

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Lidija STROJNIK

**RAZNOLIKOST PLESNI NA RDEČEM GROZDJU IN
V MOŠTU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Lidija STROJNIK

RAZNOLIKOST PLESNI NA RDEČEM GROZDJU IN V MOŠTU

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

**DIVERSITY OF MOULDS POPULATION ON RED GRAPES AND IN
GRAPE MUSTS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2014

Strojnik L. Raznolikost plesni na rdečem grozdju in v moštu.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Prehrana. Opravljeno je bilo na Katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Barbaro Jeršek, za somentorico izr. prof. dr. Tatjano Košmerl in za recenzentko izr. prof. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Somentorica: izr. prof. dr. Tatjana Košmerl

Recenzentka: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana soglašam z objavo svojega magistrskega dela v polnem tekstu na spletni strani digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Lidija Strojnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.67: 663.2: 582.28: 615.9 (043) = 163.6
KG	živilska mikrobiologija/grozdje/mošt/vino/grozdne sorte/vinorodni okoliš/plesni/raznolikost plesni/izolacija plesni/identifikacija plesni/ <i>Penicillium/Aspergillus</i> /mikotoksini/aflatoksin B1/ohratoksin A
AV	STROJNIK, Lidija, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
SA	JERŠEK, Barbara (mentorica)/KOŠMERL, Tatjana (somentorica)/JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2014
IN	RAZNOLIKOST PLESNI NA RDEČEM GROZDJU IN V MOŠTU
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana)
OP	XI, 60 str., 3 pregl., 39 sl., 45 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil raziskati prisotnost morebitnih ohratoksgenih in aflatoksgenih plesni v vzorcih devetih različnih grozdnih sort, namenjenih za predelavo v vino v štirih klimatsko različnih vinorodnih okoliših Slovenije (Slovenska Istra, Dolenjska, Bela Krajina in Štajerska Slovenija). Iz vzorcev grozda smo pripravili vzorce grozdnega soka, ki smo jih nato pustili, da so spontano fermentirali. Plesni smo izolirali iz vzorcev grozda, med spontano alkoholno fermentacijo in vzorcev vina (skupno 204 vzorci). Populacija plesni je bila največja na grozdju in nato je pričakovano v času fermentacije upadala. Identificirali smo devet različnih rodov plesni (<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Acremonium</i> in <i>Rhizopus</i>), 4 % izolatov pa so ostali neidentificirani. Na grozdju ter v vinu so bile najpogosteje izolirane plesni rodov <i>Penicillium</i> (v 58,6 % oz. 100 % izolatov), medtem ko so v moštu prevladovale plesni rodu <i>Aspergillus</i> (71 % izolatov). Plesni rodu <i>Penicillium</i> so bile najbolj razširjene v Štajerski Sloveniji na vzorcih grozda, medtem ko so bile plesni rodu <i>Aspergillus</i> v največji meri prisotne v vzorcih mošta v Beli Krajini. V raziskavi smo identificirali 6 vrst rodu <i>Aspergillus</i> in 24 vrst rodu <i>Penicillium</i> . Najbolj razširjene vrste so bile <i>A. japonicus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. niger</i> in <i>A. carbonarius</i> ter <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. griseofulvum</i> in <i>P. thomii</i> . Noben izolat vrste <i>A. niger</i> ni tvoril ohratoksa A (OTA) in le 31,3 % izolatov, določenih kot plesni vrste <i>A. carbonarius</i> , je bilo OTA-pozitivnih. Izolati plesni vrste <i>A. parasiticus</i> so bili aflatoksin B1 (AFB1)-pozitivni v 35,3 %. Plesni vrst <i>A. ochraceus</i> in <i>P. verrucosum</i> smo izolirali v majhnem št. vzorcev (<i>A. ochraceus</i> v 2 vzorcih, <i>P. verrucosum</i> v 1 vzorcu), vendar so bili prav vsi izolati OTA-pozitivni. Največje število OTA- in AFB1-pozitivnih sevov je bilo izolirano v Slovenski Istri, medtem ko na Dolenjskem in v Štajerski Sloveniji nismo določili OTA- oz. AFB1-pozitivnih izolatov. Ugotovili smo, da se oba toksina pojavljata le pri sortah cabernet sauvignon in shiraz. Sorte merlot, refošk in modri pinot niso vsebovale OTA ali AFB1 toksigenih plesni. Največ vzorcev je vseboval seve, ki so tvorili OTA oz. AFB1 v prvih treh dneh fermentacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDC 579.67: 663.2: 582.28: 615.9 (043) = 163.6
 CX food microbiology/grape/must/wine/grapevine varieties/wine-growing districts/
 moulds/mould diversity/mould isolation/mould identification/*Penicillium*/
 Aspergillus/mycotoxin/aflatoxin B1/ochratoxin A
 AU STROJNIK, Lidija
 AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/KOŠMERL, Tatjana (co-advisor)/JAMNIK,
 Polona (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
 Technology
 PY 2014
 TI DIVERSITY OF MOULDS POPULATION ON RED GRAPES AND IN
 MUSTS
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)
 NO XI, 60 p., 3 tab., 39 fig., 45 ref.
 LA Sl
 AL sl/en
 AB The aim of this thesis was to determine the presence of potential ochratoxin A (OTA)
 and aflatoxin B1 (AFB1) producing moulds in samples of nine red grapevine varieties
 used for wine production in four climatically different wine-growing districts in
 Slovenia (Slovenska Istra, Dolenjska, Bela Krajina, and Štajerska Slovenia). Grape
 samples were crushed into grape juice, which was then allowed to spontaneously
 ferment. Moulds were isolated from grape samples, during spontaneous alcoholic
 fermentation and from wine samples (204 samples in total). The largest population was
 found on grapes and then took a downturn during the fermentation. We identified nine
 different genera of moulds (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*,
 Alternaria, *Mucor*, *Fusarium*, *Acremonium* and *Rhizopus*), with 4 % of the isolates
 remaining unidentified. The most frequently isolated genera on grapes and in wine were
 Penicillium with 58.6 % and 100 % of isolates, respectively, while *Aspergillus* was
 dominant in the must with 71 % of isolates. *Penicillium* strains was predominantly found
 in grape samples from Štajerska Slovenija, while the *Aspergillus* strains was most
 frequently found in must samples from Bela Krajina. In total, we identified 6 species of
 Aspergillus and 24 species of *Penicillium*. The most prevalent species were *A. japonicus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. carbonarius* and *P. chrysogenum*, *P. janthinellum*,
 P. griseofulvum and *P. thomii*. None of the *A. niger* isolates produced OTA and only
 31.3 % of isolates of *A. carbonarius* was OTA-positive. Isolates of *A. parasiticus* were
 AFB1-positive in 35.3 %. *A. ochraceus* and *P. verrucosum* strains were isolated in a
 small No. of samples (*A. ochraceus* in 2 samples and *P. verrucosum* in 1 sample), but all
 of them were OTA-positive. The highest number of OTA- and AFB1-positive samples
 were isolated in Slovenian Istria, while in Dolenjska and in Štajerska Slovenia we did
 not find any OTA- or AFB1-positive isolates. We found that both toxins occur only in
 Cabernet sauvignon and Shiraz grapevines. Merlot, Refosco and Pinot Noir did not
 contain any OTA or AFB1 toxin-producing moulds. Most samples contained strains that
 produced OTA or AFB1 in the first three days of fermentation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKOTOKSIGENE PLESNI	3
2.1.1 Rod <i>Penicillium</i>	3
2.1.2 Rod <i>Aspergillus</i>	4
2.2 MIKROFLORA GROZDJA	4
2.3 MIKOTOKSINI	6
2.3.1 Aflatoksi	7
2.3.2 Ohratoksi	8
2.4 UŽIVANJE GROZDJA/VINA	9
2.5 DEJAVNIKI ZA NASTANEK MIKOTOKSINOV	10
2.5.1 Dejavniki, ki vplivajo na prisotnost plesni v vinogradu	10
2.5.2 Dejavniki, ki vplivajo na pojavnost plesni rodu <i>Aspergillus</i> in produkcijo OTA v grozdju	12
2.5.3 Trgatov in razmere po trgovini	14
3 MATERIAL IN METODE DELA	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Vzorci grozdja	16
3.1.2 Vzorci mošta in vina	16
3.1.3 Mikrobiološka gojišča	18
3.1.4 Kemikalije za pripravo suspenzije spor	19

3.1.5 Kemikalije za pripravo nativnega mikroskopskega preparata in mikroskopiranje	19
3.1.6 Kemikalije za izvedbo tankoplastne kromatografije (TLC)	19
3.1.7 Laboratorijska oprema	20
3.2 METODE	22
3.2.1 Shema dela	22
3.2.2 Priprava grozinja	23
3.2.3 Priprava grozdnega soka in potek alkoholne fermentacije	23
3.2.4 Vzorčenje grozdnega soka, mošta in vina	23
3.2.5 Izolacija in kvantifikacija plesni	23
3.2.6 Določitev makro- in mikromorfoloških lastnosti plesni	24
3.2.7 Izolacija čiste kulture	24
3.2.8 Identifikacija plesni	24
3.2.9 Precepljanje potencialno mikotoksigenih izolatov	25
3.2.10 Določitev prisotnosti mikotoksinov s TLC	25
4 REZULTATI.....	27
4.1 RAZNOLIKOST PLESNI	27
4.1.1 Razširjenost plesni v vinorodnih okoliših	27
4.1.2 Razširjenost plesni na grozdju, med fermentacijo in v vinu	31
4.1.3 Razširjenost plesni glede na sorto	31
4.2 POPULACIJA PLESNI	34
4.2.1 Spremljanje populacije plesni v vinorodnih okoliših	34
4.2.2 Spremljanje populacije plesni na grozdju, med fermentacijo in v vinu	34
4.2.3 Spremljanje populacije plesni na sortah	35
4.3 PLESNI RODOV <i>Penicillium</i> IN <i>Aspergillus</i>	36
4.3.1 Razširjenost plesni rodov <i>Penicillium</i> in <i>Aspergillus</i> na grozdju, v moštu in vinu glede na vinorodne okoliše	38
4.3.2 Razširjenost plesni rodov <i>Penicillium</i> in <i>Aspergillus</i> na grozdju, med fermentacijo in v vinu	40
4.3.3 Razširjenost plesni rodov <i>Penicillium</i> in <i>Aspergillus</i> glede na sorto	41
4.4 OHRATOKSIGENOST IN AFLATOKSIGENOST IDENTIFICIRANIH VRST PLESNI	42

4.4.1 Ohratoksigenost in aflatoksigenost identificiranih vrst plesni glede na vinorodni okoliš	44
4.4.2 Ohratoksigenost in aflatoksigenost identificiranih vrst plesni iz grozdja, mošta in vina	45
4.4.3 Ohratoksigenost in aflatoksigenost identificiranih vrst plesni glede na sorto.....	45
4.5 POSEBNOSTI PRI IZOLACIJI IN IDENTIFIKACIJI PLESNI.....	47
5 RAZPRAVA.....	52
6 SKLEPI	58
7 POVZETEK.....	60
8 VIRI	61

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Povzetek razmer, pri katerih različne vrste plesni tvorijo OTA (Amezqueta in sod., 2012)	13
Preglednica 2: Vinorodni okoliš, datum obiranja in sorta vzorcev grozdja	16
Preglednica 3: Čas in oznaka vzorcev med alkoholno fermentacijo (mošt) in po njej (vino)	17

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Penicillium</i> spp. a) kolonije na CYA, b) mikroskopski preparat, 1000x povečava	3
Slika 2: <i>Aspergillus</i> spp. a) kolonije na CYA, b) mikroskopski preparat, 1000x povečava	4
Slika 3: Stopnje tveganj za kontaminacijo z OTA na grozdju (Battilani in sod., 2008)	11
Slika 4: Shema eksperimentalnega dela	22
Slika 5: Shema gojišč za identifikacijo plesni. Shema predstavlja kombinacijo petrijev z izbranimi gojišči in temperaturami inkubacije. Številki 1 in 2 označujeta nacepljene kulture (Pitt in Hocking, 1985)	24
Slika 6: Delež izolatov plesni na grozdju iz različnih vinorodnih okolišev	28
Slika 7: Razširjenost plesni na grozdju glede na vinorodni okoliš in na skupno koncentracijo plesni v posameznem vinorodnem okolišu	28
Slika 8: Delež izolatov plesni v moštu iz različnih vinorodnih okolišev	29
Slika 9: Razširjenost plesni iz vzorcev mošta glede na vinorodni okoliš in na skupno koncentracijo plesni v posameznem vinorodnem okolišu	30
Slika 10: Razširjenost plesni rodu <i>Penicillium</i> v vzorcih vina glede na vinorodni okoliš in na skupno koncentracijo plesni v posameznem vinorodnem okolišu	30
Slika 11: Delež izolatov plesni na grozdju, v moštu in v vinu	31
Slika 12: Delež izolatov plesni na grozdju glede na sorto	32
Slika 13: Delež izolatov plesni v moštu glede na sorto	33
Slika 14: Delež izolatov plesni v vinu glede na sorto	33
Slika 15: Povprečna koncentracija plesni na grozdju, v moštu in v vinu po različnih vinorodnih okoliših	34
Slika 16: Povprečna koncentracija plesni na grozdju v različnih časih fermentacije mošta in v vinu	35
Slika 17: Povprečna koncentracija plesni na grozdju, v moštu in v vinu glede na grozdne sorte	35
Slika 18: Deleži vrst identificiranih plesni rodu <i>Aspergillus</i> na grozdju, v moštu in v vinu	36
Slika 19: Število sort pri katerih so bile vsaj enkrat določene plesni rodu <i>Aspergillus</i> na grozdju, v moštu in v vinu	37
Slika 20: Deleži vrst identificiranih plesni rodu <i>Penicillium</i> na grozdju, v moštu in v vinu	37
Slika 21: Število sort v katerih so bile vsaj enkrat določene plesni rodu <i>Penicillium</i> na grozdju, v moštu in v vinu	38
Slika 22: Razširjenost plesni rodu <i>Penicillium</i> v grozdju, moštu in vinu glede na vinorodni okoliš	39
Slika 23: Razširjenost plesni rodu <i>Aspergillus</i> v grozdju, moštu in vinu glede na vinorodni okoliš	39
Slika 24: Razširjenost plesni rodov <i>Penicillium</i> in <i>Aspergillus</i> na grozdju, v različnih časih fermentacije mošta in v vinu	40

Slika 25: Razširjenost plesni rodu <i>Penicillium</i> v grozdju, moštu in vinu glede na sorto	41
Slika 26: Razširjenost plesni rodu <i>Aspergillus</i> v grozdju, moštu in vinu glede na sorto	42
Slika 27: Povprečna koncentracija identificiranih ohratoksgenih plesni	43
Slika 28: Povprečna koncentracija identificiranih aflatoksgenih plesni.....	43
Slika 29: Povprečna koncentracija OTA-pozitivnih izolatov glede na vinorodni okoliš	44
Slika 30: Povprečna koncentracija AFB1-pozitivnih izolatov glede na vinorodni okoliš ..	44
Slika 31: Povprečna koncentracija OTA- in AFB1-pozitivnih izolatov iz grozinja, mošta v različnih časih fermentacije in iz vina	45
Slika 32: Povprečna koncentracija OTA-pozitivnih izolatov na grozdju, moštu in v vinu glede na sorto.....	46
Slika 33: Povprečna koncentracija AFB1-pozitivnih izolatov na grozdju, v moštu in v vinu glede na sorto.....	46
Slika 34: Neštavnost plošče zaradi velikega števila kolonij, ki preraščajo druga drugo....	47
Slika 35: Nenavaden apeks plesni rodu <i>Aspergillus</i> , 400x povečava.....	48
Slika 36: Izgled sporangija plesni rodu <i>Mucor</i> , 1000x povečava. Na sliki je opaziti tudi konidije, ki pripadajo plesnim rodu <i>Aspergillus</i>	49
Slika 37: Netipičen izgled plesni vrste <i>A. niger</i> oz. <i>A. carbonarius</i> , posledica večkratnega precepljanja z namenom pridobitve čiste kulture	49
Slika 38: Netipičen izgled plesni vrste <i>A. carbonarius</i> na gojišču CYA, 25 °C	50
Slika 39: Poseben izgled plesni vrste <i>A. carbonarius</i> (precepitev s plošč – Slika 38) na gojišču YES, 25 °C	50

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol Pomen

AFB1	Aflatoksin B1
CFU/mL	Št. kolonijskih enot v 1 mL; koncentracija mikroorganizmov
CYA	Gojišče Czapek agar s kvasnim ekstraktom (ang. Czapek Yeast Extract Agar)
DRBC	Gojišče dikloran-rozbengal kloramfenikol agar (ang. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar)
G25N	Gojišče 25 % glicerol nitratni agar (ang. 25 % Glycerol Nitrate Agar)
MEA	Gojišče s sladnim ekstraktom (ang. Malt Extract Agar)
OGY	Gojišče oksitetračiklin kvasni ekstrakt (ang. Oxytetracyclin Glucose Yeast Agar)
OTA	Ohratoksin A
TLC	Tankoplastna kromatografija (ang. Thin-Layer Chromatography)
UV	Ultravijolično valovanje
YES	Gojišče s kvasnim ekstraktom in saharozo (ang. Yeast Extract Sucrose Agar)

1 UVOD

Grozje je bilo včasih sezonsko sadje, sedaj pa ga potrošniki lahko kupujemo skoraj vse leto. Redko koga ne zamikajo vabljive velike grozdne jagode na stojnici ali sveže utrgan grozd iz ljubiteljskih vinogradov ali brajd, ki jih v Sloveniji res ne manjka. Še bolj kot grozdje pa ljudje cenijo in uživajo vino. Ali potrošniki vemo, kakšno grozdje jemo ali kakšno vino pijemo?

Večina ljudi preveri ali ima grozdje velike jagode, lepo barvo, če ni gnilo in je brez mehanskih poškodb. Pri vinu smo pozorni, iz katere sorte grozdja je pridelano, kakšne suhosti je in kakšna je kakovost. Ekološko ozaveščeni pogledajo tudi, ali je grozdje biološke pridelave, predvsem zaradi ostankov škropiv v jagodah. Koliko pa nas pomisli na plesnivost grozdja?

Ljudje večinoma vedo, da plesni, če jih opazimo s prostim očesom v živilu, pomenijo, da živilo ni več primerno za uživanje. Večinoma pa ne vedo, kaj plesni so in še manj zakaj so tako nevarne.

Če vidimo grozdje, ki je plesnivo, tega ne bomo kupili ali pa bomo plesnive jagode odstranili, ostale pa brez slabe vesti pojedli. Pri vinu smo v slabšem položaju. Če kupimo ustekleničeno vino, ne moremo vedeti, iz kakšne kakovosti grozdja je bilo pridelano. Nekateri vinogradniki se zavedajo slabosti prisotnosti plesni na grozdju, čeprav morda samo zaradi tega, ker plesen vpliva na slabšo aromo vina. Nekateri plesnive jagode grozdja zavržejo, vendar je bolj, predvsem v večjih vinogradih, pomembna količina vina dobljena po stiskanju, zato preventivno veliko uporabljajo razna sredstva za zaščito vinske trte (škropiva) ali pa vinu odstranijo aromo po plesni z raznimi postopki. Toda kljub škropljenju in vseh postopkih čiščenja ne moremo vedeti, koliko plesni oz. njihovih slabih produktov toksinov se je na grozdju, v moštu ali vinu obdržalo, če ne opravimo mikrobiološke analize.

Z opravljenimi mikrobiološkimi analizami smo v nalogi pridobili podatke o mikroflori glivnih vrst na grozdju in o velikosti in trendu gibanja populacije teh vrst od grozdja in mošta do vina. Z enostavno kvalitativno metodo določanja toksinov smo ocenili razširjenost dveh z vidika zdravja najnevarnejših mikotoksinov v posameznih vzorcih in na ta način dobili delen vpogled v plesni in njihove toksine v slovenskih vinogradih.

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil raziskati vpliv vinorodnega okoliša, sorte grozdja in različnih časov vzorčenja (grodje, mošt med fermentacijo, vino) na prisotnost rodov plesni, spreminjanje populacije plesni, razširjenost plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium* ter tvorbo ohratoksin A (OTA) in aflatoksin B1 (AFB1).

1.2 HIPOTEZE

Zaradi ugodnih vremenskih razmer za razvoj plesni smo predvidevali, da bo razširjenost plesni in njihova raznolikost visoka ter:

- da bodo najpogosteje identificirane plesni rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Rhizopus*,
- da bomo OTA oz. AFB1 največkrat določili pri prvih vzorčenjih, odvzetih med postopkom maceracije, pred začetkom alkoholne fermentacije,
- da bomo OTA oz. AFB1 določili pri plesnih rodu *Aspergillus*
- in da bomo največjo koncentracijo plesni, ki tvorijo toksina OTA oz. AFB1, določili v vinorodnem okolišu Slovenska Istra.

2 PREGLED OBJAV

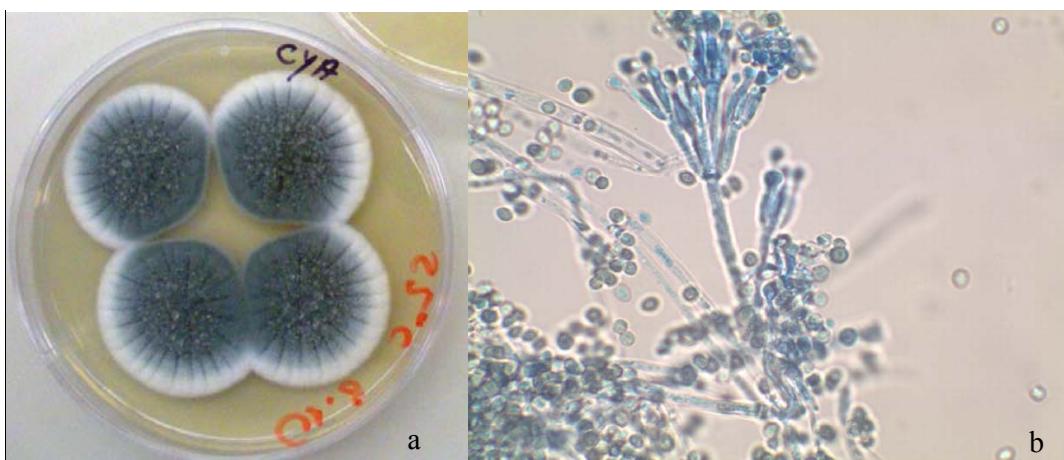
Poglavlje 2 zajema pregled objav s področja proučevanja razširjenosti in vplivov na prisotnost mikotoksigenih plesni na grozdju in produktih iz njega, v obsegu potrebnem za razumevanje raziskovalnega dela.

2.1 MIKOTOKSIGENE PLESNI

Mikotoksigene plesni sodijo med filamentozne glive. So ubikvitarni organizmi, kar pomeni, da uspevajo v vseh podnebnih razmerah po svetu tako na trdnih kot tudi v tekočih substratih (Pitt, 2000). Med drugim kolonizirajo tudi rastlinje, namenjeno prehrani in živalski krmi, kjer lahko, v ugodnih razmerah plesni rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* in *Fusarium*, sintetizirajo škodljive mikotoksine. Od teh štirih sta prva dva glavna proizvajalca mikotoksinov v sadju (Jakson in Al Taher, 2008). Zaradi zaužitja hrane rastlinskega ali živalskega izvora kontaminirane s toksigenimi plesnimi, ki so v hrano izločile mikotoksine, prihaja do bolezni imenovanih mikotoksikoze. Izpostavljenost toksičnim mikotoksinom se kaže v toksičnih odzivih, ki pa so odvisni od številnih dejavnikov, npr. toksičnosti mikotoksinov, pogostosti in časa trajanja izpostavljenosti, starosti in prehranskega statusa posameznika ter drugih možnih sinergističnih učinkih s kemikalijami, ki jim je posameznik izpostavljen (Peraica in sod., 1999).

2.1.1 Rod *Penicillium*

Za rod *Penicillium* so značilne hitro rastoče kolonije, ki so največkratobarvane zeleno, tudi sivo-zeleno, modro-zeleno, rumeno-zeleno ali belo (Slika 1a). Pod mikroskopom rod prepoznamo po značilnih metulah (simetričnih ali asimetričnih razvejitetah na koncu konidiofora), na katerih se v snopih tvorijo keglaste konidiogene celice, ki se imenujejo fialide. V njih se tvorijo verižice konidijev, ki so lahko okrogle, elipsoidne ali cilindrične oblike (Slika 1b) (Pitt in Hocking, 1985).

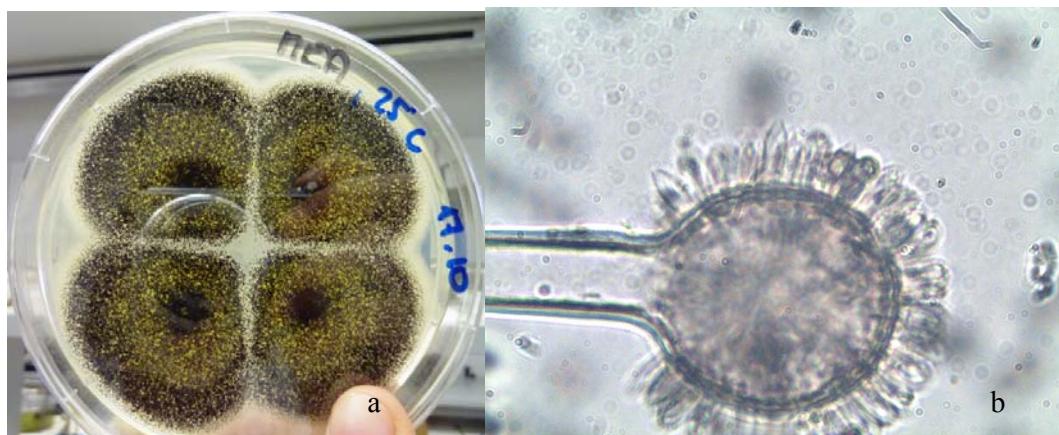


Slika 1: *Penicillium* spp. a) kolonije na CYA, b) mikroskopski preparat, 1000x povečava

Plesni rodu *Penicillium* so, glede na veliko število vrst, ki lahko rastejo v različnih različnih razmerah, najpomembnejši kvarljivci živil. Rastejo lahko pri nizkih temperaturah, nizki vodni aktivnosti (a_w) in v širokem območju vrednosti pH (Pitt in Hocking, 1985). Povzročajo kvarjenje hrane in živalske krme rastlinskega izvora, predvsem zelenjave, sadja, žitaric in stročnic. Nekatere vrste povzročajo tudi gnitje sena, redkeje pa se pojavi kolonizacija na mesu, sirih in začimbah (Logrieco in sod., 2003). Med pomembnejše mikotoksine, ki jih tvori ta rod, sodijo ohratoksin, patulin in citridin (Sweeney in Dobson, 1998).

