 1987). Osim toga, zbog sličnosti s fenilalaninom, OTA inhibira sintezu makromolekula (DNA, RNA, proteina), negativno utječe na metabolizam glukoze i povećava lipidnu peroksidaciju (Pepeljnjak i sur., 2008). Pretpostavlja se da OTA igra glavnu ulogu u nefrotoksičnom sindromu svinja, zbog hranjenja svinja kontaminiranim ječmom. Osim toga, smatra se da je odgovoran i za Balkansku endemsku nefropatiju, tj. kroničnu i tešku obostranu bolest bubrega (Duraković i Duraković, 2003).

OTA se zbog svog neobičnog metabolizma, dugo zadržava u organizmu, a na ispitivanim životinjama dokazano se najviše nakuplja u bubrezima, no nalazi se i u drugim organima. Mjerenjem koncentracije u plazmi ispitivanih životinja, odnosno ljudi, može se izračunati koliki je dnevni unos OTA, odnosno kolika je izloženost tom mikotoksinu. Smatra se da i mala koncentracija OTA može naškoditi ljudskom zdravlju (Peraica i Domjan, 2006).

Kod dekontaminacije žitarica i proizvoda na njihovoj bazi, rijetko se koristi termička obrada. No u slučaju termičke obrade pšeničnog brašna dolazi do redukcije 76% OTA pa se može zaključiti da je termička obrada učinkovita kod smanjivanja OTA u nekim uzorcima. Međutim, najbolji rezultati dekontaminacije postižu se primjenom različitih adsorbensa kao što su gline, smole, alumosilikati i u novije vrijeme glukomanan iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Pepeljnjak i sur., 2008).



Slika 1. Strukturna formula okratoksina A (Anonymous1, 2017)

2.2 BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, nesporogene bakterije koje su prirodno prisutne u probavnom traktu ljudi i životinja te su uključene u njihov metabolizam. Tipični predstavnici ove skupine, u obliku štapića i koka, najčešće su iz rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* (Šušković i sur., 1997; Grba, 2010). Predstavljaju skupinu bakterija koje kao glavni proizvod fermentacije ugljikohidrata daju mliječnu kiselinu. Prema metaboličkim putevima razgradnje ugljikohidrata dijele se na homofermentativne i heterofermentativne te fakultativno heterofermentativne bakterije. Kod homofermentativnih, konačni produkt je samo mliječna kiselina, a značajni su rodovi *Streptococcus* i *Pediococcus* te različite vrste roda *Lactobacillus*. Kod heterofermentativnih, osim mliječne kiseline, nastaje i značajna količina CO₂ i etanola, a u njih ubrajamo bakterije iz roda *Leuconostoc* i neke vrste roda *Lactobacillus* (Duraković, 1991; Frece i Markov, 2016). Međutim, fakultativno heterofermentativne bakterije imaju enzim fosfoketolazu koja se inducira pentoznim šećerima, a u prisutnosti glukoze ponašaju se kao homofermentativne BMK (Duraković, 1991; Lahtinen i sur., 2011; Grba, 2010).

BMK posjeduju mnoga poželjna svojstva, zbog toga se naširoko koriste u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda. Osim toga, koriste se i kao starter kulture u proizvodnji fermentiranih mliječnih i mesnih proizvoda te imaju sposobnost smanjivanja količine određenog mikotoksina u hrani i krmivu. Provedena su mnoga istraživanja koja potvrđuju vezanje aflatoksina pomoću BMK (Haskard i sur., 2001; Markov i sur., 2010). Primjena BMK u prehrani i terapeutici kao probiotika, pokazala se poželjna zbog pozitivnog djelovanja BMK na zdravlje ljudi i životinja. Među mnogim poželjnim karakteristikama, možemo izdvojiti;

snižavanje kolesterola u serumu, antikancerogeno djelovanje, biosinteza širokog spektra antimikrobnih metabolita koji inhibiraju rast mikotoksikogenih plijesni (Muñoz i sur., 2010; Varsha i Napoothiri, 2016). Međutim, njihove točne funkcije u ljudskom tijelu još uvijek nisu jasne (Šušković i sur., 1997; Teuber, 1993).

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

Istraživanja provedena posljednjih godina dovela su do uvjerenja da određeni sojevi bakterija mliječne kiseline, posebno sojevi iz roda *Lactobacillus*, mogu pozitivno djelovati na zdravlje ljudi i životinja. Osim što se kao starter kulture koriste u proizvodnji fermentirane hrane, dodaju se i kao biokonzervansi, s ciljem produljenja trajnosti proizvoda (Markov i sur., 2010; Frece i Markov, 2016). Rod *Lactobacillus* obuhvaća znatan broj različitih vrsta koje pokazuju velik stupanj različitosti. Djelotvoran je kod liječenja iritabilnog crijeva (IBS – Irritable Bowel Syndrome), Crohnove bolesti te upalne bolesti crijeva (Ducrotté i sur., 2012).

Pozitivno djeluje na ljudsko i životinjsko zdravlje, zbog antimikrobnog efekta koji pokazuje prema patogenim mikroorganizmima, antikancerogenog djelovanja, potiče imunološki sustav te pomaže u metabolizmu mliječnog šećera-laktoze (Šušković i Kos, 2001).

2.3. KVASCI

Široka upotreba u biotehnologiji, proizvodnji vina, piva, alkoholnih pića i pekarskog kvasca učinila je kvasac vrlo zanimljivim i lako dostupnim mikroorganizmom za temeljna znanstvena istraživanja (Grba i sur., 2010). Kvasac je jednostanični organizam, čije su stanice najčešće cilindričnog ili ovalnog oblika. Kvasci se najčešće razmnožavaju nespolnim načinom-pupanjem, pomoću askospora, koje se formiraju u askusima (Duraković i Redžepović, 2002).

Veliki broj kvasaca pripada rodu *Saccharomyces* koji se smatra industrijski najznačajnijim. Mogu proizvoditi etanol i CO₂, pa se koriste u proizvodnji vina i piva te u pripremi kiselog tijesta (Duraković i Redžepović, 2002). Termin kvasac najčešće se uzima kao sinonim za *Saccharomyces cerevisiae*. Još od davnina u prehrambenoj industriji igra važnu ulogu kao osnovna komponenta za proces fermentacije (konverzije šećera u alkohol) (Landry i sur., 2006). Među ostalim predstavnicima ovog roda može se pronaći i *Saccharomyces bayanus* koji je uključen u proces proizvodnje vina.

Kvascima najviše odgovara kiseli pH, no mogu se naći u širokom rasponu pH-vrijednosti. Mnogi od njih mogu podnijeti ekstremno visoke koncentracije šećera i do 55-60% saharoze (Duraković i Redžepović, 2002). S obzirom na to da nemaju klorofil, nemaju mogućnost obavljanja fotosinteze, do hrane dolaze adsorpcijom iz okoline (Grba i sur., 2010).

Štoviše, današnji proizvođači pekarskih proizvoda, vina i piva posjeduju vlastite sojeve kvasca čime garantiraju kvalitetu gotovog proizvoda. Međutim, u skladu sa zahtjevima tržišta, postoji stalna potreba za poboljšanjem proizvodnih svojstva industrijskih kvasaca. Stoga se kvasci koji se koriste u proizvodnji kruha, vina i piva stalno genetički mijenjaju. Industrijski kvasci se sve više razlikuju od svojih prirodnih srodnika jer su najprije selekcionirani u uvjetima proizvodnog procesa, a onda ih čovjek više ili manje precizno mijenja u cilju poboljšanja njihovih proizvodnih karakteristika (Grba i sur., 2010). U ovom radu pažnja je usmjerena prema selekcioniranim kvascima *S.cerevisiae* i *S.bayanus*.

