

Univerza v Ljubljani



**RESPONS**  
RES - PONS d.o.o.



Javni študijski, razvojni,  
invalidski in preživetniški  
sklad Republike Slovenije



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,  
ZNANOST IN ŠPORT



EVROPSKA UNIJA  
EVROPSKI SKLAD  
SOCIALNI SKLAD  
NALOŽBA V VAŠO PRIHODNOST

*Projekt sofinancirata Republika Slovenija in Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada.*

# **GLIVE KOT GLAVNA SESTAVINA PREHRANSKIH DOPOLNIL**

Martina Puc

Jerneja Čepin

Romana Černe

Alan Kacin

Katja Zdešar Kotnik

Petra Golja

*Glive kot glavna sestavina prehranskih dopolnil*

Avtorji: Martina Puc, Jerneja Čepin, Romana Černe, Alan Kacin, Katja Zdešar Kotnik, Petra Golja

Recenzentka: dr. Polona Zalar

Tehnična urednica: Meta Galjot

Izdal in založil: Založba COVIRIAS, Parmova 14, 1000 Ljubljana

pretehtajte.si, telefon: 01 23 22 097, info@covirias.si

Ljubljana, september 2019

1. izdaja

Brezplačna publikacija

Publikacija je izdana v elektronski obliki v formatu pdf.

Publikacija je objavljena na spletni povezavi: [pretehtajte.si](http://pretehtajte.si)

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v

Ljubljani

COBISS.SI-ID=301784064

ISBN 978-961-94432-7-9 (pdf)

## KAZALO VSEBINE

1 GLIVE V PREHRANSKIH DOPOLNILIH .....	5
2 GLIVE.....	8
2.1 OSNOVNA TAKSONOMIJA GLIV .....	8
2.1.1 Tradicionalna sistematika .....	10
2.1.2 Sodobna sistematika .....	12
2.2 KRAJŠI OPIS POSAMEZNIH SKUPIN GLIV.....	13
2.2.1 Goba (ang. Mushroom).....	13
2.2.2 Plesen (ang. Mold ali Mould).....	14
2.2.3 Kvasovka (ang. Yeast).....	15
2.2.4 Snet (ang. Smut).....	15
2.2.5 Rja (ang. Rust) .....	15
2.3 VLOGA GLIV V PREHRANI.....	16
3 PLESNI.....	18
3.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI PLESNI, KI SE POJAVLJAJO V PREHRANSKI INDUSTRIJI .....	18
3.1.1 Zygomycota.....	18
3.1.2 Ascomycota.....	19
3.2 UPORABA PLESNI V PREHRANI .....	19
3.2.1 Zygomycota.....	20
3.2.2 Ascomycota.....	21
3.3 HRANILA V PLESNIH .....	23
3.4 IZOLACIJA PLESNI .....	26
3.4.1 Direktne metode izolacije .....	27
3.4.2 Selektivne metode izolacije .....	28
3.5 GOJENJE PLESNI .....	28
3.6 KONTAMINACIJA GLIVNIH GOJIŠČ.....	31
3.7 ČIŠČENJE GLIVNIH KULTUR .....	32
4 KVASOVKE.....	33
4.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI KVASOVK.....	33
4.2 UPORABA KVASOVK V PREHRANSKI INDUSTRIJI .....	34
4.2.1 Proizvodnja alkoholnih pijač .....	35
4.2.2 Proizvodnja pekovskih izdelkov .....	36
4.2.3 Proizvodnja sirov.....	36
4.2.4 Proizvodnja ostalih izdelkov .....	37
4.2.5 Proizvodnja encimov.....	37
4.2.6 Kvasovke med probiotiki.....	38
4.2.7 Proizvodnja beta-glukanov .....	39
4.2.8 Proizvodnja selena .....	39
4.3 HRANILA V KVASOVKAH .....	40
4.4 GOJIŠČA ZA KVASOVKE .....	41
5 ZAKLJUČEK.....	43
6 VIRI IN LITERATURA .....	44

## KAZALO TABEL

Tabela 1. Osnovni taksonomski nivoji in značilne končnice, ki so v uporabi v glivni taksonomiji. ....	9
Tabela 2. Poenostavljen klasifikacijski sistem gliv z značilnimi predstavniki. ....	11
Tabela 3. Delež vlage v nekaterih plesnih in prehranskih izdelkih.....	24
Tabela 4. Podatki o vsebnosti pepela, beljakovin in maščob v vzorcih različnih organizmov in živil (podana je povprečna vrednost $\pm$ standardni odklon).....	25
Tabela 5. Vsebnost nekaterih mineralov v analiziranih vzorcih (povprečje $\pm$ SD). ....	26

## 1 GLIVE V PREHRANSKIH DOPOLNILIH

Prehranska dopolnila so koncentrirani viri posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom (Pravilnik o prehranskih dopolnilih Ur. l. RS št. 66/2013), s katerimi naj bi ljudje po lastni presoji dopolnjevali svojo prehrano. V prehranska dopolnila vse pogostoje kot glavno sestavino, torej kot vir hranil oz. drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom, proizvajalci vključujejo tudi različne glive (P3 Professional, 2017). Ker pa glive predstavljajo celo kraljestvo živih bitij, podobno kot živali ali rastline, je njihovo poznavanje in razumevanje že v osnovi zahtevnejše od drugih sestavin prehranskih dopolnil. Na prvi pogled se morda njihova uporaba zdi preprosta, če si kdo predstavlja, da glive, podobno kot alge (Puc in sod., 2017), le pobereмо iz rastišč oz. gojišč, jih posušimo in vključimo v tehnološko obliko. A pričakovati je, da raznolikost kraljestva vpliva tako na načine gojenja kot tudi predelave in hranilno vrednost. Kako, je vprašanje, na katerega je potrebno začeti iskati odgovore.

V tem prispevku se osredotočamo na jasno in nedvoumno opredelitev gliv in njihovih količin v prehranskih dopolnilih, s čimer pa ne želimo zmanjšati pomena vpliva drugih lastnosti na kakovost, varnost in delovanje prehranskih dopolnil. Jasna in nedvoumna opredelitev vsebovanih gliv oziroma plesni in njihovih količin pa je pomembna tudi za obdelavo podatkov o teh izdelkih ter je predpogoj za njihovo standardizacijo.

Prav prepoznavanje glavnih sestavin je eden od namenov za oblikovanje kategorij prehranskih dopolnil v sistemu P3 Professional<sup>1</sup>. P3 kategorizacija obravnava prehranska dopolnila glede na glavno sestavino in jih razporeja v 15 različnih kategorij. Te kategorije so označene s posebej razvitimi slikovnimi oznakami, ki so razvidne na različnih nivojih baze prehranskih dopolnil na slovenskem trgu<sup>2</sup>. Ena izmed kategorij v bazi P3/ P3 Professional (P3 Professional, 2017) je *Gobe, glive, plesni in kvasovke*, ki pod tem pojmom združuje prehranska dopolnila, ki vsebujejo glive v najširšem smislu.

---

<sup>1</sup> Avtorica P3 kategorij in sistema P3 Professional je Martina Puc. Avtorske pravice kategorij so pridržane.

<sup>2</sup> Baza P3 Professional oz. P3 je na trgu od leta 2011.

V Sloveniji uživanje gob v prehrani ni nič neobičajnega, vendar je že poznavanje tujih vrst tako velik in pomemben izziv, da je npr. Mikološka zveza Slovenije za njihovo razločevanje s posebnim pravilnikom opredelila potreben izpit za pridobitev naziva »determinator« (Mikološka zveza Slovenije, 2014).

Kako obsežno je kraljestvo gliv, kaže tudi podatek, da so v okviru projekta Seznam vrst in razširjenost makromicet v Sloveniji (Gozdarski inštitut Slovenije, 2004) z analizo stopnje ogroženosti Ciljnega raziskovalnega programa »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2001 – 2006« pripravili seznam z več kot 1500 vrstami gliv. Ker so glive tako zelo raznolika in tako samosvoja skupina organizmov, je za uporabnika prehranskih dopolnil poseben izziv, kako izbirati med vrstami gliv, ki jih praviloma ne poznamo iz domačih gozdov. Zato je vprašanje, v čem se glive pravzaprav medseboj razlikujejo, tako pomembno.

Na prvi pogled je očitno, da so npr. gomoljike oz. tartufi, ne samo zaradi cene, ampak predvsem zaradi svoje intenzivne aromatičnosti, predvsem začimba. Tudi jurčki, lisičke in druge gobe, ki so del nacionalne kulinarike, že zaradi svoje sezonskosti kot tudi redkosti, zakonske omejitve nabranih količin in količin v receptih, ravno tako ne predstavljajo pomembnega vira makrohranil ali mikrohranil v prehrani populacije (Inštitut za nutricionistiko, 2019). Kakšne prehranske vrednosti pa vsebujejo plesni oziroma glive, ki se dejansko tržijo v prehranskih dopolnilih, je vprašanje, na katerega je potrebno odgovoriti, da lahko presojamo izdelke iz te kategorije.

Ne pozabimo, da tveganje za zastrupitve z nekaterimi vrstami gliv (Perčič in sod., 2014) poznamo praktično vsi laiki in zelena mušnica takorekoč simbolizira sinonim za strup. Razlikovanje med vrstami je tudi zato še kako pomembno in posebna previdnost pri vrstah, ki jih ne poznamo niti v osnovi, zato ni odveč.

Poleg makroskopskih gliv, ki jih kot gobe prepoznamo tudi laični uporabniki (npr. šitake), vedno več prehranskih dopolnil vsebuje tudi bolj eksotične glive (P3 Professional, 2017)<sup>3</sup> in plesni, zato ima na izbiro izdelka pomemben vpliv tudi kakovost navajanja sestave na deklaraciji in drugih informacijah, ki jih potrošnik izve pred nakupom izdelka. Poseben

---

<sup>3</sup> Vsi podatki iz baze P3 Professional v nadaljevanju te publikacije se nanašajo na stanje maja 2017.

pomen pri glivah ima njihovo poimenovanje, saj dalj časa uveljavljenih slovenskih imen za tiste vrste, ki se uporabljajo v prehranskih dopolnilih, pogosto nimamo. Pri informiranju kupcev se uporabljajo slovenjena tuja oz. latinska imena, tudi brez sočasne navedbe polnih latinskih nazivov (P3 Professional, 2017)<sup>4</sup>, ki omogočajo nedvoumno identifikacijo. Poseben primer je rdeč kvasni riž, ki je pravilnemu slovenskemu poimenovanju navkljub lahko za laika zavajajoč. Pomisli lahko, da je bistvo sestavine riž, čeprav je to v resnici plesen. Trend naraščanja uvajanja novih živil<sup>5</sup> na evropski trg je prisoten že nekaj let tudi na trgu prehranskih dopolnil (Natural Products Insider, 2016) in je zato smiselno tako za industrijo kot pristojne organe in raziskovalce, da se pripravijo na nove glavne sestavine tudi v P3 kategoriji *Gobe, glive, plesni in kvasovke*. Temelj pa predstavljajo prav osnove poimenovanja gliv, njihove prehranske značilnosti, pridobivanje in prehranske vrednosti. Posebno pozornost zasluži tudi način tradicionalne uporabe živil, saj lahko varnost zagotavlja npr. termična obdelava oziroma kuhanje<sup>6</sup>, ki jo nepoučeni proizvajalci prehranskih dopolnil lahko spregledajo.

Tudi pri samih plesnih ne smemo spregledati vidika varnosti, ki v prehranskih dopolnilih predstavlja posebno tveganje med drugim zaradi stopnje koncentracije glavne sestavine, ki je lahko v primerjavi s tradicionalno uporabo v prehrani večje, kot to velja npr. za rdeč kvasni riž (EFSA, 2018) in je posebno pomembno doziranje, da ne prekoračimo priporočenih dnevni vnosov.

---

<sup>4</sup> Vsi podatki iz baze P3 Professional v nadaljevanju te publikacije se nanašajo na stanje maja 2017.

<sup>5</sup> Nova živila so živila ali živilske sestavine, ki so se v Evropski uniji (EU) pred majem 1997 uživala redko ali nikoli in jih ureja Uredba (ES) št. 258/97.

<sup>6</sup> BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), Nemška agencija za hrano je leta 2004 izdala javno opozorilo, da je potrebno gobe shitake (*Lentinus edodes*) termično obdelati, da je njihovo uživanje varno (BfR, 2004). V znanstveni literaturi je sicer kar nekaj opisanih primerov t.i. šitake dermatitisa kot posledice uživanja termično neobdelane te vrste sicer široko uporabljanih gob, in sicer ne samo v Evropi, temveč tudi v Aziji in obeh Amerikah.

## 2 GLIVE

Glive so evkariontski organizmi, ki se pojavljajo v različnih oblikah (Baron, 1996). Med evkarionte uvrščamo vse organizme, ki jih sestavljajo evkariontske celice, torej celice, ki imajo, za razliko od celic t.i. prokariontov, celično jedro, ki je obdano s celično membrano, kompleksen sistem membran znotraj celice, citoskelet (notranje celično ogrodje) ter mitohondrije (membranske organele, ki služijo celičnemu dihanju) (Koonin, 2010). Ne glede na njihovo velikost in obliko, so vse glive heterotrofni organizmi (Baron, 1996), kar pomeni, da same niso sposobne sintetizirati hranilnih snovi za preživetje, pač pa potrebne hranilne snovi črpajo iz podlage (Hogg, 2013). Splošna značilnost gliv je med drugim tudi izločanje encimov v okolje in s tem zunanja prebava hranil, kar ljudje s pridom uporabljamo v številnih biotehnoloških procesih (npr. pri proizvodnji sira, bistrenju sadnih sokov itd.) (Moore in sod., 2011).

Glive uvrščamo v svoje kraljestvo znotraj domene evkariontov, ki jo poleg gliv po tradicionalni nomenklaturi sestavljajo še živali, rastline ter protisti (Cavalier-Smith, 1981). Čeprav taksonomija protistov ni enotna, jih zaradi prikladnosti definiramo kot večinoma enocelične organizme, ki ne sodijo v druga kraljestva v domeni evkariontov. Celicam gliv in rastlin je skupna prisotnost vakuol ter celične stene. Celično steno gliv gradi predvsem hitin, rastlinska celična stena pa je celulozna. Živalske celice nimajo celične stene. S celicami gliv jih družijo odsotnost kloroplastov (značilnih za rastlinske celice) in heterotrofen način prehranjevanja (Alexopoulos in sod., 1996).

### 2.1 OSNOVNA TAKSONOMIJA GLIV

Glive predstavljajo številno, pestro in razširjeno skupino organizmov. Ocenjujejo, da se v naravi nahaja celo od 3.5 do 5.1 milijona različnih vrst gliv (O'Brien in sod., 2005), od katerih je približno bilo l. 2012 opisanih 100.000 (Madigan, 2012), današnje število pa je 140.000 opisanih vrst. Pri identifikaciji in razvrščanju tako znanih kot tudi na novo odkritih gliv upoštevamo razlike in podobnosti med organizmi, ponavadi upoštevajoč več nivojev, morfologijo, fiziologijo, biokemijske in genetske značilnosti (Zalar, 2002).



