

# Plijesni iz roda *Aspergillus* i *Penicillium* kao mogući producenti aflatoksina B1 i okratoksina A

---

**Numanović, Edina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:100528>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Edina Numanović**  
**7410/BT**

**PLIJESNI IZ RODA *Aspergillus* I *Penicillium* KAO  
MOGUĆI PRODUCENTI AFLATOKSINA B<sub>1</sub> I  
OKRATOKSINA A**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Mikrobiologija**

**Mentor: Prof. dr. sc. Ksenija Markov**

**Zagreb, 2019.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za Biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Markov i uz pomoć mag.ing.preh.ing. Željka Jakopovića.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Plijesni iz roda *Aspergillus* i *Penicillium* kao mogući producenti aflatoksina B<sub>1</sub> i okratoksina A**

***Edina Numanović, 0058210497***

**SAŽETAK:** Pojedine vrste plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* od izrazite su važnosti u biotehnologiji i prehrambenoj industriji. Osim pozitivnih učinaka, karakteriziraju ih i oni štetni poput tvorbe toksičnih spojeva. Toksikotvorne plijesni tijekom rasta, proizvode sekundarne toksične produkte metabolizma, mikotoksine. S obzirom da su neki od njih karcinogeni, poput aflatoksina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) i okratoksina A (OTA), njihova prisutnost u prehrambenim proizvodima predstavlja opasnost za zdravlje ljudi. U ovom radu cilj je bio provjeriti imaju li kulture plijesni *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium nalgiovense* i *Penicillium* sp. sposobnost sinteze AFB<sub>1</sub> odnosno OTA. Tankoslojna kromatografija (TLC) je metoda pomoću koje se istraživala prisutnost mikotoksina u uzorcima micelija odabranih plijesni budući da se radi o brznoj i jeftinoj metodi, koja se rutinski koristi za kvalitativnu analizu mikotoksina. Prema rezultatima, dokazana je prisutnost AFB<sub>1</sub> u uzorku plijesni *Aspergillus parasiticus* te prisutnost OTA u uzorcima *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium* sp. nakon 28 dana uzgoja na temperaturi od 28 °C.

**Ključne riječi:** toksikotvorne plijesni, mikotoksini, aflatoksin B<sub>1</sub>, okratoksin A, tankoslojna kromatografija

**Rad sadrži:** 26 stranica, 12 slika, 4 tablice, 32 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u :** Knjižnica Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Ksenija Markov

**Pomoć pri izradi:** mag.ing.preh.ing. Željko Jakopović

**Datum obrane:** 9. rujan, 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

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

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Moulds from *Aspergillus* and *Penicillium* genera as possible producers of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A**

***Edina Numanović, 0058210497***

**Abstract:** Some moulds from *Aspergillus* and *Penicillium* genera are important in biotechnology and food industry. Besides the positive effects, they are also characterized as harmful due to their ability to produce toxic compounds. Toxigenic fungi during their growth, produce secondary metabolites, mycotoxins. Considering some of them are cancerogenic, like aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and ochratoxin A (OTA), their presence on food products presents danger for human health. Purpose of this paper was to determine the ability of mould cultures, isolated from cured meat, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium nalgiovense* and *Penicillium* sp. to synthesize AFB<sub>1</sub> and OTA. The method used for determination of mycotoxin presence was thin layer chromatography, fast and inexpensive method, that can be used routinely for qualitative analysis of mycotoxins. According to the results, the presence of AFB<sub>1</sub> was detected in culture of *Aspergillus parasiticus* while presence of OTA was detected in two cultures, *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium* sp., after 28 days of cultivation at a temperature of 28°C.

**Key words:** toxigenic moulds, mycotoxins, aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A, thin layer chromatography

**Thesis contains:** 26 pages, 12 figures, 4 tables, 32 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Full Professor, Ksenija Markov, PhD.

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

**Defence date:** September 9th, 2019.

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Plijesni .....	2
2.2. Toksikotvorne plijesni .....	3
2.2.1. Rod <i>Aspergillus</i> .....	3
2.2.2. Rod <i>Penicillium</i> .....	4
2.3. Mikotoksini .....	5
2.3.1. Aflatoksin B <sub>1</sub> .....	7
2.3.2. Okratoksin A .....	8
2.4. Tankoslojna kromatografija (TLC) .....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. Materijali .....	11
3.1.1. Mikroorganizmi .....	11
3.1.3. Kemikalije .....	11
3.1.4. Mikotoksini .....	12
3.1.5. Pribor i aparatura .....	12
3.2. Metode rada .....	12
3.2.1. Priprema kultura plijesni .....	12
3.2.2. Kvalitativno određivanje sintetiziranih mikotoksina metodom tankoslojne kromatografije (TLC) .....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	16
4.1. Rezultati .....	16
4.1.1. Praćenje rasta plijesni na čvrstim hranjivim podlogama .....	16
4.1.2. Određivanje sintetiziranih mikotoksina TLC metodom .....	16
4.2. Rasprava .....	20
4.2.1. Kvalitativno određivanje sintetiziranih mikotoksina metodom tankoslojne kromatografije .....	20
5. ZAKLJUČCI .....	23
6. POPIS LITERATURE .....	24

# 1. UVOD

Plijesni su vrlo česti kontaminanti krmnih smjesa i hrane te pritom sintetiziraju sekundarne metabolite – mikotoksine, koji zbog svoje toksičnosti narušavaju zdravlje ljudi i životinja. Mikotoksine sintetiziraju toksikotvorne vrste plijesni, a pojedine vrste mogu sintetizirati više različitih mikotoksina. Prema procjeni FAO-a, 25% hrane proizvedene na svijetu, uglavnom biljnog podrijetla, kontaminirano je mikotoksinima (HAH, 2012). Stoga je opravdana zabrinutost zbog tzv. „carry over“ efekta jer mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka kroz meso, jaja, mlijeko i druge prehrambene proizvode (Markov i sur., 2013; Giovati i sur., 2015; Pleadin i sur., 2015).

Europska unija (EU), a samim time i Republika Hrvatska, ima najstrože propise koji definiraju najvišu dozvoljenu količinu (NDK) mikotoksina u različitim vrstama hrane i hrane za životinje.

Najznačajniji mikotoksini s javnozdravstvenog aspekta su aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) i okratoksin A (OTA). AFB<sub>1</sub> je, zbog snažnog karcinogenog djelovanja na jetru sisavaca svrstan u skupinu 1 kao ljudski karcinogen (IARC, 2002), dok je OTA svrstan u skupinu 2B, kao mogući ljudski karcinogen (IARC, 1993). Plijesni mogu biti prisutne u svim fazama proizvodnje hrane, a samim time moguća je i prisutnost mikotoksina. Stoga je važno identificirati toksikotvorne plijesni, ali i što točnije definirati parametre sinteze mikotoksina.

Povećana konzumacija hrane dovodi do potrebe za standardizacijom kvalitete i ispravnosti proizvoda, a glavni analitički postupci koji se koriste za određivanje mikotoksina uključuju orijentacijske (screening) i potvrdne metode. Za određivanje mikotoksina najčešće se koriste kromatografske metode kao potvrdne metode. Od kromatografskih metoda tankoslojna kromatografija (TLC) je kvalitativna metoda kojom se utvrđuje prisutnost mikotoksina. Tankoslojna kromatografija je jednostavna i jeftina tehnika koja se primjenjuje za brzo određivanje sastojaka smjese nekog prirodnog materijala. Istovremeno se može analizirati nekoliko uzoraka, mogu se koristiti različiti eluensi (mobilna faza), ovisno o topljivosti mikotoksina, a točnost i osjetljivost su na visokoj razini.

Cilj ovog rada bio je istražiti imaju li ispitivane vrste plijesni sposobnost sinteze mikotoksina aflatoksina B<sub>1</sub> i okratoksina A u definiranim laboratorijskim uvjetima pomoću tankoslojne kromatografije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Plijesni

Plijesni, uz kvasce i mesnate gljive pripadaju posebnoj skupini organizama, gljivama (carstvo *Fungi*). Plijesni su eukariotski, nefotosintetski organizmi čija je stanica obavijena staničnom stijenkom, u pravilu sastavljenom od polisaharida hitina. Plijesni sudjeluju u razgradnji organskih tvari u okolišu, a mnoge imaju važne komercijalne uloge, primjerice upotreba kvasca u pekarstvu, fermentacijskim procesima poput proizvodnje piva i vina, ali i upotreba određenih sojeva plijesni za proizvodnju antibiotika i drugih metabolita.

