

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja VOJKOVIĆ

**VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA RAST PLESNI RODU
Penicillium IN TVORBO OHRATOKSINA A**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON GROWTH OF
Penicillium spp. AND PRODUCTION OF OCHRATOXIN A**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za živilsko mikrobiologijo in Katedre za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzenta doc. dr. Andreja Plestenjaka.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: doc. dr. Andrej Plestenjak

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Vojković

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 579.26+579.24: 582.28: 615.917(043)=163.6
 KG plesni/*Penicillium*/*Penicillium verrucosum*/ekologija mikroorganizmov/vrednost a_w /vrednost pH/temperatura/gojišča/gojišče YES/gojišče analog kruha/rast plesni/ohratoksin A/tvorba ohratoksina A
 AV VOJKOVIČ, Maja
 SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/PLESTENJAK, Andrej (recenzent)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2008
 IN VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA RAST PLESNI RODU *Penicillium* IN TVORBO OHRATOKSINA A
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XII, 64 str., 13 pregl., 32 sl., 22 pril., 39 vir.
 IJ SI
 JI sl/en
 AI Namen naloge je bil proučiti vpliv različnih okoljskih parametrov na rast plesni rodu *Penicillium* in tvorbo ohratoksina A (OTA). Izbrali smo pet živilskih izolatov in sledeče okoljske parametre: trdno gojišče YES in analog kruha, vrednost a_w (0,90, 0,99), vrednost pH (4,5, 6,5) in temperatura (10 °C, 25 °C). Za spremljanje rasti plesni smo uporabili klasično mikrobiološko gojitveno metodo na trdnem gojišču in izračunali radialno hitrost rasti. Analiza eksperimentalnih rezultatov je pokazala, da ima največji vpliv na rast plesni rodu *Penicillium* vrsta izolata. Ugotovili smo, da rast plesni pod vplivom različnih okoljskih parametrov močno variira med izbranimi izolati rodu *Penicillium*. Njihov vpliv se prav tako odraža v različnih makromorfoloških lastnostih istega izolata plesni. S primerjavo vpliva okoljskih parametrov na rast plesni rodu *Penicillium* smo ugotovili, da ima najvidnejši vpliv na njihovo rast vrednost a_w gojišča, ki ji sledijo temperatura, pH in vrsta gojišča. Rezultati so potrdili našo hipotezo, da bo znižanje a_w in T upočasnilo oz. zavrlo rast plesni, medtem ko znižanje vrednosti pH ni upočasnilo rasti plesni. Za določanje ohratoksina A smo uporabili spektrofotometrično metodo, kot izbrano plesen pa mikotoksikogeno plesen vrste *P. verrucosum*. Plesen smo inokulirali na gojišče YES in jo gojili, pri istih okoljskih parametrih kot pri spremljanju njene rasti, 56 dni. OTA smo kvantitativno določili šele po 35 dnevu inkubacije pri temperaturi 25 °C na gojišču YES z a_w 0,90 in pH 4,5. Na gojišču YES z a_w 0,90 pri pH 6,5 in 25 °C smo določili OTA le po 56 dnevu, medtem ko pri 10 °C in a_w 0,99 OTA nismo določili. Najvišje koncentracije OTA je plesen tvorila na gojišču s pH 4,5 in a_w 0,90 pri 25 °C, torej v manj ugodnih razmerah za njeno rast glede na a_w in pH.

KEY WORDS DOKUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.26+579.24: 582.28: 615.917(043)=163.6
 CX fungi/*Penicillium*/*Penicillium verrucosum*/ecology of microorganisms/water activity/pH value/temperature/media/ YES agar/bread analogue/growth of fungi/ochratoxin A production
 AU VOJKOVIĆ, Maja
 AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/PLESTENJAK, Andrej (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2008
 TI THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON GROWTH OF *Penicillium* spp. AND PRODUCTION OF OCHRATOXIN A
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XII, 64 p., 13 tab., 32 fig., 22 ann., 39 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The aim of our research was to investigate the effect of environmental factors on growth of *Penicillium* spp. and production of ochratoxin A (OTA). In this study we used five food-borne isolates and different environmental factors: YES agar and bread analogue, water activity (0.90, 0.99), pH (4.5, 6.5) and temperature (10 °C, 25 °C). The growth of isolates was observed with classical microbiological method and radial growth rates were calculated. The results showed that the most influencing factor on the growth of fungi were the *Penicillium* strains. We determined that the growth of *Penicillium* spp. varied significantly under different environmental factors and between the strains. The influence of environmental factors was also shown in different macromorphological nature of the same isolate. We determined that the most influencing parameter on growth was water activity with subsequential effect of temperature, pH and type of medium. The results confirmed our presumption that lower water activity and temperature will decrease or completely inhibit the growth. However pH did not decrease the growth of fungi. We conducted spectrofluorimetical method to examine OTA production by ochratoxigenic strain of *P. verrucosum*. We cultivated the strain on YES agar, under the same environmental treatments applied for the growth, over 56 days. We determined quantifiable production of OTA after 35 days of incubation at 25 °C on YES agar at a_w 0.90 and pH 4.5. We also determined production of OTA on YES agar at a_w 0.90 at pH 6.5, but only after 56 days. However no OTA was detected at 10 °C and water activity 0.99. The result showed that strain *P. verrucosum* produced the maximum values of OTA on YES agar at a_w 0.90 and pH 4.5, that means under less favorable conditions for its growth.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOKUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJ NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI PLESNI RODU <i>Penicillium</i>	3
2.1.1 Razširjenost plesni rodu <i>Penicillium</i>	4
2.1.2 Toksičnost plesni rodu <i>Penicillium</i>	4
2.2 ZNAČILNOSTI IN RAZŠIRJENOST PLESNI VRSTE <i>Penicillium verrucosum</i>	5
2.3 VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA RAST PLESNI RODU <i>Penicillium</i>	6
2.3.1 Termodinamska aktivnost vode	6
2.3.2 Vrednost pH	7
2.3.3 Hranilne snovi (gojišče)	8
2.3.4 Temperatura	8
2.4 OHRATOKSIN A	9
2.4.1 Značilnosti OTA	9
2.4.2 Stabilnost OTA	10
2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na tvorbo OTA	11
2.4.4 Meje vrednosti OTA v živilih	13
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 POTEK DELA	14

3.2	MATERIAL	15
3.2.1	Plesni	15
3.2.2	Mikrobiološka gojišča	15
3.2.3	Druge kemikalije in dodatki	17
3.2.4	Laboratorijska oprema	18
3.3	METODE DELA	19
3.3.1	Revitalizacija plesni	19
3.3.2	Spremljanje rasti plesni pri različnih okoljskih parametrih	19
3.3.2.1	Uporabljen material	19
3.3.2.2	Izvedba metode	19
3.3.3	Določanje OTA	23
3.3.3.1	Uporabljen material	23
3.3.3.2	Izvedba metode	23
3.3.3.3	Izkoristek spektrofotometrične metode	26
3.3.4	Statistična analiza	27
4	REZULTATI	28
4.1	SPREMLJANJE RASTI PLESNI RODU <i>Penicillium</i> NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH	28
4.1.1	Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri 25 °C	28
4.1.2	Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri 25 °C	31
4.1.3	Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri 10 °C	33
4.1.4	Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri 10 °C	36
4.2	VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA POVPREČNO RADIALNO HITROSRT RASTI PLESNI RODU <i>Penicillium</i>	38
4.2.1	Vpliv vrste izolata plesni rodu <i>Penicillium</i>	38
4.2.2	Vpliv a_w	41
4.2.3	Vpliv temperature	42
4.2.4	Vpliv pH	44
4.2.5	Vpliv vrste gojišča	45
4.3	PRIMERJAVA VPLIVA OKOLJSKIH PARAMETROV NA RAST PLESNI VRSTE <i>P. verrucosum</i>	46

4.4	VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA TVORBO OHRATOKSINA A.....	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	53
5.1	RAZPRAVA.....	53
5.1.1	Spremljaje rasti plesni na različnih gojiščih	53
5.1.2	Določanje OTA	57
5.2	SKLEPI.....	59
6	POVZETEK.....	60
7	VIRI	61

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2-1: Dejavniki, ki vplivajo na biosintezo OTA (Smith in sod., 1994)	12
Preglednica 2-2: Dovoljene zgornje mejne vrednosti OTA v živilih (Commission Regulation (EC) No1881/2006, 2006)	13
Preglednica 3-1: Izolati plesni rodu <i>Penicillium</i>	15
Preglednica 3-2: Laboratorijska oprema	18
Preglednica 3-3: Izbor okoljskih parametrov	20
Preglednica 3-4: Izbor okoljskih parametrov za proučevanje tvorbe OTA pri plesnih vrste <i>P. verrucosum</i>	23
Preglednica 3-5: Izkoristek spektrofotometrične metode	26
Preglednica 4-1: Vpliv vrste izolata plesni rodu <i>Penicillium</i> na povprečno RHR	38
Preglednica 4-2: Vpliv a_w gojišča na povprečno RHR plesni rodu <i>Penicillium</i>	41
Preglednica 4-3: Vpliv temperature na povprečno RHR plesni rodu <i>Penicillium</i>	43
Preglednica 4-4: Vpliv pH na povprečno RHR plesni rodu <i>Penicillium</i>	44
Preglednica 4-5: Vpliv gojišča na povprečno RHR plesni rodu <i>Penicillium</i>	45
Preglednica 4-6: Tvorba OTA pri plesni vrste <i>P. verrucosum</i> na gojiščih YES	52

KAZALO SLIK

Slika 2-1: <i>Penicillium</i> spp. (Mercuri, 2008)	3
Slika 2-2: Plesni vrste <i>P. verrucosum</i> (A) na ovsu, (B) na ječmenu, (C) mikrokultura (Elmholt, 2005).....	6
Slika 2-3: Struktura OTA (Walker, 1999)	10
Slika 2-4: Območji pH in a_w za rast plesni rodu <i>Penicillium</i> in tvorbo OTA	11
Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela.....	14
Slika 3-2: Shema izbora okoljski parametrov	19
Slika 3-3: Shema spremljanja rasti plesni na različnih gojiščih.....	22
Slika 3-4: Shema določanja OTA s spektrofotometrično metodo	25
Slika 4-1: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 in 25 °C	28
Slika 4-2: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,90 in 25 °C	29
Slika 4-3: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,99 in 25 °C	30
Slika 4-4: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,90 in 25 °C	30
Slika 4-5: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri pH 4,5, a_w 0,99 in 25 °C ..	31
Slika 4-6: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri pH 5,9, a_w 0,99 in 25 °C .	32
Slika 4-7: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri pH 6,5, a_w 0,99 in 25 °C .	32
Slika 4-8: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 in 10 °C	33
Slika 4-9: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,90 in 10 °C	34
Slika 4-10: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,99 in 10 °C ..	34
Slika 4-11: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,90 in 10 °C ..	35
Slika 4-12: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri pH 4,5, a_w 0,99 in 10 °C	36
Slika 4-13: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri pH 5,9, a_w 0,99 in 10 °C	37
Slika 4-14: Rast izolatov rodu <i>Penicillium</i> na analogu kruha pri pH 6,5, a_w 0,99 in 10 °C	37
Slika 4-15: Vpliv vrste izolata plesni rodu <i>Penicillium</i> na povprečno RHR na gojiščih YES pri 25 °C	39
Slika 4-16: Vpliv vrste izolata plesni rodu <i>Penicillium</i> na povprečno RHR na analogu kruha z a_w 0,99.....	40

Slika 4-17: Vpliv a_w gojišča YES na povprečno RHR plesni rodu <i>Penicillium</i> pri 10 °C .	42
Slika 4-18: Vpliv a_w in T na rast plesni vrste <i>P. verrucosum</i> na gojišču YES pri pH 6,5 ..	46
Slika 4-19: Vpliv a_w in T na rast plesni vrste <i>P. verrucosum</i> na gojišču YES pri pH 4,5 ..	47
Slika 4-20: Vpliv pH in T na rast plesni vrste <i>P. verrucosum</i> na gojišču YES pri a_w 0,99	48
Slika 4-21: Vpliv pH in T na rast plesni vrste <i>P. verrucosum</i> na gojišču YES pri a_w 0,90	48
Slika 4-22: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 in T na rast plesni vrste <i>P. verrucosum</i> pri pH 6,5	49
Slika 4-23: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 in T na rast plesni vrste <i>P. verrucosum</i> pri pH 4,5	50
Slika 4-24: Vpliv a_w in pH gojišča YES na tvorbo OTA pri plesnih vrste <i>P. verrucosum</i> pri 25 °C ..	51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vpliv pH na rast plesni vrste *P. verrucosum* na analogu kruha z a_w 0,99 in različno vrednostjo pH pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

Priloga B: Vpliv a_w in pH na rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

Priloga C: Vpliv a_w na rast izolata 25 A na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

Priloga D: Vpliv pH na rast izolata 19 B na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C)

Priloga E: Vpliv temperature na rast izolata 25 A na gojišču YES z a_w 0,99 pri pH 6,5 (A) in pH 4,5 (B)

Priloga F: Vpliv pH na rast izolata 25 A na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

Priloga G: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 25 A pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

Priloga H: Vpliv a_w na rast izolata 19 B na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

Priloga I: Vpliv pH na rast izolata 19 B na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C), a_w 0,90, 10 °C (D)

Priloga J: Vpliv temperature na rast izolata 19 B na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 (A), pH 6,5, a_w 0,90 (B), pH 4,5, a_w 0,99 (C), pH 4,5, a_w 0,90 (D)

Priloga K: Vpliv pH na rast izolata 19 B na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

Priloga L: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 19 B pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

Priloga M: Vpliv a_w na rast izolata 10 B na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

Priloga N: Vpliv pH na rast izolata 10 B na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C), a_w 0,90, 10 °C (D)

Priloga O: Vpliv temperature na rast izolata 10 B na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 (A), pH 6,5, a_w 0,90 (B), pH 4,5, a_w 0,99 (C), pH 4,5, a_w 0,90 (D)

Priloga P: Vpliv pH na rast izolata 10 B na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

Priloga Q: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 10 B pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

Priloga R: Vpliv a_w na rast izolata 9 C na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

Priloga S: Vpliv pH na rast izolata 9 C na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C), a_w 0,90, 10 °C (D)

Priloga T: Vpliv temperature na rast izolata 9 C na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 (A), pH 6,5, a_w 0,90 (B), pH 4,5, a_w 0,99 (C), pH 4,5, a_w 0,90 (D)

Priloga U: Vpliv pH na rast izolata 9 C na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

Priloga V: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 9 C pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	Pomen
ADI	sprejemljiv dnevni vnos (angl. acceptable daily intake).
a_w	termodinamska aktivnost vode
CBS	zbirka gliv (Centraalbureau voor schimmelcultures)
CYA	gojišče Czapek (angl. Czapek yeast agar)
ES	evropska skupnost
IARC	angl. International Agency for Research on Cancer
LD ₅₀	doza pri kateri pogine 50 % testnih živali (angl. lethal dose)
MEA	gojišče sladni ekstrakt (angl. malt extract agar)
NOEL	odmerek brez opaznega zdravju škodljivega učinka (angl. no observable adverse effect level).
OGY	gojišče oksitetraciklin kvasni ekstrakt
OTA	ohratoksin A
<i>P. verrucosum</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
P	parni tlak raztopine
P _o	parni tlak topila
pH	negativni logaritem vodikovih ionov
PV	<i>Penicillium verrucosum</i>
R	premer kolonije plesni
RHR	radialna hitrost rasti
t	čas
T	temperatura
YES	gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo (angl. yeast extract agar)
ŽM, ŽMJ	mikrobiološki zbirki laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

1 UVOD

Živila nudijo ustrezne razmere za rast in razvoj plesni. Med plesnimi so najpogostejši povzročitelji kvara živil plesni rodu *Penicillium*. Poleg slabšanja prehranskih in senzoričnih lastnosti so le te odgovorne tudi za tvorbo mikotoksinov in alergenskih komponent, ki se tvorijo že pred vidno rastjo plesni.

Na rast plesni na določenih živilih vpliva veliko fizikalnih, kemijskih in okoljskih parametrov. Definiranje le-teh nam je lahko v veliko pomoč pri ohranjanju stabilnosti živil, vendar je pri tem potrebno upoštevati dejstvo, da ti parametri ne delujejo neodvisno (Pitt in Hocking, 1997).

Mikotoksini so sekundarni metaboliti plesni, ki imajo različne škodljive vplive na živali, človeka (Jeršek in sod., 2004) in pridelek ter se kažejo v boleznih in ekonomskih izgubah. Uvrščamo jih v skupino kemijskih dejavnikov tveganja, med naravne onesnaževalce živil.

Onesnaževalo v živilu je katerakoli nenamerno v živilu prisotna snov in je lahko rezultat pridelave, prireje, predelave, priprave, obdelave, pakiranja, transporta ali skladiščenja živila ali rezultat kontaminacije živila iz okolja (Jeršek in sod., 2004)

Glavni način vnosa mikotoksinov v telo je uživanje kontaminiranih živil, zato je eden temeljnih kakovostnih parametrov hrane zagotavljanje njene varnosti oziroma zdravstvene neoporečnosti.

Ohratoksin A je mikotoksin, ki ga proizvajajo predvsem plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus*. Je potencialno nefrotoksičen, hepatotoksičen, teratogen in imunotoksičen za živali ter potencialno karcinogen za človeka (Mateo in sod., 2007; Schmidt-Heydt, 2007; Torelli in sod., 2005).

Potrjena prisotnost ohratoksina A v različnih živilih (žita, stročnice, pivo, vino, kava, kakav, oreški, grozdni sok, suho sadje, začimbe, meso), možna okužba ljudi preko prehranjevalne verige in preprečevanje tvorbe mikotoksinov predstavljajo resen globalni problem.

Najboljši način preprečevanja prisotnosti mikotoksinov v živilih in krmi je zmanjšanje rasti plesni v agrikolturnih proizvodih (Frisvad in Thrane, 2000).

Prisotnost potencialno toksikogene plesni na živilu še ne pomeni, da ta produkt vsebuje mikotoksin oz. prisotnosti spor ali rasti določene plesni ne sledi vedno proizvodnja mikotoksina. Pomembno vlogo imajo številni okoljski parametri, med katerimi so poleg hranil najpomembnejši temperatura, a_w in kisik (Filtenborg in sod., 2000).

V praktičnem delu diplomske naloge smo proučevali vpliv različnih okoljskih parametrov na rast plesni rodu *Penicillium* s klasično gojitveno metodo na trdnem gojišču. Pri plesni vrste *P. verrucosum* smo s spektrofotometrično metodo kvantitativno določali tvorbo ohratoksina A v določenem časovnem zaporedju.

1.1 CILJ NALOGE

Glavni namen naloge je bil proučiti vpliv različnih okoljskih parametrov (gojišče, a_w , pH, temperatura) na rast plesni rodu *Penicillium* in tvorbo ohratoksina A. V praktično delo smo vključili klasično mikrobiološko gojitveno metodo za spremljanje rasti plesni in spektrofotometrično metodo za določanje ohratoksina A. Ugotoviti smo želeli morebitne razlike v rasti različnih živilskih izolatov plesni ter kvantitativno določiti tvorbo ohratoksina A pri izbrani plesni vrste *P. verrucosum*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Okoljski parametri a_w , pH, T in vrsta gojišča vplivajo na rast plesni rodu *Penicillium* in tvorbo ohratoksina A.
- Rast na različnih gojiščih je odvisna od vrste plesni.
- Znižanje vrednosti a_w , pH, T bo upočasnilo ali zavrlo rast plesni.
- Analog kruha bo predstavljal optimalnejše razmere za rast plesni kot gojišče YES.
- Predvidevamo, da bo tvorba ohratoksina A večja pri okoljskih parametrih, ki niso optimalni za rast plesni.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI PLESNI RODU *Penicillium*

Taksonomska razvrstitev:

Kraljestvo	Fungi
Deblo	Ascomycota
Razred	Euascomycetes
Družina	Trichomaceae
Rod	<i>Penicillium</i>

Za rod *Penicillium* so značilne hitro rastoče kolonije, ki so največkrat obarvane zeleno, lahko tudi sivo-zeleno, modro-zeleno, rumeno-zeleno ali belo. Zračni micelij je nizek s strukturo, podobno vati ali filcu. Substratni micelij je septiran ter debelejši in temnejši od zračnega micelija. Septirani konidiofori posamično ali v parih izhajajo iz bazalnih celic substratnega micelija. Konidiofor se na koncu cepi v simetrične ali asimetrične razvejitve, ki se imenujejo metule. Na metulah se v snopih tvorijo keglaste konidiogene celice, ki se imenujejo fialide (slika 2-1). V njih se tvorijo verižice okroglih, elipsoidnih ali cilindričnih konidijev. Plesni rodu *Penicillium* so glede na veliko število vrst, ki lahko rastejo v različnih razmerah, najpomembnejši kvarljivci živil. Lahko rastejo pri nizkih temperaturah, nizkih vrednostih a_w (vse do 0,78) in v širokem območju vrednosti pH (Pitt in Hocking, 1985; Adamič in sod., 2003).



Slika 2-1: *Penicillium* spp. (Mercuri, 2008)

2.1.1 Razširjenost plesni rodu *Penicillium*

Poleg zemlje so naravno okolje plesni rodu *Penicillium* različne vrste žit, citrusi, zelenjava, siri in suhomesnati izdelki. Kot kvarljivci se pojavijo pogosto na siru, mesu, salamah, suhomesnatih in drugih mesnih izdelkih, na svežem in suhem sadju, v sadnih sokovih, marmeladah, rižu, kavi, lešnikih in orehih. Nekatere vrste so industrijsko pomembne in se uporabljajo kot starter kulture v proizvodnji sirov, mesnih izdelkov, farmaciji in v proizvodnji antibiotikov (Adamič in sod., 2003; Filtenborg in sod., 1996).

2.1.2 Toksičnost plesni rodu *Penicillium*

Veliko vrst plesni rodu *Penicillium* tvori mikotoksine in druge sekundarne toksične metabolite. Mikotoksine, ki jih tvorijo plesni rodu *Penicillium* lahko na osnovi njihovega vpliva razdelimo na dve obsežni skupini, in sicer na tiste, ki prizadenejo delovanje ledvic in jeter ter na nevrotoksine (Sweeney in Dobson, 1998).

Glavne toksikogene plesni rodu *Penicillium*, ki tvorijo ohratoksin A (OTA) so: *P. verrucosum*, *P. viridicatum*, *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. palitans*, *P. commune*, *P. variable*, *P. purpurescens* in *P. cyclopium* (D'Mello, 2003; Kahne-Jurišević, 2005).

Poznanih je torej več vrst rodu *Penicillium*, ki proizvajajo OTA, vendar je le nekaj od njih znanih kot kontaminantov živil in krme z mikotoksini. Do nedavnega je bilo znano, da je takšna le plesen vrste *P. verrucosum*, vendar so ugotovili da proizvaja OTA v živilih tudi plesen vrste *P. nordicum*, ki trenutno skupaj s plesnijo vrste *P. verrucosum* predstavljata edini vrsti iz rodu *Penicillium*, ki proizvajata OTA (Bragulat in sod., 2008).

Plesni rodu *Penicillium* lahko tvorijo poleg OTA še druge mikotoksine kot so patulin, penicilinska kislina, citrinin in citreoviridin (Smith in sod., 1994).

Bolezen, ki jo povzroča hrana kontaminirana s toksikogenimi plesnimi imenujemo mikotoksikoza. Za ljudi, živali in rastline so mikotoksini izredno strupene snovi, ki povzročajo mikotoksikoze z neposrednimi znaki v obliki zastrupitev in kroničnimi znaki v obliki obolenj jeter ali aktiviranjem tumorjev (Kovač, 2004).

Mikotoksikoze se razlikujejo glede na količino in trajanje uživanja mikotoksinov na akutne in kronične ter glede na območja, kjer se pojavljajo v večjem obsegu na endemske (Bidovec, 1989).

Do akutne zastrupitve pride po časovno kratkotrajni (24 ur ali manj) izpostavljenosti smrtni dozi določene kemijske snovi, medtem ko je kronična zastrupitev rezultat izpostavljenosti manjšim koncentracijam toksina v daljšem časovnem obdobju. Simptomi akutne in kronične zastrupitve so seveda različni. Akutna toksičnost toksina je opisana s smrtnim

odmerkom toksina, pri katerem pogine 50 % laboratorijski testnih živali (LD_{50} (mg/kg telesne teže)). Akutna toksičnost je zelo odvisna od starosti, spola in vrste živali ter znaša za ohratoksin A <6 mg/kg telesne teže (prašiči). Določanje kronične toksičnosti služi največkrat ocenjevanju vrednosti NOEL - odmerek brez opaznega zdravju škodljivega učinka (angl. No observable adverse effect level). Vsebnost NOEL je osnova določitvi sprejemljivega dnevnega vnosa – ADI (angl. Acceptable daily intake). Vrednost ADI pomeni količino določene kemijske snovi, ki jo lahko človek zaužije vsak dan brez posebnega tveganja za zdravje in se izraža v mg/kg telesne teže/dan (Jeršek in sod., 2004; D'Mello, 2003).

V večini primerov ostanejo mikotoksikoze neregistrirane, razen, ko pride do zastrupitve večje populacije ljudi (Kahne-Juriševič, 2005).

2.2 ZNAČILNOSTI IN RAZŠIRJENOST PLESNI VRSTE *Penicillium verrucosum*

Za plesni vrste *P. verrucosum* je značilna počasna rast na gojiščih CYA (gojišče Czapek s kvasni ekstraktom) in MEA (gojišče sladni ekstrakt) pri 25 °C, svetlo zeleni konidiji ter bister do moten eksudat. Plesen so izolirali iz skandinavskega ječmena, kjer so dokazali tudi prisotnost OTA, iz mesnih izdelkov v Nemčiji in ostalih Evropskih državah (Pitt in Hocking, 1997).

Plesni vrste *P. verrucosum* lahko rastejo v temperaturnem območju od 0 do 31 °C, z optimalno temperaturo za rast pri 20 °C. So kserofilne plesni sposobne rasti pri a_w 0,80 ter v pH območju med 2 in 10, z optimalnim pH za rast med 6 in 7. Poznane optimalne razmere na kruhovem testu so a_w 0,92 in pH 5,6. Vrednost a_w in temperatura ter njuna interakcija imata značilen vpliv na germinacijo spor in rast micelija plesni vrste *P. verrucosum*. Skupen vpliv teh faktorjev omogoča rast plesnim vrste *P. verrucosum* pri različnih okoljskih parametrih. OTA lahko tvorijo v celotnem temperaturnem območju rasti in do a_w 0,86 (Sweeney in Dobson, 1998; Creppy, 2002; Magan in Aldred, 2007; Pardo in sod., 2006).

Med vrstami rodu *Penicillium* so plesni vrste *P. verrucosum* pomembne proizvajalke ohratoksina A (OTA) in so predominantno odgovorne za pojav OTA v žitu in žitnih izdelkih (Schmidt-Heydt in sod., 2007).

Nedavne ocene žit v Evropi, predvsem pšenice, navajajo, da je ta vrsta plesni glavna proizvajalka OTA. Kontaminacija nastopi že med procesom žetve ter med sušenjem in skladiščenjem. Za vrste kot je *P. verrucosum* je značilno, da so zelo kompetitivne in sposobne dominacije v ugodnih okoljskih razmerah (Magan in Aldred, 2007).

Plesni vrste *P. verrucosum* se pojavljajo na žitu in žitnih izdelkih, stročnicah, sirih, kavi, kakavu, suhem sadju, vinu, pivu, začimbah, grozdnem soku.

Ocenili so, da v Evropi približno 50 % prehranskega vnosa OTA izvira iz žit in njihovih produktov (Pardo in sod., 2006)



Slika 2-2: Plesni vrste *P. verrucosum* (A) na ovsu, (B) na ječmenu, (C) mikrokultura (Elmholt, 2005)

2.3 VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA RAST PLESNI RODU *Penicillium*

Najbolj pomembni dejavniki, ki vplivajo na rast plesni in tvorbo mikotoksinov so količina razpoložljivih hranil, temperatura okolja, vrednost a_w in kisik. Razmere, ki pospešujejo proizvodnjo toksinov, so običajno bolj omejene od razmer, ki vplivajo na rast plesni (Kokkonen, 2005).

2.3.1 Termodinamska aktivnost vode

Voda je nujno potrebna vsem živim bitjem. Vrednost a_w je poleg temperature najpomembnejši fizikalni dejavnik, ki vpliva na metabolizem in rast mikroorganizmov. Vodna aktivnost je parameter, ki se širše uporablja namesto vsebnosti vlage in predstavlja razpoložljivost vode za rast mikroorganizmov v živilu. Matematično vrednost a_w izrazimo kot razmerje med parnim tlakom raztopine oz. snovi (živila) (P) in parnim tlakom topila, vode (P_o) pri isti temperaturi. Ta pojem se nanaša na relativno vlažnost (Adamič in sod., 2003; Jay, 1992).

Med a_w , temperaturo in živili obstajajo določena razmerja:

- pri katerikoli temperaturi se z znižanjem a_w sposobnost mikroorganizmov za rast zmanjša,
- območje a_w rasti je večje pri optimalni temperaturi za rast,
- prisotnost hranil poveča območje a_w rasti v katerem organizmi preživijo.

Splošen vpliv znižane vrednosti a_w pod optimalno se kaže v daljši fazi prilagajanja in zmanjšanju hitrosti rasti ter manjši velikosti končne populacije mikroorganizmov. Znižana a_w neugodno vpliva na vse metabolne aktivnosti, saj vse kemijske reakcije v celici

potrebujejo vodno okolje. Na a_w vplivajo še drugi okoljski dejavniki kot so pH, temperatura in Eh (Jay, 1992).