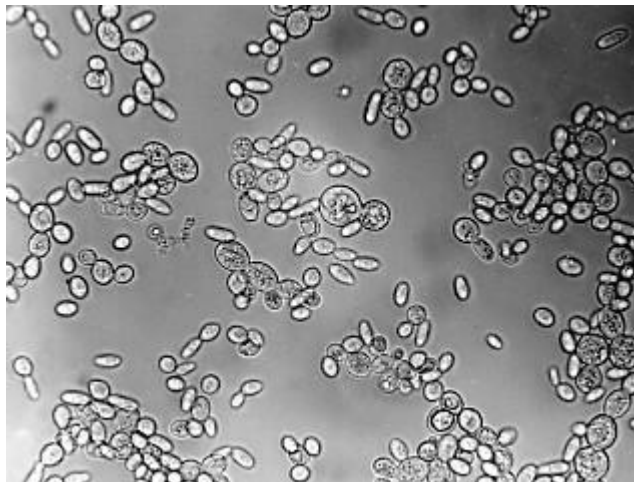
2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (slika 2) je prvi put izolirao Emil Mark 1983. godine (Mortimer i Johnson, 1986). *Saccharomyces cerevisiae* je najpoznatija vrsta kvasca iz roda *Saccharomyces*, čiji se sojevi danas upotrebljavaju u proizvodnji vina, piva, kruha i jakih alkoholnih pića. Njegovo svojstvo visoke fermentacijske aktivnosti i dobro podnošenje različitih ekstremnih uvjeta okoline, prisutnih u industrijskim pogonima, dovelo je do selekcije nekoliko stotina sojeva toga kvasca s poznatim karakteristikama (Grba i sur., 2010).

S. cerevisiae može postojati kao haploidna ili diploidna stanica, no pretežito su diploidnog oblika. Može rasti na širokom rasponu ugljikovih spojeva, ali glukoza je preferirani supstrat. No daljnjim ispitivanjem, utvrđeno je da je kvasac otporan prema promjeni uvjeta u okolišu zbog širokog raspona fizikalnih i kemijskih parametra pri kojima može rasti te se smatra nepatogenim mikroorganizmom za proizvodnju hrane i lijekova (Dickinson i sur.,2004; Grba i sur.,2010)

Stanice kvasca, naširoko se koriste u pekarstvu, pivarstvu i vinarstvu, no svoju primjenu su našle i u biotransformaciji. Osim toga, sve više se upotrebljavaju u proizvodnji proteina uz modificiranje stanica kvasca genetičkim inženjerstvom. Porijeklo kvasaca u fermentacijskim procesima još uvijek je nepoznato pa postoje brojne pretpostavke. Pojedini istraživači tvrde da se ti mikroorganizmi nalaze na površini voća ili žitarica te u vrijeme fermentacijskih procesa prelaze u hranjivu podlogu, dok drugi tvrde da je *S.cerevisiae*

„udomljena“ vrsta koja je prisutna samo tamo gdje je zabilježeno djelovanje čovjeka. Kasnija istraživanja dokazuju, da su obje pretpostavke točne (Grba i sur.,2010).



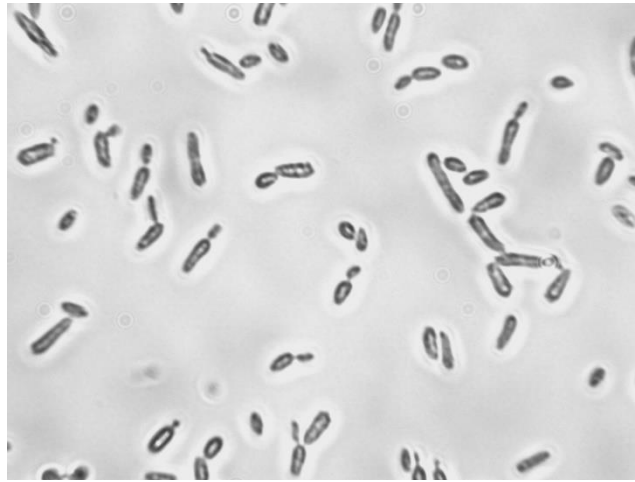
Slika 2. Mikroskopska slika stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Anonymus 2, 2014)

2.3.2 *Saccharomyces bayanus*

Iako je *S. cerevisiae* dominantni kvasac u većini fermentacijskih procesa, opisana je još jedna vrsta s ulogom u fermentaciju vina. *S. bayanus* (slika 3) izoliran je iz prirodne okoline samo u hladnijim predjelima Europe i također je povezan s fermentacijskim procesima. Tipični soj te vrste (CBS 380), koji je izoliran iz piva, nedavno je opisan kao hibrid i također sadrži dio jezgrinog genoma *S. cerevisiae* (Grba, 2010; Gonzalez i sur., 2006).

Saccharomyces bayanus se koristi u proizvodnji vina i jabučnog vina (cider), a rezultat je višestrukih hibridizacijskih događanja između tri čiste vrste; *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces eubayanus*. *S. bayanus* posebno je otporan na nepovoljne uvjete kao što su alkohol, sumporov dioksid, pH vrijednosti i niske temperature. Tolerantan je na visoki osmotski pritisak (visoke koncentracije šećera) i na visoke koncentracije alkohola.

Kod proizvodnje jabučnog vina, danas se preporučuje korištenje selekcionirane kulture kvasaca koje se inače koriste kod proizvodnje vina. Zbog prirodno prisutnih visokih koncentracija šećera fruktoze u jabukama, preporučuje se uporaba kvasca koji preferiraju fruktozu te sojevi vrste *S. bayanus* koji su otporniji i tolerantniji na teške uvjete u moštu (Gospodarski list, 2015).



Slika 3. Mikroskopska slika stanica kvasca *Saccharomyces bayanus* (Anonymus 3, 2017)

2.4 MIKROBNI RAST

Pod rastom mikroorganizma podrazumijevamo povećanje njegovih dimenzija prije nego što se poveća broj pojedinačnih stanica u populaciji. U ovom radu pratit će se mikrobni rast bakterija mliječne kiseline i odabranih vinskih kvasaca. Bakterije se razmnožavaju na različite načine; primjerice filamentima, konidiosporama i pupanjem. No, najveći broj bakterija ipak se razmnožava binarnim cijepanjem (diobom) prilikom čega se iz jedne roditeljske stanice stvaraju dvije identične stanice kćeri. Kvasci se također razmnožavaju nespolnim načinom, tj. pupanjem. Na roditeljskoj stanici raste pup, jezgra se dijeli i jedna odlazi u pup, koji se otkida kada dostigne veličinu osnovne stanice (Duraković, 1991).

Vrijeme nužno za udvostručenje broja stanica u populaciji naziva se vrijeme udvostručenja, ili generacijsko vrijeme (g) te ako se ne promijene fizikalni i kemijski okolišni uvjeti, ono ostaje konstantno za pojedine mikroorganizme. Međutim, u probavnom traktu, gdje uvjeti nisu ni blizu optimalnom, generacijsko vrijeme može biti duže od 12 sati (Duraković, 1991). Bakterija *L. plantarum* metabolizira glukozu puno brže od laktoze, tako da generacijsko vrijeme iznosi 2,85 sati tijekom rasta na glukozu, dok prilikom rasta na laktozi iznosi 4,75 sati (Sedewitz i sur., 1984). Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zbog svojih brojnih poželjnih karakteristika je idealan modelni organizam za proučavanje brojnih biokemijskih procesa u stanicama. Ove jednostanične eukariote opisuje još jednostavan životni ciklus, kratko generacijsko vrijeme (90 min) te izmjena haploidne i diploidne generacije (Smith i sur., 2000).

Iz duljine trajanja generacijskog vremena saznajemo brzinu nastanka kolonija mikroorganizama; što je kraće generacijsko vrijeme to je brzina nastanka veća. Mikroorganizmi ne proizvode beskonačnu masu stanica jer je rast prirodno limitiran (Duraković, 1991).

2.2.1. Krivulja rasta mikroorganizama

Jedna od osnovnih metoda upoznavanja karakteristika pojedinih mikroorganizama, jest praćenje mikrobnog rasta, koji se većinom prikazuje kao krivulja rasta (slika 4.). Nakon naciepljivanja bakterijske ili kvaščeve kulture na hranjivu podlogu koja sadrži sve nužne sastojke, kao i osigurane fizikalne uvjete, njihov rast i razmnožavanje odvija se sljedeći krivulju rasta mikroorganizama. Krivulja prikazuje ovisnost logaritamske vrijednosti broja stanica mikroorganizma o vremenu (Zwietering i sur., 1990).