Paučinaste prevlake na kruhu, voću, pekmezu, vlaga na zidovima, to su zapravo plijesni, tipični predstavnici carstva Gljiva. Plijesni su mikroskopske gljive koje dolaze u obliku velikih nakupina razgranatih cjevastih stanica, hifa (slika 1). Hife rastu kao isprepletana masa i čine micelij zbog čega makroskopske kolonije plijesni imaju pahuljast ili paučinast izgled (Duraković i Redžepović, 2002). Nalaze se u prirodi, ali se mogu koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.



**Slika 1.** Mikroskopska slika plijesni iz roda *Aspergillus* s hifama (vlastita fotografija)



## 2.2. Toksikotvorne plijesni

Neke plijesni uzrokuju infektivne bolesti u ljudi, druge mogu razgrađivati rezerve hrane, a neke sintetiziraju snažne toksine koji mogu dovesti do fatalnih završetaka nakon unošenja u organizam sisavaca. Većina plijesni opasnih za zdravlje ljudi podrijetlom je iz skladišta, iako su i neki biološki aktivni produkti metabolizma plijesni s prirodnih staništa pokazali toksični učinak na zdravlje ljudi i životinja (Duraković i Redžepović, 2002).

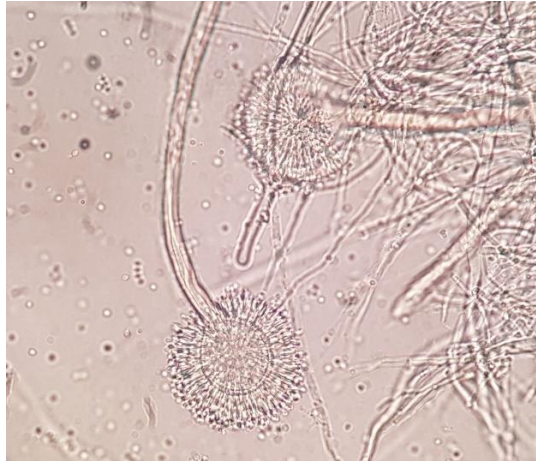
Toksikotvorne plijesni različitih rodova (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*) koje prirodno proizvode sekundarne metabolite – mikotoksine, kao obrambeni mehanizam, mogu rasti na različitim usjevima i namirnicama uključujući žitarice, orašaste plodove, začine, suho voće, jabučni sok, kavu, a posebno im odgovaraju topli i vlažni uvjeti (Oancea i Stoia, 2008). Neke plijesni imaju sposobnost sinteze više od jednog mikotoksina, dok su neki mikotoksini proizvodi više različitih vrsta plijesni (Duraković, 1991).

### 2.2.1. Rod *Aspergillus*

Plijesni iz roda *Aspergillus* prvi put je opisao 1729. godine biolog Pier Antonio Micheli. Promatrajući ih pod mikroskopom uočio je oblik aspergillum (liturgijskog predmeta za škropljenje svete vode) pa je po tome i dobiven naziv (Baker i Bennett, 2010).

Plijesni roda *Aspergillus* tvore okrugle ili ovalne, kompaktne ili blago rastresite kolonije, čije boje variraju od žute, zelene, smeđe do crne, ovisno o boji sporangija, tj. konidija. Vrste ovog roda mogu rasti pri različitim vremenskim uvjetima, neke su otporne na visoke temperature te visoke koncentracije soli i šećera.

*Aspergillus* je vrlo raširen rod plijesni za čije se vrste smatra da su jedni od najvećih mikrobnih kontaminanata. Može ih se primijetiti na pokvarenom voću (crno truljenje bresaka, limuna, naranča i smokva), kontaminanti su na šunkama i slaninama te uzrokuju kvarenje ulja, poput palminog, kikirikijevog i kukuruznog. Neke vrste tog roda, posebice *A. flavus* i *A. parasiticus* tijekom rasta na ovim namirnicama sintetiziraju opasne mikotoksine, aflatoksine, a ostale vrste kao npr. *A. ochraceus* (slika 2) sintetiziraju okratoksin A (Duraković i Redžepović, 2002).



**Slika 2.** Mikroskopska slika plijesni *Aspergillus ochraceus* (vlastita fotografija)

### 2.2.2. Rod *Penicillium*

*Penicillium* je možda jedan od najpoznatijih i najšire rasprostranjenih rodova plijesni, još od otkrića antibiotika penicilina 1929. godine. Ime roda *Penicillium* potječe od latinskog korijena penicillum, što znači "slikarski kist", a odnosi se na lance konidija koje nalikuju na metlu (slika 3). Micelij se obično sastoji od vrlo razgranate mreže s više jezgri i pregrada, obično bezbojnih hifa.



**Slika 3.** Mikroskopska slika plijesni iz roda *Penicillium* (vlastita fotografija)

Nekoliko vrsta iz roda *Penicillium* igraju središnju ulogu u proizvodnji sira i raznih mesnih prerađevina (zbog poboljšanja okusa i sprječavanja rasta drugih plijesni i bakterija).

Koriste se i u biotehnološkoj proizvodnji enzima i drugih makromolekula kao što su limunska, glukonska, i vinska kiselina te nekoliko pektinaza (lipaza, amilaza, celulaza i proteaza). Neke vrste roda *Penicillium* pokazuju potencijalnu uporabu u bioobnovi zbog njihove sposobnosti da razgrade različite ksenobiotike (Cao i sur., 2012).

Raspon vrsta mikotoksina koje sintetiziraju plijesni iz roda *Penicillium* je širi nego u ostalih, a molekularni sastav je izvanredno drugačiji (Duraković i Duraković, 2003). Osim što je rod *Penicillium* od velikog značaja u prirodnom okolišu, u proizvodnji hrane i lijekova, vrste ovog roda su i najvažnije toksikotvorne vrste koje su odgovorne za kvarenje namirnica, odnosno sintezu mikotoksina. Neke od vrsta plijesni koje sintetiziraju okratoksin A su *Penicillium viridicatum*, *P. cyclopim*, *P. commune*, *P. palitans*, *P. purpurescens*, *P. variable*, *P. verrucosum*, *P. chrysogenum* (Gorst-Allman i Steyn, 1979; Pleadin i sur., 2018).

### 2.3. Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni, odnosno ne sudjeluju u njihovom primarnom metabolizmu, rastu i razvoju, a induciraju akutne i kronične toksične učinke kod ljudi i životinja (IARC, 1993; 2002). Riječ je o kemijskim spojevima različite strukture, različitoga biološkoga učinka te u pravilu bez boje i okusa. Zbog odsutnosti senzorskog upozorenja prilikom konzumacije i visoke toksičnosti u malim količinama, mikotoksini su izrazito opasni (Markov i sur., 2010; Markov i sur., 2013). Visoka akutna toksičnost mikotoksina, često je povezana uz maligne bolesti (karcinogenost, mutagenost, imunotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, fenotoksičnost, dermatotoksičnost, hematotoksičnost, teratogenost) (Vasić-Rački i sur., 2010, Pleadin i sur. 2018). Prema procjeni FAO-a, 25 % hrane koja se proizvodi u svijetu, kontaminirano je mikotoksinima (HAH, 2012).

Prve informacije o štetnom učinku pljesnive hrane datiraju još iz Kine od prije 5000 godina. Otkrićem aflatoksina 1963. godine nakon pojave „X-bolesti“ purana u Engleskoj i znatnim zanimanjem za mikotoksine, došlo se do spoznaje da se radi o novom, značajnom znanstvenom području (Vasić-Rački i sur., 2010).