V nadaljevanju sledi opis pomembnejših pojmov, ki so ključni za razumevanje razvrščanja gliv v taksonomske skupine.

**Znanstvena klasifikacija** v biologiji pomeni razvrščanje živih bitij v definirane kategorije. Začetnik sodobne klasifikacije je švedski botanik Carl Linne, ki je vrste razvrščal glede na skupne telesne značilnosti. Te skupine so bile, upoštevajoč tudi evolucijske povezave med živimi in izumrlimi organizmi, kasneje večkrat spremenjene (Frängsmyr in Lindroth, 1994; Judd, 2008).

**Taksonomija** pomeni opisovanje, identifikacijo, klasifikacijo in poimenovanje organizmov glede na njihove morfološke in/ali molekularne lastnosti. Organizme na osnovi tovrstnih lastnosti razdelimo v taksonomske skupine oz. taksone različnih nivojev, in sicer kot si sledijo od najnižjega do najvišjega nivoja: v vrste, rodove, družine, redove, razrede, debla, kraljestva in domene (Simpson, 2010).

**Sistematika** je opredeljena širše in poleg zgoraj predstavljene tradicionalne taksonomije vključuje še teoretične in praktične vidike evolucije, genetike in speciacije (t.j. nastanka vrst) (Zalar, 2002).

Za lažje razumevanje besedila so v nadaljevanju predstavljeni osnovni taksonomski nivoji z značilnimi končnicami, ki so v uporabi pri taksonomiji gliv (Tabela 1).

Tabela 1. Osnovni taksonomski nivoji in značilne končnice, ki so v uporabi v glivni taksonomiji. Povzeto po: Zalar in Gunde-Cimerman, (2002).

<b>Domena</b>		<b>Eukarya (evkarionti)</b>
Kraljestvo	(regnum)	Fungi (glive)
Deblo	(phylum)	-mycota
Poddeblo	(subphylum)	-mycotina
Razred	(classis)	-mycetes
Red	(ordo)	-ales
Družina	(familia)	-aceae
Rod	(genus)	/
Vrsta	(species)	/

Nomenklaturo gliv natančno določa Mednarodni kodeks nomenklature za alge, glive in rastline (ang. *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants* - ICN) (Turland in sod., 2018).

### **2.1.1 Tradicionalna sistematika**

Glive so v sklopu tradicionalne sistematike obravnavali kot umetno skupino, ki združuje predstavnike z različnim izvorom, a s podobnimi lastnostmi, kot so filamentozna rast, način prehranjevanja. Klasična sistematika je delila glive v tri skupine, in sicer:

- Deblo Myxomycota – sluzavke,
- Deblo Oomycota,
- Deblo Eumycota – prave glive.

Najobsežnejše med njimi je deblo pravih gliv (Eumycota), kar so v sklopu molekularno genetskih raziskav opisali kot kraljestvo gliv (prave glive) v zgodnjih 90. letih prejšnjega stoletja (White in sod., 1990). Med pravimi glivami so številne vrste pomembne kot industrijski proizvajalci organskih kislin, antibiotikov, encimov in drugih spojin, mnoge pa izkoriščamo tudi v procesih pridelave hrane (Jogan, 2001).

Da bi čim boljše razumeli vlogo in značilnosti gliv, ki se pojavljajo v prehranski industriji, je v nadaljevanju besedila predstavljen poenostavljen klasifikacijski sistem z značilnimi predstavniki (Tabela 2). Razmnoževanje gliv je kompleksen proces, ki se odraža tako v spolnem kot tudi nespolnem načinu razmnoževanja. Glede na kriterij načina tvorbe spolnih spor (reproduktivnih enot, iz katerih zraste nov organizem), lahko glive iz debla Eumycota (torej prave glive) razdelimo v naslednje razrede<sup>7</sup> (Jogan, 2001):

- cl. Chytridiomycetes,
- cl. Zygomycetes – jarmaste glive,
- cl. Ascomycetes – zaprtotrosnice,
- cl. Basidiomycetes – prostotrosnice.

---

<sup>7</sup> Razred latinsko imenujemo Classis, okrajšano cl.

Tabela 2. Poenostavljen klasifikacijski sistem gliv z značilnimi predstavniki. Povzeto po: Jogan, (2001).

<b>deblo</b>	<b>Pomembnejši predstavniki</b>
cl. Chytridiomycetes	
cl. Zygomycetes – jarmaste glive	o. <sup>8</sup> Mucorales <i>Mucor</i> (najpogosteje prisotni v tleh, pojavljajo pa se tudi na hrani, kot so mlečni izdelki, oreški) <i>Rhizopus</i> (t.i.krušna plesen) ...
cl. Ascomycetes – zaprtotrošnice	scl. <sup>9</sup> Endomycetidae o. Endomycetales – kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – pekovska, vinska, pivska kvasovka scl. Ascomycetidae – prave zaprtotrošnice o. Eurotiales <i>Aspergillus</i> – glavičasta plesen <i>Penicillium</i> – čopičasta plesen o. Erysiphales – pepelaste plesni <i>Erysiphe graminis</i> – žitna pepelasta plesen <i>Podosphaera leucotricha</i> – jablanova pepelasta plesen o. Pezizales – skledarji <i>Morchella</i> – smrček, mavrah o. Hypocreales <i>Claviceps</i> – glavnica ...
cl. Basidiomycetes – prostotrošnice	scl. Heterobasidiomycetidae – nižje prostotrošnice o. Puccinicales – rje <i>Puccinia graminis</i> – žitna rja <i>Cronartium ribicola</i> – ribezova rja <i>Uromyces pisi – sativi</i> – grahova rja o. Ustilaginales – sneti <i>Ustilago maydis</i> – koruzna snet <i>Ustilago hordei</i> – ječmenova snet o. Tremellales - drhtavčevci scl. Homobasidiomycetidae – višje prostotrošnice o. Boletales o. Agaricales o. Lycoperfales ...

Kljub temu da klasifikacija gliv temelji na različnih načinih spolnega razmnoževanja, še vedno obstaja ogromno glivnih vrst, pri katerih spolno razmnoževanje ni poznano oz. ob prvi identifikaciji ni bilo opisano, kar je otežilo njihovo uvrstitev v sistem. Tiste predstavnike, ki ne

<sup>8</sup> Red imenujemo latinsko Ordo in okrajšamo o.

<sup>9</sup> Podrazred latinsko imenujemo Subclassis in okrajšamo scl.

tvorijo spolnih spor in imajo samo nespolne oblike razmnoževanja, je tradicionalna klasifikacija uvrstila v skupino »Deuteromycota«, vendar pa so dandanes na osnovi modernejših pristopov identifikacije uvrščeni med bodisi Asco- ali Basidiomycota. Posebnost znotraj skupine Eumycota predstavljajo tudi lišaji – združbe gliv z zelenimi algami ali cianobakterijami, ki živijo v sožitju (Jogan, 2001, Brodo in sod., 2001), ki so polifiletskega izvora.

Gliva se lahko v svojem življenjskem ciklu nahaja v dveh različnih oblikah; nespolni obliki, (imenovani tudi anamorf), ki tvori nespolne spore, in spolni obliki (imenovani tudi telomorf), ki tvori spolne spore. Ti dve obliki skupaj tvorita glivo v celoti – holomorf (Baron, 1996). Posledica prepoznavanja teh stanj pri glivah je bila posebnost takoimenovanega dvojnega poimenovanja gliv, saj je kodeks dopuščal ločeno poimenovanje tako anamorfnih, kot tudi telomorfih stanj, ki jih ima posamezna gliva. To je namreč do L. 2011 dovoljeval Mednarodni kodeks poimenovanja rastlin (ang. International Code of Botanical Nomenclature oz. ICBN). Ko je l. 2011 stopil v veljavo nov kodeks, Mednarodni kodeks poimenovanja alg, gliv in rastlin (ang. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants oz. t.i, Melbourne Code), dvojno poimenovanje ni več možno, saj ima lahko en organizem le eno ime, ki pa ga pridobi po dogovoru raziskovalne, industrijske in medicinske sfere. Npr. ime plesni *Eurotium repens* se je nanašalo na teleomorfno oz. holomorfno obliko plesni, medtem ko ime *Aspergillus repens* pomeni le anamorfno obliko iste vrste plesni (Malloch, 1981). Od leta 2011 je na podlagi novih analiz sekvenciranja genoma po dogovoru veljaven koncept »ena gliva – eno ime«, kljub občasni ne-formalni rabi obeh imen (Hawksworth, 2011; Gams, 2014).

### **2.1.2 Sodobna sistematika**

Nadgradnja tradicionalne sistematike, predstavljene zgoraj, upošteva rezultate novejših filogenetskih analiz (Hibbett in sod., 2007; 2016). Sodobna klasifikacija je tako omejena na vse organizme, ki imajo skupnega prednika in torej skupaj z njim tvorijo t.i. monofiletsko skupino. Omenjena klasifikacija iz kraljestva gliv torej izključuje organizme, ki so bili v to kraljestvo vključeni po tradicionalni sistematiki, pa tja glede na kriterij skupnega prednika več ne sodijo - takšne so na primer glive iz skupin Myxomycota ter Oomycota. Skupino pravih gliv (Eumycota) tako sodobna sistematika deli na sledeča debla (Hibbett in sod., 2007):

- Chytridiomycota,
- Blastocladiomycota,
- Neocallimastigomycota,
- Microsporidia,
- Glomeromycota,
- Ascomycota,
- Basidiomycota.

Debli Ascomycota (zaprtotrosnice) in Basidiomycota (prostotrosnice) v sodobni sistematiki združujemo v skupino Dikarya. Do največjih sprememb je v sodobni sistematiki prišlo predvsem znotraj skupin Chytridiomycota in Zygomycota, pri čemer je bila skupina Chytridiomycota ohranjena v ožjem smislu kot eno izmed debel ob novo uveljavljenih deblih Blastocladiomycota in Neocallimastigomycota, l. 2017 so na osnovi celotnih genomskih DNA zaporedij ohranili deblo Blastocladiomycota, deblo Neocallimastigomycota pa so ponovno uvrstili v Chytridiomycota (Spatafora s sod.). Predstavniki tradicionalne skupine Zygomycota so bili v sodobni klasifikaciji razdeljeni v deblo Glomeromycota in zaradi nerazjasnenih odnosov med skupinami še v štiri ločena poddebla Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina ter Zoopagomycotina (Hibbett in sod., 2007), danes jih uvrščamo v debli Mucoromycota in Zoopagomycota (Spatafora s sod., 2017). Prav tako so na podlagi primerjav nukleotidnih zaporedij tudi glive, ki so bile tradicionalno umeščene v skupino Deuteromycota, klasificirali v ustrezna posodobljena debela (Moore in sod., 2011).

## 2.2 KRAJŠI OPIS POSAMEZNIH SKUPIN GLIV

V splošni rabi se pogosto uporabljajo izrazi kot so gobe, plesni, sneti in rje, ki niso vezani na taksonomsko ali filogenetsko klasifikacijo gliv, ampak so z njimi označene oblike razraščanja gliv in njihova uporaba.

### **2.2.1 Goba (ang. Mushroom)**

Izraz goba se uporablja za mesnato, od nekaj milimetrsko do več 10 centimetrsko plodišče nekaterih gliv, ki izrašča nad zemljo (oziroma kakšno drugo podlago) in se značilno oblikuje v

bet in klobuk. Običajno se na spodnji strani klobuka nahaja trosovnica (himenij), kjer nastajajo trosi oziroma spore, ki so mikroskopsko majhne razmnoževalne celice. Med gobe uvrščamo tiste zaprtotrosnice in prostotrosnice, ki tvorijo makroskopska plodišča. Tvorba slednjega je tako pogoj za uvrstitev med gobe (Chatterjee in sod., 2017). Podgobje, mrežasto razrastle hife v substratu pod gobami, se razraščajo v podlagi v obliki eno- ali dvojedrnih nitastih tvorb oziroma hif. Gre za nežen in gost preplet (imenovan tudi micelij), po katerem se pretakajo snovi, potrebne za rast in razmnoževanje gliv (Kalač, 2012).

Glede na način prehranjevanja gobe razvrščamo v tri skupine:

- Zajedalke zajedajo žive organizme (rastline, živali ali človeka) in iz njih črpajo hranilne snovi ter so tako neposredno udeležene v presnovi živih organizmov. Zaradi strupenih presnovkov začne gostitelj odmirati. V to skupino sodijo na primer štorovke.
- Gniloživke se hranijo z odmrli ali razpadajočimi organskimi ostanki. Sem sodi na primer užitni nazobčanec (bolj znan kot goba šitake).
- Soživke oziroma simbiotske glive živijo v sožitju z drugimi organizmi. V primeru simbioze z drevesom gliva obrašča korenine drevesa. Z drevesom si izmenjujeta hranilne snovi in zato oba bolje uspevata. Glive drevesu dajejo mineralne snovi, v zameno pa prejmejo ogljikove hidrate in druge snovi. Primer takšnih gob so gobani (npr. navadni goban ali jurček).

Vse gobe niso primerne za našo prehrano, saj med njimi najdemo tudi strupene (npr. rdeča mušnica) in neužitne (npr. grenki goban) gobe. Strupene gobe vsebujejo strupene snovi in posledica njihovega uživanja je zastrupitev ali celo smrt. Neužitne gobe niso strupene, so pa npr. neprebravljive za ljudi, zato jih ne uživamo. Večina gob, namenjenih za prehrano ljudi, je načrtno vzgojenih (npr. šampinjoni, šitake gobe, bukov ostrigar) (Kalač, 2012).

### **2.2.2 Plesen (ang. Mold ali Mould)**

Med plesni ali filamentozne uvrščamo tiste glive, ki rastejo v obliki hif in z razraščanjem po organskem materialu oblikujejo micelije (Madigan, 2012). Več o plesnih sledi v nadaljevanju besedila.

### **2.2.3 Kvasovka (ang. Yeast)**

Glavna značilnost kvasovk je njihov način razmnoževanja z brstenjem in dejstvo, da so enocelični mikroorganizmi. Njihov natančnejši opis sledi v nadaljevanju besedila v poglavju kvasovk (Mueller in sod., 2004).

### **2.2.4 Snet (ang. Smut)**

Sneti so skupina rastlinskih parazitov in sodijo v deblo Basidiomycota (prostotrosnice), in v razred Ustilaginomycetes. Snet sestavljajo parazitski medcelični micelij (sestavljeno iz hif) in razmnoževalne strukture (Mueller in sod., 2004). Značilni del življenjskega cikla sneti so teliospore, nastale po fragmentaciji hif zgrajenih iz dvojedrnih celic, ki služijo za preživetje težkih pogojev (npr. za prezimovanje), so običajno melanizirane, obdaja pa jih debela stena. Po prezimovanju in združitvi jeder se razvije bazidij (t.j. reproduktivni organ). Na bazidiju nastajajo trosi oziroma bazidiospore, ki lahko rastejo izven gostitelja v obliki kvasnih celic.