V mnogih praktičnih razmerah je a_w prevladujoč okoljski parameter, ki vpliva na obstojnost živil. Večina predstavnikov nitastih gliv iz askomicetnih rodov je sposobnih rasti pri a_w pod 0,90. Stopnja tolerance na nizko vrednost a_w je definirana kot minimalna a_w , pri kateri se pojavi germanizacija in rast plesni. Glivam, ki rastejo pri nizkih vrednostih a_w pravimo kserofili, med katere uvrščamo tudi plesni rodu *Penicillium*. V širšem pomenu so to glive, ki so sposobne rasti pri a_w pod 0,85 pri različnih okoljskih parametrih. Plesni bolje prenašajo pomanjkanje vode kot bakterije. Zato kot kvarljivci živil pri nizkih a_w prevladujejo plesni, pri visokih pa se pojavljajo tudi bakterije. Pri tem pa igra odločilno vlogo pH (Pitt in Hocking, 1997).

2.3.2 Vrednost pH

Neugoden pH vpliva na funkcionalnost encimov in na transport hranilnih snovi v mikrobo celico. Snovi, ki so odgovorne za neugoden pH določajo tako hitrost rasti kot tudi minimalen/optimalen pH za rast mikroorganizma. Pri izpostavitvi mikroorganizmov okolju pod ali nad nevtralnimi pH je njihova rast odvisna od njihove sposobnosti spreminjanja okoljskega pH k bolj optimalni vrednosti ali območju. pH lahko vpliva tudi na morfologijo plesni (npr. na dolžino hif) (Jay, 1992).

V določenem območju pH je rast mikroorganizmov zelo počasna, medtem ko optimalen pH omogoča najhitrejšo rast. Vpliv vrednosti pH na rast mikroorganizmov je odvisen tudi od drugih dejavnikov:

- ostalih dejavnikov okolja, predvsem temperature, vrednosti a_w , prisotnosti kisika, hranil in protimikrobnih snovi,
- pH substrata postane z višanjem temperature bolj kisel. Koncentracija soli ima značilen vpliv na pH območje rasti (Jay, 1992),
- vrste medija, predvsem kisline, ki je vzrok nizke vrednosti pH,
- možne prilagoditve mikroorganizmov in sposobnosti rasti pri nižjih vrednostih pH, če so bili predhodno izpostavljeni istemu ali kateremu drugemu subletalnemu stresu.

Plesni lahko rastejo v širokem območju vrednosti pH okolja in pri nižjem optimalnem pH kot večina bakterij (Adamič in sod., 2003).

Na večino plesni ima pH majhen vpliv, rastejo lahko v širokem območju, običajno med 3 in 8. Nekatere plesni so sposobne rasti celo pri pH 2. Pri odstopanju pH od optimalnega, okoli 5, se lahko pojavi vpliv drugih limitirajočih faktorjev (Pitt in Hocking, 1997).

2.3.3 Hranilne snovi (gojišče)

Mikroorganizmi potrebujejo za normalno rast in delovanje vodo, vir energije, vir dušika, vitamine in rastne faktorje ter minerale. Plesni imajo najmanjše zahteve po hranilnih snoveh, sledijo jim kvasovke, gramnegativne in grampozitivne bakterije. V ali na živilih lahko mikroorganizmi kot vir energije izrabljajo sladkorje, alkohole in amino kisline. Nekateri pa so sposobni izkoriščanja kompleksnih ogljikovih hidratov kot sta škrob in celuloza ter maščob kot energijski vir. Primarni vir dušika heterotrofnih mikroorganizmov so amino kisline (Jay, 1992).

Plesni so heterotrofni mikroorganizmi z absorptivnim načinom prehranjevanja ter sintetizirajo hidrolitične encime. Na njihovo rast vplivajo vrsta in lastnosti substrata, kemijska sestava, struktura, higroskopičnost, površina, pH vrednost, fizikalne lastnosti, morebitne primesi in inhibitorne substance. Najpomembnejši hranili za rast plesni na gojišču sta dušik in ogljik ter njuno razmerje in količina. Na ustreznih gojiščih lahko pride do hitrega razmnoževanja plesni, katere s svojimi encimi povzročajo kemijsko razgradnjo beljakovin, ogljikovih hidratov, maščob in drugih esencialnih snovi (Bidovec, 1989).

Na splošno so plesni kvarljivci ogljikohidratnih žvil, medtem ko so bakterije kvarljivci proteinskih žvil. Določeni topljenci v živilu lahko kažejo dodaten vpliv na rast gliv. Hocking in Pitt (1997) sta dokazala, da je imela kontrola vrednosti a_w gojišča z glukozo-fruktozo, glicerolom ali natrijevim kloridom le majhen vpliv na rast mnogih plesni rodu *Aspergillus* in *Penicillium*.

2.3.4 Temperatura

Temperatura je najpomembnejši zunanji dejavnik, ki vpliva na rast in razmnoževanje mikroorganizmov v živilih. Uporaba nizkih temperatur pri hlajenju in zamrzovanju je še vedno najbolj uporaben način zaviranja mikrobnih in endogenih encimskih procesov v živilu. Prav tako je toplotna obdelava, bodisi pasterizacija pri $T < 100\text{ °C}$ ali apertizacija pri $T > 100\text{ °C}$, še vedno najpogostejši način uničevanja mikroorganizmov v živilih in s tem podaljšanja obstojnosti in zagotavljanje mikrobiološke varnosti živil (Adamič in sod., 2003).

Mikroorganizmi rastejo v zelo širokem temperaturnem območju, ki ga določajo tri temperature: minimalna, optimalna, maksimalna. Na temperaturno območje rasti izredno močno vplivajo drugi okoljski parametri (vrednost pH, vrednost a_w , prisotnost kisika, sestava gojišča ipd.). Glavne skupine mikroorganizmov glede na njihova temperaturna območja rasti so: termofili, mezofili, psihrotrofi in psihrofili. Plesni so sposobne rasti v širšem temperaturnem območju v primerjavi z bakterijami. Plesni rodu *Penicillium* prištevamo med psihrotrofe (0-40 °C) (Adamič in sod., 2003; Jay, 1992).

Najnižja znana temperatura, pri kateri še rastejo plesni rodu *Penicillium* je med -7 do 0 °C (Pitt in Hocking, 1997). Optimalna temperatura za rast večine plesni rodu *Penicillium* je 25-30 °C, maksimalna pa med 28 in 35 °C (Filtenborg in sod., 2000).

2.4 OHRATOKSIN A

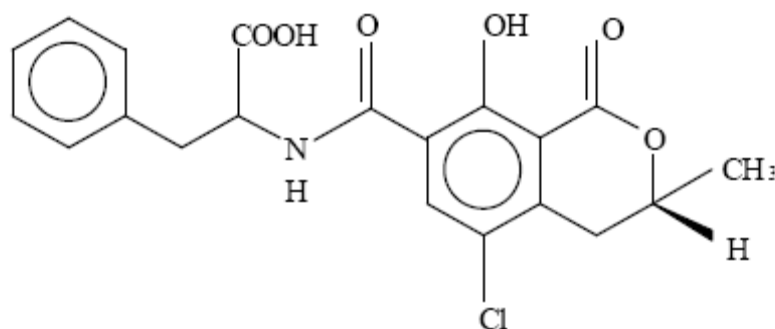
2.4.1 Značilnosti OTA

Ohratoksini A, B, C, D so velika skupina sekundarnih metabolitov toksikogenih plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* med katerimi je OTA najbolj toksičen. OTA je mikotoksin, ki ga proizvajajo predvsem plesni vrste *A. ochraceus* in *P. verrucosum*. OTA je potencialno nefrotoksičen, hepatoksičen, tetragen in karcinogen za živali. Povezujejo ga z obolevnostjo imenovano Balkanska endemska nefropatija in razvojem tumorjev v urinarnem traktu ljudi. IARC (angl. International Agency for Research on Cancer) ocenjuje morebiten karcinogen vpliv OTA na ljudi in ga uvršča v Skupino 2B. Izpostavljanje toksinu je v glavnem vezano na uživanje kontaminirane hrane in krme, prenos je lahko tudi aerogen (Mateo in sod., 2007; Rosa, 2006; Petzinger in Weidenbach, 2002; Creppy, 2002).

Biološke učinke OTA so proučevali na različnih vrstah poskusnih živali. OTA se absorbira preko gastrointestinalnega trakta in se prenaša preko krvi, v glavnem do ledvic, v manjših koncentracijah pa tudi do jeter, mišic in maščobnega tkiva. OTA so našli v vzorcih človeške krvi, in sicer predvsem v hladnejših državah severne poloble, vendar brez znakov akutne intoksikacije (Creppy, 2002; D'Mello, 2003; Van Egmond, 2000; Ringot in sod., 2006).

Karcinogen OTA proizvajajo plesni vrste *P. verrucosum*, *P. nordicum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *Neopetromyces muricatus* in *Petromyces alliaceus* (Frisvad in Thrane, 2000).

OTA sestoji iz pentaketidnega ogrodja in vsebuje klorirano funkcionalno skupino izokumarina, ki je z amidno vezjo povezana z L-fenilalaninom preko karboksilne skupine (slika 2-3).



Slika 2-3: Struktura OTA (Walker, 1999)

OTA je dobro topen v organskih topilih: acetonitrilu, etilacetatu, benzenu, acetonu in izopropanolu. Malo slabše je topen v kloroformu in metanolu. Je optično aktiven in naravno fluorescira. Maksimum emisijskega fluorescentnega spektra je pri 428-460 nm, odvisno od topila (Kahne-Jurišević, 2005). OTA je topen v maščobah, zato se akumulira v maščobnem tkivu živali (Pitt in Hocking, 1997).

OTA se pojavlja se v različnih živilih: pivo, vino, ječmen in ostala žita, stročnice, kava, kakav, oreški, grozdni sokovi, začimbe. Prevladujoč vir OTA so žita, ki so osnovno krmilo ter posledično povzročajo okužbo živali in potencialno okužbo ljudi z OTA v prehranjevalni verigi.

2.4.2 Stabilnost OTA

OTA je relativno stabilen pri visokih temperaturah. Mletje ne razgradi toksina, ostali tehnološki postopki predelave živil in druge obdelave npr.: kuhanje, pečenje, fermentacija pa le delno (Jay, 1992; Creppy, 2002; Kahne-Jurišević, 2005).

Ohranja se med procesom pečenja, med proizvodnjo kosmičev ter med kuhanjem in slajenjem piva. Praženje zelenih zrn kave se je izkazalo kot postopek, ki popolno uniči OTA (Bullerman, 2003; D'Mello, 2003).

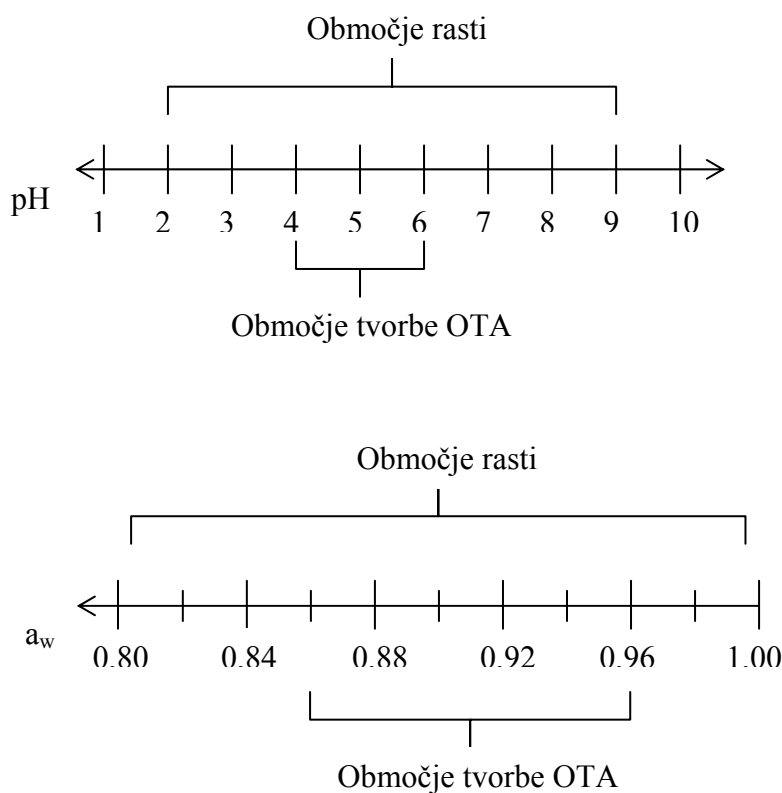
V primeru skladiščenja OTA v raztopini in v temi pri konstantni temperature je stabilen več kot 30 dni (Kralj Cigić in Strlič, 2006).

Nestabilen je na svetlobi, zraku in pod vplivom močnih kislin. OTA v kratkem času razpade pod vplivom svetlobe in vlage. Ob prisotnosti močnih kislin hidrolizira na fenilalanin in optično aktivno laktonsko kislino – ohratoksin alfa. V raztopini etanola je stabilen več kot leto dni, če je hranjen v temnem in hladnem prostoru (Kahne-Jurišević, 2005).

2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na tvorbo OTA

Okoljski dejavniki, ki vplivajo na tvorbo mikotoksina so: primerna vlaga oz. vodna aktivnost, zadostna količina kisika, primerna temperatura, fizikalne poškodbe proizvodov in prisotnost spor plesni (Sforza in sod., 2004). Poleg naštetih so pomembni še substrat (hranila), kompetitivna in asociativna rast drugih plesni in mikroorganizmov ter stres (Bullerman, 2003).

Plesni tvorijo OTA v ožjem temperaturnem in a_w območju v primerjavi z območjema pri katerih plesen raste (slika 2-4). Rast plesni in tvorba OTA se ne pojavita vedno simultano (Filtenborg in sod., 2000).



Slika 2-4: Območji pH in a_w za rast plesni rodu *Penicillium* in tvorbo OTA

Običajno so geni za biosintezo mikotoksina tesno regulirani z rastnimi parametri (a_w , temperatura, konzervansi) in so aktivirani le v določenih razmerah (Schmidt-Heydt in sod., 2007).

Preglednica 2-1: Dejavniki, ki vplivajo na biosintezo OTA (Smith in sod., 1994)

Biološki dejavniki	Kemijski dejavniki	Okoljski dejavniki
Variabilnost rodu plesni	Vrsta substrata	Temperatura
Konkurenčna mikroflora	Antiglivni inhibitorji	Vodna aktivnost (a_w)
Velikost inokuluma		Atmosferski plini
		Intenzivnost svetlobe

- Vrednost a_w

Voda je pomemben dejavnik za klitje, rast, razvoj in sekundarni metabolizem plesni na organskih substratih. Plesni začnejo z izločanjem OTA pri 16 % vlažnosti živila, to vrednost vlage dosegajo živila v skladiščih. Ohratoksikogene plesni uvrščamo v skupino skladiščnih plesni. Minimalna a_w za tvorbo toksina je 0,86. (Kahne-Juriševič, 2005). Plesni rodu *Penicillium* tvorijo OTA celo pri maksimalni a_w 0,95 (Jay, 1992).

- Temperatura

Temperatura je poleg vode najpomembnejši dejavnik okolja, ki vpliva na rast plesni in izločanje mikotoksinov (Kahne-Juriševič, 2005). Plesni rodu *Penicillium* tvorijo OTA približno pri maksimalni temperaturi 30 °C (Jay, 1992).

- Kisik

Vse plesni, tudi ohratoksikogene, so aerobni organizmi. Sposobne so prilagoditi svoje anabolne in katabolne kemijske procese na spremembe okolja in spremembe plinov kot so kisik, dušik, ogljikov dioksid itd. v atmosferi. Kisik je pomemben za rast plesni in tvorbo sekundarnih metabolitov. Kadar koncentracija kisika pade pod 1 % se močno zmanjša tvorba mikotoksinov (Kahne-Juriševič, 2005).

- Hranila v substratu

Najpomembnejši hranili v substratu sta dušik in ogljik ter njuno razmerje in količina. Kot vir dušika so za plesni idealne glutaminska kislina, prolin in amonijev nitrat, kot vir ogljika pa glukoza in saharoza. Na tvorbo OTA vplivata koncentracija beljakovin in kombinacija aminokislin. Nekatere aminokisliline zavirajo tvorbo OTA, druge jo pospešujejo (Bidovec, 1989). Gojišče ima značilen vpliv na sekundarni metabolizem plesni in s tem na proizvodnjo mikotoksinov (Kokkonen, 2005).

Substrat z 2 % kvasa in 4% saharoze pri 25 °C ter nevtralne do rahlo bazične vrednost pH med 7,6-8,2 predstavlja idealne razmere za tvorbo toksina (Kahne-Juriševič, 2005).

2.4.4 Mejne vrednosti OTA v živilih

Temelj zdrave prehrane so varna in kakovostna živila, skladna s predpisi za posamezne dejavnike tveganj. V večini držav kot tudi pri nas so s predpisi za različne možne dejavnike tveganja vključno z onesnaževali opredeljene zgornje mejne vrednosti oziroma normativi (Jeršek in sod., 2004).

V evropski skupnosti velja uredba EC No 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih (preglednica 2-2).

Preglednica 2-2: Dovoljene zgornje mejne vrednosti OTA v živilih (Commission Regulation (EC) No1881/2006, 2006)

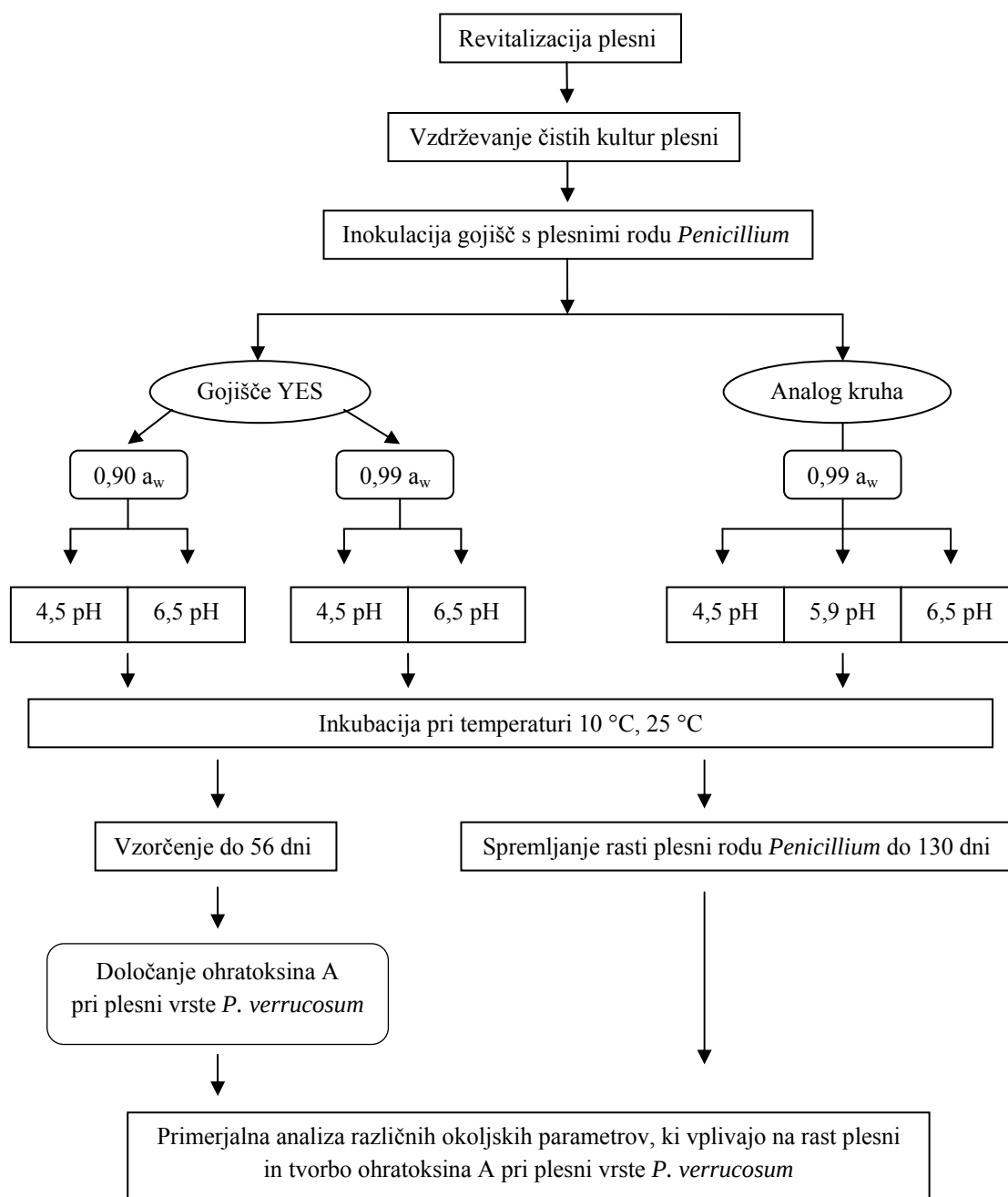
Ohratoksin A	
Živilo	Mejne vrednosti (µg/kg)
1. Nepredelana žita	5,0
2. Vsi proizvodi, pridobljeni iz nepredelanih žit, vključno s predelanimi žitnimi proizvodi in žiti, namenjenimi neposredni prehrani ljudi, razen živil iz točk 9. in 10.	3,0
3. Suho grozdje (korinte, rozine, sultanine)	10,0
4. Pražena zrna kave in mleta pražena zrna, razen instant kave	5,0
5. Instant kava	10,0
6. Vino (vključno s penečim vinom, razen likerskih vin in vin z volumskim deležem alkohola najmanj 15 %) in sadno vino	2,0
7. Aromatizirana vina, aromatizirane pijače na osnovi vina in aromatizirane mešane pijače iz vinskih proizvodov	2,0
8. Grozdni sok, obnovljen zgoščen grozni sok, grozdni nektar, grozdni mošt in obnovljen zgoščen grozni mošt, namenjen neposredni prehrani ljudi	2,0
9. Žitne kašice ter otroška hrana za dojenčke in majhne otroke	0,50
10. Živila za posebne zdravstvene namene, posebej za dojenčke	0,50
11. Surova kava, suho sadje, razen suhega grozdja, pivo, kakav in kakavovi proizvodi, likerska vina, mesni izdelki, začimbe in sladki koren	-

V več kot 70 državah po svetu so predpisali maksimalne dovoljene koncentracije ohratoksina A v različnih živilih z namenom, da bi preprečili oziroma zmanjšali vnos toksične substance v telo. Maksimalne dovoljene koncentracije nihajo v odvisnosti od države in živila (Kahne-Juriševič, 2005)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

Namen našega dela je bil proučiti vpliv različnih okoljskih parametrov (a_w , pH, T, vrsta gojišča) na rast različnih izolatov plesni rodu *Penicillium* in tvorbo ohratoksina A. Potek raziskovalnega dela je shematsko prikazan na sliki 3-1.



Slika 3-1: Shema eksperimentalnega dela

Legenda: YES: gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo; OGY: gojišče oksitettraciklin kvasni ekstrakt

3.2 MATERIAL

3.2.1 Plesni

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili 5 izolatov plesni rodu *Penicillium*, med katerimi plesni vrste *P. verrucosum* tvorijo OTA (preglednica 3-1).

Preglednica 3-1: Izolati plesni rodu *Penicillium*

Oznaka plesni	Vir plesni
<i>Penicillium verrucosum</i> ŽMJ23	CBS 302.48 (švicarski sir)
<i>Penicillium</i> ŽM25 A	kruh
<i>Penicillium</i> ŽM19 B	kisla smetana
<i>Penicillium</i> ŽM10 B	oreh
<i>Penicillium</i> ŽM9 C	mandarina

Legenda: CBS: zbirka gliv Fungal biodiversity centre (Nizozemska); ŽM, ŽMJ: mikrobiološki zbirki laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Gojišče YES (gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo)

Sestavine:

- Kvasni ekstrakt (Biolife, 412220, Italija)
- Saharoza (Kemika, 1800408, Hrvaška)
- Agar (Biolife, 411030, Italija)
- Destilirana voda

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 10 g kvasnega ekstrakta, 75 g saharoze in 10 g agarja. Mešanico smo raztopili v 500 ml destilirane vode in jo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C. Na 45 °C ohlajeno gojišče smo nato aseptično razlili v sterilne petrijeve plošče in jih hranili v hladilniku.

Gojišče OGY (gojišče oksitetraciklin glukoza kvasni ekstrakt)

Sestavine:

- Osnovni medij OGY (Biolife, 4018382, Italija)
- Raztopina oksitetraciklina-OTC (Krka, 743054, Slovenija)
- Destilirana voda

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 20 g osnovnega medija OGY in ga raztopili v 500 ml destilirane vode ter sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C. Ohlajenemu gojišču na približno 50 °C smo nato aseptično dodali 0,05 g oksitetraciklina, ki smo ga predhodno raztopili v 2 ml sterilne destilirane vode. Gojišče smo nato aseptično razlili v sterilne petrijeve plošče in jih hranili v hladilniku.

Analog kruha (Kokkonen in sod., 2005)

Sestavine:

- 1000 g moka (TIP 500-Žito, Slovenija)
- 100 g margarina (Delikat creme-Spar, Avstrija)
- 5 g sol (Morska sol, Droga Kolinska, Slovenija)
- 5 g sladkor (Beli sladkor-Mercator, Hrvaška)
- 5 g kvas (Saf-instant, S.I.Lesaffre, Francija)
- 700 ml vode

Priprava:

Gojišče smo pripravili tako, da smo najprej vse sestavine natehtali in zgnetili v testo, ki je nato eno uro fermentiralo. Testo smo razvaljali in oblikovali v približno 3 mm debelih diske premera 90 mm in jih zavili v folijo. Po 20 minutni sterilizaciji pri 121 °C smo v folijo zavite diske ohladili in jih hranili v hladilniku.

Fiziološka raztopina

Sestavine:

- KH_2PO_4 (Kemika, Hrvaška)
- Destilirana voda

Priprava:

Natehtali smo 3,4 g KH_2PO_4 in ga raztopili v 100 ml destilirane vode. 1,25 ml te raztopine smo razredčili v 1000 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121°C.

3.2.3 Druge kemikalije in dodatki

- 1 M HCl (Merc, 1.00317.1000, Nemčija)
- 3 M NaOH (Sigma, S-8045, Nemčija)
- Glicerol (Kemika, 0711901, Hrvaška)
- Citronska kislina (Merck, 1.00244.0500, Nemčija)
- Etanol 96 % (Merck, 1.00983.1000, Nemčija)
- Metanol (Merck, 1.06009.1000, Nemčija)
- Kloroform (Merck, 1.02445.1000, Nemčija)

3 M NaOH

Sestavine:

- NaOH
- Destilirana voda

Priprava:

Natehtli smo 12 g NaOH in ga raztopili v 100 ml destilirane vode.

Citronska kislina

Sestavine:

- $C_6H_8O_7 \times H_2O$

Priprava:

- 1 M citronsko kislino smo pripravili tako, da smo z analitsko tehtnico natehtali 5,2535 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ in jo raztopili v 25 ml destilirane vode.

3.2.4 Laboratorijska oprema

Aparature, ki smo jih uporabljali pri raziskovalnem delu, so navedene v preglednici 3-2.

Preglednica 3-2: Laboratorijska oprema

Aparatura	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd
Avtomatske pipete in nastavki	P10, P100, P1000	Gilson, Francija
Analitska tehtnica	PB1502-S	Mettler, Švica
Centrifuga za epice	Mini spin plus	Eppendorf, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih plošč	Safire 2	Tecan, Švica
Digitalna tehtnica	PBI 1502-S	Mettler Toledo, Švica
Digestorij	SMBC 122AV	Iskra PIO, Slovenija
Fermentacijska komora	/	Gostol, Slovenija
pH meter	HI 8519N	Hanna instruments, Portugalska
Hladilnik (4 °C)	LTH	Gorenje, Slovenija
Inkubator	Sutjeska	Sutjeska, Beograd
Laboratorijska centrifuga z rotorji	SIGMA 3K30	Sigma, Nemčija
Magnetno mešalo	Rotamix SHP-10	Tehtnica, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Cook 'n grill 1300	Sanyo, Japonska
Mikroskop, kamera	DMBA 300, 102M	Motic, Nemčija
Mikrotitrski ploščice za merjenje fluorescence (flatbottom)	Nunc A/S	Nunc, Danska
Naprava za merjenje a_w	CX-1	Campbell Scientific, Anglija
Plinski gorilnik	/	/
Spiralni mešalec za testo	Diosna	Diosna, Nemčija
Ubodni pH meter	Testo 206-pH2	Testo, Nemčija
Vodna kopel	WB-30	Kambič, Slovenija
Vakuumska črpalka	Univapo 100H	Uniequip
Vrtinčno mešalo	Yellowline TTS2	IKA, ZDA
Zaščitna mikrobiološka komora	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija
Zamrzovalnik (-20 °C)	LTH HG 5.1 Z	Gorenje, Slovenija

Poleg aparatur, ki so navedene v preglednici 3-2, smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo: petrijeve plošče (Labortehtnica, Golias, Slovenija), mikrotitrski plošče (Nunc MicroWellTM, Danska), centrifugirke (Brand, Nemčija), epice (Eppendorf, Nemčija), laboratorijske steklenice – 100 ml, 250 ml, 1000 ml (Duran, Nemčija), merilne valje (Plastibrand, Nemčija), pipetor (Eppendorf, Nemčija), parafilm (Menasha, ZDA), pincete, skalpel, sterilne zobotrebce, alu-folijo in steklovino.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija plesni

Izolati plesni so bili pred začetkom eksperimentalnega dela shranjeni pri temperaturi - 40 °C na trdnem gojišču OGY ali MEA. Vsak izolat smo precepili na gojišče OGY in inkubirali en teden pri temperaturi 25 °C.

