

Utjecaj odabranih sojeva kvasaca na rast toksikotvornih plijesni

Knapić, Simona

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:352503>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno- biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Simona Knapić

7421/ PT

UTJECAJ ODABRANIH SOJEVA KVASACA NA RAST TOKSIKOTVORNIH PLIJESNI

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno- biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikorbiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Utjecaj odabranih sojeva kvasaca na rast toksikotvornih plijesni

Simona Knapić, 0058210892

SAŽETAK:

Kvasci predstavljaju neiskorišteni izvor antagonističkog djelovanja prema drugim mikroorganizmima. Antagonističke interakcije iznjedrile su koncept biokontrole, prilikom čega bi se jedna vrsta mikroorganizma mogla koristiti kako bi se inhibirao rast i preživljavanje druge, manje poželjne vrste. Tijekom posljednjih 20 godina otkriveno je nekoliko vrsta kvasaca koje pokazuju snažno antagonističko djelovanje protiv plijesni. Pojava plijesni na prehrambenim proizvodnima, krmi, ali i u okolišu kao posljedicu može imati negativan učinak na zdravlje ljudi i životinja. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj odabranih sojeva kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ, *Saccharomyces bayanus* 8, *Saccharomyces uvarum* 20, *Hanseniaspora uvarum* S138, *Kluyveromyces marxianus* DS12 i *Pichia guilliermondii* ZIM) na rast toksikotvornih plijesni (*Aspergillus ochraceus* 402, *Aspergillus carbonarius* 408, *Penicillium nordicum* 701 i *Penicillium verrucosum* 702). Rast plijesni u kontrolnim uzorcima te u prisutnosti odabranih sojeva kvasaca, ispitan je tijekom 10 dana inkubacije, mjerenjem promjera porasle kolonije plijesni na čvrstoj hranjivoj podlozi. Dobiveni rezultati pokazuju potencijalnu primjenu kvasaca za biokontrolu rasta plijesni, a kao najbolji primjeri ističu se *P. guilliermondii* ZIM koji je inhibirao rast plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* za 63,4 %, odnosno 68,3 % već nakon 3 dana uzgoja. *S. cerevisiae* DSMZ je inhibirao rast plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* za 74,7 %, odnosno 54,4 %, ali nakon 10 dana uzgoja.

Ključne riječi: antagonističko djelovanje, kvasci, plijesni, rast mikroorganizama

Rad sadrži: 32 stranice, 10 slika, 0 tablica, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

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

Datum obrane: lipanj, 2021.

BASIC DOCUMENT CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory of General and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food technology

Influence of selected yeast strains on the growth of toxic molds

Simona Knapić, 0058210892

ABSTRACT:

Yeasts represent an unused source of antagonistic agents against other microorganisms. Antagonistic interactions have spawned the concept of biocontrol, in which one species of microorganism could be used to inhibit the growth and survival of another, less desirable species. Over the last 20 years, several types of yeast have been discovered that show strong antagonistic action against molds. The appearance of mold on food products, feed and in the environment can have a negative effect on human and animal health. The aim of this study was to investigate the influence of selected strains of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ, *Saccharomyces bayanus* 8, *Saccharomyces uvarum* 20, *Hanseniaspora uvarum* S138, *Kluyveromyces marxianus* DS12 and *Pichia guilliermondii* ZIM) on the growth of toxic molds (*Aspergillus ochraceus* 402, *Aspergillus carbonarius* 408, *Penicillium nordicum* 701 and *Penicillium verrucosum* 702). Mold growth in control samples and in the presence of selected yeast strains was examined during 10 days of incubation, by measuring the diameter of the grown mold colony on a solid nutrient medium. The obtained results show the potential use of yeast for biocontrol of mold growth and the best examples are *P. guilliermondii* ZIM which inhibited the growth of molds of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* by 63.4% and 68.3% after just 3 days of cultivation. *S. cerevisiae* DSMZ inhibited the growth of molds from the genera *Aspergillus* and *Penicillium* by 74.7% and 54.4%, respectively, but after 10 days of cultivation.

Keywords: antagonistic interactions, yeasts, molds, growth of microorganisms

Thesis contains: 32 pages, 10 figures, 0 tables, 50 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Full Professor, Ksenija Markov, PhD

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

Defence date: June, 2021.

Sadržaj

| | | |
|---------------|--|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 2. | TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. | KVASCI | 2 |
| 2.1.1. | Kvasci roda <i>Saccharomyces</i> | 3 |
| 2.1.2. | <i>Hanseniaspora uvarum</i> | 4 |
| 2.1.3. | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 4 |
| 2.1.4. | <i>Pichia guilliermondii</i> | 5 |
| 2.2. | PLIJESNI | 5 |
| 2.2.1. | Plijesni roda <i>Aspergillus</i> | 7 |
| 2.2.2. | Plijesni roda <i>Penicillium</i> | 8 |
| 3. | MATERIJALI I METODE | 9 |
| 3.1. | Materijali | 9 |
| 3.1.1. | Mikroorganizmi | 9 |
| 3.1.2. | Hranjive podloge za uzgoj kvasaca i plijesni | 9 |
| 3.1.3. | Pribor i aparatura..... | 11 |
| 3.2. | Metode | 12 |
| 3.2.1. | Revitalizacija i priprema uzorka kvasaca | 12 |
| 3.2.2. | Priprema uzorka plijesni | 13 |
| 3.2.3. | Inhibicijski utjecaj kvasca na rast plijesni | 13 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 15 |
| 4.1. | Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasaca roda <i>Saccharomyces</i> | 16 |
| 4.1.1. | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5 | 16 |
| 4.1.2. | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSMZ | 17 |
| 4.1.3. | <i>Saccharomyces uvarum</i> 20 | 18 |
| 4.1.4. | <i>Saccharomyces bayanus</i> 8 | 19 |
| 4.2. | Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasca <i>Kluyveromyces marxianus</i> DS12 | 21 |
| 4.3. | Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasca <i>Hanseniaspora uvarum</i> S138 | 23 |
| 4.4. | Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasca <i>Pichia guilliermondii</i> ZIM | 25 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 27 |
| 6. | LITERATURA | 28 |

1. UVOD

Odnos kvasaca i ljudi blizak je već tisućljećima, budući da se od davnina koriste u različite svrhe (proizvodnja hrane, vina, piva i raznih biokemijskih proizvoda). Biokonzervacija temeljena na tvarima prirodnog podrijetla pojavila se kao alternativa uobičajenim kemijskim konzervansima, a kvasci predstavljaju neiskorišteni izvor antagonističkog djelovanja protiv drugih mikroorganizama (Gil-Rodríguez i sur., 2020). Potreba za razvojem prirodnih alternativa kemijskim strategijama suzbijanja rasta neželjenih mikroorganizama, dovela je do primjene različitih sojeva kvasca kao biokontrolnih sredstava protiv različitih patogenih plijesni. Antagonistički kvasci (poznati i kao kvasci koji vrše biokontrolu) obećavajuća su zamjena kemijskim fungicidima u kontroli propadanja hrane zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti, antagonističkim sposobnostima, ekološkoj prirodi i sigurnosti za ljude (Zhang i sur., 2020). Provedena su mnoga istraživanja i u literaturi postoji izvjestan broj izvještaja u kojima se navodi da antagonistički kvasci posjeduju učinkovite mehanizme za kontrolu kvarenja mikroorganizmima. Ta su antagonistička svojstva dobro proučena i uspješno su iskorištena u biološkoj kontroli bolesti plodova nakon berbe (Cubaiu i sur., 2012). Kako bi se spriječio rast plijesni, važno je da mikrobiota bude pravilno izolirana i točno identificirana (Twaružek i sur., 2020). Plijesni su velika skupina gljiva, kojima je tijelo građeno od gustog sustava cjevastih, obično bezbojnih stanica bez klorofila. Nitaste su građe, a niti (hife) rastu kao isprepletana masa, na površini i unutar gotovo svih tvari biljnog ili životinjskog podrijetla (Duraković, 1991). Kontaminacija prehrambenih proizvoda plijesnima uzrokuje značajne godišnje gubitke u globalnim prihodima u prehrambenoj industriji, a također predstavlja problem u sigurnosti hrane zbog sinteze mikotoksina, prirodnih produkata nitastih gljiva, uglavnom iz rodova *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Claviceps* i *Alternaria*. Zbog visoke toksičnosti u malim količinama i nemogućnosti uočavanja prilikom konzumacije kontaminirane hrane, mikotoksini se smatraju izrazito opasnim kontaminantima (Markov i sur., 2010; Markov i sur., 2013). S obzirom na interakcije između kvasaca i plijesni, cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih sojeva kvasaca na sposobnost inhibicije rasta toksikotvornih plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KVASCI

Kvasci su skupina eukariotskih gljiva od kojih je većina jednostanična i razmnožavaju se pupanjem (Zhang i sur. 2020). Vrlo su korisni čovječanstvu jer se naširoko koriste za proizvodnju hrane, vina, piva i raznih biokemijskih proizvoda. Budući da se kvasci široko koriste u tradicionalnoj i modernoj biotehnologiji, istraživanja na novim vrstama mogla bi dovesti do razvoja novih tehnologija. Kvasci su askomicetne ili bazidiomicetne gljive koje se vegetativno razmnožavaju pupanjem odnosno cijepanjem, ili tvore spolne forme koje nisu zatvorene u plodištu (Wolf, 1996). Nefotosintetski su jednostanični mikroorganizmi ovalnog ili cilindričnog oblika (Đuraković i Redžepović, 2002; Erten i sur., 2014). Utjecaj kvasaca na kvalitetu i sigurnost hrane i pića usko je povezan s njihovim biološkim aktivnostima. Te su aktivnosti određene fizikalnim i kemijskim svojstvima ekosustava i načinom na koji kvasac reagira u skladu s fiziologijom, biokemijom i genetikom sustava. Kvarenje uzrokovano kvascima vrlo je predvidljivo, uglavnom se događa u onim proizvodima kod kojih je rast bakterija ili usporen ili spriječen unutarnjom preradom. Tipično, hrana s kiselinama i niskim pH, proizvodi s visokim udjelom šećera ili visokim udjelom soli i proizvodi konzervirani sa slabim organskim kiselinama (npr. sorbinska, benzojeva, octena) su skloni kvarenju kvascima. Voće, voćni sokovi i voćni napitci, voćna pulpa, koncentрати voćnih sokova, sirupi od šećera, konditorski proizvodi, alkoholna pića, gazirana pića neki su od proizvoda podložni kvarenju. Utjecaj kvasaca u prehrambenoj industriji je mnogo veći od same proizvodnje pekarskih proizvoda, alkoholnih pića kao što su vino, pivo ili rakija, fermentiranih mliječnih proizvoda te mesnih prerađevina (Querol i sur., 2006).