Sneti se najpogosteje pojavijo na cvetočih rastlinah, najpogosteje na travah. Znanih je približno 1200 vrst sneti, ki lahko okužijo več kot 4000 različnih rastlinskih vrst. Sneti delajo škodo na posevkih kot so pšenica, oves, ječmen, koruza, riž ter sladkorni trs. Simptomi okužbe s snetmi so črne strukture na mestu semen, ki so polne spor, ali pa tumorske strukture značilne za koruzo, ki jih povzroča koruzna snet (lat. *Ustilago maydis*). V tumorskih tvorbah, ki lahko prizadenejo celoten nadzemeljski del rastline, se razvijejo spore. Pri rižu sneti poškodujejo rastlino tako, da sploh ne more tvoriti semen (Bakkeren in sod., 2008).

### **2.2.5 Rja (ang. Rust)**

Rje sodijo v deblo Basidiomycota, in v razred Uredinomycetes. Ocenjenih je kar 168 rodov rj in približno 7000 vrst, pri čemer več kot polovica vrst sodi v rod *Puccinia*. Rje so največja in najbolj razširjena skupina obvezno biotrofnih gliv (t.j. gliv, ki lahko živijo le na živem gostitelju) na žilnih rastlinah; potencialni gostitelji rj so praproti, iglavci in trave. Poznane so po zelo kompleksnem življenjskem ciklu, ki lahko nastopa na enem ali dveh rastlinskih gostiteljih. Žitna rja npr. sodi med prostotrosnice, vendar ne tvori makroskopskih plodišč, zato rje ne uvrščamo med gobe (Chatterjee in sod., 2017).

Za razliko od ostalih rastlinskih povzročiteljev bolezni (patogenov), rje običajno napadejo zdrave, rastoče rastline. Če so okužbe manjše in omejene le na določen del rastline, lahko

okužbo tudi spregledamo. Trajne, sistemske okužbe lahko povzročijo deformacije kot so različna obarvanja (običajno rumeno do rjavo obarvanje), zakrnelost rastline in razrast različnih tvorbo (Mueller in sod., 2004).

Največjo ekonomsko škodo povzročajo sledeče rje: rja žit – pšenice, ječmena, ovs, rži (*Puccinia graminis*), rja kave (*Hemileia vastatrix*) in mehurjevka zelenega bora (*Cronartium ribicola*) (Leonard in Szabo, 2005).

### 2.3 VLOGA GLIV V PREHRANI

Glive lahko povzročajo ogromne ekonomske izgube. Kot saprotrofi povzročajo poškodbe lesa in hrane. Kot paraziti povzročajo škodo v kmetijstvu ter bolezni ljudi in živali. Po drugi strani pa imajo glive tudi zelo pomembne pozitivne ekonomske učinke. Izkoriščamo jih za hrano, pripravo hrane in alkoholnih pijač (Raspor, 1996). Mnoge plesni so v teh procesih odgovorne za nastanek značilnih okusov, vonjev ali teksture, in so v končnem prehranskem izdelku lahko prisotne, ali pa ne (Moore in sod., 2011).

V biotehnološki proizvodnji pomembnejših komercialnih izdelkov, v katerih so vključene glive, pogosto uporabljamo postopek fermentacije (vrenja). V ožjem biokemijskem smislu gre pri fermentaciji za anaerobni proces pretvorbe ogljikovih hidratov (npr. glukoze, fruktoze ali saharoze) v alkohol, pline ali organske kisline ob pomoči različnih mikroorganizmov. V prehranski industriji pa izraz velja za katerikoli proces, pri katerem se s pomočjo mikroorganizmov pridobi želene fermentirane prehranske izdelke (Hui, 2004). Velikokrat fermentacija poteka v tekočih pogojih (»fermentation in submerged liquid cultures«), mnogo pomembnih fermentacijskih postopkov za proizvodnjo hrane pa poteka tudi v trdnem stanju (»solid state fermentation«). Ločimo dva osnovna fermentacijska sistema – odprtega in zaprtega. V zaprtem sistemu fermentacije po inokulaciji (t.j. namerni okužbi) s plesnimi ne dodajamo oz. odvezujemo ničesar, kar bi lahko vplivalo na nadaljnjo rast kulture. Nasprotno pa pri odprtem sistemu fermentacije hranila v sistemu nadomeščamo, redno odvezujemo nastale produkte in s tem omogočimo, da kultura neomejeno raste (Moore in sod., 2011). Poleg gliv kvasovk, ki so eden najpomembnejših organizmov v prehranski industriji, so v



procesiranje hrane vključene tudi nekatere druge vrste gliv, med njimi pa mnoge uvrščamo tudi med plesni.

Za človeško prehrano najpogosteje uporabljamo gobe, plesni in kvasovke. Vsebine, ki se nanašajo na gobe, presegajo okvir pričujočega besedila, zato so v nadaljevanju podrobneje predstavljene le plesni in kvasovke, ki jih uporabljamo v človeški prehrani oz. v industriji prehranskih dopolnil.

### 3 PLESNI

#### 3.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI PLESNI, KI SE POJAVLJAJO V PREHRANSKI INDUSTRIJI

Plesni rastejo v obliki večceličnih filamentov, imenovanih hife. Hife imajo toge celične stene, znotraj hif pa se lahko pojavijo tudi perforirane stene, imenovane septa, ki strukturo hif še bolj ojačajo. Takrat pravimo, da so hife septirane. Za razliko od ostalih skupin gliv (gob, sneti, rj) je njihov hifni preplet rahel. Izraz »plesen« torej ne predstavlja samostojne taksonomske kategorije, pač pa je le skupno ime za veliko in predvsem raznoliko skupino gliv, ki ji je skupen tanek in rahlo zamrežen micelij na organskem materialu (Malloch, 1981). Hife z razraščanjem po površini in v notranjosti organskega materiala, s katerim se hranijo, oblikujejo makroskopsko vidno strukturo, imenovano micelij (Madigan, 2012). Plesni se razmnožujejo s sporami, k nastanejo nespolno (Malloch, 1981). Večina plesni taksonomsko sodi v debla Zygomycota in Ascomycota (Hibbett in sod., 2007).

V nadaljevanju so predstavljene splošne značilnosti plesni, ki se najpogosteje pojavljajo v prehranski industriji.

##### **3.1.1 Zygomycota**

Po »tradicionalni« taksonomiji večina plesni tega debla sodi v razred Zygomycetes, ki je med glivami eden izmed evolucijsko starejših. Predstavniki zigomicet so ekološko zelo raznolika, široko razširjena in evolucijsko uspešna skupina gliv (Moore in sod., 2011), ki se razmnožuje tako spolno kot nespolno. Za spolno razmnoževanje zigomicet so ključne spolne spore z odebeljenimi stenami imenovane zigospore, ki so pomembne za preživetje teh gliv v neugodnih razmerah. Za hitro in uspešno razširjanje ter kolonizacijo novih substratov pa so ključni produkti njihovega nespolnega razmnoževanja, zelo uspešno razširjajoče se spore.

Za zigomicete je značilen večjedrni micelij z malo ali nič septami, kar omogoča hitro gibanje celične vsebine (t.j. celičnega jedra, mitohondrijev in hranilnih snovi) ter tvorbo spor, predvsem pa hitro rast hif (Malloch, 1981). Zigomicete ne tvorijo mikotoksinov. Najdemo jih v tleh ter gnoju, nekatere hitro rastoče vrste pa so značilni kvarljivci živil (Jeršek, 2014). Pomembnejše predstavnice zigomicet so npr. plesni iz rodu *Mucor* ter *Rhizopus*.

### 3.1.2 Ascomycota

S približno 64.000 vrstami so askomicete največja skupina v kraljestvu gliv (Moore in sod., 2011). Zanje je značilna prisotnost spolnih spor imenovanih askospore, ki se tvorijo v t.i. askusih. Nespolno razmnoževanje askomicet poteka z negibljivimi nespolnimi spori (imenovane tudi konidiji) (Jeršek, 2014).

Micelij askomicet sestavljajo septirane hife, kar ima za posledico počasnejšo rast teh plesni. So kozmopolitske, saj naseljujejo zelo različne habitate, od terestričnih (tla, rastline, itd.), do sladko- in morskovodnih (Jeršek, 2014). Mednje sodijo številni rastlinski škodljivci (npr. glive iz rodov *Fusarium*, *Magnaporthe* in *Cryphonectria*), pa tudi povzročitelji bolezni pri človeku (npr. rodova *Candida* in *Pneumocystis*). Večina glivnih partnerjev v lišajih sodi prav v skupino Ascomycota (Moore in sod., 2011). Pomembnejši predstavniki askomicet, ki se pojavljajo bodisi v prehrani bodisi pri njeni pripravi so plesni iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monascus*, *Morchella* idr. (Moore in sod., 2011; Nguyen in sod., 2017; Park in sod., 2017).

## 3.2 UPORABA PLESNI V PREHRANI

Številni fermentirani prehranski produkti so popularni zlasti na azijskem trgu. Plesni rodu *Aspergillus*, *Actinomucor*, *Mucor* in *Rhizopus* so široko izkoriščane v proizvodnji številnih azijskih specialitet, kot so npr. miso (gosta rjavkasto rdeča zelo slana pasta iz fermentirane soje, ki se v japonski kuhinji uporablja kot dodatek jedem, npr. juham.), tamari (japonska različica sojine omake) in tempeh (tradicionalni sojin proizvod, narejen s fermentacijo sojinih zrn s pomočjo bakterij in plesni) ter ostalih sojinih produktov (Borresen in sod., 2012). Poleg neposrednega izkoriščanja plesni za hrano ter pripravo hrane, lahko s pomočjo plesni proizvajamo številne druge pomembne produkte kot so antibiotiki, vitamini, encimi, hormoni in beljakovine (Raspor, 1996). Večina farmakoloških in medicinskih raziskav se osredotoča na vrste plesni iz debel Ascomycota in Basidiomycota, kjer tudi najdemo največ predstavnikov, ki bi lahko bili potencialni proizvajalci sekundarnih metabolitov (organskih komponent, ki niso neposredno vključene v normalni razvoj organizma kot so npr. lovastatin, ciklosporin, penicilin idr.), medtem ko je skupina Zygomycota manj raziskana (Hameed in sod., 2017; Park in sod., 2017). Med drugim so plesni proizvajalci različnih pigmentov (npr.

karotenoidov, melaninov, flavinov, kinonov...). Tako danes na trgu obstajajo nekatera jedilna barvila kot so npr. pigmenti plesni rodu *Monascus*, pigment Arpink red™ iz plesni *Penicillium oxalicum*, riboflavin iz plesni *Ashbya gossypii* ter produkcija likopena in  $\beta$ -karotena iz plesni *Blakeslea trispora* (Dufossé in sod., 2014). V nadaljevanju so po skupinah predstavljeni primeri uporabe različnih vrst plesni v prehrani, posebej za deblo Zygomycota in Ascomycota. V literaturi je opisanih kar nekaj primerov uporabe plesni v prehrani ljudi, kakršni so npr. plesnivi siri, rdeč kvasni riž, azijske specialitete. Ti viri navajajo tudi produkcijo biološko aktivnih molekul (Hermet in sod., 2012; Ferreira in sod., 2013; Karimi in Zamani, 2013).

### **3.2.1 Zygomycota**

Med plesnimi iz skupine gliv zigomicet so v prehranski industriji najbolj znane plesni iz rodu *Mucor* in *Rhizopus*. Le-te sodelujejo pri številnih fermentacijskih procesih za pridobivanje prehranskih izdelkov, kakršen je na primer tempeh – tradicionalni indonezijski prehranski izdelek iz soje (Karimi in Zamani, 2013), ki ga pridobivajo z nadzorovano fermentacijo soje in se lahko uporablja kot nadomestek mesa. Zanimiv je tudi sufu, ki je s pomočjo zigomicet (*Actinomucor elegans*, *Mucor racemosus* ali zigomicet iz rodu *Rhizopus*) fermentiran tofu (Moore in sod., 2011). Tako plesni iz rodu *Mucor* kot tudi *Rhizopus* se uporabljajo pri proizvodnji etanola ter alkoholnih pijač (Karimi in Zamani, 2013; Meussen in sod., 2012), nekatere plesni iz rodu *Mucor* pa tudi pri proizvodnji sira (Hermet in sod., 2012).

Zigomicete so proizvajalci številnih encimov, maščob, etanola, organskih kislin, jedilnih barv, aminokislin, polisaharidov (kot sta npr. hitozan in hitin) in nekaterih beljakovin. Rod *Rhizopus* velja za široko izkoriščenega proizvajalca mlečne in fumarične kisline, številnih encimov (amilaz, pektinaz, lipaz, ureaz ter tanaz) in steroidov, rod *Mucor* pa je prav tako dober vir encimov (celulaz, fitaz in proteaz), etanola, maščob in jedlnih barv (Ferreira in sod., 2013). Hameed in sod. (2017) poročajo, da je micelij plesni iz rodu *Mucor* (*Mucor circinelloides*) tudi bogat vir antioksidantov, kar bi farmacevtska industrija lahko s pridom uporabila v proizvodnji nutricevtikov, ki jih Das in sod. (2012) definirajo kot hrano ali del hrane, ki ima pomembno vlogo pri ohranjanju normalnih fizioloških procesov v telesu in s tem zdravja ljudi

in naravnih antioksidantov (Hameed in sod., 2017)<sup>10</sup>. Adedayo in sod. (2018) so denimo preučevali morebitni vpliv prehranskega dopolnila, pridobljenega s fermentacijo semen rastline *Moringa oleifera* s pomočjo glive *Rhizopus stolonifer*, na krvno sliko ter na indikatorje povečane ravni holesterola v krvi.

### 3.2.2 Ascomycota

Mnoge glive, ki sodijo v skupino Ascomycota, so pomembne v vsakdanji prehrani – širše poznane so npr. glive kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*), pa tudi vrste iz rodu *Penicillium*, ki se uporabljajo v sirarski industriji (npr. *Penicillium camembertii* ter *Penicillium roquefortii*). (Vallone in sod., 2014; Lessard in sod., 2014). V svetovni industrijski proizvodnji sirov s plemenito plesnijo je eden ključnih proizvodnih korakov inokulacija (proces vnosa oz. prenosa mikroorganizmov) (Zaid, 1999) skute s čisto kulturo *Penicillium roquefortii*, ki je zaradi močne lipolitične aktivnosti (tj. sposobnosti razgradnje maščob) ter proizvodnje nekaterih kratko-verižnih maščobnih kislin, odgovorna za razvoj specifičnega okusa in arome sira (Ropars in sod., 2017; Vallone in sod., 2014). Da zagotovijo večjo zanesljivost in ponovljivost procesa so inokulati plesni kultivirani in vitro (Ropars in sod., 2017), v nadzorovanem okolju (Zaid, 1999). Tudi vrsta *Penicillium camembertii* je pomembna za zorenje nekaterih sirov in v proizvodnji sirov zagotavlja lipolitične in proteolitične encime za sintezo različnih komponent, kot so npr. 1-okten-3-ol, ki je ključen za razvoj okusa sirov, kot sta npr. Camembert in Brie (Takahashi, 2010).

Zanimiva je tudi vrsta *Fusarium venenatum*, iz katere pridobivajo vegetarijanski mesni nadomestek Quorn™ (Moore in sod., 2011).