Svaka krivulja rasta jedinstvena je za određenu vrstu mikroorganizma te se mijenja ovisno o hranjivoj podlozi i okolišnim uvjetima. Osim toga, njezin rast se može opisati pomoću 4 faze; lag faza (faza suzdržanog rasta), log faza rasta (logaritamska ili eksponencijalna faza), stacionarna faza i faza odumiranja (Duraković, 1991).

1. lag-faza (faza suzdržanog rasta)

Inokulirani mikroorganizmi (bakterije i kvasci) ne počinju se odmah razmnožavati kada se naciepe na hranjivu podlogu, jer je potrebno vrijeme da se stanice priviknu na novu okolinu. Karakteristika ove faze je sinteza potrebnih enzima za rast u novoj sredini, dolazi do povećanja obujma stanice, no broj stanica se ne povećava. Trajanje lag-faze ovisi o stanju inokuliranih stanica, prethodnim uvjetima okoline iz koje su stanice prenesene te koncentraciji stanica u inokulumu (Duraković, 1991). Također stanice su osjetljive na visoku temperaturu te na različite kemijske agense koji mogu biti toksični.

2. logaritamska ili eksponencijalna faza

Kada se stanice prilagodile okolišnim uvjetima, dolazi do razmnožavanja i ubranog rasta i to geometrijskom progresijom. Dioba stanice se odvija ubrzano i u maksimalnim iznosima dok postoji hranjivih tvari, a koncentracija otrovnih produkata ne naraste do vrijednosti koja onemogućuje rast. Tijekom ove faze rasta stvara se nova generacija stanica, a svaka stanica u novoj generaciji može se dijeliti na jednak način. Na osnovu promjene

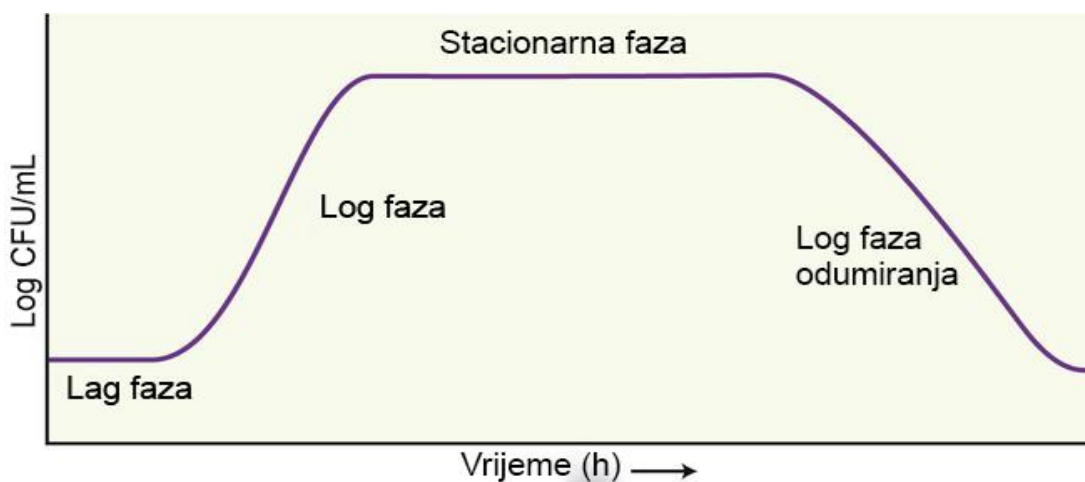
broja stanica i vremena uzgoja, može se izračunati generacijsko vrijeme (g) (Duraković, 1991).

3. stacionarna faza

Tijekom log-faze hranjive tvari se troše, a otpadni produkti metabolizma se nagomilavaju pa se brzina rasta mikroorganizama počinje smanjivati. Dolazi do izjednačavanja broja živih i mrtvih stanica, s tim da ugibanjem određenog broja stanica dolazi do istodobnog oslobađanja hranjivih sastojka koje druge stanice mogu upotrijebiti za rast i razmnožavanje. Unutar ove faze dolazi do sinteze sekundarnih metabolita, poput enzima i antibiotika koji imaju komercijalnu uporabu (Duraković, 1991).

4. logaritamska faza odumiranja

U posljednjoj fazi dolazi do ubrzanog ugibanja mikroorganizama zbog povećane koncentracije toksičnih produkata te se broj živih stanica smanjuje geometrijskom progresijom koja je obrnuta onoj u log-fazi rasta. Mrtve stanice se liziraju pomoću autolitičkih enzima koji oslobađaju sadržaj stanice. Nakon određenog vremena, dolazi do nestajanja preostalih živih stanica, a česti uzrok tome je isušivanje hranjive podloge (S.Weeks i sur., 2008; Duraković, 1991).



Slika 4. Krivulja rasta mikroorganizama (Anonymus 4, 2015)

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Mikroorganizmi

Bakterijska kultura *Lactobacillus plantarum* B te odabrani vinski kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus* korišteni su kao test mikroorganizmi za određivanje utjecaja okratoksina A na krivulju rasta i morfološke karakteristike. Mikroorganizmi su dobiveni iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Podloga za uzgoj bakterije *L. plantarum* B

MRS (Man-Rogosa-Sharpe)-bujon i agar korišteni su za uzgoj i određivanje ukupnog broja bakterije *L. plantarum* B pri laboratorijskim uvjetima od 37°C tijekom 72 sata.

a) MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – agar sastava: (g x L⁻¹)

- ❖ pepton 10
- ❖ mesni ekstrakt 10
- ❖ kvašćev ekstrakt 5
- ❖ glukoza 20
- ❖ Tween 80 1
- ❖ MgSO₄ · 7 H₂O 0,1
- ❖ MnSO₄ · 7H₂O 0,05
- ❖ natrijev-acetat 5
- ❖ agar 20
- ❖ u destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 6,5
- ❖ sterilizacija pri 121°C/15 min.

b) MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – bujon

- ❖ istog je sastava kao podloga MRS-agar, samo bez dodanog agara i korištena je kao podloga za određivanje utjecaja OTA

3.1.3 Podloga za uzgoj kvasaca *S.cerevisiae* i *S.bayanus*

Za uzgoj i određivanje broja stanica kvasca u uzorcima korišten je sladni agar i sladni bujon (Biolife, Italija). Uzgoj kvasaca *S. cerevisiae* i *S. bayanus* proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 28°C tijekom 168 sati.

a) Sladni agar- sastav: (g x L⁻¹)

❖ sladni ekstrakt	30
❖ agar	17

b) Sladni bujon- sastav:

❖ pepton	15
❖ mesni ekstrakt	3
❖ natrijev klorid	100
❖ kalijev hidrogenfosfat	0,3

3.1.4 Mikotoksini

Standard mikotoksina:

OTA „Sigma“ – St. Louis, MO, SAD

3.1.5 Aparatura

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

3.1.6 Pribor

- Erlenmeyer tikvice 250 mL
- Petrijeve zdjelice Ø 10 cm
- epruvete mikrobiološke 18 x 180 mm
- mikropipete 100 i 1000 µL JUSTOR 1100G
- okularni mikrometar
- objektni mikrometar

3.2 METODE RADA

3.2.1 Standard OTA

Kristalinični oblik mikotoksina OTA otopljen je u etanolu do osnovne koncentracije 0,1 mg/mL te je kao takav pohranjen na 4°C do izvođenja pokusa. Radne koncentracije OTA pripremljene su u mediju za rast bakterija odnosno kvasca.