Antagonistički kvasci (poznati i kao biokontrolni kvasci) obećavajuće su zamjene kemijskim fungicidima u kontroli propadanja žetve/berbe zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti, antagonističkim sposobnostima, ekološkoj prirodi i sigurnosti za ljude (Zhang i sur., 2020). Antagonističke interakcije iznjedrile su koncept biokontrole, pri čemu bi se jedna vrsta mogla namjerno iskoristiti kako bi se inhibirao rast i preživljavanje druge, manje poželjne vrste. Tijekom posljednjih 20 godina otkriveno je nekoliko vrsta kvasaca koje pokazuju snažno antagonističko djelovanje protiv nitastih gljiva (plijesni). Ti su kvasci istraženi kao potencijalni agensi za biokontrolu plijesni koje uzrokuju kvarenje voća i povrća prije i nakon berbe (npr. *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus spp.*), omogućujući tako manju upotrebu kemijskih fungicida.

Predloženi su različiti mehanizmi za objašnjenje antagonističkog djelovanja kvasca prema plijesnima, a oni uključuju proizvodnju toksina ubojica i drugih inhibitornih proteina i peptida; natjecanje za hranjive sastojke i prostor; proizvodnju litičkih glukanaza i kitinaza staničnih stijenki gljivica, proizvodnju metabolita kao što su etanol, acetaldehid, etil acetat i masne kiseline te indukcija gljivične rezistencije ili obrambene reakcije unutar biljke (Querol i sur., 2006).

2.1.1. Kvasci roda *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* je predstavnik askosporogenih kvasaca i kroz povijest je ljudima najpoznatiji rod kvasca. Najznačajnija fiziološka karakteristika *Saccharomyces* roda je njegova sposobnost snažne anaerobne ili semianaerobne fermentacije jednog ili više šećera za proizvodnju etanola i CO₂ (Stewart, 2014a).

Saccharomyces cerevisiae komercijalno je značajan u industriji hrane i pića zbog svoje uloge u proizvodnji fermentiranih pića i kruha, kvarenju hrane i pića, preradi prehrambenog otpada te proizvodnji industrijskog etanola. *S. cerevisiae* može fermentirati velik broj heksoza (D-glukozu, D-fruktozu, D-manozu, saharozu, maltozu, maltotriozu i D-galaktozu). Kao i svi kvasci, preferira blago kiseli medij s optimalnom pH vrijednosti između 4,5 i 6,5. Značaj *S. cerevisiae* u prehrambenoj industriji povećava se njegovom sposobnošću stvaranja i sintetiziranja izvanstaničnog enzima poligalakturonaze, što može imati posljedice na fermentaciju supstrata biljnog podrijetla. *S. cerevisiae* također proizvodi ekstracelularne proteaze (pod stresnim uvjetima) za razgradnju proteina i polipeptida (Stewart, 2014b), a pokazuje i značajnu inhibiciju prema rastu plijesni (Souza i sur., 2017; Cubaiu i sur., 2012).

S. bayanus sudjeluje u alkoholnim vrenjima vina i cidera. Odgovoran je i za kvarenje voća i povrća te proizvoda od voća, kao što su sokovi, sirupi i džemovi (Kurtzman, 2011). Vrlo dobro utječe na ponovno pokretanje vrenja, stvaranje pjene, a otporan je i na prisutnost alkohola i sumporovog-dioksida. Uz sve navedeno, jedna od glavnih značajki kvasaca *Saccharomyces bayanus* je kriotolerancija, odnosno sposoban je provoditi fermentaciju pri niskim temperaturama te se tako jasno razlikuje od profila kvasca *S. cerevisiae*. Također, proizvodi manje količine octene kiseline i etanola, ali i veće količine glicerola i jantarne kiseline. Sintetizira, ali ne razgrađuje jabučnu kiselinu te proizvodi hlapljive fermentacijske spojeve, poput feniletanola i njegovog acetata. Ovi čimbenici rezultiraju značajnim organoleptičkim varijacijama, ovisno o prisutnoj vrsti (Le Jeune i sur., 2007).

S. uvarum također sudjeluje u alkoholnim vrenjima, najčešće se koristi za proizvodnju cidera, pive i vina (Jarvis, 2014; Stewart, 2014c). Široko je rasprostranjen u prirodi i obično je izoliran iz fermentiranih pića, osobito ako se čuvaju na niskoj temperaturi (0–2 °C) (Pulvirenti i sur., 2000). Klasificiran je kao prirodna podskupina, unutar heterogene vrste *Saccharomyces bayanus* (Rainier i sur., 1999).

2.1.2. *Hanseniaspora uvarum*

Hanseniaspora uvarum je dominantan kvasac u početnim fazama alkoholne fermentacije dok kasnije tijekom fermentacije dolazi do dominacije kvasaca iz roda *Saccharomyces* (Du Plessis i sur., 2019). Djelovanje *H. uvarum* ovisi o interakcijama i produktima drugih kvasaca, koncentraciji etanola i šećera te ostalim nutrijentima koji su potrebni za rast kao i o uvjetima fermentacije poput temperature i koncentracije sumporovog dioksida (Moreira i sur., 2008; Wang i sur., 2015). Istraživanja su pokazala antagonističko djelovanje *H. uvarum* koji je inhibirao propadanje uzrokovano sivom plijesni, značajno je inhibirao razvoj spora, smanjio prirodni razvoj propadanja nakon berbe, a pritom nije umanjio parametre kvalitete (Cai i sur., 2015; Liu i sur., 2010).

2.1.3. *Kluyveromyces marxianus*

Sojevi koji pripadaju vrsti kvasca *Kluyveromyces marxianus* izolirani su iz velikog broja različitih staništa, što rezultira velikom metaboličkom raznolikošću i značajnim stupnjem intraspecifičnog polimorfizma (Fonseca i sur., 2008). Industrijska primjena kvasca *Kluyveromyces marxianus* iskorištava osobine poput brzog rasta, termotolerancije, izlučivanja enzima inulinaze te proizvodnje etanola. Sposobnost metaboliziranja laktoze, rasta na inulinu i drugim jednostavnim šećerima poput glukoze, fruktoze i saharoze omogućava uzgoj ovog kvasca u melasi (Garcia-Garibay i sur., 2014). *K. marxianus* je aerobni kvasac te se njegov metabolizam opisuje kao respiratorno-fermentativni. Duga povijest sigurnog povezivanja s prehranbenim proizvodima pomogla je ovom kvascu u postizanju GRAS (eng. *Generally Regarded As Safe*) odnosno QPS (eng. *Qualified Presumption of Safety*) u SAD-u i Europi (Lane i Morrissey, 2010).

2.1.4. *Pichia guilliermondii*

Kvasac *Pichia guilliermondii* je značajan zbog sposobnosti korištenja ugljikovodika kao izvora energije i izvanredne sposobnost različitih sojeva da sintetiziraju riboflavin (vitamin B2) tijekom rasta u medijima s nedostatkom željeza. Stanice *P. guilliermondii* su heterogene, uglavnom izduženog oblika te ponekad tvore pseudomicelij. Prirodno stanište ovog kvasca je raznoliko, a izoliran je iz lišća biljaka, grožđa, jezerske vode i kravlje utrobe. Tipični je predstavnik aerobnih kvasca i ne može rasti u strogo anaerobnim uvjetima. Standardna temperatura rasta za *P. guilliermondii* je 30 °C, a gornja granica je blizu 42 °C (Wolf, 1996). Antagonistička učinkovitost *P. guilliermondii* u laboratorijskim pokusima uspješno je reproducirana u pilot ispitivanjima na biljkama u kojima je uspješno konkurirala kemijskim tretmanima u sprječavanju propadanja plodova zbog bolesti nakon berbe (Petersson i sur., 1995).

2.2. PLIJESNI

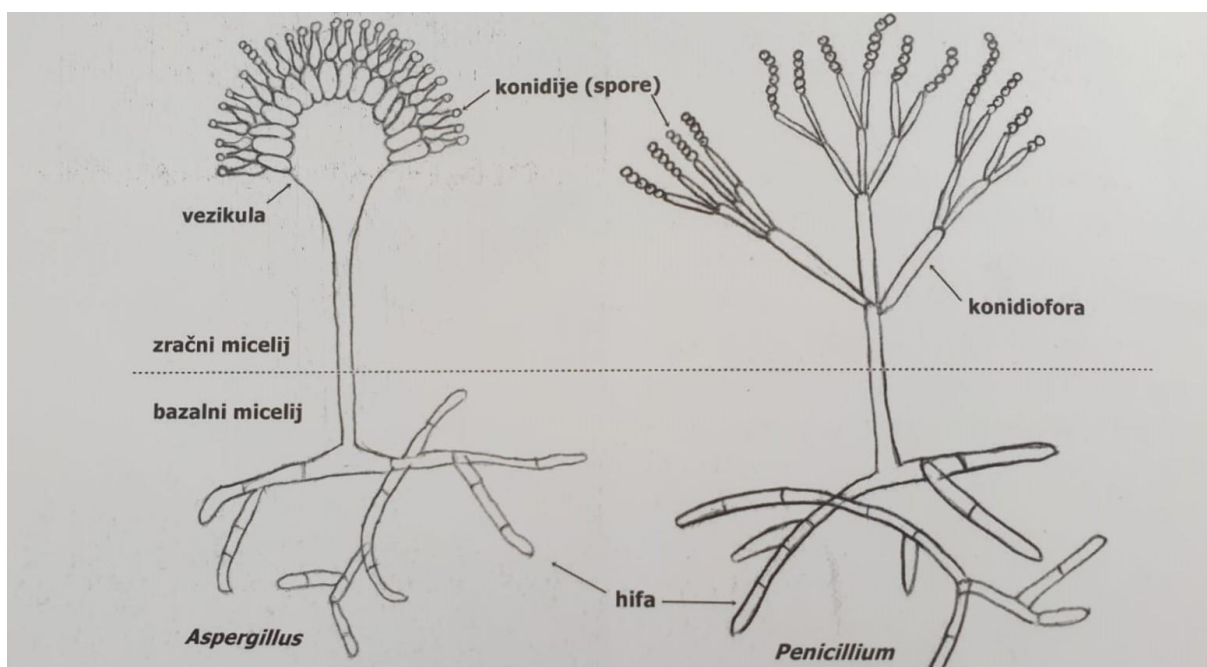
Plijesni su velika skupina eukariotskih, nefotosintetskih mikroorganizama koji pripadaju carstvu Glijiva (carstvo *Fungi*). Široko su rasprostranjene u prirodi u obliku živućih vegetativnih tijela ili u obliku latentnih spora (Frisvald i Filtenborg, 1989; Pleadin i sur., 2018). Obavijene su staničnom stijenkom koja je u pravilu sastavljena od polisaharida hitina. Tijelo plijesni je nitaste građe, a niti (hife) rastu kao isprepletana masa izduženih, bezbojnih stanica bez klorofila koje se kao paučinasta navlaka rasprostiru po podlozi i naziva se micelij (Markov, 2005). Hife su duge, tanke strukture, a tip hife je karakterističan za određnu skupinu plijesni – neke hife su septirane (pregrađene), a neke nisu. Micelij može biti zračni, tada se nalazi iznad podloge, ili supstratni, tada se nalazi u podlozi. Na kraju zračnih hifa izrastaju posebne stanice, spore, koje služe za razmnožavanje, širenje te kao zaštita od štetnih okolišnih uvjeta (Duraković, 1991). Plijesni se mogu razmnožavati spolno (spolnim sporama) ili nespolno (fragmentacijom hifa i tvorbom nespolnih spora).