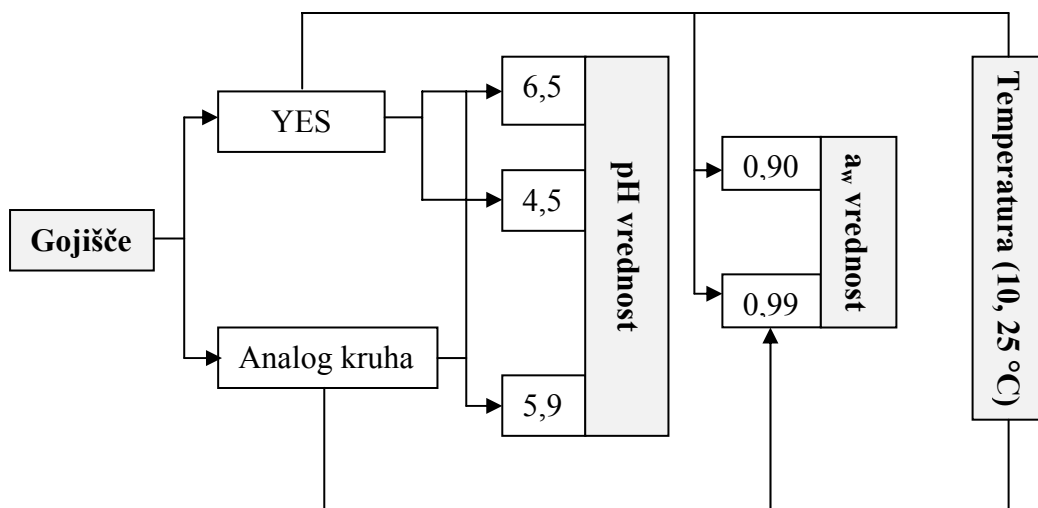
3.3.2 Spremljanje rasti plesni pri različnih okoljskih parametrih

3.3.2.1 Uporabljen material

- Izolati plesni rodu *Penicillium* (preglednica 3-1)
- Gojišča: YES, analog kruha (preglednica 3-3)
- Sterilni zobotrebeci
- Etanol (96 %)
- Pinceta
- Skalpel
- Parafilm

3.3.2.2 Izvedba metode

S spremljanjem rasti plesni rodu *Penicillium* smo želeli proučiti vpliv različnih okoljskih parametrov na njihovo rast.



Slika 3-2: Shema izbora okoljski parametrov

- Izbor in spreminjanje okoljskih parametrov

Izbrali smo dve vrsti gojišč za rast plesni, gojišče YES in analog kruha, z različno vrednostjo a_w in pH (preglednica 3-3):

Preglednica 3-3: Izbor okoljskih parametrov

Gojišče	Okoljski parameter	
	a_w	pH
YES	0,99	4,5
YES	0,90	4,5
YES	0,99	6,5
YES	0,90	6,5
Analog kruha	0,99	4,5
Analog kruha	0,99	5,9
Analog kruha	0,99	6,5

Gojišču YES smo spreminjali vrednost a_w in vrednost pH. Vrednost a_w gojišča 0,99 smo zniževali na 0,90 z dodatkom glicerola (López Diaz in sod., 2002, Arroyo in sod., 2005, Pitt in Hocking, 1997; Pardo in sod., 2006). Vrednost pH pa smo zviševali s 3 M NaOH in zniževali z 1 M HCl. Pripravili smo štiri različice gojišča YES (preglednica 3-3).

Analogu kruha smo spreminjali le vrednost pH. Zviševali smo jo s 3 M NaOH in zniževali z 1 M $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (Arroyo in sod., 2005; Guynot in sod., 2005). Pripravili smo analog kruha z vrednostjo a_w 0,99 in s tremi različnimi vrednostmi pH: 5,9, 4,5 in 6,5 (preglednica 3-3). Analog kruha smo morali pred uporabo aseptično prenesti iz folije v sterilne petrijeve plošče. S skalpelom smo oblikovane diske primerno obrezali in jih s pinceto prenesli v petrijeve plošče.

- Inokulacija

Izolate smo vzdrževali na gojišču OGY, tako da smo jih precepljali vsakih sedem dni. Vseh pet izolatov plesni rodu *Penicillium* smo aseptično inokulirali na izbrana gojišča. S sterilnim zobotrebcom smo naredili luknjico v gojišče, v katero smo z istim zobotrebcom prenesli plesen tako, da smo narahlo postrgali po robu 7 dni stare kolonije plesni na gojišču OGY. Petrijeve plošče smo nato ovili s parafilmom in plesni inkubirali pri temperaturi 10 °C in 25°C.

- Spremljanje rasti

Med inkubacijo smo spremljali rast plesni povprečno vsak drugi dan oz. odvisno od hitrosti rasti posameznega izolata, z merjenjem premera kolonij na spodnji strani petrijeve plošče s premerom 90 mm. Premer smo izmerili z ravnilom v navpični in vodoravni smeri in upoštevali povprečje (slika 3-3).

- Radialna hitrost rasti

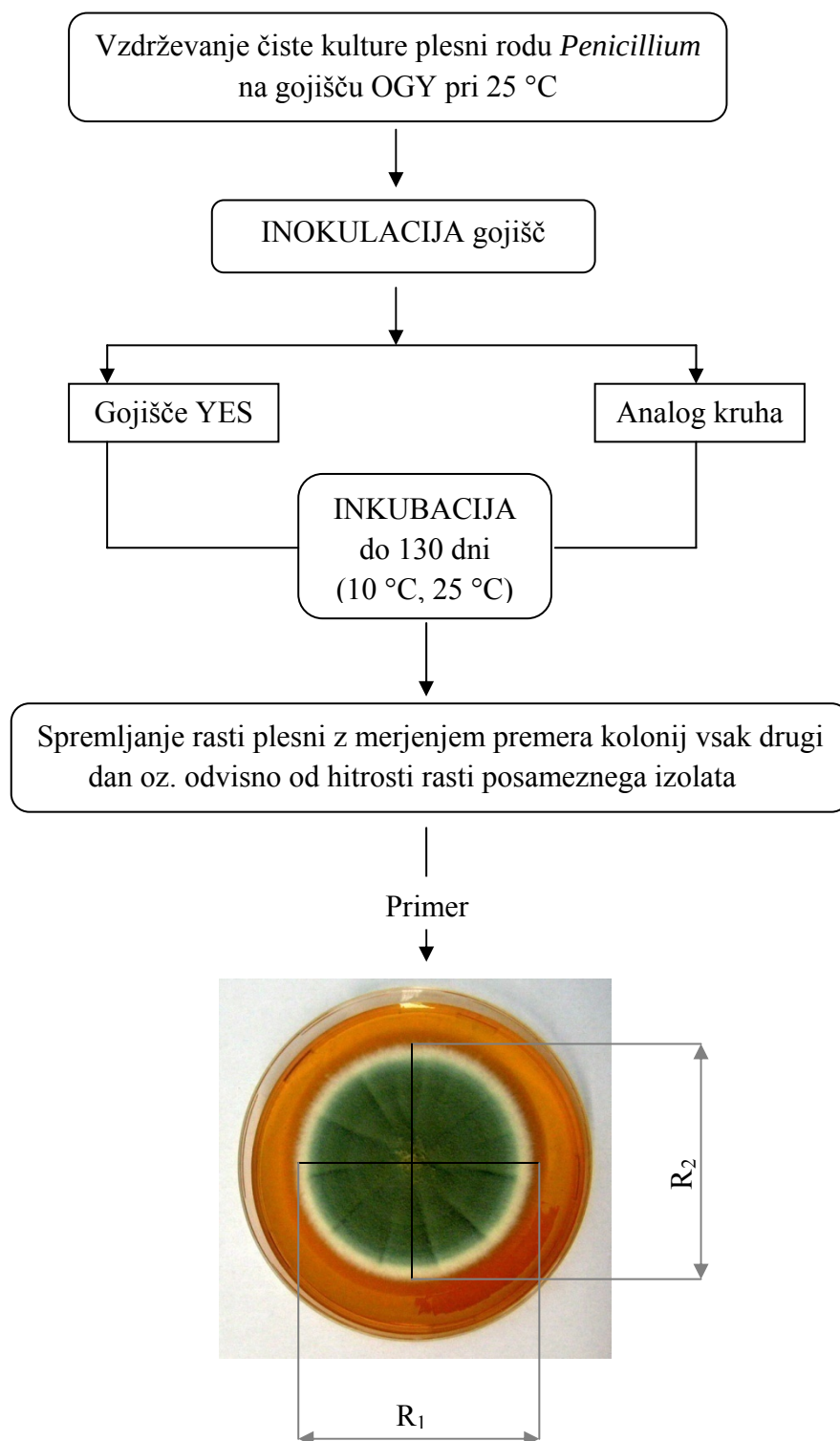
Iz podatkov o rasti plesni smo izračunali radialno hitrost rasti (mm dan^{-1}) z uporabo enačbe 3.1 (Arroyo in sod., 2005; Abellana in sod., 2001).

Radialno hitrost rasti smo podali kot povprečje radialnih hitrosti rasti v določenem časovnem obdobju spremljanja rasti plesni.

$$\text{Radialna hitrost rasti} = \frac{R_2 - R_1}{t_2 - t_1} \quad \dots(3.1)$$

Legenda: R_1 : premer kolonije v času n (mm); R_2 : premer kolonije v času $n+m$ (mm); t_1 : čas n (dan); t_2 : čas $n+m$ (dan); $n, m=0, 1, 2 \dots 130$

Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje le teh.



Slika 3-3: Shema spremljanja rasti plesni na različnih gojiščih

Legenda: OGY: gojišče oksitetraciklin kvasni ekstrakt; YES: gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo; R_1 , R_2 : premera kolonije

3.3.3 Določanje OTA

3.3.3.1 Uporabljen material

- Plesni vrste *P. verrucosum*
- Gojišče YES
- Centrifugirke (50 ml)
- Laboratorijska centrifuga z rotorji
- Epice (2 ml)
- Centrifuga za epice (Mini spin plus)
- Vakuumska črpalka (Univapo 100H)
- Tecan
- Digestorij
- Zaščitna mikrobiološka komora
- Avtomatske pipete
- Kloroform
- Metanol (50 %)
- Mikrotiterska plošča
- Skalpel
- Pinceta
- Etanol (96 %)
- Gaza

3.3.3.2 Izvedba metode

Uporabili smo spektrofotometrično metodo za določanje ohratoksina A, ki jo razvijajo na Katedri za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo.

Za eksperimente smo izbrali plesen vrste *P. verrucosum*, ki smo jo inokulirali na gojišče YES, kot priporočljivo gojišče za analizo sekundarnih metabolitov (Kokkonen in sod., 2005), pri izbranih okoljskih parametrih (preglednica 3-4).

Preglednica 3-4: Izbor okoljskih parametrov za proučevanje tvorbe OTA pri plesnih vrste *P. verrucosum*

Gojišče	Okoljski parameter		
	a_w	pH	T (°C)
YES	0,99	4,5	10
YES	0,99	4,5	25
YES	0,90	4,5	10
YES	0,90	4,5	25
YES	0,99	6,5	10
YES	0,99	6,5	25
YES	0,90	6,5	10
YES	0,90	6,5	25

Vzorčili smo po 7, 14, 21, 28, 35 in 42 dnevu inkubacije oz. še 49 in 56 dan pri gojišču z a_w 0,90 (slika 3-4). Delo je potekalo po sledečem zaporedju:

- Razrez gojišča z rastočo plesnijo na 8 približno enakih delov v zaščitni mikrobiološki komori.
- Prenos delov gojišča na gazo, ki smo jo predhodno ugnezdili v centrifugirko.
- Centrifugiranje pri 3000 min^{-1} , 6 minut.
- Ločitev supernatanta v epice in centrifugiranje le teh pri 14000 min^{-1} , 10 minut.
- 1 ml supernatanta + 1,1 ml kloroforma, mešanje z vrtnčnim mešalom in 30-90 minutno mirovanje v hladilniku do vzpostavitve dveh faz.
- Prenos faze s kloroformom (1 ml) v novo epico.
- Evaporiranje z vakuumsko črpalko 90 min.
- Dodatek 210 μl 50 % metanola in pomešanje z vrtnčnim mešalom.
- Prenos 200 μl v mikrotitrsko ploščo.
- Merjenje fluorescence pri 443 nm z napravo Tecan.
- Izračun koncentracije OTA (ng ml^{-1}) iz umeritvene krivulje (enačba 3.2).

Enačba umeritvene krivulje (Katedra za biotehnologijo):

$$y = 2,6817x + 146,72 \quad \dots(3.2)$$

Legenda: y: signal fluorescence; x: koncentracija OTA

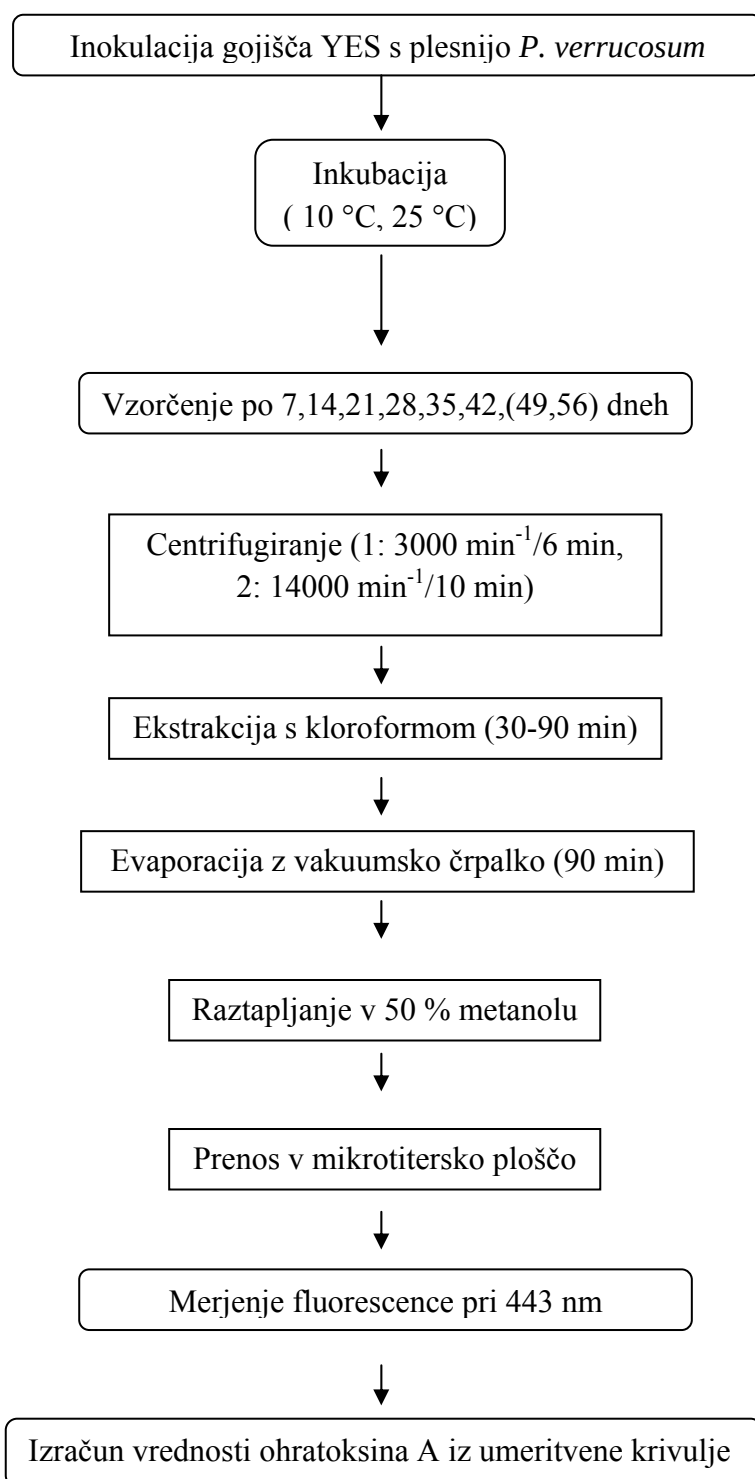
Pri izračunu koncentracije OTA (ng ml^{-1}) iz umeritvene krivulje smo upoštevali korekcijo dobljenega signala pri merjenju fluorescence. Pri postopku priprave vzorca prihaja do izgub OTA, in sicer pri ekstrakciji s kloroformom (korekcijski faktor k_1) in pri prenosu vzorca v mikrotitrsko ploščo (korekcijski faktor k_2). Koncentracijo OTA smo izračunali iz enačbe 3.3.

$$x = \frac{y \times k_1 \times k_2}{2,6817} \quad \dots(3.3)$$

$$k_1 = \frac{1100}{1000} = 1,1 \quad k_2 = \frac{210}{200} = 1,05$$

Legenda: x: koncentracija OTA; y: signal fluorescence; k_1 , k_2 : korekcijska faktorja

Vse poskuse smo izvajali v paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje le teh. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 3-4.



Slika 3-4: Shema določanja OTA s spektrofotometrično metodo

3.3.3.3 Izkoristek spektrofotometrične metode

Določili smo izkoristek spektrofotometrične metode, in sicer kot izkoristek celotne metode od priprave vzorca do merjenja fluorescence.

Za eksperiment smo uporabili gojišče YES z a_w 0,99 in pH 6,5 ter OTA s koncentracijo 1 ng/ml.

Pripravili smo gojišča YES z različnimi koncentracijami ohratoksina A:

1. 200 ng/ml
2. 1000 ng/ml
3. 1600 ng/ml

Eksperiment smo izvedli tako, da smo pripravili 50 ml gojišča YES, ki smo ga po sterilizaciji v avtoklavu približno 15 minut ohlajali pri sobni temperaturi in ga nato 1 uro vzdrževali v vodni kopeli pri temperaturi 60 °C. Po 10 ml gojišča smo s pipeto prenesli v tri centrifugirke in v prvo dodali 2 µg OTA /ml, dobro premešali na vrtničnem mešalu in gojišče razlili v petrijeve plošče premera 40 mm. V drugo centrifugirko z gojiščem smo dodali 10 µg OTA /ml in v tretjo 16 µg OTA /ml ter nadaljevali kot pri prvi. Gojišča z OTA smo hranili v hladilniku pri 10 °C 24 ur. Pripravo vzorca smo nadaljevali po enakem postopku kot je prikazan na sliki 3-4 in po merjenju fluorescence določili koncentracije OTA iz umeritvene krivulje (enačba 3.2).

Preglednica 3-5: Izkoristek spektrofotometrične metode

Koncentracija OTA v vzorcu (ng/ml)	Koncentracija OTA izračunana iz umeritvene krivulje (ng/ml)	Izkoristek metode %
200,00	152,04	76
1000,00	721,12	72
1600,00	1227,47	77
POVPREČJE	/	75

3.3.4 Statistična analiza

Izmerjene vrednosti smo vnesli v računalnik s programom Microsoft Excel 2000 in izračunali relativno hitrost rasti. S programskim paketom SAS/STAT (SAS Software, 1999) smo izračunali osnovne statistične parametre, kot so povprečje, standardni odklon, najmanjša in največja vrednost ter podatke za radialno hitrost rasti (RHR) statistično obdelali. Vplivi vrste seva (10 B, 19 B, 25 A, 9 C, PV), vrednosti pH (4,5 in 6,5), vodne aktivnosti (0,99 in 0,90), vrste gojišča (analog kruha, YES) in temperature inkubacije (10°C in 25 °C) na RHR so bili analizirani s postopkom PROC GLM (General linear models). Povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z Duncanovim testom in so bile primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

Predpostavili smo, da okoljski parametri različno vplivajo na rast plesni rodu *Penicillium* in tvorbo ohratoksina A. Za spremljanje rasti plesni smo uporabili klasično mikrobiološko gojitveno metodo, pri kateri smo spremljali premer kolonije plesni na trdnem gojišču (YES, analog kruha).

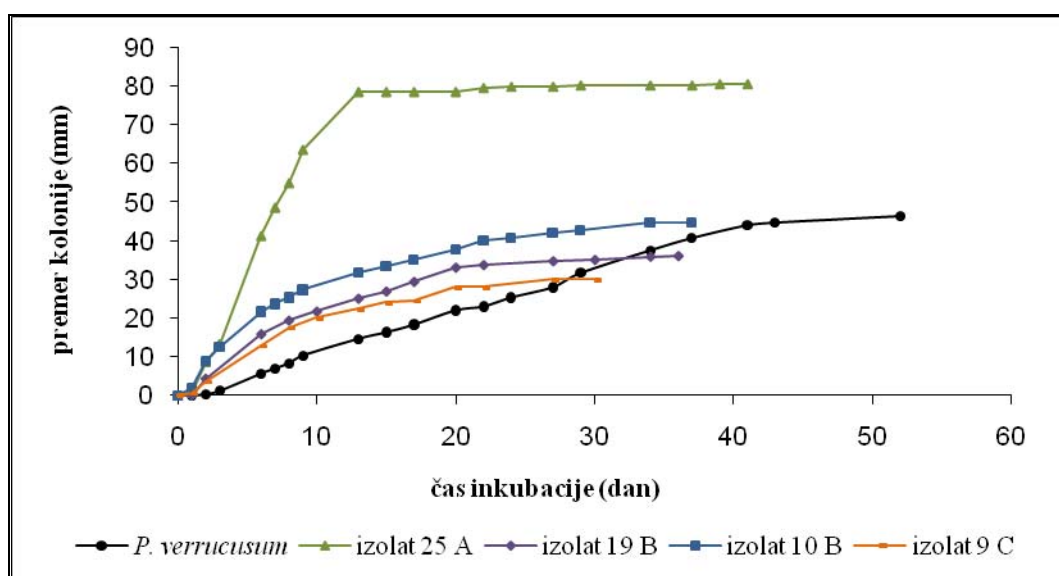
V prvem delu poskusa smo spremljali rast in izračunali radialno hitrost rasti 5 izolatov plesni rodu *Penicillium* pri različnih okoljskih parametrih (pH, a_w , temperatura, gojišče). Plesni vrste *P. verrucosum* smo izbrali kot primerjalno plesen za katero je značilna tvorba ohratoksina A.

Vpliv okoljskih parametrov na tvorbo ohratoksina A smo nato določili pri plesni vrste *P. verrucosum*. Za kvantitativno določanje ohratoksina A smo uporabili spektrofotometrično metodo.

4.1 SPREMLJANJE RASTI PLESNI RODU *Penicillium* NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH

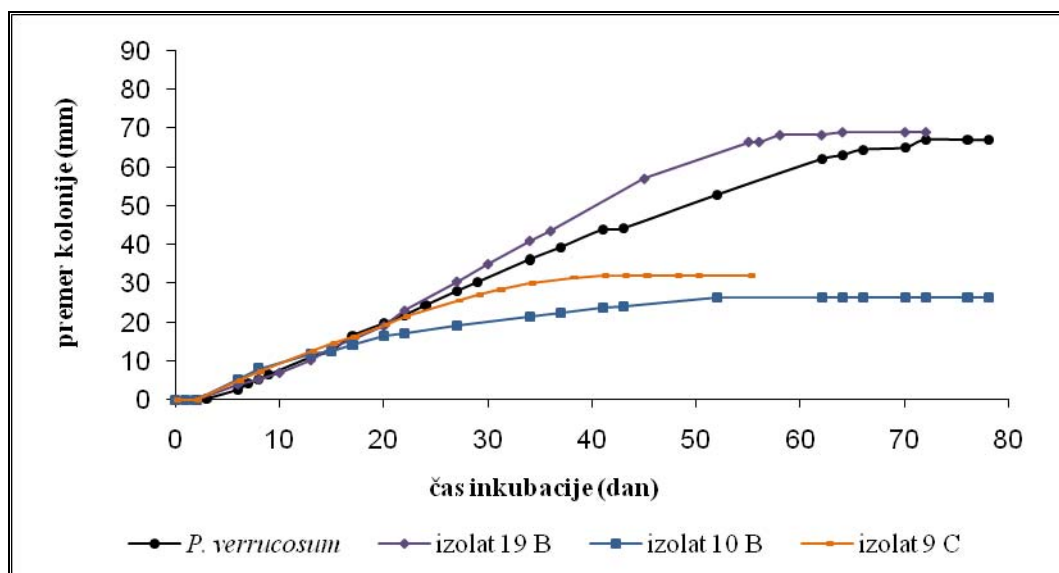
4.1.1 Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri 25 °C

Rast petih izolatov plesni rodu *Penicillium* smo spremljali na trdnem gojišču YES z različno vrednostjo pH (4,5 in 6,5) in termodinamsko aktivnostjo vode (0,90 in 0,99) pri temperaturi inkubacije 25 °C.



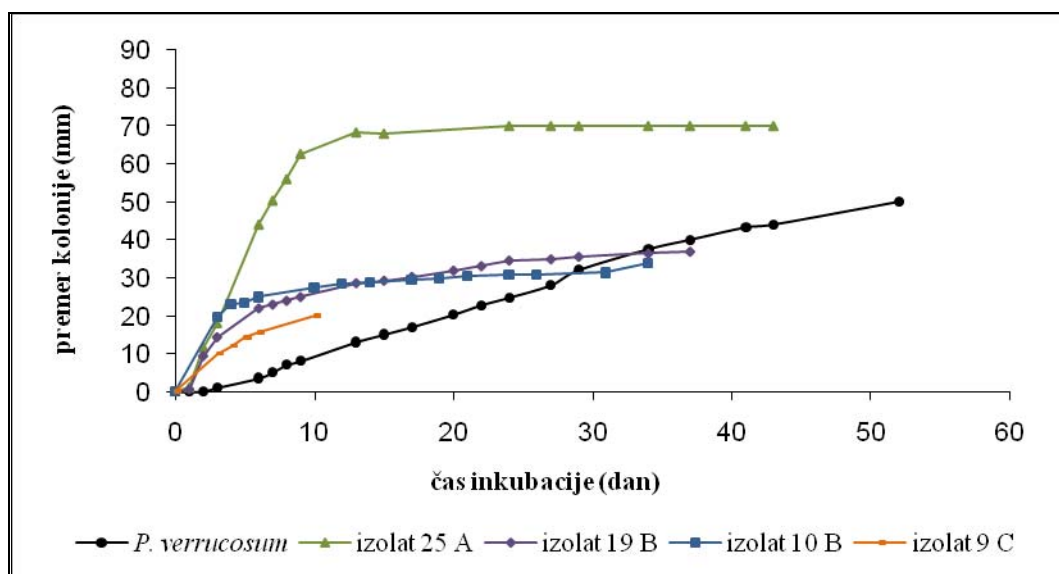
Slika 4-1: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 in 25 °C

Iz slike 4-1 je razvidno, da so na gojišču YES s pH 6,5 in a_w 0,99 rastli vsi izolati. Gojišče je predstavljalo najbolj optimalne razmere za rast izolata 25 A, ki so mu sledili izolati 10 B, 19 B, 9 C in plesni vrste *P. verrucosum*. Primerjava rasti izolatov je pokazala, da so se razlike v rasti pojavile po približno 3 dneh inkubacije.



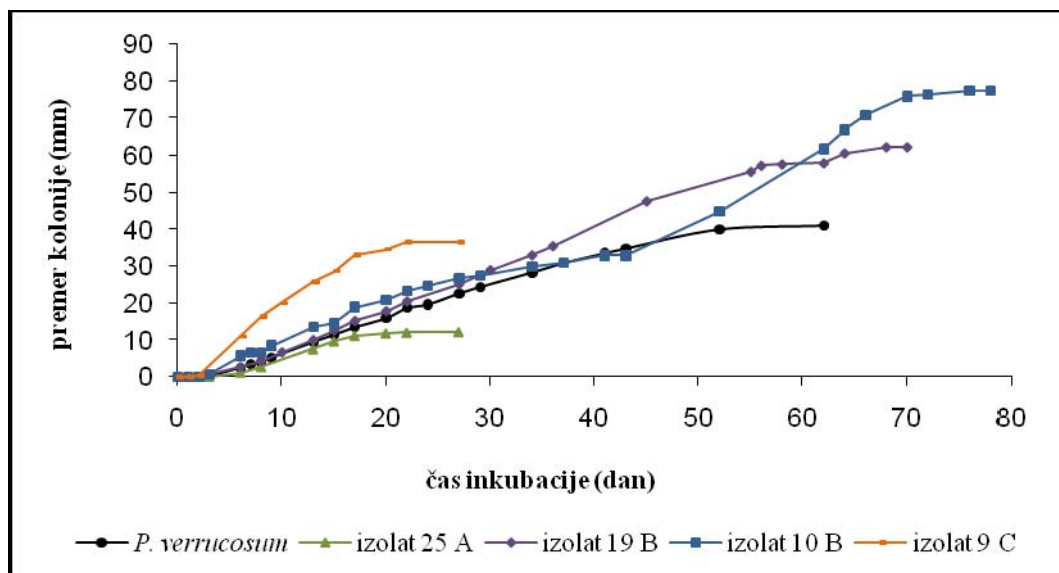
Slika 4-2: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,90 in 25 °C

Iz slike 4-2 je razvidno, da na gojišču YES s pH 6,5 in a_w 0,90 ni rasel izolat 25 A, medtem ko najbolje rasel izolat 19 B, ki so mu sledile plesni vrste *P. verrucosum*, izolat 9 C in izolat 10 B. Rast izolatov je bila v primerjavi z a_w 0,99 (slika 4-1) počasnejša in čas spremljanja rasti daljši. Primerjava rasti izolatov je pokazala, da so se bolj očitne razlike v rasti pojavile šele po približno 20 dnevni inkubaciji.



Slika 4-3: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,99 in 25 °C

Iz slike 4-3 je razvidno, da so na gojišču YES s pH 4,5 in a_w 0,99 rastli vsi izolati. Gojišče je predstavljalo najbolj optimalne razmere za rast izolata 25 A, ki so mu sledili izolati 10 B, 19 B, 9 C in plesni vrste *P. verrucosum*. Ugotovili smo, da so izolati 25 A, 19 B, 10 B in 9 C pričeli rasti prej pri pH 4,5 kot pri 6,5 (slika 4-1).