3.2.2 Priprema uzorka

3.2.2.1. Priprema uzorka bakterije

Bakterijska kultura *L. plantarum* B precjepljuje se svakih 14 dana i inkubira pri 37°C, a čuvana je u MRS-bujonu pri 4°C. *L. plantarum* B nacijepljena je u 5 mL MRS bujona te inkubirana tijekom 24 sata pri 37 °C. 5 mL prečnoćne kulture dodano je u tri Erlenmeyerove tikvice s 30 mL MRS bujona. Jedna tikvica bila je kontrolna (samo bujon, etanol i bakterija), u drugu je dodana etanolna otopina OTA do konačne koncentracije 4 µg/mL, a u treću otopina OTA do konačne koncentracije 2 µg/mL.

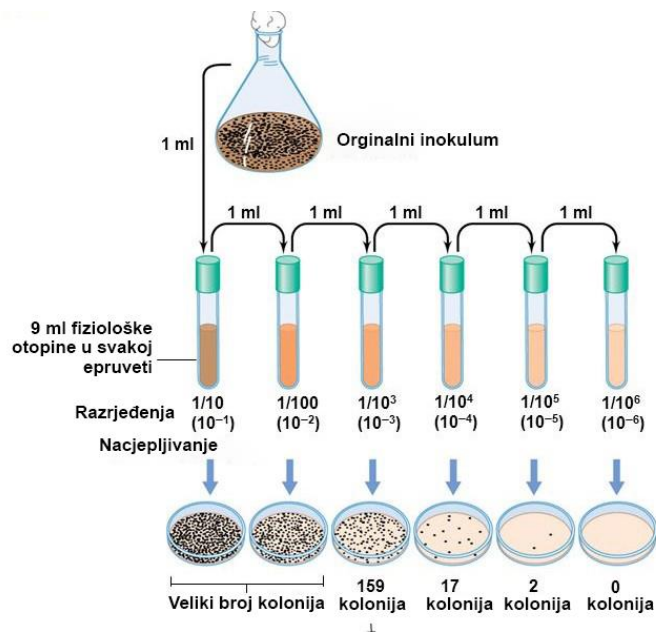
3.2.2.2. Priprema uzorka kvasaca

S.cerevisiae i *S.bayanus* čuvani su na krutoj podlozi u epruveti pri 4 °C, u hladnjaku. Nakon pola sata temperiranja pri laboratorijskim uvjetima, pomoću mikrobiološke ušice pripremljena je suspenzija kvaščevih stanica u sladnom bujonu (10⁶ CFU/mL). Nakon 24 sata inkubacije pri 28°C, po 5 mL sladnog bujona s nacijepljenim kvaščevim kulturama, dodano je u četiri Erlenmeyerove tikvice. Po jedna tikvica je bila kontrolna (samo bujon, etanol i kvasac), a u druge dvije je dodana etanolna otopina OTA do konačne koncentracije 1 µg/mL.

3.2.3. Određivanje krivulje rasta

Svrha ovog rada je ispitivanje utjecaja OTA na krivulju rasta bakterije *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata. Tijekom prvih 10 sati, svaka 2 sata te nakon 24., 48. i 72. sata načinjena je serija decimalnih razrjeđenja (slika 5) u omjeru 1:10 i po 100µL suspenzije nacijepljeno je na čvrstu MRS podlogu u Petrijevim zdjelicama i inkubirano kroz 48h na 37°C. Pokusi za određivanje krivulje rata provedeni su u paralelama. Nakon inkubacije, koristeći brojač kolonija, prebrojane su porasle kolonije u kontrolnom uzorku i u uzorcima s dodanim OTA. Dobiveni broj živih bakterija izražen je kao log CFU/mL.

Prilikom ispitivanja utjecaja OTA na krivulju rasta kvasaca *S.cerevisiae* i *S.bayanus* tijekom 168 sati, prvih 12 sati, svaka 4 sata, a nakon toga svaka 24 sata, načinjena je serija decimalnih razrjeđenja i po 100 μL suspenzije naciepljeno je na sladni agar u Petrijevim zdjelicama te stavljeno na inkubaciju 24 sata na 28°C. Kao i kod bakterija, pokusi su provedeni u paraleli. Za praćenje rasta kvasca korištena je metoda neizravnog (posrednog) određivanja broja živih stanica izraženih kao log CFU/mL.



Slika 5. Priprema decimalnih razrjeđenja (Anonymous 5, 2012)

3.2.4. Mikrometrija

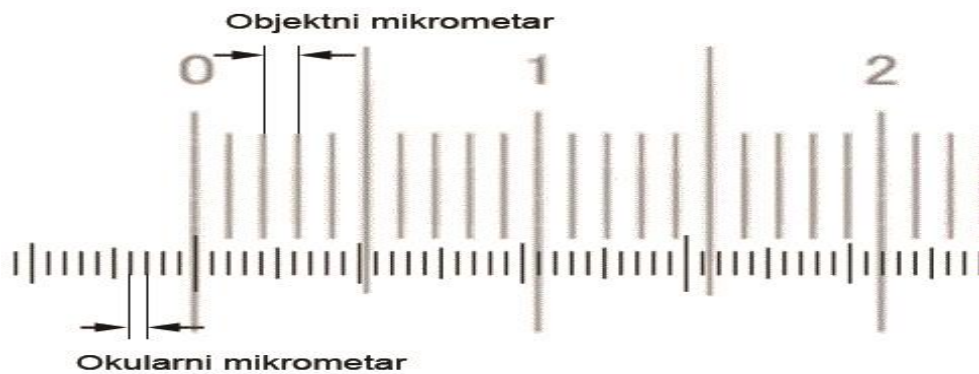
Tijekom 72 sata inkubacije, korištenjem okularnog i objektnog mikrometra, praćen je utjecaj OTA na veličinu stanica bakterije *Lactobacillus plantarum* B obojenih metilenskim modrilom. Veličina bakterijskih stanica, tijekom prvih 10 sati, mjerila se svaka 2 sata, a zatim nakon 24., 48. i 72. sata. Mjerenja su provedena u paralelama po 50 stanica.

Kao i prilikom određivanja krivulje rasta kod kvasaca *S.cerevisiae* i *S.bayanus*, utjecaj OTA na veličinu stanica praćen je tijekom 168 sati inkubacije. Tijekom prvih 12 sati veličina stanica se mjerila svaka 4 sata, a zatim svakih 24 sata do 168. sata. Mjerenja su provedena u paralelama po 50 stanica.

Prije mjerenja potrebno je izbaždriti okularni mikrometar stavljanjem okularnog mikrometra u okular, a objektnog mikrometra na stolić mikroskopa (slika 6). Baždarenje se provodi pod povećanjem od 1000x uz upotrebu imerzijskog ulja za bakterije i pri povećanju

od 400x za kvasce, tako da se odredi broj podjeljaka objektne skale koji odgovara 100-tom podjeljku okularne skale. Razmak između dvaju podjeljaka na objektnoj skali je točno 10 μm . Faktor povećanja okularnog mikrometra dobije se dijeljenjem podjeljaka objektne skale sa 100 podjeljaka okularne skale i pomnoži s 10. Za svaku kombinaciju mikroskopa i objektnog i okularnog mikrometra potrebno je provesti baždarenje (Duraković i Redžepović, 2002).

Nakon provedenog baždarenja, na stolić mikroskopa se stavi pripremljeni preparat bakterija ili kvasaca, dok okularni mikrometar ostaje u okularu. Izmjeri se broj podjeljaka koji zauzima mikroorganizam na okularnoj skali i pomnoži s faktorom povećanja. Na taj način izračuna se veličina određenog mikroorganizma.