Mikotoksini su stabilni i u pravilu otporni na povišenu temperaturu. Njihova biosinteza ovisi o vrsti toksikotvorne plijesni, klimatskim i okolišnim uvjetima, fizikalno-kemijskim čimbenicima (temperaturi od -5 do 60°C, sadržaju vode u namirnici od 13% i više, o koncentraciji plinova u atmosferi te sastavu namirnice) (HAH, 2013.). Primjeri mikotoksina od najvećeg agro-ekonomskog i javnozdravstvenog utjecaja uključuju: aflatoksine (AFB<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>),

okratoksin A (OTA), zearalenon (ZEA), fumonizine (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>), trihotecene (T-2 toksin, deoksinivalenol - DON), patulin (PAT) i ergot alkaloide (Hussein i Brassel, 2001, Pleadin i sur. 2018). Poznato je da dvadesetak različitih patogenih plijesni ima sposobnost proizvodnje dva ili više različitih mikotoksina. Neki od istraženih mikotoksina i plijesni koje ih proizvode navedeni su u tablici 1. Istovremeno mogu djelovati na različite načine i na više ciljnih mjesta u organizmu, što ovisi o samoj tvari, dozi i vremenu izloženosti (HAH, 2012). Otrovanja mogu biti akutna (posljedica jednokratnog uzimanja namirnica s visokom koncentracijom mikotoksina) i/ili kronična nastala konzumiranjem namirnica s niskim koncentracijama mikotoksina tijekom dužeg vremenskog perioda (s mogućim letalnim završetkom).

**Tablica 1.** Značajni mikotoksini i plijesni koje ih sintetiziraju (Gorst-Allman i Steyn, 1979; Pleadin i sur., 2018)

<b>Mikotoksini</b>	<b>Vrste plijesni</b>
<b>Aflatoksin B<sub>1</sub></b>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
<b>Okratoksin A</b>	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. chrysogenum</i>
<b>T-2-toksin</b>	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. lateririum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. rigidiusculum</i> , <i>Trichoderma viride</i>
<b>Zearalenon</b>	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. nivale</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Gibberella zea</i>
<b>Patulin</b>	<i>Penicillium patulum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. lapidosum</i> , <i>P. melinii</i> , <i>P. rugulosum</i> , <i>P. equinum</i> , <i>P. novaezeelandiae</i> , <i>P. divergens</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. Ieucopus</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Aspergillus clavarius</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>

Najčešći izvori mikotoksina u hrani su: žitarice, brašno, kruh, mahunarke, riža, mlijeko i mliječni proizvodi, meso i suhomesnati proizvodi, masline i maslinovo ulje, kava, suho voće, vino, pivo, sokovi, začini, čajevi (HAH, 2013; Pleadin i sur., 2014).

Aflatoksin B<sub>1</sub> i okratoksin A su karcinogeni te je zbog toga potrebno postaviti prihvatljive granice njihovog sadržaja u hrani. U usporedbi s drugim dijelovima svijeta, Europska unija (EU) ima najopsežnije i najstrože razrađene propise koji definiraju NDK (najviša dozvoljena količina) za mikotoksine u različitim vrstama hrane i hrane za životinje, a Republika Hrvatska je također donijela propise kojima se regulira prisutnost mikotoksina u hrani i hrani za životinje, uključujući sve stavke iz trenutno važećih propisa na području EU. Hrvatska je među državama koje imaju najnižu NDK za mikotoksine. Najviše dopuštene količine mikotoksina (µg/kg jestivog dijela namirnice) u hrani i hrani za životinje u RH propisane su Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/12) te Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/10, NN111/10, NN 124/12).

U cilju sprječavanja moguće kontaminacije hrane toksikotvornim plijesnima i mikotoksinima potrebno je poznavati preventivne mjere za sprečavanje kontaminacije: fizikalne, kemijske i biološke metode, mjere uzgoja, žetve, pohrane krme i žitarica te mjere prilikom proizvodnog procesa, transporta i prilikom uskladištenja (HAH, 2013).

Najčešće metode detekcije mikotoksina su konvencionalne analitičke metode visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC), tankoslojne kromatografije (TLC) i plinske kromatografije (GC) te brza metoda enzimskog imunološkog testa (ELISA) (Zheng i sur., 2006).

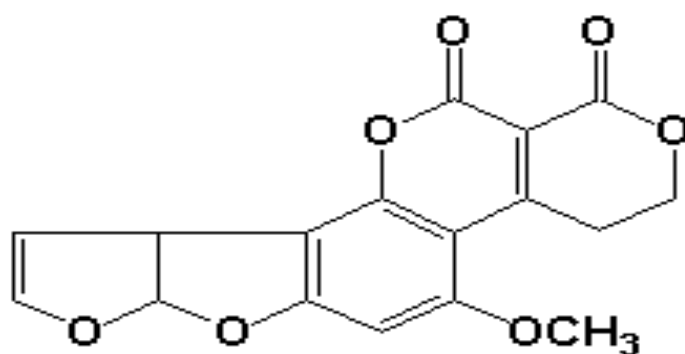
### **2.3.1. Aflatoksin B<sub>1</sub>**

Aflatoksini (AF) su najpoznatiji i najbolje istraženi mikotoksini koje sintetizira ograničen broj sojeva plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Biosinteza AF plijesnima iz roda *Aspergillus* (*A. flavus* i *A. parasiticus*) ovisi o temperaturnim uvjetima rasta plijesni, a mogu ih sintetizirati tijekom žetve, skladištenja i prerade žitarica, pri temperaturama između 28 i 33 °C i vlažnosti iznad 15%. Aflatoksini su toksični, karcinogeni, imunosupresivni metaboliti, smjese kemijski srodnih spojeva, derivata difurokumarina

(Bennet i Klich, 2003), među kojima su najvažniji predstavnici aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> (Oancea i Stoia, 2008). Oznake B i G obilježavaju boju kojom pri određenoj valnoj duljini UV svjetla fluoresciraju (intenzitet fluorescencije: B - eng. *blue*, plavo; G - eng. *green*, zeleno), a M (eng. *milk*) prema supstratu iz kojeg su izolirani (HAH, 2013).

Najpoznatiji i najtoksičniji aflatoksin je aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) (slika 4), koji se smatra jednim od najpoznatijih karcinogenih spojeva, prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer – IARC) te je time uvršten u skupinu 1 ljudskih karcinogena (IARC 2012). Kod dugotrajne izloženosti mogu prouzročiti opasnost od malignih tumora, prvenstveno jetre. Njegova akutna toksičnost za pojedine vrste životinja nije ujednačena već se razlikuje se od životinje do životinje te stoga LD<sub>50</sub> (mg/kg) variraju od 0,5 mg/kg za patke do 10 mg/kg za miševe (Oancea i Stoia, 2008). AFB<sub>1</sub> inhibira sintezu DNA, polimerazu RNA ovisnu o DNA, sintezu glasničke RNA i sintezu proteina (HAH, 2012). Nalazi ga se u poljoprivrednim proizvodima, žitaricama, uljaricama, kavi, riži, kikirikiju, mlijeku, sušenom voću i dr.

Primjenom fizičkih, kemijskih i bioloških postupaka poput sušenja žitarica, kemijskim antifungalnim agensima (propionska, mravlja, octena kiselina), zračenjem, dehidriranim amonijakom pri povišenoj temperaturi i tlaku, jakim kiselinama i lužinama, oksidirajućim agensima (ozon i vodikov peroksid), može se smanjiti količina aflatoksina u hrani (Vasić-Rački i sur., 2010).