2.1.2 Rod *Aspergillus*

Prav tako kot za rod *Penicillium* so tudi za rod *Aspergillus* značilne hitrorastoče kolonije. Te so lahko bele, rumene, rumeno-rjave, črne ali zelenkaste barve (Slika 2a). Pod mikroskopom rod prepoznamo po posebni strukturi, ki je sestavljena iz konidiofora, ki se razširi v vezikel ali mešiček, iz njega pa izhajajo metule, fialide in konidiji, ki se ločijo po velikosti, obliki, teksturi in barvi. Konidiji tvorijo kompaktno stebričasto ali pahljačasto, razvejano obliko nad oziroma okoli vezikla (Slika 2b) (Klich, 2002).



Slika 2: *Aspergillus* spp. a) kolonije na CYA, b) mikroskopski preparat, 1000x povečava

Je vsesplošno prisoten rod, ki ga najdemo na različnih substratih, poznan predvsem kot kvarljivec rastlinskih pridelkov. Rod vključuje večinoma saprofitske vrste, ki kolonizirajo odpadni rastlinski material, nekaj sevov pa lahko kolonizira tudi žive rastline. Najpomembnejši mikotoksični tega rodu so aflatoksin in ohratoksin (Logrieco in sod., 2012).

2.2 MIKROFLORA GROZDJA

Površina zrelega zdravega grozda tipično vsebuje mikrobnjo populacijo v koncentracijah $10^3\text{-}10^5$ CFU/g, ki je pretežno sestavljena iz kvasovk in številnih vrst mlečnokislinskih in ocetnokislinskih bakterij. Na poškodovanih grozdih je populacija, ki jo v velikem deležu predstavljajo filamentozne glive in ocetnokislinske bakterije, v obsegu $10^6\text{-}10^8$ CFU/g (Fleet, 1999). Dosedanje študije so pokazale, da so na grozdju kot naravna mikroflora

vedno prisotne plesni rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium* (Serra in sod., 2005; Belli in sod., 2006; Aydogdu in Gucer, 2009). Med aspergili so najpogosteje zastopani tako imenovani črni aspergili (El Khoury in sod., 2008), ki jih predstavlja sekcija Nigri. V študiji iz Španije, ki je obsegala triletno vzorčenje grozdja, sta bili iz zgoraj omenjene sekcijs najpogosteje izolirani vrsti *A. niger* (0-77 %) in *A. carbonarius* (25-100 %). Prvi je zelo redko (2-7 %) proizvajal OTA, medtem ko so skoraj vsi izolati *A. carbonarius* (78-100 %) tvorili OTA (Belli in sod., 2006). Cabanes in sod. (2013) v najnovejših raziskavah navajajo redkost v naravnem okolju prisotnih netoksigenih izolatov vrste *A. carbonarius*, kar je izkazano v kar nekaj študijah, kjer je število OTA-pozitivnih izolatov vrste *A. carbonarius* zelo veliko in dosega tudi 100 % (Cabanes in sod., 2013). Po drugi strani vrsti *A. flavus* in *A. parasiticus* proizvajata OTA med 30 in 60 % (Belli in sod., 2006; Cabanes in sod., 2013). Vrsti *P. verrucosum* in *A. ochraceus*, ki prav tako lahko proizvajata OTA, v raziskavah nista bili zaznani kot predstavnici normalne mikroflore grozdja (Cabanes in sod., 2002; Belli in sod., 2006).

Skupino *A. niger aggregate*, ki jo navaja starejša literatura, predstavljata dve vrsti: *A. niger* in *A. tubigensis*. V raziskavi, ki je bila narejena, so bile vse vrste iz skupine *A. niger aggregate* določene kot *A. niger* (Cabanes in sod., 2002).

V raziskavi enajstih vinogradov v triletni periodi (2001-2003) štirih portugalskih vinorodnih okolišev so najpogosteje izolirali pet rodov: *Cladosporium* (24 %), *Alternaria* (16 %), *Botrytis* (17 %), *Penicillium* (24 %) in *Aspergillus* (15 %) (Serra in sod., 2005). Ugotovili so, da pojavnost tako imenovanih 'plesni na polju' (*Alternaria*, *epicoccum*, *Fusarium*, *Stemphylium* in *Ulocladium*) med zorenjem grozdnih jagod upada, narašča pa pojavnost sporolirajočih plesni, kot so *Aspergillus*, *Penicillium* in *Rhizopus* (Serra in sod., 2005; Chunmei in sod., 2013). Najpogosteje določene vrste rodu *Penicillium* so bile *P. brevicompactum*, *P. glabrum/spinulosum* in *P. thomii*, med aspergili pa vrste sekcijs Nigri: *A. niger aggregate* in *A. carbonarius*. Kljub temu da je bila večina vrst določena kot netoksigena, je 8 % mikroflore grozdja tvorilo toksine (aflatoksi, OTA, patulin, trihoteceni), med katerimi je bil najpogosteje tvorjen OTA (6 % mikroflore grozdja) (Serra in sod., 2005).

V podobni raziskavi so leta 2010 v provinci Shaanxi na Kitajskem proučevali mikrofloro poškodovanega grozdja ter nagnitega grozdja treh namiznih sort in petih sort namenjenih predelavi v vino. Najpogosteje izoliran rod je bil *Aspergillus*, sledita mu rodova *Penicillium* in *Mucor*. Preostali rodovi *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium* in *Fusarium* so bili določeni v majhnih deležih in le pri nekaterih vinskih sortah. Prisotnost treh najpogostejših rodov je bila večja pri nagnitem kot pri poškodovanem grozdju. Pokazale so se tudi razlike med različnimi sortami grozdja – na splošno se je za najbolj s plesnimi kontaminirano grozje pokazala pogosto uživana namizna sorta 'Thompson seedless'. Pri tej sorti so izolirali tudi največje vsebnosti OTA (najpogosteje *A. carbonarius*) tako iz poškodovanega ($4,5 \pm 0,2 \times 10^4$ CFU/g) kot iz nagnitega ($1661,1 \pm 42,3 \times 10^3$ CFU/g) grozdja. Grozje,

namenjeno predelavi v vino, je bilo kontaminirano v bistveno manjših koncentracijah (tako skupna koncentracija plesni kot vrednost OTA). AFB1 pogosto ni bil detektiran, oziroma je bila vrednost manjša od $0,3 \times 10^3$ CFU/g (Chunmei in sod., 2013).

V raziskavi libanonskega grozinja leta 2005, je 95,5 % izoliranih vrst pripadalo rodu *Aspergillus* (najpogosteji vrsti *A. niger aggregates* 52,2 % in *A. flavus* 43,1 %), preostanek 4,5 % pa rodu *Penicillium*. Najpogosteje izolirana vrsta rodu *Aspergillus* je bila *A. niger aggregates* z 52,2 %. *A. carbonarius* je bila prisotna v zelo majhnem deležu (1,8 %), kar je v nasprotju z ostalimi mediteranskimi državami, kjer je delež te vrste večji. Je pa *A. carbonarius* edini od črnih aspergilov, ki je tvoril OTA (vsi izolati – največja vsebnost 8,4 µg/g). Druga najpogosteje izolirana vrsta rodu *Aspergillus* je bila s 43,1 % *A. flavus*, od tega je 43,4 % tvorilo AFB1 v vrednostih med 0,1 in 22,6 µg/g (El Khoury in sod., 2008).

Študija, ki je bila narejena v sezoni 2005 v Braziliji, je vsebovala 101 vzorec grozdnega soka in vin iz trgovin v Sao Paulu. 29 rdečih vin in 38 vzorcev grozdnega soka je bilo proizvedenih v Braziliji, preostalih 34 vzorcev rdečega vina pa je bilo iz uvoza (Argentina, Čile, Urugvaj, Francija, Italija, Portugalska, Španija in Severna Afrika). Rezultati so pokazali, da je pojavnost plesni v rdečih vinih iz Južne Amerike majhna, prav tako so majhne vrednosti OTA (od 0,03 do 0,3 ng/L), za razliko od evropskih mediteranskih držav, kjer je pojavnost plesni zelo velika (vsi vzorci so vsebovali OTA). Vrednosti OTA v vinu iz Južne Amerike so bile prav tako nizke (od 0,1 do 1,3 ng/mL), OTA pa ni bil detektiran v nobenem od vzorcev grozdnega soka (Shundo in sod., 2006).

2.3 MIKOTOKSINI

Mikotoksini, sekundarni metaboliti gliv, so kemijsko in temperaturno stabilne spojine, ki jih glede na strukturne podrobnosti in toksičnost razvrščamo v več skupin. Posamezna vrsta plesni lahko proizvaja enega ali več različnih mikotoksinov, prav tako je lahko enak mikotoksin proizvod različnih vrst plesni (Hussein in Brasel, 2001). Glede na njihovo delovanje in vsebnost jih uvrščajo v različne skupine. Antibiotiki so toksični za bakterije, fitotoksini so patogeni rastlinam, mikotoksini pa spadajo v skupino nizkomolekularnih spojin, ki so že v nizkih vrednostih toksične za vretenčarje in druge živalske skupine. Med slednje ne sodijo metaboliti gob, velja namreč, da filamentozne glice proizvajajo mikotoksine, gobe in druge makroskopske glice pa strupe. Med mikotoksine se prav tako ne uvrščajo drugi nizkomolekularni sekundarni metaboliti gliv (npr. etanol), ki so toksični le v visokih koncentracijah (Bennett in Klich, 2003).

Obstaja na stotine mikotksinov, vendar je le nekaj takšnih, ki jih pogosto zasledimo v hrani in pomembno vplivajo na zdravje ljudi. Med slednje CAST (ang. Council of Agricultural Science and Technology) šteje aflatoksine, trihotecene, fumonizine, zearalenone, OTA in ergot alkalioide (Serra in sod., 2005).

2.3.1 Aflatoksini

Aflatoksini so družina mikotoksinov, ki jih v kmetijskih pridelkih primarno sintetizirajo številni sevi vrst rodu *Aspergillus*, najpogosteje *A. flavus* in *A. parasiticus* (Bennett in Klich, 2003; Jackson in Al Taher, 2008). Obstajajo velike kvalitativne in kvantitativne razlike. Kot primer Bennett in Klich (2003) navajata, da samo približno polovica sevov *A. flavus* tvori aflatoksine, vendar jih ti proizvajajo v zelo velikih vrednostih, več kot 106 µg/kg. Glede na UV flourescenco in kromatografsko mobilnost ločimo štiri glavne aflatoksine: aflatoksin B1 ($C_{17}H_{12}O_6$) in B2 ($C_{17}H_{14}O_6$) pod UV svetilko florescirata modro, G1 ($C_{17}H_{12}O_7$) in G2 ($C_{17}H_{14}O_7$) pa turkizno (Bennett in Klich, 2003; Barkai-Golan, 2008).

V hrani in živalski krmi se izmed vseh aflatoksinov v najvišjih vsebnosti pojavlja aflatoksin B1, ki pri živalih povzroča največjo akutno toksičnost, sledijo mu aflatoksin G1, B2 in G2 (Barkai-Golan, 2008).

Po klasifikaciji Mednarodne agencije za raziskave raka IARC (angl. International Agency for Research on Cancer) je aflatoksin B1 mikotoksin, ki je pri ljudeh dokazano rakotvoren. Povzroča maligne tumorje, primarni tarčni organ pa so običajno jetra. Poleg rakotvornega učinka lahko na ljudi in živali deluje tudi imunosupresivno (zavira delovanje imunskega sistema), teratogeno (povzroča nepravilnosti v razvoju zarodka) in mutageno (povzroča spremembe genetskega materiala) (Richard, 2007; Barkai-Golan, 2008).

Vsebnost aflatoksinov je zaradi karcinogenih lastnosti le-teh v večini držav kontrolirana in regulatorno urejena. V Ameriki FDA (angl. Food and Drug Administration) določa največjo vsebnost vsote vseh aflatoksinov (B1, B2, G1 in G2) v hrani 20 µg/kg (FAO, 2004). V Evropski uniji je zakonodaja še strožja. Uredba ES 1881/2006 določa, uredba EU 165/2010 pa potrjuje skupno vsebnost aflatoksinov v hrani, ki ne sme preseči 10 µg/kg (gre za vsoto koncentracij aflatoksinov B1, B2, G1 in G2). V suhem sadju in zemeljskih oreščkih (arašidi) namenjenim neposredni uporabi za prehrano ljudi ali kot sestavina živil ter žitih in žitnih proizvodih, pa je dovoljena vsebnost 2 ng/g za AFB1.

2.3.1.1 Pojavnost aflatoksinov

Aflatoksini pretežno proizvedeni s strani *A. flavus* in *A. parasiticus* so najpogosteje prisotni v žitaricah, začimbah, oljnih semenih, oreščkih, maslu in mleku (Logrieco in sod., 2003). Veliko tveganje za naravno prisotnost ohratoksinov predstavlja sadje: arašidi, pistacije in oreščki, brazilski oreščki in fige. Majhno tveganje za okužbe pa predstavljajo mandlji, orehi, lešniki in rozine (Battilani in sod., 2008). Do okužbe svežih produktov, kot so žitarice, kava, kakav, suho sadje in začimbe, običajno pride med skladiščenjem. Občasno pa se okužbe pojavijo tudi med pridelavo na polju, posledično so aflatoksinii prisotni tudi v raznih sadnih sokovih in vinu (Bhat in sod., 2010). Sadje se večinoma kontaminira na poljih, ugodni skladiščni pogoji pa pogosto vplivajo na povečanje količine mikotoksinov (Bennett in Klich, 2003; Battilani in sod., 2008).

2.3.2 Ohratoksini

Ohratoksini A, B, C, D so velika skupina sekundarnih metabolitov številnih sevov rodov *Aspergillus* in *Penicillium*. Iz te skupine je ohratoksin A ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) najbolj toksična spojina, ki je tudi največkrat tvorjena. Proizvajajo ga primarno plesni vrste *A. ochraceus* in *P. verrucosum* (Richard, 2007; Barkai-Golan, 2008). Je imunosupresiven in potencialno teratogen, po klasifikaciji IARC pa tudi potencialno rakotvoren za človeka (skupina 2B) (Bennett in Klich, 2003). OTA, ki je med mikotoksini največkrat najden v krvi ljudi, najden je bil tudi v materinem mleku in v serumu novorojenčkov (Bennett in Klich, 2003; Barkai-Golan, 2008), ima potencialno tudi genotoksično (povzroča genetske spremembe) in nefrotoksično (povzroča poškodbe ledvic) delovanje. Povezan je z obolenjnostjo Balkanska endemska nefropatijska, kjer je kot agent odgovoren za povzročitev te smrtnih bolezni ledvic (Jackson in Al Taher, 2008).

Zaradi morebitnih posledic za človekovo zdravje je Evropska unija tudi za OTA z uredbo ES 1881/2006 nato pa še z dopolnitvijo te uredbe EU 105/2010 določila največje koncentracije v posamezni hrani. Za vino iz grozdja je določena največja vsednost 2,0 µg/kg, za grozdni sok 2,0 µg/kg in rozine 10,0 µg/kg. Viri navajajo, da je vino na drugem mestu za žitaricami kot glavni vir dnevnega vnosa OTA. Grozdni sok in rozine pa so glavni vir OTA pri dietah, posebno pri mladih otrocih (Jackson in Al Taher, 2008).

2.3.2.1 Pojavnost ohratoksin A

Ohratoksin A, eden izmed najnevarnejših mikotoksinov, se najpogosteje pojavlja v žitaricah. Pomemben vir predstavljajo še različna živila, kot so kavna zrna, kakavova zrna, oreščki, pivo, vino, grozdni sokovi, začimbe in suho grozdno sadje (rozine, sultanine, kurinte) (EFSA, 2006; Jackson in Al Taher, 2008).

Od prvih raziskav o pojavnosti OTA v vinu (Zimmerli and Dick, 1996) so kasneje tako v Evropi, kot v Avstraliji in Ameriki potekale številne raziskave o pojavnosti toksinov v vinu (Jackson in Al Taher, 2008).

Miraglia in Brera (2002) navajata nivo kontaminacije v velikosti 15,6 µg/L južni Evropi. Največje vrednosti OTA so bile določene v rdečem vinu in sladkih vinih, pridelanih iz nasocu posušenih grozdnih jagod (Mateo in sod., 2007; Jackson in Al Taher, 2008).

OTA pa ne kontaminira le vina, temveč tudi druge proizvode iz grozdja. Raziskave na grozdnem soku so pokazale, da skoraj nobeden vzorec grozdnega soka iz belega grozdja ni vseboval OTA (pri tistih, ki so jih vsebovali, pa je bila vsebnost majhna), medtem ko so skoraj vsi vzorci proizvodov iz rdečega grozdja vsebovali OTA v velikih vrednostih (Jackson in Al Taher, 2008). Miraglia and Brera (2002) poročata o vsebnosti OTA 5,3 µg/L v nemških vzorcih grozdnega soka.

Kis: raziskave prav tako navajajo vsebnosti toksinov v kisu, in sicer večje vsebnosti OTA v balzamičnem kisu (102 -252 ng/L) kot v navadnem (Jackson in Al Taher, 2008).

Suho sadje: Vsebnosti OTA za rozine, sultanine, korinte so v splošnem večje kot v vinu oz. grozdnem soku, okoli 50-70 µg/kg (Miraglia and Brera, 2002). Po nekaterih raziskavah naj bi kar 88 % vzorcev (rozine, sultanine, korinte) vsebovalo OTA v območju od 0,2-53,6 µg/kg. Vsebnost OTA je v drugem suhem sadju značilno manjša kot 3 µg/kg. Iz rezultatov je razvidno, da je suho grozdje lahko v velikih količinah onesnaženo z OTA. Ta in ostale podobne raziskave vsebujejo zato pomembne podatke za ljudi, ki veliko uživajo rozine, posebej otroci (Jackson in Al Taher, 2008).

2.4 UŽIVANJE GROZDJJA/VINA

Proizvodnja vina v Evropi predstavlja kar 75 % svetovne proizvodnje (Battilani in sod., 2006; Belajova in Rauova, 2007), največje pridelovalke grozdja leta 2012 so bile Kitajska, ZDA, Italija, Francija in Španija (FAOSTAT, 2014). Z 62,3 L/prebivalca ima največjo porabo vina Vatikan, Slovenija je na 6. mestu z 45,1 L/prebivalca leta 2011 (Wine Institute, 2011). Poraba grozdja (absolutno) je največja na Kitajskem, v 27 državah Evropske unije in v Turčiji (USDA, 2012). Okužba grozdja in grozdnega soka predstavlja še posebej veliko skrb, odkar so glavni potrošniki otroci in odkar je poraba grozdnega soka večja kot poraba vina (Terra in sod., 2012). Sprejemljiv dnevni vnos OTA je 5 ng/kg telesne mase/dan (Terra in sod., 2012).

V okviru Direktive Sveta 93/5/EGS, 25. februarja 1993, o pomoči Komisiji in sodelovanju držav članic pri znanstvenem proučevanju vprašanj v zvezi z živili (SCOOP) je bila izvedena ocena vnosa OTA s hrano pri prebivalstvu Skupnosti. Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) je na zahtevo Komisije, ob upoštevanju novih znanstvenih spoznanj, sprejela in posodobila znanstveno mnenje v zvezi z OTA v hrani z dne 4. aprila 2006 in določila sprejemljiv tedenski vnos 120 ng/kg telesne mase. Na podlagi teh mnenj je določila mejne vrednosti za žita, žitne proizvode, suho grozdje, praženo kavo, vino, grozdnji sok ter živila za dojenčke in majhne otroke, ki bistveno prispevajo k splošni izpostavljenosti ljudi OTA ali izpostavljenosti občutljivih skupin potrošnik kot so otroci (Uredba komisije ES 1881/2006; Uredba komisije EU 105/2010).

EFSA (2006) podaja oceno izpostavljenosti OTA, ki združuje podatke o analizi živil s podatki o dejanski porabi hrane za tri države članice EU (Francija, Italija, Švedska). Ocenjene vrednosti izpostavljenosti povprečnega potrošnika (2 do 3 ng/kg telesne mase na dan) in velikega potrošnika (od 6 do 8 ng/kg telesne mase na dan) kažejo, da izpostavljenost OTA giblje med 15 do 20 ng/kg telesne mase na teden oziroma med 40 in 60 ng/kg telesne mase na teden pri potrošniku z veliko potrošnjo. Pri dojenčkih, otrocih in drugih segmentih prebivalstva, ki predstavljajo veliko potrošnjo določenih vrst živil, lahko pride tudi do večje stopnje izpostavljenosti.

Na podlagi podatkov o pojavnosti OTA v živilih in živilskih proizvodih ter njihovi porabi, je bilo ugotovljeno, da k vnosu OTA (50 %, 0,06-1,28 ng/kg telesne mase na dan) največ prispevajo živila iz skupine žitaric, sledijo vino (13 %, 0,02-0,86 ng/kg telesne mase na

dan) in kava (10 %, 0,06-0,42 ng/kg telesne mase na dan), preostalih 27 % pa predstavljajo začimbe, pivo, kakav, suho sadje, sadni sokovi in meso. Glede na celotno populacijo je bil vnos OTA v razponu od 0,13 ng/kg telesne mase na dan v Grčiji, do 3,14 ng/kg telesne mase na dan v Nemčiji (WHO, 2001).

2.5 DEJAVNIKI ZA NASTANEK MIKOTOKSINOV

Kljud prizadevanjem za omejitve kontaminacije plesni v hrani so mikotoksigene plesni vseprisotni kontaminanti v naravi in najdejo svoje poti v sadje na polju oz. sadovnjaku, kadarkoli med zorenjem, predelavo, skladitiščenjem ali prodajo (Serra in sod., 2005; Jackson in Al Taher, 2008). Čeprav je sadje zaradi visoke vodne aktivnosti, vsebnosti sladkorja in prisotnost organskih kislin, ki dajo mesu sadja nižji pH, dovzetnejše za glivične okužbe, vsebuje, tako kot mnogo drugih živil, kemijske in/ali fizikalne lastnosti, ki preprečujejo glivično ali mikrobeno razrast. Tako je relativno malo rodov sposobnih kolonizacije sadja. Nekatere vrste plesni so specializirani patogeni in napadajo samo določene vrste sadja, medtem ko imajo nekatere bolj splošne sposobnosti za napad na tkivo sadja. Prav tako prisotnost toksin-producirajoče plesni ne pomeni nujno, da je toksin tudi prisoten. Tvorba toksina je namreč povezana z mnogimi dejavniki, kot so okoljske razmere, vrsta, sorta, vsebnost hranil, mikrobiološka obremenitev in vrsta oz. sev plesni. Prav tako je bilo raziskano tudi, da iste razmere, ki prispevajo k ugodni rasti plesni, ne pomenijo nujno tudi ugodne proizvodnje toksinov (Jackson in Al Taher, 2008).

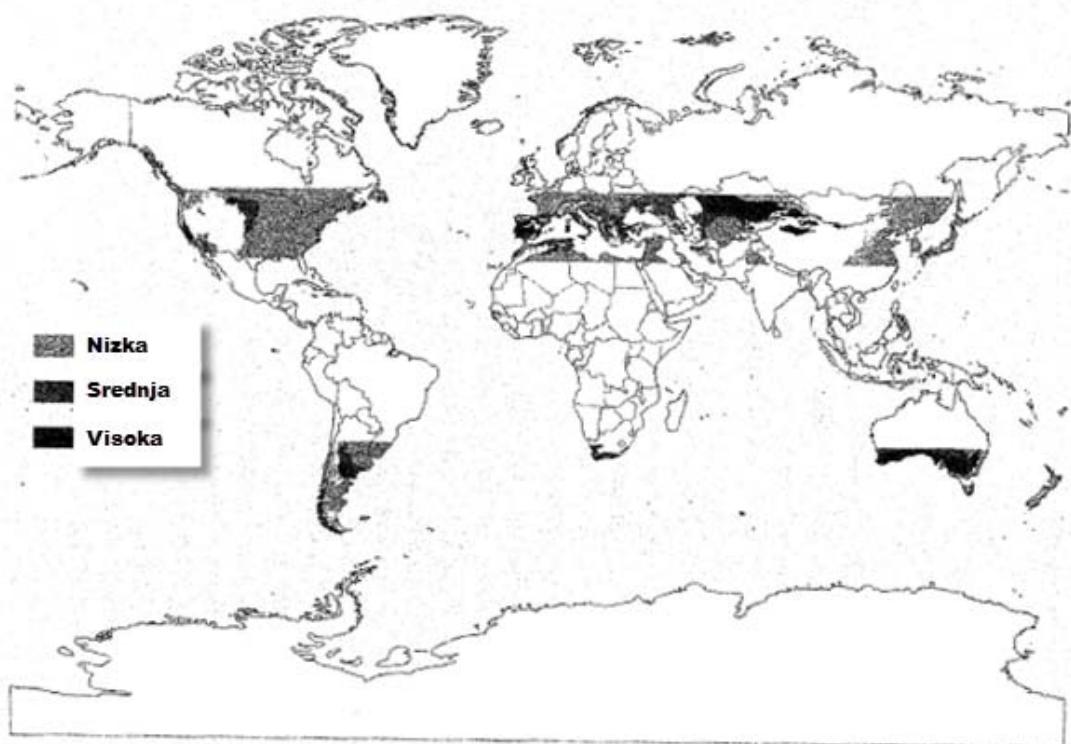
V naslednjem poglavju so podrobneje predstavljeni dejavniki, ki vplivajo na prisotnost plesni in njihovih toksinov (predvsem črnih aspergilov in OTA) pred trgovinjo, ob trgovini in po njej.