Neke plijesni žive u simbiozi s biljkama i pomažu im da uzimaju hranjive tvari iz tla, dok su određene plijesni paraziti. Pozitivan utjecaj plijesni najviše je vidljiv u farmaceutskoj industriji gdje služe za proizvodnju lijekova - antibiotika (penicilin), organskih kiselina, vitamina, ali i u prehrambenoj industriji (fermentirani mliječni proizvodi, suhomesnati proizvodi) (Giraud i sur.,

2010) gdje različite kulture plijesni igraju ulogu u stvaranju specifične arome i poboljšavanju teksture prehrambenih proizvoda. Plijesni su aerobni mikroorganizmi, budući da rastu samo u prisutnosti kisika, a općenito pripadaju skupini mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane (Pleadin i sur., 2018).

Pojava plijesni na prehrambenim proizvodima, krmu, ali i u okolišu, kao posljedicu može imati negativan učinak na zdravlje ljudi i životinja (Sweeney i Dobson, 1998) uzrokujući određene bolesti, od alergijskih reakcija na spore plijesni pa do bolesti uzrokovanih mikotoksina (sekundarnim metabolitima plijesni) koje se nazivaju mikotoksikoze. Mnoge plijesni koje sintetiziraju mikotoksine su česti kontaminanti hrane i krmiva, a primarno su to plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*.

Plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* su sveprisutne, uzrokuju propadanje i kvarenje hrane te mogu sintetizirati različite mikotoksine (aflatoksine, okratoksine, citrinin). Stoga, svojom pojavom i rastom na različitim supstratima, predstavljaju veliku, kako ekonomsku tako i zdravstvenu opasnost (Pleadin i sur., 2018).



Slika 1. Shematski prikaz građe plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* (Pleadin i sur., 2018)

2.2.1. Plijesni roda *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* predstavlja raznoliku skupinu plijesni koja je među najrasprostranjenijim na svijetu. Klijanje spora može dovesti do rasta vegetativnog micelija koji kolonizira supstrat. Hife unutar micelija su vrlo heterogene s obzirom na ekspresiju, rast i sekreciju gena. Aspergilli se mogu razmnožavati i nespolno i spolno (Krijgsheld i sur., 2013). Za rod *Aspergillus* karakteristični su nerazgranati konidiofori koji završavaju proširenjem ovalnog oblika, vezikulom. Na vezikule se nadovezuju fialide ili sterigme koje nose lance konidija. Ova karakteristika definitivno razlikuje rod *Aspergillus* od roda *Penicillium* (Pitt i Hocking, 2009).

Plijesni iz roda *Aspergillus* imaju sposobnost rasta na višim temperaturama i/ili nižim a_w vrijednostima te obično rastu brže iako im treba dulje da sporuliraju, a njihove su spore otpornije na svjetlost i kemikalije (Aytac i sur., 2014). Plijesni iz roda *Aspergillus* su široko rasprostranjene u okolišu, uključujući tlo, biljne ostatke, drvo i zrak, a dominantne su u tropskim i suptropskim klimama. Voda i neadekvatno ubrane i uskladištene žitarice te druge namirnice poput kikirikija, badema, zelenih zrna kave, grožđa i vina ili procesuirani proizvodi navedenih namirnica također su izvori pojave i rasta *Aspergillus* vrsta (Public Health Agency of Canada, 2013).

Međutim, osim što se mogu koristiti za proizvodnju različitih metabolita (antibiotici, organske kiseline, enzimi, lijekovi i slično), plijesni iz roda *Aspergillus* sintetiziraju po život opasne mikotoksine (aflatoksin B₁ (AFB₁) i okratoksin A (OTA) (Zadravec i sur., 2019). Stoga je rod *Aspergillus* poznat i kao ljudski i životinjski patogen, a među najznačajnijim vrstama su *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. parasiticus* te *A. niger*. Crni Aspergilli smatraju se glavnim proizvođačima OTA u grožđu na mediteranskom području, posebno *Aspergillus carbonarius* i *Aspergillus niger* (Gil-Serna i sur., 2014).

Optimalna temperatura za rast *A. ochraceus* je 25 °C, a prilagođava se različitim okolišnim uvjetima. Kada raste na hranjivom agaru, vegetativni micelij uglavnom je uronjen u agar, dok su konidijalne glave (vezikula i konidije) raspoređene u zonama. *A. carbonarius* sastavni je dio mikroflore grožđa i sušenog voća. Za rast treba povišenu temperaturu i povećanu vlagu te se stoga najčešće pronalazi u područjima s tropskom klimom (Pleadin i sur., 2018).

2.2.2. Plijesni roda *Penicillium*

Teško je procijeniti važnost roda *Penicillium* (*penicillium* – lat. kist) u prirodi i u životu ljudi. Vrste plijesni iz roda *Penicillium* su sveprisutne i okarakterizirane kao oportunistički saprofiti. *Penicillium* vrste su vrlo važni agensi u prirodnim procesima recikliranja korištene biološke tvari. Kao posljedica toga, oni također igraju važnu ulogu u kvarenju mnogih vrsta hrane. Gotovo sve vrste dobro rastu u laboratorijskim uvjetima, proizvodeći male, kružne kolonije, koje u pravilu obilno sporuliraju u sivoj-zelenoj ili sivo-plavoj boji. Kao posljedica toga, većina *Penicillium* vrsta se može prepoznati na razini roda. Najčešće uzrokuju kvarenje citrusa, jabuka, krušaka, bobičastog voća, sireva, prerađene hrane kao što su tjestenina, brašno i pekarski proizvodi (Pitt, 2014).

Vrste *Penicillium* posjeduju iznimno raznolike metaboličke sposobnosti, odnosno imaju mogućnost proizvoditi na stotine različitih spojeva, različite enzime i mikotoksine (okratoksin A, citrinin, patulin). Zbog prisutnosti i rasta plijesni iz roda *Penicillium* na pšenici i ječmu, na tim se namirnicama i u njihovim proizvodima često pronalazi nefrotoksičan mikotoksin okratoksin A (Bianchini i sur., 2014).

Nekoliko izolata *P. nordicum* pokazalo se važnim proizvođačima OTA, mikotoksina koji je Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, eng. *International Agency for Research on Cancer*) klasificirala kao mogući ljudski kancerogen koji je uključen u nefropatiju i tumore (urotelijalni karcinom) urinarnog trakta kod ljudi (Virgili i sur., 2012).

Penicillium verrucosum je uglavnom prisutan u hladnijim klimatskim područjima. Raste na zrnju sjemenki i žitarica, a široko je rasprostranjen u hrani na bazi žitarica i krmnim smjesama. Ima sposobnost rasta pri temperaturama između 0 °C i 3 °C, uz optimalnu temperaturu između 21 °C i 23 °C (Pleadin i sur., 2018).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Kao radni mikroorganizmi korištene su sljedeće kulture:

Kvasci: *Saccharomyces cerevisiae* 5

Saccharomyces uvarum 20

Saccharomyces bayanus 8

Plijesni: *Aspergillus ochraceus* 402

Aspergillus carbonarius 408

Penicillium nordicum 701

Penicillium verrucosum 702

dobivene iz Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Kvasac: *Kluyveromyces marxianus* DS12

dobiven iz Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Kvasci: *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ,

Hanseniaspora uvarum S138

Pichia guilliermondii ZIM

dobiveni iz Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasaca i plijesni

Za uzgoj kvasaca korišteni su sladovina i sladni agar

a) Sladovina - sastav:

sladni ekstrakt (praškasti) 20 g/L

| | |
|--------------------|--------|
| pepton | 6 g/L |
| glukoza | 20 g/L |
| voda (destilirana) | 1 L |
| pH 5,5 | |

b) Sladni agar – sastav:

| | |
|-----------------------------|--------|
| sladni ekstrakt (praškasti) | 20 g/L |
| pepton | 6 g/L |
| glukoza | 20 g/L |
| voda (destilirana) | 1 L |
| agar | 15 g |
| pH 5,5 | |

Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121 °C/15 min.

Za uzgoj plijesni korišten je Czapekov agar

Czapekov agar - sastav:

| | |
|---------------------------------|-------|
| Czapekov koncentrat | 10 mL |
| K ₂ HPO ₄ | 1 g |
| ekstrakt kvasca | 5 g |
| saharoza | 30 g |
| agar | 15 g |
| destilirana voda | 1 L |
| pH 6,7 | |

Czapekov koncentrat:

| | |
|---------------------------------------|--------|
| NaNO ₃ | 30,0 g |
| KCl | 5,0 g |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 5,0 g |
| FeSO ₄ x 7H ₂ O | 0,1 g |
| ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 0,1 g |

CuSO₄ x 5H₂O 0,05 g

Destilirana voda 1 L

Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C/15 min.

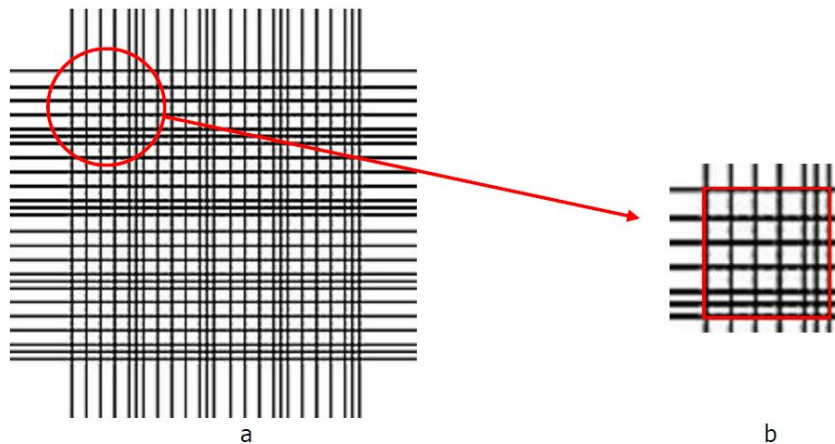
3.1.3. Pribor i aparatura

- Petrijeve zdjelice Φ 10 cm
- Mikrobiološka ušica/lanceta
- Mikrobiološke igle
- Bunsenov plamenik
- Autoklav (Sutjeska, Beograd)
- Termostat (Sutjeska, Beograd)
- Pokrovna i predmetna staklaca
- Svjetlosni mikroskop (Olympus, Japan, CX21)
- Vibromikser EV-102 (Tehtnica, Telezniki)
- Mikropipete
- Mikrobiološke epruvete
- Thomaova komorica

3.2. Metode

3.2.1. Revitalizacija i priprema uzorka kvasaca

Odabrani sojevi kvasaca čuvaju se u sladovini s 30 % (v/v) glicerola, a prije postavljanja pokusa, revitalizirani su u 5 mL svježe pripremljene sladovine tijekom 48h na 28 °C. Nakon revitalizacije određen je ukupan broj (žive i mrtve) stanica kvasaca pomoću Thomaove komorice (slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz Thomaove komorice (a) i jednog kvadrata (b) unutar kojeg se broje prisutne stanice kvasaca/spora plijesni (vlastita fotografija)