**Slika 4.** Kemijska struktura aflatoksina B<sub>1</sub> (Oancea i Stoia, 2008)

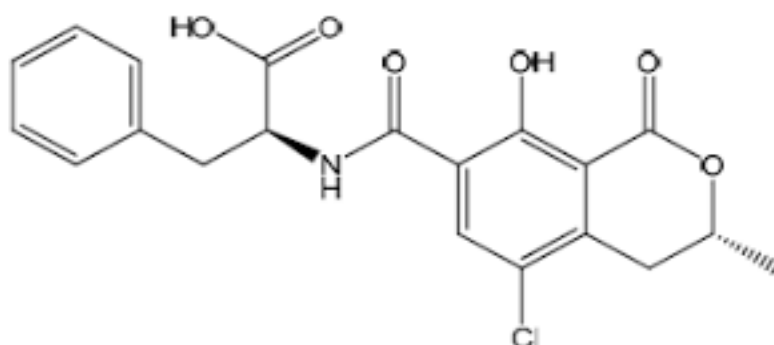
### 2.3.2. Okratoksin A

Okratoksinu su skupina bliskih derivata dihidroizokumarina povezanih sa L-β-fenilalaninom koju čine: OTA, OTB, OTC, OTα (Vasić-Rački i sur., 2010). Najtoksičniji

predstavnik ove skupine je okratoksin A (OTA) (slika 5), koji u svojoj strukturi sadrži i atom klora, što ga čini puno toksičnijim od OTB. Otkriven je 1965. godine kao metabolit plijesni *Aspergillus ochraceus* tijekom „screeninga“ velikog broja fungalnih metabolita, specijalno za identifikaciju novih mikotoksina (Bennet i Klich, 2003).

OTA je bezbojan, kristaliničan spoj, koji pod UV svjetlom pokazuje plavu fluorescenciju. Sekundarni je produkt metabolizma plijesni *Penicillium verrucosum* (sinteza čak od 0-31°C, optimumom pri 20°C) i *Aspergillus ochraceus* (sinteza pri 12-37°C, optimum pri 31°C) (Sweeney i Dobson, 1998). Do njegove biosinteze može doći tijekom rasta navedenih toksikotvornih plijesni na žitaricama (primarno na onim koje prije uskladištenja nisu prikladno osušene - ječam, pšenica, kukuruz, zob), ali i u nekim drugim namirnicama biljnog i animalnog podrijetla (kruh, pivo, svinjsko meso, sirova i pržena kava, sušeno voće, kakao, crno vino, čaj, začini). OTA se na više načina uključuje u staničnu fiziologiju, primjerice kroz inhibiciju enzima koji sudjeluju u metabolizmu fenilalanina i sintezu fenilalanin-tRNA kompleksa. Također inhibira sintezu mitohondrijskog ATP i stimulira lipidnu peroksidaciju, uzrokuje oksidativni stres i malim koncentracijama stimulira apoptozu u epitelnim stanicama bubrega u štakora. Kao posljedica duže izloženosti, OTA može izazvati akutno zatajenje bubrega u pokusnim i domaćim životinjama zbog oštećenja funkcije proksimalnih tubula, što uzrokuje smanjenje ili gubitak funkcije bubrega (Vasić-Rački i sur., 2010).

Zbog dokazanog toksičkog i karcinogenog učinka za životinje, a nedovoljnih spoznaja o utjecaju na ljude, OTA je prema IARC-u svrstan u skupinu 2B kao potencijalni karcinogen. Prženje, zagrijavanje na višim temperaturama, obrada amonijakom s kalcijevim hidroksidom (pri 96 °C) utječu na smanjenje koncentracije okratoksina u hrani (Vasić-Rački i sur., 2010).



**Slika 5.** Kemijska struktura okratoksina A (Oancea i Stoia, 2008)

## 2.4. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Tankoslojna kromatografija (TLC) je jednostavna i relativno jeftina tehnika koja se počela razvijati 1960-ih godina. Primjenjuje se kao brzi postupak za određivanje sastojaka smjesa izoliranog prirodnog materijala ili produkta neke reakcije. Odvajanje se temelji na adsorpcijskim ili razdjelnim procesima, a najčešće je korištena varijanta adsorpcijske kromatografije na tankom sloju adsorbensa (stacionarna faza) nanesenom na staklenu ploču ili foliju. Kao adsorbensi pretežno se upotrebljavaju silikagel (silicijska kiselina) ili aluminijev oksid. Najjednostavnija izvedba je tzv. uzlazna kromatografija (Rapić, 2008).

Nakon nanošenja uzorka na startnu liniju udaljenu 1,5-2 cm od ruba pločice i sušenja, pločica se stavlja u kadu u kojoj je pogodan eluens (mobilna faza - MF). Dizanje MF uz pločicu i eluiranje sastojaka smjese odvija se pomoću kapilarnih sila te se ta faza naziva razvijanje kromatograma. Osnovni kriterij za identifikaciju pojedinog spoja jest njegova pokretljivost na tankom sloju, što se izražava pomoću  $R_f$ -vrijednosti (retencijski faktor, eng. *Retention factor*), omjer udaljenosti koju je od startne linije prošla mrlja (x) i udaljenost do koje je stigla fronta otapala (y) (Rapić, 2008). Retencijskim faktorom se određuje uspješnost razdvajanja, a vrijednosti su uvijek manje od 1.

TLC se koristi češće od ostalih kromatografskih metoda (HPLC, GC, LC) jer ne zahtjeva skupu instrumentaciju te je zbog toga pristupačnija, a rezultati analize se dobivaju relativno brzo. Osim navedenog, kod tankoslojne kromatografije moguće je izbjeći dugotrajnu i zahtjevnju pripremu uzorka koja uključuje destruktivne mehaničke metode.

Pogodna je za analizu širokog spektra mikotoksina zbog mogućnosti analize sirovog ekstrakta, istovremene analize nekoliko uzoraka na istoj ploči, korištenje različitih eluensa, odgovarajuće osjetljivosti te pruža kvalitativnu analizu sa zadovoljavajućom preciznošću i točnošću (Lin i sur., 1998). Kao jednostavnu screening metodu za toksikotvorne plijesni, razvili su je Filtenborg i Frisvad (1980), Filtenborg i sur. (1983) i Thrane (1986). Zbog niske cijene i jednostavne izvedbe, TLC se rutinski koristi za dokazivanje prisutnosti mikotoksina (Braicu i sur., 2008).

Tankoslojna kromatografija je inicijalno korištena samo za kvalitativnu analizu, ali kombinacijom s densimetrijom, masenom spektrometrijom može se primjenjivati i za kvantitativnu metodu (Braicu i sur., 2003).



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Mikroorganizmi

Kao radni mikroorganizmi za dokazivanje prisutnosti mikotoksina aflatoksina B<sub>1</sub> i okratoksina A upotrijebljenesu tri vrste plijesni iz roda *Aspergillus* (*A. parasiticus*, *A. ochraceus* i *Aspergillus* sp.) te dvije vrste iz roda *Penicillium* (*P. nalgiovense* i *Penicillium* sp.). Upotrijebljene kulture pohranjene su u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Kulture plijesni čuvane su na sladnom agaru pri temperaturi od 4 °C do upotrebe.

#### 3.1.2. Hranjive podloge

**Tablica 2.** Sastojci za pripremu hranjivih podloga

HRANJIVE PODLOGE	SASTOJCI	KOLIČINA
krumpirov glukozni agar (za sporulaciju plijesni)	vodeni ekstrakt krumpira	230 mL
	agar	20 g
	glukoza	20 g
	destilirana voda	do 1000 mL
sladni agar (za uzgoj plijesni)	sladni ekstrakt	30 gxL <sup>-1</sup>
	pepton iz sojina brašna	3 gxL <sup>-1</sup>
	agar	15 gxL <sup>-1</sup>
	destilirana voda	1000 mL

Sterilizacija podloge provedena je pri 121 °C kroz 15 minuta.

#### 3.1.3. Kemikalije

- kloroform "Kemika" - Zagreb
- aceton "Kemika" - Zagreb
- benzen "Kemika" – Zagreb
- ledena octena kiselina "Kemika" – Zagreb

### 3.1.4. Mikotoksini

Standardi mikotoksina:

- AFB<sub>1</sub> „Sigma“ - Chemical
- OTA „Sigma“ - Chemical

### 3.1.5. Pribor i aparatura

- Petrijeve zdjelice
- mikrobiološka ušica
- mikropipeta (automatska pipeta) od 10 µL (Justor 1100)
- Bunsenov plamenik
- termostat (Sutjeska, Beograd)
- staklene kadice za TLC
- ploče sa silikagelom za TLC (20x20 cm, debljine 0,25 mm) "Merck"
- UV-lampa „Camag“

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema kultura plijesni

Kulture plijesni *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium nalgiovense* i *Penicillium sp.* sa sladnog agara iz Zbirke mikroorganizama naciepljene su na krumpirov glukozni agar i inkubirane 7 dana pri temperaturi od 28 °C. Nakon inkubacije, dodatkom fiziološke otopine načinjene su suspenzije spora plijesni i po 10 µL je otpipetirano na sredinu sladnog agara u Petrijevoj zdjelici. Ploče sa naciepljenim kulturama inkubirane su pri temperaturi od 28 °C tijekom 28 dana. Za određivanje sinteze mikotoksina AFB<sub>1</sub> i OTA, postavljeno je ukupno 20 uzoraka, a uzorci su uzimani nakon 7, 14, 21 i 28 dana inkubacije.