Slika 4-4: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,90 in 25 °C

Iz slike 4-4 je razvidno, da so na gojišču YES s pH 4,5 in a_w 0,90 rastli vsi izolati. Na gojišču je najbolj rasel izolat 9 C, ki so mu sledili izolati 10 B, 19 B, plesni vrste *P.*

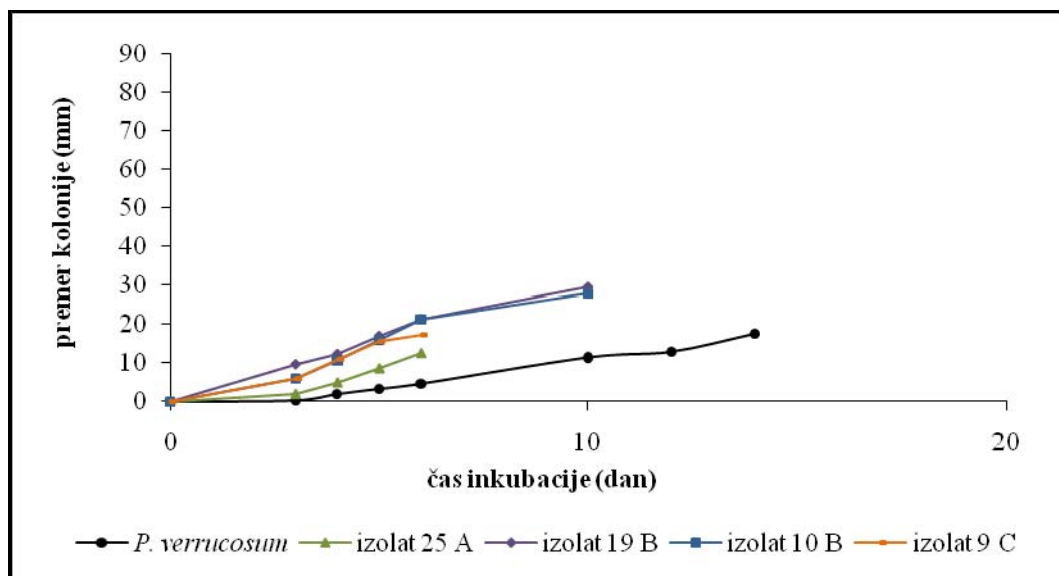
verrucosum ter izolat 25 A. V primerjavi z rastjo na gojišču z a_w 0,99 (slika 4-3) je imelo znižanje a_w najvidnejši vpliv na rast izolata 25 A, ki je bila bistveno upočasnjena. Prav tako je bila na gojišču z znižano a_w upočasnjena rast izolata 19 B, 10 B, 9 C in plesni vrste *P. verrucosum*.

4.1.2 Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri 25 °C

Rast plesni rodu *Penicillium* smo spremljali na analogu kruha z vrednostjo a_w 0,99 in z različno vrednostjo pH: 4,5, 5,9 in 6,5, pri temperaturi inkubacije 25 °C.

Analog kruha je trdno gojišče, ki simulira okoljske razmere pravega kruha. Spremljanje rasti je bilo v primerjavi s spremljanjem rasti na gojišču YES časovno krajše in večkrat onemogočeno, zaradi razrasti plesni v večjem številu kolonij. Sklepamo, da plesen na analogu kruha dozori hitreje, vendar je potrebno upoštevati dejstvo, da proizvodnja spor ni vedno natančno merilo rasti plesni, ampak označuje sposobnost sporulacije (Magan in Aldred, 2007).

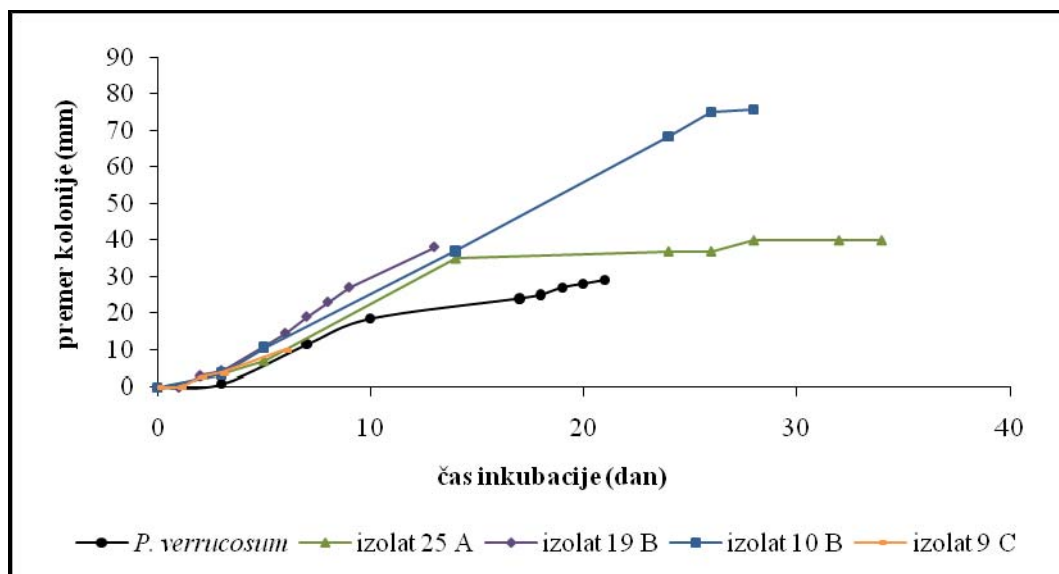
- 4,5 pH



Slika 4-5: Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri pH 4,5, a_w 0,99 in 25 °C

Iz slike 4-5 je razvidno, da so na analogu kruha z a_w 0,99 in pH 4,5 rastli vsi izolati. Izolat 19 B, 10 B in 9 C so razmere gojišča ustrezale bolj kot izolat 25 A in plesni vrste *P. verrucosum*. Slednje so rastle v primerjavi z ostalimi izolati najpočasneje, zato je bilo spremljanje njihove rasti nekoliko daljše.

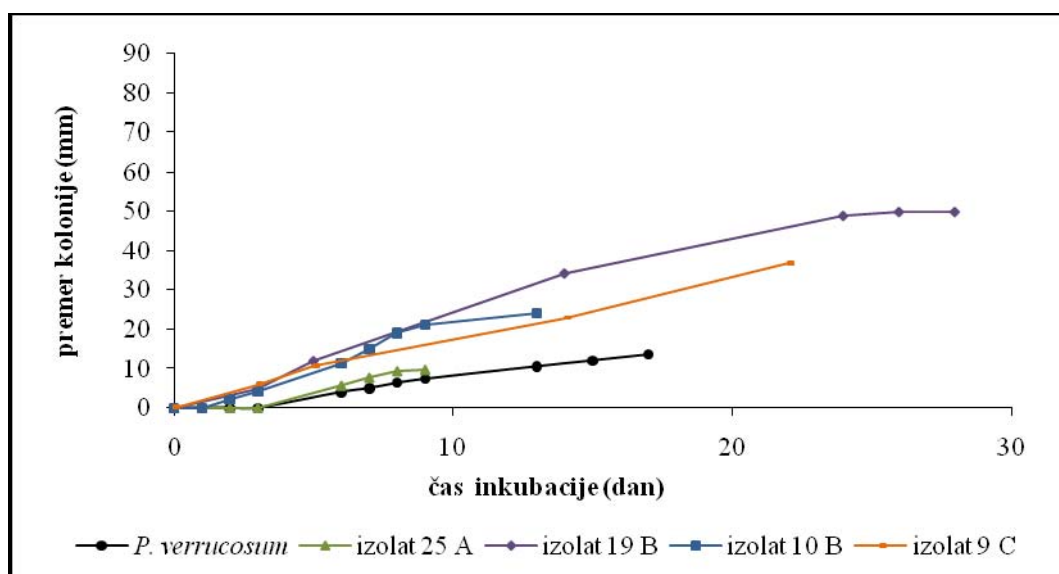
- 5,9



Slika 4-6: Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri pH 5,9, a_w 0,99 in 25 °C

Iz slike 4-6 je razvidno, da so na analogu kruha z a_w 0,99 in pH 5,9 rastli vsi izolati. S primerjavo rezultatov (slika 4-5) smo ugotovili, da je bilo spremljanje rasti plesni na gojišču s pH 5,9, z izjemo izolata 9 C, daljše ter premer njihovih kolonij večji. Razmere gojišča so bile v primerjavi z ostalimi izolati najmanj ugodne za rast plesni vrste *P. verrucosum*.

- pH 6,5

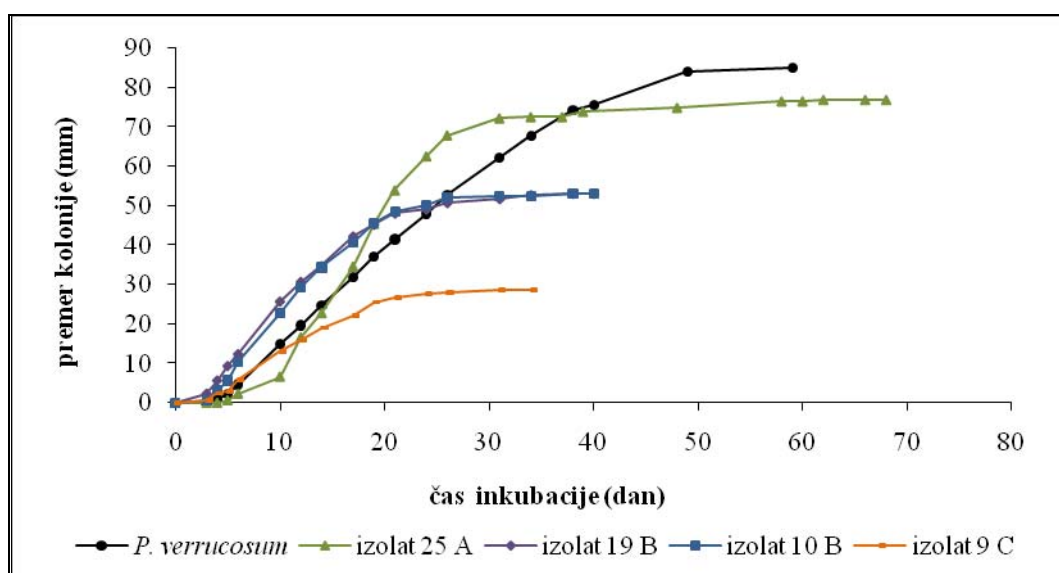


Slika 4-7: Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri pH 6,5, a_w 0,99 in 25 °C

Iz slike 4-7 je razvidno, da so na analogu kruha z a_w 0,99 in pH 6,5 rastli vsi izbrani izolati. Razlike v njihovi rasti so bile vidnejše po 3 dneh inkubacije. Na gojišču so bolje rastli izolati 19 B, 10 B in 9 C v primerjavi z izolatom 25 A in plesnimi vrste *P. verrucosum*. Za slednjo so bile razmere gojišča v primerjavi z ostalimi izolati najmanj ugodne.

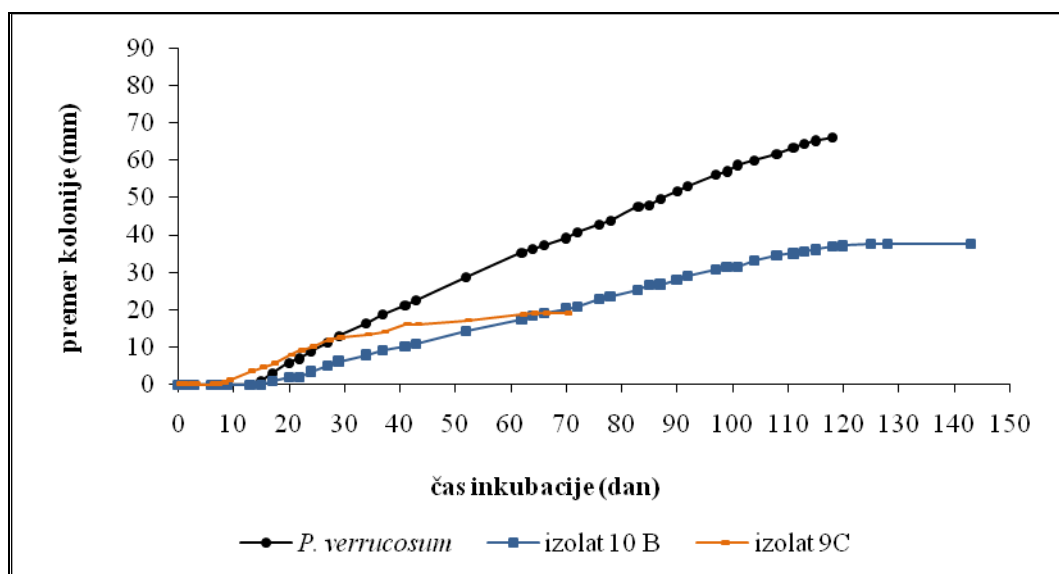
4.1.3 Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri 10 °C

Rast plesni rodu *Penicillium* smo spremljali na trdnem gojišču YES z različno vrednostjo pH (4,5 in 6,5) in termodinamsko aktivnostjo vode (0,90 in 0,99) pri temperaturi inkubacije 10 °C.



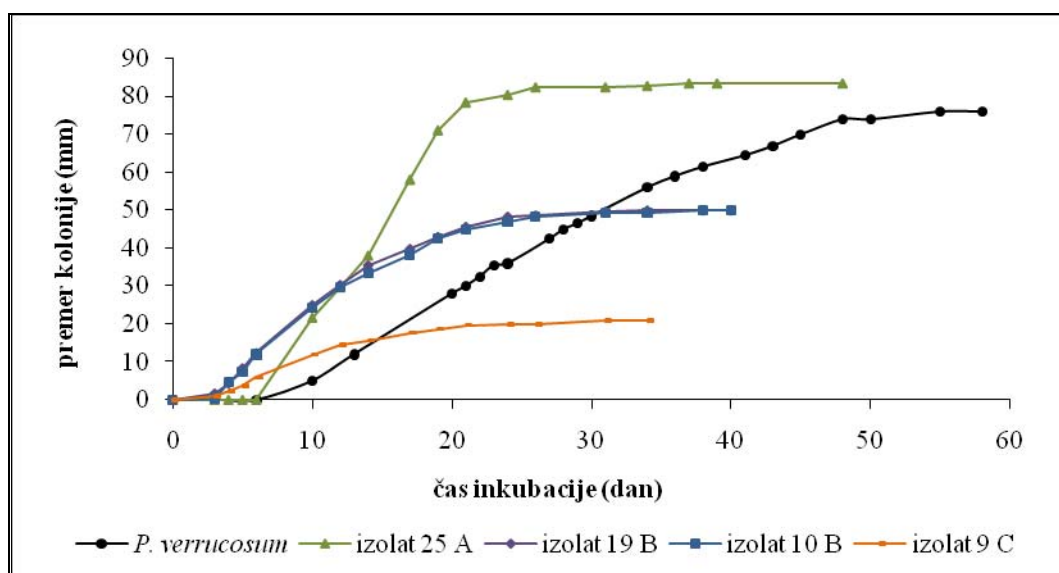
Slika 4-8: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 in 10 °C

Iz slike 4-8 je razvidno, da so na gojišču YES s pH 6,5 in a_w 0,99 rastli vsi izolati. Na gojišču sta najbolje rastla izolata 19 B in 10 B, sledile pa so jima plesni vrste *P. verrucosum* ter izolata 25 A in 9 C. Ugotovili smo, da se rast med izolati ni bistveno razlikovala, z izjemo izolata 9 C, ki je v primerjavi z ostalimi rastel nekoliko počasneje.



Slika 4-9: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,90 in 10 °C

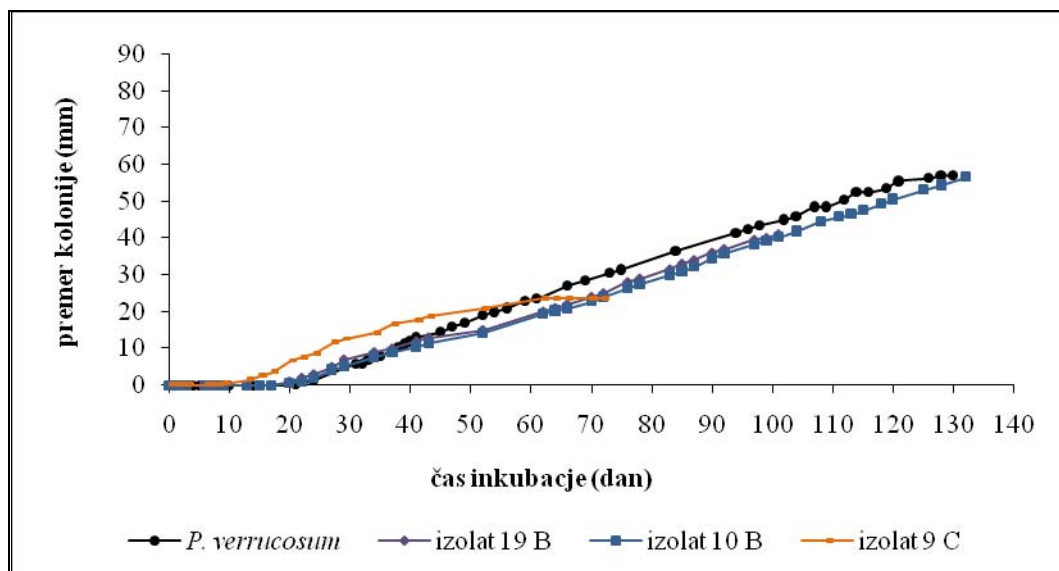
Iz slike 4-9 je razvidno, da so na gojišču YES s pH 6,5 in a_w 0,90 rastli trije izolati. Na gojišču nista rastla izolata 25 A in 19 B. S primerjavo rezultatov (sliki 4-8 in 4-9) smo ugotovili, da je bil glavni parameter, ki je zavrl njuno rast znižanje a_w , medtem ko je bila rast ostalih izolatov bistveno upočasnjena.



Slika 4-10: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,99 in 10 °C

Iz slike 4-10 je razvidno, da so na gojišču YES s pH 4,5 in a_w 0,99 rastli vsi izolati. Gojišče je bilo najbolj ugodno za rast izolata 25 A in najmanj za izolat 9 C. Izolat 25 A je pričel

rasti sicer kasneje kot izolata 19 B in 10 B, ki sta mu sledila ter prav tako plesni vrste *P. verrucosum* v primerjavi z izolatom 9 C.



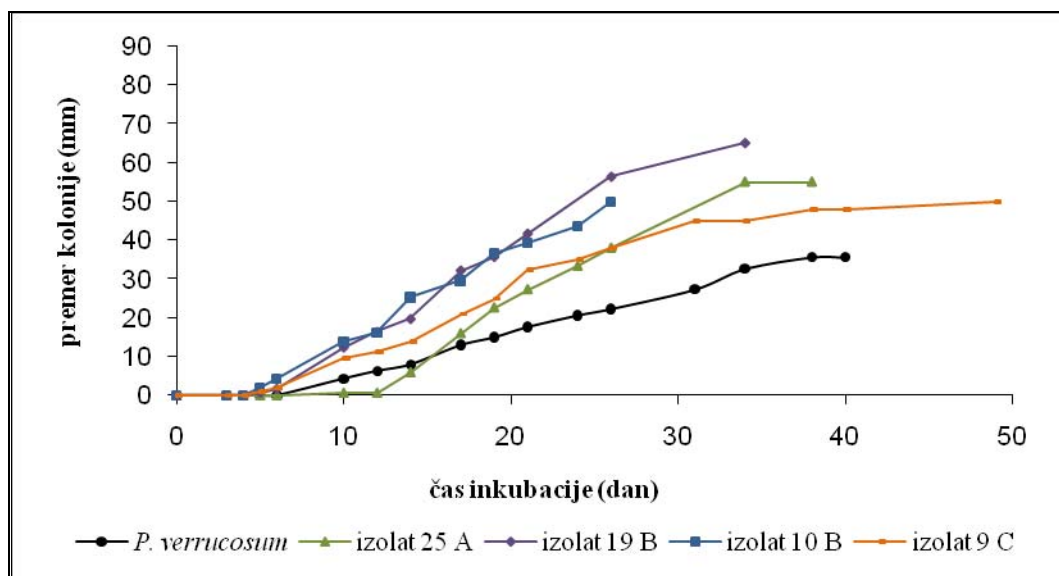
Slika 4-11: Rast izolatov rodu *Penicillium* na gojišču YES pri pH 4,5, a_w 0,90 in 10 °C

Iz slike 4-11 je razvidno, da na gojišču YES s pH 4,5 in a_w 0,90 ni rasel izolat 25 A, medtem ko so rastli ostali izolati precej podobno. V primerjavi z rastjo na gojišču z a_w 0,99 (slika 4-10) je imela nižja a_w najmanjši vpliv na rast izolata 9 C, rast ostalih izolatov pa je bila upočasnjena in spremljanje rasti daljše.

4.1.4 Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri 10 °C

Rast plesni rodu *Penicillium* smo spremljali na analogu kruha z vrednostjo a_w 0,99 in z različno vrednostjo pH 4,5, 5,9 in 6,5 pri temperaturi inkubacije 10 °C.

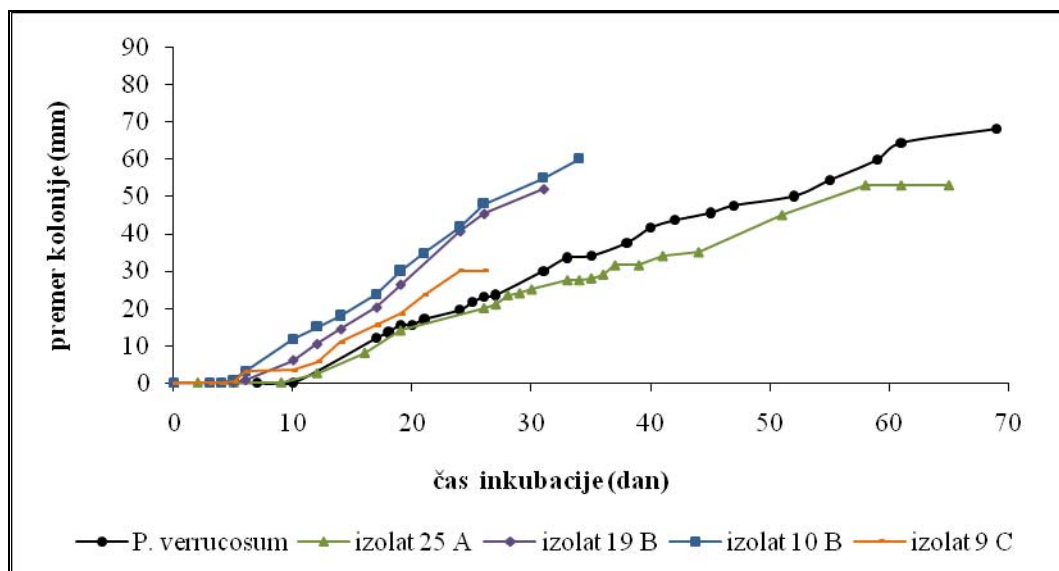
- pH 4,5



Slika 4-12: Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri pH 4,5, a_w 0,99 in 10 °C

Iz slike 4-12 je razvidno, da so na analogu kruha z a_w 0,99 in pH 4,5 rastli vsi izbrani izolati. Gojišče je bilo najbolj ugodno za rast izolata 10 B, ki so mu sledili izolati 19 B, 25 A, 9 C in plesni vrste *P. verrucosum*. V primerjavi z ostalimi izolati je pričel rasti najkasneje izolat 25 A, vendar njegova rast ni bila najpočasnejša.

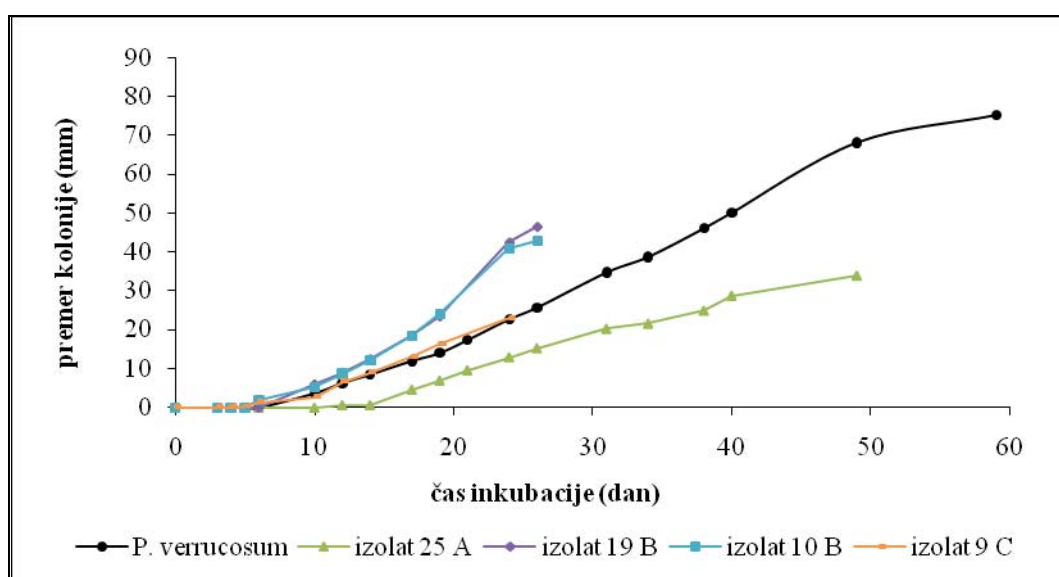
- pH 5,9



Slika 4-13: Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri pH 5,9, a_w 0,99 in 10 °C

Iz slike 4-13 je razvidno, da so analogu kruha z a_w 0,99 in pH 5,9 rastli vsi izolati. Razmere gojišča so najbolj ustrezale izolatoma 10 B in 19 B, ki jima je sledil izolat 9 C, plesni vrste *P. verrucosum* in izolat 25 A. Izolat 25 A in plesni vrste *P. verrucosum* so pričele rasti kasneje v primerjavi z ostalimi izolati, spremljanje njune rasti je bilo časovno daljše.

- pH 6,5



Slika 4-14: Rast izolatov rodu *Penicillium* na analogu kruha pri pH 6,5, a_w 0,99 in 10 °C

Iz slike 4-14 je razvidno, da so na analogu kruha z a_w 0,99 in pH 6,5 rastli vsi izolati. Gojišče je bilo najbolj ugodno za rast izolata 19 B, ki so mu sledili izolati 10 B, 9 C in plesni vrste *P. verrucosum* ter izolat 25 A. Izolat 25 A in plesni vrste *P. verrucosum* so pričele rasti kasneje v primerjavi z ostalimi izolati, spremljanje njune rasti je bilo časovno daljše.

4.2 VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA POVPREČNO RADIALNO HITROSRT RASTI PLESNI RODU *Penicillium*

Radialne hitrosti rasti (RHR) posameznega izolata pri preizkušanih okoljskih parametrih smo izračunali po enačbi 3.1 in jih predstavili v preglednicah 4-1 do 4-5 kot povprečne radialne hitrosti rasti pri določenih okoljskih parametrih.

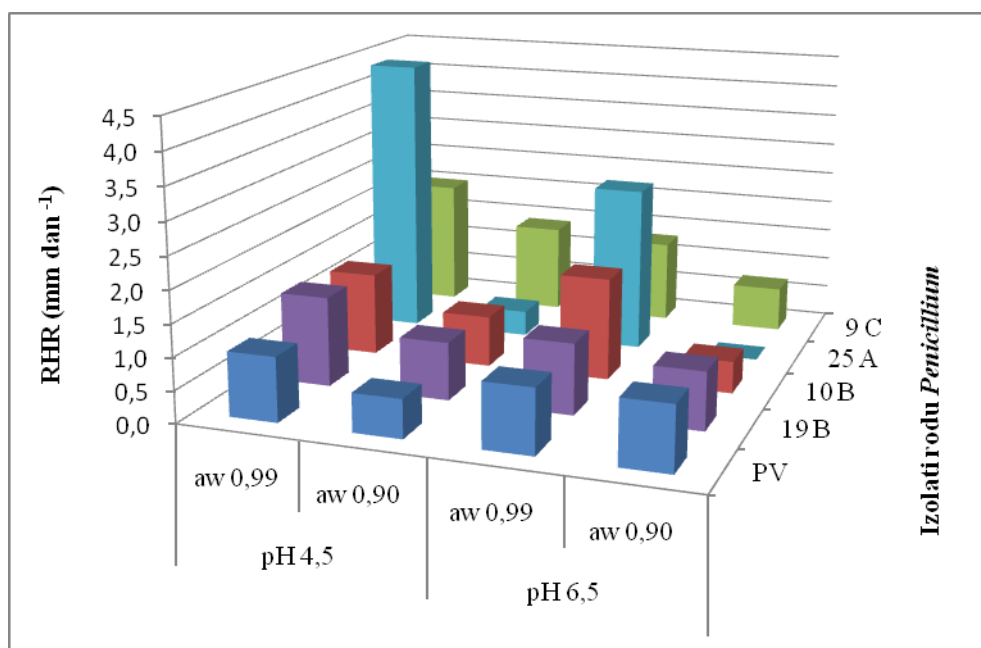
4.2.1 Vpliv vrste izolata plesni rodu *Penicillium*

Na povprečno relativno hitrost rasti (RHR) vpliva vrsta izolata oz. RHR je različna za različne izolate plesni rodu *Penicillium* (preglednica 4-1). Pri 10 °C je najhitreje rasel izolat 19 B pri vseh okoljskih parametrih, razen na gojišču YES z a_w 0,90 in pH 6,5, ko je najhitreje rasel izolat *P. verrucosum*. Pri 25 °C je najhitreje rasel na analogu kruha izolat 19 B, na gojišču YES pa pri a_w 0,99 izolat 25 A. Na gojišču YES z a_w 0,90 je najhitreje rasel izolat 9C pri pH 4,5 in izolat *P. verrucosum* pri pH 6,5.