U Thomaovoj komorici se broje veliki mikroorganizmi kao što su stanice kvasca i spore plijesni. Komorica ima mrežicu površine 1 mm^2 , koja se sastoji od 16 velikih kvadrata (4×4), a svaki veliki kvadrat je podijeljen na 25 malih (5×5). Volumen tekućine (suspencije) koji je zatvoren u komorici kada se na mrežicu nanese kap uzorka i poklopi pokrovnicom iznosi $0,1 \text{ mm}^3$. Preparat je kvalitetan i dobro pripremljen kada pokrovnica čvrsto priliježe na susjedna polja komorice, nema prisutnih mjehurića zraka i na pokrovnici se pojave Newtonovi kolobari. Kako bi se izračunao ukupan broj stanica kvasaca u jednom mL uzorka pomoću Thomaove komorice, u jednom velikom kvadratu Thomaove komorice izbroje se stanice kvasca, a broj izbrojanih stanica se pomnoži sa 16 kako bi se dobio broj stanica u čitavoj mrežici odnosno u točno poznatom volumenu uzorka

(0,1 mm³). Dobiveni broj se pomnožiti s faktorom 10⁴ kako bi se dobio broj stanica u mL uzorka (1).

$$N = n \times 16 \times 10^4 \quad (1)$$

Nakon brojanja stanica (žive i mrtve) u Thomaovoj komorici, iz sladovine s poraslom kulturom kvasca načinjena je serija decimalnih razrjeđenja (u omjeru 1:10). Zatim je za svaki soj kvasca neizravnim metodom naciepljivanjem poznatog volumena suspenzije na čvrstu podlogu određen broj živih stanica kvasca koje se označavaju kao CFU vrijednost (eng. *Colony Forming Units*). Konačan broj živih stanica kvasca izračunat je prema jednadžbi (2) i iznosio je 10⁶ CFU/mL.

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija (N)}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka (mL)}} \times \text{recipročna (obratna) vrijednost razrjeđenja} \quad (2)$$

3.2.2. Priprema uzorka plijesni

Odabrane plijesni čuvaju se u vodi, na 4 °C. Mikrobiološkom lancetom, plijesni su naciepljene na kosi Czapekov agar i inkubirane tijekom 7 dana. Nakon inkubacije, porasle plijesni su suspendirane u 9 mL destilirane vode kako bi se odredio broj spora. Broj spora izbrojan je Thomaovom komoricom, a nakon toga je pripremljena serija decimalnih razrjeđenja za svaku vrstu plijesni kako bi broj spora svakog soja koji će se naciepiti na Czapekov agar iznosio 10⁵ spora/mL.

3.2.3. Utjecaj kvasca na rast kolonija plijesni

Kako bi se ispitao inhibicijski utjecaj odabranih sojeva kvasca na rast plijesni, 100 µL suspenzije svakog soja kvasca (10⁶ CFU/mL), naciepljeno je na površinu Czapekovog agara u Petrijevoj

zdjelici te razmazano štapićem po Drigalskom. Nakon što je suspenzija kvasca difundirala u podlogu na sredinu Czapekovog agara nacjepljeno je 10 µL suspenzije spora plijesni (10⁵ spora/mL). Uzorci su stavljeni na inkubaciju na 25 °C tijekom 10 dana. Za svaku plijesan napravljen je i kontrolni uzorak gdje je nacjepljeno 10 µL suspenzije spora plijesni (10⁵ spora/mL) na Czapekov agar bez dodanog kvasca (slika 3). Svi uzorci su postavljeni u četverostrukom pokusu.



Slika 3. Primjer inhibicije rasta plijesni *A. carbonarius* 408 u prisutnosti odabranih sojeva kvasaca (vlastita fotografija)

Rast plijesni mjereno je kao srednja vrijednost dvaju okomita promjera kolonije u cm nakon 3., 5., 7., i 10. dana inkubacije. Inhibicijska aktivnost izračunata je prema jednadžbi (3) (Lima i sur., 1999).

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\text{promjer kolonije plijesni na kontr.ploči} - \text{promjer kolonije plijesni s nacjepljenim kvascem}}{\text{promjer kolonije plijesni na kontr.ploči}} * 100 \quad (3)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Plijesni ili mikroskopske filamentozne gljive sveprisutni su mikroorganizmi s velikim kapacitetom kolonizacije pa je kontaminacija hrane plijesnima neizbježna i često dovodi do kvarenja i/ili nakupljanja mikotoksina u hrani. Rast plijesni uključuje dvije međusobno povezane pojave: klijanje spora i širenje micelija. Tijekom klijanja i širenja, plijesni mogu stvarati egzoenzime (npr. lipaze, proteaze) i na taj način promijeniti senzorska svojstva prehrambenih proizvoda (promjena okusa i boje) te potaknuti sintezu toksina. Među najznačajnijim predstavnicima plijesni koji uzrokuju kvarenje prehrambenih proizvoda su plijesni iz roda *Aspergillus* i *Penicillium*. Prisutnost toksikotvornih plijesni u hrani i zrnju predstavlja moguću opasnost za zdravlje ljudi i životinja. Stoga se za kontrolu prisutnosti plijesni uz dobru agrotehnološku praksu traže sva moguća rješenja za sprečavanje klijanja spora i širenja micelija plijesni, a da pri tom budu zdravstveno prihvaćena. Jedna od mogućnosti je i uporaba kvasaca, njihovih metabolita i/ili staničnih komponenta kao potencijalnih agenasa za biokontrolu plijesni.

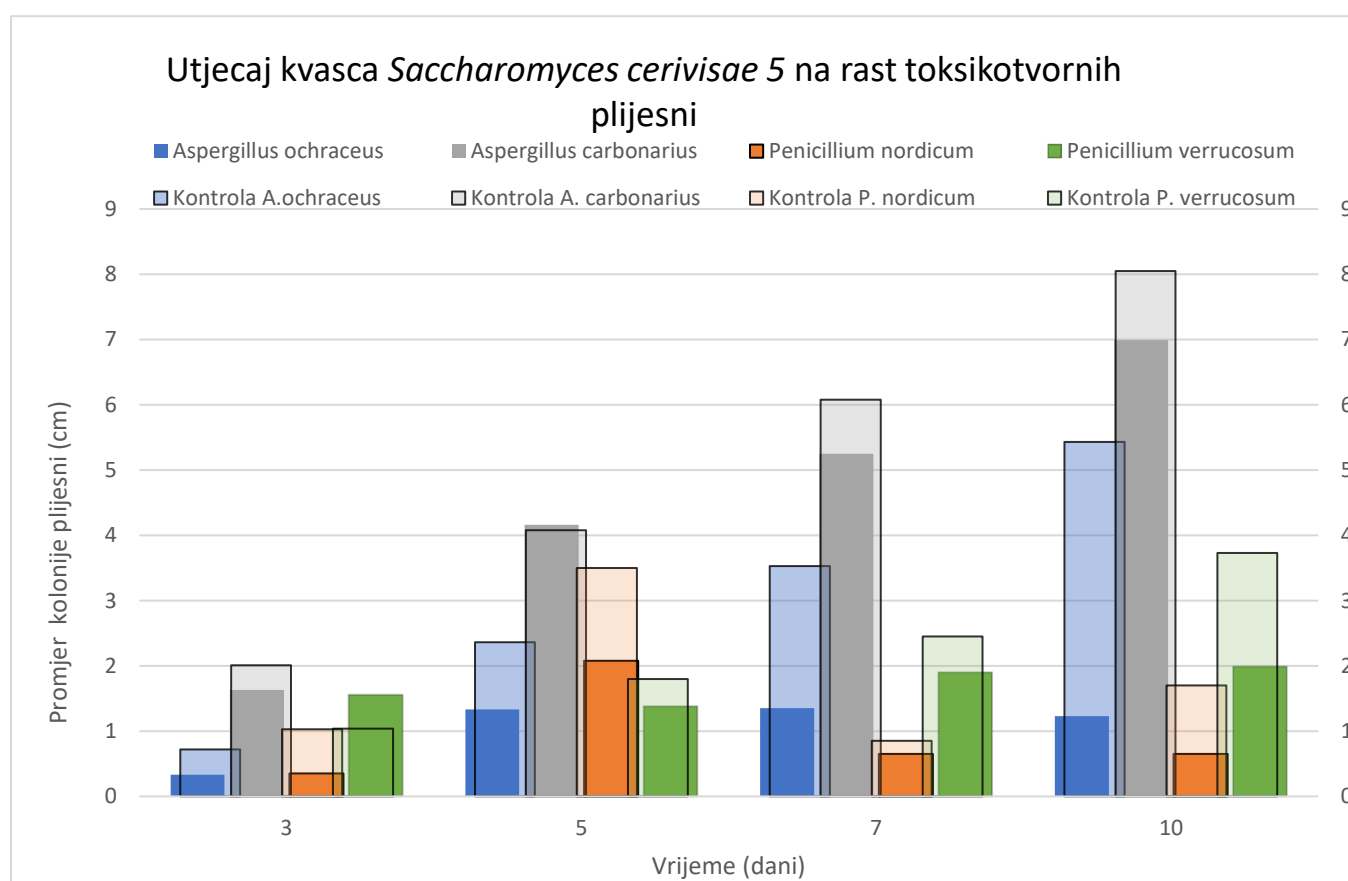
U ovom radu korištene su plijesni koje uzrokuju velike štete na prehrambenim proizvodima, a ujedno proizvode i sekundarne metabolite (mikotoksine). Rast plijesni praćen je u kontrolnim uzorcima (samo nacjepljena kultura plijesni) te u prisutnosti odabranih sojeva kvasaca. Utjecaj kvasaca na promjenu veličine porasle kolonije plijesni ispitivan je tijekom 10 dana inkubacije, metodom mjerenja promjera rasta kolonije plijesni na čvrstoj hranjivoj podlozi (Czapekov agar) u Petrijevim zdjelicama. Iz rezultata je vidljivo da je tijekom rasta odabranih sojeva plijesni u kontrolnim uzorcima najveći promjer kolonija zabilježen nakon 10-tog dana uzgoja za *A. ochraceus* 402 (5,43 cm), *A. carbonarius* 408 (8,05 cm) i *P. verrucosum* 702 (3,73 cm), dok je za plijesan *P. nordicum* 701 najveći promjer kolonije zabilježen nakon 5-tog dana uzgoja i iznosio je 3,5 cm.

Rezultati istraživanja utjecaja kvasaca na rast kolonija plijesni prikazani su na slikama 4-10.