2.5.1 Dejavniki, ki vplivajo na prisotnost plesni v vinogradu

ZEMLJA: Plesni vrst *A. carbonarius* in *A. niger* živijo v zemlji, ki je njihov primarni substrat (Hocking in sod., 2007). Spore teh vrst se po vinogradu razširjajo s toplimi (25-30 °C) zračnimi tokovi (Battilani in sod., 2008). Posebno ugoden, s sladkorji bogat substrat, predstavlja zemlja, na katero so popadale poškodovane ali odmrle grozdne jagode (Amezqueta in sod., 2012), pa tudi zemlja, na kateri raste veliko plevela oz. drugih zelenih prekrivnih rastlin (Hocking in sod., 2007). Spore zelo dobro prenašajo nižjo vodno aktivnost, poleg tega so črne barve, kar jim omogoči dobro odpornost na sončno svetlobo, tako preživijo tudi večnevno sušenje sonca. Vse to, ob dobrih temperturnih razmerah, omogoča veliko okužbo grozdja v vinogradih (Battilani in sod., 2008).

PODNEBJE: Aflatoksigene plesni so zelo pogoste in lahko rastejo na številnih različnih substratih, v mnogih razmerah, vendar izrazito uspevajo v vročem, vlažnem, subtropskem ali tropskem podnebju (Jackson in Al Taher, 2008). Vrsta *P. verrucosum* – ohratoksigena plesen se pojavlja v hladnejših, vlažnih območjih S Evrope, medtem ko *A. carbonarius*, najpogostejši tvorec OTA, prevladuje v območjih s toplejšim podnebjem. Ohratoksigene plesni tako poleg pridelkov, ki zorijo v tropskih in subtropskih regijah, kontaminirajo predvsem pridelke mediteranskega podnebja (Jackson in Al Taher, 2008).

Izkazalo se je, da je prisotnost OTA na grozdju odvisna od zemljepisne širine vinorodnega območja. Stopnje tveganj kontaminacije z OTA so predpostavljene na osnovi kombinacije povprečne temperature in vsote dežja (mm), avgusta na severni in februarja na južni polobli, in so prikazane na sliki 3 (Battilani in sod., 2008). Na splošno velja, da manjša kot je geografska širina, bolj pogosta je prisotnost in večja je vsebnost (Battilani in sod., 2006; Battilani in sod., 2008). Toplejša območja imajo večjo pojavnost OTA kot hladnejša območja (Jackson in Al Taher, 2008).



Slika 3: Stopnje tveganj za kontaminacijo z OTA na grozdju (Battilani in sod., 2008)

Na severni polobli so določena območja z velikim tveganjem (vroče podnebje s povečano vlažnostjo oz. padavinami (Hocking in sod., 2007): v Evropi pretežno okoli mediteranskega morja, z največjim tveganjem na španskem in pirenejskem polotoku, ter v Grčiji in Turčiji ter v južni Franciji – izjema je Portugalska, kjer je tveganje za prisotnost OTA majhno (Battilani in sod., 2006; Battilani in sod., 2008). Območja severne Afrike ne predstavljajo velikega tveganja za prisotnost OTA, predvsem zaradi visokih temperatur in majhne količine dežja, ki so ustreznejši pogoji za tvorbo AFB1. Podobno je v Severni Ameriki (Kalifornija). Na južni polobli obstaja veliko tveganje za prisotnost OTA v Avstraliji in na jugu Afrike, medtem ko je tveganje v Južni Ameriki manjše (Battilani in sod., 2008).

2.5.2 Dejavniki, ki vplivajo na pojavnost plesni rodu *Aspergillus* in produkcijo OTA v grozdju

ZDRAVSTVENO STANJE GROZDJJA: Okužba se najprej pojavi na poškodovanih ali nagnitih (Hocking in sod., 2007) zrelih grozdnih jagodah, od koder se ob ugodnih temperaturnih razmerah razširi na celoten grozd. Mehanske poškodbe (razpoke oz. rane) povzroči hranjenje insektov ali ptic z jagodami, kar povzroči predrtje grozdnega tkiva in omogoči plesnim naselitev v notranjost, ki postane idealen habitat za njihovo razmnoževanje (Battilani in sod., 2008). Povezavo med poškodovanimi grozdnimi jagodami in vsebnostjo OTA v vinu so potrdili v raziskavi, v katero je bilo vključenih 156 vinogradov na jugu Francije. Ugotavljalni so vsebnost OTA v vinu glede na majhno, srednje ali veliko število poškodovanih jagod. Največjo vsebnost OTA ($>2 \mu\text{g/L}$) je povzročila kombinacija velikega števila poškodovanih jagod in povprečne temperature nad 21°C (Clouvel in sod., 2008).

V raziskavi na Kitajskem so Chunmei in sod. (2013) odkrili povezavo med veliko onesnaženostjo zraka s sporami plesni in visoko stopnjo kontaminacije grozdnih jagod. Povezava velja za rodova *Aspergillus* in *Pencillium*, ni pa nujno, da visoka koncentracija spor v zraku pomeni tudi visoko celokupno kontaminacijo grozdja. Ugotovili so, da je prisotnost rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in *Mucor* večja pri nagnitih grozdnih jagodah kot v poškodovanih grozdnih jagodah.

VREME : Različne vremenske razmere vplivajo na razlike med vinskimi letniki, pa čeprav gre za isto območje (Battilani in sod., 2006). Primerena temperatura in primerena vlaga oz. vodna aktivnost sta pomembna okoljska dejavnika, ki vplivata na pojavnost plesni ter njihovo produkcijo mikotoksinov (Battilani in sod., 2006; Amezqueta in sod., 2012). Amezqueta in sod. (2012) so raziskali različne pogoje (temperatura, vodna aktivnost, število dni starosti micelija) in ugotovili, da različni sevi tvorijo OTA pri različnih temperaturah (Preglednica 1). Tako sta vrsti *P.verrucosum* in *A. ochraceus* sposobni tvoriti OTA pri nižjih temperaturah kot vrsti *A. carbonarius* in *A. niger*, ki OTA tvorita pri višjih temperaturah. Optimalna temperatura in a_w , pri kateri določena plesen uspeva, ter optimalna temperatura in a_w , pri kateri ista plesen tvori toksin, se praviloma razlikujejo. Tako večina plesni vrste *A. carbonarius* raste optimalno med 30 in 35°C , optimalna a_w pa je $0,93$ do $0,99$. Optimalna temperatura za rast plesni vrste *Aspergillus niger* je med 30 in 37°C , optimalna a_w pa med $0,9$ in $0,995$ (Battilani in sod., 2008).

Preglednica 1: Povzetek razmer, pri katerih različne vrste plesni tvorijo OTA (Amezqueta in sod., 2012)

	<i>P. verrucosum</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>
Min. T (° C)	4 – 10	5 – 10	5 – 15	10 – 15
Max. T (° C)	21 – 31	30 – 40	30 – 45	35 – 41
Optimalna T (° C)	24 – 25	20 – 35	15 – 30	15 – 35
Min. a_w	0,80 – 0,83	0,87 – 0,90	0,85 – 0,94	0,90 – 0,95
Optimalna a_w	0,95 – 0,99	0,95 – 0,99	0,95 – 0,99	0,95 – 0,99
Min št. dni	7	3	2 – 5	3 – 7
Optimalno št. dni	> 14	9 – 21	10 – 15	5 – 30

Optimalne razmere za rast plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus* so 35 °C in a_w 0,95 (Jackson in Al Taher, 2008). Optimalna T za produkcijo aflatoksinov (*A. flavus* in *A. parasiticus*): 35 °C, 0,95 a_w oz. 33 °C in a_w 0,99. Nobena vrsta ne proizvaja toksinov pri temperaturah pod 7,5 °C oz. nad 40 °C (Barkai-Golan, 2008).

VRSTA SADJA, SORTA GROZDJA (HRANILA V SUBSTRATU): V številnih študijah je bilo ugotovljeno, da je grozdje najbolj dovetno za kontaminacijo s črnimi aspergili v obdobju zrelosti do trgatve. Takrat se grozdna kožica zmehča in postane še bolj dovetna za poškodbe. Delež sladkorja naraste, sadje z visokim deležem ogljikovih hidratov (OH) pa predstavlja odličen substrat za razrast plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium* ter proizvodnjo OTA (Hocking in sod., 2007; Amezqueta in sod., 2012; Chunmei in sod., 2013).

Pomemben podatek predstavlja tudi vrednost pH grozinja oz. grozdnega soka, ki se med zorenjem grozinja zvišuje, načeloma pa ne preseže vrednosti pH 4,5. Rast plesni vrste *A. carbonarius* je boljša pri pH 4 oz. 7, kot pri pH 2,6. Najboljša produkcija OTA v poskusu je bila pri pH 7 (Battilani in sod., 2008).

VRSTA, SEV PLESNI: Sekcija *Aspergillus* Nigri vključuje nekaj vrst, ki jih je izredno težko identificirati s klasičnimi metodami, saj razlike med njimi večinoma temeljijo na uniseratni ali biseratni porazdelitvi konidijskih glav ter na velikosti in hrapavosti konidijev. Velja, da uniseratne vrste ne tvorijo OTA, medtem ko biseratne vrste pogosto tvorijo OTA in sicer v velikih vsebnostih (velja za vrsto *A. carbonarius*) ali pa je produkcija OTA redka in v majhnih vsebnostih (velja za vrsto *A. niger aggregate*) (Battilani in sod., 2008).

Analiza suhega grozinja iz Argentine je pokazala, da je *A. niger* bila najpogosteje določena vrsta, vendar so le trije od 293 izolatov tvorili OTA, medtem ko je bila vrsta *A. carbonarius* manj pogosta (48 izolatov), vendar je kar 96 % izolatov bilo OTA-pozitivnih (Romero in sod., 2005; Battilani in sod., 2008).

Analize zemlje v Italiji so pokazale, da kar 60 % izolatov predstavlja *A. niger aggregate* in le 19 % *A. carbonarius*. Slednji je bil OTA-pozitiven v 60 % (Battilani in sod., 2008).

Aspergillus flavus je v raziskavi El Khoury in sod. (2008) predstavljal 43,1 % vseh aspergilov, ki so bili določeni. AFB1 je tvorili pri 43 % izolatov te vrste.

Raziskana je bila kontaminacija grozja s plesnimi vrste *A. carbonarius* in posledično pojavnost OTA glede na različne sorte vinske trte. Prisotnost OTA je bila majhna pri groznih sortah kot so 'Bianco d'Alessano', 'Pampanuto' in 'Uva di Troia', v nasprotju s sortami 'Cabernet Sauvignon', 'Trebiano' in 'Verdeca', ki so kazali veliko vsebnost OTA (Battilani in sod., 2008). V drugi raziskavi Chunmei in sod. (2013) navajajo veliko vsebnost OTA predvsem pri namiznem grozdju sort 'Thompson Seedless' ($1,67 \times 10^7$ CFU/g) in 'Red Earth' ($105,0 \times 10^3$ CFU/g). Vsebnosti OTA pri grozdju namenjenemu predelavi so bile največje pri 'Pinot Noir' ($15,3 \times 10^3$ cfu/g).

INTERAKCIJE: Interakcije plesni vrste *A. carbonarius* z ostalimi plesnimi, ki so del mikroflore grozja, kot so plesni vrst *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium janthinellum* in *Trichoderma harzianum*, zavirajo produkcijo OTA, medtem ko interakcije s plesnimi vrst *Eurotium amstelodami* in *Candida spp.* stimulirajo produkcijo OTA (Barkai-Golan, 2008).

UPRAVLJANJE VINOGRADA: Zmanjševanje pojavnosti črnih aspergilov v vinogradu je mogoče doseči z dobro prakso, ki vključuje odstranjevanje poškodovanih oz. nagnitih jagod in grozdov s trte oz. iz tal (Jackson in Al Taher, 2008) ter minimizacijo mehanskih in okoljskih poškodb jagod oz. grozdov. Izkazalo se je tudi, da majhni ohlapni šopki grozja, dobro razporejeni po vinski trti, preprečujejo poškodbe zaradi škodljivcev (Jackson in Al Taher, 2008). Ugoden učinek na zmanjševanje pojavnosti plesni ima zagotavljanje konstantne vlažnosti tal, posebno v kombinaciji z muljeno zastirko, kjer se sprostijo komponente, ki delujejo fungistatično oz. fungicidno (Hocking in sod., 2007). Fungicidno delujejo tudi pripravki, ki vsebujejo baker ali strobilurin (Jackson in Al Taher, 2008).

2.5.3 Trgatev in razmere po trgatvi

TRGATEV: Odstranjevanje gnilih grozdnih jagod, jagod, poškodovanih zaradi insektov, plesni, pretiranega namakanja, poškodb dežja ob trgatvi pred nadaljnjo predelavo oz. pred sušenjem, uspešno vpliva na manjšo vsebnost OTA v vinu, soku, kisu in suhem sadju (Serra in sod., 2005; Jackson in Al Taher, 2008).

PROCES VINIFIKACIJE: Ugotovljeno je bilo, da je OTA pogosteje določen v rdečih vinih (54 %) kot v rose (40 %) in belih (25 %) vinih. Največje vsebnosti OTA so prav tako bile določene v rdečih vinih (Battilani in sod., 2008). Vzrok je v poteku maceracije (stik mošta z jagodnimi kožicami in grozdnimi pečkami) rdečih in rose vin, ki ne poteka pri belih vinih. Ta trend so opazili pri evropskih vinih (v Avstraliji in Grčiji razlik med belim in rdečim vinom niso opazili) pa tudi pri grozdnem soku in balzamičnem kisu (Jackson in Al Taher, 2008).

FERMENTACIJA: OTA se med primarno alkoholno fermentacijo ne tvori - predvsem zaradi inhibitornega delovanja alkohola na plesni. Vsebnost OTA, ki je nastala pred pojavom alkohola med fermentacijo (na grozdju, grozdnem soku, grozdnem moštu), pa v vinu ostane. (Hocking in sod., 2007; Battilani in sod., 2008; Jackson in Al Taher, 2008).

OBDELAVA: Obdelava grozdja, grozdnega soka, vina in suhega grozdja z žveplovim dioksidom ugodno vpliva na manjšo pojavnost črnih aspergilov (Hocking in sod., 2007). Prav tako uporaba nekaterih bakterij (*Lactobacillus plantarum* in *Oenococcus oeni*) ali kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*), ki imajo sposobnost razgradnje OTA ali absorbentov, kot so preparati iz aktivnega oglja, tekoče želatine, bentonina, ki vežejo OTA nase, zmanjšajo vsebnost OTA v vinu v povprečju za 40 %, pogosto pa posledično vplivajo na slabšo kakovost vina (Hocking in sod., 2007; Quintela in sod., 2013).

SUŠENJE: Zelo pomembno je, da se proces sušenja izvede takoj po trgovitvi, produkt pa se zapakira in shrani le, če sadje doseže primerno stopnjo vlage (Hocking in sod., 2007; Jackson in Al Taher, 2008), temperatura skladiščenja pa ne sme presegati 15 °C (Amezqueta in sod., 2012).

SHRANJEVANJE: Za namizno grozdje je pomembno shranjevanje v hladnjem prostoru (0 °C), za suho sadje pa v suhem prostoru. Primeren prostor za shranjevanje ugodno vpliva na manjšo pojavnost vrst črnih aspergilov (Hocking in sod., 2007). Sestava atmosferskih plinov okoli toksigenih plesni prav tako vpliva na produkcijo toksinov. Kontrolirana atmosfera oz. modificirana atmosfera sta se izkazali kot možna zaviralca produkcije aflatokinov plesni vrste *A. flavus* (Barkai-Golan, 2008).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci grozdja

V raziskavo smo vključili 12 vzorcev grozdja, ki pripadajo devetim različnim vinskim sortam iz štirih različnih vinorodnih okolišev v Sloveniji. Podatki o sortah, vinorodnih okoliših in datumih obiranja so zapisani v preglednici 2.

Preglednica 2: Vinorodni okoliš, datum obiranja in sorta vzorcev grozdja

Oznaka vzorca grozdja	Sorta	Vinorodni okoliš	Datum obiranja
G1	Refošk	Slovenska Istra	17.9.2012
G2	Merlot	Slovenska Istra	17.9.2012
G3	Shiraz	Slovenska Istra	17.9.2012
G4	Cabernet sauvignon	Slovenska Istra	17.9.2012
G5	Cabernet franc	Slovenska Istra	17.9.2012
G6	Šentlovrenka	Bela Krajina	18.9.2012
G7	Modra frankinja	Bela Krajina	18.9.2012
G8	Žametna črnina	Bela Krajina	18.9.2012
G9	Žametna črnina	Ptuj	26.9.2012
G10	Modra frankinja	Ptuj	26.9.2012
G11	Modri pinot	Ptuj	26.9.2012
G12	Žametna črnina	Dolenjska	4.10.2012

3.1.2 Vzorci mošta in vina

Iz 12 vzorcev grozdja smo po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.2 oz. 3.2.3 pripravili vzorce grozdnega soka, katere smo nato pustili, da so spontano fermentirali. Med alkoholno fermentacijo smo vzorčili mošt oz mlado vino, prav tako smo vzorčili vino po zaključku fermentacije, in sicer po protokolu, ki je zapisan v preglednici 3.

Zaradi lažje obravnave vzorcev pri vseh vzorčenjih od 1. do 35. dne pred filtracijo govorimo o moštu oz. mlademu vinu (v nadaljevanju uporabljam le izraz mošt). 35. dan po filtraciji govorimo o vinu. V nalogi ni bila opravljena kemijska analiza vzorcev, ki bi natančneje opredelila, pri katerih vzorcih gre za grozjni sok, mošt, mlado vino in vino.

Preglednica 3: Čas in oznaka vzorcev med alkoholno fermentacijo (mošt) in po njej (vino)

Oznaka vzorca grozda	Sorta, vinorodni okoliš	Čas in oznaka vzorcev med alkoholno fermentacijo							Vino
		1. dan	3. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan	35. dan	
G1	Refošk, Slovenska Istra	M1/I-1	M1/I-3	M1/I-7	M1/I-14	M1/I-21	M1/I-28	M1/I-35	V1/I-35
		M1/II-1	M1/II-3	M1/II-7	M1/II-14	M1/II-21	M1/II-28	M1/II-35	V1/II-35
G2	Merlot, Slovenska Istra	M2/I-1	M2/I-3	M2/I-7	M2/I-14	M2/I-21	M2/I-28	M2/I-35	V2/I-35
		M2/II-1	M2/II-3	M2/II-7	M2/II-14	M2/II-21	M2/II-28	M2/II-35	V2/II-35
G3	Shiraz, Slovenska Istra	M3/I-1	M3/I-3	M3/I-7	M3/I-14	M3/I-21	M3/I-28	M3/I-35	V3/I-35
		M3/II-1	M3/II-3	M3/II-7	M3/II-14	M3/II-21	M3/II-28	M3/II-35	V3/II-35
G4	Cabernet sauvignon, Slovenska	M4/I-1	M4/I-3	M4/I-7	M4/I-14	M4/I-21	M4/I-28	M4/I-35	V4/I-35
		M4/II-1	M4/II-3	M4/II-7	M4/II-14	M4/II-21	M4/II-28	M4/II-35	V4/II-35
G5	Cabernet franc, Slovenska	M5/I-1	M5/I-3	M5/I-7	M5/I-14	M5/I-21	M5/I-28	M5/I-35	V5/I-35
		M5/II-1	M5/II-3	M5/II-7	M5/II-14	M5/II-21	M5/II-28	M5/II-35	V5/II-35
G6	Šentlovrenka, Bela Krajina	M6/I-1	M6/I-3	M6/I-7	M6/I-14	M6/I-21	M6/I-28	M6/I-35	V6/I-35
		M6/II-1	M6/II-3	M6/II-7	M6/II-14	M6/II-21	M6/II-28	M6/II-35	V6/II-35
G7	Modra frankinja, Bela Krajina	M7/I-1	M7/I-3	M7/I-7	M7/I-14	M7/I-21	M7/I-28	M7/I-35	V7/I-35
		M7/II-1	M7/II-3	M7/II-7	M7/II-14	M7/II-21	M7/II-28	M7/II-35	V7/II-35
G8	Žametna črnina, Bela Krajina	M8/I-1	M8/I-3	M8/I-7	M8/I-14	M8/I-21	M8/I-28	M8/I-35	V8/I-35
		M8/II-1	M8/II-3	M8/II-7	M8/II-14	M8/II-21	M8/II-28	M8/II-35	V8/II-35
G9	Žametna črnina, Ptuj	M9/I-1	M9/I-3	M9/I-7	M9/I-14	M9/I-21	M9/I-28	M9/I-35	V9/I-35
		M9/II-1	M9/II-3	M9/II-7	M9/II-14	M9/II-21	M9/II-28	M9/II-35	V9/II-35
G10	Modra frankinja, Ptuj	M10/I-1	M10/I-3	M10/I-7	M10/I-14	M10/I-21	M10/I-28	M10/I-35	V10/I-35
		M10/II-1	M10/II-3	M10/II-7	M10/II-14	M10/II-21	M10/II-28	M10/II-35	V10/II-35
G11	Modri pinot, Ptuj	M11/I-1	M11/I-3	M11/I-7	M11/I-14	M11/I-21	M11/I-28	M11/I-35	V11/I-35
		M11/II-1	M11/II-3	M11/II-7	M11/II-14	M11/II-21	M11/II-28	M11/II-35	V11/II-35
G12	Žametna črnina, Dolenjska	M12/I-1	M12/I-3	M12/I-7	M12/I-14	M12/I-21	M12/I-28	M12/I-35	V12/I-35
		M12/II-1	M12/II-3	M12/II-7	M12/II-14	M12/II-21	M12/II-28	M12/II-35	V12/II-35

* Zaradi lažje obravnave vzorcev, smo konec fermentacije za vse vzorce določili 35. dan od priprave grozdnega soka za fermentacijo. Pri vseh ostalih časih govorimo o moštu oz. mlademu vinu

Oznake vzorcev so oblike *An/f-d*, kjer na mestu *A* označimo ali gre za mošt oz. mlado vino (M) ali za vino (V), *n* je številka vzorca grozda, *f* je fermentacijska steklenica mošta/mladega vina oz. vina (paralelka I ali II), *d* pa pri moštu/mlademu vinu in vinu označuje dan vzorčenja med fermentacijo.

Primer:

M5/I-7; mošt/mlado vino vzorca grozda G5 (Refošk, Slovenska Istra), prva paralelka, vzorčeno 7. dan fermentacije

3.1.3 Mikrobiološka gojišča

Za izolacijo in identifikacijo plesni ter ugotavljanje sposobnosti tvorbe OTA in AFB1 smo uporabili naslednja gojišča:

- gojišče MEA (ang. Malt Extract Agar, Melt) pripravljeno po navodilih proizvajalca
- gojišče DRBC (ang. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar, CMO727, Oxoid, Anglija) pripravljeno po navodilih proizvajalca
 - + 96 % etanol, denaturirani, tip B (Itrij, Slovenija)
 - + kloramfenikol (ang. Chloramphenicol supplement, SR0078E, Oxoid, Anglija)
- gojišče OGY (ang. Oxytetracyclin Glucose Yeast Agar, 4018382, Biolife, Italija) pripravljeno po navodilih proizvajalca
 - + oksitetraciklin (ang. Oxytetracycline ant. supplement, 4240000, Biolife, Italija)
- gojišče CYA (ang. Czapek Yeast Extract Agar) po protokolu Pitt in Hocking (1985) pripravljen iz:
 - K_2HPO_4 (Kalij-hidrogenfosfat brezvodni, 1116108, Kemika, Hrvaška)
 - kvasni ekstrakt (ang. Yeast extract, 4122202, Biolife, Italija)
 - saharoza (ang. Sucrose, 1800408, Kemika, Hrvaška)
 - bakteriološki agar (ang. Agar bacteriological, 4110302, Biolife, Italija)
 - Czapek koncentrat (pripravljen po protokolu)
 - destilirana voda
- Czapek koncentrat po protokolu pripravljen iz:
 - $NaNO_3$ (Natrijev nitrat)
 - KCl (Kalijev klorid, 4936, Merck, Nemčija)
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Magnezijev sulfat heptahidrat, 1058860500, Merck, Nemčija)
 - $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Železov sulfat heptahidrat)
 - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Cinkov sulfat heptahidrat)
 - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Bakrov sulfat pentahidrat)
 - destilirana voda

- gojišče G25N (ang. 25 % Glycerol Nitrate Agar) po protokolu Pitt in Hocking (1985) pripravljen iz:

- K₂HPO₄ (kalij-hidrogenfosfat brezvodni, 1116108, Kemika, Hrvaška)
 - Czapek koncentrat (pripravljen po protokolu)
 - kvasni ekstrakt (ang. Yeast extract, 4122202, Biolife, Italija)
 - glicerol redestiliran (0711901, Kemika, Hrvaška)
 - bakteriološki agar (ang. Agar bacteriological, 4110302, Biolife, Italija)
 - destilirana voda
- gojišče YES (ang. Yeast Extract Sucrose Agar) po protokolu pripravljen iz:

- kvasni ekstrakt (ang. Yeast extract, 4122202, Biolife, Italija)
- saharoza (ang. Sucrose, 1800408, Kemika, Hrvaška)
- bakteriološki agar (ang. Agar bacteriological, 4110302, Biolife, Italija)
- destilirana voda

3.1.4 Kemikalije za pripravo suspenzije spor

- 0,5 % agar s Tweenom po protokolu pripravljen iz:

- bakteriološki agar (ang. Agar bacteriological, 4110302, Biolife, Italija)
- emulgator Tween 80 (8221870500, Merck, Nemčija)

3.1.5 Kemikalije za pripravo nativnega mikroskopskega preparata in mikroskopiranje

- laktofenolno modro (ang. Lactophenol blue solution, 10108400, Sigma Aldrich, Nemčija)
- imerzijsko olje (0900104, Kemika, Hrvaška)
- destilirana voda

3.1.6 Kemikalije za izvedbo tankoplastne kromatografije (TLC)

Standardi:

- ciklopiazonska kislina (ang. Cyclopiazonic acid, from *Penicillium cyclopium*, C1530-5MG, Sigma Aldrich, Nemčija)

Strojnik L. Raznolikost plesni na rdečem grozdju in v moštu.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2014

