

Miroslava Hlebová*¹, Lukáš Hleba², Viktória Uzsáková²

*¹Univerzita Svätého Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, Katedre biológie

²Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Ústav biotechnológie, Katedra mikrobiológie

Mikroskopické vláknité huby, mykotoxíny a potraviny

Pred a pozberové straty ovocia, zeleniny či obilnín určených na priamu konzumáciu, alebo na výrobu potravín toxigénnymi hubami v potravinách, spôsobujú každoročne značné ekonomické straty v potravinárskom priemysle a v dôsledku možnej akumulácie ich produktov - mykotoxínov, predstavujú i potenciálnu hrozbu pre ľudské zdravie. Celkové straty predstavujú 25 % z celkovej produkcie v priemyselných krajinách a viac ako 50 % v rozvojových krajinách. V prípade ovocia a zeleniny, sú straty týchto komodít spôsobené najmä hubovými patogénmi, z ktorých väčšina preniká do ovocia/zeleniny cez drobné ranky, ktoré nevyhnutne vznikajú pri ktoromkoľvek z pozberových procesov ich spracovania. Následná syntéza mykotoxínov vláknitými hubami závisí od niekoľkých vnútorných a vonkajších faktorov, vrátane vlhkosti prostredia, okolitej teploty, aktivity vody, pH a povahy substrátu, a predovšetkým od toxikogénneho potenciálu samotného kmeňa vláknitej huby. Rody mikroskopických vláknitých húb ako *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* patria medzi významných producentov mykotoxínov. Medzi najvýznamnejšie mykotoxíny produkované týmito rodmi patria najmä aflatoxíny (AF), ochratoxíny (OT), zearalenón (ZEN), fumonizíny (FB₁, FB₂), deoxynivalenol (DON). Aflatoxíny sú známe svojimi karcinogénnymi, cytologickými a mutagénnymi účinkami a Medzinárodná agentúra pre výskum rakoviny (IARC) ich zaradila medzi karcinogény skupiny 1. Nežiaduce účinky mykotoxínov na zdravie viedli potravinové úrady k zavedeniu regulačných limitov na ochranu exponovaných kategórií ľudí a zvierat. V závislosti od krajiny/regulačného orgánu, typu potravín a možnej exponovanej populácie sú stanovené prípustné limity rôzne. V širšom poňatí sú tieto limity pre aflatoxíny (B₁, B₂, G₁, G₂) 0 - 40 g/kg pre potraviny a 0 - 1000 g/kg pre krmivá. Podobne pre ochratoxín A (OTA) sú tieto limity od 0 - 50 g/kg pre potraviny a 0 - 1 000 g/kg pre krmivo. Avšak štruktúra a chemické zloženie rôznych plodov je priaznivé pre množstvo ďalších druhov mikroskopických vláknitých húb, ktoré nemusia, alebo neprodukurujú mykotoxíny, ale sú rovnako nežiaduce a zodpovedné za ich kazenie. Jedným z najviac znepokojujúcich ochorení ovocia alebo zeleniny je tzv. „sivá plesň“, ktorej pôvodcom je mikroskopická vláknitá huba *Botrytis cinerea*. Táto huba napáda viac ako 200 rastlinných druhov. Medzi ďalších významných kontaminantov patria napríklad rody *Rhizopus*, alebo *Mucor*, ktoré napadajú napríklad jahody, kde spôsobujú tzv. mäkkú hnilobu.

Fyzikálny a chemický spôsob ochrany potravín

Primárnym opatrením na kontrolu všetkých týchto neželaných chorôb je použitie pozberových syntetických fungicídov. Napríklad na zvládnutie problematiky výskytu mykotoxínov a mykotoxikóz, spolu so zlepšenými poľnohospodárskymi postupmi, sa v súčasnosti používa niekoľko stratégií chemickej, fyzikálnej a biologickej dekontaminácie. Chemické ošetrovanie obilnín kontaminovaných mykotoxínmi, rôznymi kyselinami, zásadami, amoniakom alebo inými oxidačno - redukčnými činidlami má potenciál výrazne znížiť rast a šírenie toxigénnych húb, ako aj obsah samotných mykotoxínov na poľnohospodárskych komoditách a produktoch z nich. Avšak zdravotné riziká spojené s využívaním chemických látok, ich environmentálna bezpečnosť a výskyt kmeňov húb odolných voči týmto fungicídmi predstavujú nový problém. Okrem chemických metód sa využívajú aj fyzikálne metódy, ako je UV ožarovanie, alebo niektoré látky viažuce mykotoxíny, ako sú íly (bentonity, kremičitany hlinito-vápenaté), aktívne uhlie. V súčasnosti však náročné požiadavky v trvalo udržateľnom poľnohospodárstve, integrovanom manažmente plodín a ekologickej výrobe vedú k potrebe vyvinúť alternatívne metódy na kontrolu pozberovej úrody.