4.1. Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasaca roda *Saccharomyces*

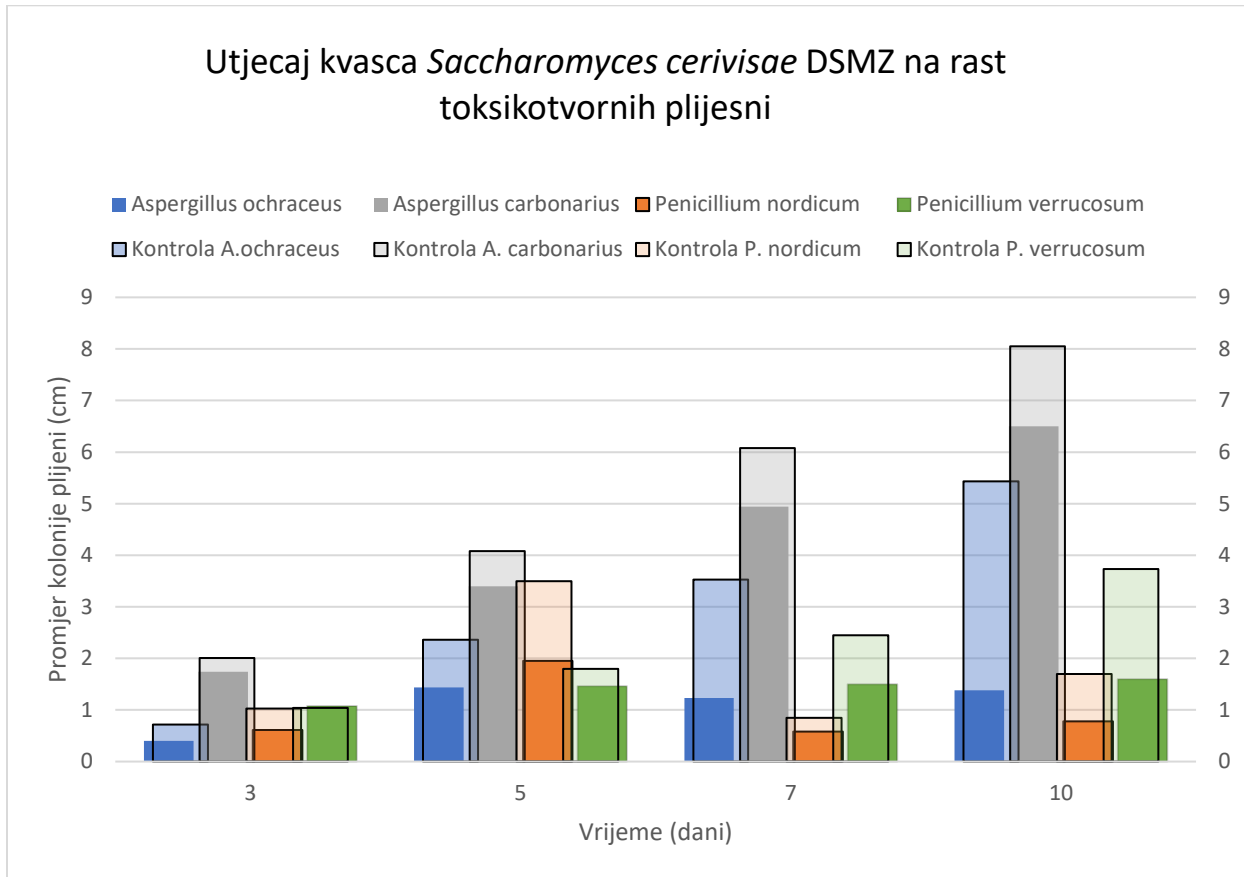
Na slikama 4 - 7 prikazan je utjecaj kvasaca iz roda *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* 5, *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ, *Saccharomyces uvarum* 20 i *Saccharomyces bayanus* 8) na rast kolonija plijesni iz roda *Aspergillus* (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408) i *Penicillium* (*P. nordicum* 701 i *P. verrucosum* 702).

4.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* 5



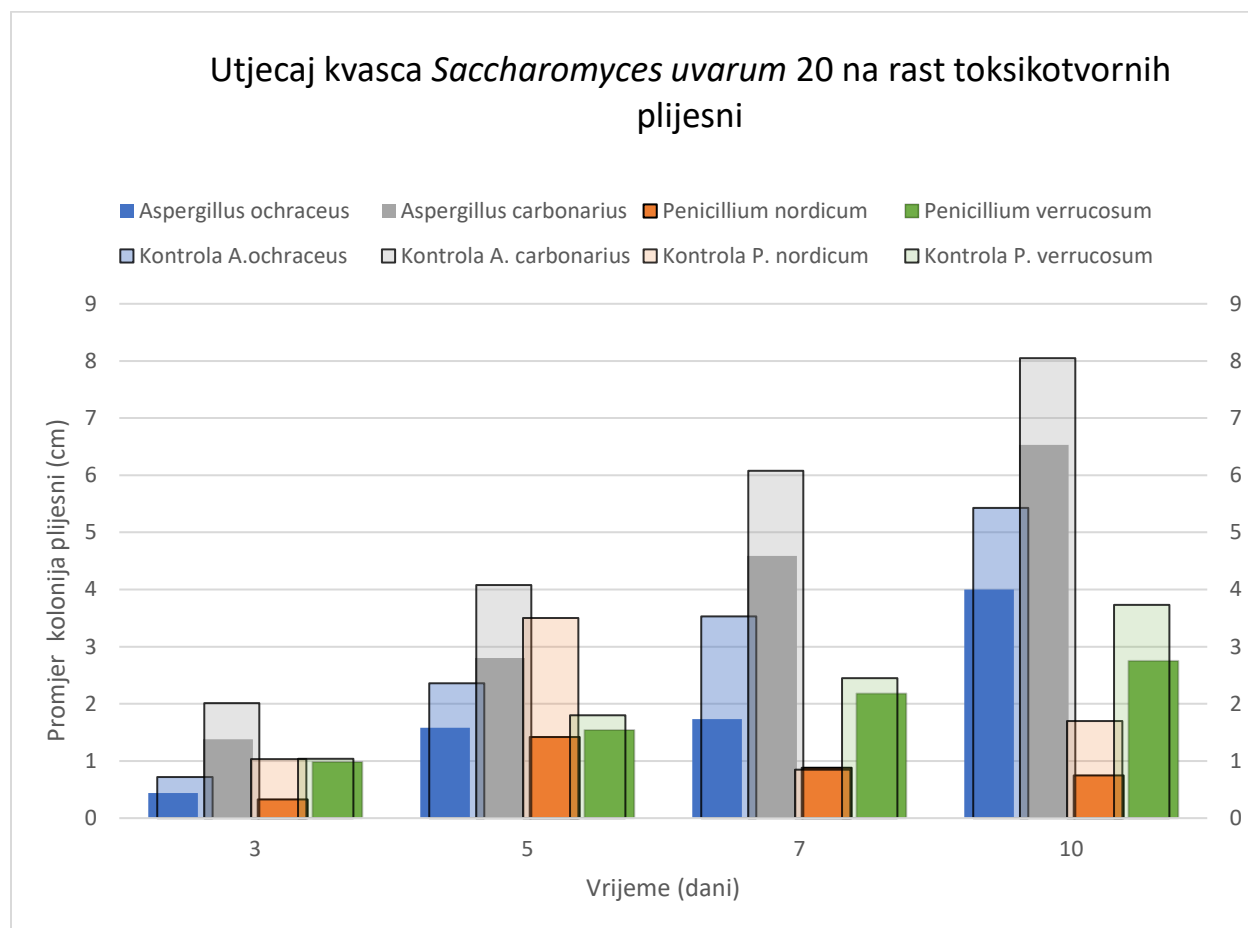
Slika 4. Utjecaj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 5 na rast toksikotvornih plijesni (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701, *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana rasta

4.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ



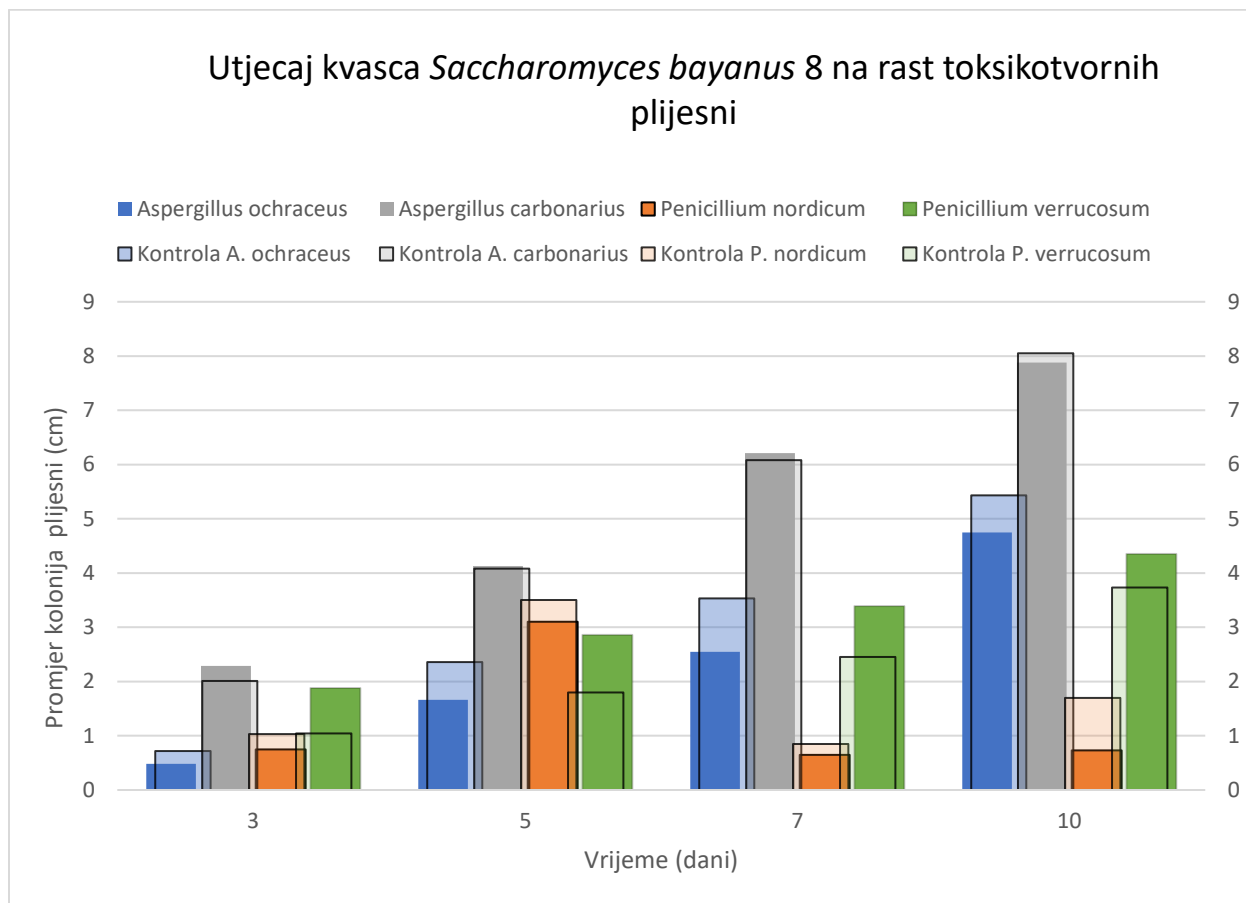
Slika 5. Utjecaj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ na rast toksikotvornih plijesni (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701, *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana rasta

4.1.3. *Saccharomyces uvarum* 20



Slika 6. Utjecaj kvasca *Saccharomyces uvarum* 20 na rast toksikotvornih plijesni (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701, *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana rasta

4.1.4. *Saccharomyces bayanus* 8



Slika 7. Utjecaj kvasca *Saccharomyces bayanus* 8 na rast toksikotvornih plijesni (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701, *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana rasta

Iz rezultata prikazanih na slikama 4 - 7 vidljivo je da je u ovisnosti o soju kvasca iz roda *Saccharomyces* i vremenu uzgoja došlo do inhibicije rasta odabranih toksikotvornih plijesni.