- ohratoksin A (ang. Ochratoxin A solution, 34037-2ML-R, Sigma Aldrich, Nemčija)
- aflatoksin B1 (ang. Aflatoxin B1 from *Aspergillus flavus*, A6636-1MG, Sigma Aldrich, Nemčija)

Kemikalije za pripravo mobilnih faz:

- kloroform (1024451000, Merck, Nemčija)
- aceton (1000201000, Merck, Nemčija)
- toluen (1083251000, Merck, Nemčija)
- etil acetat (1096231000, Merck, Nemčija)
- mravljična kislina 98-100% (1002641000, Merck, Nemčija)

Stacionarna faza:

- TLC plošča (TLC Silica gel 60F254, Merck, Nemčija)
- absolutni etanol (1009831000, Merck, Nemčija) za sterilizacijo opreme

Kemikalije za potrditev prisotnosti toksinov

- Erlichov reagent (101195815, Sigma Aldrich, Nemčija)

3.1.7 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali sledečo laboratorijsko opremo:

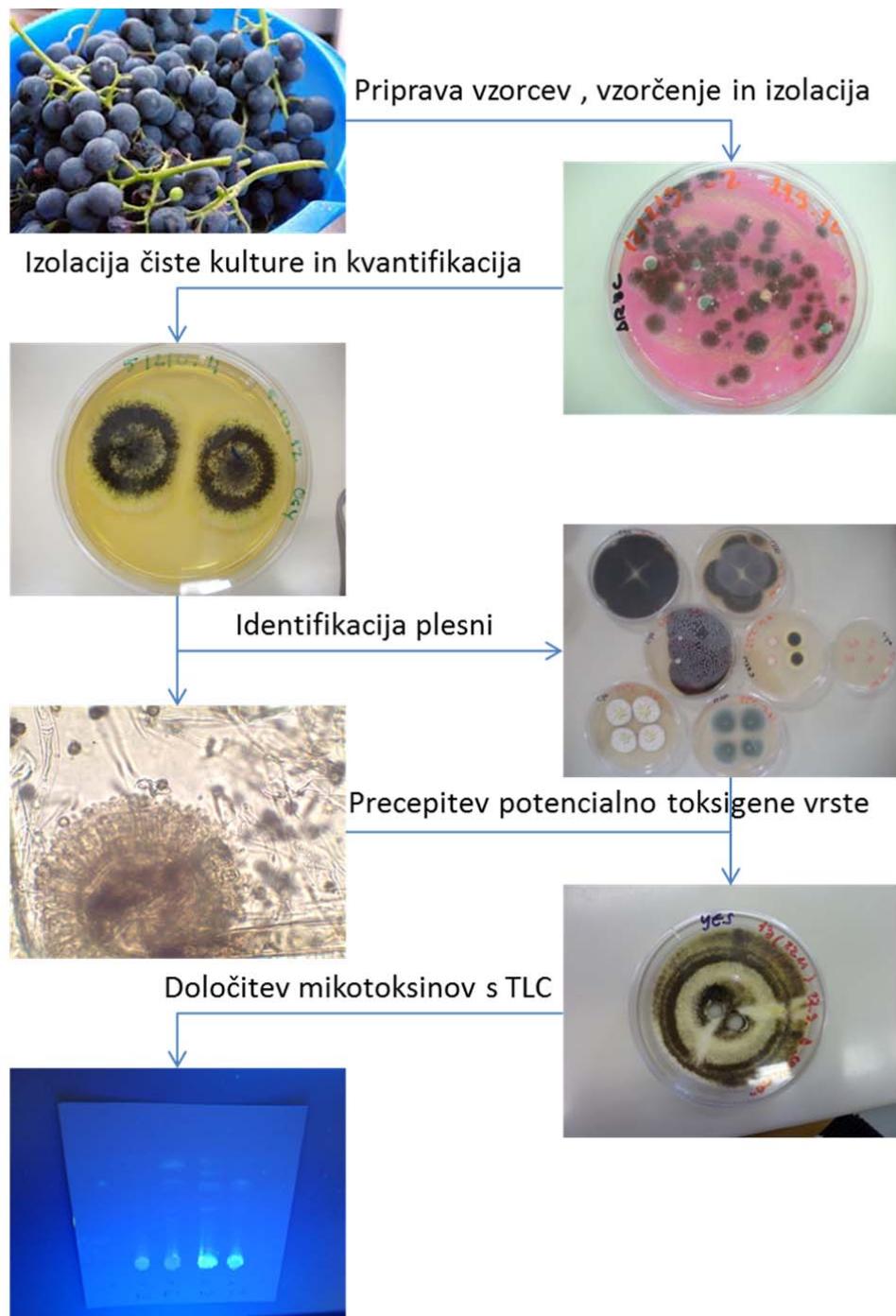
- gnetilnik (Stomacher 400, tip BA 7021, Seward, Anglija)
- vrečke za gnetilnik (Golias Labortehnika, Slovenija)
- fermentacijske stekleničke z vrelnimi vrahami
- pipete in nastavki (Eppendorf, Francija)
- plastične petrijevke 90 mm in 75 mm (Golias Labortehnika, Slovenija)
- krovna in objektna stekelca
- namizno mešalo (TTS 2, tip T, Yelowline, Nemčija)
- hladilnik LTH, 101 Gorenje in LAE

- hladilna omara LTH in WHIRPOLLE
- inkubator (tip I-105 CK, Kambič, Slovenija)
- inkubator z magnetnimi mešali (tip I-45-4M, Kambič, Slovenija)
- tehnicna (tip PB 1502-S/A, Mettler toledo, Švica)
- avtoklav (serija 1-61-137, Sutjeska, Srbija)
- avtoklav (tip 500X700, Sutjeska, Srbija)
- digestorij (tip 382)
- mikroskop (BA 210, Motic, Kitajska)
- stereo mikroskop – lupa (MS 5, Leica, Nemčija)
- UV svetilka (z valovno dolžino 366 nm, tip MANWOOD/36)
- računalniški program Motic Images Plus 2.0 (Motic, Kitajska)
- ostali osnovni in laboratorijski pribor: računalnik, komora za TLC, gorilnik, cepilna igla, cepilna zanka, trikotna palčka za razmazovanje, sterilne epruvete, pinceta, skalpel, steklenice za pripravo gojišč, čaše, merilni valji, ravnilo, svinčnik, škarje, kartonaste škatle, plastične vrečke, sterilni zobotrebci, parafilm, parni indikatorski trak za avtoklaviranje, rokavice iz lateksa, papirnate brisače, etanol (70 % za razkuževanje), raztopina natrijev hipoklorid (18 % NaOCl) (za mikroskopske preparate, TLC plošče in nastavke za pipetiranje toksinov), destilirana voda.

3.2 METODE

3.2.1 Shema dela

Na sliki 4 je predstavljena je poenostavljena shema dela, po kateri smo izvedli naš poskus.



Slika 4: Shema eksperimentalnega dela

3.2.2 Priprava grozdja

Iz dveh srednjih velikih grozdov smo naključno izbrali grozdne jagode v skupni količini enega grozda in jih vložili v plastično vrečko. To smo nato postavili v gnetilnik in grozdne jagode 120 sekund homogenizirali pri srednji hitrosti. S tem smo pridobili homogen vzorec.

3.2.3 Priprava grozdnega soka in potek alkoholne fermentacije

Približno pet kilogramov grozdja smo ročno zmečkali, pri čemer smo predhodno odstranili pecljevino. Iz zmečkane drozge smo tako pridobili grozni sok, ki smo ga označili kot vzorec s časom ena med fermentacijo. Preostalo drozgo smo natočili v 2 fermentacijski steklenici z vrelnimi vehami (paralelki), ki smo ju postavili v klet s konstantnimi razmerami ($T = 18 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.2.4 Vzorčenje grozdnega soka, mošta in vina

Vsek vzorec smo vzorčili v dveh paralelkah. Med fermentacijo smo vzorčili 3., 7., 14., 21., 28. in 35. dan. 35. dan smo vzorčili pred filtracijo mladega vina ter po njej (vino). Filtracijo smo opravili preko dvakrat prepognjene gaze.

3.2.5 Izolacija in kvantifikacija plesni

Nato smo pripravili razredčitve vsakega vzorca (od 10^{-1} do 10^{-5}) (ISO 7218, 1996; ISO 4833, 1991). Vsako razredčitev smo pripravili v dveh paralelkah. Razredčitev 10^{-1} smo dobili direktno s prenosom 100 μL homogeniziranega vzorca na gojišče. Razredčitev 10^{-2} smo pridobili iz matične suspenzije (pripravljena iz 10 mL homogeniziranega vzorca in 90 mL fosfatnega pufra), tako da smo raztopino homogenizirali na namiznem mešalu in 100 μL prenesli na gojišče DRBC. Razredčitev 10^{-3} smo pridobili kot razredčitev 10^{-2} , le da smo namesto homogeniziranega vzorca vzeli razredčitev 10^{-2} . Ostale razredčitve smo pridobili po istem postopku. Gojišča DRBC z vzorci smo sedem dni inkubirali pri 25 °C. Pri nekaterih vzorcih (kjer ni bilo kolonij) smo inkubacijo podaljšali na 10 oziroma na 14 dni. Po inkubaciji smo določili koncentracijo plesni v vzorcih s štetjem kolonij na gojiščih DRBC. Upoštevali smo, da so števne plošče tiste z najmanj 15 kolonijami in največ 150 kolonijami. Ker je bilo pri vzorcih oziroma pri posameznih paralelkah število kolonij plesni mnogokrat manjše od 15, smo koncentracije celic kljub temu izračunali in jih označili z opombo, da gre za oceno. Izračun koncentracije celic (CFU/mL) v vzorcu smo izračunali po formuli:

$\sum c_{\dots}$ vsota kolonij na števnih gojiščih DRBC

n1...število gojišč prve upoštevane razredčitve

n2...število gojišč druge upoštevane razredčitve

d...faktor prve upoštěvane razredčitve

3.2.6 Določitev makro- in mikromorfoloških lastnosti plesni

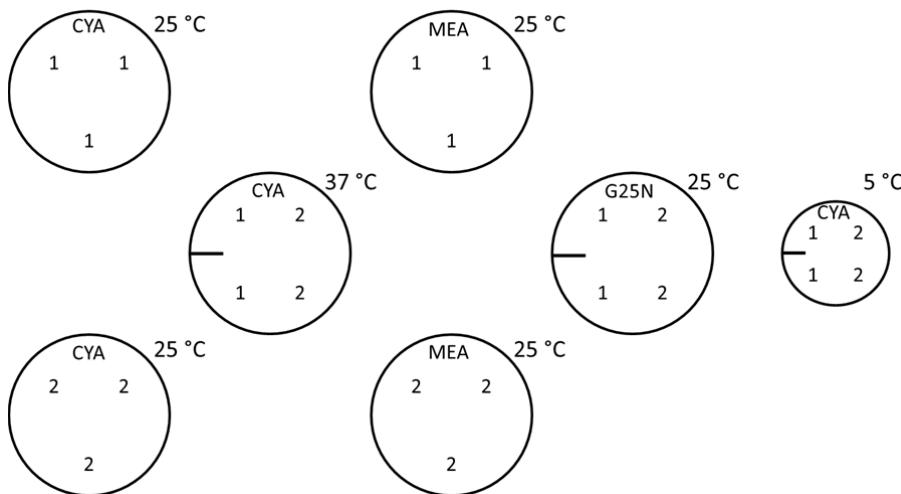
Da smo lahko določili mikromorfološke lastnosti posamezne kolonije plesni, smo najprej pripravili nativni mikroskopski preparat, tako da smo s sterilnima zobotrebcem odvzeli del zračnega micelija skupaj s substratnim micelijem in ga prenesli na objektno steklo v kapljico laktofenola ter pokrili s krovnim stekelcem. Nato smo preparat mikroskopirali pri 400x povečavi. Na podlagi značilnih makro- in mikromorfoloških lastnosti smo določili morebitne rodove plesni: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhisopus* in *Mucor*. V kolikor smo določili enega izmed naštetih rodov, smo iz kolonije izolirali čiste kulture in jih identificirali.

3.2.7 Izolacija čiste kulture

Želeli smo proučevati značilne lastnosti posamezne vrste plesni, zato smo jo morali najprej izolirati (osamiti) v čisti kulturi. To smo naredili tako, da smo se s sterilno cepilno iglo dotaknili kolonije, ki smo jo želeli izolirati. S cepilno iglo (na katero so se prijele spore) smo nato naredili dva vboda v novo gojišče OGY. Tako pripravljena gojišča OGY smo nato sedem dni inkubirali pri 25 °C.

3.2.8 Identifikacija plesni

Po izolaciji čistih kultur smo izbrali posamezne kolonije plesni za identifikacijo. S sterilno cepilno zanko smo spore posamezne čiste kulture plesni prenesli v 0,5 % agar s Tweenom, tako, da je bila suspenzija rahlo motna. Suspenzijo smo nato homogenizirali na namiznem mešalu in za vsako plesen precepili spore plesni, aseptično s cepilno iglo, na naslednja gojišča: CYA, MEA, G25N. Precepljanje spor in inkubacijo gojišč, ki je trajala sedem dni pri 25 °C, 37 °C oziroma 5 °C, pa smo izvedli po shemi za identifikacijo plesni na sliki 5 (Pitt in Hocking, 1985).



Slika 5: Shema gojišč za identifikacijo plesni. Shema predstavlja kombinacijo petrijevk z izbranimi gojišči in temperaturami inkubacije. Številki 1 in 2 označujeta nacepljene kulture (Pitt in Hocking, 1985)

3.2.8.1 Določitev makromorfoloških lastnosti

Po 7-dnevni inkubaciji gojišč za identifikacijo (3.2.8) smo naredili za vsak izolat na gojiščih zapis makromorfoloških lastnosti (velikost kolonije (premer 2r), barva substratnega in zračnega micelija, struktura substratnega in zračnega micelija, tvorba eksudata, tvorba kleistotecijev). Makromorfološke lastnosti smo določali tudi s pregledom kolonije z lupo pri 40x povečavi.

3.2.8.2 Določitev mikromorfoloških lastnosti

Mikromorfološke lastnosti smo določali na nativnem preparatu (izjema pri *Aspergillus* spp., kjer zaradi boljše vidljivosti nismo uporabili laktofenola) pri 400x in 1000x povečavi. Opazovali smo septiranost micelija, tvorbo in izgled askospor, tvorbo konidijev, vrsto in izgled konidijev (apeks, metula, fialida, kleistoteciji z askosporami). Po zaključenem mikroskopiranju smo preparate preventivno dekontaminirali v raztopini NaOCl.

3.2.8.3 Identifikacija plesni

Glede na določene makromorfološke značilnosti ter mikromorfološka opažanja smo s podrobnnimi navodili in ključi za identifikacijo določili posamezne vrste iz rodov *Penicillium* (Pitt, 1991) in *Aspergillus* (Klich, 2002). Vrst plesni drugih rodov nam ni uspelo določiti zaradi presplošnih in ne dovolj podrobnih ključev za identifikacijo. Plesni, kjer glede na dane značilnosti nismo uspeli določiti niti rodu, so ostale neidentificirane.

3.2.9 Precepljanje potencialno mikotoksigenih izolatov

Glede na vrsto identificiranih plesni smo iz literature in člankov (Bennett in Klich, 2003; Belajova in Rauova, 2007; Richard, 2007; Jackson in Al Taher, 2008; Barkai-Golan, 2008; Aydogdu in Gucer, 2009;) predvideli, kateri od izolatov so potencialni tvorci mikotoksinov: ohratoksin A, aflatoksin B1 in ciklopiazonske kislina (ta nas je zanimala izključno zaradi tega, ker z drugimi metodami nismo mogli določiti ali imamo izolate vrst *Aspergillus flavus* ali *Aspergillus parasiticus* - ciklopiazonska kislina se pojavlja samo pri vrsti *Aspergillus flavus*). Izolate, ki bi lahko tvorili te mikotoksine smo, aseptično s sterilno cepilno iglo z enim vbodom, precepili na gojišča YES. Tako nacepljene izolate smo inkubirali 14, 21 ter 28 dni pri 25 °C.

3.2.10 Določitev prisotnosti mikotoksinov s TLC

Pri delu z mikotoksinimi smo obvezno uporabljali zaščitne rokavice. Delo smo opravljali v digestoriju in z vsemi topili ravnali kot z nevarnimi snovmi. Ves material, ki je prišel v stik z mikotoksinimi (nastavki za pipete, TLC plošče, čepi plesni...), pa smo dekontaminirali v raztopini NaOCl.

3.2.10.1 Priprava vzorcev čepov plesni

Čepe plesni smo pripravili s pomočjo orodja za izdelovanje čepov ali pa kar s pinceto za čepe, če je bilo gojišče prevlažno. Delo smo opravili aseptično s sterilnim orodjem. Za sterilizacijo orodja smo uporabljali 96 % etanol in gorilnik.

3.2.10.2 Priprava TLC-plošče

Kot stacionarno fazo smo uporabili ploščo TLC, ki je sestavljena iz nosilca (aluminijeva pločevina) z naneseno tanko plastjo stacionarne faze (silikagel in aluminijev oksid). Glede na to, ali smo uporabili malo ali veliko komoro, smo ploščo predhodno ustrezno razrezali s škarjami (velika komora 10 cm x 20 cm, mala komora 10 cm x 10 cm). Na ploščo smo s svinčnikom rahlo označili spodnjo črto (2,5 cm od spodnjega roba) in na njej označili vzorce v razmiku po 1,5 cm.

3.2.10.3 Priprava mobilne faze

Glede na vrsto mikotoksina smo pripravili mešanico topil – mobilno fazo (200 ml za veliko komoro in 20 mL za malo komoro). Za določitev tvorbe ciklopiazonske kislino in ohratoksin A smo pripravili mobilno fazo TEF v razmerju 5:4:1 (toluen, etil acetat, mravljinčna kislina). Za določitev aflatoksin B1 pa smo pripravili mobilno fazo KAC v razmerju 9:1 (kloroform:aceton).

3.2.10.4 Izvedba TLC

Na prvo in zadnje označeno mesto na plošči TLC smo nanesli standardno raztopino mikotoksina; raztopine je bilo potrebno nanesti zelo pazljivo, tako da je premer lise manjši od 3 mm. Nato smo nanesli na preostala mesta vzorce čepov plesni. Vsak vzorec smo nanesli 3x na eno mesto. Paziti smo morali, da smo dobili lepo liso brez sledi vzorca gojišča. Ko smo nanesli vse vzorce, smo v digestoriju odparili topilo. Ploščo z vzorci smo nato previdno postavili v komoro z mobilno fazo. Komoro smo pokrili in počakali, da je mobilna faza zaradi kapilarnega tlaka priprovala skoraj do vrha plošče. Takrat smo ploščo vzeli iz komore in ponovno počakali, da je topilo odparelo v digestoriju.

3.2.10.5 Potrditev prisotnosti toksinov

Za potrditev prisotnosti ciklopiazonske kislino smo potem, ko smo odparili topilo v digestoriju, ploščo ovlažili z Erlichovim reagentom. Ta nam naravne rjave repe toksina, ki so sicer slabše vidni, obarva vijolično in potrditev je tako enostavnejša. Po literaturi (Samson in sod., 2000) naj bi po postopku z Erlichovim reagentom ploščo ovlažili še s 50 % žveplovo (VI) kislino v vodi (dobimo modro obarvanje repov), vendar se ta postopek ni obnesel, saj je žveplova kislina največkrat uničila TLC-ploščo.

Za potrditev prisotnosti ohratoksin A in aflatoksin B1 smo uporabili UV svetilko. Z UV-svetlubo valovne dolžine 366 nm smo osvetlili ploščo tako, da so postale lise vidne, nato smo jih označili in plošče tudi fotografirali. Glede na izmerjeno razdaljo, ki jo prepotujejo standardna raztopina mikotoksina in posamezne spojine vzorcev, smo določili ali vzorec tvori določen mikotoksin (+) ali ne (-).

4 REZULTATI

Iz širih slovenskih vinorodnih okolišev in devetih različnih vinskih sort smo na rdečem grozdju, v moštu po različnih časih fermentacije ter v vinu določali prisotnost rodov plesni. Spremljali smo spreminjanje populacije plesni ter prisotnost plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus*. Identificirali smo vrste znotraj teh dveh rodov. S TLC smo preverjali toksigenost izolatov tistih vrst, ki potencialno tvorijo toksina OTA in AFB1.

Razširjenost plesni smo določali preko povprečne koncentracije plesni, kot je podana v poglavju 3.2.5 (enačba 1). Izračunana je kot vsota koncentracij plesni (CFU/mL) v vseh vzorcih, deljena s skupnim številom vzorcev.

Primer 1: Število izolatov rodu *Aspergillus* v vzorcih grozdnega mošta iz Bele Krajine.

Število vzorcev najdemo v preglednici 2:

$$3 \text{ (vzorci grozdnih sort G6, G7 in G8)} * 2 \text{ (steklenica I, II)} * 7 \text{ (število vzorčenj)} = 42$$

$$\text{Vsota koncentracij plesni rodu } Aspergillus \text{ v navedenih vzorcih} = 646356,4 \text{ CFU/mL}$$

$$\text{Povprečna koncentracija} = \text{vsota koncentracij plesni} / \text{št. vzorcev} = 646356,4 \text{ CFU/mL} / 42 = 1539 \text{ CFU/mL}$$

4.1 RAZNOLIKOST PLESNI

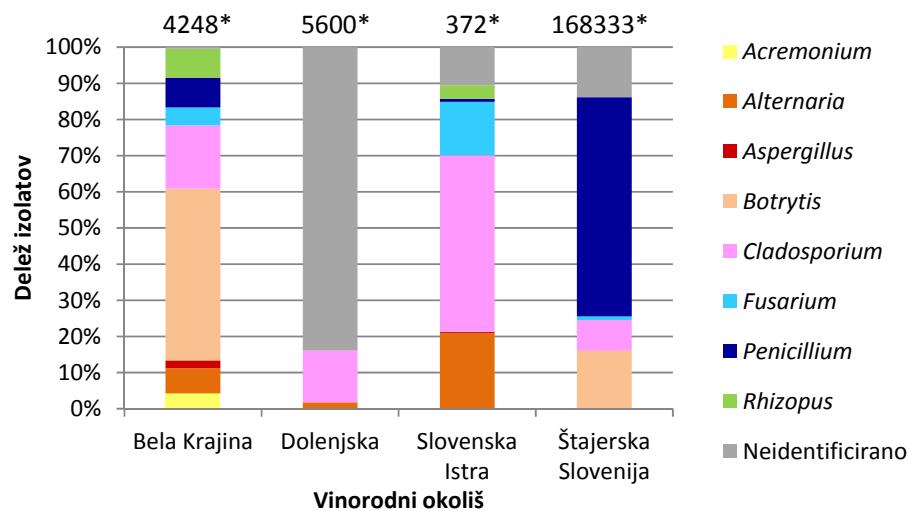
Identificirali smo 4137 izolatov devetih različnih rodov plesni. 4 % izolatov je zaradi neizrazitih tipičnih mikro- in makromorfoloških znakov ostalo neidentificiranih.

4.1.1 Razširjenost plesni v vinorodnih okoliših

Opazovali smo koncentracijo plesni v posameznih vinorodnih okoliših posamično za grozdje, mošt in vino. Prav tako smo posamično za grozdje, mošt in vino določali, v katerih okoliših so posamezni rodovi plesni najbolj razširjeni.

4.1.1.1 Plesni na grozdju iz različnih vinorodnih okolišev

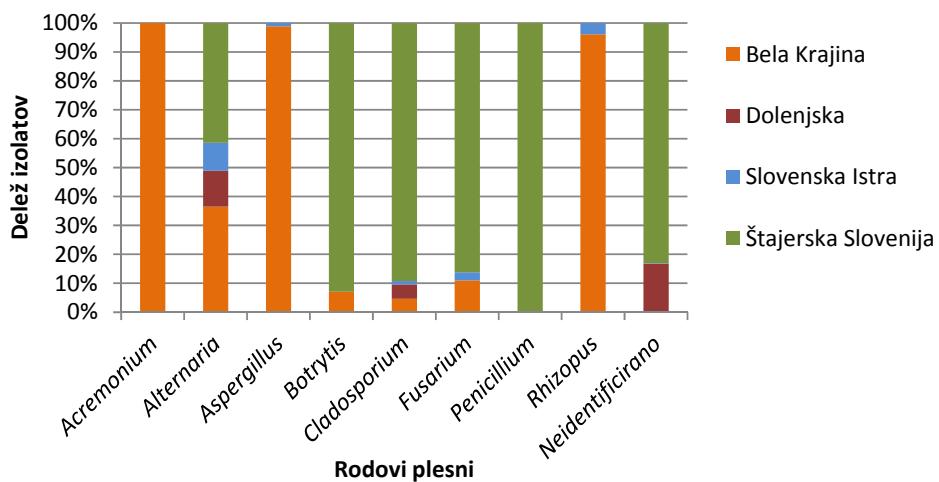
Razširjenost rodov plesni na grozdju med vinorodnimi okoliši zelo varira. Tako ne moremo trditi, da sta dve vinorodni območji med sabo podobni, saj v vsakem območju prevladujejo drugi rodovi (slika 6). Glede na povprečno koncentracijo plesni v vinorodnem okolišu Slovenska Istra prevladuje rod *Cladosporium* z 49 %, sledita rodova *Alternaria* z 21 % in *Fusarium* z 15 %. V Beli Krajini sta najpogostejsa rodova *Botrytis* z 47 % ter *Cladosporium* z 18 %. V Štajerski Sloveniji pa je najbolj razširjen rod *Penicillium* (61 %), sledi rod *Botrytis* (16 %), 14 % pa je bilo neidentificiranih izolatov (izračun glede na povprečno koncentracijo plesni). Slednjih je bilo največ na Dolenjskem, kjer predstavljajo kar 84 %.