Preglednica 4-1: Vpliv vrste izolata plesni rodu *Penicillium* na povprečno RHR

Okoljski parametri				RHR izolata rodu <i>Penicillium</i> (mm dan ⁻¹)					p vrednost
T (°C)	Gojišče	a_w	pH	10B	19B	25A	9C	PV	
10	Analog kruha	0,99	4,5	1,9 ^a	1,8 ^{ab}	1,3 ^{abc}	1,2 ^{bc}	0,8 ^c	***
			6,5	1,6 ^a	1,8 ^a	0,7 ^a	1,0 ^b	1,0 ^b	***
	YES	0,90	4,5	0,4 ^{ab}	0,4 ^{ab}	0,0 ^c	0,3 ^b	0,4 ^a	***
			6,5	0,3 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,3 ^b	0,5 ^a	***
		0,99	4,5	1,7 ^a	1,7 ^a	1,9 ^a	0,9 ^b	1,4 ^{ab}	*
			6,5	1,7 ^a	1,6 ^a	1,5 ^a	1,0 ^a	1,8 ^a	nz
	Analog kruha	0,99	4,5	3,9 ^a	3,5 ^{ab}	2,8 ^b	3,3 ^{ab}	1,3 ^c	***
			6,5	1,8 ^a	2,1 ^a	1,0 ^b	2,0 ^a	0,7 ^b	***
25	YES	0,90	4,5	0,8 ^b	0,9 ^b	0,4 ^c	1,4 ^a	0,6 ^{bc}	***
			6,5	0,5 ^b	0,9 ^a	0,0 ^c	0,7 ^{ab}	1,0 ^a	***
		0,99	4,5	1,3 ^b	1,4 ^b	4,4 ^a	2,0 ^b	1,0 ^b	***
			6,5	1,6 ^b	1,1 ^b	2,6 ^a	1,3 ^b	1,0 ^b	***
	Analog kruha	0,99	4,5	3,9 ^a	3,5 ^{ab}	2,8 ^b	3,3 ^{ab}	1,3 ^c	***
			6,5	1,8 ^a	2,1 ^a	1,0 ^b	2,0 ^a	0,7 ^b	***

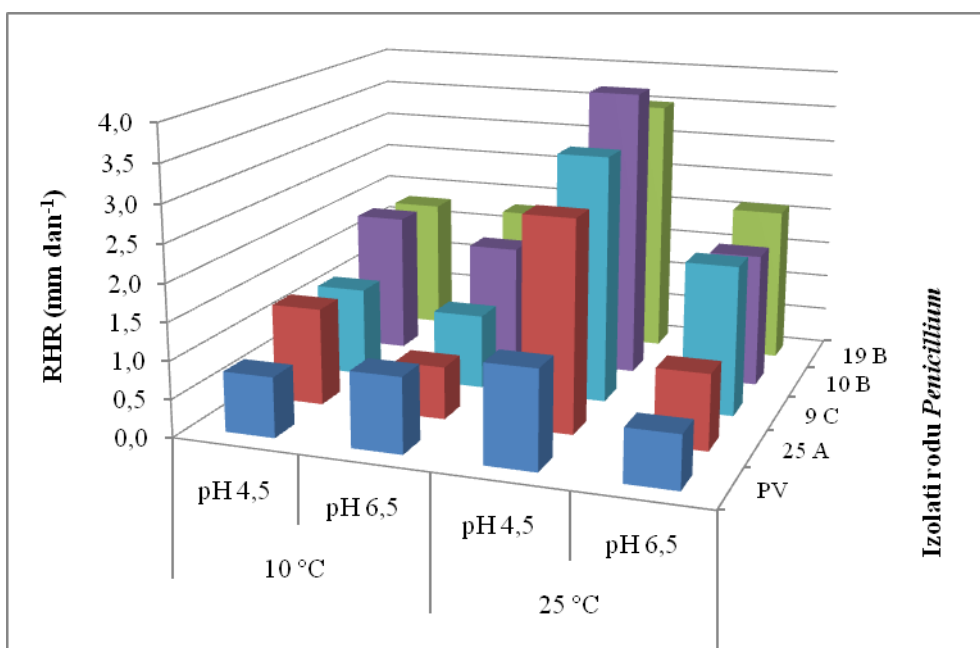
Legenda: Izolati z enako črko v skupini se med seboj statistično ne razlikujejo; ***: $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; **: $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; *: $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz: neznačilen vpliv; RHR: radialna hitrost rasti (mm dan⁻¹); PV: *Penicillium verrucosum*



Legenda: RHR: radialna hitrost rasti (mm dan^{-1}); PV: *Penicillium verrucosum*

Slika 4-15: Vpliv vrste izolata plesni rodu *Penicillium* na povprečno RHR na gojiščih YES pri 25 °C

Analiza eksperimentalnih rezultatov je pokazala, da je imela vrsta izolata plesni rodu *Penicillium* nekoliko večji vpliv na povprečno RHR na gojišču YES pri 25 °C kot pri 10 °C. Iz slike 4-15 je razvidno, da je na gojišču YES z a_w 0,99 pri 25 °C najhitreje rasel izolat 25 A pri pH 4,5 in 6,5. Na gojišču YES z a_w 0,90 pa je najhitreje rasel izolat 9 C pri pH 4,5 ter izolat PV pri pH 6,5.



Legenda: RHR: radialna hitrost rasti (mm dan⁻¹); PV: *Penicillium verrucosum*

Slika 4-16: Vpliv vrste izolata plesni rodu *Penicillium* na povprečno RHR na analogu kruha z a_w 0,99

Vrsta izolata plesni rodu *Penicillium* je prav tako vplivala na RHR izolatov na analogu kruha z a_w 0,99 pri obeh temperaturah. Iz slike 4-16 je razvidno, da je izolat 10 B najhitreje rasel na analogu kruha s pH 4,5 pri 25 ° in 10 °C. Izolat 19 B pa je rasel najhitreje na analogu kruha s pH 6,5 pri obeh temperaturah.

4.2.2 Vpliv a_w

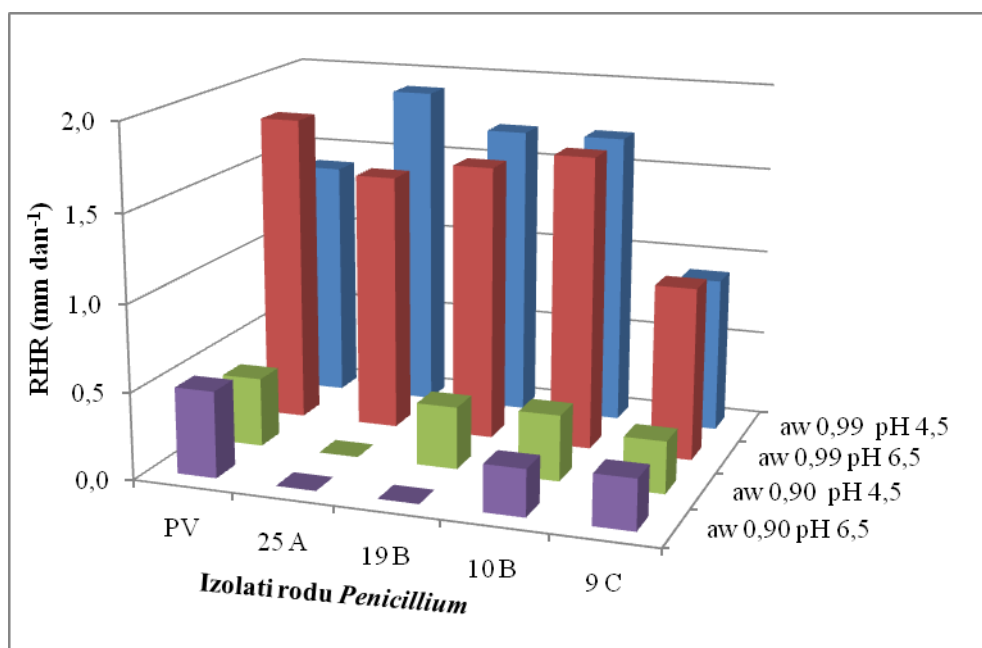
Povprečna radialna hitrost rasti (RHR) je bila odvisna od a_w gojišča in v splošnem je RHR za vse izolate rodu *Penicillium* večja pri 0,99 kot pri 0,90 ne glede na temperaturo inkubacije, vrsto gojišča in vrednost pH (preglednica 4-2).

Preglednica 4-2: Vpliv a_w gojišča na povprečno RHR plesni rodu *Penicillium*

Okoljski parametri			Izolat	RHR (mm dan ⁻¹)		p vrednost
T (°C)	Gojišče	pH		a _w		
				0,90	0,99	
10	YES	4,5	10 B	0,4	1,7	***
			19 B	0,4	1,7	***
			25 A	0,0	1,9	***
			9 C	0,3	0,9	***
			PV	0,4	1,4	***
		6,5	10 B	0,3	1,7	***
			19 B	0,0	1,6	***
			25 A	0,0	1,5	***
			9 C	0,3	1,0	***
			PV	0,5	1,8	***
25	YES	4,5	10 B	0,8	1,3	nz
			19 B	0,9	1,4	*
			25 A	0,4	4,4	***
			9 C	1,4	2,0	*
			PV	0,6	1,0	***
		6,5	10 B	0,5	1,6	***
			19 B	0,9	1,1	nz
			25 A	0,0	2,6	***
			9 C	0,7	1,3	**
			PV	1,0	1,0	nz

Legenda: ***: $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; **: $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; *: $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz: neznačilen vpliv; RHR: radialna hitrost rasti (mm dan⁻¹); PV: *Penicillium verrucosum*

S primerjavo rezultatov smo ugotovili, da je imela a_w v kombinaciji z vsemi ostalimi okoljskimi parametri nekoliko večji vpliv na RHR izolatov rodu *Penicillium* pri 10 °C kot pri 25 °C. Vpliv a_w gojišča YES na RHR izolatov pri 10 °C je prikazan na sliki 4-17.



Legenda: RHR: radialna hitrost rasti (mm dan^{-1}); PV: *Penicillium verrucosum*

Slika 4-17: Vpliv a_w gojišča YES na povprečno RHR plesni rodu *Penicillium* pri 10 °C

Iz slike 4-17 je razvidno, da pri 10 °C na gojišču YES z a_w 0,90 ni rasel izolat 25 A pri pH 4,5 in 6,5 ter izolat 19 B pri pH 6,5. RHR ostalih izolatov je bila pri nižji a_w bistveno manjša.

4.2.3 Vpliv temperature

Povprečna radialna hitrost rasti (RHR) je bila odvisna od temperature inkubacije in v splošnem je RHR za vse izolate rodu *Penicillium* večja pri 25 °C kot pri 10 °C, ne glede na vrsto gojišča ter njegovo a_w in pH (preglednica 4-3). V dveh primerih je pri 10 °C hitreje rasel izolat *P. verrucosum*, in sicer na gojišču YES pri a_w 0,99 pri pH 4,5 in pH 6,5.

Preglednica 4-3: Vpliv temperature na povprečno RHR plesni rodu *Penicillium*

Okoljski parametri			Izolat	RHR (mm dan ⁻¹)		p vrednost
Gojišče	a _w	pH		T (°C)		
				10	25	
Analog kruha	0,99	4,5	10 B	1,9	3,9	***
			19 B	1,8	3,5	***
			25 A	1,3	2,8	**
			9 C	1,2	3,3	***
			PV	0,8	1,3	**
		6,5	10 B	1,6	1,8	nz
			19 B	1,8	2,1	nz
			25 A	0,7	1,0	nz
			9 C	1,0	2,0	**
			PV	1,0	0,7	nz
YES	0,9	4,5	10 B	0,4	0,8	***
			19 B	0,4	0,9	***
			25 A	0,0	0,4	***
			9 C	0,3	1,4	***
			PV	0,4	0,6	*
		6,5	10 B	0,3	0,5	**
			19 B	0,0	0,9	***
			25 A	0,0	0,0	-
			9 C	0,3	0,7	***
			PV	0,5	1,0	***
	0,99	4,5	10 B	1,7	1,3	nz
			19 B	1,7	1,4	nz
			25 A	1,9	4,4	***
			9 C	0,9	2,0	***
			PV	1,4	1,0	*
		6,5	10 B	1,7	1,6	nz
			19 B	1,6	1,1	nz
			25 A	1,5	2,6	*
			9 C	1,0	1,3	nz
			PV	1,8	1,0	***

Legenda: ***: $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; **: $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; *: $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz: neznačilen vpliv; RHR: radialna hitrost rasti (mm dan⁻¹); PV: *Penicillium verrucosum*

4.2.4 Vpliv pH

Povprečna radialna hitrost rasti (RHR) je bila le deloma odvisna od pH gojišča (preglednica 4-4), saj so izolati rodu *Penicillium* hitreje rasli pri pH 4,5 kot pri pH 6,5 le v nekaterih kombinacijah okoljskih parametrov (na primer na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C so vsi izolati rasli hitreje pri pH 4,5).

Preglednica 4-4: Vpliv pH na povprečno RHR plesni rodu *Penicillium*

Okoljski parametri			Izolat	RHR (mm dan ⁻¹)		p vrednost
T (°C)	Gojišče	a _w		pH		
				4,5	6,5	
10	Analog kruha	0,99	10 B	1,9	1,6	nz
			19 B	1,8	1,8	nz
			25 A	1,3	0,7	*
			9 C	1,2	1,0	nz
			PV	0,8	1,0	nz
	YES	0,90	10 B	0,4	0,3	**
			19 B	0,4	0,0	***
			25 A	0,0	0,0	-
			9 C	0,3	0,3	nz
			PV	0,4	0,5	nz
		0,99	10 B	1,7	1,7	nz
			19 B	1,7	1,6	nz
			25 A	1,9	1,5	nz
			9 C	0,9	1,0	nz
			PV	1,4	1,8	nz
25	Analog kruha	0,99	10 B	3,9	1,8	***
			19 B	3,5	2,1	**
			25 A	2,8	1,0	***
			9 C	3,3	2,0	*
			PV	1,3	0,7	**
	YES	0,90	10 B	0,8	0,5	nz
			19 B	0,9	0,9	nz
			25 A	0,4	0,0	***
			9 C	1,4	0,7	**
			PV	0,6	1,0	**
		0,99	10 B	1,3	1,6	nz
			19 B	1,4	1,1	nz
			25 A	4,4	2,6	*
			9 C	2,0	1,3	*
			PV	1,0	1,0	nz

Legenda: ***: $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; **: $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; *: $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz: neznačilen vpliv; RHR: radialna hitrost rasti (mm dan⁻¹); PV: *Penicillium verrucosum*

4.2.5 Vpliv vrste gojišča

Vpliv vrste gojišča na povprečno radialno hitrost rasti (RHR) plesni rodu *Penicillium* smo določili pri a_w 0,99 (preglednica 4-5). V splošnem je bila RHR odvisna od kombinacije okoljskih parametrov in vrste izolata.

Pri 10 °C je izolat *P. verrucosum* rasel hitreje na gojišču YES kot na analogu kruha, izolat 25 A pa le pri pH 4,5. Drugi izolati so imeli pri 10 °C ne glede na pH podobno RHR.

Pri 25 °C so hitreje rasli izolati 10 B, 19 B in 9 C na analogu kruha pri pH 4,5 in pri pH 6,5 izolat 19 B. Na gojišču YES pri 25 °C in pH 6,5 sta hitreje rasla izolata 25 A in *P. verrucosum*.

Preglednica 4-5: Vpliv gojišča na povprečno RHR plesni rodu *Penicillium*

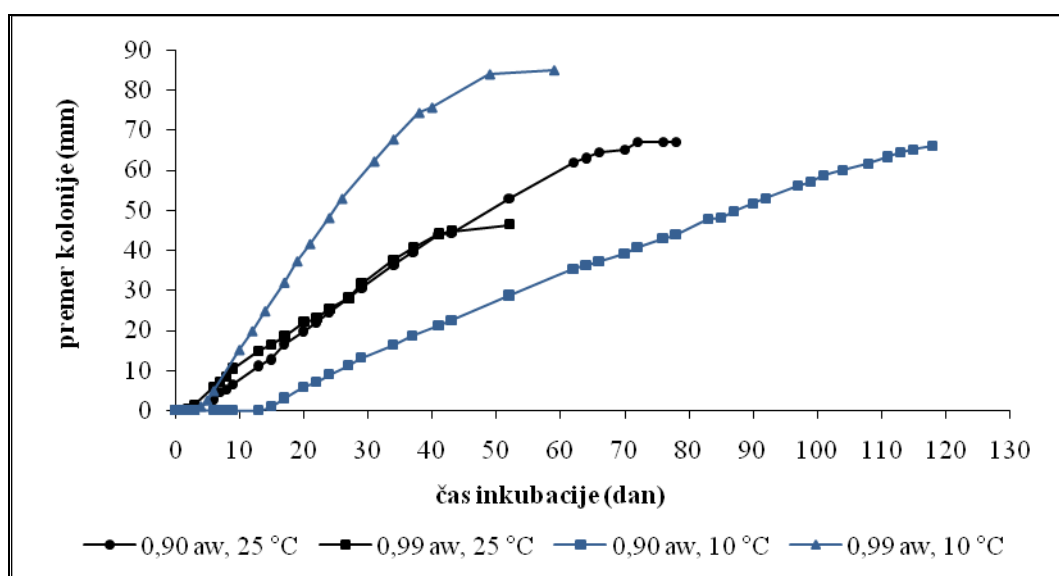
Okoljski parametri			Izolat	RHR (mm dan ⁻¹)		p vrednost
				Gojišče		
T (°C)	a _w	pH		Analog kruha	YES	
10	0,99	4,5	10 B	1,9	1,7	nz
			19 B	1,8	1,7	nz
			25 A	1,3	1,9	nz
			9 C	1,2	0,9	nz
			PV	0,8	1,4	***
		6,5	10 B	1,6	1,7	nz
			19 B	1,8	1,6	nz
			25 A	0,7	1,5	**
			9 C	1,0	1,0	nz
			PV	1,0	1,8	***
25	0,99	4,5	10 B	3,9	1,3	***
			19 B	3,5	1,4	**
			25 A	2,8	4,4	nz
			9 C	3,3	2,0	*
			PV	1,3	1,0	nz
		6,5	10 B	1,8	1,6	nz
			19 B	2,1	1,1	*
			25 A	1,0	2,6	*
			9 C	2,0	1,3	nz
			PV	0,7	1,0	*

Legenda: ***: $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; **: $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; *: $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz: neznačilen vpliv; RHR: radialna hitrost rasti (mm dan⁻¹); PV: *Penicillium verrucosum*

4.3 PRIMERJAVA VPLIVA OKOLJSKIH PARAMETROV NA RAST PLESNI VRSTE *P. verrucosum*

Za primerjavo smo izbrali plesni vrste *P. verrucosum*, ker smo želeli podrobneje proučiti njihovo rast pod vplivom različnih okoljskih parametrov. Naš namen je bil ugotoviti kateri okoljski parametri so bolj oziroma manj ugodni za njihovo rast in potencialno tvorbo ohratoksina A.

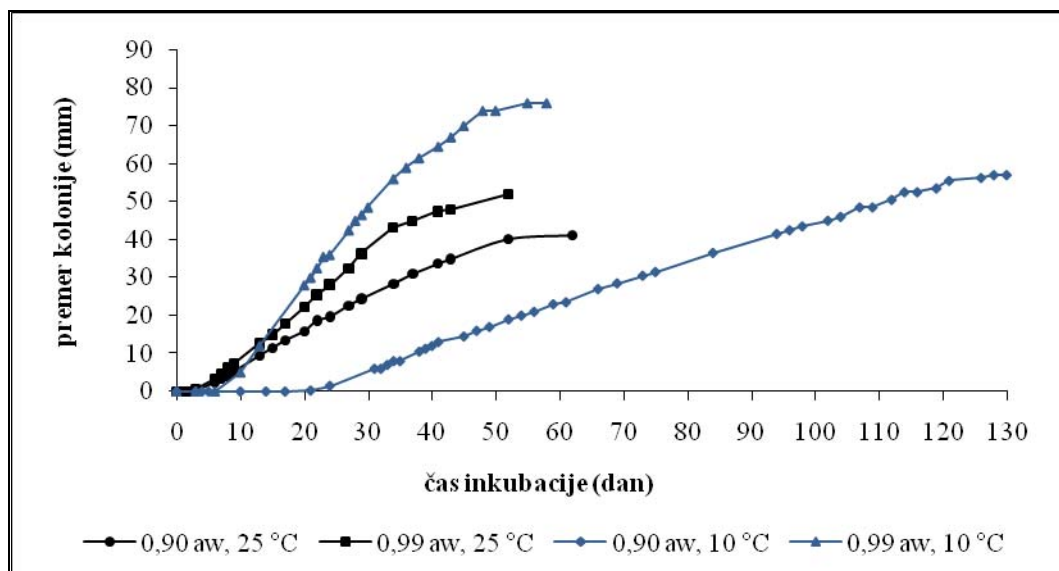
- Vpliv a_w in T pri pH 6,5



Slika 4-18: Vpliv a_w in T na rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES pri pH 6,5

Iz slike 4-18 je razvidno, da je bila a_w 0,99 optimalnejša za rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES s pH 6,5 pri 10 °C, medtem ko pri 25 °C vpliva a_w na rast plesni vrste *P. verrucosum* nismo določili. Določili pa smo vpliv temperature na gojišču YES s pH 6,5 tako pri a_w 0,99 kot 0,90. Znižanje a_w gojišča na 0,90 je bistveno vplivalo na upočasnitev rasti plesni pri temperaturi inkubacije 10 °C. S primerjavo rezultatov smo ugotovili, da so plesni te vrste rastle najhitreje na gojišču YES z a_w 0,99 in pH 6,5 in 10 °C.

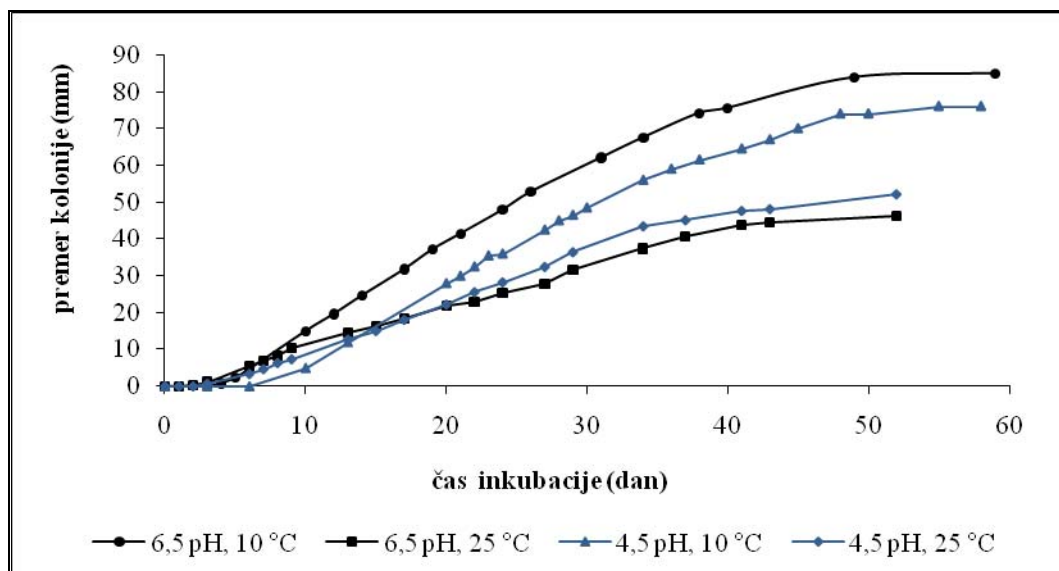
- Vpliv a_w in T pri pH 4,5



Slika 4-19: Vpliv a_w in T na rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES pri pH 4,5

Iz slike 4-19 je razvidno, da je bila vrednost a_w 0,99 optimalnejša za rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES s pH 4,5 pri 10 °C in 25 °C. Znižanje vrednosti a_w gojišča na 0,90 je upočasnilo rast plesni pri obeh temperaturah. Ugotovili smo, da so plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES s pH 4,5 in a_w 0,90 rastle hitreje pri 25 °C, medtem ko so na gojišču z a_w 0,99 rastle hitreje pri 10 °C. S primerjavo rezultatov smo na gojišču YES s pH 4,5 določili vpliv a_w in T na rast plesni vrste *P. verrucosum* (preglednica 4-3) ter najbolj optimalne razmere za njihovo rast na gojišču YES z a_w 0,99 in pH 4,5 pri 10 °C, tako kot pri pH 6,5 (slika 4-18).

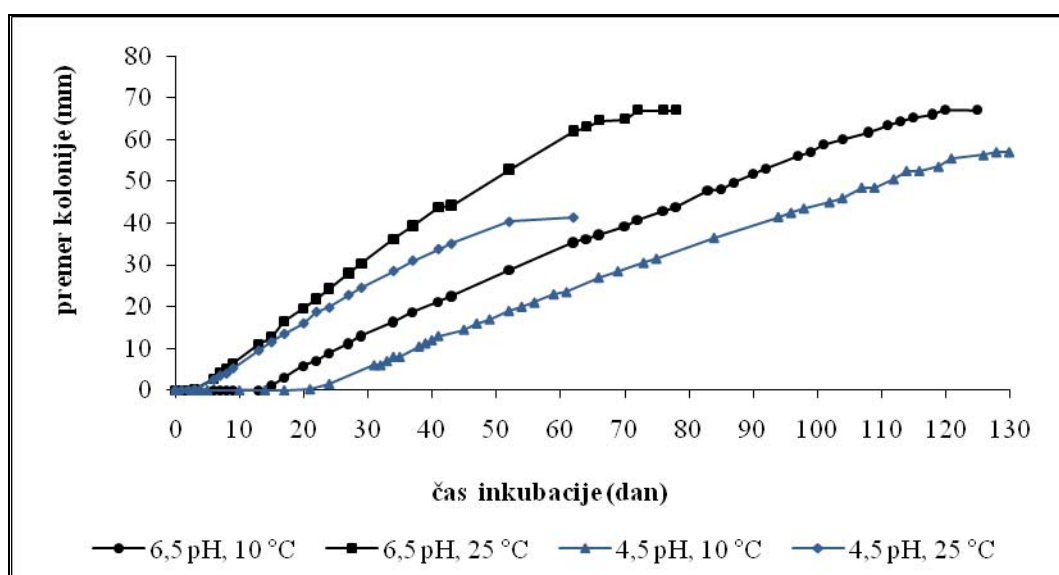
- Vpliv pH in T pri a_w 0,99



Slika 4-20: Vpliv pH in T na rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES pri a_w 0,99

Iz slike 4-20 je razvidno, da so plesni vrste *P. verrucosum* rastle na gojišču YES z a_w 0,99 in 10 °C hitreje pri pH 6,5 kot pri pH 4,5, medtem ko so pri 25 °C rastle zelo podobno. Vendar je analiza eksperimentalnih rezultatov pokazala, da pH nima vpliva na rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES z a_w 0,99 pri 10 in 25 °C. Določili smo, da je bil vpliv temperature večji na gojišču YES z a_w 0,99 pri pH 6,5 kot pri pH 4,5.

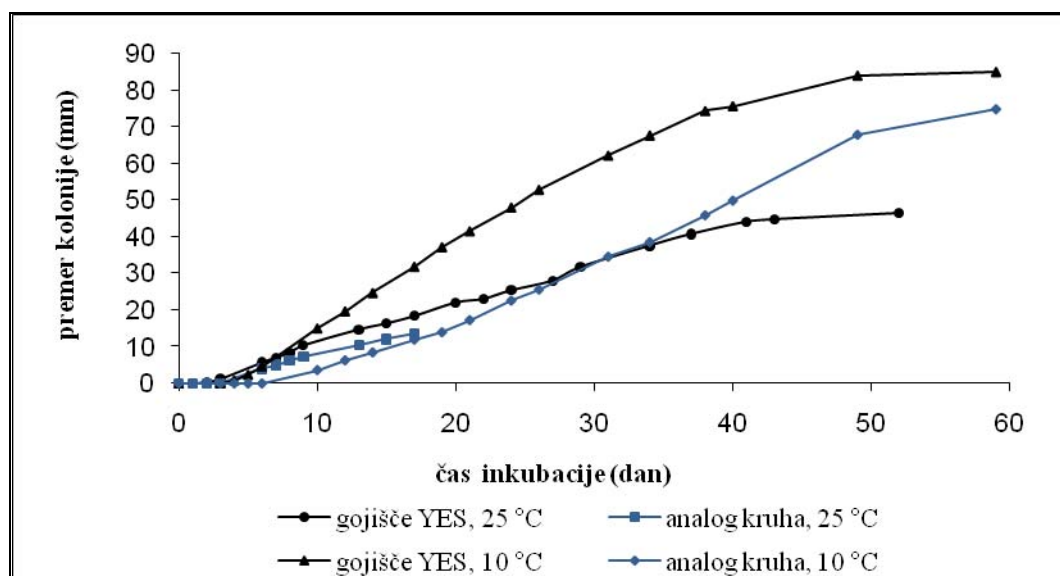
- Vpliv pH in T pri a_w 0,90



Slika 4-21: Vpliv pH in T na rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES pri a_w 0,90

Iz slike 4-21 je razvidno, da je bila rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES z a_w 0,90 hitrejša pri pH 6,5 pri obeh temperaturah inkubacije v primerjavi s pH 4,5, vendar smo vpliv pH na rast plesni določili le pri 25 °C. S primerjavo rezultatov smo ugotovili, da je bilo gojišče YES z a_w 0,90 najbolj optimalno za rast plesni pri pH 6,5 in 25 °C. Prav tako smo določili, da je bil vpliv T na rast plesni vrste *P. verrucosum* večji na gojišču YES z a_w 0,90 pri pH 6,5 kot pri pH 4,5.