Kvasci *S. cerevisiae* 5 i *S. cerevisiae* DSMZ pokazali su inhibitorno djelovanje na rast plijesni iz roda *Aspergillus* tijekom cijelog vremena uzgoja. Najveća inhibicija rasta od 77,5 % odnosno 74,7 % dokazana je nakon deset dana uzgoja za plijesan *A. ochraceus* 402, dok je za *A. carbonarius* 408 uočena slaba inhibicija od samo 13, 6% odnosno 19,3 % u odnosu na kontrolne vrijednosti (slika 4 i 5).

U pokusima s plijesnima iz roda *Penicillium* pri istim uvjetima uzgoja kvasac *S. cerevisiae* 5 inhibira rast *P. nordicum* 701 za oko 50 % nakon 3, 5 i 10 dana, dok je nakon 7 dana uočena slaba inhibicija od oko 20%. Zanimljivo je kako kvasac *S. cerevisiae* 5 nakon 3 dana uzgoja stimulira rast plijesni *P. verrucosum* 702 za oko 50% u odnosu na kontrolne vrijednosti, ali dužim vremenom postignuta je inhibicija rasta od oko 25% (5. i 7. dan) do 46,7 % nakon 10 dana uzgoja (slika 4).

Antifungalni učinak kvasca *S. cerevisiae* DSMZ na rast *P. nordicum* 701 i *P. verrucosum* 702 prikazan je na slici 5. Promjer kolonije plijesni *P. nordicum* 701 je 44,3 % i 54% manji u odnosu na kontrolni uzorak nakon 5. odnosno 10. dana, dok je nakon sedam dana zabilježena najmanja promjena veličine kolonije plijesni (32,3 %). U pokusima s plijesni *P. verrucosum* 702 nakon tri dana uzgoja nije uočeno značajno inhibitorno djelovanje (3,6%) ali je nakon 10 dana uzgoja zabilježena inhibicija rasta od 57,1 %.

Istraživanja su pokazala da određeni sojevi kvasca *S. cerevisiae* inhibiraju rast biljnih patogena poput *A. carbonarius* i *A. ochraceus*, a također inhibiraju i sintezu mikotoksina, okratoksina A (Freimoser i sur., 2019). Na temelju rezultata kinetičkih parametara plijesni, pokazalo se da *S. cerevisiae* uzgojen kao čista kultura ili u miješovitoj kulturi s drugim kvascima rezultira potpunom inhibicijom plijesni *A. carbonarius* (Tryfinopoulou i sur., 2020).

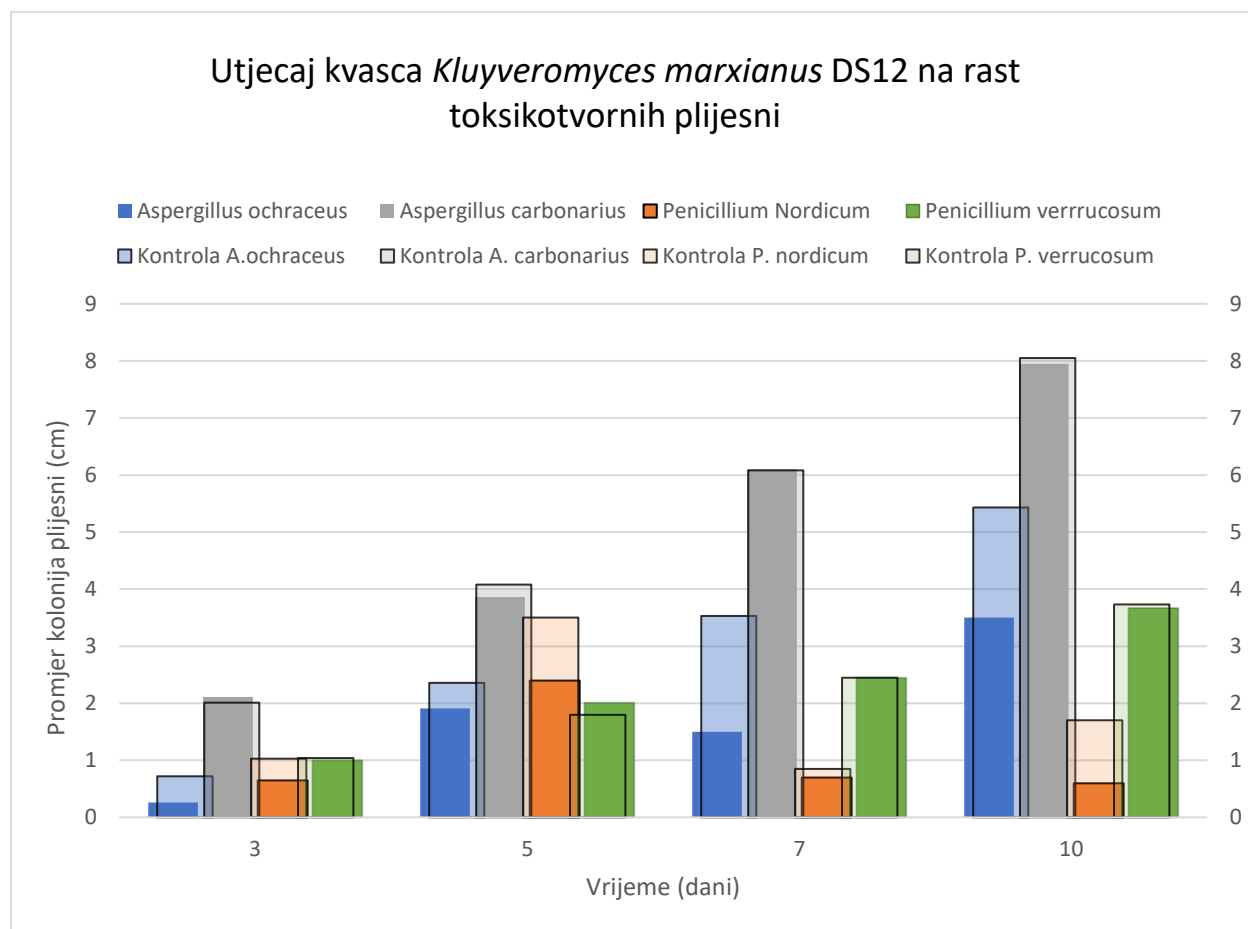
Na slici 6 prikazan je rast odabranih vrsta plijesni u kontrolnim uzorcima i u prisutnosti kvasca *S. uvarum* 20. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je *S. uvarum* 20 usporio rast plijesni i iz roda *Aspergillus* i iz roda *Penicillium*. Tijekom rasta *A. ochraceus* 402, inhibitorni utjecaj kvasca *S. uvarum* 20 je najizraženiji nakon sedam dana te iznosi 51,2 %, dok je utjecaj kvasca na rast *A. carbonarius* 408 nešto slabiji i iznosi 31,6 i 31,3% nakon 7 odnosno 10 dana uzgoja. U istim uvjetima uzgoja kada su pokusi uključivali rast plijesni iz roda *Penicillium* najbolja inhibicija rasta *P. nordicum* 701 uočena je trećeg (68,3 %) i petog (59,5 %) dana, dok je najmanja inhibicija uočena nakon sedam dana i iznosi svega 2,9 %. Veličina kolonije plijesni *P. verrucosum* 702 je linearna tijekom trajanja pokusa, a inhibicijski utjecaj kvasca *S. uvarum* 20 je najslabiji u početku, nakon trećeg dana (6 %) i linearno se povećava s vremenom uzgoja plijesni te nakon 10 dana iznosi 26,3 %.

U odnosu na ostale *Saccharomyces* vrste, iz rezultata prikazanih na slici 7, vidljivo je slabije inhibicijsko djelovanje kvasca *S. bayanus* 8 na rast plijesni iz roda *Aspergillus* i *Penicillium* tijekom čitavog vremena inkubacije. Najjače inhibitorno djelovanje kvasca izraženo je kod plijesni *A.*

ochraceus 402 nakon tri dana i iznosi 33%, a kod *P. nordicum* 701 oko 50% nakon 10 dana. Antifungalni učinak kvasca *S. bayanus* 8 na *A. carbonarius* 408 i *P. verrucosum* 702 nije zabilježen, već naprotiv, u prisutnosti kvasca plijesni bolje rastu. Kao što prikazuje slika 7, kvasac stimulira rast plijesni *A. carbonarius* 408 od 2 % do 10 %, a *P. verrucosum* 702 od 16,5 % – 80,7 %.

4.2. Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12

Utjecaj kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 na rast kolonija toksikotvornih plijesni *A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701 i *P. verrucosum* 702 tijekom 10 dana uzgoja prikazan je na slici 8.



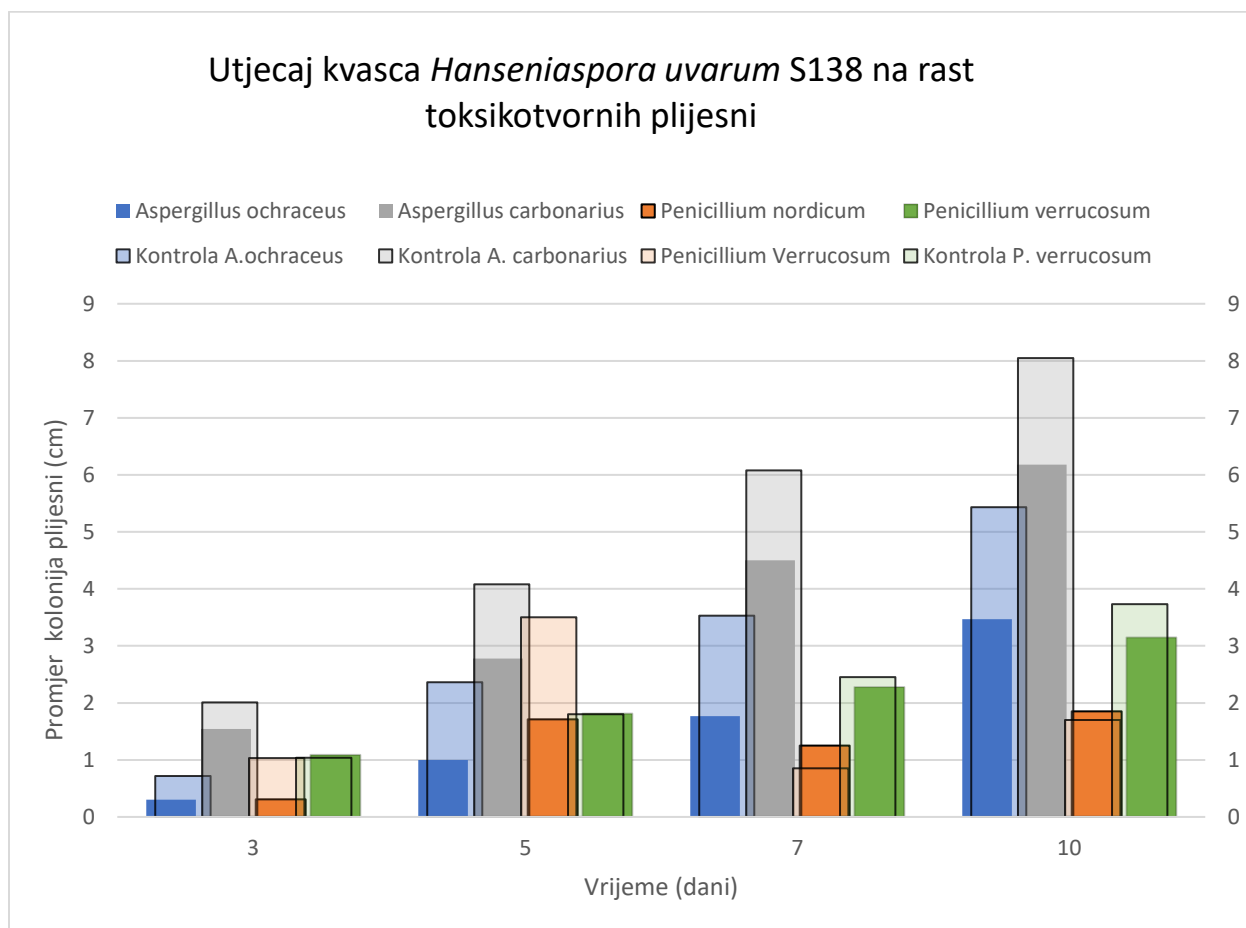
Slika 8. Utjecaj kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 na rast toksikotvornih plijesni (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701, *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana uzgoja