Slika 6: Delež izolatov plesni na grozdju iz različnih vinorodnih okolišev

Legenda: * Skupna koncentracija plesni (CFU/mL) v posameznem vinorodnem okolišu

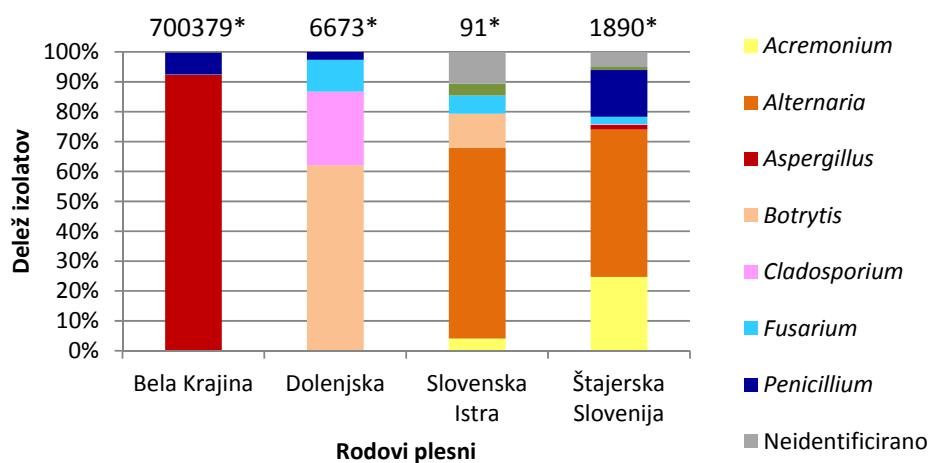
Iz slike 7 je razvidno, v katerih vinorodnih okoliših so bili posamezni rodovi najbolj razširjeni. Največ izolatov rodov *Aspergillus*, *Acremonium* in *Rhizopus* je bilo pridobljenih iz vzorcev v vinorodnem okolišu Bela Krajina. Rodovi *Penicillium*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Cladosporium* in neidentificirani izolati so bili izolirani pretežno iz vzorcev, pridobljenih v Štajerski Sloveniji. Rod *Alternaria* je podobno razširjen tako v Beli Krajini kot v Štajerski Sloveniji.



Slika 7: Razširjenost plesni na grozdju glede na vinorodni okoliš in na skupno koncentracijo plesni v posameznem vinorodnem okolišu

4.1.1.2 Plesni v moštu iz različnih vinorodnih okolišev

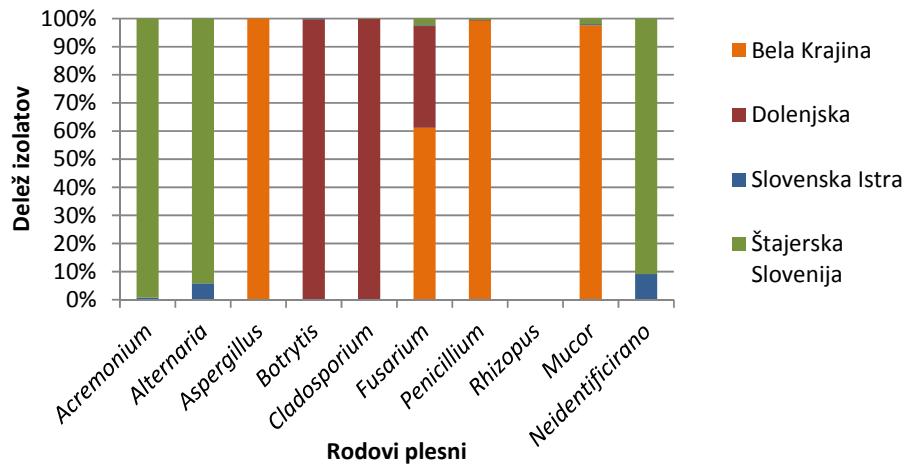
Tudi razširjenost plesni v moštu v vinorodnih okoliših je zelo raznolika, kar je prikazano na sliki 8. V Slovenski Istri prevladuje *Alternaria* (64 %), sledi *Botrytis* (11 %) in neidentificirane plesni (11 %). V vinorodnem okolišu Dolenjske prevladuje z 62 % *Botrytis* in z 25 % sledi *Cladosporium*. Visoko, kar z 92 % v Beli Krajini prevladujejo plesni rodu *Aspergillus*. Plesni rodu *Alternaria* z 49 % prevladujejo na Štajerskem. Sledita rodova *Acremonium* (25 %) in *Penicillium* (16 %).



Slika 8: Delež izolatov plesni v moštu iz različnih vinorodnih okolišev

Legenda: * Skupna koncentracija plesni (CFU/mL) v posameznem vinorodnem okolišu

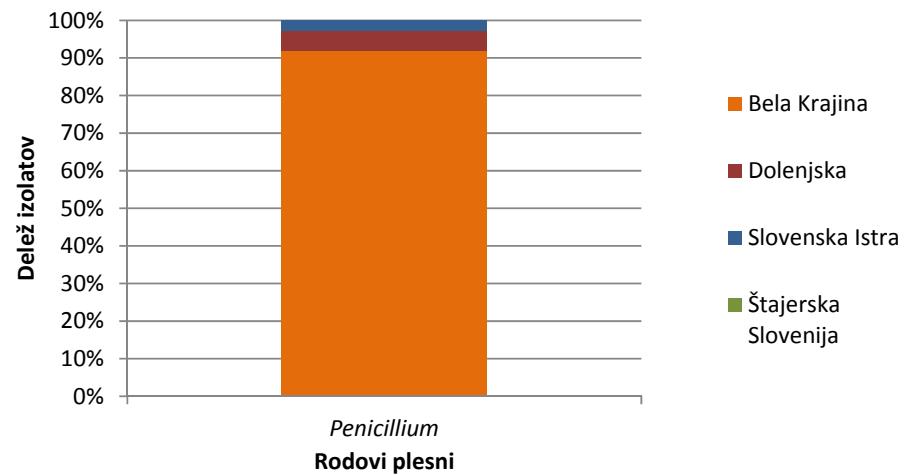
Rodovi *Acremonium*, *Alternaria* in neidentificirani rodovi se v moštu večinoma pojavljajo v Štajerski Sloveniji. Rodova *Cladosporium* in *Botrytis* najdemo predvsem na Dolenjskem. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* in *Fusarium* so v največji meri prisotni v Beli Krajini (slika 9).



Slika 9: Razširjenost plesni iz vzorcev mošta glede na vinorodni okoliš in na skupno koncentracijo plesni v posameznem vinorodnem okolišu

4.1.1.3 Plesni v vinu iz različnih vinorodnih okolišev

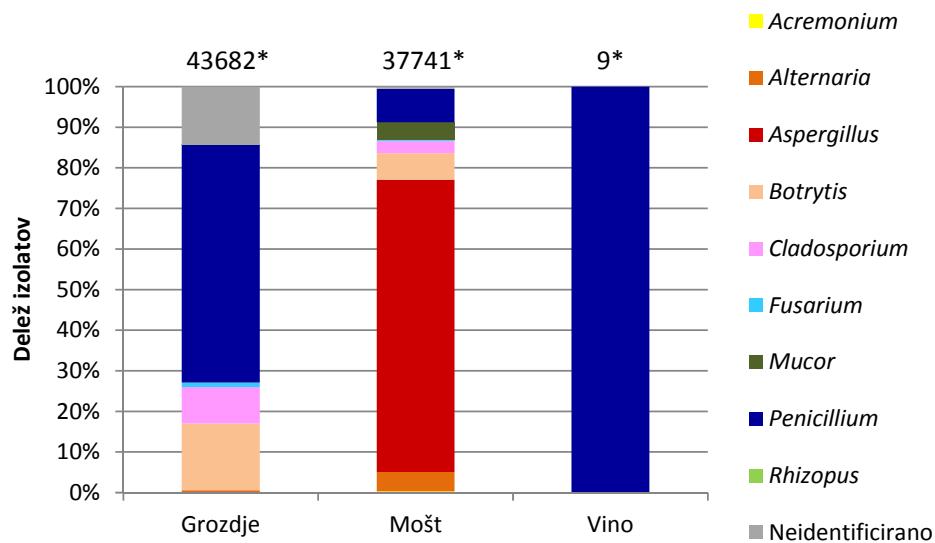
V vzorcih vina smo identificirali samo plesni rodu *Penicillium*. Največja razširjenost rodu je bila v Beli Krajini (92 % izolatov), zaznali pa smo ga tudi v vzorcih iz Slovenske Istre (5 %) ter Dolenjske (3 %) (slika 10).



Slika 10: Razširjenost plesni rodu *Penicillium* v vzorcih vina glede na vinorodni okoliš in na skupno koncentracijo plesni v posameznem vinorodnem okolišu

4.1.2 Razširjenost plesni na grozdju, med fermentacijo in v vinu

Iz primerjave razširjenosti plesni na grozdju, v moštu in v vinu ne glede na vinorodni okoliš ali sorto vidimo, da pretežno prevladujeta dva rodova in sicer *Penicillium* in *Aspergillus*, ki sta nadalje v nalogi obsežneje prikazana. Tako na grozdju prevladuje *Penicillium* (58,6 %), v moštu pa *Aspergillus* (71 %), medtem ko smo v vinu našli zgolj predstavnike *Penicillium* (Slika 11).



Slika 11: Delež izolatov plesni na grozdju, v moštu in v vinu

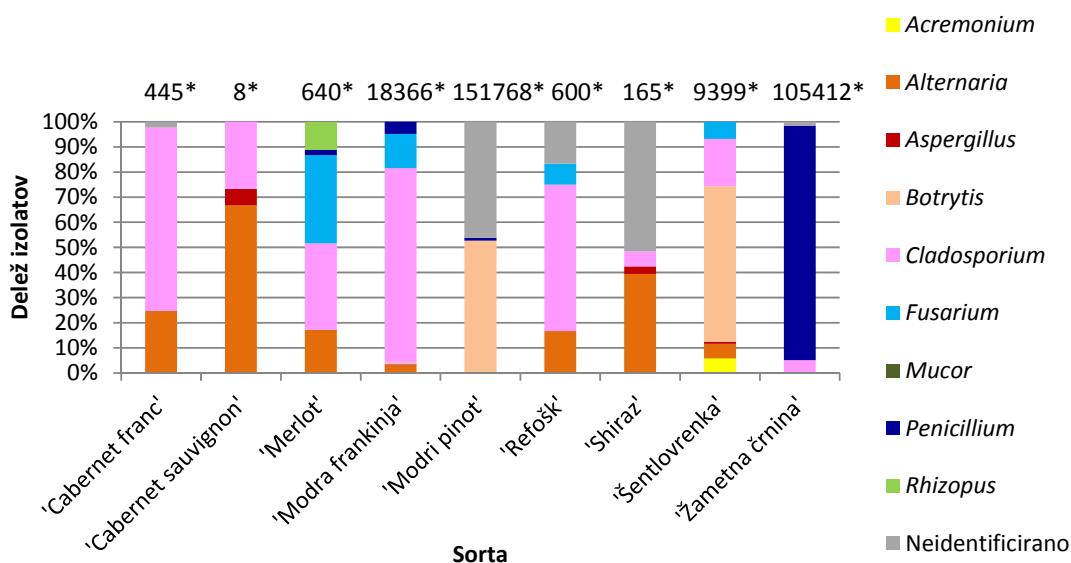
Legenda: * Skupna koncentracija plesni (CFU/mL) na vzorcih grozinja, mošta oz. vina

4.1.3 Razširjenost plesni glede na sorto

Na devetih različnih sortah smo proučevali prisotnost rodov plesni na grozdju, v moštu in vinu.

4.1.3.1 Razširjenost plesni na grozdju glede na sorto

Na grozdju je opaziti veliko raznolikost rodov. Na sortah 'Cabernet franc', 'Modra frankinja' in 'Refošk' so bile prisotne pretežno plesni rodu *Cladosporium*. Plesni rodu *Cladosporium* so enakovredno zastopane kot plesni rodu *Fusarium* na sorti 'Merlot'. Na sorti 'Cabernet sauvignon' prevladujejo plesni rodu *Alternaria*, ki so bile v večjem deležu poleg neidentificiranih vrst določene tudi na sorti 'Shiraz'. V večjem deležu smo na sortah 'Modri pinot' in 'Šentlovrenka' določili plesni rodu *Botrytis*. Na grozdju sorte 'Žametna črnina' pa skoraj celoto populacije plesni predstavlja rod *Penicillium*, kar je prikazano na sliki 12.

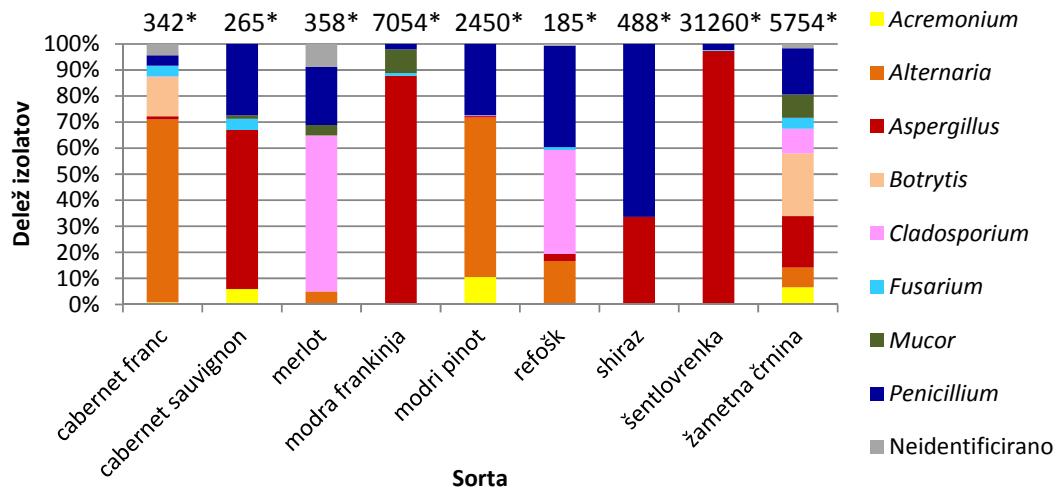


Slika 12: Delež izolatov plesni na grozdju glede na sorto

Legenda: * Skupna koncentracija plesni (CFU/mL) na grozdju po posameznih sortah

4.1.3.2 Razširjenost plesni v moštu glede na sorto

V moštu je prav tako opaziti veliko raznolikost plesni, kar prikazuje slika 13. Tudi struktura rodov se glede na grozdje bistveno ne spreminja. Če so na grozdju prevladovale plesni rodov *Cladosporium*, *Alternaria*, *Botrytis* in *Penicillium*, v moštu poleg teh prevladujejo še plesni rodov *Aspergillus*. Slednji je najpogosteje določen v moštih sort cabernet sauvignon, šentlovrenka in modra frankinja. Plesni rodov *Penicillium* prevladujejo v moštu shiraz, v večjem deležu pa tudi v moštu refošk. Rod *Cladosporium* prevladuje v moštu merlot, v večjem deležu pa je prisoten tudi v moštu refošk. Plesni rodov *Alternaria* prevladujejo v moštih cabernet franc in modri pinot. Plesni rodov *Botrytis* pa prevladujejo v moštu žametna črnina.

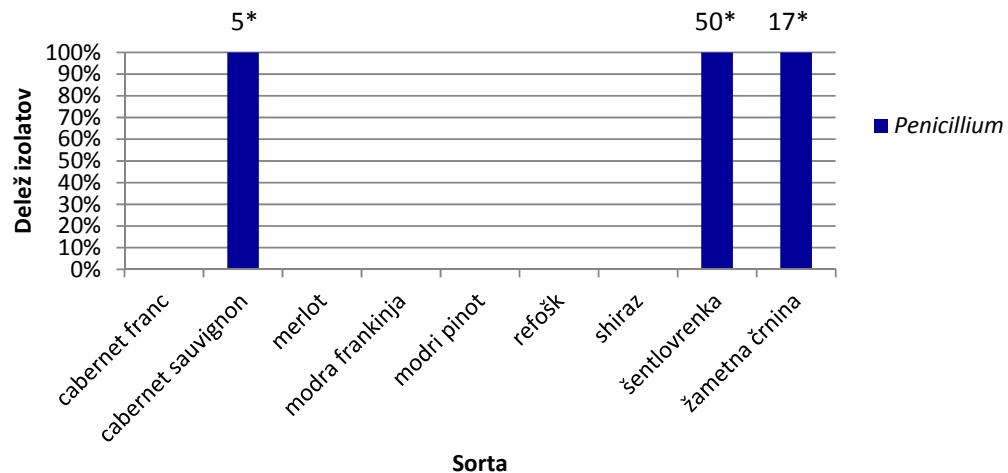


Slika 13: Delež izolatov plesni v moštu glede na sorto

Legenda: * Skupna koncentracija plesni (CFU/mL) v moštu po posameznih sortah

4.1.3.3 Razširjenost plesni v vinu glede na grozdno sorto

Plesni, ki smo jih določili v vinih treh sort: cabernet savignon, šentlovrenka in žametna črnina, pripadajo rodu *Penicillium* (slika 14).



Slika 14: Delež izolatov plesni v vinu glede na sorto

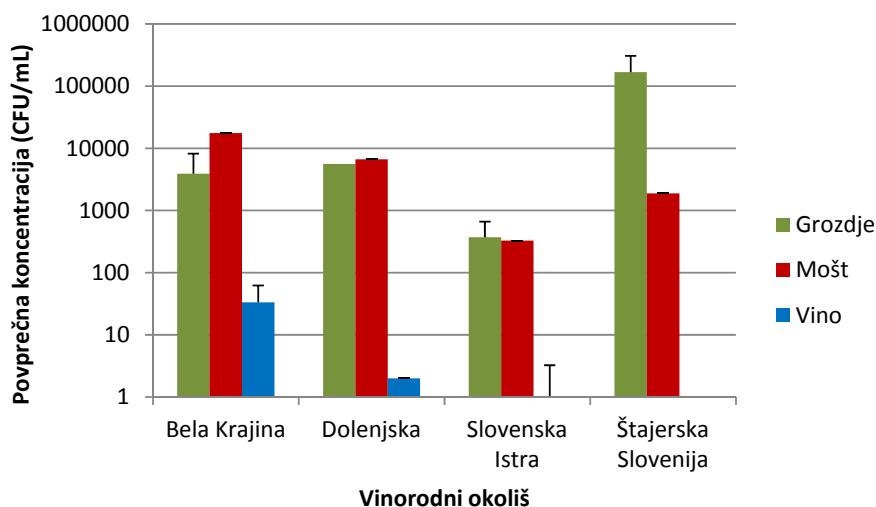
Legenda: * Skupna koncentracija plesni (CFU/mL) v vinu po posameznih sortah

4.2 POPULACIJA PLESNI

Prikazali smo, kako se populacija plesni na grozdju razlikuje od mošta in vina ter ali vinorodni okoliš oz. sorta vplivata na populacijo plesni na grozdju, moštu in vinu.

4.2.1 Spremljanje populacije plesni v vinorodnih okoliših

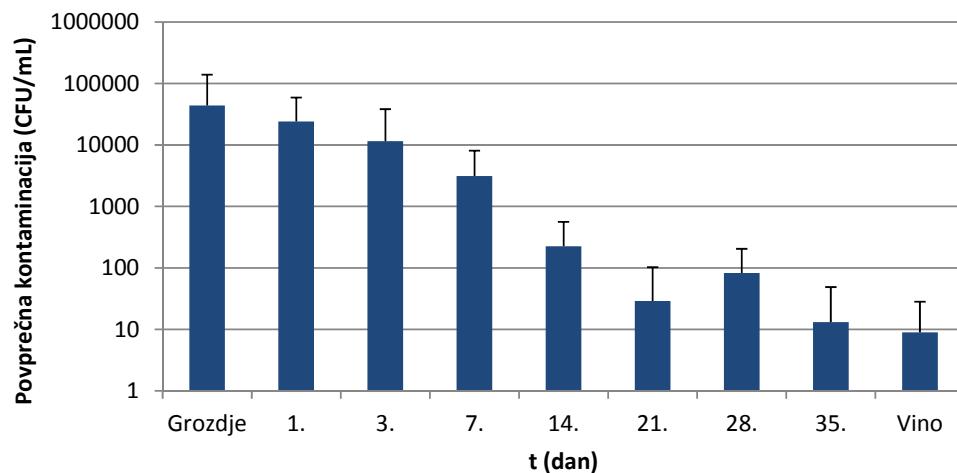
S spremeljanjem populacije plesni v vinorodnih okoliših smo ugotovili, da je bila največja populacija (koncentracija plesni) na grozdju določena v Štajerski Sloveniji. Največjo populacijo v moštu smo določili v Beli Krajini in na Dolenjskem, največjo populacijo v vinu pa smo določili v Beli Krajini. Najmanjše povprečne vrednosti, tako na grozdju, kot v moštu in vinu, so bile določene v Slovenski Istri (slika 15). Ob rezultatih je treba omeniti še, da so odkloni med posameznimi vzorci grozdja in vina zelo veliki – večji kot razlike med povprečnimi vrednostmi, kar je razvidno iz slike 15.



Slika 15: Povprečna koncentracija plesni na grozdju, v moštu in v vinu po različnih vinorodnih okoliših

4.2.2 Spremljanje populacije plesni na grozdju, med fermentacijo in v vinu

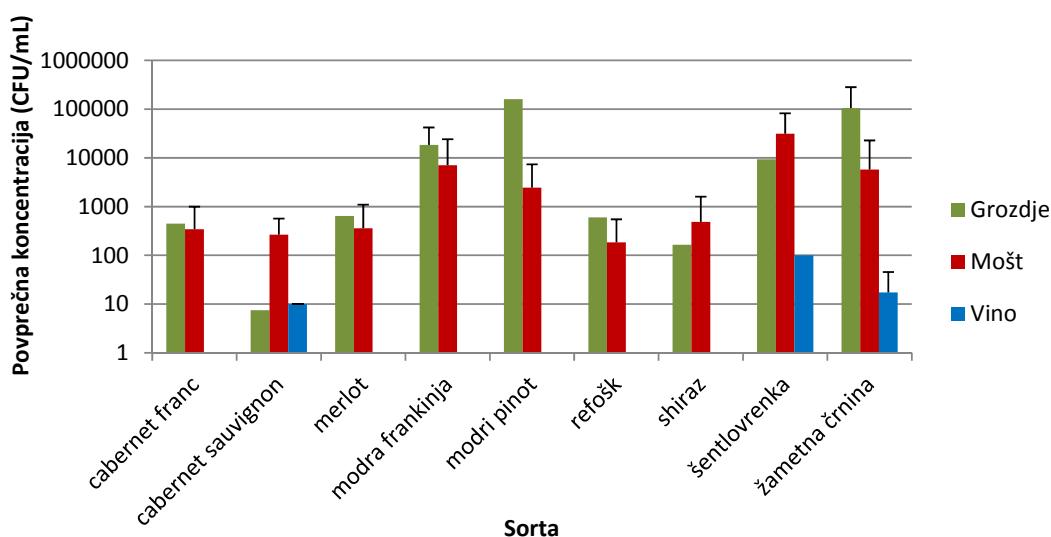
Populacija plesni je časovno odvisna, kar je prikazano na sliki 16. Na grozdju in prvi dan vzorčenja mošta (dan 1) je povprečna koncentracija plesni najvišja, nato z vsakim vzorčenjem pada, najmanjša je bila pričakovano v vinu.



Slika 16: Povprečna koncentracija plesni na grozdju v različnih časih fermentacije mošta in v vinu

4.2.3 Spremljanje populacije plesni na sortah

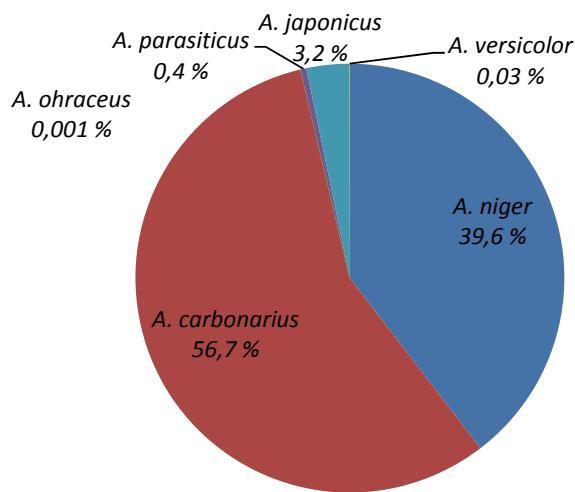
Spremljali smo spreminjanje populacije plesni po posameznih sortah. Opaziti je, da na sortah cabernet franc, cabernet sauvignon, merlot, modra frankinja, refošk, shiraz in šentlovrenka populacija plesni v moštu prevlada nad populacijo na grozdju, za razliko od sort modri pinot in žametna črnina, kjer je populacija plesni na grozdju večja kot v moštu. Plesni v vinu smo določili le pri treh sortah (šentlovrenka, žametna črnina in cabernet sauvignon) (slika 17).



Slika 17: Povprečna koncentracija plesni na grozdju, v moštu in v vinu glede na grozdne sorte

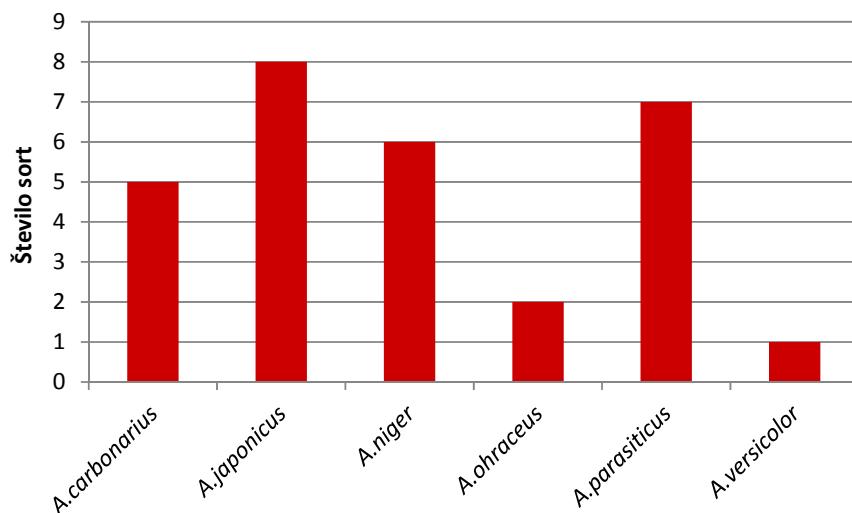
4.3 PLESNI RODOV *Penicillium* IN *Aspergillus*

Identificirali smo šest vrst plesni rodu *Aspergillus* in 24 vrst rodu *Penicillium*. Med plesnimi rodu *Aspergillus* največji delež predstavlja vrsti *A. carbonarius* (56,7 % vseh izolatov rodu *Aspergillus*) in *A. niger* (39,6 %). Ostale identificirane vrste so bile *A. japonicas* (3,2 %), *A. parasiticus* (0,4 %), *A. versicolor* (0,03 %) in *A. ochraceus* (0,001 %) (slika 18). Med plesnimi rodu *Penicillium* prevladujejo plesni vrste *P. glabrum* (77,4 %) (Slika 20) Ta vrsta je bila sicer zastopana zgolj v enem vzorcu, kjer pa je bila določena zelo visoka koncentracija plesni. Da bi lahko dobili bolj detajlno sliko o razširjenosti posameznih vrst plesni, smo pri nadaljni analizi namesto povprečne koncentracije plesni (CFU/mL) po vseh vzorcih raje spremljali število pozitivnih vzorcev (prisotnost plesni) ter povprečno koncentracijo plesni izračunali zgolj iz pozitivnih vzorcev (Slika 19, 21 in od slike 22 dalje). Če torej rezultate predstavimo z vidika števila vzorcev, na katerih smo uspeli določiti različne plesni (prisotnost), dobimo nekoliko drugačno sliko.