### **3.2.2. Kvalitativno određivanje sintetiziranih mikotoksina metodom tankoslojne kromatografije (TLC)**

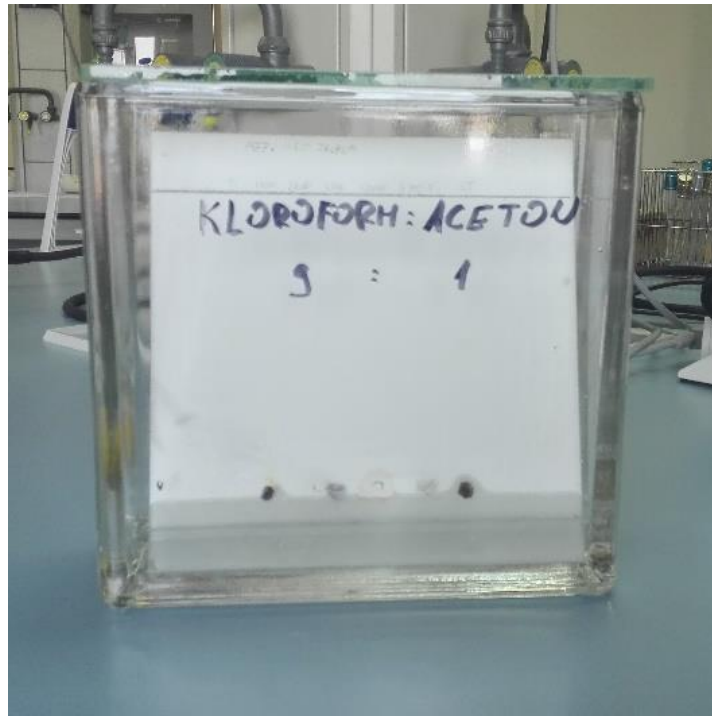
Metodom tankoslojne kromatografije kvalitativno je dokazana prisutnost AFB<sub>1</sub> i OTA u uzorcima micelija odabranih plijesni. Postupkom tankoslojne kromatografije provodi se separacija na pločama za tankoslojnu kromatografiju sa silikogelom G uz različite sustave otapala. Prisutnost mikotoksina utvrđuje se ozračivanjem ploča UV svjetlom i dokazuje se usporedbom s odgovarajućim standardima, što omogućuje određivanje ekstremno malih količina toksina u namirnicama, čak od 0,1 ng s pomoću fluorodenzitometra (Markov, 2005).

Ploča za tankoslojnu kromatografiju se pripremi na način da se označe mjesta na koja se nanese otopljeni standardi istraživanih mikotoksina i uzorci micelija.

Svakih 7 dana tijekom 28 dana uzimani su uzorci micelija poraslih plijesni tako što su iz sredine porasle kolonije plijesni izrezani uzorci u obliku diska i prenijeti pomoću bušača ( $\Phi=5$  mm) zajedno s agarom, na označena mjesta na ploči za TLC. Svi uzorci su okrenuti prema silikagelu stranom na kojoj je agar. Nakon što su standard i uzorci nanešeni na ploču, te nakon sušenja mrlja, ploča je stavljena u smjesu otapala na razvijanje kromatograma (slike 6 i 7).

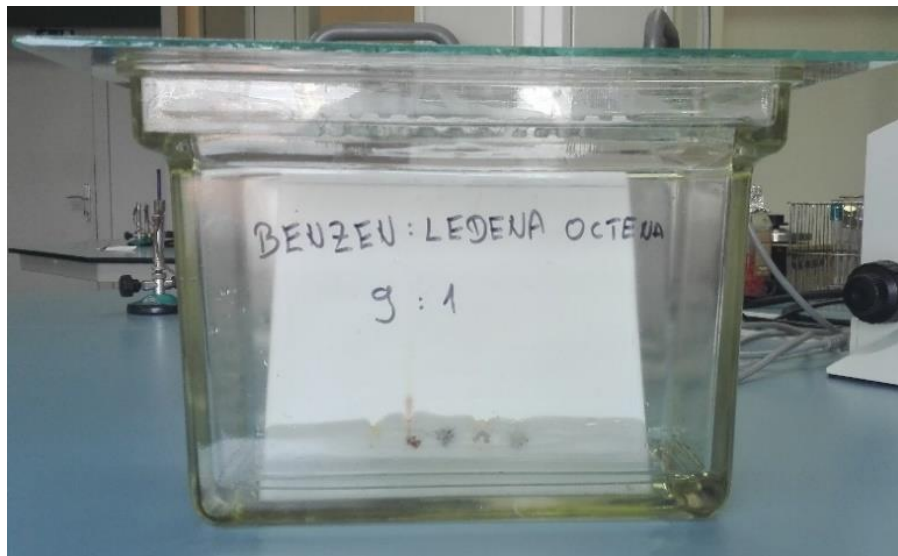
Prije razvijanja kromatograma kadice za kromatografiju su kod sobne temperature prethodno bile 12 sati zasićene otapalom.

Za određivanje prisutnosti AFB<sub>1</sub>, na silikagel ploču stavljeni su izrezani diskovi poraslih plijesni na sladnom agaru u Petrijevim zdjelicama i 10  $\mu$ L standarda AFB<sub>1</sub>. Pripremljena ploča za TLC uronjena je u staklenu lađicu sa 100 mL smjese otapala kloroform/aceton u omjeru 9:1 (slika 6).



**Slika 6.** Staklena kadica za provođenje tankoslojne kromatografije (AFB<sub>1</sub>) (vlastita fotografija)

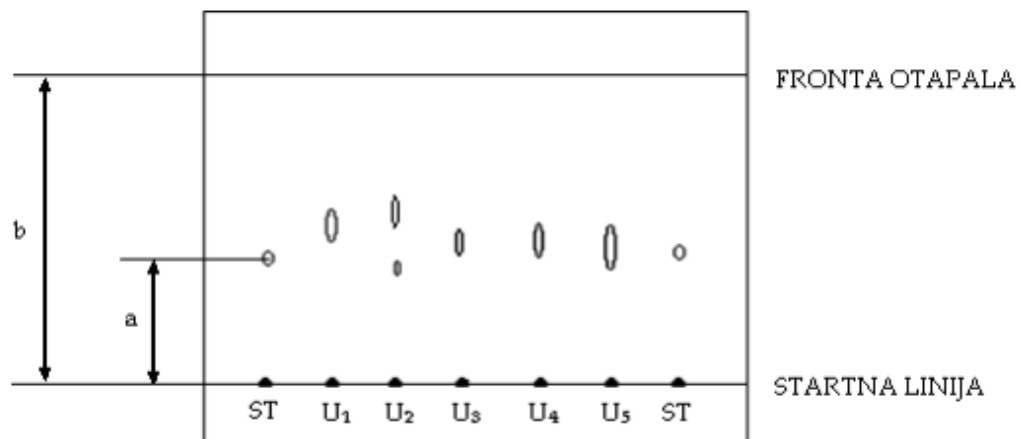
Za određivanje prisutnosti OTA, na silikagel ploču stavljeni su izrezani diskovi poraslih plijesni na sladnom agaru u Petrijevim zdjelicama i 10  $\mu$ L standarda OTA. Pripremljena ploča za TLC uronjena je u staklenu lađicu sa 100 mL smjese otapala benzen/ledena octena kiselina u omjeru 9:1 (slika 7)



**Slika 7.** Staklena kadica za provođenje tankoslojne kromatografije (OTA) (vlastita fotografija)

Fronta otapala u pokusima iznosila je između 13 i 14 cm (tablica 3). Kada je postignuta fronta mobilne faze ploče su izvađene i osušene u struji zraka. Razvijene ploče osvijetljene su UV lampom pri valnoj duljini od 365 nm. Identifikacija mikotoksina je provedena vizualnom usporedbom fluorescencije mrlja u kromatogramu uzorka i standarda mikotoksina. Kako bi se mogla dokazati prisutnost određenog mikotoksina u uzorku, mrlja uzorka mora biti u ravnini sa standardom. Na taj način provedena je kvalitativna detekcija AFB<sub>1</sub> odnosno OTA.