Nekatere askomicete (predvsem plesni iz rodu *Aspergillus*) so pomembni heterotrofni proizvajalci organskih kislin, antibiotikov, encimov in sekundarnih metabolitov, zato lahko delujejo kot kvarljivci hrane ali pa s proizvodnjo mikoksinov (npr. med najnevarnejšimi so kancerogeni aflatoksini, ki jih proizvajajo nekatere vrste znotraj rodu *Aspergillus*) ogrožajo zdravje ljudi in živali ter uničujejo kmetijske pridelke (Moore in sod., 2011; Park in sod., 2017). V zadnjih desetletjih na plesnih iz rodu *Aspergillus* potekajo intenzivnejše raziskave s

---

<sup>10</sup> Avtorji uporabljajo drugačne izraze in definicije kot zakonodaja, ki velja na slovenskem oziroma evropskem trgu.

področja kmetijstva in prehrane, pa tudi medicine (Sheikh-Ali in sod., 2014; Cairns in sod., 2018), kar kaže na njihovo pomembnost v svetovni prehranski industriji. Rod *Aspergillus* sestavlja okoli 250 različnih vrst, razdeljenih v podrodove. Le -ti se naprej delijo v t.i. sekcije, ki združujejo med seboj sorodnejše vrste in imajo tudi formalen taksonomski status (Geiser in sod., 2007). Večina teh industrijsko pomembnih vrst plesni sodi v dve večji sekciji - *Nigri* in *Flavi* ter nekatere manjše razdelke (Park in sod., 2017). Plesen *Aspergillus oryzae* (sekcija *Flavi*) je najpogosteje uporabljena za fermentacijo riža, žit, soje in krompirja, *Aspergillus niger* (sekcija *Nigri*) pa za industrijsko proizvodnjo številnih encimov in organskih kislin (Park in sod., 2017). Park in sod. (2017) poročajo, da je kar 99 % svetovne citronske kisline proizvedene s pomočjo glive *Aspergillus niger*. Predvsem v azijski prehrani se plesni iz rodu *Aspergillus* uporabljajo kot ojačevalci okusa ter izboljševalci teksture in hranilne vrednosti fermentiranih živil (Pitt in Hocking, 2009; Park in sod., 2017). Nekatere plesni (npr. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* in *Aspergillus luchuensis*) kolonizirajo določene vrste žit in soje ter sintetizirajo hidrolitične encime in druge komponente ter s tem prispevajo k proizvodnji številnih produktov, ki se uporabljajo v azijski prehrani (npr. alkoholnih pijač, sojine omake in paste, kisa idr.). Skupen izraz za pripravek iz soje oz. žit, ki jih omenjene plesni kolonizirajo, je »koji«, plesni, ki v procesu sodelujejo pa so t.i. koji plesni. Nastali produkti imajo glede na vrsto plesni in regijo proizvodnje svoje ime. Plesen *Aspergillus kawachii* je npr. ključna za proizvodnjo alkoholnih pijač kot sta npr. sochu na Japonskem in makgeolli v Koreji (Machida in sod., 2008; Park in sod., 2017; Bentley, 2006). Plesni iz rodu *Aspergillus* se za pripravo različnih vrst jedi uporabljajo tudi drugod po svetu. Tak primer je npr. khamir – tradicionalni kruh iz Savdske Arabije, ki ga med drugim pridobivajo s pomočjo *Aspergillus niger* (Gassem, 1999; Park in sod., 2017). Nekatere izmed vrst *Aspergillus* so našli v fermentiranih čajih kot sta Pu-erh in Fuzhuan Cha, ki izvirata iz Kitajske (Abe in sod., 2008; Mogensen in sod., 2009; Tamang in sod., 2016; Park in sod., 2017). V Afriki se vrsti *Aspergillus flavus* ter *Aspergillus niger* uporabljata za fermentacijo manioke (gomoljasta rastlina), iz katere pridobivajo Fufu (kaši podobna jed), Gari (moka) in Bobolo (priloga iz manioke, ovita v bananine liste) (Hillocks in sod., 2002; Montet in Ray, 2016; Park in sod., 2017). V zadnjem času so postale zanimive tudi nekatere beljakovine, ki jih sintetizirajo glive, ki bi lahko služile kot vegetarijanski mesni nadomestki (Wiebe, 2002; Yoder in Christianson, 1998; Park in sod., 2017). Ker tudi *Aspergillus oryzae* in *Aspergillus niger* proizvajata veliko količino beljakovin in aminokislin, bi lahko tudi le-te uporabljali v iste namene (Dijksterhuis in

Samson, 2007; Park in sod., 2017). Plesni rodu *Aspergillus* se uporabljajo tudi za proizvodnjo številnih organskih kislin (npr. citronska kislina, jabolčna kislina idr.), encimov (npr. amilaze, lipaze, celulaze, esteraze idr.) in sekundarnih metabolitov (npr. lovastatin, ciklosporin idr.) (Park in sod., 2017).

Med askomicete sodi tudi plesen *Monascus purpureus*, s pomočjo katere pridobivamo fermentacijski produkt rdečega riža, imenovan rdeč kvasni riž ali rdeč »koji« riž – fermentat se že dolgo uporablja v tradicionalni medicini ter v azijski prehrani za izboljšanje okusa, barve in obstojnosti hrane (Burke, 2015; Nguyen in sod., 2017). Rdeč kvasni riž vsebuje številne komponente, kot npr. nenasičene maščobne kisline, rastlinske sterole, barvila idr. (Patel, 2016). Njegova glavna farmakološko aktivna komponenta je monakolin K, ki je kemijsko podoben lovastatinu (Steffen, 2017). Rdeč kvasni riž lahko ob nepravilni pripravi vsebuje tudi mikotoksin citrinin (Nguyen in sod., 2017), ki lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi in živali.

### 3.3 HRANILA V PLESNIH

Glivna biomasa ima visoko vsebnost beljakovin z vsemi esencialnimi aminokislinami, nizko vsebnost maščob ter hitin kot vir prehranske vlaknine, vsebuje pa tudi nekatere pomembne vitamine (predvsem vitamin B) (Moore in sod., 2011). Približno 200 različnih vrst gob se po svetu uživa kot delikateso, v prehrani pa so priljubljene zaradi nizke energijske vrednosti, vsebnosti prehranske vlaknine in visoke antioksidativne kapacitete. Med različnimi vrstami gob sicer vlada precejšnja raznolikost v kemijski sestavi, zato je potrebna previdnost pri posploševanju pridobljenih podatkov o hranilnih vrednostih (Kalač, 2013).

Poleg uporabe gliv kvasovk ter različnih vrst gob v vsakdanji prehrani, so tudi micelijii številnih plesni vir hranil v človeški prehrani. Plesni naj bi bile dober vir mineralov, ki so velikokrat sestavni del prehranskih dopolnil (Carvalho in sod., 2010).

Raziskav, ki bi se ukvarjale z vsebnostjo hranil v različnih vrstah plesni, je v znanstveni literaturi malo. Carvalho in sod. (2010) so ocenili vsebnost beljakovin, maščob in mineralov v

nekaterih vrstah filamentoznih gliv (*Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer*, *Syncephalastrum racemosum*) ter dobljene vrednosti primerjali z vrednostmi v živilih, ki jih uporabljamo v vsakdanji prehrani. Izbrane glive so izolirali iz tal ter jih 20 dni gojili na ustreznih gojiščih. Z gojišča so nato pobrali razrasle micelije ter analizirali njihovo osnovno sestavo. Določili so npr. vsebnost vlage, beljakovin in celokupno vsebnost maščob v skladu metodologijo objavljeno v zbirki Official Methods of Analysis AOAC International (AOAC International, 2009).

Povprečen odstotek vlage v analiziranih vzorcih je, kot poročajo Carvalho in sod. (2010), variiral med 75 % in 83 %, kar je primerljivo z nivojem vlage v živilih kot so npr. mleko (87 %), jajca (77 %) ali piščančje prsi (74 %) (Torres in sod., 2000) (Tabela 3).

Tabela 3. Delež vlage v nekaterih plesnih in prehranskih izdelkih.

Vzorec	Odstotek vlage
<i>Penicillium sclerotiorum</i> (Carvalho in sod., (2010))	83 %
<i>Penicillium janthinellum</i> (Carvalho in sod. (2010))	75 %
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Carvalho in sod., (2010))	75 %
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (Carvalho in sod., (2010))	83 %
mleko (Torres in sod., (2000))	87 %
jajca (Torres in sod., (2000))	77 %
piščančje prsi (Torres in sod., (2000))	74 %

Vsebnost beljakovin v micelijih je bila med 27 % in 37 % suhe snovi (Carvalho in sod., 2010), pri čemer so o podobni vrednosti (40 %) poročali tudi Yamada in sod. (2003) pri glivah kvasovkah (*Saccharomyces cerevisiae*). Izsledke raziskave Carvalho in sod. (2010) lahko primerjamo z nekaterimi živilih, ki so jih analizirali Pires in sod. (2006). Povprečna vsebnost beljakovin v plesnih, ki so jo izmerili Carvalho in sod. (2010) je večja v primerjavi s pšenično (12 %) in koruzno (8 %) moko ter manjša v primerjavi z jajci (49 %) in sojino moko (42 %) (Tabela 4).

Analiza vsebnosti maščob je pokazala nekoliko večje vrednosti kot so za kvasovke poročali Yamada in sod. (2003). Na podobnost v hranilnih vrednostih med nekaterimi užitnimi gobami ter plesnimi nakazuje tudi raziskava Chye in sod. (2008) (Tabela 4).



Tabela 4. Podatki o vsebnosti pepela, beljakovin in maščob v vzorcih različnih organizmov in živil (podana je povprečna vrednost ± standardni odklon).

ORGANIZEM OZ. ŽIVILO	Suha snov (%)		
	Pepel	Beljakovine	Maščobe
<i>Penicillium sclerotiorum</i> (Carvalho in sod., (2010))	4,6±0,3	34,3±1,2	2,5±1,5
<i>Penicillium janthinellum</i> (Carvalho in sod., (2010))	4,8±0,2	37,5±6,6	3,5±4,7
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Carvalho in sod., (2010))	5,9±0,2	26,8±0,4	3,2±0,6
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (Carvalho in sod., (2010))	9,0±1,0	31,1±3,8	1,7±0,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Yamada in sod., (2003))	4,6	39,6	0,5
pšenična moka (Pires in sod., (2006))	-	11,6	-
koruzna moka (Pires in sod., (2006))	-	7,9	-
jajca (Pires in sod., (2006))	-	48,6	-
sojina moka (Pires in sod., (2006))	-	41,9	-
gobe (Chye in sod., (2008))	2,4-1,3	1,2-15,0	0,5-6,6

Odstotek pepela v hifah plesni je primerljiv vrednosti, ki so jo Yamada in sod. (2003) podali za kvasovke (Tabela 4). Izmerjene vsebnosti pepela v plesnih po raziskavi Carvalho in sod. (2010) so bile višje v primerjavi z živili kot so mleko, jajca ali govedina (Torres in sod. (2000) za ta živila poročajo o vrednostih med 0,59 – 0,94 g pepela/100 g živila).

Izmerili so tudi vrednost nekaterih mineralov (kalcija, magnezija, cinka in železa) (Tabela 5). Povprečna vrednost kalcija za vse vzorce je bila 21,1 mg/100 g celokupne mase, vendar je pri tem potrebno poudariti veliko raznolikost med vsebnostmi tega minerala v posameznih vzorcih: gliva *Syncephalastrum racemosum* je v hifah imela visoko vsebnost (43,6 mg/100 g celokupne mase), *Penicillium janthinellum* pa nizko vsebnost kalcija (1,2 g/100 g celokupne mase) (Carvalho in sod., 2010). Gliva *Syncephalastrum racemosum* je vsebovala tudi veliko magnezija (580 mg/100 g), medtem ko so vse ostali analizirani vzorci vsebovali povprečno 16,1 mg magnezija/100 g. Testirane glive so v povprečju vsebovale 0,26 mg cinka/100 g vzorca ter 0,35 mg železa/100 g vzorca. V primerjavi s kvasovkami (Yamada in sod., 2003) je bila vsebnost omenjenih mineralov v hifah filamentoznih gliv manjša. Izstopala je le vsebnost magnezija, ki so ga v glivi *Syncephalastrum raceomosum* izmerili precej več (580 mg/100 g) kot pri kvasovkah (143 mg/100 g).

Tabela 5. Vsebnost nekaterih mineralov v analiziranih vzorcih (povprečje±SD).

ORGANIZEM OZ. ŽIVILO	Vsebnost minerala (mg/100 g)			
	Ca	Mg	Zn	Fe
<i>Penicillium sclerotiorum</i> (Carvalho in sod., (2010))	13,7±0,3	11,8±0,1	0,24±0,0	0,16±0,0
<i>Penicillium janthinellum</i> (Carvalho in sod., (2010))	1,2±0,0	13,9±1,0	0,33±0,0	0,46±0,0
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Carvalho in sod., (2010))	26,6±0,7	21,7±1,0	0,22±0,0	0,67±0,0
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (Carvalho in sod., (2010))	43,6±2,2	580,1±2,3	0,29±0,0	0,12±0,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Yamada in sod., (2003))	147,7	143	12,7	38
glavnata solata (Kawashima in Soares,(2003))	-	18	0,33	-
rukola (Kawashima in Soares, (2003))	-	30	-	-
vodna kreša (Kawashima in Soares, (2003))	-	30	-	-

Dobljene vsebnosti mineralov v plesnih so Carvalho in sod. (2010) primerjali tudi z izsledki raziskav Kawashime in Soaresa (2003), ki se je osredotočila na nekatere vrste listnate zelenjave. Plesen *Syncephalastrum racemosum* je vsebovala več (580 mg/100g) magnezija kot glavnata solata (18 mg/100g), rukola (30 mg/100g) in vodna kreša (30 mg/100g). *Penicillium janthinellum* je vseboval podobno količino cinka kot solata (Tabela 5). Navedeni rezultati so torej potrdili obstoj dobrih hranilnih lastnosti plesni kot so visoka vsebnost beljakovin, nizka vsebnost maščob, prisotnost esencialnih maščobnih kislin ter kalcija, magnezija, cinka in železa, določene vrednosti pa so bile primerljive s tistimi, ki jih srečamo pri vsakdanjih živilih (Carvalho in sod., 2010). Drugih raziskav, ki bi se ukvarjale z vsebnostjo posameznih makrohranil ter mikrohranil pri plesnih nismo našli.