Slika 8 prikazuje utjecaj kvasca *Kluyveromyces marxianus* DS12 na veličinu promjera kolonija toksikotvornih plijesni. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da kvasac ima izraziti inhibicijski učinak na rast plijesni *A. ochraceus* 402 od 63 % nakon tri dana uzgoja i > 60% na *P. nordicum* 701 nakon 10 dana. Međutim, kod plijesni *A. carbonarius* 408 i *P. verrucosum* 702 nije uočeno značajno inhibitorno djelovanje i iznosi svega 5,2 % nakon pet dana za *A. carbonarius* 408, odnosno 3,6 % nakon tri dana za *P. verrucosum* 702. Štoviše, čak je vidljiv i stimulacijski utjecaj na rast plijesni *A. carbonarius* 408 nakon trećeg dana za 4,9 % te za 11,8 % kod *P. verrucosum* 702 nakon petog dana uzgoja.

Ovi rezultati su u suglasju s rezultatima Alasmar i sur. (2020) koji su proveli istraživanje u kojem su primjenili kvasac *K. marxianus* i njegove metabolite za sprečavanje gljivičnih infekcija na poljoprivrednim proizvodima. Grožđe je umjetno inokulirano sporama plijesni, nakon čega je izloženo hlapljivim spojevima koje sintetizira kvasac *K. marxianus*. Bobice grožđa ostale su svježije do kraja eksperimenta te nije došlo do porasta plijesni.

4.3. Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasca *Hanseniaspora uvarum* S138

U pokusima koji slijede određen je promjer poraslih kolonija toksikotvornih plijesni tijekom 10 dana uzgoja u prisutnosti kvasca *Hanseniaspora uvarum* S138, a rezultati istraživanja prikazani su na slici 9.



Slika 9. Utjecaj kvasca *Hanseniaspora uvarum* S138 na rast toksikotvornih plijesni (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701, *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana rasta

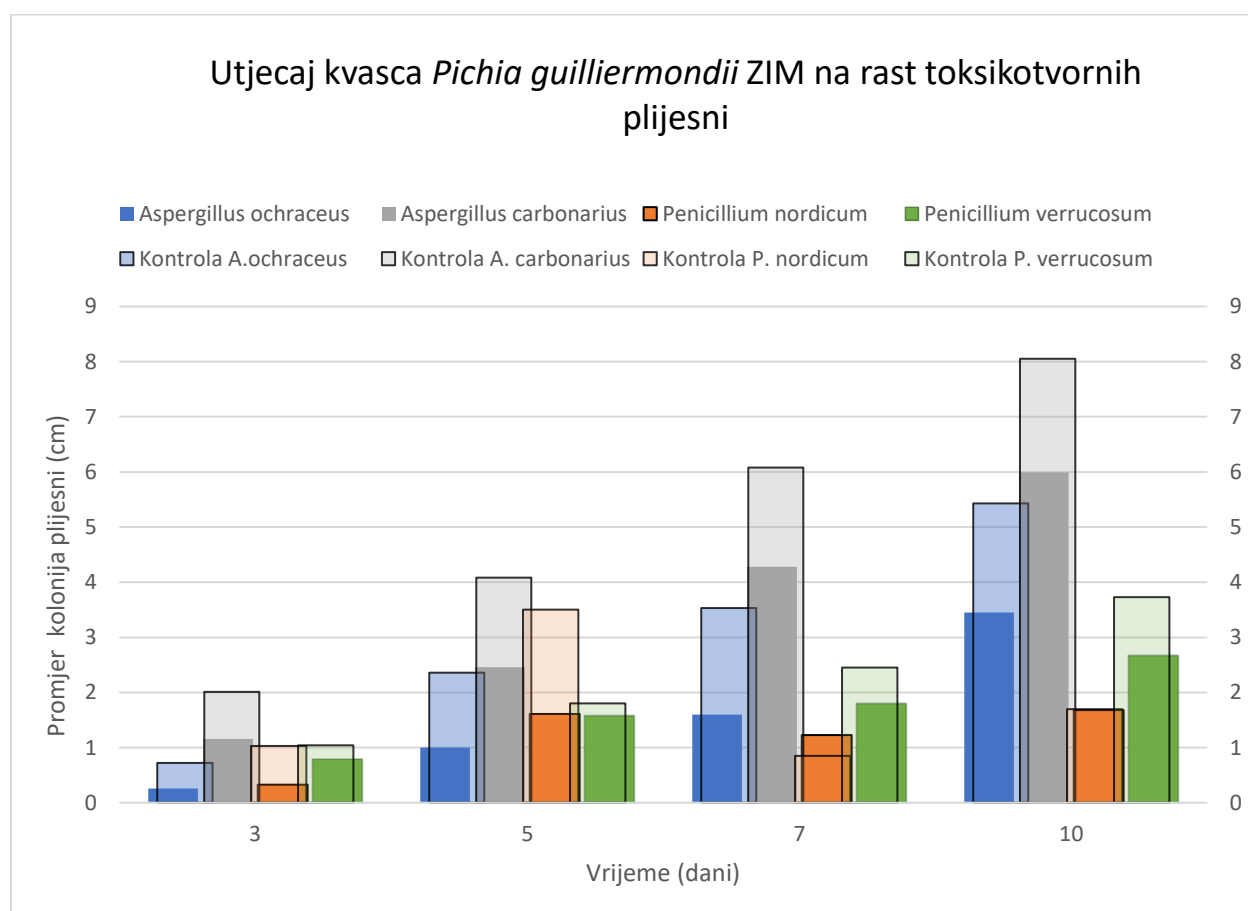
Iz slike 9 vidljivo je da kvasac *H. uvarum* S138 inhibira rast plijesni iz roda *Aspergillus* tijekom čitavog vremena trajanja pokusa i to za oko 35 do 50% za *A. ochraceus* 402 i oko 25% za *A. carbonarius* 408.

Najizraženiji inhibicijski utjecaj kvasca *H. uvarum* S138 na rast plijesni *P. nordicum* 701 uočen je nakon trećeg dana i iznosi 69 %, dok nakon 7. i 10. dana dolazi do stimulacije rasta za 47,1 %, odnosno 8,8 % što upućuje na to da se plijesan prilagodila na prisutnost kvasca i neometano rasla. Također nije uočena inhibicija rasta plijesni *P. verrucosum* 702 nakon 3. i 5. dana uzgoja, ali dužim vremenom trajanja pokusa dolazi do slabe inhibicije rasta za 9 odnosno 15%.

Potencijal kvasca *H. uvarum* kao jednog od sredstva biološke kontrole predstavljen je u istraživanjima koja pokazuju i predlažu nadmetanje za životni prostor kao mehanizam djelovanja (Qin i sur., 2015). Inhibicijsko djelovanje *H. uvarum* dokazano je na rast i sporulaciju sive plijesni te se na taj način sprječava kvarenje prilikom skladištenja i nakon berbe, bez utjecaja na kvalitetu proizvoda (Cai i sur., 2014). *H. uvarum* može spriječiti klijanje spora *A. ochraceus* u sladovini (Masoud, 2006). Kvasac *H. uvarum* također proizvodi hlapljive organske spojeve koji imaju ulogu u sprječavanju rasta plijesni *A. ochraceus* i sinteze OTA tijekom proizvodnje kave (Pfliegler i sur., 2015). Štoviše, zabilježeno je da hlapljivi organski spojevi suzbijaju rast micelija, sporulaciju plijesni *Aspergillus carbonarius* i *Aspergillus ochraceus* i biosintezu mikotoksina (Zhang i sur., 2020).

4.4. Inhibicija rasta plijesni djelovanjem kvasca *Pichia guilliermondii* ZIM

Na slici 10 prikazana je inhibicija rasta kolonije plijesni iz roda *Aspergillus* (*A. ochraceus* 402 i *A. carbonarius* 408) i iz roda *Penicillium* (*P. nordicum* 701 i *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana uzgoja u prisutnosti kvasca *Pichia guilliermondii* ZIM.



Slika 10. Utjecaj kvasca *Pichia guilliermondii* ZIM na rast toksikotvornih plijesni (*A. ochraceus* 402, *A. carbonarius* 408, *P. nordicum* 701, *P. verrucosum* 702) tijekom 3., 5., 7., i 10. dana rasta

Iz rezultata izmjerenih promjera kolonija plijesni koji su prikazani na slici 10, vidljivo je da kvasac *P. guilliermondii* ZIM pokazuje antifungalni učinak na rast svih ispitivanih plijesni.

Kod plijesni iz roda *Aspergillus* kvasac pokazuje snažniji inhibitorni učinak već nakon tri dana uzgoja, dok s vremenom taj utjecaj opada. Za *A. ochraceus* 402 promjer kolonije je smanjen za 63,4 % - 36,5 %, a za *A. carbonarius* 408 42,2 % - 25,6 %.

Najbolji inhibicijski učinak kvasca *P. guilliermondii* ZIM izmjeren je nakon tri dana uzgoja kod plijesni *P. nordicum* 701 (68 %), dok je nakon desetog dana promjer kolonije plijesni gotovo identičan kontrolnim vrijednostima. Rezultati ukazuju na prilagodbu plijesni na prisutnost kvasca, budući da je nakon sedam dana, u usporedbi s kontrolnim uzorkom, kolonija plijesni *P. nordicum* 701 u prisutnosti kvasca bila veća za 44,1 %.