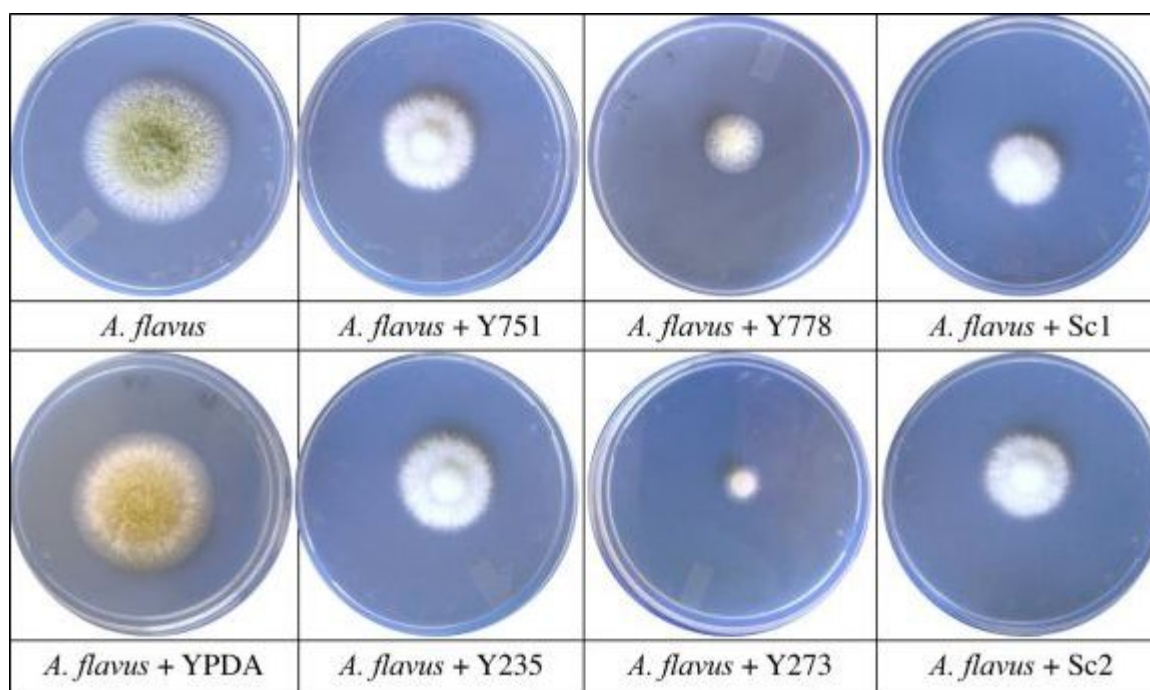
Biologický spôsob ochrany potravín

Biologická kontrola mykotoxínov alebo pozberovej kontaminácie rôznych plodín využíva najmä antagonistické mikroorganizmy, ako sú napríklad baktérie mliečneho kvasenia, baktérie rodu *Bacillus*, ale aj kvasinky a ich produkty získavajú na popularite v potravinárskom priemysle. Biologická kontrola pozberového rozkladu ovocia, zeleniny a obilnín pomocou antagonistických kvasiniek bola a v súčasnosti je skúmaná ako jedna z niekoľkých sľubných alternatív k chemickým fungicídmi. Kvasinky majú požadované špecifické vlastnosti, ako je tolerancia voči viacerým stresovým faktorom, jednoduché nutričné požiadavky a schopnosť kolonizovať suché povrchy na dlhé časové obdobia. Na vysvetlenie ich antagonistickej aktivity, bolo navrhnutých množstvo mechanizmov vrátane súťaženia o živiny a priestor, parazitizmus, sekrécia antifungálnych zlúčenín, tvorby biofilmov, schopnosť vylučovať tzv. killer toxíny, alebo syntetizovať prchavé organické zlúčeniny (VOC). Zo všetkých spomenutých mechanizmov, ktoré kvasinky využívajú, má práve produkcia prchavých látok obrovský potenciál pri ochrane potravín.