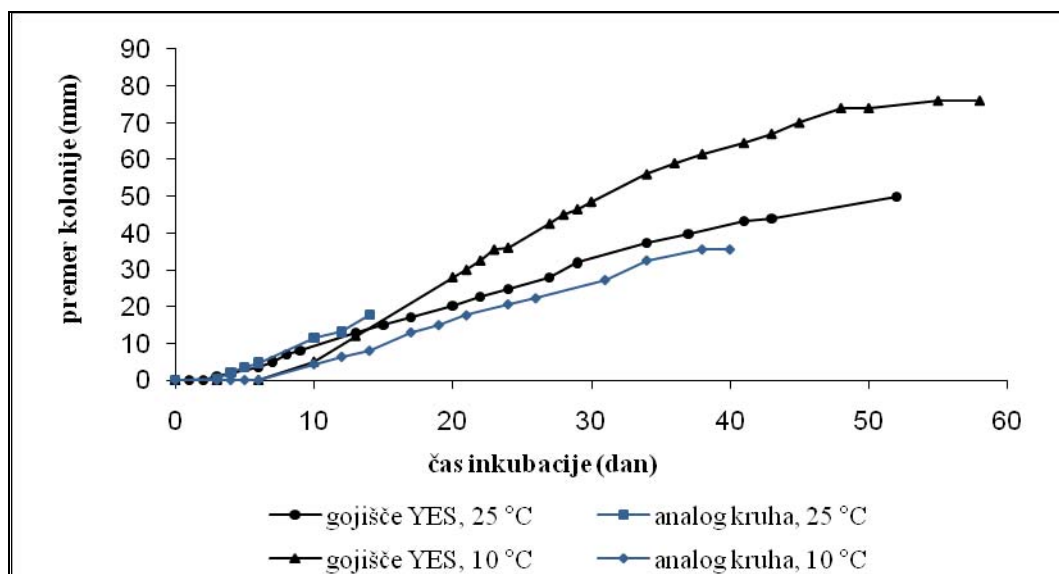
- Vpliv gojišča in T pri pH 6,5



Slika 4-22: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 in T na rast plesni vrste *P. verrucosum* pri pH 6,5

Iz slike 4-22 je razvidno, da so rastle plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču s pH 6,5 in a_w 0,99 hitreje na gojišču YES kot na analogu kruha pri obeh temperaturah inkubacije. Spremljanje rast plesni je bilo na analogu kruha pri 25 °C precej krajše kot na gojišču YES, saj je bilo zaradi razrasti plesni v večje število kolonij nadaljnje spremljanje rasti onemogočeno. Sklepamo na hitrejšo dozorevanje in na potencialno optimalnejše pogoje rasti na analogu kruha. Plesni vrste *P. verrucosum* so rastle najhitreje na gojišču YES z a_w 0,99 pri 10 °C in dosegle tudi največji končni premer v primerjavi z rastjo pri ostalih parametrih. Prav tako smo določili, da je imelo gojišče večji vpliv na rast plesni vrste *P. verrucosum* pri 10 °C kot pri 25 °C (preglednica 4-5).

- Vpliv gojišča in T pri pH 4,5



Slika 4-23: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 in T na rast plesni vrste *P. verrucosum* pri pH 4,5

Iz slike 4-23 je razvidno, da so rastle plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču s pH 4,5 in a_w 0,99 hitreje na analogu kruha pri 25 °C, medtem ko je bilo pri 10 °C optimalnejše za njihovo rast gojišče YES. Ugotovili smo, da je imelo gojišče s pH 4,5 vpliv na rast plesni vrste *P. verrucosum* le pri 10 °C (preglednica 4-5). Spremljanje rasti plesni na analogu kruha pri 25 °C je bilo v primerjavi z rastjo pri ostalih parametrih tudi bistveno krajše, tako da lahko sklepamo, da je analog kruha nudil boljše pogoje za rast plesni.

S primerjavo rezultatov (sliki 4-22 in 4-23) smo ugotovili, da je imel pH nekoliko večji vpliv na rast plesni pri 25 °C na analogu kruha ter pri 10 °C na gojišču YES. Plesni vrste *P. verrucosum* so rastle najhitreje na analogu kruha pri pH 4,5 in 25 °C ter na gojišču YES pri pH 6,5 in 10 °C.

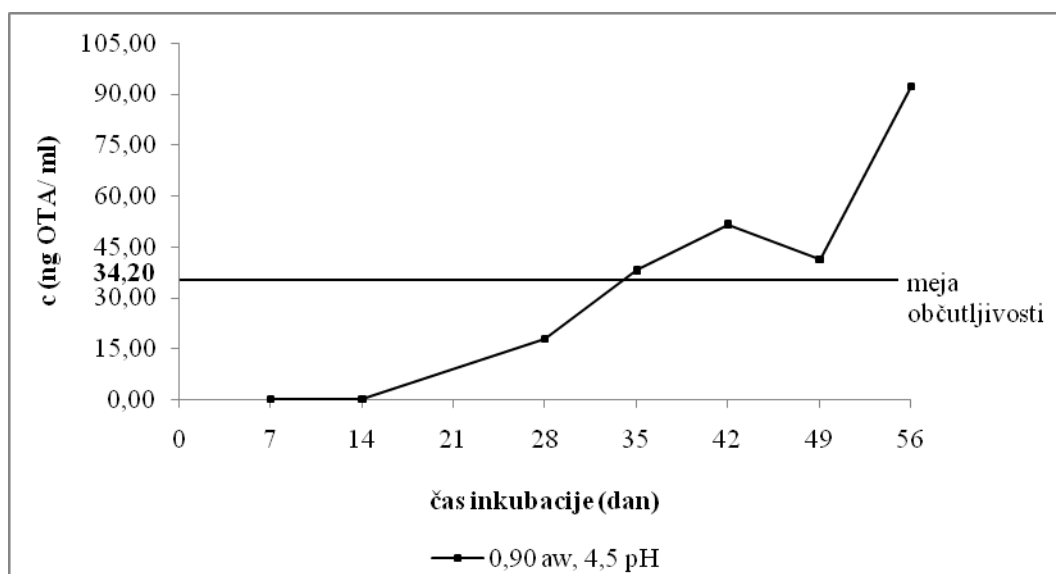
4.4 VPLIV OKOLJSKIH PARAMETROV NA TVORBO OHRATOKSINA A

OTA smo določali pri rasti plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES s pH 4,5 in 6,5 ter a_w 0,90 in 0,99. Plesen smo po inokulaciji inkubirali pri temperaturi 10 °C in 25 °C.

Vzorčili smo vsakih sedem dni v časovnem obdobju od 7 do 42 oz. 56 dni. Po pripravi vzorca (slika 3-4) smo OTA določali s spektrofotometrično metodo, katere občutljivost je $34,2 \text{ ng ml}^{-1}$, na Katedri za biotehnologijo.

Določili smo, da so plesni vrste *P. verrucosum* tvorile OTA na gojišču YES z a_w 0,90 in pH 4,5 po 35 dneh inkubacije pri 25 °C (slika 4-21), medtem ko smo tvorbo OTA na gojišču YES z a_w 0,90 in pH 6,5 pri 25 °C določili šele po 56 dneh (preglednica 4-10). Pri temperaturi 10 °C in ostalih okoljskih parametrih (preglednica 3-4) tvorbe OTA nismo določili oz. so bile koncentracije pod mejo občutljivosti metode.

- Vpliv a_w in pH na tvorbo ohratoksina A



Slika 4-24: Vpliv a_w in pH gojišča YES na tvorbo OTA pri plesni vrsti *P. verrucosum* pri 25 °C

Iz slike 4-24 je razvidno, da smo tvorbo OTA pri plesni vrsti *P. verrucosum* določili na gojišču YES z a_w 0,90 in pH 4,5 po 35 dneh inkubacije.

- Izračunana koncentracija ohratoksina A

Koncentracijo OTA smo izračunali iz umeritvene krivulje (enačba 3.2) z upoštevanjem korekcije.

Preglednica 4-6: Tvorba OTA pri plesni vrste *P. verrucosum* na gojiščih YES

T	Koncentracija OTA (ng ml ⁻¹)							
	25 °C				10 °C			
	0,99		0,90		0,99		0,90	
Vodna aktivnost (a _w)	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5
pH	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5	4,5	6,5
Čas inkubacije (dan)								
28	7,42*	10,43*	17,65*	10,13*	5,87*	*	*	*
35	10,33*	17,72*	38,06	15,06*	*	*	*	*
42	12,48*	33,15*	51,67	22,81*	6,23*	*	6,73*	*
49	/	/	41,34	10,33*	/	/	*	*
56	/	/	92,37	102,17	*	*	*	*

Legenda: /: nismo določali OTA; *koncentracija pod mejo občutljivosti metode

Rezultati našega eksperimentalnega dela so pokazali, da ima temperatura največji vpliv na tvorbo OTA, medtem ko bi bilo za določitev vpliva a_w in pH potrebnih več raziskav. Omejitev pri našem delu je bila tudi uporabljena spektrofotometrična metoda, ki jo razvijajo na Katedri za biotehnologijo. Meja občutljivosti te metode je relativno visoka.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V skladu z delovnimi hipotezami smo preverili ali okoljski parametri a_w (0,90, 0,99), pH (4,5, 6,5), temperatura (10 °C, 25 °C) in vrsta gojišča (YES, analog kruha) vplivajo na rast petih živilskih izolatov rodu *Penicillium* ter na tvorbo ohratoksina A pri izbrani mikotoksikogeni plesni vrste *P. verrucosum*. Hkrati nas je zanimalo, kako okoljski parametri vplivajo na rast, saj je znano, da ne delujejo neodvisno (Pitt in Hocking, 1997) ter ali bodo različno vplivali na živilske izolate.

Na rast plesni na določenih živilih vpliva veliko okoljskih, fizikalnih in kemijskih parametrov. Definiranje le teh nam je lahko v veliko pomoč pri ohranjanju stabilnosti živil (Pitt in Hocking, 1997), zato smo preverili ali znižanje vrednosti a_w , pH, T upočasni ali zavre rast plesni rodu *Penicillium*.

Zanimale so nas razmere, pri katerih raste ta vrsta plesni, kajti razmere, ki pospešujejo proizvodnjo toksinov so običajno bolj omejene od razmer, ki diktirajo rast plesni (Kokkonen, 2004). Ohratoksin A (OTA) je sekundarni metabolit plesni vrste *P. verrucosum*, ki se lahko nahaja v živilih in krmi ter ima različne škodljive vplive na živali in človeka.

Ker smo za eksperimentalno delo izbrali novejše gojišče, analog kruha, nas je zanimal njegov vpliv na rast živilskih izolatov v primerjavi s klasičnim gojiščem YES. Analog kruha je trdno gojišče, ki simulira razmere pravega kruha. Izdelali smo ga iz pšenične moke, zato nas je zanimalo, kako rastejo izolati na njem, glede na to, da nedavne ocene žit v Evropi, predvsem pšenice, navajajo, da je ohratoksikogena vrsta plesni *P. verrucosum* njihov glavni onesnaževalec (Magan in Aldred, 2007).

5.1.1 Spremljaje rasti plesni na različnih gojiščih

Klasična mikrobiološka gojitvena metoda z merjenjem premera kolonije plesni je enostavna metoda za spremljanje rasti, vendar se je v našem primeru pokazalo, da je ena izmed njenih največjih omejitev nenatančna oz. nestandardizirana inokulacija.

- **Vpliv izolata plesni rodu *Penicillium***

Plesni rodu *Penicillium* so se različno odzvale na okoljske parametre, kar potrjuje našo hipotezo, da je rast odvisna od vrste plesni. Analiza eksperimentalnih rezultatov je

pokazala, da ima največji vpliv na rast plesni rodu *Penicillium* vrsta izolata. Izbrani živilski izolati so rastle na gojiščih (YES, analog kruha) pri različnih a_w , pH in T (preglednica 3-3), ki so bile določene glede na njihov individualen odziv na okoljske parametre.

Na splošno so se razlike v rasti izolatov pojavile po določenem času inkubacije. Na začetku spremljanja rasti so nekateri izolati pričeli rasti na gojiščih prej in hitreje v primerjavi z ostalimi ali podobno in se je njihova razlika v rasti in hitrosti rasti stopnjevala ves čas spremljanja, se zmanjševala ali ostajala podobna. Pri tem je bil pomemben tudi sam čas za germinacijo spor ali porast konidijev. Podobno kot navajajo drugi avtorji je bilo v neugodnih razmerah potrebnih za pričetek rasti deset ali več dni, medtem ko pri ugodnih en dan (Filtenborg in sod., 2000).

• Vpliv a_w

Primerjava vpliva okoljskih parametrov na rast plesni rodu *Penicillium* je pokazala, da je imela največji vpliv na rast vseh izolatov znižana vrednost a_w , tako pri 25 °C kot pri 10 °C. Rast izolatov je bila upočasnjena, medtem ko je bila rast izolatov 25 A in 19 B popolnoma zavrta (slike 4-2, 4-9 in 4-11). Ugotovili smo, da je imela a_w nekoliko večji vpliv na rast plesni pri 10 °C kot pri 25 °C (preglednica 4-2).

Prado in sod. (2006) so proučevali rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču BMEA (gojišče ječmenov sladni ekstrakt) pri štirih vrednostih a_w (0,85, 0,90, 0,95 in 0,99) in treh T (10, 20 in 30 °C). Ugotovili so, da je bila optimalna vrednost a_w gojišča za rast plesni značilno odvisna od temperature. Pri 10 in 20 °C je bila radialna hitrost rasti (mm dan⁻¹) višja pri a_w 0,99, medtem ko pri 30 °C pri a_w 0,95. Rezultati našega eksperimenta pa so pokazali, da je bila radialna hitrost rasti plesni vrste *P. verrucosum* tudi višja pri 10 in 25 °C na gojišču YES z a_w 0,99 v primerjavi z rastjo na gojišču YES z a_w 0,90.

Plesni vrste *P. verrucosum* so rastle na vseh gojiščih pri a_w 0,90, Filtenborg in sod. (2000) navajajo minimalne a_w za rast te vrste plesni celo med 0,81 in 0,83.

Avtorja Pitt in Hocking (1997) navajata optimalno a_w za rast plesni vrste *P. verrucosum* na kruhovem testu 0,92, medtem ko smo mi spremljali rast te vrste plesni in še štirih drugih izolatov rodu *Penicillium* le na analogu kruha z a_w 0,99. Ugotovili smo, da so pri tej a_w rastle vsi izolati, njihova stopnja rasti pa je bila odvisna še od ostalih okoljskih parametrov.

- **Vpliv pH**

Vrednost pH je imela v primerjavi z vplivom a_w in T manjši vpliv na rast vseh izolatov plesni rodu *Penicillium*. López Diaz in njegovi sodelavci (2002) so prav tako ugotovili majhen vpliv pH na rast številnih vrst plesni rodu *Penicillium*.

Ugotovili smo, da so bili vsi izolati rodu *Penicillium* sposobni rasti pri pH 4,5 in 6,5. Predvidevali smo, da bo rast plesni pri nižjem pH upočasnjena ali zavrta, vendar je bila stopnja rasti plesni pri pH 4,5 nekoliko višja kot pri pH 6,5 (preglednica 4-4), medtem ko je optimalna vrednost pH za rast večine plesni rodu *Penicillium* približno 5 (Pitt in Hocking, 1997).

S primerjavo rezultatov smo ugotovili, da je imel pH večji vpliv na rast plesni rodu *Penicillium* na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C v primerjavi z 10 °C. Prav tako smo določili večji vpliv pH na rast plesni na gojišču YES z a_w 0,99 in 0,90 pri 25 °C kot pri 10 °C.

Plesni vrste *P. verrucosum* so rastle na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C hitreje pri pH 4,5 kot pri pH 6,5, medtem ko vpliva pH pri 10 °C nismo določili. Iz dobljenih rezultatov težko sklepamo o optimalnih razmerah za rast plesni vrste *P. verrucosum* na analogu kruha kot je to uspelo Pittu in Hockingu (1997) na kruhovem testu, ki sta ugotovila optimalne razmere za rast te vrste plesni pri 0,92 a_w in 5,6 pH ter Arroyu in sod. (2005), ki so ugotovili, da je bila njihova rast na analogu kruha z a_w 0,97 pri 25 °C hitrejša pri pH 6 kot pri pH 4,5. Slednji so ugotovili ravno obratno kot mi pri isti temperaturi.

Na splošno pa lahko povzamemo, da se optimalna vrednost pH za rast plesni vrste *P. verrucosum* na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C nagiba bolj k kislemu in pri 10 °C bolj k nevtralnemu območju pH.

Iz preglednice 4-4 je razvidno, da bi bile potrebne za določitev vpliva pH na rast plesni rodu *Penicillium* dodatne analize. Na splošno pa je bila rast izolatov na analogu kruha in gojišču YES hitrejša pri pH 4,5 kot pri pH 6,5 pri obeh temperaturah. Sklepamo, da je vpliv pH na rast plesni premajhen oz. odvisen od drugih okoljskih parametrov.

• Vpliv T

Rezultati eksperimenta so potrdili našo hipotezo, da bo nižja temperatura upočasnila rast izolatov. Optimalna temperatura za rast večine plesni rodu *Penicillium* je 25-30 °C (Filtenborg in sod., 2000). Tudi mi smo določili, da je bila rast izolatov rodu *Penicillium* v splošnem večja pri 25 °C kot pri 10°C ne glede na vrsto gojišča ter njegovo a_w in pH (preglednica 4-3).

Prado in sod. (2006) navajajo, da je optimalna temperatura za rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču BMEA z a_w od 0,95 do 0,99 med 20 °C in 30 °C, brez značilne razlike v rasti med njima, medtem ko smo mi določili, da je optimalna temperatura za rast te vrste plesni na gojišču YES z a_w 0,99 10 °C ter z a_w 0,90 25 °C.

• Vpliv gojišča

Analog kruha je trdno gojišče, ki simulira okoljske razmere pravega kruha ter vsebuje vsa pomembna hranila. Pripravili smo ga iz pšenične moke za katero je znano, da vsebuje tudi prolin, ki je eden izmed pomembnejših virov dušika za rast plesni (Kahne-Jurišević, 2005). Zato smo predvidevali, da bo analog kruha predstavljal optimalnejše razmere za rast plesni v primerjavi z gojiščem YES. Statistična analiza je pokazala, da gojišče na splošno nima značilnega vpliva na RHR pri ostalih okoljskih parametrih (preglednica 4-5), vendar smo kljub temu določili, da ima vrsta gojišča večji vpliv na rast izolatov pri 25 °C kot pri 10 °C. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da pri 25 °C nudi boljše razmere za rast plesni analog kruha, medtem ko pri 10 °C gojišče YES (preglednica 4-5). Vpliv gojišča je odvisen tudi od izolata plesni rodu *Penicillium*. Spremljanje rasti na analogu kruha je bilo v primerjavi s spremljanjem rasti na gojišču YES časovno krajše in večkrat onemogočeno, zaradi razrasti plesni v večjem številu kolonij. Sklepamo, da plesen na analogu kruha dozori hitreje, vendar je potrebno upoštevati dejstvo, da proizvodnja spor ni vedno natančno merilo rasti plesni, ampak označuje sposobnost sporulacije (Magan in Aldred, 2007).

5.1.2 Določanje OTA

OTA smo določali s spektrofotometrično metodo, ki jo še razvijajo na Katedri za biotehnologijo. Gojišče YES, na katerem smo določali tvorbo OTA je visoko hranljiv medij in priporočljiv za analizo sekundarnih metabolitov (Kokkonen in sod., 2005).

- **Vpliv a_w , pH in T na tvorbo OTA**

Ugotovili smo, da so plesni vrste *P. verrucosum* rastle na gojišču YES pri vseh okoljskih parametrih (preglednica 3-3), medtem ko so bili parametri za tvorbo toksina bolj omejeni (Kokkonen in sod., 2005). Plesni vrste *P. verrucosum* so tvorile OTA na gojiščih YES z a_w 0,90 ter pH 4,5 in 6,5 pri 25 °C. Pri 10 °C tvorbe OTA nismo določili, medtem ko Frisvad in Thrane (2000) navajata, da plesni vrste *P. verrucosum* tvorijo OTA tudi pri nižjih temperaturah. Predvidevamo, da nismo določili OTA pri 10 °C, zaradi relativno visoke meje občutljivosti spektrofotometrične metode.

Pri analizi okoljskih parametrov (preglednica 3-4), ki vplivajo na tvorbo OTA smo ugotovili, da so plesni vrste *P. verrucosum* tvorile OTA na gojišču YES z a_w 0,90. Vrednost a_w je skupaj s temperaturo bistveno vplivala na tvorbo OTA na gojišču YES pri pH 4,5 ter 6,5. Določili smo, da so plesni tvorile najvišje koncentracije OTA na gojišču YES z a_w 0,90 pri pH 4,5, medtem ko drugi avtorji navajajo kot optimalno a_w za tvorbo OTA 0,99 (Arroyo in sod., 2005). Ta vrsta plesni je na gojišču z a_w 0,90 in pH 4,5 rastla nekoliko hitreje (preglednici 4-1 in 4-3) pri 25 °C v primerjavi z 10 °C, vendar počasneje v primerjavi s pH 6,5, torej ima pH tudi vpliv na formacijo mikotoksina (Filtenborg in sod., 2000).

S primerjavo tvorbe OTA na gojiščih YES z različno a_w smo ugotovili, da so na gojiščih YES s pH 4,5 in 6,5 pri 25 °C plesni vrste *P. verrucosum* tvorile OTA le na gojiščih z a_w 0,90, medtem ko pri a_w 0,99 OTA nismo določili. Plesni so rastle na gojišču YES z a_w 0,90 pri pH 4,5 in 6,5 hitreje pri 25 °C v primerjavi z rastjo pri 10 °C. Na gojišču z a_w 0,90 in 25 °C so plesni te vrste rastle hitreje pri pH 6,5 v primerjavi s pH 4,5. Torej lahko o specifičnih parametrih, ki vplivajo na tvorbo OTA le sklepamo, saj so plesni vrste *P. verrucosum* tvorile večje koncentracije OTA pri ne optimalnem pH za njeno rast, vendar pri optimalni a_w glede na temperaturo. Iz rezultatov je razvidno, da okoljski parametri a_w , pH in T medsebojno vplivajo na tvorbo OTA pri plesni vrste *P. verrucosum*. Prav tako so dobljeni rezultati ovrgli našo hipotezo, da bo ta vrsta plesni tvorila OTA pri parametrih, ki bodo manj optimalni za njeno rast, saj lahko plesen tvori mikotoksin tako pri optimalnih kot manj ugodnih razmerah (Kokkonen in sod., 2005).

S primerjavo tvorbe OTA na gojiščih YES z različnim pH smo ugotovili, da so plesni tvorile na gojiščih YES z a_w 0,90 večje koncentracije mikotoksina po 49 dneh pri pH 4,5, medtem ko je bila koncentracija OTA po 56 dnevov nekoliko večja pri pH 6,5. To bi si lahko razlagali kot razpad OTA pri pH 4,5 do ohratoksina α kot je bilo ugotovljeno za nekatere druge ohratoksikogene vrste (Arroyo in sod., 2005), vendar smo s podrobnejšo analizo ugotovili, da so plesni tvorile OTA na gojiščih YES s pH 6,5 le po 56 dnevov inkubacije (preglednica 4-6). Dobljene rezultate si lahko razlagamo tudi s prevlado primarnega metabolizma plesni med inkubacijsko dobo in kasnejšim pojavom sekundarnega metabolizma (Kokkonen in sod., 2005).

Ugotovili smo tudi, da so plesni na gojišču YES z a_w 0,90 pri pH 4,5 (preglednica 4-6) tvorile po 49 dnevov inkubacije nekoliko nižje koncentracije kot po 42 dnevov iz česar sledi, da povečanje rasti plesni ni povezano s povečanjem tvorbe OTA (Arroyo in sod., 2005).

Analiza eksperimentalnih rezultatov je pokazala, da bi bilo potrebno za natančnejše rezultate in popolno analizo tvorbe mikotoksina uporabiti več gojišč (Kokkonen in sod., 2005) in več sevov plesni vrste *P. verrucosum*. Prav tako na osnovi dobljenih rezultatov ne moremo natančno sklepati o vplivu okoljskih parametrov (a_w , T, pH) na tvorbo OTA ter da je na gojišču YES plesen tvorila nizke koncentracije OTA (Kokkonen in sod., 2004).

5.2 SKLEPI

- Potrdili smo vpliv okoljskih parametrov a_w , pH in T na rast plesni rodu *Penicillium*. Največji vpliv na njihovo rast je imela vrednost a_w , ki sta ji sledili temperatura in pH.
- Rast plesni rodu *Penicillium* je bila odvisna od vrste izolata in njegovega individualnega odziva na okoljske parametre.
- Na splošno je znižanje a_w in T upočasnilo rast vseh izolatov plesni rodu *Penicillium*.
- Zvišanje vrednosti pH je upočasnilo rast izolatov plesni rodu *Penicillium*.
- Vrsta gojišča ni imela značilnega vpliva na radialno hitrost rasti plesni rodu *Penicillium*.
- Temperatura je vplivala na tvorbo ohratoksina A pri plesnih vrste *P. verrucosum*.

PREDLOGI ZA NADALJNE DELO:

Najprej bi bilo potrebno standardizirati način inokulacije plesni in spremljati rast plesni vzporedno še s kakšno drugo metodo. Prav tako bi bilo potrebno za določanje ohratoksina A uporabiti še kakšna druga gojišča, več sevov plesni vrste *P. verrucosum* in predvsem bi morali uporabiti optimizirano metodo v kombinaciji s standardno metodo.

6 POVZETEK

Plesni rodu *Penicillium*, v katerem je veliko število vrst, so ubikvitarne glive. Rastejo v različnih razmerah, pri nizkih temperaturah, nizkih vrednostih a_w in v širokem območju vrednosti pH, zato jih uvrščamo med najpogostejše kvarljivce živil. Plesni s svojo prisotnostjo na živilih ali krmi slabšajo njihovo kakovost, senzorične in prehranske lastnosti ter povzročajo velike ekonomske izgube.

Veliko vrst plesni rodu *Penicillium* tvori mikotoksine in druge sekundarne toksične metabolite. Med njimi so glavni proizvajalci ohratoksina A (OTA) plesni vrste *P. verrucosum*. OTA ima različne škodljive vplive na živali in človeka ter se kaže v različnih obolenjih.

Na rast plesni, ki ji ne sledi vedno tvorba mikotoksina, vpliva veliko fizikalnih, kemijskih in okoljskih parametrov med kateri so najpomembnejši: razpoložljivost hranil, temperatura, vrednost a_w in kisik. Ti okoljski parametri z medsebojnim vplivom oblikujejo bolj ali manj specifične razmere. Definiranje le teh nam je lahko v veliko pomoč pri ohranjanju stabilnosti živil, zato smo jih želeli tekom našega eksperimenta podrobneje proučiti. V prvem delu poskusa smo spremljali rast izbranih živilskih izolatov rodu *Penicillium* na dveh različnih gojiščih pod vplivom različnih okoljskih parametrov ($a_w \times \text{pH} \times T$). Za primerjavo vplivov okoljskih parametrov smo izračunali radialne hitrosti rasti. Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je imela največji vpliv na rast plesni rodu *Penicillium* vrsta izolata. Med okoljskimi parametri pa je imela največji vpliv na rast izolatov znižana vrednost a_w , ki je skupaj z ostalimi okoljskimi parametri v določeni kombinaciji popolnoma zavrla rast dveh izolatov (25 A in 19 B). Rast ostalih izolatov pa je bila upočasnjena. Tudi znižana temperatura je na splošno upočasnila rast izolatov, medtem ko je imela vrednost pH nekoliko manjši vpliv. Vpliv gojišča smo težje ocenili in ne moremo ne potrditi ne ovreči delovne hipoteze, da analog kruha predstavlja optimalnejše razmere za rast plesni. Povzamemo lahko, da je bila rast odvisna od posameznega izolata in njegovega specifičnega odziva na okoljske parametre.

Drugi del eksperimenta pa je bil namenjen spremljanju tvorbe OTA v določenem časovnem obdobju pri ohratoksikogeni plesni vrste *P. verrucosum*. Plesen smo gojili na trdnem gojišču YES, pod vplivom istih okoljskih parametrov kot za spremljanje njene rasti, 56 dni. Tvorbo OTA smo kvantitativno določili šele po 35 dnevuh inkubacije na gojišču YES z a_w 0,90 in pH 4,5 pri 25 °C, medtem ko smo na gojišču YES z a_w 0,90 in pH 6,5 pri 25 °C tvorbo OTA določili le po 56 dnevuh. Pri ostalih okoljskih parametrih plesni vrste *P. verrucosum* niso tvorile OTA oz. so bile njegove koncentracije pod mejo občutljivosti metode. Na osnovi eksperimentalnih podatkov lahko sklepamo, da je imela najvidnejši vpliv na tvorbo OTA temperatura, medtem ko bi bilo potrebno za določitev vpliva a_w in pH narediti še dodatne raziskave.

7 VIRI

Abellana M., Sanchis V., Ramos A.J. 2001. Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 151-157

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 35-36

Arroyo M., Aldred D., Mgsn N. 2005. Environmental factors and week organic acid interactions have different effect on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 223-231

Bidovec V. 1989 Okratoksinogene glive in razgradnja okratoksina – A z mikrovalovi. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo : 21, 50-52

Bragulat M.R., Martínez E., Castellá G., Cabañes. 2008. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 43-48

Bullerman L.B. 2003. Mycotoxins. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed. Vol.6. Caballero B., Trugo L.C., Finglos P. M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 4080-4089

Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. 2006. *Official Journal of the European Union*, 24, L 364: 5-24

Creppy E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28

D'Mello J.P.F. 2003. Food safety-contaminants and toxins. Edinburgh, CABI Publishing: 65-90

Elmholt S. 2005. Low temperature handling will delay but not hinder ochratoxin in wet grain. Newsletter from Danish Research Centre for Organic Farming (March 2005)
<http://www.darcof.dk/enews/mar05/mycotox.html> (25.08.2008): 1 str.