Slika 6.Objektni i okularni mikrometar (Anonymus 6, 2012)

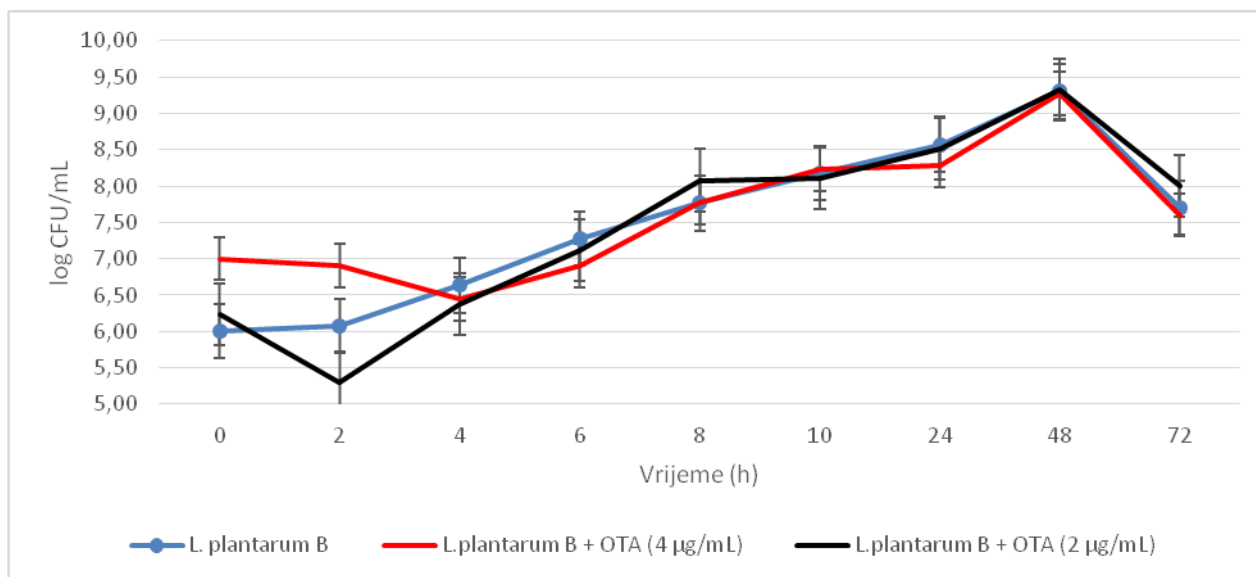
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Utjecaj mikotoksina na krivulju rasta *L.plantarum* B

Neizravnim određivanjem broja živih stanica bakterija, brojenjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi (MRS) u Petrijevoj zdjelici, praćen je rast bakterije *Lactobacillus plantarum* B tijekom 72 sata sa i bez dodanog OTA. Dobiveni rezultati oblikuju krivulju rasta bakterije te se mogu uočiti pojedine faze rasta (slika 7).

Lag-faza odnosno faza suzdržanog rasta u uzorku bez dodanog toksina trajala je do 2. sata od trenutka naciepljivanja bakterijske kulture na podlogu. Nakon 2. sata nastupa eksponencijalna (logaritamska) faza rasta, koja je trajala do 48. sata. Na slici 7 je vidljivo da je izostala stacionarna faza jer je nakon 48. sata nastupila faza odumiranja. Također, na slici 7 je vidljivo da rast bakterija s dodanim OTA (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ima produženu lag-fazu u odnosu na kontrolni uzorak. Lag-faza je produljena za 2 sata kod obje dodane koncentracije

OTA, što možemo pripisati prilagođavanju bakterije novonastalim uvjetima. Nakon 48. sata uslijedila je faza odumiranja.



Slika 7. Krivulja rasta bakterije *Lactobacillus plantarum* B bez i s dodanim OTA u koncentraciji od 4 µg/mL i 2 µg/mL pri 37 °C tijekom 72 sata uzgoja

Najveći broj živih stanica u kontrolnom uzorku postignut je u 48. satu i iznosio je 9,30 log CFU/mL. U uzorcima s 4 i 2 µg/mL dodanog OTA, najveći broj živih stanica iznosio je 9,24 log CFU/mL odnosno 9,33 log CFU/mL (slika 7). Iz navedenih rezultata vidljivo je da OTA ima neznatan učinak na preživljavanje bakterije *Lactobacillus plantarum* B.

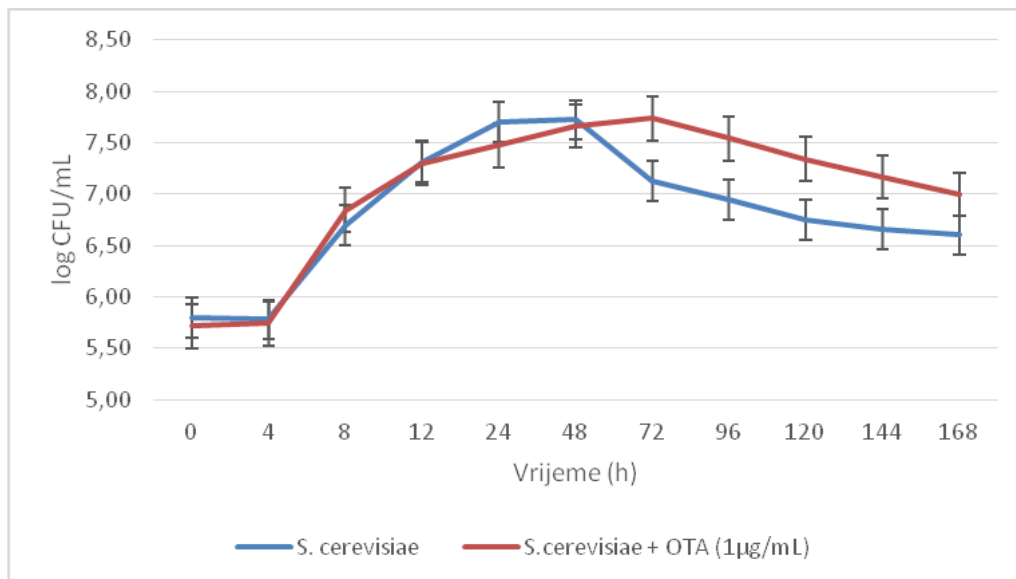
U uzorcima s dodatkom 4 µg/mL i 2 µg/mL OTA broj živih stanica se u fazi odumiranja smanjuje za 1,67 odnosno 1,33 log jedinice, dok se u kontrolnom uzorku broj živih stanica smanjuje za 1,6 log jedinica.

O utjecaju raznih mikotoksina na bakterije mliječne kiseline, proveden je relativno mali broj istraživanja. Budući da u ovom radu krivulja rasta bakterije uz dodatak OTA prati krivulju rasta kontrolnog uzorka, moguće je zaključiti da je učinak OTA na krivulju rasta bakterije *Lactobacillus plantarum* B neznatan. Prisutnost mikotoksina vidljivo je djelovala jedino u lag-fazi, gdje je uočeno produljeno vrijeme trajanja faze za 2 sata prilikom dodatka obje koncentracije OTA (4 µg/mL i 2µg/mL).

4.2 Utjecaj mikotoksina na krivulju rasta *S. cerevisiae* i *S. bayanus*

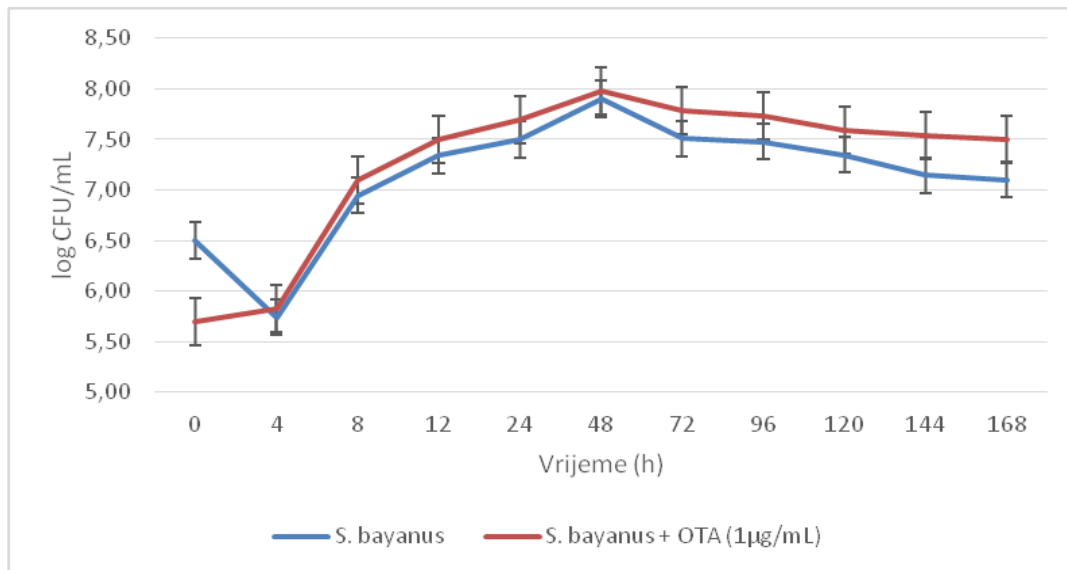
Neizravnim određivanjem broja živih stanica vinskih kvasaca, brojanjem živih stanica na hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici, praćen je rast kvasaca *S. cerevisiae* i *S. bayanus*

tijekom 168 sati sa i bez dodanog mikotoksina OTA. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 8 i 9.