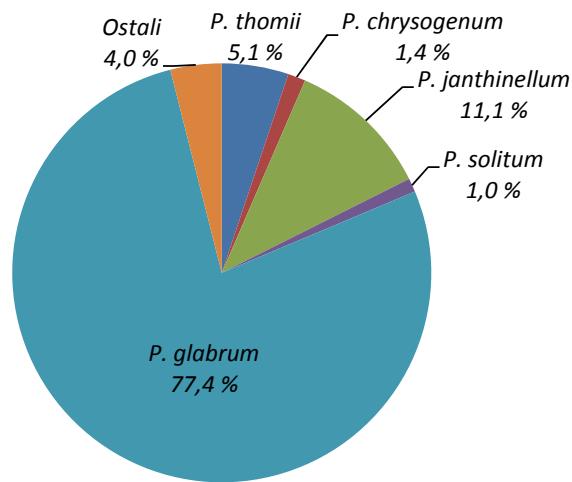


Slika 18: Deleži vrst identificiranih plesni rodu *Aspergillus* na grozdju, v moštu in v vinu

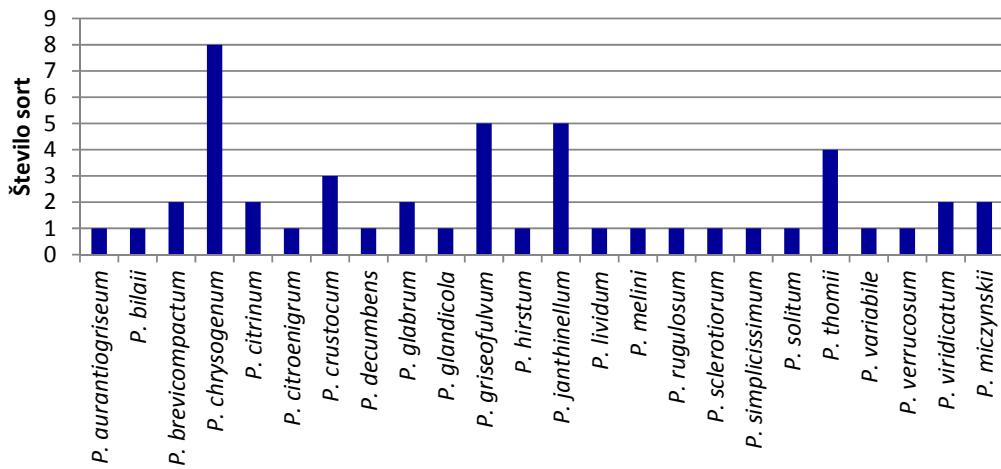
S predstavljivjo rezultatov glede na prisotnost izolatov (da/ne), smo želeli predstaviti koliko sort predstavlja nevarnost za kontaminacijo z rodovoma *Aspergillus* in *Penicillium*. Izmed plesni rodu *Aspergillus* smo na največ sortah izolirali plesni vrste *A. japonicus*, sledijo plesni vrst *A. parasiticus*, *A. niger* in *A. carbonarius*. Najmanjše število vzorcev pripada plesnim vrst *A. ochraceus* in *A. versicolor* (slika 19). Pri plesnih rodu *Penicillium* po prisotnosti prevladujejo vrste *P. chrysogenum*, *P. janthinellum*, *P. griseofulvum* in *P. thomii* (slika 21).



Slika 19: Število sort pri katerih so bile vsaj enkrat določene plesni rodu *Aspergillus* na grozdju, v moštu in v vinu



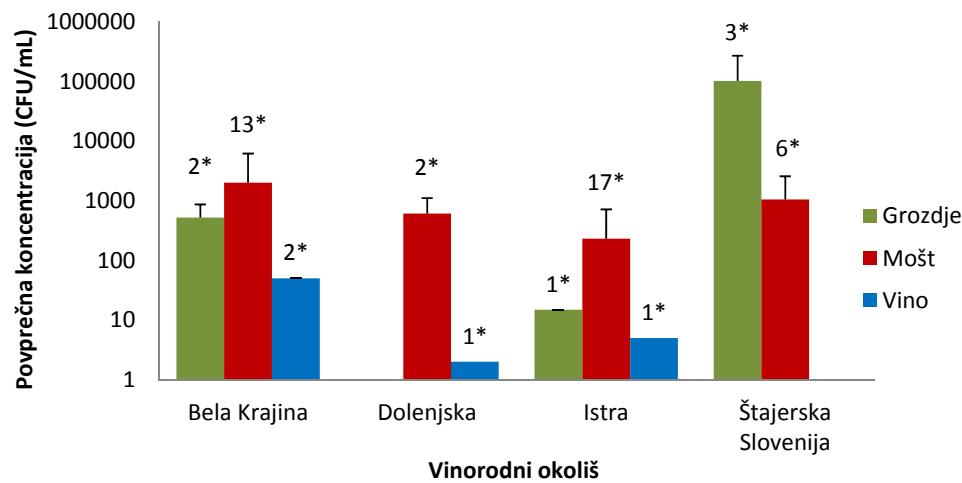
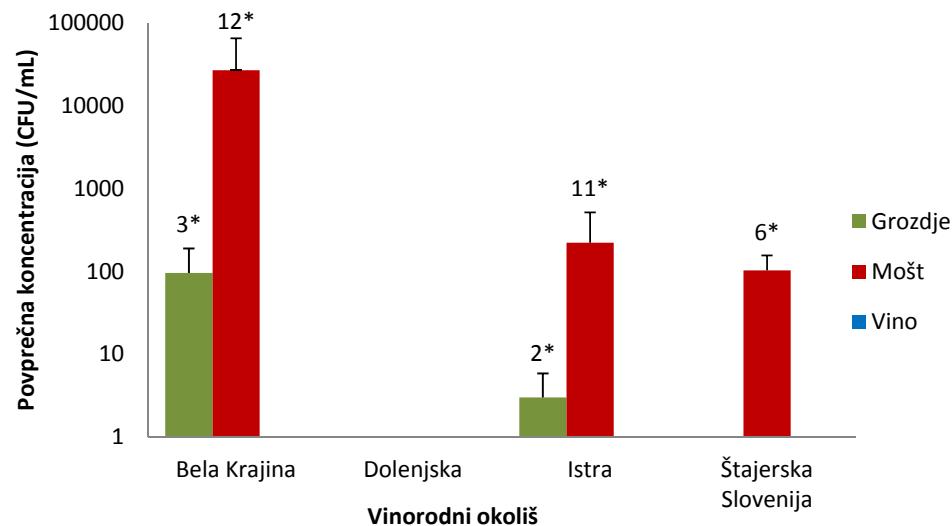
Slika 20: Deleži vrst identificiranih plesni rodu *Penicillium* na grozdju, v moštu in v vinu



Slika 21: Število sort v katerih so bile vsaj enkrat določene plesni rodu *Penicillium* na grozdju, v moštu in v vinu

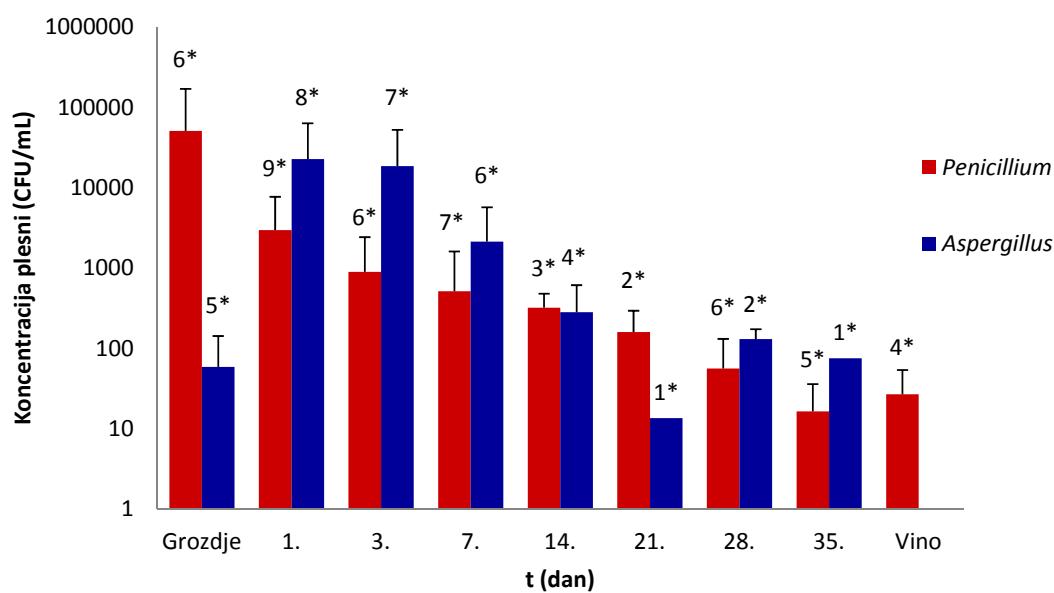
4.3.1 Razširjenost plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* na grozdju, v moštu in vinu glede na vinorodne okoliše

Zanimalo nas je, ali obstajajo razlike v prisotnosti plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* med vinorodnimi okoliši. Razlike v povprečnih koncentracijah obstajajo na grozdju tako pri plesnih rodov *Penicillium* (najvišja povprečna koncentracija plesni v Štajerski Sloveniji, najmanjša v Slovenski Istri in na Dolenjskem, kjer plesni rodov *Penicillium* nismo izolirali) (slika 22), kot pri plesnih rodov *Aspergillus*, kjer smo najvišjo povprečno koncentracijo plesni določili v Beli Krajini (slika 23). V moštu se povprečna koncentracija plesni rodov *Penicillium* med vinorodnimi okoliši bistveno ne razlikuje, za razliko od povprečne koncentracije plesni rodov *Aspergillus*, kjer prevladuje Bela Krajina z najvišjo povprečno koncentracijo plesni rodov *Aspergillus* in Dolenjska brez določenih izolatov plesni rodov *Aspergillus*. V vinu plesni rodov *Aspergillus* nismo določili, povprečna koncentracija plesni rodov *Penicillium* pa je najvišja v Beli Krajini.

Slika 22: Razširjenost plesni rodu *Penicillium* v grozdju, moštu in vinu glede na vinorodni okolišLegenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Penicillium*Slika 23: Razširjenost plesni rodu *Aspergillus* v grozdju, moštu in vinu glede na vinorodni okolišLegenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus*

4.3.2 Razširjenost plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* na grozdju, med fermentacijo in v vinu

Razširjenost plesni rodu *Aspergillus* je časovno odvisna. Število izolatov pada z vsakim vzorčenjem mošta. Manjša odstopanja so le 21. in 35. dan. Podobno obnašanje lahko ugotovimo tudi pri plesnih rodu *Penicillium*, kjer je vidna monotona časovna odvisnost povprečne koncentracije plesni. Večja odstopanja v primerjavi povprečnih koncentracij plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* se prikažejo pri vzorčenju grozdja. Pri plesnih rodu *Aspergillus* tako povprečna koncentracija ni najvišja, temveč je med najnižjimi. Trend je razviden tudi v smeri vedno manjše prisotnosti plesni na vzorcih, sploh pri plesnih rodu *Aspergillus*, medtem ko prisotnost plesni rodu *Penicillium* nekoliko bolj variira (slika 24). Glede na rezultate lahko predvidevamo, da so plesni rodu *Penicillium* bolj odporne na proces fermentacije kot plesni rodu *Aspergillus*, saj število vzorcev, v katerih smo jih določili, ne upade bistveno.



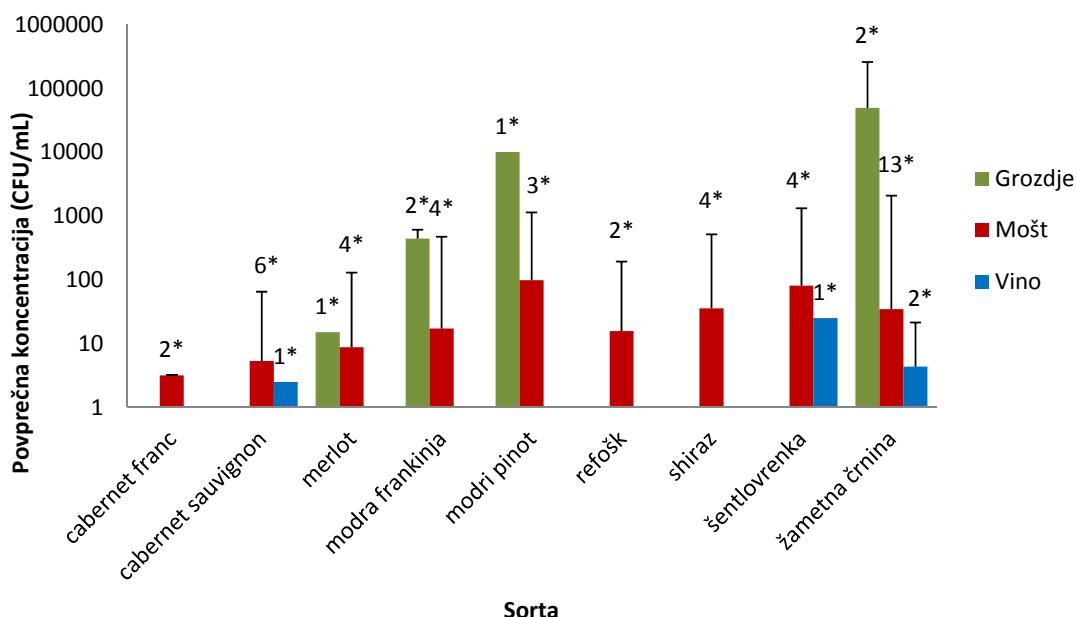
Slika 24: Razširjenost plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* na grozdju, v različnih časih fermentacije mošta in v vinu

Legenda: * Število vzorcev (prisotnost), iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus* oz. *Penicillium*

4.3.3 Razširjenost plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* glede na sorto

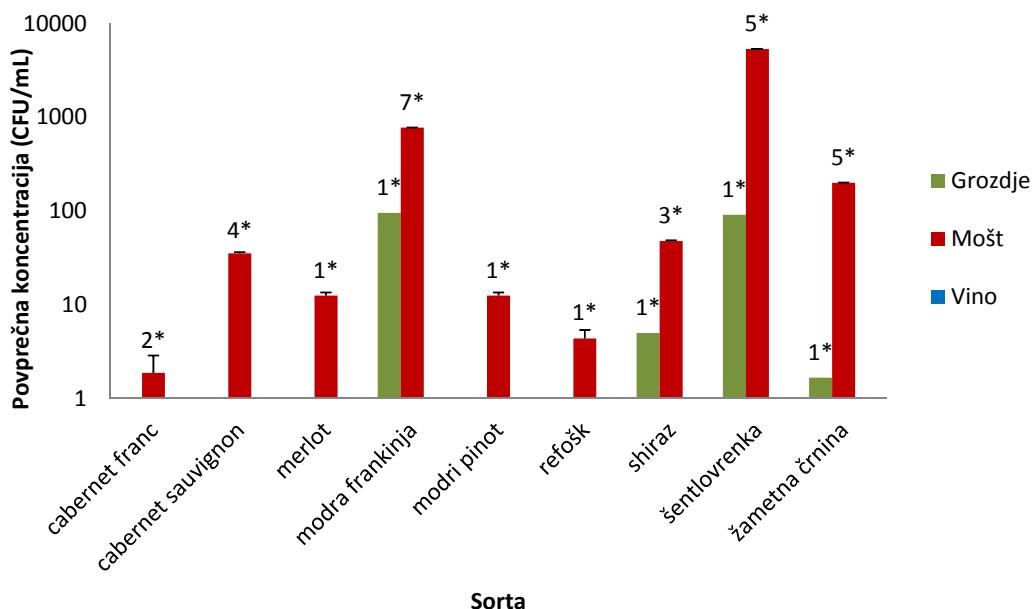
Na grozdju smo plesni rodu *Penicillium* v najvišjih povprečnih koncentracijah določili pri sortah 'Žametna črnina' in 'Modri pinot' (slika 25), plesni rodu *Aspergillus* pa pri sortah 'Modra frankinja' in 'Šentlovrenka' (slika 26). Na moštu plesni rodu *Aspergillus* prevladujejo na istih dveh sortah, sta se pa prisotnost in populacija plesni generalno povečala v primerjavi z vzorci grozdja. Plesni rodu *Penicillium* so v moštu približno enakovredno zastopane na vseh sortah.

V vinu plesni rodu *Aspergillus* nismo določili, plesni rodu *Penicillium* pa smo približno enakovredno določili na sortah merlot, šentlovrenka in žametna črnina. Iz slik 25 in 26 je poleg zgoraj naštetih stvari opaziti, da je povprečna koncentracija plesni na grozdju in v moštu bistveno višja pri plesnih rodu *Penicillium* kot pri plesnih rodu *Aspergillus*. Največjo populacijo plesni rodu ali *Penicillium* ali *Aspergillus* je opaziti na naslednjih štirih sortah grozdja: 'Modra frankinja', 'Modri pinot', 'Šentlovrenka' in 'Žametna črnina'.



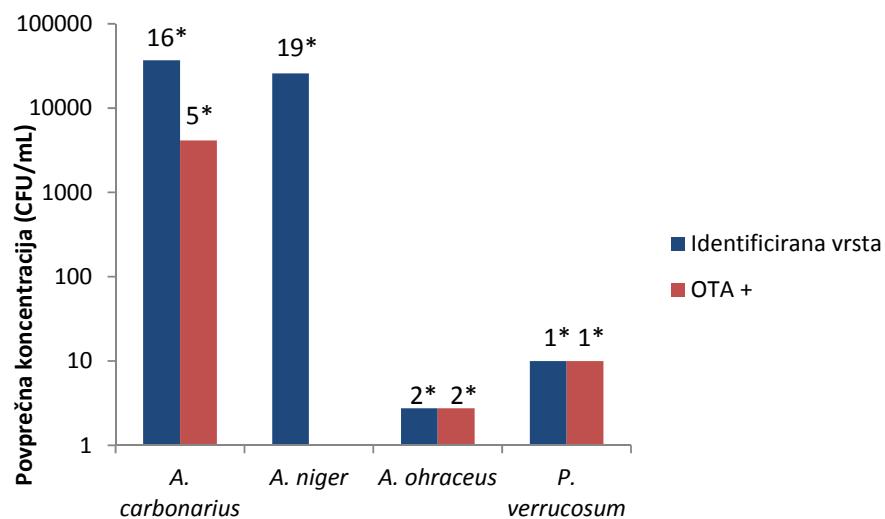
Slika 25: Razširjenost plesni rodu *Penicillium* v grozdju, moštu in vinu glede na sorto

Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Penicillium*

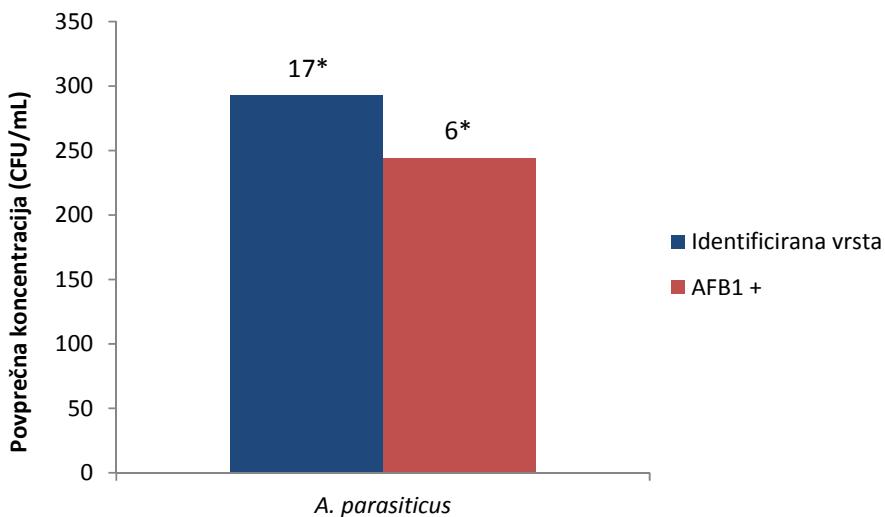
Slika 26: Razširjenost plesni rodu *Aspergillus* v grozdju, moštu in vinu glede na sortoLegenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus*

4.4 OHRATOKSIGENOST IN AFLATOKSIGENOST IDENTIFICIRANIH VRST PLESNI

Določili smo štiri vrste, ki so po pregledu literature (Bennett in Klich, 2003; Belajova in Rauova, 2007; Richard, 2007; Jackson in Al Taher, 2008; Barkai-Golan, 2008; Aydogdu in Gucer, 2009) možni proizvajalci OTA in 1 vrsto, ki bi lahko proizvajala ABF1. Po izvedeni TLC-analizi smo določili delež pozitivnih izolatov. Tako je bila najpogosteje določena vrsta *A. carbonarius* OTA-pozitivna v 31,3 %, medtem ko so bili vsi vzorci vrste *A. niger* OTA- negativni. Sta pa bili vrsti, ki sta bili najredkeje določeni, *A. ochraceus* in *P. verrucosum* 100 % OTA-pozitivni (slika 27). Vrsta *A. parasiticus* je bila AFB1-pozitivna v 35,3 % (slika 28).



Slika 27: Povprečna koncentracija identificiranih ohratoksiogenih plesni

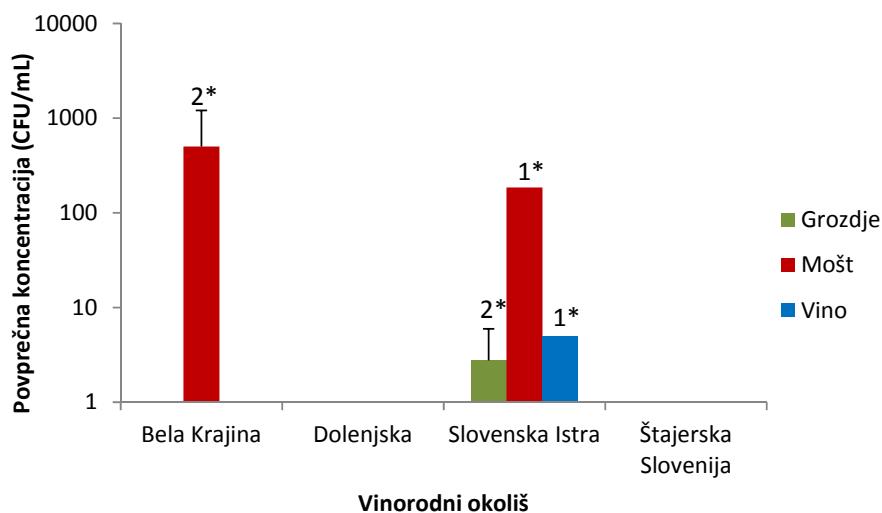
Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus* oz. *Penicillium*

Slika 28: Povprečna koncentracija identificiranih aflatoxigenih plesni

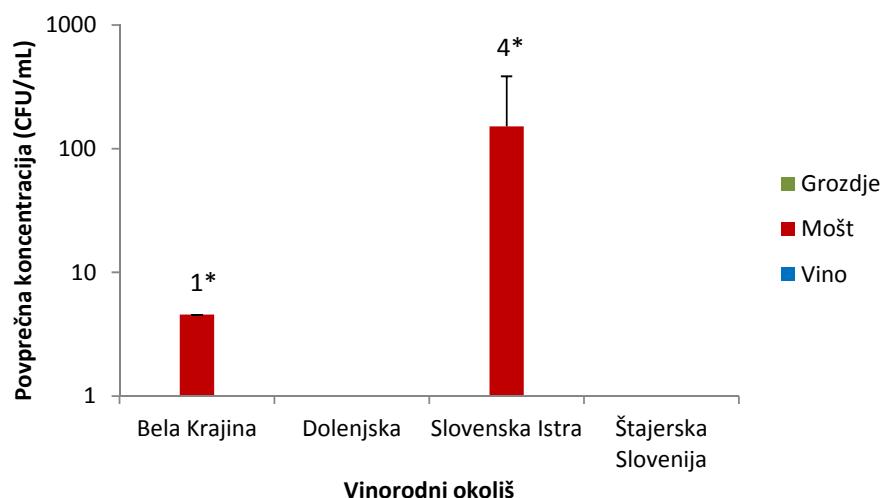
Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus*

4.4.1 Ohratoksigenost in aflatoksigenost identificiranih vrst plesni glede na vinorodni okoliš

Zanimiva je porazdelitev OTA- in AFB1-pozitivnih izolatov glede na vinorodni okoliš. Tako na Dolenjskem kot v Štajerski Sloveniji namreč ni bilo OTA- oz. AFB1-pozitivnega izolata ne na grozdju, kakor tudi ne v moštu in vino. Največje število OTA- in AFB1-pozitivnih vzorcev je bilo izolirano v Slovenski Istri. Največjo vrednost OTA-pozitivnih izolatov smo določili v moštu v Beli Krajini (slika 29), največ AFB1-pozitivnih izolatov pa v Slovenski Istri, prav tako v moštu (slika 30).