Prchavé organické zlúčeniny (VOC)

VOC sú produkované kvasinkami, ale aj niektorými baktériami počas ich primárneho a sekundárneho metabolizmu. Sú to zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou (<300Da), vyznačujúce sa nízkou polaritou, ktorých produkcia je biologicky dynamická a silne ovplyvnená mikrobiálnymi druhmi, podmienkami a fázou rastu. Produkcia VOC je druhovo

špecifická a pôsobí ako chemický komunikačný signál medzi bunkami, ako mechanizmus uvoľňovania uhlíka a ako promótor alebo inhibítor mikrobiálneho rastu. Antifungálna aktivita VOC produkovaných kvasinkami bola vyhodnotená a navrhnutá ako účinná stratégia biologickej kontroly napríklad proti niektorým druhom mikroskopických vláknitých húb ako sú *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Penicillium expansum*, *P. digitatum* a *P. italicum*. VOC by sa mohli považovať za ideálne antimikrobiálne látky, pretože na vykonávanie ich činnosti nie je potrebný kontakt medzi činiteľom biologickej kontroly a patogénom, alebo medzi činiteľom biologickej kontroly a potravinami.



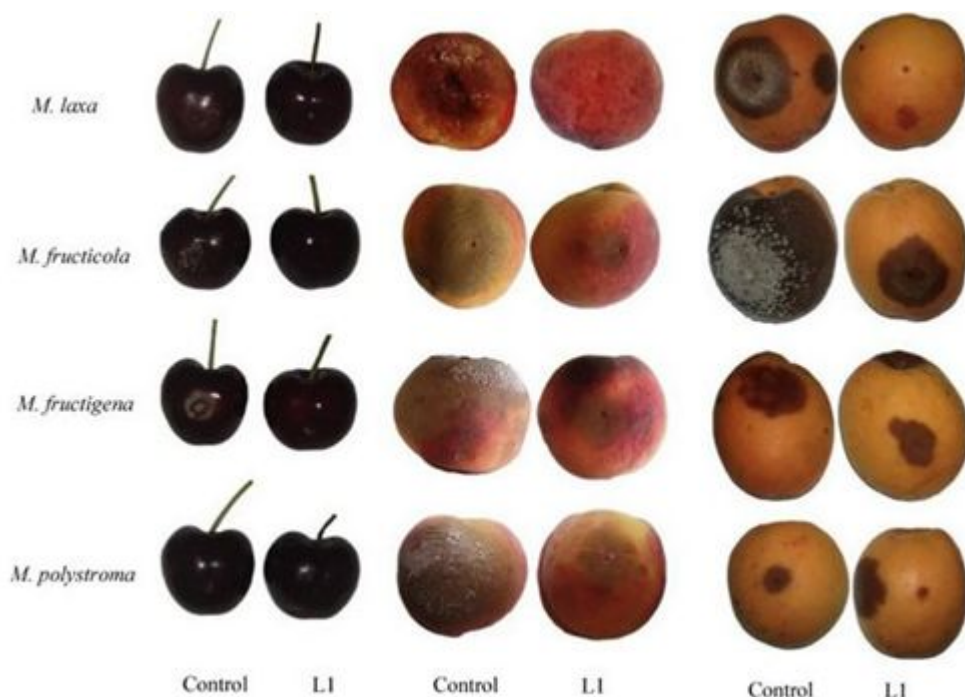
Obrázok 1 Morfológia kolónií mikroskopickej vláknitej huby *Aspergillus flavus* vystavená prchavým látkam emitovaným z rôznych druhov kvasiniek - na ľavej strane kontrola na pravej strane, kolónie vystavené VOC produkovaných nefermentujúcimi kvasinkami s označením Y778 a Y273 (zdroj: Hassan, Z. U., Al Thani, R., Atia, F. A., Alsafran, M., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2021). Application of yeasts and yeast derivatives for the biological control of toxigenic fungi and their toxic metabolites. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101447)