Slika 8. Krivulja rasta *S. cerevisiae* bez i s dodanim OTA u koncentraciji od 1 µg/mL pri 28°C tijekom 168 sati

Kod krivulje rasta *S. cerevisiae* jasno se mogu uočiti pojedine faze rasta (slika 8). U uzorku bez dodanog toksina lag-faza je trajala do 4. sata, nakon koje kvasac ulazi u eksponencijalnu fazu koja je trajala do 24. sata. Zatim slijedi stacionarna faza koja traje do 48. sata, nakon čega slijedi faza odumiranja. Na slici 8 je vidljivo da krivulja rasta uz dodatak 1 µg/mL OTA prati krivulju rasta kontrolnog uzorka do 48. sata. Dodatak mikotoksina produžio je eksponencijalnu fazu za 24 sata, nakon koje je odmah uslijedila faza odumiranja.



Slika 9. Krivulja rasta *S. bayanus* bez i s dodanim OTA u koncentraciji od 1 µg/mL pri 28°C tijekom 168 sati

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da lag-faza kvasca *S. bayanus* bez dodanog OTA traje do 4. sata, potom je uslijedila eksponencijalna faza koja je trajala do 48. sata uzgoja nakon čega odmah slijedi faza odumiranja. Na slici 9 vidljivo je da krivulja rasta s dodanim OTA prati krivulju rasta kontrolnog uzorka.

Najveći broj živih stanica kod kvasca *S. cerevisiae* postignut je u 48. satu i iznosio je 7,72 log CFU/mL, a kod uzorka s 1 µg/mL dodanog OTA najveći broj je postignut u 72. satu i iznosio je 7,74 log CFU/mL. U pokusu s kvascem *S. bayanus*, maksimalan broj stanica također je postignut u 48. satu i iznosio je 7,90 log CFU/mL, dok je pri dodanoj koncentraciji od 1 µg/mL taj broj nakon 48. sata iznosio je 7,98 log CFU/mL.

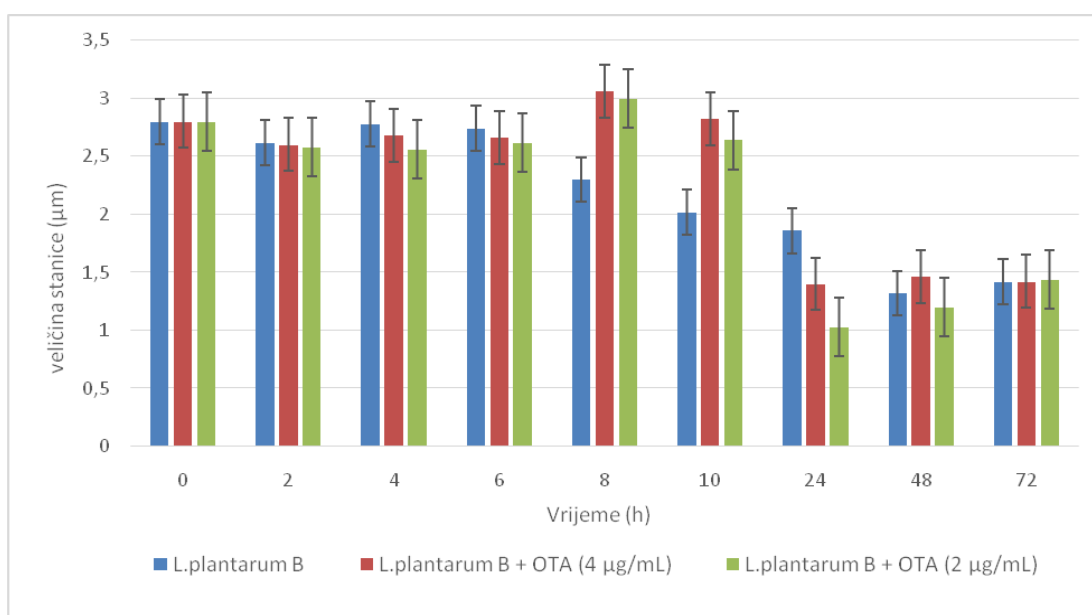
U kontrolnom uzorku kvasca *S. cerevisiae* broj živih stanica u fazi odumiranja smanjuje se za 0,59 log jedinica, dok se uz dodatak OTA broj živih stanica smanjuje za 0,2 log jedinica. Broj živih stanica kvasca *S. bayanus* smanjuje se za 0,65 log jedinica u kontrolnom uzorku, odnosno za 0,29 log jedinica u uzorku s dodanim tokisnom OTA u koncentraciji od 1 µg/mL.

Analizirajući kontaminaciju grožđa okratoksinom A, De Felice i sur. (2008) zaključili su da različiti mikroorganizmi imaju sposobnost razgradnje mikotoksina na mnogo manje toksične spojeve. Tako su *Aureobasidium pullulans* sojevi mogli degradirati egzogeno dodani OTA u OTAd. Stoga se rezultati da OTA u koncentraciji 1 µg/mL nema negativan utjecaj na

rast kvasaca, poklapaju s istraživanjima koja su dokazala da *S. cerevisiae* može smanjiti razinu toksičnog djelovanja OTA (Cubaiui sur., 2012).

4.3 Utjecaj mikotoksina na morfološke karakteristike stanica *L. plantarum* B

U ispitivanjima utjecaja OTA na morfološke karakteristike stanica *L. plantarum* B tijekom 72 sata, u mikroskopskim preparatima kontrolnog uzorka i uzorka s dodanim OTA vidljiva je promjena u veličini stanica u ovisnosti o vremenu kontakta između bakterije i mikotoksina. Dobiveni rezultati istraživanja prikazani su na slici 10.



Slika 10. Utjecaj OTA u koncentracijama 4 µg/mL i 2 µg/mL na veličinu stanica *L. plantarum* B tijekom 72 sata

Kako bi se utvrdila veličina bakterijskih stanica, odabrano je u paraleli po 50 nasumičnih stanica te je veličina određena mikroskopiranjem pod povećanjem od 1000x, uz upotrebu imerzijskog ulja te okularnog i objektnog mikrometra.