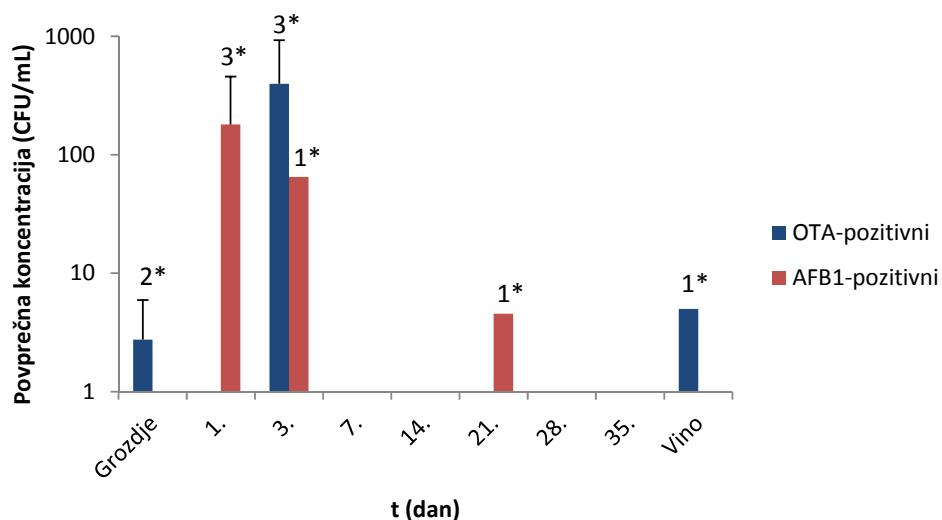
Slika 29: Povprečna koncentracija OTA-pozitivnih izolatov glede na vinorodni okoliš
Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus* oz. *Penicillium*



Slika 30: Povprečna koncentracija AFB1-pozitivnih izolatov glede na vinorodni okoliš
Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus*

4.4.2 Ohratoksigenost in aflatoksigenost identificiranih vrst plesni iz grozdja, mošta in vina

Glede povprečno koncentracijo OTA-pozitivnih izolatov zelo izstopa drugo vzorčenje mošta (dan 3). Večino AFB1- pozitivnih izolatov smo določili v prvem in drugem vzorčenju (dan 1 in 3) (slika 31). Opazili smo, da po drugem vzorčenju mošta povprečna koncentracija toksgenih izolatov zelo oz. popolnoma upade, nesorazmerno z upadom populacije.

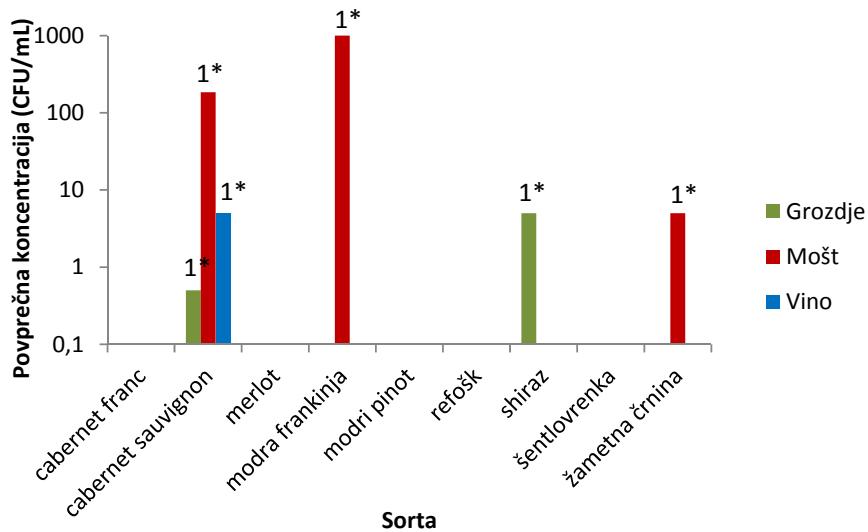


Slika 31: Povprečna koncentracija OTA- in AFB1-pozitivnih izolatov iz grozdja, mošta v različnih časih fermentacije in iz vina

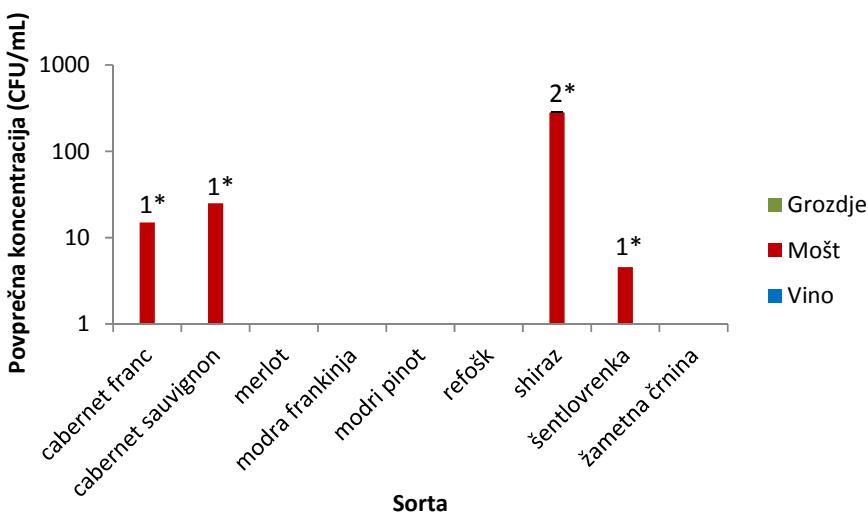
Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus* oz. *Penicillium*

4.4.3 Ohratoksigenost in aflatoksigenost identificiranih vrst plesni glede na sorto

Najvišjo povprečno koncentracijo OTA-pozitivnih izolatov smo določili na sorti modra frankinja v moštu, v manjšem številu sledita sorte cabernet sauvignon (mošt in vino) in žametna črnina (mošt) (slika 32). Na sortah shiraz, cabernet sauvignon, cabernet franc in šentlovrenka smo določili AFB1-pozitivne izolate, vse v moštu, z najvišjo povprečno koncentracijo pri grozdni sorti shiraz (Slika 33). V vinu smo določili le prisotnost OTA, in sicer le pri sorti cabernet sauvignon. Ugotovili smo, da se oba toksina pojavljata le pri sortah cabernet sauvignon in shiraz. Sorte merlot, refošk in modri pinot pa niso vsebovale OTA ali AFB1 toksgenih plesni.



Slika 32: Povprečna koncentracija OTA-pozitivnih izolatov na grozdju, moštu in v vinu glede na sorto

Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus oz. Penicillium*

Slika 33: Povprečna koncentracija AFB1-pozitivnih izolatov na grozdju, v moštu in v vinu glede na sorto

Legenda: * Število vzorcev, iz katerih smo izolirali plesni rodu *Aspergillus*

4.5 POSEBNOSTI PRI IZOLACIJI IN IDENTIFIKACIJI PLESNI

Izolacija in kvantifikacija plesni: Pri kvantifikaciji plesni se je pogosto zgodilo, da je bila plošča pri neki razredčitvi (npr. 10^{-3}) neštevna zaradi prevelikega št. kolonij (nad 300), pri večji razredčitvi (npr. 10^{-4}) pa prav tako zaradi premajhnega št. kolonij (pod 15). Pogosto se kolonij ni dalo prešteti tudi v območju števnosti (npr. 200), saj so kolonije preraščale ena drugo in se jih ni dalo ločiti med sabo (slika 34).



Slika 34: Neštevnost plošče zaradi velikega števila kolonij, ki preraščajo druga drugo

Izolacija čiste kulture: Pri eksperimentalnem delu smo pri izolaciji plesni rodu *Aspergillus* v zadnjih vzorčenjih posebno iz vzorcev Bele Krajine preko mikroskopskih preparatov opazili deformiranost posameznih struktur. Pogosto smo tako le na polovici vezikla opazili metule (slika 35). Poleg struktur, ki so imele značilen izgled za plesni rodu *Aspergillus*, smo v istem preparatu našli tudi strukture, ki so imele tipičen izgled plesni rodu *Mucor* (slika 36). Izgled kolonije je bil značilen za plesni rodu *Aspergillus*. Pri pregledu pod lupo smo našli celice, ki so bile po obliku podobne apeksu, vendar brez metul, vendar nismo mogli zanesljivo določiti ali gre za razrast plesni rodu *Mucor* preko plesni rodu *Aspergillus* ali gre mogoče za nezrele apekse plesni rodu *Aspergillus*. Predvidevali smo, da gre za okužbo s plesnimi rodu *Mucor*. Pri precepljanju kolonije *Aspergillus* iz takšne mešane kolonije smo uporabili različne tehnike: od standardnega postopka za pridobitev čiste kulture, nadalje smo poskusili s kombinacijo standardnega postopka in uporabo lupe, s katero smo določili nekontaminirani del. Ker se je izkazalo, da je konica cepilne igle bila predebela, smo cepilno iglo zamenjali s pasteurjevimi cevkami, s katerimi smo pridobili

kot las tanko iglo. S slednjim postopkom smo iz kar nekaj mešanih plošč uspešno izolirali čisto kulturo. Uspešnost izolacije čiste kulture je bila največja pri prvi precepitvi. Pri vsaki nadaljnji precepitvi narejeni iz prejšne precepitve je izgled kolonije postajal vrstno netipičen (slika 37), kljub temu, da lastnosti kolonije pod lupo in mikroskopom niso izgledale kot kontaminirana kolonija. Zaradi nenavadega poteka dogodkov smo takšne kolonije določili kot rod *Mucor*. Kolonije, ki so bile določene kot čiste kulture in so imele tipičen izgled vrste *A. carbonarius*, z izjemo barve kolonije (bela na gojišu CYA), smo identificirali kot *A. carbonarius* (slika 38). Ko smo te kolonije precepili na gojišče primerno za določitev toksinov (YES), smo ponovno pridobili netipični izgled (slika 39 a in b) (običajno je bil izgled na gojišču YES primerljiv z izgledom na gojišču CYA). Predvidevamo, da gre za kakšen poseben sev plesni vrste *A. carbonarius*.



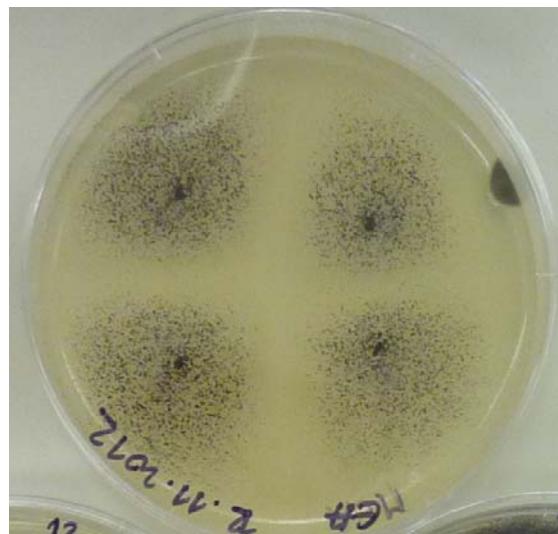
Slika 35: Nenavaden apeks plesni rodu *Aspergillus*, 400x povečava

Strojnik L. Raznolikost plesni na rdečem grozdju in v moštu.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2014



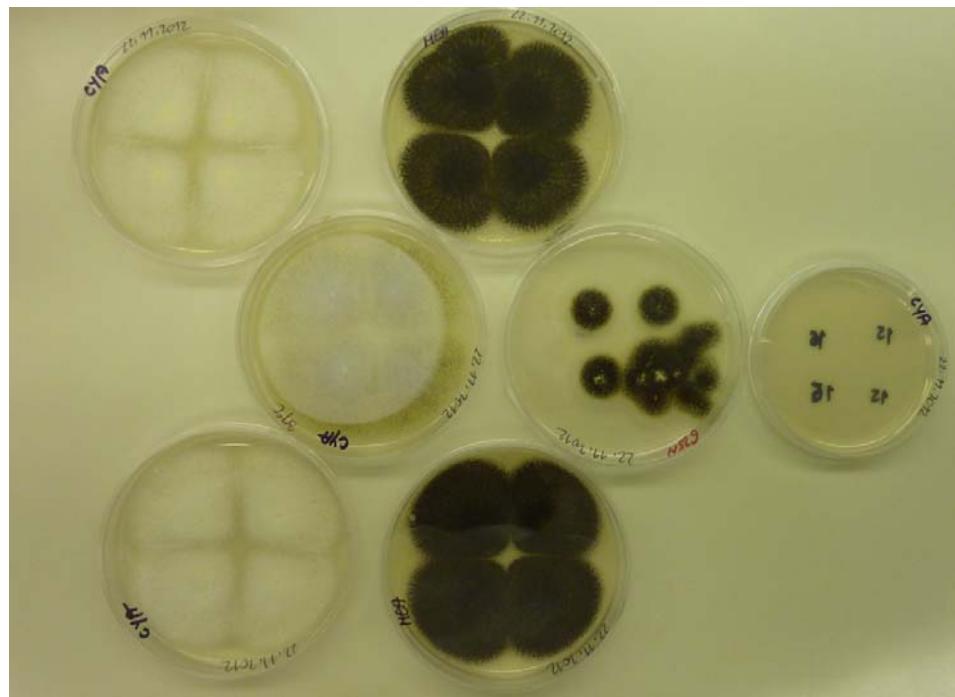
Slika 36: Izgled sporangija plesni rodu *Mucor*, 1000x povečava. Na sliki je opaziti tudi konidije, ki pripadajo plesnim rodu *Aspergillus*



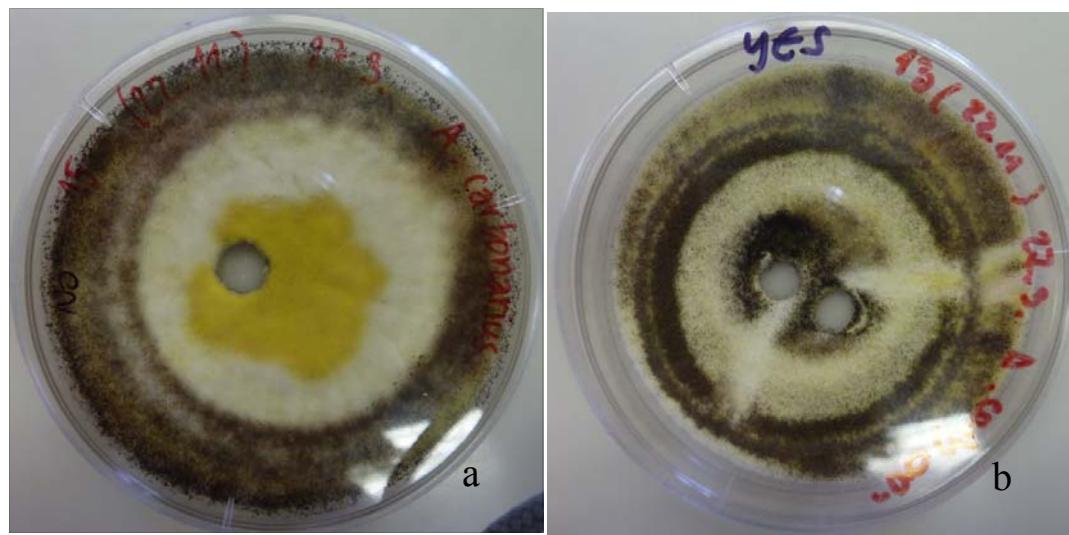
Slika 37: Netipičen izgled plesni vrste *A. niger* oz. *A. carbonarius*, posledica večkratnega precepljanja z namenom pridobitve čiste kulture

Strojnik L. Raznolikost plesni na rdečem grozdju in v moštu.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2014



Slika 38: Netipičen izgled plesni vrste *A. carbonarius* na gojišču CYA, 25 °C



Slika 39: Poseben izgled plesni vrste *A. carbonarius* (precepitev s plošč – Slika 38) na gojišču YES, 25 °C

Identifikacija plesni: Identifikacijo plesni do nivoja vrste smo izvedli za izolate rodov *Penicillium* in *Aspergillus*. Pri ostalih rodovih ključi za identifikacijo vsebujejo pre malo vrst, da bi vrsto lahko zanesljivo določili. Ključi za identifikacijo plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus* pa vsebujejo raznolik nabor vrst. Identifikacija določene vrste po ključu se pogosto razlikuje le v drobnih podrobnostih, ki so praviloma pod mikroskopom zelo težko določljive in odvisne od dobre priprave mikroskopskega preparata. Po standardni metodi priprave nativnega mikroskopskega preparata naj bi za boljšo prepoznavnost struktur uporabili modro barvilo. Izkazalo se je, da (posebno pri plesnih rodu *Aspergillus*) to barvilo pogosto zakrije strukture, ki ločijo eno vrsto od druge. Za pomemben pripomoček pri razlikovanju vrst med sabo se je izkazala lupa. Zelo uporabne bi bile tudi barvne fotografije kolonij (zračni in substratni micelij) ter slike pod lupo za opažanje posebnih značilnosti določenih vrst (izgled metul, eksudata, sklerocijev). Opis kolonije posamezne vrste vsebuje tudi barvo substratnega in zračnega micelija. Ker so barve v določenih primerih težko predstavljive, bi ob ključu bila zelo zaželena barvna lestvica.

5 RAZPRAVA

Raziskavo smo izvedli, ker pri pregledu dosedanje literature nismo zasledili študij o raznovrstnosti populacije plesni, o velikosti njihove populacije, stopnji kontaminacije s plesnimi rodov *Aspergillus* oz. *Penicillium* ter o prisotnosti mikotoksinov OTA in AFB1, narejenih na slovenskem grozdju, moštu oziroma vinu. Poraba vina v Sloveniji znaša 45 L/prebivalca in je med največjimi glede na evropska (povprečje držav Italije, Francije in Španije je 35 L) oz. svetovna merila (povprečje držav Avstralija, Argentina, ZDA, Kitajska je 14,5 L/prebivalca) (Wine Institute, 2011). Skrb glede kontaminacije s plesnimi in posledično prisotnosti mikotoksinov ni pomembna zgolj pri vinu, temveč tudi na grozdju in grozdnem soku, še posebej odkar so glavni potrošniki otroci in odkar je poraba grozdnega soka večja kot poraba vina (Terra in sod., 2012). Skrb je izrazila tudi Evropska agencija za varnost hrane (EFSA), ki je podala oceno izpostavljenosti OTA, ki se giblje med 15 do 60 ng/kg telesne mase na teden in določila sprejemljiv tedenski vnos 120 ng/kg telesne mase (Uredba komisije ES 1881/2006; Uredba komisije EU 105/2010). Na podlagi podatkov o pojavnosti OTA v živilih in živilskih proizvodih ter njihovi porabi je bilo ugotovljeno, da je vino na drugem mestu, za žitaricami, glavni vir dnevnega vnosa OTA (13 % vnosa) (WHO, 2001; Jackson in AL Taher, 2008). Za razliko od vina pa grozdje, suho grozdje in mošt zaradi manjšega odstotka uživanja ne predstavljajo tako velikega vnosa OTA kot vino, kljub temu da so vsebnosti OTA v suhem grozdju (50-70 µg/kg) večje od tistih, določenih v vinu (15,6 µg/L) (Miraglia in Brera, 2002). Največje vsebnosti OTA so bile določene v rdečih vinih (Jackson in Al Taher, 2008; Mateo in sod., 2007; Battilani in sod., 2008), kar je posledica postopka maceracije (stika mošta z jagodnimi kožicami) rdečih vin, ki pri belih vinih ne poteka (Jaskoson in Al Taher, 2008). Jagodna kožica, ki je za kontaminacijo s črnimi aspergili najbolj dovzetna v obdobju od zrelosti do trgatve, se v tem obdobju zmehča in postane bolj dovzetna za poškodbe. Delež sladkorja naraste, sadje z visokim deležem ogljikovih hidratov pa predstavlja odličen substrat za razrast plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium* ter proizvodnjo OTA (Hocking in sod., 2007; Jackson in Al Taher 2008; Amezqueta in sod., 2012; Chunmei in sod., 2013).

Dosedanje študije so pokazale, da so na grozdju, kot naravna mikroflora, vedno prisotne plesni rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* in *Penicillium* (Serra in sod., 2005; Belli in sod., 2006; Aydogdu in Gucer, 2009). Pred raziskavo smo predvidevali, da bomo identificirali plesni rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Rhizopus*. Hipotezo smo deloma potrdili, saj smo identificirali vse rodove, razen rodu *Epicoccum*. Na grozdju je bil najpogosteje identificiran rod *Penicillium* (58,6 %), s čimer smo potrdili dosedanje raziskave, ki navajajo, da pojavnost tako imenovanih plesni na polju, kamor spadajo rodovi *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Stemphylium* in *Ulocladium*, z zorenjem grozdnih jagod upada, naraščajo pa sporolirajoče plesni, kot so rodovi *Aspergillus*, *Penicillium* in *Rhizopus* (Serra in sod., 2005; Chunmei in sod., 2013). 4 % izolatov so zaradi neizrazitih tipičnih mikro- in makro-morfoloških znakov ostali neidentificirani. Slednjih je bilo največ na Dolenjskem, kjer predstavljajo kar 84 %.

Zanimivo je, da so bili skoraj vsi neidentificirani izolati določeni na grozdju, kasneje pa se v moštu oz. vinu ne pojavljajo več. Med fermentacijo (v moštu) smo najpogosteje izolirali plesni rodu *Aspergillus* z 71 %, po končani fermentaciji (v vinu) pa zopet plesni rodu *Penicillium* (100 %). Zanimiva je ugotovitev, da najpogosteje izolirana rodova, *Penicillium* oz. *Aspergillus*, prevladujeta le v enem okolišu, vendar pa je v tem okolišu povprečna koncentracija plesni višja kot v drugih okoliših (slike 6, 8 in 10). Najvišja povprečna koncentracija plesni rodu *Penicillium* je bila določena na grozdju v Štajerski Sloveniji (v drugih vinorodnih okoliših sta bila najpogosteje izolirana rodova *Cladosporium in Botrytis*) in v vinu (Bela Krajina). Izolate rodu *Aspergillus* smo najpogosteje določili v moštu v Beli Krajini (v drugih območjih smo najpogosteje izolirali rodova *Botrytis* in *Alternaria*). Iz tega lahko zaključimo, da obstajajo razlike v povprečni koncentraciji plesni med vinorodnimi okoliši tako na grozdju, v moštu kot v vinu ter da se sestava mikroflore v okoliših z določeno najvišjo povprečno koncentracijo plesni bistveno razlikuje od sestave mikroflore v ostalih okoliših (z izjemo pri vinu, kjer v vseh pokrajinah prevladuje le en rod plesni). Štajerska Slovenija in Bela Krajina torej izstopata po najvišji povprečni koncentraciji plesni, pri prvem vinorodnem okolišu določeni na grozdju, kjer v večjem deležu pripada rodu *Penicillium*, pri drugem pa v moštu, kjer skoraj vsi izolati pripadajo rodu *Aspergillus*.

Povprečna koncentracija plesni na grozdju je primerljivo s povprečno koncentracijo plesni v moštu. Povprečna koncentracija plesni v vinu predstavlja zanemarljiv delež, saj je 10000x nižja kot na grozdju oz. v moštu (slika 11). Populacija plesni je največja na grozdju in nato po dnevih fermentacije pričakovano upada. Po 14 dneh fermentacije je populacija plesni v moštu primerljiva s populacijo plesni v vinu (slika 16). S tem lahko potrdimo dosedanje študije, ki navajajo vinograd kot primarni vir okužbe (Bennett in Klich, 2003; Battilani in sod., 2008; Bhat in sod., 2010). Ob neprimerinem skladiščenju oz. predelavi se populacija plesni lahko še poveča in je tako večja kot na primarni surovini - grozdju (Bennett in Klich, 2003; Battilani in sod., 2008). Veča se lahko vse do zadostne tvorbe alkohola, ki ima dokazano inhibitorno (zaviralno) delovanje na rast in razmnoževanje plesni (Hocking in sod., 2007; Battilani in sod., 2008; Jackson in Al Taher, 2008).

V vseh vinorodnih deželah, razen v Štajerski Sloveniji, je bilo ugotovljeno, da je povprečna koncentracija plesni rodu *Penicillium* v moštu višja kot na grozdju. Najnižja je v vinu (slika 22). Tudi za plesni rodu *Aspergillus* velja, da je povprečna koncentracija plesni v moštu višja kot na grozdju v vseh vinorodnih okoliših (slika 23). Za visoke koncentracije plesni v moštu je več razlogov; eden izmed njih je gotovo ugoden medij za rast in razvoj plesni (jagodne kožice, prisotnost sladkorja) (Hocking in sod., 2007; Jackson in Al Taher, 2008, Chunmei in sod., 2013), verjetno pa vpliva tudi čistoča procesnega postopka. Nižje koncentracije plesni proti koncu fermentacije in v vinu so verjetno posledica naraščanja vsebnosti alkohola in prekinitev postopka maceracije (Hocking in sod., 2007; Battilani in sod., 2008; Jackson in Al Taher, 2008).

Poleg poškodovanih oz. nagnitih grozdnih jagod je za stopnjo kontaminacije in prisotnost toksinov bistvenega pomena tudi podnebje vinogradniškega področja in vremenske razmere vinorodnega letnika (Battilani in sod., 2006; Jackson in Al Taher, 2008). Najvišje vsebnosti OTA ($>2 \mu\text{g/L}$) so bile določene ob kombinaciji velikega števila poškodovanih jagod in višje povprečne temperature (nad 21°C). Ugotovljeno je bilo tudi, da se optimalna temperatura in a_w , pri kateri uspevajo plesnih vrst *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* in *A. niger*, praviloma razlikuje od optimalne temperature in a_w kjer te iste plesni tvorijo toksin (Battilani in sod., 2008).