Medzi identifikované VOC produkované 98 kmeňmi tropických askomycetových kvasiniek (reprezentujúcich 40 druhov) patria napríklad alkoholy (amylalkohol a izoamylalkohol), aldehydy (2-metyl-2-hexenal a 2-izopropyl-5-metyl-2-hexenal) a estery (etylizobutykrát, izobutylacetát, izoamylacetát, 2-metylbutylacetát, etylizovalerát, izoamylpropionát a fenylmetylacetát). Etylacetát bol tiež postulovaný ako hlavná VOC zodpovedná za

antagonistickú aktivitu rôznych druhov kvasiniek, ako sú *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Saccharomyces cerevisiae*. Nedávno bola taktiež testovaná účinnosť prchavých látok produkovaných kvasinkou *Candida intermedia*, ktoré sa použili na kontrolu hniloby jahôd napadnutých mikroskopickou vláknitou hubou rodu *Botrytis*. Medzi 49 identifikovanými prchavými látkami (estery, alkoholy, alkény, alkány, alkíny, organické kyseliny, ketóny a aldehydy) boli najviac zastúpené dve zlúčeniny, 1,3,5,7-cyklooktatetraén a 3-metyl-1-butanol. Predchádzajúce štúdie uskutočnené na rovnakých študovaných kmeňoch kvasiniek ukázali, že na základe navrhovaných mechanizmov hrajú VOC dôležitú úlohu pri určovaní účinnosti biologickej kontroly proti rôznym pozberovým patogénnym mikroskopickým hubám. Najmä VOC produkované druhmi kvasiniek ako sú *Metschnikowia pulcherrima* MPR3 a *Wickerhamomyces anomalus* BS91 sa ukázali ako najlepšie pri kontrole rozkladu plodov viniča sivou plesňou. Antifungálna účinnosť týchto kvasiniek a ich prchavých látok bola skúmaná aj na mandarínkach napadnutých mikroskopickou vláknitou hubou *Penicillium digitatum*, kde výrazne znížili infekciu, ale taktiež na jahodách, kde úplne inhibovali rozklad jahôd spôsobený mikroskopickou hubou *Botrytis cinerea*.



Obrázok 2 Účinok prchavých organických látok (VOC) produkovaných kvasinkovými kmeňmi *Aureobasidium pullulans*, *A. melanogenum* a *A. subglaciale*, na stolovom hrozne umelo naočkovanom mikroskopickou vláknitou hubou *Botrytis cinerea* (zdroj: Di Francesco, A., Zajc, J., Gunde-Cimerman, N., Aprea, E., Gasperi, F., Placì, N., ... & Baraldi, E. (2020). Bioactivity of volatile organic compounds by *Aureobasidium* species against gray mold of tomato and table grape. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1-11)



Obrázok 3 Účinok prchavých organických zlúčenín (VOC) produkovaných kvasinkami (L1) na čerešne, broskyne a marhule umelo naočkované suspenziami konídií mikroskopických vláknitých húb *Monilinia laxa*, *M. fructicola*, *M. fructigena* a *M. polystroma* (zdroj: Di Francesco, A., Di Foggia, M., & Baraldi, E. (2020). *Aureobasidium pullulans* volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *Food microbiology*, 87, 103395)

Potenciálne využitie biokontrolných kvasiniek pri ochrane potravín pred kontamináciou mikroskopickými vláknitými hubami, či ich mykotoxínmi

Použitie mikroorganizmov ako lapačov voľných radikálov kyslíka, ktoré sú zodpovedné za kazenie potravín, bolo skúmané v rôznych predchádzajúcich štúdiách. Biokontrolné kvasinkové kmene okrem svojej schopnosti zachytávať voľné radikály kyslíka a zabrániť tomu, aby bol kyslík dostupný pre iné aeróbne mikroorganizmy, uvoľnili ako konečný produkt metabolickej reakcie veľké množstvo oxidu uhličitého, čím sa vytvoril biologický MAP (Modifikovaná atmosféra balenia). Aj keď sa o takomto mechanizme biokontroly proti hubovým patogénom po zbere úrody ešte neuvažovalo, vyčerpanie kyslíka a najmä zvýšenie koncentrácie oxidu uhličitého produkovaného metabolickou aktivitou hodnotených kvasiniek môže významne prispieť k účinnej inhibícii rastu mikroskopických vláknitých húb napríklad v balenom ovocí. Zmesi plynov, ktoré sa v súčasnosti využívajú v modifikovanej atmosfére balenia musia byť špeciálne formulované pre každý balený produkt, to znamená, že koncentrácie O₂ a CO₂ sú vo všeobecnosti v rozmedzí od 1 - 21 % a 1 - 20 %. Celková

spotreba O₂ a značná produkcia CO₂ (až 52,3 %) zistená u hodnotených kmeňov kvasiniek by teda mohla byť prispôsobená pre každý špecifický skladovaný produkt jemným doladením hladín kvasinkového inokula a dostupného zdroja uhlíka v živnom médiu.