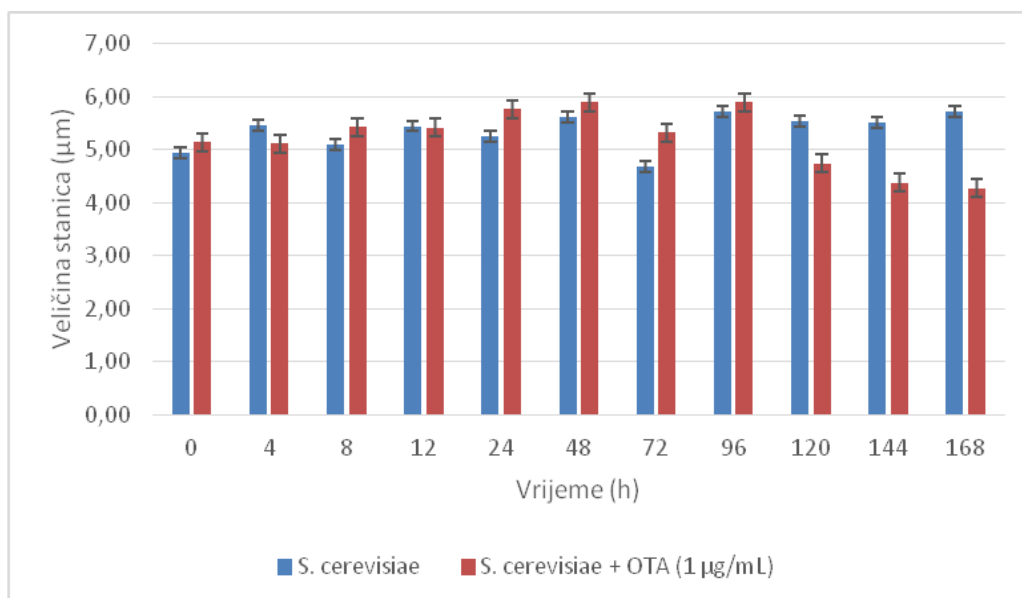
Na slici 10 vidljivo je da OTA utječe na veličinu stanica *L. plantarum* B, no nije jasno kojim mehanizmom djeluje na morfologiju stanica. U početnim satima (od 0. do 6. sata) uočeno je da bakterija tretirana s OTA ima u prosjeku manje dimenzije u odnosu na kontrolni uzorak koji do 6. sata ima veće vrijednosti. Najveća razlika u veličini stanica između kontrolnog uzorka i uzoraka tretiranih s toksinom uočava se u 8. i 10. satu, gdje uzorci tretirani s OTA pokazuju veće vrijednosti. Ove razlike ukazuju na mogućnost da bakterija *Lactobacillus plantarum* ima sposobnost vezanja mikotoksina što se podudara s rezultatima

Del Prete i sur. (2007), Fuchs i sur. (2008). Dok su Haskard i sur. (2001), Markov i sur. (2010), Muñoz i sur. (2010) dokazali da bakterije roda *Lactobacillus* imaju sposobnost vezanja AFB₁ u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. U znanstvenoj literaturi je predložen mehanizam vezanja za AFB₁ i pretpostavlja se da se odvija u dva procesa; vezanje (adsorpcija) te otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice mikroorganizma (Peltonen i sur., 2001). Iako se većina istraživanja bazira na mehanizmu vezanja aflatoksina B₁, provedena su i istraživanja o interakcijama BMK i okratoksina A (Dalié i sur., 2010). Na temelju dobivenih rezultata može se pretpostaviti da predloženi mehanizam vezanja vrijedi i u slučaju djelovanja mikotoksina OTA na BMK, jer je iz slike 10. vidljivo da naizmjenice dolazi do povećanja i smanjenja bakterijskih stanica ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti stanica okratoksinu A.

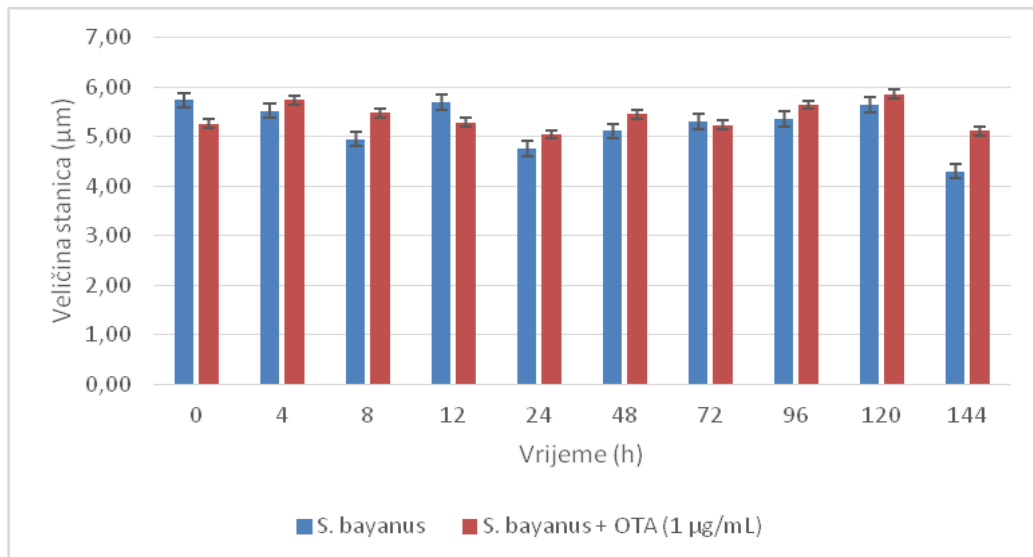
Najveća razlika u veličini stanica uočena je u 8. satu. Dodatak 4 µg/mL OTA u prosjeku je povećao stanicu za 33,04%, odnosno 30,44% uz dodatak 2 µg/mL OTA.

4.4 Utjecaj mikotoksina na morfološke karakteristike stanice kvasaca *S.cerevisiae* i *S. bayanus*

Utjecaj OTA na veličinu stanica kvasca tijekom 168 sati prikazan je na slikama 11 i 12.



Slika 11. Utjecaj OTA u koncentraciji od 1 µg/mL na veličinu stanice kvasca *S. cerevisiae* tijekom 168 sati



Slika 12. Utjecaj OTA u koncentraciji od 1 µg/mL na veličinu stanice kvasca *S. bayanus* tijekom 168 sati

Rezultati prikazani na slici 11 pokazuju utjecaj OTA na veličinu stanice kvasca *S. cerevisiae* iako nije vidljiv jasan trend utjecaja OTA na morfologiju stanica. Početno povećanje stanica može se objasniti vezanjem mikotoksina na staničnu stjenku kvasca, a vidljivo je da se dužim izlaganjem kvasca okolini s dodanim mikotoksinom (144. i 168. satu) veličine stanica smanjuje, vjerojatno zbog otpuštanja mikotoksina. Kod kvasca *S. bayanus* dolazi do naizmjeničnog povećanja i smanjenja stanica u prisutnosti 1 µg/mL OTA, a zatim nakon dužeg vremenskog kontakta između kvasca i mikotoksina vidljivo dolazi do povećanja veličine stanica.

Najveća razlika u veličini stanica kod kvasca *S. cerevisiae* uočena je tek u 168. satu, a pokazuje smanjenje veličine stanice od 25,31% od kontrolnog uzorka. U pokusu s kvascem *S. bayanus* također je u istom satu vidljiva najveća razlika koja pokazuje povećanje stanice za 16,01% u odnosu na kontrolni uzorak.

Iz dobivenih rezultata zaključujemo da mikotoksin OTA ima različit utjecaj na veličinu stanica kvasaca *S. cerevisiae* i *S. bayanus* te da promjene ovise o sposobnosti vezanja i otpuštanja OTA na površinu stanične stjenke, ali i vremenu djelovanja mikotoksina na stanice kvasca. Poznato je da stanična stijenka kvasaca veže sterole (Adams i Parks, 1967), metalne ione, kompleksne strukture ili toksine (Brady i sur., 1994; Breierova i sur., 2002), a molekula koja je zaslužna za vezanje je manan. Potvrđeno je da je uklanjanje mikotoksina povezano s adhezijom na staničnu stijenku, a ne kovalentnim vezanjem ili metabolizmom, budući da mrtve stanice ne gube sposobnost vezanja (Baptista i sur., 2004; Celyk i sur., 2003). Vezanje okratoksina je učinkovitije kada su stanice kvasaca zamijenjene s

ekstrahiranom staničnom stijenkom (Huwig i sur., 2001) ili s termički tretiranim stanicama što ukazuje da se toksin iz tekućih medija (Bejaoui i sur., 2004) uklanja adsorpcijom.

Istraživanje u cilju odabira sojeva vinskih kvasaca kao agensa biokontrole protiv gljivičnih kontaminanata odgovornih za nakupljanje OTA u grožđu i vinu te analiziranje mehanizma dekontaminacije OTA pomoću soja *Saccharomyces cerevisiae*; dokazalo je da se tijekom fermentacije vina smanjuje razina OTA. Smanjenje razine OTA posredovanjem kvasaca objašnjeno je različitim mehanizmima, uključujući adsorpciju na površinu stanica kvasca ili interakcijom s metabolitima kvasaca (Cubaiu i sur., 2012).