### 3.4 IZOLACIJA PLESNI

Poleg splošno znane uporabe gliv v prehrani, so mnoge izmed njih – predvsem plesni, tudi pomemben del biotehnoloških procesov, s katerimi pridobivajo komercialno pomembne produkte. Če so v biotehnološki postopek vključene žive celice organizmov ali njihovi biokemijski aktivni deli (encimi, mitohondriji, kloroplasti itd.) ter opravljajo biološko spremembo snovi v substratu, jih s splošnim izrazom imenujemo biokultura (Pinter in Predikaka, 2012). Za uspešno izvedbo biotehnološkega procesa je potrebno biokulture skrbno izbrati in pripraviti, temu pa sta prilagojeni tudi izbira in priprava substratov, ekoloških parametrov bioprocesa itd. (Raspor, 1996). Ker je vsaka vrsta plesni edinstvena, imajo tudi posamezne kolonije svoje tipične značilnosti, po katerih se razlikujejo od ostalih

predstavnikov. Preden lahko začnemo plesni uspešno gojiti, jih moramo izolirati iz različnih vzorcev. Metod izolacij plesni je več, v osnovi pa jih lahko razdelimo v dve kategoriji – neposredne oziroma *direktne* in posredne oziroma *indirektne* metode izolacije (Malloch, 1981; Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

#### **3.4.1 Direktne metode izolacije**

Pri direktnih metodah izolacije gre za prenos plesni iz njenega naravnega okolja v čisto laboratorijsko kulturo (Malloch, 1981; Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Čista kultura pomeni genetsko enaka populacija celic, ki raste v nadzorovanih pogojih v odsotnosti ostalih organizmov ali nečistoč (Zaid, 1999). Proces je na najpreprostejši način izveden s sterilno (prežarjeno in ohlajeno) inokulacijsko iglo ali pinceto, in z njo prenesemo spore na sterilno ploščo s hranilnim gojiščem ter počakamo, da plesen razvije kolonije. Za lažji prenos spor v sterilno okolje lahko iglo navlažimo s sterilnim glicerinom, ali pa na konico igle namestimo košček agarja, na katerega se spore lažje prilepijo (Malloch, 1981).

Direktne metode izolacije plesni so velikokrat uspešneje izvedene, če je naravni material, na katerem plesen uspeva, izpostavljen vlagi za nekaj tednov, tako da lahko plesen raste in proizvaja spore. Najpreprostejša je uporaba vlažne komore, napolnjene z materialom, ki po navlažitvi z vodo ohranja vlago (npr. papirjem ali peskom, še posebej uporaben je šotni mah). Na vrh materiala položimo plast filtrirnega papirja, nanj pa predhodno omočen vzorec. Komoro pokrijemo in pustimo na stalni temperaturi ter počakamo nekaj dni, da se plesen razraste (Malloch, 1981; Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Za detekcijo, izolacijo in določanje količine plesni, ki je morebiti prisotna v nekem vzorcu, se pogosto uporabljata metoda gojenja, lahko neredčenega vzorca, ali pa redčenega (Malloch, 1981), ki sta opisani v nadaljevanju. To sta metodi, ki se redno uporabljata tudi v prehranski industriji za spremljanje ravni morebitne glivne kontaminacije živil na različnih stopnjah v njihovi proizvodnji, pri čemer ugotavljamo količino plesni, ki je prisotna v hrani na enoto mase ali prostornine živila oz. posameznih kosov živila (Beuchat, 1992).

### *Metoda direktnega gojenja plesni*

Pri tej metodi položimo vzorec, iz katerega želimo izolirati plesen, na agarno gojišče, lahko na njegovo površino, ali pa ohlajeni stopljeni agar prelijemo čez vzorec. Po nekajdnevni inkubaciji se na površini pojavijo glivne kolonije, ki jih nato lahko prenesemo v čisto kulturo. Količina vzorca mora biti zelo majhna in razprostrta po celi površini gojišča. (Malloch, 1981; Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

### *Metoda redčenja vzorca plesni na ploščah*

Pri tej tehniki npr. raztopimo 1 g suhe mase vzorca v 9 ml destilirane vode, tako da je vzorec redčen desetkrat. Nato 1 ml tako pripravljene raztopine redčimo v novih 9 ml destilirane vode in dobimo stokratno redčenje. Postopek ponavljamo, dokler ne dobimo zelene razredčitve. Nato po 1 ml ustrezno razredčenih raztopin razporedimo v ločena gojišča. Po nekajdnevni inkubaciji se pojavijo glivne kolonije, pri čemer dejansko količino glivnih kolonij na gram vzorca predstavlja razmerje med preštetimi kolonijami in uporabljenim redčitvenim faktorjem. Natančnost te metode lahko izboljšamo s pripravo večjega števila vzorcev (Malloch, 1981).

### **3.4.2 Selektivne metode izolacije**

Poleg predstavljenih direktnih metod izolacije plesni poznamo tudi selektivne metode izolacije, ki pa so bolj specifične in jih izberemo glede na učinek oz. vrsto vzorca oz. vrst, ki jih želimo izolirati. V uporabi so npr. metode izolacije gliv iz zraka, izpostavitve stresnim dejavnikom, površinska sterilizacija, izbira selektivnih hranil, izbira selektivnih temperatur, ozmofilija (izbira gojišč s povišano koncentracijo sladkorja oz. soli idr. (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

## **3.5 GOJENJE PLESNI**

Za gojenje plesni je nujna uporaba ustreznega gojišča, ki mora vsebovati vse potrebne elemente, ki jih plesen potrebuje za svojo rast, torej vir ogljika za energijo, vir dušika za izgradnjo beljakovin, vitaminov in nekaj mineralov (Malloch, 1981). Po navadi je kot vir ogljika (energije) v glivno gojišče dodana glukoza. Če je rast plesni v/na gojišču uravnotežena,

je sinteza vseh celičnih komponent plesni enakomerna. Pri neuravnoteženi rasti plesni v/na gojišču pa se koncentracija različnih celičnih komponent plesni spreminja. Takrat se namreč določena hranila v gojišču hitreje porabljajo, kar vodi v njihovo pomanjkanje (postanejo omejitveni dejavniki), zaradi česar se določene celične komponente sintetizirajo hitreje, druge pa počasneje. Večina gojišč je zasnovanih tako, da je takšen dejavnik ravno vir ogljika (Moore in sod., 2011).

V literaturi se najdejo precej natančnejši podatki o sestavinah, ki jih mora gojišče vsebovati, vendar je različnih gojišč (in zato »receptov« za pripravo) zelo veliko. Zato v nadaljevanju predstavljamo splošnejši opis sestavin, ki so potrebni v gojišču.

V splošnem ločimo dva tipa gojišč – trdna in tekoča. Večinoma jih pripravimo tako, da ustrezna hranila, ki jih plesen potrebuje za rast, raztopimo v vodi (Malloch, 1981).

Ključne sestavine vsakega gojišča so makroelementi, ki morajo biti v gojišču prisotni v večjih količinah (v g/l). Poleg vira ogljika (ki ga največkrat predstavlja glukoza) in vode so makroelementi še naslednji (Moore in sod., 2011):

- Dušik. Je ključen za sintezo aminokislin ter nukleinskih kislin (glavna vira dušika v gojišču sta predvsem  $\text{NH}_4$  in  $\text{NO}_3$ ).
- Fosfor. Je sestavina nukleinskih kislin, fosfolipidov (v gojišču je dodan v obliki  $\text{PO}_4^{2-}$ ).
- Žveplo. Sodeluje pri sintezi aminokislin cisteina in metionina, ter encimskih kofaktorjev (npr. koencima A) (v gojišču je v obliki  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

Elementi, ki so v glavnem gojišču potrebni v manjših količinah (mg/l):

- Kalcij. Je pomemben regulator rasti. Zlahka se sprošča iz steklovine, ki je v stiku s kulturo, kar lahko vodi v njeno kontaminacijo.
- Železo. Je sestavina številnih encimov.
- Magnezij. Sodeluje pri sintezi makromolekul in tvorbi energijsko bogate molekule ATP (adenozin trifosfat).
- Kalij. Vpliva na aktivnost številnih encimov.
- Natrij. Sodeluje pri sintezi molekule ATP ter vpliva na ravnovesje elektrolitov in tekočin.

Elementi v sledovih, ki so v glivnem gojišču potrebni v najmanjših količinah ( $\mu\text{g/l}$ ):

- Kobalt. Je komponenta vitamina B12.
- Baker. Ključen je za delovanje nekaterih encimov.
- Molibden, nikelj in cink. Vključeni so v sintezo nekaterih encimov.

Priprava trdnega gojišča za gojenje plesni za razliko od tekočega gojišča vključuje uporabo zgoščevalnega sredstva, ki se ob ohlajanju strdi v gel. Najpogosteje uporabljeno sredstvo za strjevanje je agar. Obstaja več vrst agarjev, razlike so v čistoči. Agar se raztopi pri relativno visoki temperaturi (skoraj  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), strdi pa se pri  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ker je termostabilen, ga lahko uporabljamo za gojenje organizmov, ki uspevajo tako pri višjih, kot tudi pri nižjih temperaturah. Agar je stabilno sredstvo, ki ga večina gojenih organizmov ne porablja. Pridobivajo ga iz morskih alg, uporaben pa je tudi kot emulgator in zgoščevalec v številnih drugih prehranskih in industrijskih produktih (Malloch, 1981).

Večino glivnih gojišč lahko razdelimo v tri kategorije. *Sintetična gojišča (definirana gojišča)* tvorijo sestavine, ki imajo znano kemijsko sestavo in se v gojišču nahajajo v znanih koncentracijah. Taka gojišča so uporabna predvsem v fizioloških ali opisnih študijah, ko je na primer potrebno točno podvojiti količino gojišča, ali pa ko opazujemo vpliv pomanjkanja ali presežka določene sestavine gojišča na rast plesni v kulturi. *Pol-sintetična gojišča* (polkompleksna gojišča) poleg sestavin z znano sestavo vsebujejo tudi takšne, katerih točne sestave ne poznamo. Takšni mediji so kot kompromis med sintetičnimi in naravnimi gojišči največkrat uporabljana kategorija glivnih gojišč. Vsebinsko *naravnih gojišč* (kompleksna gojišča) je deloma ali v celoti sestavljena iz naravnih materialov z neznano sestavo. Ker se mnogo plesni uspešno razmnožuje le v naravnih medijih, so tudi tovrstna gojišča pogosto v uporabi, vendar ima zaradi njihove raznolike narave gojenje plesni na tovrstnih gojiščih manj zanesljive rezultate (Malloch, 1981).

Za namen identifikacije gliv je primernejša uporaba trdnih gojišč, saj v primerjavi s tekočimi na njih proizvaja spore veliko več glivnih vrst. Izjema so glive kvasovke, ki so dobro prilagojene na tekoča okolja. Tekoča gojišča večkrat uporabljamo tudi za analizo morebitnih kemijskih sprememb, ki so se tekom gojenja zgodile v samem gojišču (Malloch 1981).

### 3.6 KONTAMINACIJA GLIVNIH GOJIŠČ

Kontaminacija pomeni kakršnokoli prisotnost nečistoč oz. drugih ne željenih elementov, ki onesnaži, uniči ali okuži nek material, telo, naravno ali delovno okolje (Donovan, 2001) oziroma v mikrobiološkem smislu prisotnost celic drugih vrst v sicer čisti kulturi.

Glavni povzročitelji kontaminacije glivnih gojišč so druge plesni, bakterije in kvasovke. Njihove kolonije hitro prerastejo gojene glivne kulture. Nekatere bakterije se lahko gibajo med hifami in se prirastejo na njihove konce, kjer prevzemajo hranila, ki jih proizvajajo posamezne plesni (Malloch, 1981).

Kulture plesni lahko kontaminirajo tudi druge glive iz skupine aktinomicet, ki jih zaradi velikega števila spor, ki jih proizvedejo, težko odstranimo. Med pomembnimi kontaminanti glivnih kultur so tudi pršice, ki lahko s premikanjem iz ene kulture na drugo s seboj prenašajo spore. Pršic se zelo težko znebimo, zato je po navadi za njihovo odstranitev potrebna ponovna izolacija plesni. Ker nekatere plesni povzročajo bolezni pri človeku, je tudi po končanem delu z glivnimi kulturami priporočena njihova sterilizacija (Malloch, 1981).

#### *Preprečevanje kontaminacije glivnih gojišč*

Za uspešno preprečevanje kontaminacije je nujno vzdrževanje ustrezne čistoče delovnega prostora. Priporočeno je redno razkuževanje delovne površine, odsvetovana pa je uporaba naprav, ki ustvarjajo zračne tokove (npr. ventilatorjev in klimatskih naprav). Pomemben vir onesnaženja so namreč prašni delci ter glivne spore v zraku. Pri delu z različnimi glivnimi kulturami v petrijevkah ali epruveh je potrebno kar se da hitro odpiranje in zapiranje pokrovčkov ter segrevanje steklovine pod plamenom, s čimer lahko preprečimo morebitne okužbe s tujimi spori. Kontaminacijo z morebitnimi bakterijami lahko preprečimo tudi z uporabo gojišč, ki vsebujejo antibiotike. Po začetni izolaciji gliv je ključno redno opazovanje glivnih kultur (še posebej prvih 12 do 72 ur), saj se na gojišču poleg zelene plesni hitro razvijejo tudi druge neželene vrste (Malloch, 1981).

### 3.7 ČIŠČENJE GLIVNIH KULTUR

Dekontaminacija je postopek zmanjševanja količine oz. uničenja mikroorganizmov, strupov ali radioaktivnih snovi v določenem prostoru oz. okolju, z namenom preprečevanja kontaminacije (Solon, 2015), v striktnem mikrobiološkem smislu se uporablja termin sterilizacija (popolno uničenje vsega živega).

Ker se kljub previdnosti pri delu z glivnimi kulturami, gojišča lahko okužijo z drugimi organizmi, so znanje in veščine dekontaminacije gojišč nujne za uspešno izolacijo zelene vrste glive. Ločimo mehansko in kemično dekontaminacijo glivnih gojišč. Pri *mehanskem čiščenju* gre za osamitev organizma, ki ga želimo izolirati, od preostale morebiti kontaminirane kulture. Najpreprostejši način je fizična ločitev plesni, da njihove kolonije določen čas ne bodo rasle skupaj. V ta namen lahko uporabimo npr. metodo precepljanja ali tehniko redčenja. *Kemično čiščenje* je za razliko od mehanske osnovana na poznavanju razlik v fiziologiji organizmov. Ena najbolj osnovnih metod je uporaba mešanic antibiotikov, ki uničijo bakterije, na rast gliv pa ne vplivajo. Pomaga nam lahko tudi poznavanje prehranskih zahtev, značilnih za posamezne vrste plesni in uporabo ustreznih selektivnih medijev, s čimer preprečimo oz. spodbujamo rast le določenih vrst plesni (Malloch, 1981).



## 4 KVASOVKE

### 4.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI KVASOVK

Kvasovke so polifiletsko nastali organizmi, ki jih uvrščamo v debli *Ascomycota* (zaprtotrosnice) in *Basidiomycota* (prostotrosnice). Poznamo jih tudi kot dimorfno fazo pri nekaterih zigomicetnih glivah. Kvasovke so enocelični mikroorganizmi, ki se razmnožujejo z brstenjem. Najdemo jih praktično povsod, v zemlji, vodi, zraku in tudi v ekstremnih okoljih, kot so ledeniki, vroči vreli in izredno slana okolja (ubikvitarni mikroorganizmi) (Mueller in sod., 2004). Kvasovke najdemo tudi na površju kože in v prebavnem traktu toplokrvnih živali, kjer živijo bodisi v sožitju bodisi parazitsko. Odgovorne so za številne okužbe ustne votline, nožnice, izločal in dihal. Povzročajo tudi vnetje notranjega sloja v steni srca (infekcijski endokarditis), vnetje možganskih ovojnic (meningitis) in druge okužbe. Največ navedenih okužb povzroča kvasovka *Candida albicans*. Nekatere vrste kvasovk so škodljive tudi za rastline. Večina kvasovk je saprotrofov, kar pomeni, da se prehranjujejo z organskimi snovmi, pridobljenimi iz odmrlih organizmov ali njihovih delov. Poleg bakterij so kvasovke glavni razkrojevalci v biosferi (Thapa in sod., 2015).