Osnovni kriterij za identifikaciju pojedinog spoja jest njegova pokretljivost na tankom sloju, što se izražava pomoću  $R_f$  vrijednosti koji predstavlja omjer udaljenosti koju je od startne linije prošla mrlja (a) i udaljenosti do koje je stigla fronta otapala (b) (slika 8). Nakon što se uzorci osuše i osvijetle pod UV lampom, izmjere se udaljenosti otapala i sintetiziranih mikotoksina (AFB<sub>1</sub>/OTA) od startne linije te se izračunaju njihove  $R_f$  vrijednosti. Očitane  $R_f$  vrijednosti bile su u području  $R_f$  vrijednosti standardnih otopina, tj. imale su istu fluorescenciju kao standardne otopine istraživanog toksina.



$$R_f = a/b < 1$$

**Slika 8.** Shematski prikaz tankoslojne kromatografije i određivanje  $R_f$  vrijednosti

ST – standard AFB<sub>1</sub>/OTA

U1-U5-uzorci potencijalnih toksikotvornih plijesni

OTAPALA – kloroform/aceton; benzen/ledena octena kiselina

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Rezultati**

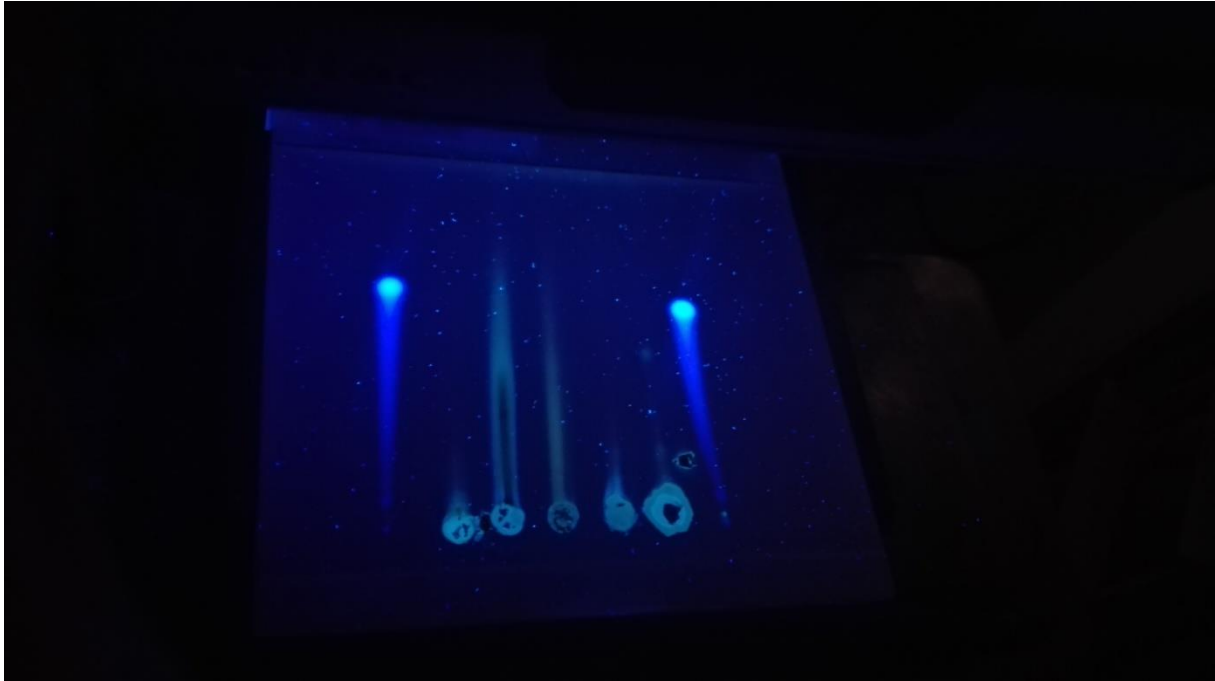
#### **4.1.1. Praćenje rasta plijesni na čvrstim hranjivim podlogama**

Kao mogući producenti mikotoksina AFB<sub>1</sub> i OTA U ovom radu, ispitivane su plijesni *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. i plemenita plijesan *Penicillium nalgiovense* koja se koristi kao starter kultura za fermentirane mesne proizvode. Kao podloga za praćenje rasta istraživanih plijesni i biosintezu AFB<sub>1</sub> i OTA upotrijebljen je sladni agar. Sve plijesni su rasle na temperaturi od 28 °C tijekom 28 dana. Porasle kolonije *A. parasiticus* bile su maslinasto-zelene, *A. ochraceus* žuto-smeđe, *Aspergillus* sp crne boje, a vrste *Penicillium nalgiovense* bijele i *Penicillium* sp. zelene boje.

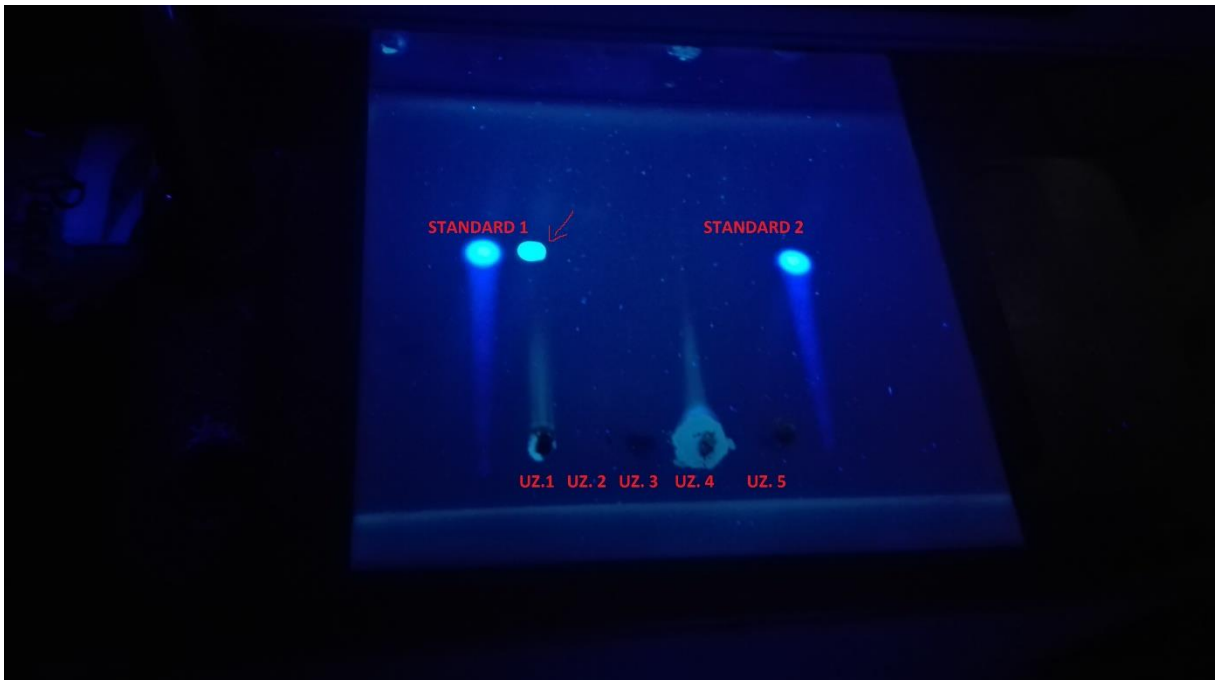
#### **4.1.2. Određivanje sintetiziranih mikotoksina TLC metodom**