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

1. Okratoksin A u koncentracijama od 4 i 2 µg/mL ima neznatan učinak na rast i morfološke karakteristike bakterije *Lactobacillus plantarum* B.
2. Okratoksin A u koncentraciji od 1 µg/mL ima neznatan učinak na rast i morfologiju kvasca *S. bayanus*, dok je vidljiv utjecaj na krivulju rasta i morfologiju kvasca *S. cerevisiae*, što se može pripisati njegovoj sposobnosti vezanja mikotoksina na površinu stanične stijenke.
3. Dobiveni rezultati vode zaključku da su se bakterija *L. plantarum* B te kvasci *S. cerevisiae* i *S. bayanus* prilagodili sredini u kojoj je prisutan mikotoksin.
4. Utjecaj OTA na broj i veličinu stanica bakterija i kvasaca ovisi o koncentraciji i vremenu djelovanja mikotoksina.

6. LITERATURA

- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabanes F.J. (2001) Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection* **64**: 903–906.
- Adams, B.G. i Parks, L.W. (1967) A water-soluble form of ergosterol and cholesterol for physiological studies. *Biochemical Biophysical Research Communications* **28**: 490-494.
- Anonymus1 (2017) Okratoksin A, <<https://www.giornaledellabirra.it/approfondimenti/ocratossina-a-contaminante-naturale-della-birra/>> Pristupljeno: 3.rujna.2017.
- Anonymus2 (2014) Budding Yeast; *Saccharomyces cerevisiae*, <<http://www.biology-pages.info/Y/Yeast.html>> Pristupljeno: 3.rujna.2017.
- Anonymus3 (2017) Viticulture and Enology; *Saccharomyces bayanus*, <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/saccharomyces_bayanus.html> Pristupljeno: 3.rujna.2017.
- Anonymus4 (2015) Krivolja rasta mikroorganizama, <<https://clinicalgate.com/bacteria-and-archaea/>> Pristupljeno: 3.rujna.2017
- Anonymus5 (2015) Decimalno razrjeđenje <<http://slideplayer.com/slide/11338624/>> Pristupljeno: 30.kolovoza.2017.
- Anonymus6 (2012) Objektni i okularni mikrometar <<http://www.mecanusa.com/microscope/micrometer/Calibration.htm>> Pristupljeno: 30.kolovoza.2017.
- Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly, M.Z., Moussa, L.A. (1998) Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Botanical Bulletin - Academia Sinica Taipei* 39, str. 279–285.
- Baptista, A.S., Horii, J., Calori-Dominiques, M.A., da Gloria, E.M., Salgado, J.M., Vizioli, M.R. (2004) The capacity of mannooligosaccharides thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**: 475-481.
- Breierova, E., Vajczikova, I., Sasinkova, V., Stratilova, E., Fiserac, M., Gregor, T. (2002) Biosorption of cadmium ions by different yeast species. *Zeitschrift für Naturforschung* **57**: 634-639.

- Celyk, K., Denly, M., Savas, T. (2003) Reduction of toxic effects of aflatoxin by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicken diets. *Revista Brasileira de Zootecnia* **32**: 615-619.
- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A. D., Budroni, M., & Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin a biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins* **4**: 1468-1481.
- Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. (2010) Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* **21**: 370-380.
- 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 Prete, V., Rodriguez, H., Carrascosa, A. V., de las Rivas, B., Garcia-Moruno, E., & Munoz, R. (2007). In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* **70**: 2155–2160.
- Dickinson, J. R., & Schweizer, M. (Eds.). (2004). Metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC press.
- Ducrotté, P., Sawant, P., Jayanthi, V. (2012) Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology* **18**: 4012–4018.
- Duraković, S. (1991) Prehrambena mikrobiologija, 1. izd., Medicinska naklada, Zagreb.
- Duraković, S., Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, 1.izdr., Kugler.
- Duraković, S., & Redžepović, S. (2002) Uvod u opću mikrobiologiju. Knjiga prva. str. 8-368
- Frece J., Markov K. (2016) Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: Food biology, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis. Str 270-293
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., & Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 1398–1407.
- Giovati L., Magliani W., Ciociola T., Santinoli C., Conti S., Polonelli L. (2015) AFM₁ in Milk: Physical, Biological and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins* **7**: 4330-4349.

- 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**: 1221-1234.
- Gospodarski list (2015). Voćna vina <<http://www.gospodarski.hr/Publication/2015/10/prilog-broja-vona-vina/8241#.WakqwPkgXIU>> Pristupljeno: 13.8.2017.
- Grba, S., Stehlik-Tomas, V., Stanzer, D., Mrvčić, J., Marić, V., Orlić, S., ... & Krpan, M. (2010). Yeasts in biotechnology. str 8-228
- HAH (2013) Što su mikotoksini?. HAH - Hrvatska agencija za hranu, <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>> Pristupljeno 10.kolovoza.2017.
- Haskard C.A., El-Nezami H.S., Kankaanpää P.E., Salminen S., Ahokas J.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3086-3091.
- Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* **122**: 179-188.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1987) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluation of carcinogenicity. An updating of IARC monographs volumes 1 to Supplement 7, . Pristupljeno 19. kolovoza 2017.
- Jorgensen, K. (1998) Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin. *Food Additives & Contaminants* **15**: 550–554.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2011). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press.4.
- Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R., & Visconti, A. (Eds.). (2008). Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade. CABI.
- Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., & Delaš, F. (2010). Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **60**: 244-251.
- Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* **205**: 1112–1113.
- Mortimer, R. K., & Johnston, J. R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35-43.

- Muñoz R., Arena M.E., Silva J., González S.N. (2010) Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**: 1019-1026.
- Peltonen K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J., Salminen S. (2001) Aflatoxin B1 binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* **84**: 2152-2156.
- Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., & Šegvić Klarić, M. (2008). Okratoksin a i zearalenon: kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva* **50**: 147-159.
- Peraica M., Rašić D. (2012.) Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi. *Krmiva* **54**: 81-84
- Peraica, M., & Domijan, A. M. (2006). Mikotoksini i zdravlje ljudi. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 2.
- Pleadin, J., Frece, J., Vasilj, V., & Markov, K. (2015). Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **10**: 6-13.
- Pleadin, J., & Kovačević, D. (2016). Kemijske opasnosti u mesu i mesnim proizvodima u prehrambenom lancu od farme do potrošača. *MESO: prvi hrvatski časopis o mesu* **18**: 436.
- Sedewitz, B. A. R. B. A. R. A., Schleifer, K. H., & Götz, F. (1984). Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bacteriology* **160**: 462-465.
- Shotwell, L.L., Hesseltine, C.W., Goulden, M.L. (1969) Ochratoxin A occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Journal of Applied Microbiology* **17**: 765-766
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E., Middelberg, A.P. (2000) The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 9871-9874.
- Sokolović, M. (2005). Značaj trikotecenskih mikotoksina u hrani za perad. *Stočarstvo* **59**: 289-300.
- Størmer, F.C. (1992) Ochratoxin A – a mycotoxin of concern. U: Handbook of Applied Mycology, 5. izdanje (Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., Arora, D.K., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York, 403-432.

Šošo, V. M., Škrinjar, M. M., & Blagojev, N. T. (2012). Influence of ecophysiological factors on the presence of ochratoxin A in dried vine fruits: A review. *Acta Periodica Technologica* **43**: 123-138.

Šušković, J., Brkić, B., & Matošić, S. (1997). Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**: 57-73.

Šušković, J., Kos, B. (2001) Probiotici i prebiotici, interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Teuber, M. (1993). Lactic acid bacteria. *Biotechnology Set, Second Edition*, 325-366.

Varsha K.K., Napoothiri K.M. (2016) Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control* **69**: 61-64.

Weeks, B. S., & Alcamo, I. E. (2008). *Microbes and society*. Jones & Bartlett Learning, 185-186.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van 'T Riet, K. (1990) Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1875–1881.

Izjava o izvornosti

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

Ašai

ime i prezime studenta