Velikost kvasovke je zelo raznolika, saj nekatere merijo v dolžino le 2 do 3  $\mu\text{m}$ , medtem ko pri nekaterih vrstah celice dosežejo dolžino 20 do 50  $\mu\text{m}$ . Širina celic kvasovk je manj spremenljiva in meri običajno od 1 do 10  $\mu\text{m}$ . Večina kvasovk je elipsoidne, jajčaste ali okrogle (take so npr. vrste iz rodu *Debaryomyces*) oblike. Lahko so tudi cilindrične s polkrogelnim koncem (take so vrste iz rodu *Schizosaccharomyces*), poznamo pa tudi nitaste (taki sta *Candida albicans* in *Yarrowia lipolytica*). Oblika kvasovk je običajno odvisna od rastnih pogojev (Feldmann, 2012).

Kljub temu, da so kvasovke enocelični mikroorganizmi so parazitske vrste kvasovk sposobne razraščati hife v času napadanja gostiteljevega tkiva. Primer takšne glive je *Candida albicans*, ki raste tudi na sluznicah pri ljudeh, pri čemer jo običajno najdemo kot brstečo enocelično kvasovko, ko napade tkivo, pa začne izraščati hife (Deacon, 2006).

Vsaka celica kvasovk ima v citoplazmi eno jedro in druge organele, vključno z veliko vakuolo in nekaj maščobnimi telesi. Slednji dve strukturi sta pogostokrat edini pod mikroskopom jasno vidni strukturi celice kvasovke. Trdna celična stena kvasovk predstavlja 20 do 25 % njihove suhe celične mase in je sestavljena iz 85 do 90 % polisaharidov ter 10 do 15 % beljakovin (Nguyen in sod., 1998). Celična stena je sestavljena iz dveh plasti. Zunanjo plast gradijo manoproteini (30 do 50 % celične stene). Manoproteini so glikoproteini, kar pomeni, da so na beljakovine vezani sladkorji, v primeru kvasovk je to manan (Lipke in Ovalle, 1998). Notranjo plast gradijo ogljikohidratni polimeri (polisaharidi) beta-1,3-glukana (30 do 45 % celične stene) in beta-1,6-glukana (8 do 18 % celične stene) ter hitin (1 do 2 %). Glede na kemijsko analizo polisaharidov v celični steni le-te sestavljajo glukoza (80 do 90 %), manosa (10 do 20 %) in N-acetilglukozamin (1 do 2 %) (Kieliszek in sod., 2015).

#### 4.2 UPORABA KVASOVK V PREHRANSKI INDUSTRIJI

Kvasovke lahko izkoriščajo zelo različne vire hranil za rast in razmnoževanje, zato so metabolno različne glive. Posledica tega je njihova uporaba v različnih industrijskih procesih, kot so produkcija etanola (za pijače, uporabo v industriji, za gorivo), vitaminov, organskih kislin, karotenoidov in encimov. Številne kvasovke razgrajujejo komponente benzena, kar se je izkazalo za koristno pri čiščenju razlitij industrijskih kemikalij (Mueller in sod., 2004 in Arevala-Vilena in sod., 2017). Raznolika uporaba kvasovk je mogoča zaradi enostavne manipulacije metabolizma kvasovk z genskimi tehnikami, velike hitrosti njihove rasti in razmnoževanja, nezahtevne ločitve biomase kvasovk od zelenega produkta, poznavanje njihovega celotnega genoma (prvi znan je za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*) ter dejstva, da so priznane kot varni (t.j. GRAS – Generally Recognised As Safe) organizmi (Thapa in sod., 2015).

V prehranski industriji imajo kvasovke najpomembnejšo vlogo pri proizvodnji alkoholnih pijač (med katerimi sta najpomembnejša pivo in vino) in pekovskih izdelkov, uporabljajo pa jih tudi v sirarski industriji in v proizvodnji nekaterih drugih izdelkov.

#### **4.2.1 Proizvodnja alkoholnih pijač**

Ob odsotnosti kisika kvasovke iz sladkorjev, ki so v substratu (npr. ječmenov slad za pivo ali zmleto grozdje za vino), izdelujejo alkohol (etanol) in sproščajo ogljikov dioksid. Če je na voljo kisik, poteka v kvasovkah celično dihanje, pri katerem se sladkorji razgradijo na vodo in ogljikov dioksid. Tega pri proizvodnji alkoholnih pijač ne želimo in je zato kisik lahko prisoten le v začetnih fazah, ko kvasovke šele rastejo in se razmnožujejo. Ob zadostni količini sladkorjev v gojišču kvasovke proizvajajo etanol tudi v prisotnosti kisika. To je osnova za veliko raznovrstnost alkoholnih pijač, pridobljenih s pomočjo kvasovk, ki jih poznamo danes (Watkinson in sod., 2016). Med njimi sta najbolj pogosti alkoholni pijači vino in pivo, zato bomo njuno pridelavo z uporabo kvasovk podrobneje predstavili v nadaljevanju.

Pri varjenju piva se uporabljajo različne vrste kvasovk. Te pretvarjajo sladkor, ki se nahaja v ječmenu ali drugih žitih, v alkohol. Kvasovke lahko poskrbijo za izjemen razpon v okusu in aromi, zato so pivovarji izredno previdni pri izboru kvasovk za želen tip piva. Pivovarne svoje kvasovkeskrbno varujejo, saj so ravno te pogosto ključnega pomena pri doseganju željenih arom, okusov in ostalih lastnosti piva. Za ale vrsto piva se uporabljajo kvasovke zgornjega vrenja *Saccharomyces cerevisiae* in tako pridobimo tipe piva kot so pale ale, stout itd. Tudi pri pšeničnem pivu se uporabljajo kvasovke zgornjega vrenja. Za lager vrsto piva (slovensko ležak) se uporabljajo kvasovke spodnjega vrenja *Saccharomyces pastorianus*; tako pridobimo vrste piva kot so pilsner, temni lager, bock in drugi (Berlowska in sod., 2014). Tipi piva, kot so lambic, gueuze, flamski rdeči ale in drugi, so proizvedeni s pomočjo divjih kvasovk in bakterij ter so posledica spontanega vrenja. Tudi v teh pivih so ponavadi prisotne kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces pastorianus*, bistveno vlogo pa igrajo različne vrste kvasovk iz roda *Brettanomyces* ter različne vrste bakterij iz roda *Lactobacillus* in *Pediococcus* (Spitaels in sod., 2014).

Alkohol v vinu je posledica fermentacije sladkorjev, ki se nahajajo v grozdnih jagodah. Poleg alkohola etanola nastaja tudi ogljikov dioksid, ki je pri proizvodnji vina stranski produkt in se iz procesa izloča. Kvasovke so že naravno prisotne na površini kožice grozdnih jagod, kar je načeloma zadosti, da poteče fermentacija sladkorjev. Kljub temu vinarji za bolj nadzorovan in pravilen potek fermentacije dodajajo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Peneča vina dobijo z dodajanjem kvasovk v že zaprte steklenice vina in tako ogljikov dioksid ostane ujet v

steklenici. Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so dobro odporne na visoke koncentracije etanola in povišanje temperature v kasnejših fazah fermentacije, zato so najbolj primerne v proizvodnji alkoholnih pijač (Celis in sod., 2019).

#### **4.2.2 Proizvodnja pekovskih izdelkov**

Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* se uporabljajo za fermentirano testo narejeno iz pšenice in rži že več kot tisočletje. Že Rimljani so ostanek kvasovk pri varjenju piva uporabili za peko kruha, kar se je ohranilo do današnjih dni. Encimi, ki jih proizvajajo kvasovke, sodelujejo pri alkoholnem vrenju, pri katerem nastane ogljikov dioksid, ki vpliva na strukturo in volumen izdelka. Ena izmed glavnih sestavin pri proizvodnji pekovskega kvasa je melasa iz sladkornega trsa ali sladkorne pese, ki vsebuje sladkorje in dušik, potrebne za rast kvasovk. Preden koncentrirano melaso dodajo kvasovkam v fermentor, jo razredčijo z vodo in sterilizirajo. Nato jo dodatno obogatijo z dušikom, fosfatom, vitamini in minerali. Fermentor mora biti opremljen s sistemi za prezračevanje, hlajenje, nadzor vrednosti pH, sistemom za dodajanje hranil ter sistemu proti penjenju. V fermentor se vstavi čisto kulturo željenega seva kvasovke ter prej pripravljeno melaso. Fermentacija poteka pri temperaturi med 25 in 30 °C. Potrebno je zadostno dodajanje kisika in hranil. Kvasno maso iz fermentorja centrifugirajo in operejo z vodo, tako dobijo kremni kvas, ki ga le še ohladijo. Iz kremnega kvasa z nadaljnimi koraki vodenja mase skozi vrteči se vakuumski filter, ki odstrani vodo, granulador (daje zrnato obliko kvasu), ekstrudor in rezalnik, lahko pridobijo kvas v obliki granul ali kock (Lallemand, 2018). Naravni kvas lahko proizvedemo tudi doma, tako da ugnetenno testo iz moke in vode pustimo stati in s tem fermentirati kakšnih 10 dni. Tako dobimo kislo testo, katerega manjši del dodamo testu pri naslednji peki kruha (Watkinson in sod., 2016).

#### **4.2.3 Proizvodnja sirov**

Kvasovke uporabljajo v sirarski industriji pri fermentacijskih reakcijah, zorenju sirov in pri pridobivanju encima kimozina. Kimozin razgrajuje beljakovine in je posledično pomemben za zgoščevanje mleka. Izvorno izhaja iz želodčkov (siriščnikov) mladih sesalcev (teleta, ovce, koze). Danes ga pridobivajo z laboratorijsko tehnologijo združevanja genetskega materiala različnih mikroorganizmov in sicer sevov bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*), plesni *Aspergillus niger* var. *awarmori* in kvasovke *Kluyveromyces lactis*.

Kvasovka *Debaryomyces hansenii* raste na poltrdih sirih in je pomembna pri površinskem zorenju številnih sirov, npr. v "Pecorino di Filiano" (Capece in Romano, 2009). Kvasovka *Geotrichum candidum* se dodaja mehkim sirom, npr. kamemberu (Lessard in sod., 2012). Pogosto se uporabljajo tudi kvasovke *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* in vrste kvasovk rodu *Kluyveromyces* (Watkinson in sod., 2016).

#### **4.2.4 Proizvodnja ostalih izdelkov**

Tudi fermentacija kakovih zrn poteka s pomočjo kompleksne združbe kvasovk in bakterij. V ta namen uporabljajo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* in druge. Kvasovke imajo vlogo tudi pri številnih fermentiranih jedeh in pijačah, ki prihajajo iz azijskih dežel. Med njimi so najbolj znane: kimči (ang. kimchi) - korejska narodna jed iz fermentirane zelenjave in z različnimi začimbami, kombuča (ang. kombucha) - fermentiran čaj, sojina omaka in miso – fermentirana sojina krema z okusom po mesu (Tamang in Fleet, 2009).

#### **4.2.5 Proizvodnja encimov**

V živilski industriji so kvasovke kot proizvajalke encimov zelo zaželeno, saj ne proizvajajo nevarnih sekundarnih metabolitov (Türker, 2015). Kvasovke proizvajajo številne encime, npr. kimozin (potreben je pri proizvodnji sira), invertazo (pretvarja namizni sladkor oziroma saharozo v glukozo in fruktozo), L-glutaminazo (pretvarja glutamin v glutamat), fitazo (razgrajuje fitinsko kislino) ter tudi alfa- in beta-galaktozidazo, inulinazo, laktazo, lipaze, fenilalanin dehidrogenazo, fenilalanin-aminopeptidazo, katerih delovanje je podrobneje predstavljeno v nadaljevanju.

Za izolacijo encima beta-galaktozidaza v prehranske namene se uporablja kvasovka *Kluyveromyces lactis*, ki pretvarja laktozo (to je mlečni sladkor) v alolaktozo. Hidroliza (razlaga pojma) laktoze s tem encimom je bistvena pri izdelavi brezlaktoznega mleka. Encim je ključen tudi za nastanek galakto-oligosaharidov, ki so kot prebiotiki pomembna sestavina živil, predvsem mlečnih formul za dojenčke (Agyei in sod., 2020).

Encim laktaza je odgovoren za razgradnjo laktoze na enostavna sladkorja glukozo in galaktozo. Komerzialna proizvodnja encima poteka na plesnih *Aspergillus niger* in *Aspergillus oryzae* ter kvasovki *Kluyveromyces lactis*. Ljudje z laktozno intoleranco morajo za razgradnjo

laktoze uživati prehranska dopolnila, ki vsebujejo encim laktazo oziroma uživati brezlaktozno mleko (Singh in Kumar, 2019).

Lipaze se v živilski industriji uporabljajo v različnih panogah. V mlečni industriji se lipaze uporabljajo pri hidrolizi mlečne maščobe ter pri proizvodnji sira, saj pospešujejo zorenje sira in izboljšajo njegov okus. V pekarski industriji so lipaze vse bolj popularne, saj lahko nadomestijo tradicionalno uporabljene emulgatorje, ki se jih uporablja za izboljšanje okusa in vonja pekarskih proizvodov zaradi sproščanja kratkoverižnih maščobnih kislin. Lipaze so pomembne tudi pri proizvodnji pijač. Ječmen je, denimo, najpomembnejša žitarica pri proizvodnji piva in vsebuje 3 % do 5 % maščob v suhi snovi. Lipaze te maščobe hidrolizirajo ter prispevajo k boljši aromi pijače. Lipaze se uporabljajo tudi v mesnih in ribjih izdelkih za odstranjevanje maščob in razvoj okusa. Za izboljšanje kakovosti in teksture se uporabljajo lipaze tudi pri proizvodnji majoneze in omak (Singh in sod., 2019).

Encim invertaza je v veliki večini proizveden iz kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Encim hidrolizira saharozo v fruktozo in glukozo, ki sta slajši od saharoze in se uporabljata predvsem zaradi sladilnih lastnosti (Singh in sod., 2019).

#### **4.2.6 Kvasovke med probiotiki**

Zmožnost preživetja kvasovk pri nizkih vrednostih pH, kakršne se nahajajo v človeškem želodcu (pH vrednost od 1 do 3), je eden izmed razlogov, zaradi katerega so kvasovke lahko izbrane za probiotike<sup>11</sup>.