Prisutnost sintetiziranih mikotoksina, AFB<sub>1</sub> i OTA, tijekom rasta odabranih plijesni na čvrstoj hranjivoj podlozi, određena je metodom tankoslojne kromatografije. TLC je provedena na pločama sa silikagelom F<sub>254</sub>, dimenzija 20 x 20 cm, debljine sloja 0,25 mm. Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 9-12 i u tablicama 2 i 3 te

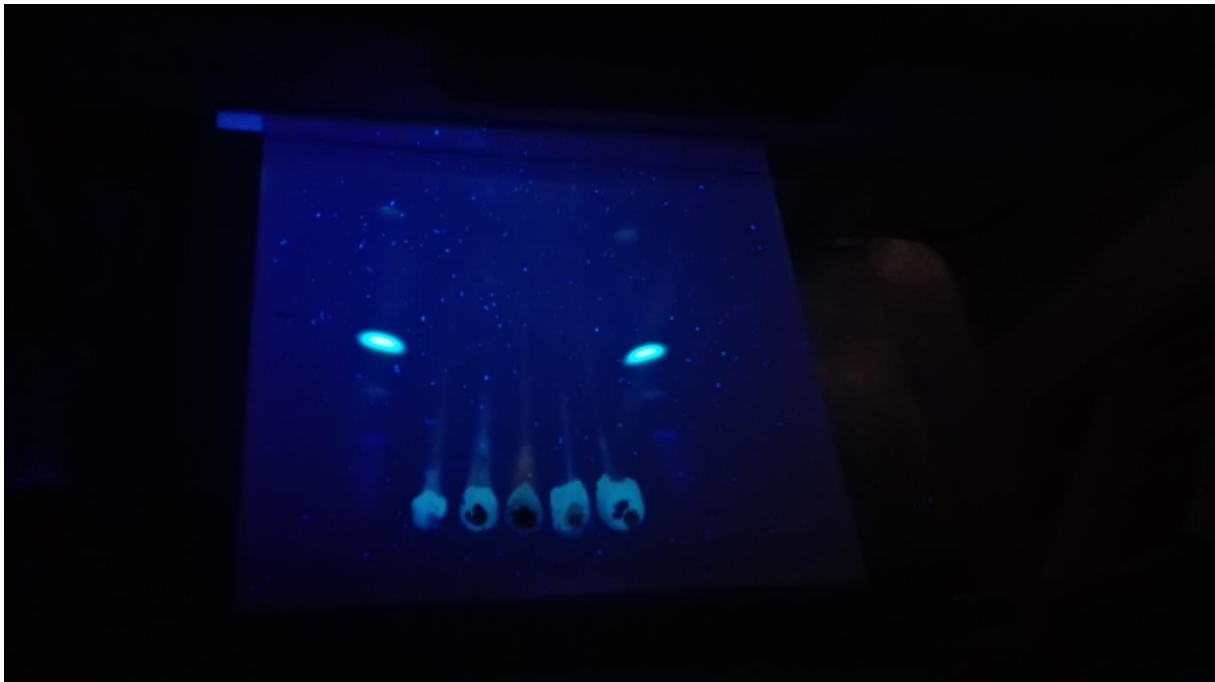
Na slikama 9-12 prikazane su ploče s razvijenim kromatogramima osvijetljenim UV-lampom pri valnoj duljini od 365 nm i vizualno je detektirana i utvrđena prisutnost mikotoksina u pojedinim uzorcima.



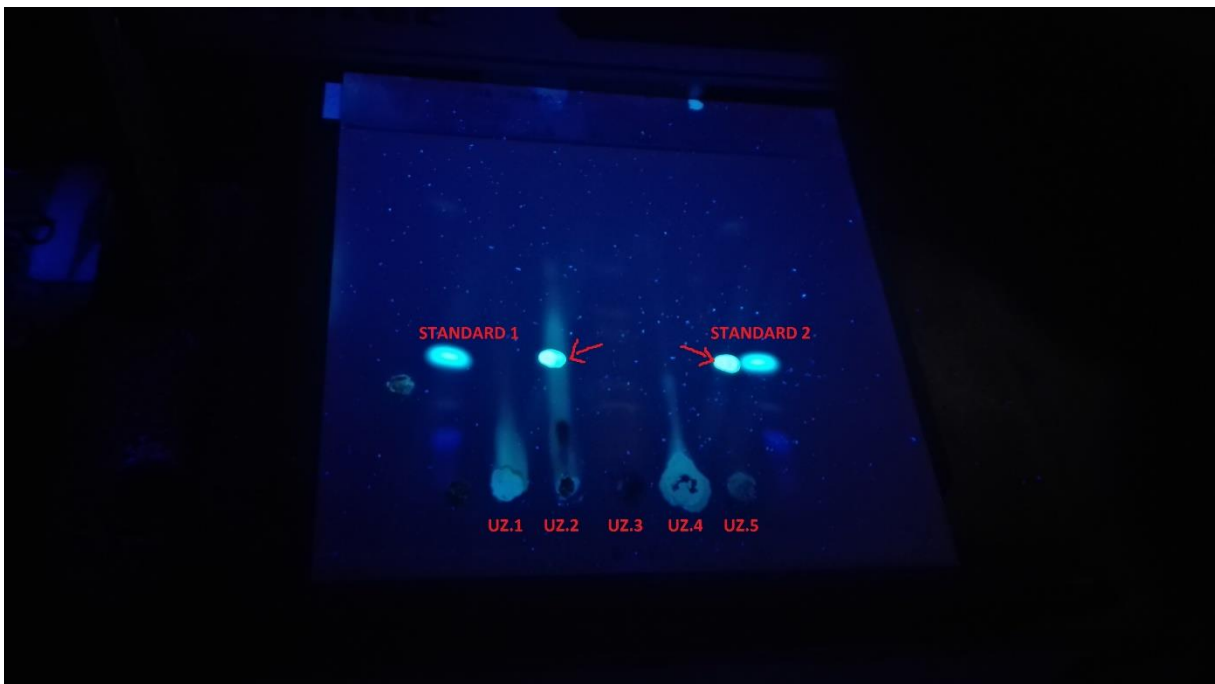
**Slika 9.** Razvijeni kromatogram na ploči za TLC ozračen UV svjetlom za određivanje AFB<sub>1</sub> nakon 21 dan inkubacije (vlastita fotografija)



**Slika 10.** Razvijeni kromatogram na ploči za TLC ozračen UV svjetlom za određivanje AFB<sub>1</sub> nakon 28 dana inkubacije (vlastita fotografija)



**Slika 11.** Razvijeni kromatogram na ploči za TLC ozračen UV svjetlom za određivanje OTA nakon 21 dan inkubacije (vlastita fotografija)



**Slika 12.** Razvijeni kromatogram na ploči za TLC ozračen UV svjetlom za određivanje OTA nakon 28 dana inkubacije (vlastita fotografija)



Sposobnosti sinteze mikotoksina, plijesni *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* i *Penicillium nalgiovense* prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.** Kvalitativno određivanje prisutnosti AFB<sub>1</sub> i OTA, dokazano TLC-om, tijekom 28 dana rasta odabranih sojeva plijesni na čvrstoj hranjivoj podlozi

<b>MIKOTOKSINI</b>	<b>VRIJEME (dani)</b>	<b><i>Aspergillus parasiticus</i> (uzorak 1)</b>	<b><i>Aspergillus ochraceus</i> (uzorak 2)</b>	<b><i>Aspergillus sp.</i> (uzorak 3)</b>	<b><i>Penicillium nalgiovense</i> (uzorak 4)</b>	<b><i>Penicillium sp.</i> (zeleni) (uzorak 5)</b>
<b>AFB<sub>1</sub></b>	7	nd	nd	nd	nd	nd
	14	nd	nd	nd	nd	nd
	21	nd	nd	nd	nd	nd
	28	+	nd	nd	nd	nd
<b>OTA</b>	7	nd	nd	nd	nd	nd
	14	nd	nd	nd	nd	nd
	21	nd	nd	nd	nd	nd
	28	nd	+	nd	nd	+

nd - nije dokazano prisutstvo AFB<sub>1</sub>/OTA

+ - dokazano je prisutstvo AFB<sub>1</sub>/OTA

Iz razvijenih kromatograma prikazanih na slikama 10 i 12 nakon mjerenja udaljenosti od startne linije (otapala i uzoraka) koje služe kao identifikacijski kriterij i karakteristične su za AFB<sub>1</sub>/OTA u određenim omjerima volumena korištenih otapala, izračunate su R<sub>F</sub>-vrijednosti, a rezultati dobivenih R<sub>F</sub>-vrijednosti prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** R<sub>F</sub>-vrijednosti za AFB<sub>1</sub>/OTA, određene TLC-om, kao identifikacijski kriterij