Filtenborg O., Frisvad J.C., Samson R.A. 2000. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. V: Introduction to food-and airborne fungi. 6th ed. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (eds.). Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 306-320

Filtenborg O., Frisvad J.C., Thrane U. 1996. Molds in food spoilage. International Journal of Food Microbiology, 33: 85-102

Frisvad J.C., Thrane U. 2000. Mycotoxin production by common filamentous fungi. V: Introduction to food-and airborne fungi. 6th ed. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (eds.). Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 321-331

Guynot M.E., Marin S., Sanchis V., Ramos A.J. 2005. An attempt to optimize potassium sorbate use to preserve pH (4,5-5,5) intermediate moisture bakery products by modelling *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium corylophilum* growth. International Journal of Food Microbiology, 101: 169-177

Jay J.M. 1992. Modern food Microbiology. 4th ed. New York, Chapman&Hall: 39-58, 648-649

Jeršek B., Poklar Ulrih N., Dekleva N., Sever D. 2004. Kemijski dejavniki tveganja v živilih in njihov nadzor. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci, 18. In 19. Marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45-64

Kahne-Juriševič B. 2005. Ohratokin A v živilih rastlinskega izvora. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo : 13, 16-24,30,40

Kovač B. 2004. Varnost izdelkov iz žit. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci, 18. In 19. Marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 221-230

Kokkonen M., Jestoi M., Rizzo A. 2005. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. International Journal of Food Microbiology, 99: 207-214

Kralj Cigić I., Strlič M., Schreiber A., Kocjančič M., Pihlar B. 2006. Ochratoxin A in wine: Its determination and photostability. Analytical Letters, 39: 1475-1488

López Diaz T.M., González C.J., Moreno B., Otero A. 2002. Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. Food Microbiology, 19: 1-7

Magan N., Aldred D. 2007. Post-harvested control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 131-139

Mateo R., Medina A., Mateo E.M., Mateo F., Jiménez M. 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 79-83

Mercuri A.M. 2005. Biodeterioramento vegetale. V: La biologia vegetale per i beni culturali. Vol.1: Biodeterioramento e conservazione. Caneva G., Nugari M. P., Salvadori O. Nardini (ed.). Firenze

<http://www.palinopaleobot.unimo.it/staff/Mercuri%20-%20web/BdetImm.htm>

(25.08.2008): 1 str.

Pardo E., Malet M., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. 2006. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 25-31

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

Pitt J.I., Hocking A.D. 1997. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London, Blackie Academic and Professional : 3-12, 319-322

Pitt J.I., Hocking A.D. 1985. Fungi and food spoilage. 1st ed. Sydney, Blackie Academic and Professional : 169-258

Pitt J.L. 1989. Toxicogenic aspergillus and penicillium species. V: Mycotoxin prevention and control in foodgrains.. Semple R.L., Frio A.S., Hicks P.A., Lozare J.V. (eds.). Bangkok, RAP Publication

www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E00.htm (26.08.2008): 1 str.

Rosa C.A.R., Ribeiro J.M.M., Fraga M.J., Gatti M., Cavaglieri L.R., Magnoli C.E., Dalcero A.M., Lopes C.W.G. 2006. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Veterinary Microbiology*, 113: 89-96

Ringot D., Chango A., Schneider Y.J., Larondelle Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159 : 18-46

Schmidt-Heydt M., Baxter E., Geisen R., Magan N. 2007. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 277-283

Sforza S., Dall'Asta C., Marchelli R. 2004. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry*, 25:54-76

Smith J.E., Lewis C.W., Anderson J.G., Solomons G.L., McDougall R.K. 1994. Mycotoxins in human nutrition and health. Luxemburg, Agro-Industrial Research Devision, European commision: 18-24, 36

Smole Možina S., Bem Z. 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 50-64, 72-76

Sweeney M.J., Dobson D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141–158
Review

Torelli E., Firrao G., Locci R., Gobbi E. 2006. Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of "passito" wines. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 307 – 312

Van Egmond H.P. 2000. Mycotoxins: Detection, reference materials and regulation. V: Intoductin to food-and airborne fungi. 6th ed. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (eds.). Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 332-338

Walker R. 1999. Mycotoxins of growing interest. Tunis, Food and Agriculture Organization (March 1999)

<http://fao.org> (26.08.2008): 9 str.

ZAHVALA

Z nasmeškom na ustnicah in velikim olajšanjem pišem zadnjo stran pomembnega poglavja v svojem življenju. Poglavje, ki ga sestavljala več podpoglavij, več obrazov, zaključkov, dosežkov...študentska leta se ne bodo zaključila le z nazivom, ampak tudi z obilico lepih spominov. Zato to stran posvečam vsem, ki so mi na različne načine pomagali, da sem prispela do zastavljenega cilja, postala trdna oseba z različnimi pogledi na življenje in pripravljena na nove izzive in dosežke.

Ne zdi se mi še dolgo tega, ko sem si izbrala mentorja in naslov diplomskega dela. Priznati moram, da se ne bi mogla odločiti bolje, kajti z dobrim mentorjem imajo stvari smisel in nobeno delo ni ovrednoteno kot nesmiselno. Zato se iskreno zahvaljujem za zelo dobro mentorstvo doc. dr. Barbari Jeršek. NAJLEPŠA HVALA za vse predloge, nasvete, potrpežljivost, vspodbudo ter za vsestransko pomoč.

Največje zasluge, da sem prišla do zastavljenega cilja grede moji mami Ani Vojković. Mami, preveliko je besed s katerimi bi se ti rada zahvalila...hvala, ker si se borila z mano!!! Iz srca hvala tudi ostalim mojim domačim, ki so mi stali ob strani skozi vsa leta študija. MOJ SVET JE LEPŠI, KER IMAM VAS!!!

Najlepša hvala tudi ga. Jani Avbelj in Tanji Rožman za vso pomoč v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo. Tanja, hvala tudi za vse nasvete, brezpogojno in raznovrstno pomoč ter dobro voljo!

Ne nazadnje hvala tudi moji »amigi« Barbari Vovk, ki dobro ve, kako trmasta in vztrajna znam biti. Hvala za vse skupne trenutke, popite kapučine, klepete ter za dobro srčnost in prijateljstvo!

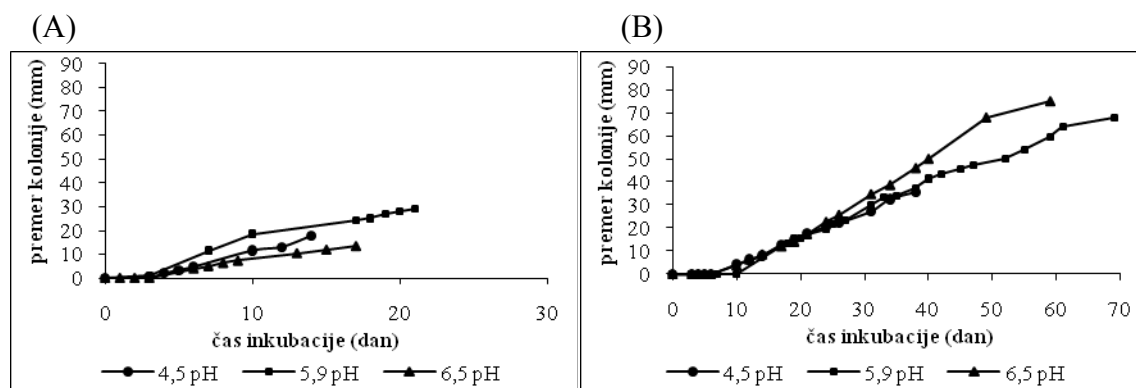
Zahvala gre tudi sotrpinoma Blažu Kunšiču in Marku Blažiču za pomoč pri praktičnem delu na Katedri za biotehnologijo.

Hvala tudi Katji v fotokopirnici, katere obraz običajno prvo vidimo, ko vstopimo skozi vrata faksa, za topel pozdrav, kavice, kopije, ustrežljivost in razne debate.

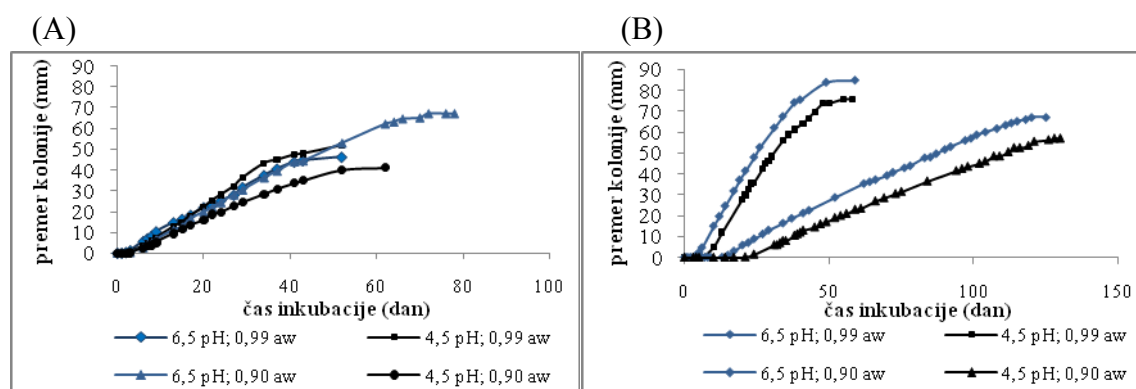
Iskrena hvala tudi vsem tistim, ki so mi kakorkoli in kdajkoli pomagali!

PRILOGE

Priloga A: Vpliv pH na rast plesni vrste *P. verrucosum* na analogu kruha z a_w 0,99 in različno vrednostjo pH pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

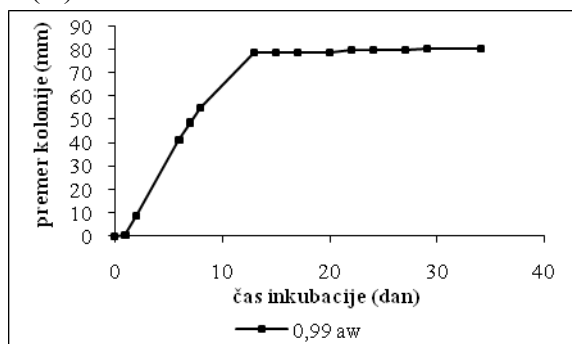


Priloga B: Vpliv a_w in pH na rast plesni vrste *P. verrucosum* na gojišču YES pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

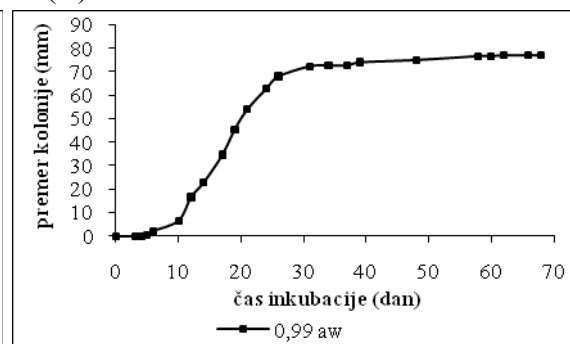


Priloga C: Vpliv a_w na rast izolata 25 A na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

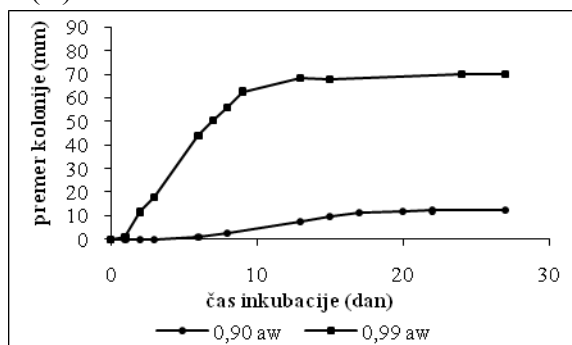
(A)



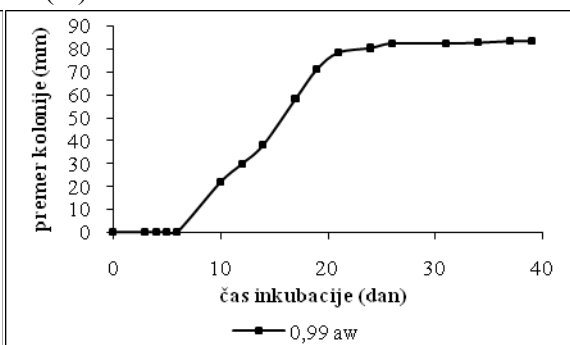
(B)



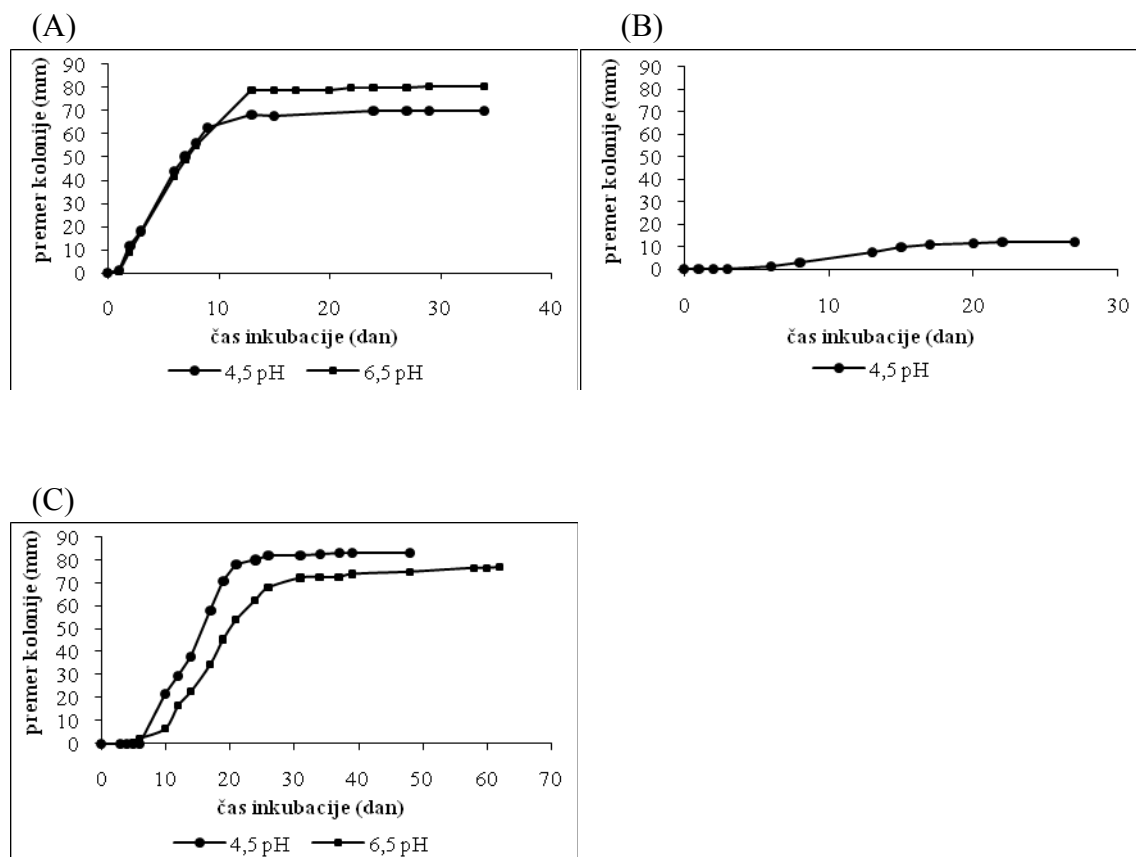
(C)



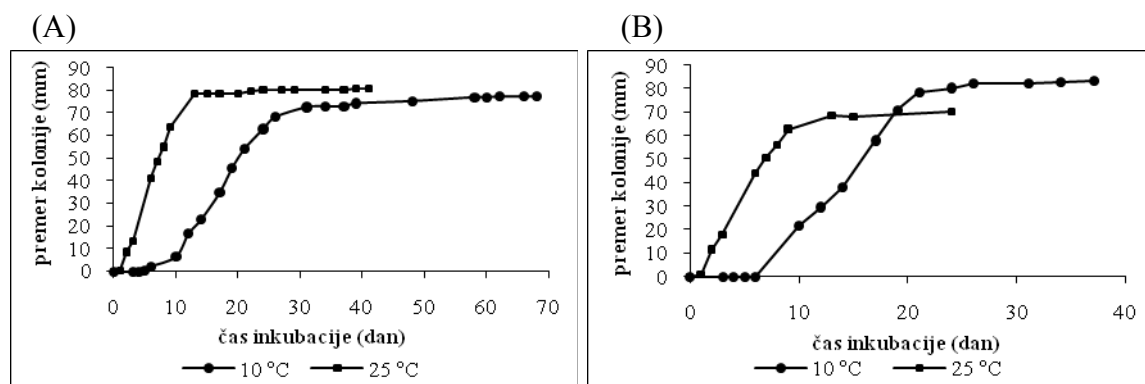
(D)



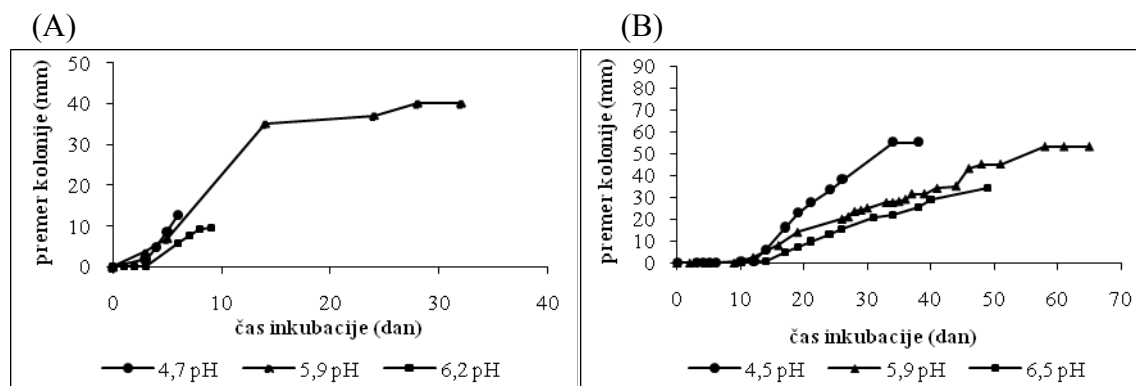
Priloga D: Vpliv pH na rast izolata 19 B na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C)



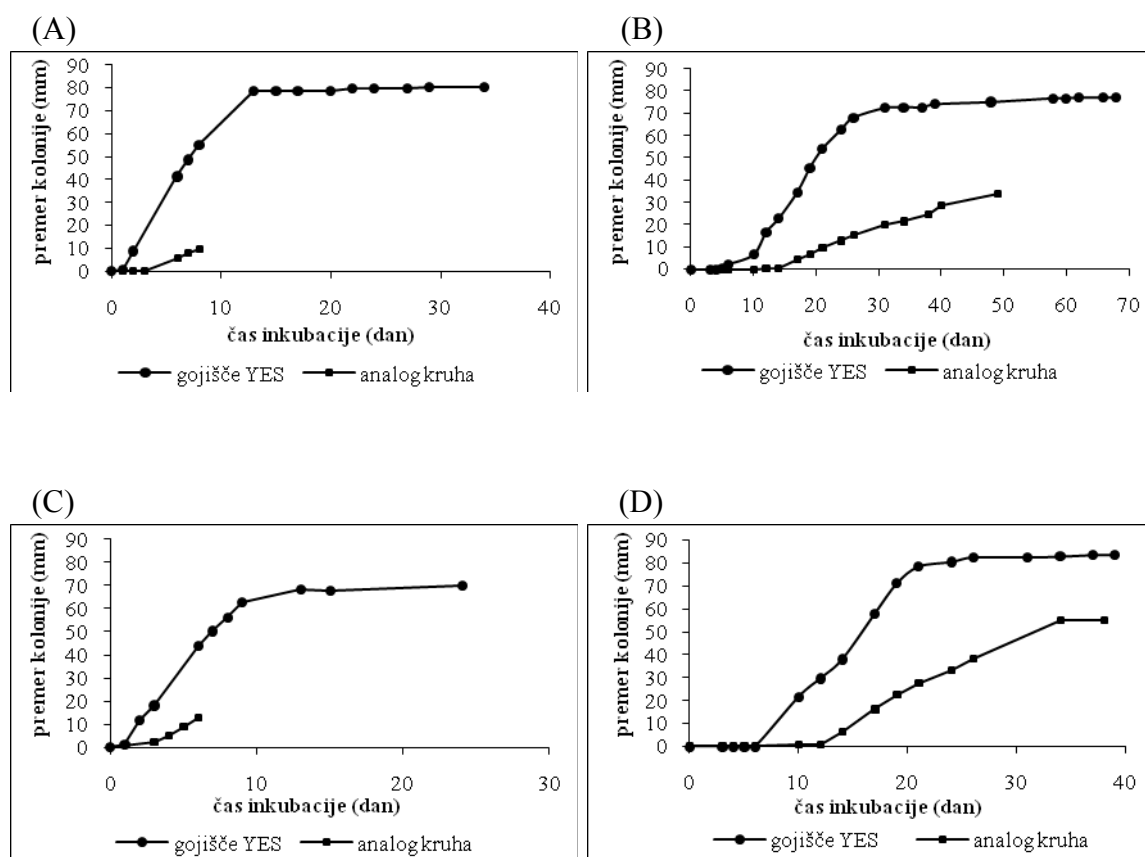
Priloga E: Vpliv temperature na rast izolata 25 A na gojišču YES z a_w 0,99 pri pH 6,5 (A) in pH 4,5 (B)



Priloga F: Vpliv pH na rast izolata 25 A na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

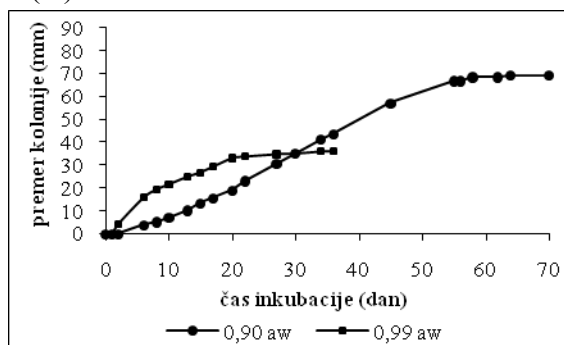


Priloga G: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 25 A pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

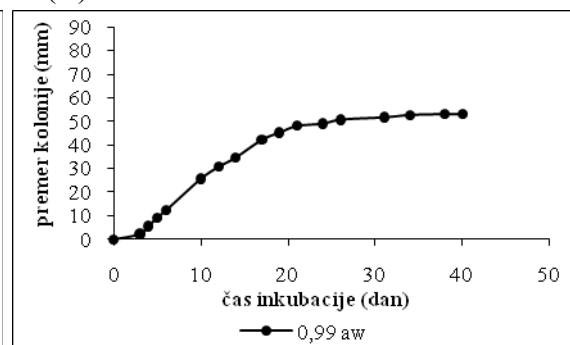


Priloga H: Vpliv a_w na rast izolata 19 B na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

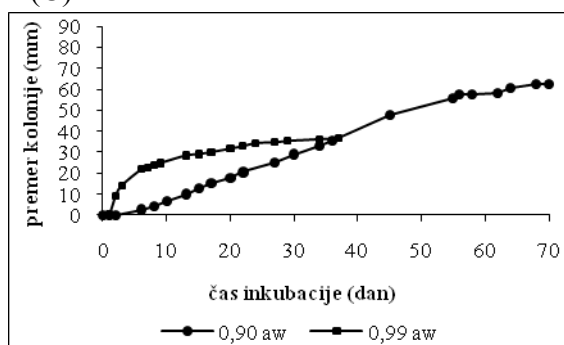
(A)



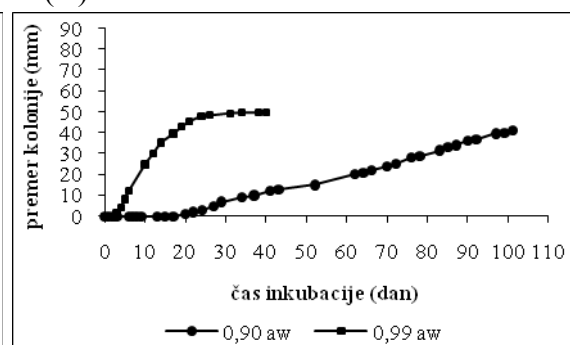
(B)



(C)

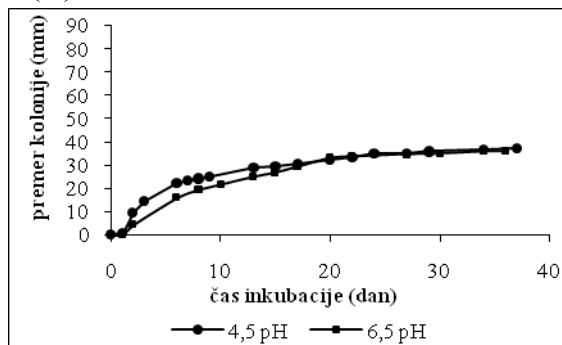


(D)

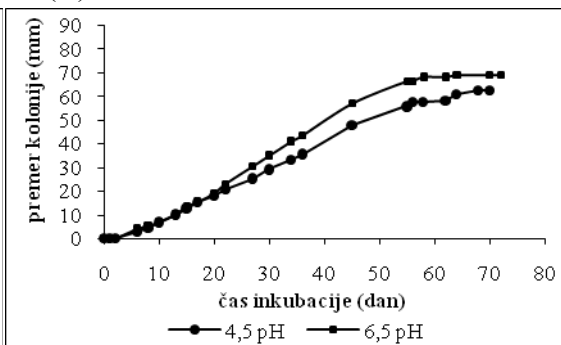


Priloga I: Vpliv pH na rast izolata 19 B na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C), a_w 0,90, 10 °C (D)

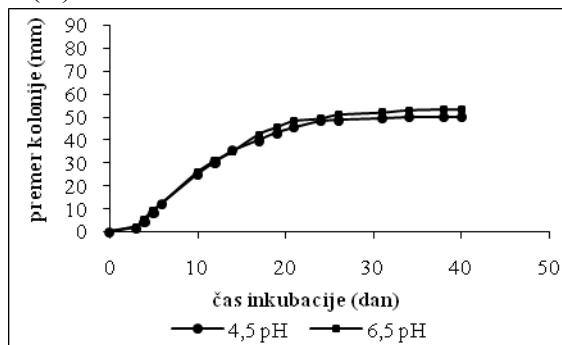
(A)



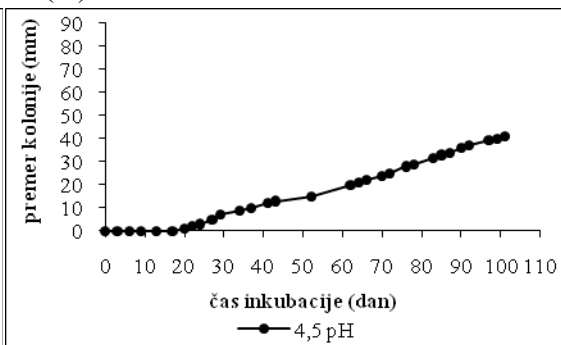
(B)



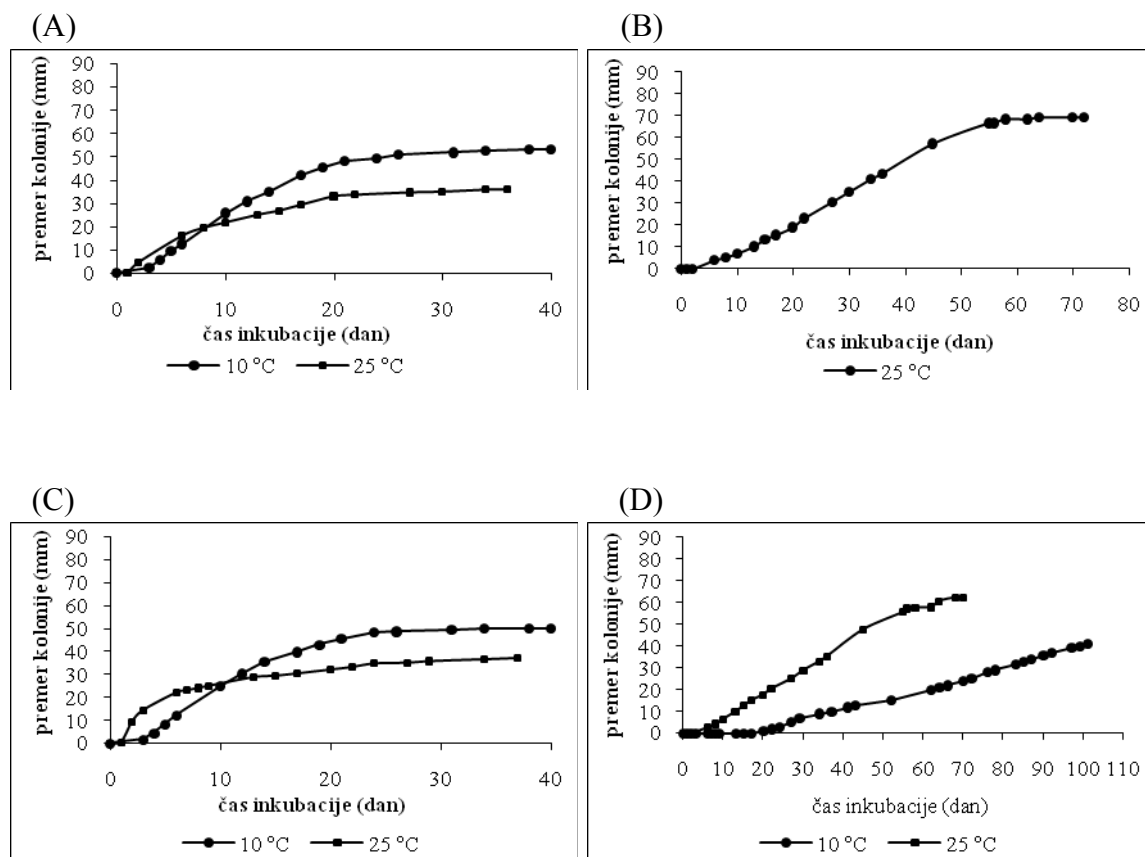
(C)