Kvasovke v probiotičnih izdelkih<sup>12</sup> običajno predstavljajo vrste *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces boulardii*. Slednje so se izkazale celo za primernejše, saj rastejo pri višjih temperaturah (37 °C) kot *Saccharomyces cerevisiae* in so bolj odporne na stresno okolje prebavnega trakta (Czeruka in sod., 2007). Dober potencial za uporabo v ta namen kaže tudi kvasovka *Kluyveromyces marxianus*, ki so jo izolirali iz številnih mlečnih izdelkov (Maccaferri in sod., 2012).

---

<sup>11</sup> Probiotiki so definirani kot živi mikroorganizmi, ki imajo ob zaužitju v zadostnih količinah ugoden vpliv na zdravje gostitelja (Hill in sod., 2014).

<sup>12</sup> Prehranska dopolnila, ki kot glavno sestavino vsebujejo vrste kvasovk, ki jih proizvajalec deklarira kot probiotike, so v P3 kategoriji Probiotiki in ne Glive, gobe, kvasovke plesni. S to klasifikacijo poudarimo, da naj se ne bi absorbirale iz črevesja v kri.

#### **4.2.7 Proizvodnja beta-glukanov**

Beta-glukane uvrščamo med prehransko vlaknino in jih najdemo v različnih rastlinah, npr. v ovsu in ječmenu, ali pa so sestavine celičnih sten nekaterih bakterij in gliv. Beta-glukani so skupina polisaharidov sestavljenih iz molekul glukoze, ki so med seboj povezane z beta-glikozidnimi vezmi. Kot navedeno zgoraj, kvasovke v svoji celični steni vsebujejo približno 60 % beta-glukana v suhi snovi. Slednjega lahko razdelimo v dva podtipa, in sicer v beta-1,3-glukan, ki se sestoji iz daljših verig in predstavlja približno 85 % skupnega beta-glukana v celici, ter beta-1,6-glukan, ki se sestoji iz krajših verig in predstavlja približno 15 % skupnega glukana (Aguilar-Uscanga in Francois, 2003).

#### **4.2.8 Proizvodnja selena**

Količina selena v živilih je močno odvisna od koncentracije selena v zemlji, od koder pride v rastline, živalsko krmo in posledično tudi v živali (Kieliszek in Blazejak., 2013).

Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so v ustreznih pogojih zmožne akumulirati večje količine anorganske oblike selena ter njegove vgradnje v organske komponente. Selen v svoji organski obliki navadno prevzame funkcijo žvepla – najpogosteje nadomesti žveplo v aminokislinah L-metionin in L-cistein, tako da dobimo aminokislino, ki vsebujejo selen, to so selenometionin in selenocistein. Ta vrsta kvasovk se torej v primeru, da imamo gojišče obogateno s selenom, lahko uporablja za proizvodnjo selena (Rajashree in Muthukumar, 2013).

Proizvodnja selena iz kvasovk vključuje kulturo kvasovk pri optimalnih pogojih fermentacije v prisotnosti vira ogljika, dušika, kisika in fosforja ter znane količine virov selena, kot so natrijev selenit, selenijev aminokislinski kelat ali selenijev dioksid. V gojišču, kateremu v eksponentni fazi rasti dodamo 30 µg/ml natrijevega selenita, lahko kvasovke akumulirajo od 1200 do 1400 µg selena/g na suho celično maso. Dodajanje višjih koncentracij selena v gojišče pa ima zaviralen vpliv na rast kvasovk (Suhajda in sod., 2000). Pomembno je, da kvasovkam v gojišču zagotavljamo aerobne pogoje; v fermentor je torej treba dovajati kisik. Fermentaciji sledi centrifugiranje in izpiranje morebitnih ostankov anorganskega selena, nato še pasterizacija kvasne biomase, s katero inaktiviramo celice kvasovk, ter sušenje. Za

standardizacijo vsebnosti selena lahko že posušeno maso pomešamo tudi z neaktivnim dehidriranim pekovskim kvasom (*S. cerevisiae*) (EFSA, 2008).

#### 4.3 HRANILA V KVASOVKAH

Kvasovke so dober vir kakovostnih beljakovin, saj vsebujejo nujno potrebne aminokisliline. Poleg tega vsebujejo številne vitamine, kot so na primer B<sub>1</sub> (tiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>6</sub> (piridoksin), niacin, folno kislino, pantotensko kislino in biotin. Vsebujejo tudi različne minerale in elemente v sledovih, kot so kalij, natrij, kalcij, magnezij, železo in cink. Kljub navedenemu, hranil v neobdelanih kvasovkah zaradi njihove trdne celične stene človeško telo ne more uporabiti, zato je nujno potrebna primerna obdelava kvasovk, s katero razbijemo njihovo celično steno (Türker, 2015).

Anderson in Jackson (1957) navajata podatke o vsebnosti esencialnih aminokislin v odstotkih na suho maso kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, in sicer: 2,4 % arginina, 2,7 % histidina, 2,5 % izolevcina, 3,8 % leucina, 3,1 % lizina, 0,65 % metionina, 2,1 % fenilalanina, 2,4 % treonina, 0,59 % triptofana ter 2,8 % valina.

Kvasovke lahko vežejo kovinske ione iz okolja in jih trajno vgradijo v svojo celično strukturo. To lahko vodi v oblikovanje stabilnih kompleksov z beljakovinami. Ob zaužitju se kompleks kovinskih ionov in beljakovin v nespremenjeni obliki prenese v prebavni trakt človeka ali živali, kjer se absorbira. Tako se izognemo problemu slabše biorazpoložljivosti mineralov (Kieliszek in sod., 2017).

Bzducha-Wrobel in sod. (2012) so preučevali zmožnost kvasovke *Candida utilis* ATCC 9950 za vezavo magnezija. Najvišja vsebnost tega elementa je znašala 7,2 mg magnezija na gram suhe mase kvasovk, po njihovem 24 urnem gojenju teh kvasovk v gojišču z magnezijevim sulfatom. Pri gojenju kvasovk v običajnem gojišču (GPY, glucose-peptone-yeast), je bila vsebnost magnezija občutno nižja, in sicer 0,9 mg magnezija na gram suhe mase. Isti sev kvasovk je pokazal tudi na dobre zmožnosti vezave selena (do 5,47 mg selena/g suhe mase pri gojenju na s selenom bogatem gojišču) (Kieliszek in Błazejak, 2016).



Številne vrste kvasovk iz glicerola proizvajajo organsko spojino manitol, ki je uporaben v prehranski, farmacevtski in kemični industriji ter sodi med alkoholne sladkorje. Kvasovki »*Candida glycerinogenes*« in *Saccharomices cerevisiae* uporabljajo za proizvodnjo glicerola. Kvasovka *Yarrowia lipolytica* se uporablja za industrijsko proizvodnjo organskih kislin, vključno s piruvično, citronsko, alfa-ketoglutarano in izocitronsko kislino, ki se uporabljajo v živilskih izdelkih (Türker, 2015). Največji biosintezni donos citronske kisline s kvasovko *Candida zeylanoides* ATCC 20367 je bil 92 g/l (Kieliszek in sod., 2017).

#### 4.4 GOJIŠČA ZA KVASOVKE

Kvasovke se redko pojavijo v odsotnosti plesni ali bakterij, zato se za izolacijo kvasovk uporabljajo selektivne tehnike z uporabo gojišča, ki spodbuja rast kvasovk in obenem zavira rast plesni in bakterij. Selektivno gojišče, ki zavira rast bakterij, dobimo z dodajanjem antibiotikov v gojišče. Za zaviranje rasti plesni se gojišču dodajajo kemična sredstva, ki zavirajo rast gliv (fungicidi), vendar je tu potrebna posebna pozornost, saj nekateri fungicidi zavirajo tudi rast kvasovk (Kurtzman in sod., 2011).

Optimalna vrednost pH za rast in razvoj kvasovk je nižja kot za rast bakterij. Optimalna rast kvasovk nastopi pri vrednostih pH med 4,5 in 6,5. Večina kvasovk lahko raste tudi pri vrednosti pH 3, nekatere vrste lahko tolerirajo vrednosti pH tudi do 1,5 (Hill in sod., 2014). Za zakisanje gojišča se najbolj priporoča uporaba fosforne in klorovodikove kisline (Kurtzman in sod., 2011).

Glede temperature rasti in razmnoževanja večino kvasovk uvrščamo v skupino mezofilnih kvasovk, ki so tudi najbolj preučevana skupina kvasovk v primerjavi s psihrofilnimi in termofilnimi kvasovkami. Mezofilne kvasovke so kvasovke, ki rastejo pri temperaturah med 5 °C in 35 °C, psihrofilne kvasovke rastejo pod 5 °C in ne kažejo znakov rasti pri temperaturah višjih od 20 °C. Termofilne kvasovke rastejo pri temperaturi 37 °C in več, zato v to skupino sodi tudi npr. za človeka patogen kvasovka *Candida albicans* (Hamid in sod., 2014). Gojišča kvasovk so običajno inkubirana pri 20 °C do 25 °C, saj je večina kvasovk mezofilnih. Za inkubacijo psihrofilnih kvasovk so potrebne temperature med 4 °C in 15 °C. Višje

temperature v razponu od 30 °C do 37 °C so potrebne za inkubacijo termofilnih kvasovk (Kurtzman in sod., 2011).

Večina kvasovk raste v okolju s koncentracijo sladkorjev, ki je dovolj visoka, da zavira rast številnih bakterij. Za direktno izolacijo se uporablja trdno gojišče GPY (glucose-peptone-yeast), ki je osnovan na glukozi, peptonu in kvasnem ekstraktu ali pa gojišče YM (yeast-malt extract) agar, ki je osnovan na glukozi, sladnem ekstraktu, peptonu in kvasnem ekstraktu (Kurtzman in sod., 2011).

Prisotnost ustreznih hranil v gojišču je nujno potrebna za rast oziroma sintezo celičnih materialov ter za proizvodnjo energije za biosintezne procese kvasovk. Ogljik, dušik in fosfor so glavne komponente vsakega gojišča. Najpogostejši viri ogljika v gojišču so: glukoza, fruktoza, laktoza in saharoza. Ogljik je tako pomemben zato, ker predstavlja glavno celično sestavino in predstavlja približno polovico suhe celične mase kvasovke. Dušik kvasovke prevzamejo iz gojišča v obliki neorganskega dušika (amonijeve soli) ali kot sečnino, aminokislino, peptide, purine in pirimidine. Kvasovke dušik nujno potrebujejo za sintezo beljakovin in gradnikov celične stene. Fosfor iz gojišča prevzamejo v obliki dehidrogeniranih fosfatnih ionov in je nujno potreben gradnik nukleotidov. Gojišča morajo biti tudi vir drugih makroelementov kot so kalij, magnezij in žveplo. Le-ti so v kvasovkah potrebni na različnih stopnjah kot koencimi (npr. kalij), encimski aktivatorji (npr. magnezij) ter komponente aminokislina (npr. žveplo), membran (npr. magnezij), koencimov (npr. žveplo) in RNA (npr. kalij). V zelo majhnih količinah kvasovke potrebujejo tudi elemente kot so: železo, mangan, molibden, cink, kobalt, nikelj, klor, natrij in bor. Ti elementi imajo pomembno vlogo kot gradniki encimov in koencimov. Prav tako je v gojiščih v majhnih količinah pomembna tudi prisotnost vitaminov. kot so tiamin, riboflavin, pantotenska kislina, piridoksin, nikotinska kislina, biotin in folna kislina. V kvasovkah vitamini igrajo vlogo prekurzorjev vitaminov ter gradnikov encimov in koencimov (Boze in sod., 1992).

## 5 ZAKLJUČEK

Pri vseh glivah v prehranskih dopolnilih je pomembno, da je na deklaraciji nedvoumno navedeno, ali končni izdelek resnično vsebuje zadevno glivo ali je taista gliva uporabljena le kot vir za pridobivanje neke sestavine, npr. hranila. Pri tem je pomemben ne samo postopek gojenja glive, ki z različnimi pogoji pravzaprav zagotavlja, da imamo opravka z določeno vrsto, temveč tudi postopek pridobivanja določene sestavine in njene ekstrakcije, če je le-ta uporabljena. V nasprotnem primeru je pomembno, ali so preostanki glive odstranjeni ali inaktivirani, in na kakšen način. V praksi to pogosto opazimo pri prehranskih dopolnilih, ki vsebujejo kvas oziroma kvasovke ali pa pri hranilih, ki so jih kvasovke proizvedle (P3 Professional, 2017).

Transparentno in jasno označevanje postajata vedno bolj pomemben odraz kakovosti izdelka, ki pa obenem zahteva vedno več znanja za ustrezno interpretacijo zapisanega. Zato moramo v stroki in znanosti uporabljati ustrezno izrazoslovje in paziti, da surovine za glavno sestavino ali glavne sestavine oziroma kategorije glavne sestavine ne zamenjujemo s končnim izdelkom ali med seboj. Tako ne bomo pozabili zapisati oziroma preveriti, kaj vse in koliko tega je še dodano končnemu izdelku – prehranskemu dopolnilu.

Biotehnologija je vedno bolj prevladujoča metodologija proizvodnje glavnih sestavin prehranskih dopolnil, kar je potrebno predstaviti javnosti. Z njo smo vstopili v novo obdobje proizvodnje živil, ki prinaša nove priložnosti, pa tudi tveganja, ki jih moramo dobro spoznati.