Aplikácia mikrobiálnych prchavých látok, ako aj difúzných (neprchavých) zlúčenín proti rastu a syntéze mykotoxínov vláknitými mikroskopickými hubami a používanie biologických látok (ako sú zložky bunkovej steny kvasiniek) na odstraňovanie mykotoxínov z kontaminovaných potravinových a kŕmnych matric, začínajú nahrádzať konvenčné metódy, ktoré sa v súčasnosti využívajú na odstraňovanie mykotoxínov z potravín. V každom prípade povaha cieľových toxigénnych húb alebo mykotoxínov hrá dôležitú úlohu v dekontaminačnom potenciáli aplikovaných molekúl. Samozrejme schopnosť biologickej matrice odstraňovať mykotoxíny závisí, ale aj od iných faktorov, ako je pH, fyzikálny stav, teplota a trvanie kontaktu. Avšak aplikácia kvasiniek pri odstraňovaní mykotoxínov má už teraz obrovský potenciál, ktorý bol dokázaný v mnohých štúdiách. Napríklad v *in vitro* štúdiu zameranej na dekontaminačný účinok kvasinky *S. cerevisiae* na AFB₁ produkovaný druhom *A. flavus* sa zistilo, že použitá kvasinkadokázala znížiť koncentráciu vyprodukovaného AFB₁ až o 98,8 %. *S. cerevisiae* má veľký komerčný význam a je široko používaná pri výrobe alkoholických nápojov, ako aj v pekárskom priemysle. Táto kvasinka patrí k jedným z najúčinnějších mikroorganizmov pre degradáciu AFB₁, čo dokazujú viaceré *in vitro* štúdie. Okrem kvasinky *S. cerevisiae*, zohrávajú významnú úlohu pri dekontaminácii aflatoxínov alebo fumonizínov aj kvasinky *Kazachstania servazzii*, *Pichia anomala*, *Candida tropicalis*, *Metschnikowia pulcherima*, *Saccharomyces vini*, *Kluyveromyces marxianus* a *Rhodotorula rubra*. Druhy *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia caribbica*, *Pichia ohmeri* a *Candida guilliermondii* taktiež nadobúdajú významnú úlohu pri dekontaminácii patulínu z potravín. Významnú úlohu pri dekontaminácii ochratoxínu A z potravín zohrávajú aj antagonistické kvasinky patriace k druhom ako *Yarrowia lipolytica*, *Pichia guilliermondii*, *Kloeckera lindneri* alebo *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terricola* a *Candida incommuni*. Každá z týchto druhov kvasiniek, dokáže mykotoxíny buď dekontaminovať, alebo ich transformovať na iné menej toxické alebo úplne netoxické zlúčeniny, čo má obrovský význam pri ochrane potravín.

V súčasnosti sa vykonáva niekoľko štúdií zameraných na využitie VOC v poľnohospodárstve na báze prírodnej antimikrobiálnej zmesi, ktorá by v budúcnosti mohla slúžiť na prevenciu alebo dekontamináciu rastlinných patogénov a mohla by nahradiť používanie chemických látok alebo znížiť chemizáciu poľnohospodárstva. Štúdie, ktoré boli vykonané doteraz odporúčajú napríklad aplikáciu VOC v uzavretom prostredí (napr. skleníky), v ktorom by sa atmosféra mohla rýchlo nasýtiť prchavými látkami.

Záver

Na základe výsledkov rôznych štúdií možno konštatovať, že prchavé látky (VOC) produkované kvasinkami by mohli byť v budúcnosti použité na minimalizáciu rastu toxigénnych alebo patogénnych mikroskopických vláknitých húb v/na potravinách ako aj na inhibíciu syntézy ich mykotoxínov. Jasne však treba pochopiť povahu a spôsob aplikácie VOC a preto sú aj naďalej potrebné ďalšie štúdie smerujúce k analýzám prchavých látok kvasiniek a skúmanie ich interakcie *in vivo* s potravinovou matricou. Avšak pozorovaný potenciál odstraňovania mykotoxínov pomocou kvasiniek a ich prchavých látok z kontaminovaných potravín, ako aj ich vysoký antifungálny potenciál voči rôznym druhom mikroskopických vláknitých húb, zdôrazňuje ich perspektívne ekonomické a bezpečné použitie v potravinárskom priemysle v porovnaní s chemickými konzervačnými látkami či v súčasnosti využívanými fungicídmi.