Določena so bila območja z najvišjim tveganjem OTA v Evropi na Pirenejskem polotoku, v južni Franciji, Grčiji in Turčiji (Battilani in sod., 2008). Dosedanje študije navajajo prisotnost plesni rodu *Penicillium* v hladnejših območjih in rodu *Aspergillus* (vrsti *A. niger* in *A. carbonarius*) v območjih z mediteranskim oz. subtropskim (*A. parasiticus*) podnebjem (Battilani in sod., 2006; Jakson in Al Taher, 2008; Battilani in sod., 2008). Slovenija ima kljub svoji majhnosti klimatsko zelo različna območja. Zato smo predvidevali, da se bodo pokazale razlike med različnimi vinorodnimi okoliši – predvsem med Slovensko Istro s submediteranskim podnebjem in ostalimi območji s celinskim podnebjem. Izkazalo se je, da plesni rodu *Penicillium* na grozdju prevladujejo v Štajerski Sloveniji, medtem ko jih na Dolenjskem nismo izolirali. Najvišje povprečne koncentracije plesni v vinu smo določili v Beli krajini (slika 22). V slednji smo določili najvišje povprečne koncentracije plesni rodu *Aspergillus* na grozdju in v moštu. Plesni rodu *Aspergillus* v vinu nismo določili, prav tako jih nismo določili v vinorodnem okolišu Dolenjska (slika 23). Glede na jakost kontaminacije tako prevladujeta dve območji: Štajerska Slovenija (rod *Penicillium* na grozdju) in Bela Krajina (rod *Aspergillus* v moštu).

Prikazane so bile tudi določene razlike med različnimi sortami grozdja. Tako naj bi namizne sorte grozdja vsebovale bistveno večje vrednosti OTA kot vinske sorte, namenjene predelavi (Chunmei in sod., 2013). V raziskavi smo dokazali, da med grozdom in moštom pri večini sort ne obstajajo bistvene razlike v populaciji plesni. Tako na grozdju kot v moštu z visokimi povprečnimi koncentracijami plesni izstopajo sorte modra frankinja, modri pinot, šentlovrenka in žametna črnina. Zanimiva je ugotovitev, da so to sorte celinskega dela. Pri vseh sortah iz Slovenske Istre je bila namreč določena 100x manjša povprečna koncentracija plesni (glede na »celinske sorte«) (slika 25). Nižja koncentracija plesni je najverjetneje posledica dobrega upravljanja vinogradov. Populacijo plesni v vinu, ki je bistveno manjša od populacije tako na grozdju kot v moštu, predstavljajo tri sorte (šentlovrenka, žametna črnina in cabernet sauvignon) (slika 25).

Opaziti je tudi razlike v prisotnosti plesni rodov *Penicillium* oz. *Aspergillus* med sortami. Na grozdju plesni rodu *Penicillium* prevladujejo pri sortah 'Modri pinot' in 'Žametna črnina' (sorti Štajerske Slovenije), niso pa prisotne pri sortah iz Slovenske Istre oz. so prisotne v zanemarljivih deležih. Tako na grozdju kot v moštu pri sortah modra frankinja in šentlovrenka, ki sta sorte iz Bele Krajine, prevladujejo plesni rodu *Aspergillus* (slika 25).

Če povzamemo rezultate, lahko zaključimo, da ima na prisotnost in stopnjo kontaminacije s plesnimi rodov *Penicillium* oz. *Aspergillus* vlogo geografska lokacija vinograda in klimatski vplivi na tem območju, kar v raziskavah navajajo tudi Battilani in sod. (2008). Predvidevamo, da na razlike med vzorci pomembno vpliva tudi upravljanje vinograda. Zmanjševanje prisotnosti aspergilov v vinogradu je mogoče doseči z minimizacijo mehanskih in okoljskih poškodb jagod, z odstranjevanjem poškodovanih oz. nagnitih jagod s trte oz. iz tal ter z uporabo fungicidnih pripravkov (Jackson in Al Taher, 2008). Po trgovini na vsebnost OTA, predvsem pri suhem grozdju, pomembno vplivajo okoljski dejavniki (temperatura, relativna vlaga). Zelo pomembno je, da se proces sušenja izvede čim prej, produkt pa se lahko zapakira le ob primerni stopnji vlage in skladišči pod 15° C (Hocking in sod., 2007; Jackson in Al Taher, 2008; Amezqueta in sod., 2012). Znižanje pojavnosti črnih aspergilov na namiznem grozdju, grozdnem soku, vinu in suhem grozdnem sadju je mogoče doseči z žveplovim dioksidom (Hocking in sod., 2007). Uporaba določenih bakterij, kvasovk ali absorbentov, kot so aktivno oglje, tekoča želatina ali bentonit, sicer zmanjša vsebnost OTA v vinu (v povprečju za 40 %), vendar pogosto negativno vpliva na kakovost vina (Hocking in sod., 2007; Quintela in sod., 2013).

V raziskavi smo identificirali šest vrst plesni rodu *Aspergillus* in 24 vrst plesni rodu *Penicillium*. Med plesnimi rodu *Aspergillus* so prevladovali tako imenovani črni aspergili. Glede na izračunane povprečne koncentracije določene plesni v vzorcu smo med aspergili najpogosteje identificirali vrsti *A. carbonarius* in *A. niger* z 56,7 % oz. 39,6 % (slika 18). Tudi drugi avtorji (Serra in sod., 2005; Belli in sod., 2006; El Khoury in sod., 2006; Chunmei in sod., 2013) so najpogosteje identificirali ravno ti dve vrsti. Serra in sod., 2005 navajajo kot najpogosteje določene vrste rodu *Penicillium* vrste *P. brevicompactum*, *P. glabrum* in *P. thomii*. V naši raziskavi pa je z 77,4 % prevladovala vrsta *P. glabrum* (slika 20). Kar je posledica izredno visoke koncentracije plesni enega vzorca. Bolj smiseln prikaz razširjenosti plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium* dobimo, če rezultate prikažemo v obliki števila kontaminacij, pri izračunu koncentracij pa upoštevamo zgolj kontaminirane vzorce. Tako lahko ocenimo pogostnost pojavljanja (razširjenost) plesni in jakost kontaminacije. Na takšen način dobimo informacijo o pogostosti pojavljanja vrst rodu *Aspergillus*, med katerimi se na največjem številu sort grozdja pojavljava vrsti *A. japonicus* in *A. parasiticus*, šele nato sledita vrsti *A. niger* in *A. carbonarius* (slika 19). Pri plesnih rodu *Penicillium* sledi, da so najbolj razširjene vrste *P. chrysogenum*, *P. janthinellum*, *P. griseofulvum* in *P. thomii* (slika 21).

Ker so mikotoksini, sekundarni metaboliti gliv, kemijsko in temperaturno stabilne spojine, jih tako le s težavo odstranimo iz živil. Uživanje z mikotoksini onesnažene hrane pa privede do toksičnih odzivov, ki so odvisni od številnih dejavnikov, kot so toksičnost mikotoksinov, pogostost in čas trajanja izpostavljenosti, starost in prehranski status posameznika ter drugih (Peraica in sod., 1999). Med toksine, ki pomembno vplivajo na zdravje ljudi, CAST prišteva tudi OTA in AFB1 (Serra in sod., 2005). Ohratoksin A velja za imunosupresivnega (zavira delovanje imunskega sistema), potencialno teratogenega

(povzroča nepravilnosti v razvoju zarodka), potencialno kancerogenega (povzroča rakasta obolenja) (Bennett in Klich, 2003), ima pa tudi potencialno genotoksično (povzroča genetske poškodbe) in nefrotoksično delovanje (povzroča poškodbe ledvic) (Jackson in Al Taher, 2008). Aflatoksin B1 je dokazano kancerogen, poleg tega deluje tudi imunosupresivno, teratogeno in mutageno (povzroča spremembe genetskega materiala) (Richard, 2007; Barkai-Golan, 2008).

Izolirali smo štiri vrste plesni, ki glede na literaturo (Bennett in Klich, 2003; Bennett in Klich, 2003; Belajova in Rauova, 2007; Richard, 2007; Jackson in Al Taher, 2008; Barkai-Golan, 2008; Aydogdu in Gucer, 2009) v ugodnih razmerah lahko tvorijo OTA (*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* in *P. verrucosum*) in eno vrsto, ki prav tako v ugodnih razmerah lahko tvori AFB1 (*A. parasiticus*). Plesni vrste *A. flavus*, ki je prav tako aflatoksična, nismo določili. Med identificiranimi izolati plesni vrste *A. niger* nismo našli ohratoksičnih. V nasprotju z dosedanjimi študijami, kjer so vsi oz. skoraj vsi vzorci *A. carbonarius* OTA-pozitivni (Romero in sod., 2005; Battilani in sod., 2008; Chunmei in sod., 2013), je bilo v naši raziskavi takšnih le 31,3 % (slika 27). Vzrok za tako majhen delež OTA-pozitivnih vzorcev vrste *A. carbonarius* v naši raziskavi bi morebiti lahko izhajal iz pomanjkljive identifikacije, saj je bila ta izvedena s klasičnimi preiskavami, pri katerih določamo pravzaprav morfološke značilnosti izolatov. Razlika med plesnimi vrst *A. niger* in *A. carbonarius* je bila določena na podlagi velikosti eksudata, na podlagi drugih lastnosti je bila identifikacija neizvedljiva. Vzrok je lahko tudi v premajhni občutljivosti metode TLC in posledično slabšem vizualnem odčitavanju rezultatov. Plesni vrste *A. parasiticus* so bila aflatoksin B1-pozitivne v 35,3 % izolatov (slika 28), kar je primerljivo rezultatom iz objavljene literature (El Khoury in sod., 2008).

Nepričakovana je izolacija in identifikacija plesni vrst *A. ochraceus* in *P. verrucosum*, čeprav v zanemarljivih deležih. Vrsti sta prvotni tvorki ohratoksin A, a se kot del naravne mikroflore grozdja ne pojavlja (Cabanes in sod., 2002; Belli in sod., 2006). Izolirali smo tako plesni vrste *A. ochraceus* kot vrste *P. verrucosum* v treh vzorcih in vsi vzorci so bili OTA-pozitivni (slika 27). Glede na močno intenzitet florescencije črte predvidevamo, da bi bila vsebnost OTA, če bi jo preverjali s kvantitativnimi metodami, velika. S tem smo ovrgli hipotezo, da bomo OTA oz AFB1 določili le pri rodu *Aspergillus*.

Največ vzorcev je tvorilo OTA oz. AFB1 v prvih treh dneh fermentacije (slika 31). S tem smo potrdili hipotezo, da bomo največ OTA oz. AFB1 (glede na koncentracijo plesni) določili pri prvih vzorčenjih pred alkoholno fermentacijo. Prisotnost OTA in AFB1 na grozdju je primerljiva s pojavljajočo se v vinu in je zanemarljivo majhna, vsi vzorci pa prihajajo iz Slovenske Istre. Prisotnost AFB1 v moštu smo določili le pri vzorcih iz Slovenske Istre in Bele Krajine (slika 30). OTA v moštu smo prav tako določili le iz teh dveh okolišev (slika 29). Če podrobnejše pogledamo, kateri toksin prevladuje pri posamezni sorti, ugotovimo, da smo OTA najpogosteje določili pri sorti modra frankinja iz Bele Krajine, sledita sorti shiraz in cabernet sauvignon iz Slovenske Istre (slika 32). AFB1 smo

najpogosteje določili pri sorti shiraz iz Slovenske Istre (slika 33). Če povzamemo rezultate, lahko sklepamo, da so ugodne razmere za rast ohratoksgenih plesni hkrati tudi ugodni razmere za tvorbo OTA, saj je bila pojavnost plesni rodu *Aspergillus* in OTA največja v Beli Krajini. To pa ni nujno tudi res, saj velja, da razmere, ki prispevajo k ugodni rasti plesni, pogosto niso enake razmeram za tvorbo toksinov (Jackson in Al Taher, 2008). Glede na tvorbo AFB1, ki je bila zabeležena izključno v Slovenski Istri, lahko potrdimo navedbe, ki prikazujejo *A. parasiticus* kot vrsto, ki dobro uspeva in tvori toksine v subtropskih območjih (Jackson in Al Taher, 2008). Deloma smo potrdili tudi hipotezo, da bomo največje število izolatov, ki tvorijo OTA oz. AFB1 res določili v vinorodnem okolišu Slovenska Istra (skupno osem vzorcev). Hipoteza ni potrjena v celoti, saj glede na nizko povprečno koncentracijo plesni, ki so tvorile toksin OTA oz. AFB1, prevladuje vinorodni okoliš Bela Krajina (sliki 29 in 30).

6 SKLEPI

- Populacija plesni je bila največja na grozdju in je nato po dnevih fermentacije pričakovano upadala. Po 14 dneh fermentacije je bila povprečna koncentracija plesni v moštu primerljiva s povprečno koncentracijo plesni v vinu.
- V vzorcih grozdja, mošta in vina smo identificirali plesni rodov *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Acremonium* in *Rhizopus*.
- Najpogosteje izolirane so bile plesni rodov *Penicillium* na grozdju (58,6 %) in v vinu (100 %) ter *Aspergillus* v moštu (71 %).
- Najvišja povprečna koncentracija plesni rodu *Penicillium* je bila določena na grozdju v Štajerski Sloveniji, v moštu in v vinu pa v Beli Krajini.
- Na grozdju ter v vinu so bile najpogosteje izolirane plesni rodov *Penicillium* (v 58,6 % oz. 100 % izolatov), medtem ko so v moštu prevladovale plesni rodu *Aspergillus* (71 % izolatov).
- Bistvenih razlik v populaciji plesni med grozdjem in moštom pri večini sort nismo zasledili. Tako na grozdju kot v moštu z visokimi povprečnimi koncentracijami izstopajo sorte modra frankinja, modri pinot, šentlovrenka in žametna črnina. Pri vseh sortah iz Slovenske Istre je bila določena veliko nižja povprečna koncentracija.
- V raziskavi smo identificirali šest vrst plesni rodu *Aspergillus* in 24 vrst plesni rodu *Penicillium*. Najbolj razširjene vrste so bile *A. japonicus*, *A. parasiticus*, *A. niger* in *A. carbonarius* ter *P. chrysogenum*, *P. janthinellum*, *P. griseofulvum* in *P. thomii*.
- Med sortami smo zasledili razlike v prisotnosti plesni rodu *Penicillium* oz. *Aspergillus*. Na grozdju plesni rodu *Penicillium* prevladujejo pri sortah 'Modri pinot' in 'Žametna črnina' (Štajerska Slovenija), na grozdju in v moštu pa pri sortah modra frankinja in šentlovrenka (Bela Krajina) prevladujejo plesni rodu *Aspergillus*.
- Izolirali smo štiri vrste plesni, ki v ugodnih razmerah lahko tvorijo OTA (*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* in *P. verrucosum*) in eno vrsto, ki lahko tvori AFB1 (*A. parasiticus*).
- Noben izolat vrste *A. niger* ni tvotil OTA in 31,3 % izolatov, določenih kot plesni vrste *A. carbonarius*, je bilo OTA-pozitivnih. Izolati plesni vrste *A. parasiticus* so bili AFB1-pozitivni v 35,3 %. Plesni vrst *A. ochraceus* in *P. verrucosum* smo izolirali v majhnem št. vzorcev (*A. ochraceus* v 2 vzorcih, *P. verrucosum* v 1 vzorecu), vendar so bili prav vsi vzorci OTA-pozitivni.
- Najvišje povprečne koncentracije OTA- in AFB1-pozitivnih izolatov smo izolirali in identificirali iz vzorcev v prvih treh dneh fermentacije.

- AFB1- in OTA-pozitivne izolate smo določili med izolati iz Slovenske Istre in Bele Krajine. Prisotnost OTA-pozitivnih izolatov na grozdju je primerljiva s pojavnostjo izolatov v vinu (vsi vzorci prihajajo iz Slovenske Istre) in je glede na izolate iz mošta zanemarljivo majhna. AFB1-pozitivne izolate smo določili le v moštu.

- OTA-pozitivne izolate smo najpogosteje (glede na koncentracijo plesni) določili pri sorti modra frankinja iz Bele Krajine, sledita sorte shiraz in cabernet sauvignon iz Slovenske Istre, kjer smo najpogosteje določili tudi AFB1-pozitivne izolate in sicer pri sorte shiraz. Največ vzorcev, ki je vsebovalo OTA- oz. AFB1-pozitivne izolate, je prihajalo iz Slovenske Istre. Glede na najvišjo povprečno koncentracijo plesni, ki je tvorila toksin OTA oz. AFB1, pa prevladuje vinorodni okoliš Bela Krajina.

7 POVZETEK

Prisotnost mikotoksinov, sekundarnih metabolitov plesni, ki v več pogledih škodljivo vplivajo na zdravje ljudi, predstavlja ne samo velik ekonomski, temveč tudi zdravstveni problem. To velja še posebej v območjih oz. pri določenih skupinah ljudi, ki v večjem deležu uživajo s toksini najbolj kontaminirana živila. Med slednje spada tudi vino. Poraba vina je v Sloveniji med najvišjimi glede na evropska oz. svetovna merila. Poleg vina, skrb glede kontaminacije s plesnimi in posledično prisotnosti mikotoksinov predstavlja tudi grozdje in grozdniki sok, še posebej, ker so glavni potrošniki otroci in druge rizične skupine (dietna prehrana). Pri pregledu dosedanje literature nismo zasledili študij o prisotnosti mikotoksinov OTA in AFB1, opravljenih na slovenskem grozdju, moštu oziroma vinu.

V raziskavo smo vključili 12 vzorcev grozdja, ki pripadajo devetim različnim vinskim sortam iz štirih različnih vinorodnih okolišev v Sloveniji. Iz 12 vzorcev grozdja smo pripravili vzorce grozdnega soka oz. mošta in jih nato pustili, da so spontano fermentirali. Med alkoholno fermentacijo smo vzorčili mošt oz. mlado vino, prav tako smo vzorčili vino po zaključku fermentacije. Skupno smo tako obravnavali 204 vzorce.

Z opravljenimi mikrobiološkimi analizami smo v magistrski nalogi pridobili podatke o mikroflori glivnih vrst na grozdju in o velikosti in trendu gibanja populacije od grozdja, do mošta in vina. Pri potencialno toksinogenih vrstah smo z enostavno kvalitativno metodo določanja toksinov (TLC) ocenili razširjenost dveh (OTA in AFB1) z vidika zdravja najnevarnejših mikotoksinov v posameznih vzorcih. Tako smo dobili delni vpogled v pojavnost plesni in njihovih toksinov v slovenskih vinogradih.

Prikazali smo gibanje populacije plesni v postopku nastanka vina. Ta je bila največja na grozdju in v prvih dneh fermentacije, nato pa je s časom fermentacije upadala. Najmanjša je bila določena v vinu. Dobljeni rezultati so pokazali, da obstajajo tako razlike med vinorodnimi okoliši kot razlike med sortami, saj so bili določeni rodovi oz. vrste plesni razširjeni le v nekaterih vinorodnih okoliših in le pri nekaterih sortah. Podobno velja tudi za toksina OTA in AFB1. Predvidevali smo, da bomo OTA in AFB1 največkrat določili pri prvih vzorčenjih. Hipotezo smo potrdili, saj je največ vzorcev tvorilo OTA oz. AFB1 v prvih treh dneh fermentacije. Glede na dosedanje objave smo predvideli večji delež OTA-pozitivnih izolatov. Vzrok za majhen delež pripisujemo predvsem metodici identifikacije in določitve toksinov.

Zaključimo lahko, da bi bila uporaba sodobnejših metod in večjega števila vzorcev, kjer bi statistična obdelava prinesla smiselne rezultate, dobro izhodišče za nadaljnje raziskave o razširjenosti toksinov na slovenskem grozdju, moštu oz. vinu.

8 VIRI

- Amezqueta S., Galindo S.S., Arbizu M.M., Penas G.E., Cerain L.A., Guiraud J.P. 2012. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control*, 26: 259-268
- Aydogdu H., Gucer Y. 2009. Microfungi and mycotoxins of grapes and grape products. *Trakia Journal of Sciences*, 7, 2: 211-214
- Barkai-Golan R. 2008. *Aspergillus* mycotoxin. V: mycotoxins in fruits and vegetables. Barkai-Golan R., Paster N. (eds.). 1st ed. Amsterdam, Elsevier: 115-152
- Battilani P., Magan N., Logrieco A. 2006. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111, Suppl. 1: S2-S4
- Battilani P., Barbano C., Logrieco A. 2008. Risk assessment and safety evaluation of mycotoxins in fruits. V: Mycotoxins in fruits and vegetables. Barkai-Golan R., Paster N. (eds.). 1st ed. Amsterdam, Elsevier: 1-26
- Belajova E., Rauova D. 2007. Determination of ochratoxin A and its occurrence in wines of Slovakian retail. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46, 2: 68-74
- Belli N., Bau M., Marin S., Abarca M.L., Ramos A.J., Bragulat M.R. 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, Suppl. 1: S40-S45
- Bennett J.W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3: 497-516
- Bhat R., Rai R.V., Karim A.A. 2010. Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 1:57-81
- Cabanes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella G., Minguez S., Pons A. 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 79: 213-215
- Cabanes F.J., Bragulat M.R., Castella G. 2013. Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. *Food Microbiology*, 36: 135-141
- Chunmei J., Junling S., Qi'an H., Yanlin L. 2013. Occurrence of toxin-producing fungi in intact and rotten table and wine grapes and related influencing factors. *Food Control*, 31: 5-13
- Clouvel P., Bonvarlet L., Martinez A., Lagourde P., Dieng I., Martin P. 2008. Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 74-80

EFSA. 2006. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. EFSA Journal, 4, 6: 365, doi:10.2903/j.efsa.2006.365: 56 str.

El Khoury A., Rizk T., Lteif R., Azouri H., Delia M.L., Lebrihi A. 2008. Fungal contamination and aflatoxin B1 and ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. Food and Chemical Toxicology, 46: 2244-2250

FAO. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Rome, Food and Agriculture Organization: 165 str.

FAOSTAT. 2014. World production (tonnes) of grapes in year 2012. Rome, Food and Agriculture Organization Statistics Division: 1 str.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (avgust 2014)

Fleet G.H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. International Journal od Food Microbiology, 50: 101-117

Hocking A.D., Leong S.L., Kazi B.A., Emmett R.W., Scott E.S. 2007. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. International Journal of Food Microbiology, 119: 84-88

Hussein H.S., Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167, 2: 101-134

ISO 4833. Microbiology – general guidance for the enumeration of micro-organisms – Colony count technique at 30 degrees C. 1991: 4 str.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations. 1996: 43 str.

Jackson L.S., Al Taher F. 2008. Factors affecting mycotoxin production in fruits. V: Mycotoxins in fruits and vegetables. Barkai-Golan R., Paster N. (eds.). 1st ed. Amsterdam, Elsevier: 75-104

Klich M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Washington, ASM Press: 116 str.

Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Perrone G. 2003. Epidemiology of toxicogenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European Journal of Plant Pathology, 109, 7: 645-667

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

Miraglia M., Brera C. 2002. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. Rome, Instituto Superiore di Sanita: 153 str.

Peraica M., Radić B., Lucić A., Pavlović M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the World Health Organization, 77, 9: 754-766

Pitt J.I., Hocking A.D. 1985. Fungi and food spoilage. Sydney, Academic Press Australia: 413 str.

Pitt J.I. 1991. A laboratory guide to common Penicillium species. 2nd ed. North Ryde, CSIRO Food Research Laboratory: 187 str.

Pitt J.I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. British Medical Bulletin, 56, 1: 184-192

Quintela S., Villaran C., Armentia L.I., Elejalde E. 2013. Ochratoxin A removal in wine: A review. Food Control, 30: 439-445

Richard J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. International Journal of Food Microbiology, 119: 3-10

Romero S.M., Comerio R.M., Larumbe G., Ritieni A., Vaamonde G., Pinto V.F. 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 104: 43-49

Samson R.A, Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. 2000. Introduction to food- and airborne fungi. 6th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 389 str.

Serra R., Braga A., Venancio A. 2005. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. Research in Microbiology, 156: 515-521

Shundo L., Almeida A.P., Alaburda J., Ruvieri V., Navas S.A., Lamardo L.C.A., Sabino M. 2006. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of Sao Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 533-537

Terra M.F., Prado G., Pereira G.E., Emante H.J., Batista L.R. 2012. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94, 4: 890-894

Uredba komisije (ES) št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L364: 5-24

Uredba komisije (EU) št. 105/2010 z dne 5. februarja 2010 o spremembah Uredbe Komisije (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih glede ohratoksin A. 2010. Uradni list Evropske unije, 53, L35: 7-8

Uredba komisije (EU) št. 165/2010 z dne 26. februarja 2010 o spremembah Uredbe Komisije (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih glede aflatoksinov. 2010. Uradni list Evropske unije, 53, L50: 8-12

USDA. 2014. Fresh table grapes domestic consumption by country in MT in year 2012. Washington, USDA: 1 str.
<http://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=grapes&graph=fresh-domestic-consumption> (marec 2014)

Wine Institute. 2011. Per capita wine consumption by country. San Francisco, Trade Data and Analysis, Wine Institute: 53-57
http://www.wineinstitute.org/files/World_Per_Capita_Consumption_by_Country_2011.pdf (marec 2014)

WHO. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on food additives (JECFA). Geneva, World Health Organization: 701 str.
<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=49> (julij 2014)

Zimmerli B., Dick R. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants, 13, 6: 665-668

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Barbari Jeršek za izvrstno izbrano tematiko, za pomoč, nasvete in strokoven pregled magistrskega dela. Hvala tudi za potrpežljivost in razumevanje tekom nastajanja naloge.

Hvala somentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za stokovno pomoč in temeljit pregled naloge, ter za vse nasvete, da je naloga dobila pravo podobo.

Zahvalila bi se tudi recenzentki prof. dr. Poloni Jamnik za strokoven in natančen pregled magistrskega dela.

Za pregled virov in navajanja literature se zahvaljujem univ. dipl. inž. Lini Burkan Makivić.

Hvala Saši in Petri za vso nesebično pomoč in marsikateri strokovni in prijateljski nasvet.

Zahvala gre tudi Jasni, Špeli in Mitotu za lektoriranje naloge.

Posebna zahvala gre mami in očetu, ki sta mi študij omogočila in me vseskozi podpirala. Jasna in Mojca hvala tudi vama!

Najpomembnejša zahvala gre mojima najdražjima, možu Martinu in hčerki Sari. Martin hvala za vso podporo, nasvete in temeljit pregled naloge. Hvala ti za potrpežljivost, za razumevanje ter pomoč. Martin in Sara hvala, da sta moja sončka.

Zahvaljujem se tudi vsem prijateljem in sošolcem, ki so mi popestrili dneve v času študija ter vsem ostalim neimenovanim, ki ste mi v tem času stali ob strani.