## 6 VIRI IN LITERATURA

1. Abe M, Takaoka N, Idemoto Y, Takagi C, Imai T, Nakasaki K (2008) Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea. *Int J Food Microbiol* 124 (2):199-203. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.008
2. Adedayo MR, Akintunde JK, Sani A, Boligon AA (2018) Effect of dietary supplement from mono-culture fermentation of. *Food Sci Nutr* 6 (7):1826-1838. doi:10.1002/fsn3.729
3. Aguilar-Uscanga B, Francois JM (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37 (3):268–274
4. Agyei D, Akanbi TO, Oey I (2020) Enzymes for Use in Functional Foods. *Enzymes in Food Biotechnology*. doi:10.1016/B978-0-12-813280-7.00009-8
5. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) *Introductory mycology*. 4th edn. Wiley, New York
6. Anderson RF, Jackson RW (1957) Essential Amino Acids in Microbial Proteins. *Microbiological Process Report*, 6:369-373
7. AOAC International (2009) *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International, Arlington, Va.
8. Bakkeren G, Kämper J, Schirawski J (2008) Sex in smut fungi; Structure, function and evolution of mating type complexes. *Fungal Genetics and Biology*, 45:15-21. doi:10.1016/j.fgb.2008.04.005
9. Baron S (1996) *Medical microbiology*. 4th edn. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Tex.
10. Bentley R (2006) From miso, saké and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Nat Prod Rep* 23 (6):1046-1062. doi:10.1039/b603758p
11. Berlowska J, Kregiel D, Rajkowska K (2014) Biodiversity of brewery yeast strains and their fermentative activities. *Yeast*. doi:10.1002/yea.3041
12. Beuchat LR (1992) Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *Int J Food Microbiol* 17 (2):145-158
13. Borresen EC, Henderson AJ, Kumar A, Weir TL, Ryan EP (2012) Fermented foods: patented approaches and formulations for nutritional supplementation and health promotion. *Recent Pat Food Nutr Agric* 4 (2):134-140
14. Boze H, Moulin G, Galzy P (1992) Production of Food and Fodder Yeast. *Critical reviews in Biotechnology*, 12 (1/2):65-86. doi:10.3109/07388559209069188
15. Brodo IM, Sharnoff SD, Sharnoff S, Canadian Museum of Nature. (2001) *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven
16. Bundesinstitut für Risikobewertung [BfR] (2004) Enjoyment with unpleasant consequences. [https://www.bfr.bund.de/en/press\\_information/2004/10/enjoyment\\_with\\_unpleasant\\_consequences-5332.html](https://www.bfr.bund.de/en/press_information/2004/10/enjoyment_with_unpleasant_consequences-5332.html)

17. Burke FM (2015) Red yeast rice for the treatment of dyslipidemia. *Curr Atheroscler Rep* 17 (4):495. doi:10.1007/s11883-015-0495-8
18. Bzducha-Wrobel A, Błazejak S, Tkacz K (2012) Cell wall structure of selected yeast species as a factor of magnesium binding ability. *European Food Research and Technology*, 235 (2):355-366. doi:10.1007/s00217-012-1761-4
19. Cairns TC, Nai C, Meyer V (2018) How a fungus shapes biotechnology: 100 years of. *Fungal Biol Biotechnol* 5:13. doi:10.1186/s40694-018-0054-5
20. Capece A, Romano P (2009) "Pecorino di Filiano" cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. *International journal of food microbiology*. 132: 180-4. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.007.
21. Carvalho SA, Coelho JV, Takahashi JA (2010) Screening filamentous tropical fungi for their nutritional potential as sources of crude proteins, lipids and minerals. *Food Sci Technol Int* 16 (4):315-320. doi:10.1177/1082013210366885
22. Cavalier-Smith T (1981) Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14 (3-4):461-481
23. Chatterjee S, Sarma KM, Deb U, Steinhauser G, Walther C, Gupta D, K (2017) Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (24):19480-19493
24. Chye FY, Wong JY, Lee J-S (2008) Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. *Food Science and Technology International* 14 (4):375-384. doi:10.1177/1082013208097445
25. Das L, Bhaumik E, Raychaudhuri U, Chakraborty R (2012) Role of nutraceuticals in human health. *J Food Sci Technol* 49 (2):173-183. doi:10.1007/s13197-011-0269-4
26. Deacon Jim (2006) *Fungal Biology*, 4th edition. Institute of Cell and Molecular Biology, University of Edinburgh, UK, 1-360
27. Dijksterhuis J, Samson RA (2007) *Food mycology : a multifaceted approach to fungi and food*. Mycology series, vol 25. CRC Press, Boca Raton
28. Donovan RP (2001) *Contamination-free manufacturing for semiconductors and other precision products*. Marcel Dekker, New York
29. Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, Mapari SA, Sutthiwong N (2014) Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Curr Opin Biotechnol* 26:56-61. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.007
30. European Food Safety Agency [EFSA] QN (2008) Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food Adopted on 9 July 2008, 1–42
31. European Food Safety Agency [EFSA] (2018) Scientific opinion on the safety of monacolins in red yeast Rice. *EFSA Journal* 16(8):5368  
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2018.5368>

32. Feldmann H (2012) Yeast. *Molecular and Cell Biology*. Second edition, 5-24.  
doi:10.1002/9783527659180.ch2v
33. Ferreira JA, Lennartsson PR, Edebo L, Taherzadeh MJ (2013) Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects. *Bioresour Technol* 135:523-532.  
doi:10.1016/j.biortech.2012.09.064
34. Frängsmyr T, Lindroth S (1994) Linnaeus, the man and his work. *Uppsala studies in history of science*, vol 18, Rev. edn. Science History Publications/USA, Canton, MA, USA
35. Gams W (2014) A new nomenclature for fungi. *Mycologia Iranica* 1 (1):1-5.  
doi:10.22043/mi.2014.2959
36. Gassem MA (1999) Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. *J Appl Microbiol* 86 (2):221-225
37. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 59:1-10.  
doi:10.3114/sim.2007.59.01
38. Gozdarski inštitut Slovenije (2004) Seznam vrst in razširjenost makromicet v Sloveniji z analizo stopnje ogroženosti.  
[http://www.gobe.si/dokumenti/Porocilo\\_20041207.pdf](http://www.gobe.si/dokumenti/Porocilo_20041207.pdf)
39. Hameed A, Hussain SA, Yang J, Ijaz MU, Liu Q, Suleria HAR, Song Y (2017) Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients* 9 (10). doi:10.3390/nu9101101
40. Hawksworth DL (2011) A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2 (2):155-162. doi:10.5598/imafungus.2011.02.02.06
41. Hermet A, Méheust D, Mounier J, Barbier G, Jany JL (2012) Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol* 116 (6):692-705. doi:10.1016/j.funbio.2012.04.002
42. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111 (Pt 5):509-547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004
43. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein JD, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder CP, Sanders ME (2014) The International Scientific Association

- for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11 (8):506-514
44. Hillocks RJ, Thresh JM, Bellotti A (2002) *Cassava : biology, production, and utilization*. CABI Pub., Wallingford, Oxon, UK ; New York, NY, USA
  45. Hogg S (2013) *Essential microbiology*. 2nd edn. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex
  46. Hui YH (2004) *Handbook of vegetable preservation and processing*. Food science and technology, vol 130. M. Dekker, New York
  47. Inštitut za nutricionistiko (2019) Gobe. <https://prehrana.si/clanek/149-gobe>
  48. Jeršek B (2014) *Osnovni principi identifikacije plesni, kvasovk in bakterij v živilih: Skripta in delovni zvezek za laboratorijske vaje pri predmetu Živilska mikrobiologija*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo ; Ljubljana
  49. Jogan N (2001) *Navodila za vaje iz sistematske botanike*. Biotehniška fakulteta ; Ljubljana
  50. Judd WS (2008) *Plant systematics : a phylogenetic approach*. 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
  51. Kalač P (2012) A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 93 (2):209-218. doi:10.1002/jsfa.5960
  52. Karimi K, Zamani A (2013) *Mucor indicus: biology and industrial application perspectives: a review*. *Biotechnol Adv* 31 (4):466-481. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.009
  53. Kawashima LM, Soares LMV (2003). Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16 (5): 605-611. doi:10.1016/S0889-1575(03)00057-7
  54. Kieliszek M, Błażej S (2013) Selenium : Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 29 (5):713–718
  55. Kieliszek M, Błażej S (2016) Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. *Molecules*, 21 (5):16
  56. Kieliszek M, Kot AM, Bzducha-wrobel A, Błażej S, Gientka I, Kurcz A (2017) Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biology Reviews*, 31:185-198. doi:10.1016/j.fbr.2017.06.001
  57. Koonin EV (2010) The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biol* 11 (5):209. doi:10.1186/gb-2010-11-5-209
  58. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V (2011) *Methods for Isolation , Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts*. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0
  59. Lallemand (2018) *Bakers Yeast Production and Characteristics*. *Baking update*, 3 (4):1-2

60. Lessard MH, Bélanger G, St-Gelais D, Labrie S (2012) The Composition of Camembert Cheese-Ripening Cultures Modulates both Mycelial Growth and Appearance. *Appl Environ Microbiol.* 78(6): 1813–1819. doi: 10.1128/AEM.06645-11
61. Lessard MH, Viel C, Boyle B, St-Gelais D, Labrie S (2014) Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics* 15:235. doi:10.1186/1471-2164-15-235
62. Lipke PN, Ovalle R (1998) Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology*, 180 (15):3735-3740
63. Maccaferri S, Klinder A, Brigidi P, Costabile A 2012 Potential Probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut Microbiota in an In Vitro Colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (4):956-964
64. Machida M, Yamada O, Gomi K (2008) Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. *DNA Res* 15 (4):173-183. doi:10.1093/dnares/dsn020
65. Madigan MT (2012) Brock biology of microorganisms. 13th edn. Benjamin Cummings, San Francisco
66. Malloch D (1981) Moulds : their isolation, cultivation, and identification. University of Toronto Press, Toronto ; Buffalo
67. Meussen BJ, de Graaff LH, Sanders JP, Weusthuis RA (2012) Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol* 94 (4):875-886. doi:10.1007/s00253-012-4033-0
68. Mikološka zveza Slovenije (2014) Pravilnik o izpitih in pridobivanju nazivov determinator. <http://www.gobe.si/Mikologija/Pravilnik>
69. Mogensen JM, Varga J, Thrane U, Frisvad JC (2009) *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B2. *Int J Food Microbiol* 132 (2-3):141-144. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.011
70. Montet D, Ray RC (2016) Fermented foods. Food biology series. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton
71. Moore D, Robson GD, Trinci APJ (2011) 21st century guidebook to fungi. Cambridge University Press, Cambridge ; New York
72. Mueller MG, Bills FG, Foster SM (2004) Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. First Edition. Elsevier Academic Press
73. Natural Products Insider (2016) Overview of the European Supplement and Novel Foods Market. <https://www.naturalproductsinsider.com/regulatory/overview-european-supplement-and-novel-foods-market>
74. Nguyen T, Karl M, Santini A (2017) Red Yeast Rice. *Foods* 6 (3). doi:10.3390/foods6030019
75. Nguyen TH, Fleet GH (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol* 50 (2):206–212.



76. O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 71 (9):5544-50.
77. Oshero N, May GS (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett* 199 (2):153-160. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x
78. P3 Professional (2017) Pretehtajte prehranska dopolnila. [http://www.covirias.si/primerjava\\_laiki/primerjava.php](http://www.covirias.si/primerjava_laiki/primerjava.php)
79. Park HS, Jun SC, Han KH, Hong SB, Yu JH (2017) Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Adv Appl Microbiol* 100:161-202. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001
80. Patel S (2016) Functional food red yeast rice (RYR) for metabolic syndrome amelioration: a review on pros and cons. *World J Microbiol Biotechnol* 32 (5):87. doi:10.1007/s11274-016-2035-2
81. Perčič S, Šarc L, Perharič L (2014) Zastrupitve z gobami. *NIJZ*, 9: 1-16 v [http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz\\_oktober\\_2014.pdf](http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz_oktober_2014.pdf)
82. Pinter RA, Predikaka M (2012) *Biotehnologija*. Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije
83. Pires CV, Oliveira MGdA, Rosa JC, Costa NMB (2006) Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Food Science and Technology* 26:179-187
84. Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and food spoilage*. 3rd edn. Springer, Dordrecht ; New York
85. Pravilnik o prehranskih dopolnilih Ur. l. RS št. 66/2013. <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV11675>
86. Puc M, Kožar J, Škedelj B, Vidic Z, Golja P (2017) Alge kot glavna sestavina prehranskih dopolnil. Ljubljana: COVIRIAS. <https://pretehtajte.si/wp-content/uploads/2018/09/COVIRIAS-Alge-kot-glavna-sestavina-prehranskih-dopolnil.pdf>
87. Raspor P (1996) *Biotehnologija*. Bia ; Ljubljana
88. Ropars J, López-Villavicencio M, Snirc A, Lacoste S, Giraud T (2017) Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. *PLoS One* 12 (3):e0171387. doi:10.1371/journal.pone.0171387
89. Sheikh-Ali SI, Ahmad A, Mohd-Setapar SH, Zakaria ZA, Abdul-Talib N, Khamis AK, Hoque ME (2014) The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: a review. *J Microbiol* 52 (10):807-818. doi:10.1007/s12275-014-4294-7
90. Simpson MG (2010) *Plant systematics*. 2nd edn. Academic Press, Burlington, MA
91. Singh P, Kumar S (2019) Microbial Enzyme in Food Biotechnology. *Encimes in Food Biotechnology*, 19–28. doi:10.1016/B978-0-12-813280-7.00002-5

92. Singh R., Singh A., Sachan S. (2019). Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes ? Enzymes in Food Biotechnology. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00048-7>
93. Solon JG, Killeen S (2015) Decontamination and sterilization. *Surgery (Oxford)* 33 (11): 572-578. doi: 10.1016/j.mpsur.2015.08.006
94. Spitaels F., Wieme A. D., Janssens M., Aerts M., Daniel H., Landschoot A., Vuyst L., Vandamme P. (2014). The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *Microbial Diversity of Traditional Lambic Beer*, 9(4): 1-13
95. Steffen C (2017) [Red yeast rice: An unsafe food supplement?]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 60 (3):292-296. doi:10.1007/s00103-016-2503-8
96. Suhajda A, Hegdczki J, Janzso B, Pais I, Vereczkey G, Janzs B, Pais I, Vereczkey G (2000) Preparation of selenium yeasts I . Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 14:43–47
97. Takahashi JA, Carvalho SA (2010) Nutritional potential of biomass metabolites from filamentous fungi. *Curr Res Edu Topics Appl Microbiol Microbial Biotechnol* 1126–1135
98. Tamang J. P., Fleet G. H. (2009). Yeast Diversity in Fermented Foods and Beverages. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, 169-198
99. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH (2016) Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front Microbiol* 7:377. doi:10.3389/fmicb.2016.00377
100. Thapa S, Shrestha R, Tibrewal A, Sharma A, Yuvraj KC (2015) Isolation of Yeast from Soil and Different Food Samples and Its Characterization Based on Fermentation. *Nepal Journal of Biotechnology*, 3 (1):29–34
101. Torres EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Philippi ST, Minazii-Rodrigues RS (2000) Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Food Science and Technology* 20:145-150
102. Türker M (2015) Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. *Advances in Science and Industrial Productions of Baker's Yeas*, 1-27
103. Turland NJ, Wiersema JH, Barrie FR, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Kusber W-H, Li D-Z, Marhold K, May TW, McNeill J, Munro AM, Prado J, Price MJ, Smith G, International Association for Plant Taxonomy. (2018) International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) : adopted by the nineteenth International Botanical Congress, Shenzhen, China, July, 2017. *Regnum vegetabile*, vol volume 159. Koeltz Botanical Books, Glashütten, Germany
104. Uredba (ES) št. 258/97 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 27. januarja 1997 v zvezi z novimi živili in novimi živilskimi sestavinami. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:31997R0258&from=SL>

105. Vallone L, Giardini A, Soncini G (2014) Secondary Metabolites from. *Ital J Food Saf* 3 (3):2118. doi:10.4081/ijfs.2014.2118
106. Watkinson CS, Boddy L, Money PN (2016) *The Fungi* (Third Edit). Sara Tenney.
107. White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White TJ (eds), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego: 315–322.
108. Wiebe MG (2002) Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Appl Microbiol Biotechnol* 58 (4):421-427. doi:10.1007/s00253-002-0931-x
109. Yamada EA, Alvim ID, Santucci MCC, Sgarbieri VC (2003) Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. *Revista de Nutrição* 16:423-432
110. Yoder WT, Christianson LM (1998) Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. Taxonomic status of the edible "Quorn" fungus reevaluated. *Fungal Genet Biol* 23 (1):68-80. doi:10.1006/fgbi.1997.1027
111. Zaid A, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1999) Glossary of biotechnology and genetic engineering. *FAO research and technology paper*,, vol 7. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
112. Zalar P, Gunde-Cimerman N (2002) Taksonomija in identifikacija gliv. Študentska založba, recenzenti: Cimerman A, Regvar M, Mahne I