Použitá literatúra

Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 9(2), 137. <https://doi.org/10.3390/foods9020137>

Alasmar, R., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Thani, R., Al-Shamary, N., Alnaimi, H., ... & Jaoua, S. (2020). Isolation of a novel *Kluyveromyces marxianus* strain QKM-4 and evidence of its volatilome production and binding potentialities in the biocontrol of toxigenic fungi and their mycotoxins. *ACS omega*, 5(28), 17637-17645. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02124>

Alassane-Kpembi, I., Pinton, P., Hupé, J. F., Neves, M., Lippi, Y., Combes, S., ... & Oswald, I. P. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* boulardii reduces the deoxynivalenol-induced alteration of the intestinal transcriptome. *Toxins*, 10(5), 199. <https://doi.org/10.3390/toxins10050199>

Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., & de Cerain, A. L. (2009). Ochratoxin A decontamination: A review. *Food control*, 20(4), 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.017>

Armando, M. R., Pizzolitto, R. P., Dogi, C. A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., ... & Cavaglieri, L. R. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of applied microbiology*, 113(2), 256-264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05331.x>

Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., & Vero, S. (2017). Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control*, 109, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.002>

Belinato, J. R., Kupper, K. C., & Augusto, F. (2018). In vivo investigation of the volatile metabolome of anti-phytopathogenic yeast strains active against *Penicillium digitatum* using comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. *Microchemical Journal*, 141, 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.036>

Buzzini, P., Martini, A., Cappelli, F., Pagnoni, U. M., & Davoli, P. (2003). A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84(4), 301-311. <https://doi.org/10.1023/A:1026064527932>

Castoria, R., Mannina, L., Durán-Patrón, R., Maffei, F., Sobolev, A. P., De Felice, D. V., ... & Wright, S. A. (2011). Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(21), 11571-11578. <https://doi.org/10.1021/jf203098v>

Coelho, A., Celli, M., Sataque Ono, E., Hoffmann, F., Pagnocca, F., Garcia, S., ... & Hirooka, E. (2008). Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 325-331. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1040>

Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food microbiology*, 82, 70-74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.008>

Di Francesco, A., Di Foggia, M., & Baraldi, E. (2020). *Aureobasidium pullulans* volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *Food microbiology*, 87, 103395. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103395>

Di Francesco, A., Zajc, J., Gunde-Cimerman, N., Aprea, E., Gasperi, F., Placi, N., ... & Baraldi, E. (2020). Bioactivity of volatile organic compounds by *Aureobasidium* species against gray mold of tomato and table grape. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02947-7>

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), 2773-2789.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>

Hassan, Z. U., Al Thani, R., Atia, F. A., Alsafran, M., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2021). Application of yeasts and yeast derivatives for the biological control of toxigenic fungi and their toxic metabolites. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101447. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101447>

Chen, P.H., Chen, R.Y., Chou, J.Y., 2018. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *MYCOBIOLOGY* 46 (1), 33-46. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454013>

Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2016). The effect of locust bean gum (LBG)-based edible coatings carrying biocontrol yeasts against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* causal agents of postharvest decay of mandarin fruit. *Food microbiology*, 58, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.014>

Pretscher, J., Fischkal, T., Branscheidt, S., Jäger, L., Kahl, S., Schlander, M., ... & Claus, H. (2018). Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. *Fermentation*, 4(2), 31. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020031>

Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., Galvan, A. I., Córdoba, M. G., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Martín, A. (2020). Selection and application of antifungal VOCs-producing yeasts as biocontrol agents of grey mould in fruits. *Food Microbiology*, 92, 103556. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103556>

Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>

Vartiainen S, Yiannikouris A, Apajalahti J, Moran CA. Comprehensive Evaluation of the Efficiency of Yeast Cell Wall Extract to Adsorb Ochratoxin A and Mitigate Accumulation of the Toxin in Broiler Chickens. *Toxins*. 2020; 12(1):37. <https://doi.org/10.3390/toxins12010037>