Zhang i sur. (2011) su pokazali visoku aktivnost biokontrole protiv sive plijesni na jabukama pomoću kvasca *P. guilliermondii*. Kao jedan od mehanizma djelovanja kvasaca iz rodova *Pichia* i *Saccharomyces* je izlučivanje citolitičkih enzima što se smatra poželjnom karakteristikom sredstava za biokontrolu, jer omogućuje razgradnju stanične stijenke plijesni (Freimoser i sur., 2019).

U ovom radu testirani su sojevi kvaca *S. cerevisiae* (2 soja; 5 i DSMZ) *S. uvarum* 20, *S. bayanus* 8, *Kluyveromyces marxianus* DS12, *Hanseniaspora uvarum* S138 i *Pichia guilliermondii* ZIM kako bi se odredio njihov potencijalni antagonistički učinak prema plijesnima *A. carbonarius* 408, *A. ochraceus* 402, *P. nordicum* 701 i *P. verrucosum* 702 tijekom rasta na Czapekovom agaru.

Važno je usredotočiti se na mikroorganizme kao što su toksikotvorne plijesni (proizvođači mikotoksina), jer je najbolji način za smanjenje onečišćenja, sprečavanje razvoja plijesni prije i nakon berbe. Nedavna istraživanja pokazala su da biološki agensi poput kvasaca (posebno autohtoni sojevi) učinkovitije sprječavaju rast plijesni, u usporedbi s kemijskim metodama.

Bitno je pronaći učinkovita sredstva za biokontrolu sojeva *A. carbonarius*, jer 75% - 100% sojeva proizvodi OTA. Upotrebom kvasaca tijekom rasta plijesni, moguće je značajno smanjiti koncentraciju mikotoksina, ali i rast samih plijesni (Souza i sur., 2017).

Antagonističke značajke kvasaca mogu se pripisati nadmetanju za hranjive sastojke i prostor, lučenju antimikotičnih spojeva, parazitizmu na gljivičnim patogenima, stvaranju biofilma, kao i indukciji i stimulaciji rezistencije biljaka domaćina poput izazivanja obrambenog odgovora koji uključuje proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *Reactive Oxygen Species*) (Pfliegler i sur., 2015).

Svi kvasci korištenih u ovom radu pokazali su određenu sposobnost inhibicije rasta prema ispitivanim plijesnima kada su uzgajani na zajedničkoj podlozi.

Uvjeti rasta kvasaca i toksikotvornih plijesni vrlo su slični, kao i njihova učestalost u prehrambenim proizvodima pa se kvasci nameću kao prikladno sredstvo za biokontrolu u uvjetima na polju (Souza i sur., 2017). Međutim, postoje složene interakcije između domaćina, patogena, antagonista i mikroorganizama koje treba preciznije istražiti (Liu i sur., 2010).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

- iz dobivenih rezultata vidljivo je da se određeni sojevi kvasaca (*Pichia guilliermondii* ZIM, *Saccharomyces uvarum* 20 i *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ) mogu koristiti za biokontrolu rasta toksikotvornih plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*.
- najbolji inhibitorni učinak prema rastu plijesni iz roda *Aspergillus* pokazali su kvasci *Pichia guilliermondii* ZIM (63,4 %), *Saccharomyces uvarum* 20 (51,2 %), *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ (74,7 %) i *Hanseniaspora uvarum* S138 (58,1 %).
- najbolji inhibitorni učinak prema rastu plijesni iz roda *Penicillium* pokazali su kvasci *Pichia guilliermondii* ZIM (68,3 %), *Saccharomyces cerevisiae* 5 (65,9 %), *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ (57,1 %).
- svi odabrani sojevi kvasaca pokazuju veći ili manji potencijal za upotrebu s ciljem inhibicije rasta toksikotvornih plijesni.

6. LITERATURA

1. Alasmar, R., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Thani, R., Al-Shamary, N., Alnaimi, H., Jaoua, S. (2020) Isolation of a Novel *Kluyveromyces marxianus* Strain QKM-4 and Evidence of Its Volatilome Production and Binding Potentialities in the Biocontrol of Toxigenic Fungi and Their Mycotoxins. *ACS Omega*, **5**: 17637–17645
2. Aytac, S. A., Taban, B. M. (2014) Food-Borne Microbial Diseases and Control: Food-Borne Infections and Intoxications. *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*, 191–224
3. Bianchini, A., Bullerman, L. B. (2014) Mycotoxins- Classification. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, **2**: 854–861
4. Cai, Z., Yang, R., Xiao, H., Qin, X., & Si, L. (2015) Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, **100**: 52–58
5. Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A., 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
6. Du Plessis, H., Du Toit, M., Nieuwoudt, H., Van der Rijst, M., Hoff, J., Jolly, N. (2019) Modulation of Wine Flavor using *Hanseniaspora uvarum* in Combination with Different *Saccharomyces cerevisiae*, Lactic Acid Bacteria Strains and Malolactic Fermentation Strategies. *Fermentation*, **5**:64
7. Duraković, S. (1991) *Prehrambena mikrobiologija*, 1. izd., Medicinska naklada, Zagreb
8. Duraković, S., Redžepović, S. (2002) *Uvod u opću mikrobiologiju*. Knjiga prva. str. 8-368
9. Erten, H., Ağirman, B., Pelin, C., Gündüz, B., Çarşamba, E., Sert, S., Bircan, S., Tangüler, H. (2014) *Food Processing: Strategies for Quality Assessment (Food Engineering Series)*, 1. izd., Springer, str. 351- 368
10. 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
11. Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., Migheli, Q. (2019) Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **10**: 35

12. Frisvald, J.C., Filtenborg, O. (1989) *Terverticillate penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, **81**: 837-861
13. García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., Bárzana, E. (2014) Single cell protein- Yeasts and Bacteria. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, **2**: 431–438
14. Gil-Rodríguez, A., Garcia-Gutierrez, E. (2020) Antimicrobial Mechanisms and Applications of Yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier, **114**: 37-72
15. Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M. T., Patiño, B. (2014) Mycotoxins- Toxicology. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, **2**: 887–892
16. Giraud F., Giraud T., Aguilera G., Fournier E., Samson R., Cruaud C., Lacoste S., Ropars J., Tellier A., Dupont J. (2010) Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *Int. J. Food Microbiol.* **137**: 204–213
17. Jarvis, B. (2014) Cider (Cyder; Hard Cider), *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, **2**: 437–443
18. Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., Wösten, H. A. B. (2013) Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, **74**: 1–29
19. Kurtzman, C. P., Fell, J. W, Boekhout, T. (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5. izd., Elsevier Science, str. 21-44
20. Lane, M. M., Morrissey, J. P. (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, **24**: 17–26
21. Le Jeune, C., Lollier, M., Demuyter, C., Erny, C., Legras, J.-L., Aigle, M., Masneuf-Pomarède, I. (2007) Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus var. uvarum*. *FEMS Yeast Research*, **7**: 540–549
22. Lima, G.; Arru, S.; De Curtis, F.; Arras, G. (1999) Influence of antagonistic, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 223–229
23. Liu, H. M., Guo, J. H., Cheng, Y. J., Luo, L., Liu, P., Wang, B. Q., Long, C. A. (2010) Control of gray mold of grape by *Hanseniaspora uvarum* and its effects on postharvest quality parameters. *Annals of Microbiology*, **60**: 31–35
24. Markov K. (2005) Utjecaj odabranih parametara na rast plijesni u mješovitim kulturama i biosintezi patulina i zearalenona, doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb.

25. 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
26. Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, **34**: 312- 317
27. Masoud, W., Kaltoft, C. H. (2006) The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, **106**: 229–234
28. Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2008) Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, **124**: 231–238
29. Petersson, S., Schunrer, J. (1995) Biocontrol of Mold Growth in High-Moisture Wheat Stored under Airtight Conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and environmental microbiology*, **3**: 1027-1032
30. Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2015) Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, **55**: 805–818
31. Pitt J. I., Hocking A. D. (2009) *Fungi and Food Spoilage*, Springer Dordrecht Heidelberg London New York, New York. str. 169-339; 412
32. Pitt, J. I. (2014) *Penicillium- Penicillium* and *Talaromyces*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, **2**: 6–13
33. Pleadin, J., Vasilj, V., Petrović, D. (2018) *Mikotoksini-pojavnost, prevencija i redukcija*, Mostar, str. 192
34. Public Health Agency of Canada (2013)- Canadian Food Inspection Agency
< <https://www.canada.ca/en/public-health.html> > Pristupljeno 14. ožujka 2021.
35. Pulvirenti, A., Nguyen, H.-V., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S., & Zambonelli, C. (2000) *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, **192**: 191–196
36. Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z., Si, L. (2015) Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, **100**: 160–167
37. Querol, A., Fleet, G. (2006) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer Berlin Heidelberg

38. Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth, J. E., Pulvirenti, A., & Giudici, P. (1999) *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. FEMS Microbiology Letters, **177**: 177–185
39. Souza, M., Passamani, F., Avila, C., Batista, L., Schwan, R., Silva, C. (2017) Use of Wild Yeasts as a Biocontrol Agent against Toxigenic Fungi and OTA Production. Acta Scientiarum. Agronomy, **39**: 349
40. Stewart, G. G. (2014a) *Saccharomyces*- Introduction. Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier, **2**: 297–301
41. Stewart, G. G. (2014b) *Saccharomyces*- *Saccharomyces cerevisiae*. Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier, **2**: 309–315
42. Stewart, G. G. (2014c) *Saccharomyces*- Brewer's Yeast. Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier, **2**: 302–308
43. Sweeney M. J., Dobson A.D.W. (1998) Review: mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. Int. J. Food Microbiol, **43**: 141-158
44. Tryfinopoulou, P., Chourdaki, A., Nychas, G., Panagou, E. (2020) Competitive Yeast Action against *Aspergillus Carbonarius* Growth and Ochratoxin A Production. International Journal of Food Microbiology, **317**: 108460
45. Twarużek, M., Justyna, E., Kwiatkowska-Giżyńska, J. (2020) Molds in food spoilage. Reference Module in Life Sciences, Elsevier
46. Virgili, R., Simoncini, N., Toscani, T., Camardo Leggieri, M., Formenti, S., & Battilani, P. (2012). Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. Toxins, **4**: 68–82
47. Wang, Y., Wang, L., Wu, F., Liu, F., Wang, Q., Zhang, X., Liu, Y. (2018) A Consensus Ochratoxin A Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of *Aspergillus ochraceus* and a Comparative Genomic Analysis. Applied and Environmental Microbiology, AEM, **19**: 01009–18
48. Wolf, K. (1996) Nonconventional Yeasts in Biotechnology, Springer Berlin Heidelberg
49. Zadavec M., Markov K., Frece J., Perković I., Jakopović Ž., Lešić T., Mitak M., Pleadin J. (2019) Toxigenic moulds and the occurrence of mycotoxin in traditional meat products. Croatian Journal of Food Science and Technology **11**: 187-197

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

Izjava o izvornosti

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

Simona Knapić

ime i prezime studenta