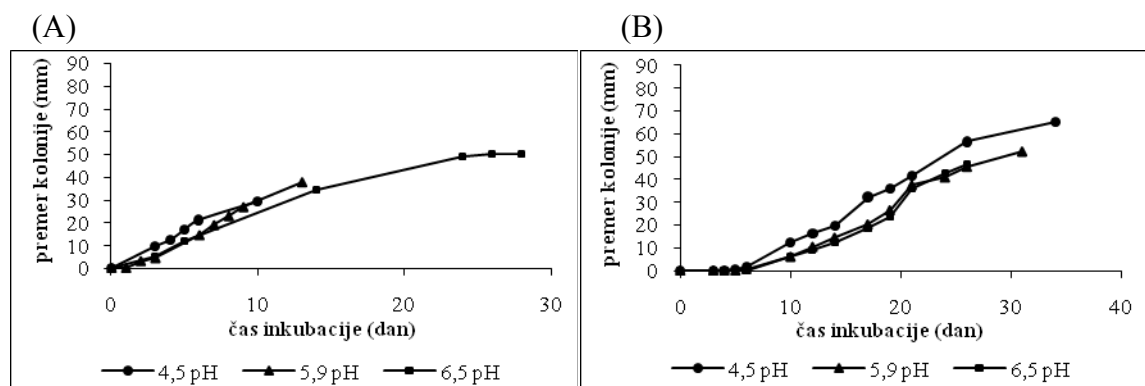
(D)



Priloga J: Vpliv temperature na rast izolata 19 B na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 (A), pH 6,5, a_w 0,90 (B), pH 4,5, a_w 0,99 (C), pH 4,5, a_w 0,90 (D)

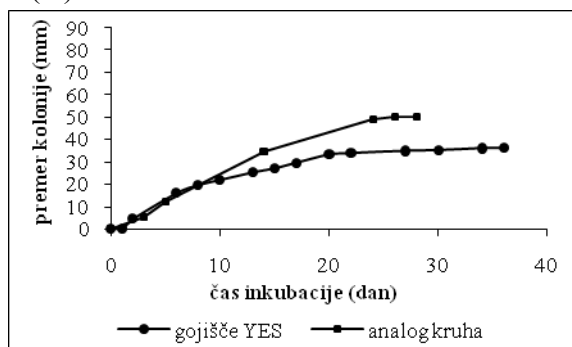


Priloga K: Vpliv pH na rast izolata 19 B na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

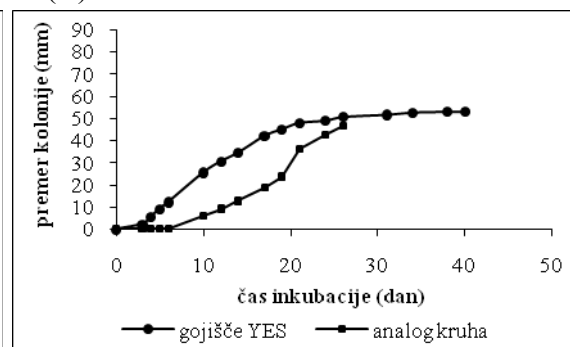


Priloga L: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 19 B pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

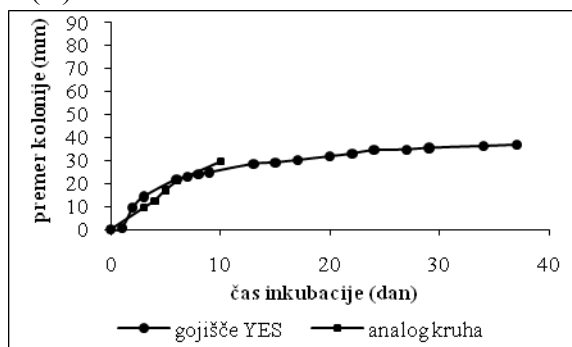
(A)



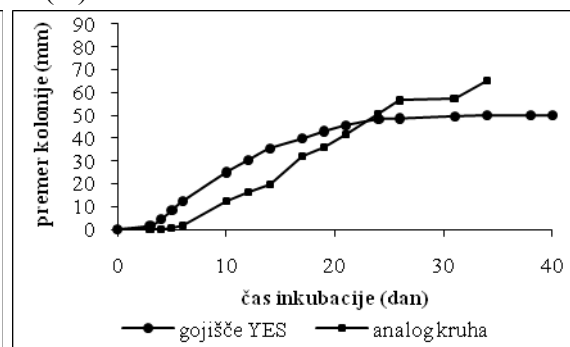
(B)



(C)

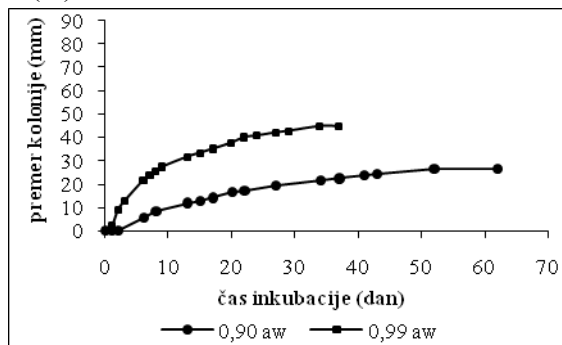


(D)

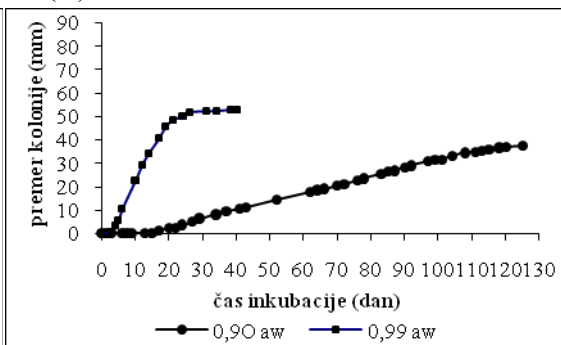


Priloga M: Vpliv a_w na rast izolata 10 B na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

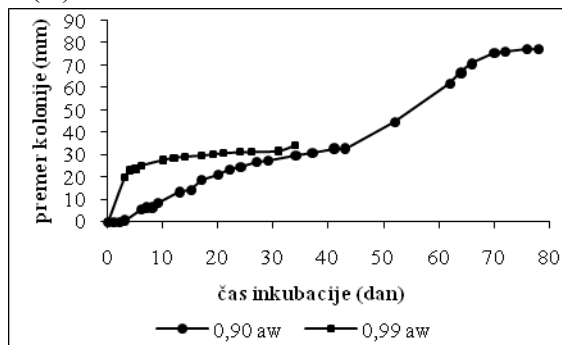
(A)



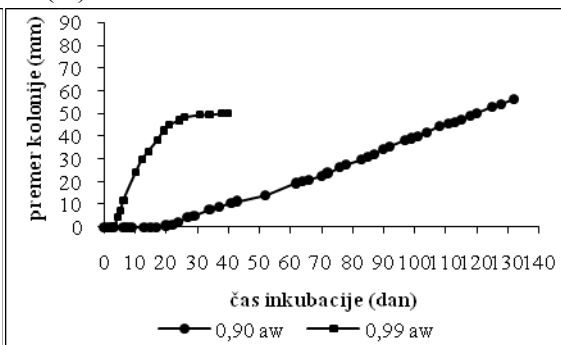
(B)



(C)

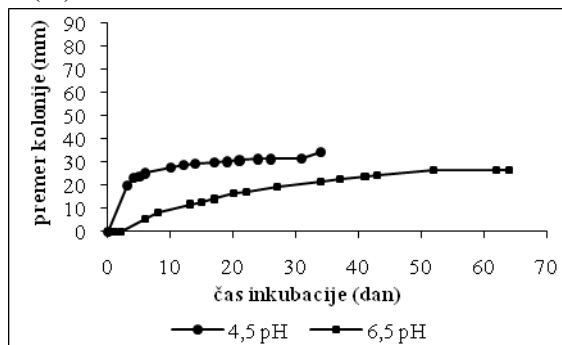


(D)

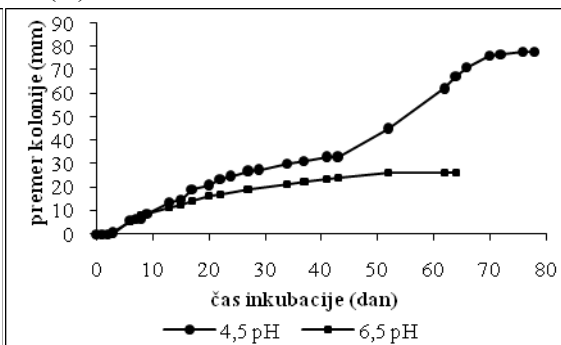


Priloga N: Vpliv pH na rast izolata 10 B na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C), a_w 0,90, 10 °C (D)

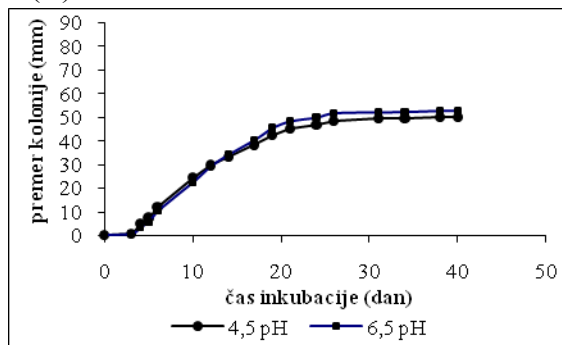
(A)



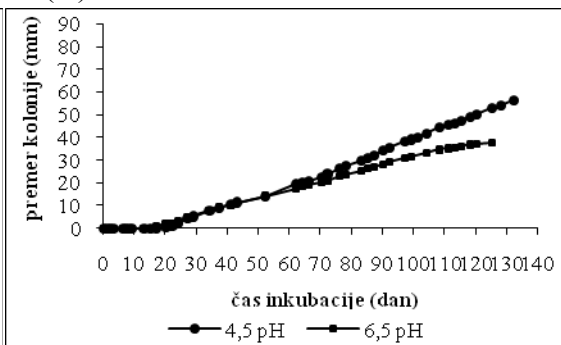
(B)



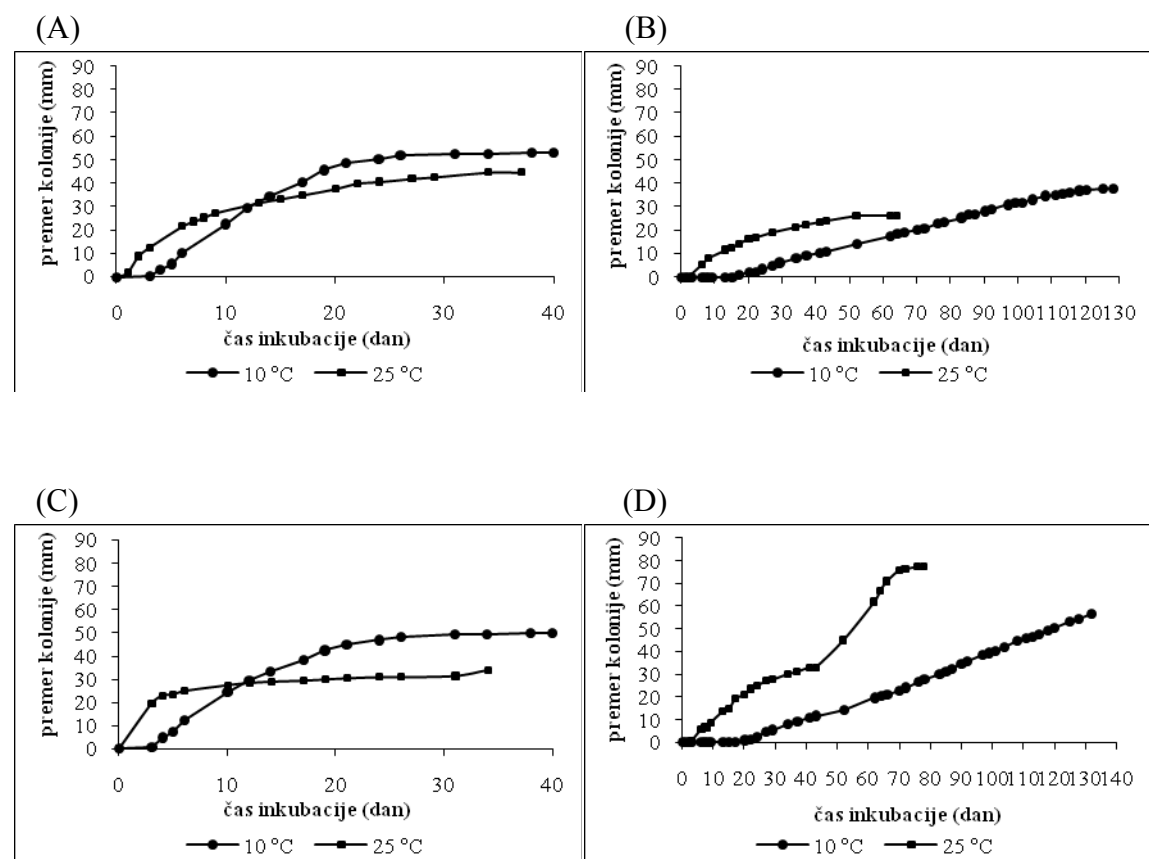
(C)



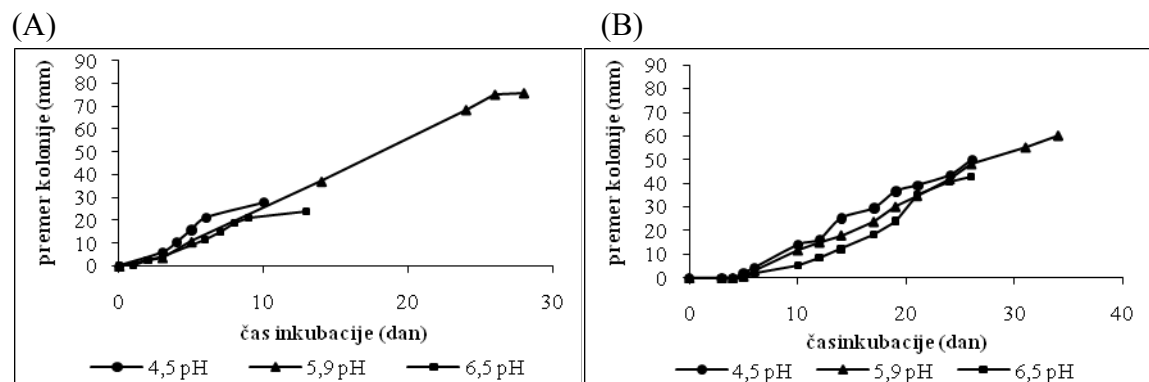
(D)



Priloga O: Vpliv temperature na rast izolata 10 B na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 (A), pH 6,5, a_w 0,90 (B), pH 4,5, a_w 0,99 (C), pH 4,5, a_w 0,90 (D)

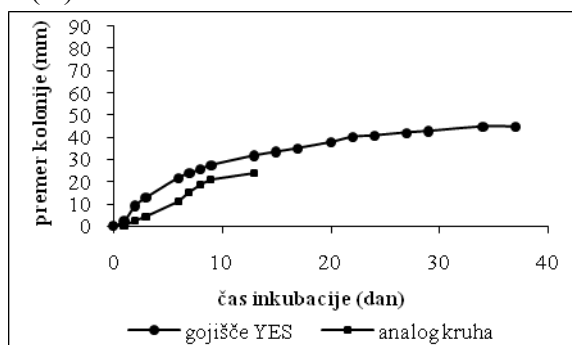


Priloga P: Vpliv pH na rast izolata 10 B na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

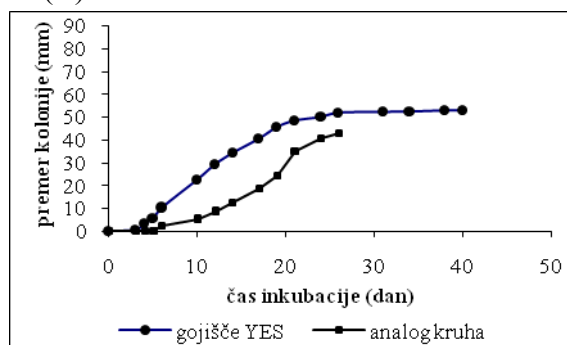


Priloga Q: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 10 B pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

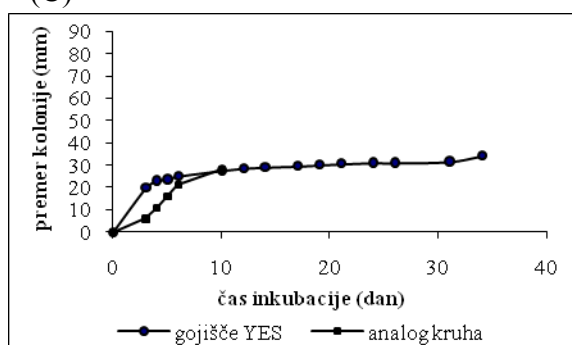
(A)



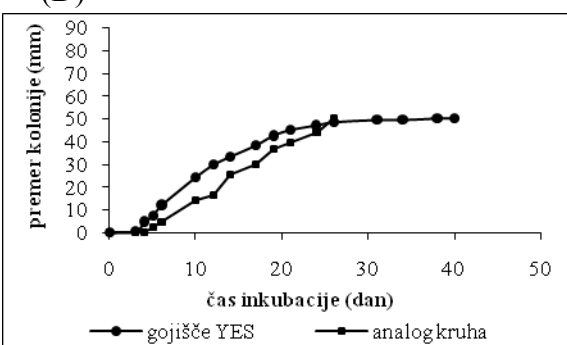
(B)



(C)

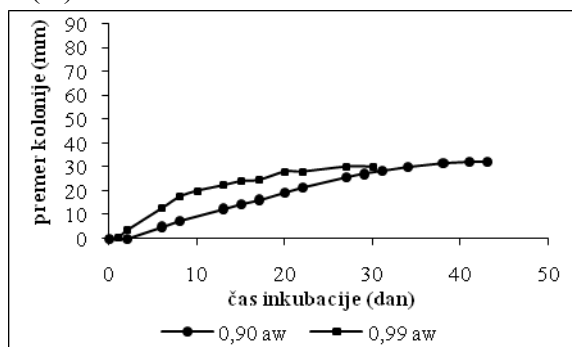


(D)

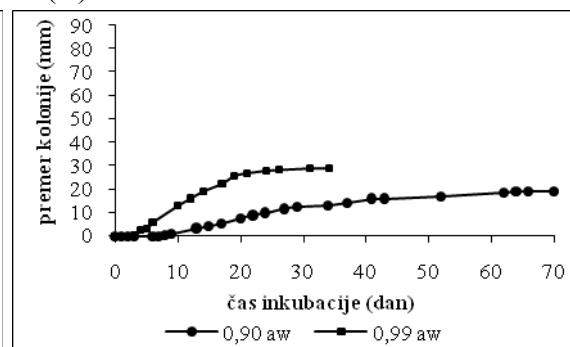


Priloga R: Vpliv a_w na rast izolata 9 C na gojišču YES pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

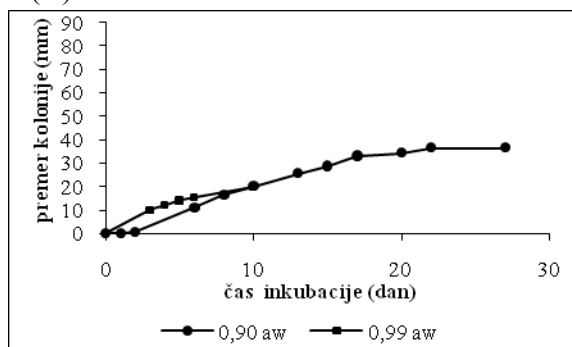
(A)



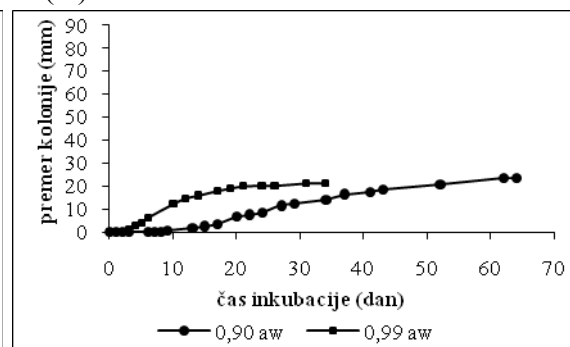
(B)



(C)

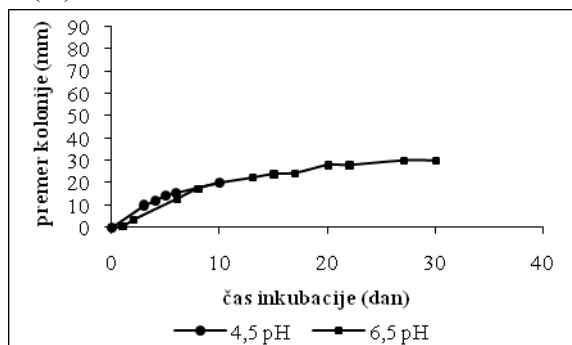


(D)

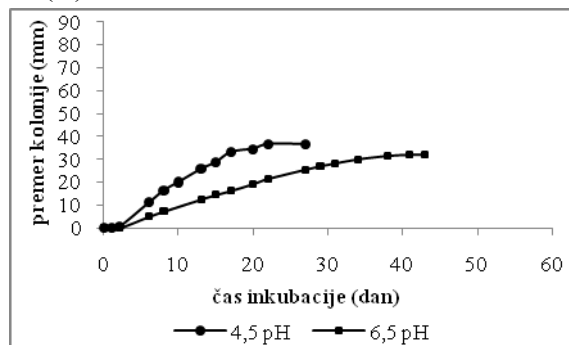


Priloga S: Vpliv pH na rast izolata 9 C na gojišču YES pri a_w 0,99, 25 °C (A), a_w 0,90, 25 °C (B), a_w 0,99, 10 °C (C), a_w 0,90, 10 °C (D)

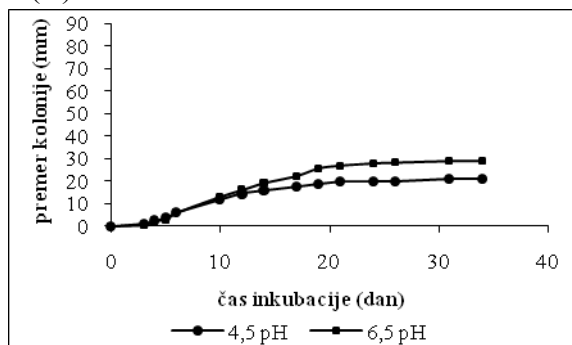
(A)



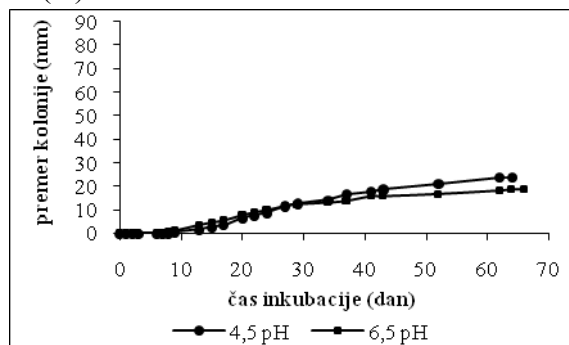
(B)



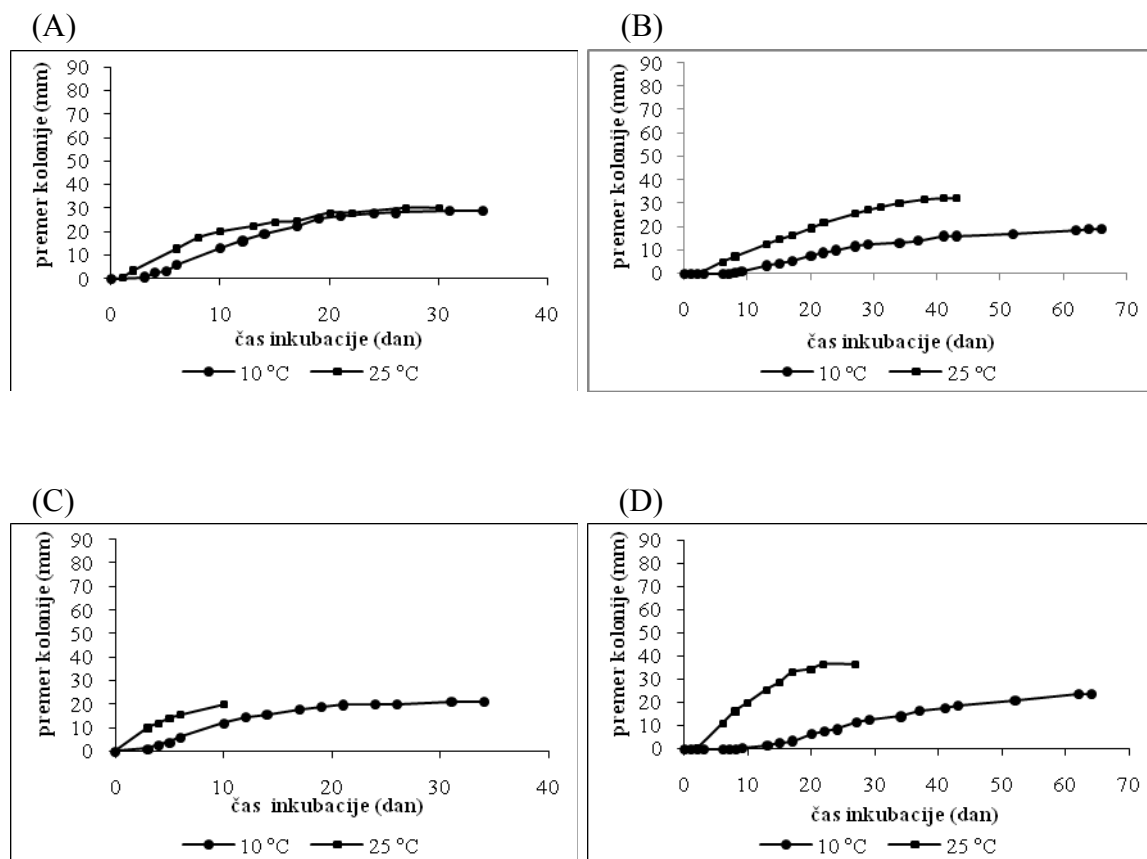
(C)



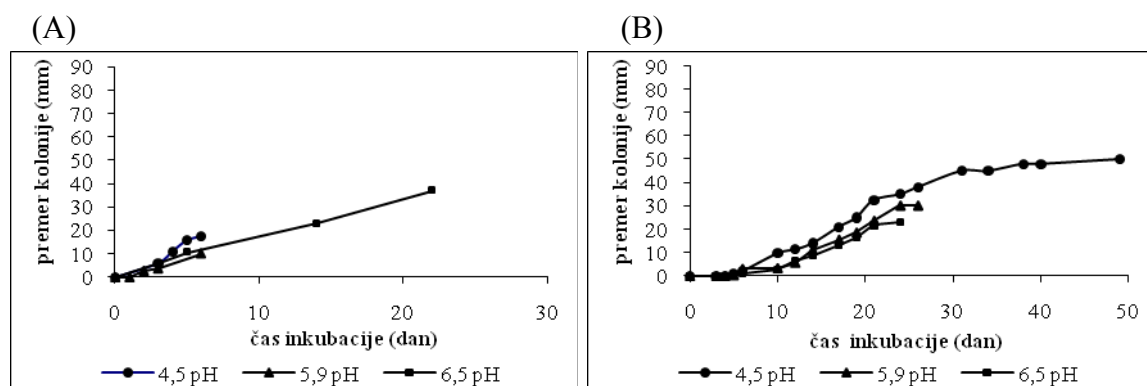
(D)



Priloga T: Vpliv temperature na rast izolata 9 C na gojišču YES pri pH 6,5, a_w 0,99 (A), pH 6,5, a_w 0,90 (B), pH 4,5, a_w 0,99 (C), pH 4,5, a_w 0,90 (D)

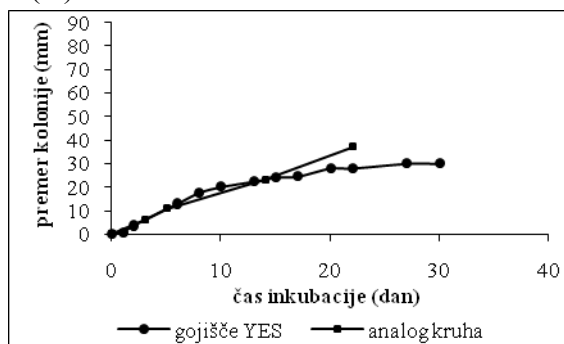


Priloga U: Vpliv pH na rast izolata 9 C na analogu kruha z a_w 0,99 pri 25 °C (A) in 10 °C (B)

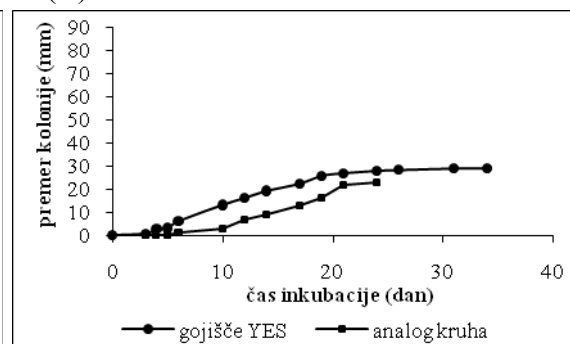


Priloga V: Vpliv vrste gojišča z a_w 0,99 na rast izolata 9 C pri pH 6,5, 25 °C (A), pH 6,5, 10 °C (B), pH 4,5, 25 °C (C), pH 4,5, 10 °C (D)

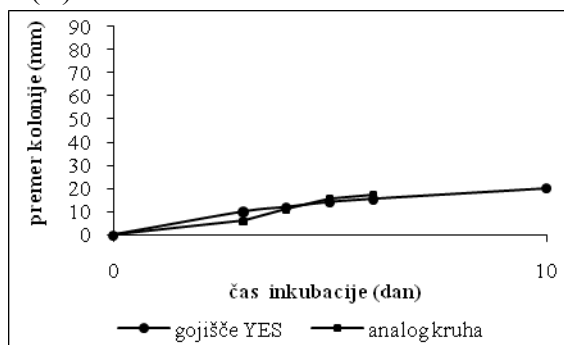
(A)



(B)



(C)



(D)