<b>Mikotoksini</b>	<b>y (cm)</b>	<b>x (cm)</b>	<b>R<sub>F</sub>-vrijednost</b>
<b>AFB<sub>1</sub></b>	13,5	6,2	0,5
<b>OTA</b>	14,3	4,7	0,3

y – udaljenost od startne linije koju je prošlo otapalo

x – udaljenost od startne linije koju je prošao AFB<sub>1</sub>/OTA

$$R_F = x/y$$

## 4.2. Rasprava

### 4.2.1. Kvalitativno određivanje sintetiziranih mikotoksina metodom tankoslojne kromatografije

Plijesni su sveprisutne kako na kopnu tako i u vodenom okolišu i svojim metabolizmom proizvode različite kemijske spojeve, među kojima su mikotoksini jedna od najvažnijih skupina sekundarnih metabolita plijesni.

Mnogobrojne namirnice kao što su sirevi, trajne kobasice i desertna vina dobivaju se fermentacijom pomoću odabranih sojeva plijesni, a njihova kvaliteta ovisi o primjeni plemenitih plijesni kao starter kultura. Međutim, plijesni mogu u promijenjenim uvjetima rasta sintetizirati mnoge sekundarne metabolite, pa tako i mikotoksine. To predstavlja za svaki fermentacijski proces potencijalnu opasnost, budući da prisustvo plijesni u namirnici ne znači nužno pojavnost mikotoksina, ali s druge strane odsutnost vidljivih plijesni u hrani ne isključuje pojavnost mikotoksina.

Budući da je prisutnost mikotoksina u hrani i hrani za životinje gotovo neizbježna i da mikotoksini pokazuju toksične učinke u ljudi i životinja, nužna je kontinuirana kontrola hrane i hrane za životinje, uz primjenu specifičnih i selektivnih analitičkih metoda (Pleadin i sur., 2018). U svrhu detekcije mikotoksina koriste se različite analitičke metode, koje se grupiraju na orijentacijske (screening) i potvrdne, koje se mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne. Kao prikladna orijentacijska (screening) metoda, pokazala se TLC kao jednostavna, brza i jeftina metoda, koja ima mogućnost simultanog određivanja više mikotoksina, a pokazala je i dobru osjetljivost za dokazivanje aflatoksina i okratoksina A.

Stoga je cilj ovoga završnog rada bio uz pomoć TLC dokazati da li odabrane plijesni (*A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Aspergillus* sp., *P. nalgiovensis* i *Penicillium* sp.), među kojima i starter kultura (*P. nalgiovensis*) koja se koristi u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda, u kontroliranim laboratorijskim uvjetima mogu sintetizirati aflatoksin B<sub>1</sub> i okratoksin A.

Kvalitativno određivanje sintetiziranog mikotoksina provedeno je promatranjem ploča pod UV-svjetlom i vizualnom usporedbom sa standardima (slike 9-12). Na pločama su vidljive fluorescentne mrlje standarda mikotoksina (AFB<sub>1</sub>/OTA) te je usporedbom intenziteta fluorescencije mrlja uzoraka koje se nalaze u ravnini sa fluorescencijama standarda

zaključeno da je u ispitivanim uzorcima prisutan mikotoksin. Također, za potvrdu prisutnosti izračunata je i pokretljivost spoja na ploči, odnosno  $R_f$ -vrijednost za oba mikotoksina.

Prema rezultatima razvijenih kromatograma micelija plijesni na silikagel pločama za TLC, u tablici 3 i na slikama 9 i 11, vidljivo je da nema prisutnosti ni AFB<sub>1</sub> ni OTA tijekom 21. dana uzgoja, tj. nijedna plijesan pri kontroliranim uvjetima inkubacije (28 °C) nije sintetizirala mikotoksine. Međutim, nakon 28 dana uzgoja, dokazana je prisutnost oba mikotoksina (slika 10 i slika 12; tablica 3).

Od svih pet odabranih kultura plijesni samo je kromatogram micelija plijesni *A. parasiticus* pokazao prisutnost AFB<sub>1</sub> nakon 28 dana uzgoja (tablica 3 i slika 10). Dobiveni rezultati su bili i očekivani budući da je *A. parasiticus* izraziti producent aflatoksina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>, a za rast i produkciju toksina mu pogoduju više temperature čak i do 42 °C, iako mu je optimum oko 32 °C (Duraković i Duraković, 2003). AFB<sub>1</sub> je bio vidljiv kao fluorescentna mrlja na kromatogramu u ravnini sa standardom AFB<sub>1</sub> nakon izlaganja ploča UV svjetlu (slika 10). Sukladno tome i  $R_f$ -vrijednost ispitivanog uzorka, ista je kao i za standard (tablica 4).

Nakon 28 dana uzgoja u pokusima u kojima je određivana sposobnost sinteze okratoksina A, kod plijesni *Aspergillus ochraceus* i zelenog *Penicillium sp.*, dokazana je prisutnost OTA na razvijenim kromatogramima (tablica 3 i slika 12). Dobiveni rezultati su u suglasju sa spoznajom da je *A. ochraceus* glavni producent OTA budući se kao kontaminant često nalazi u tlu i na trulim biljkama, osušenim namirnicama, ali i mesnim proizvodima (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2018). Među vrstama iz roda *Penicillium* koje su snažni producenti OTA, a na hranjivoj podlozi daju zeleno obojene kolonije je vrsta *P. verrucosum*, međutim zeleni penicillium u ovom radu nije identificiran tako da sa sigurnošću ne možemo tvrditi o kojoj vrsti se radi. Također, nakon izlaganja ploča UV svjetlu (slika 12) i računanja  $R_f$ -vrijednosti (tablica 4), izračunato je da istu  $R_f$ -vrijednost ima OTA dokazan u miceliju plijesni kao i standard okratoksina.

Gorst-Allman i Steyn (1979) analizirali su 13 mikotoksina (smjesa devet neutralnih mikotoksina među njima i AFB<sub>1</sub> i smjesa četiri kisela mikotoksina među kojima je OTA) TLC metodom u različitim otapalima i različitim omjerima otapala te su računali i uspoređivali  $R_f$ -vrijednosti.  $R_f$ -vrijednost aflatoksina B<sub>1</sub> iz smjese mikotoksina u sustavu otapala kloroform/aceton (9:1) iznosila je 0,27; a  $R_f$ -vrijednost u ovom istraživanju za čisti AFB<sub>1</sub> iznosi 0,5. Za okratoksin A iz smjese u sustavu otapala benzen/ledena octena kiselina (4:1)  $R_f$ -vrijednost je iznosila 0,40, dok u ovom istraživanju s omjerom otapala 9:1,  $R_f$ -vrijednost za čisti OTA iznosi 0,30.

Braicu i sur. (2008) su provodili kvalitativnu i kvantitativnu analizu aflatoksina i okratoksina na različitim žitaricama te su dokazali da TLC povezan s densimetrijskom kvantifikacijom osigurava dobru rezoluciju, precizno i pouzdano kvantitativno određivanje aflatoksina i okratoksina A ekstrahiranih iz žitarica. Za analizu su imali smjesu od četiri aflatoksina i OTA koristeći sustav otapala kloroform/acetone (9:1) razdvojili su sva četiri aflatoksina i OTA te im odredili  $R_f$ -vrijednosti, za  $AFB_1$  je iznosila 0,35 što relativno odgovara rezultatu istraživanja u ovom radu, kao i  $R_f$ -vrijednost za OTA koja je iznosila 0,58.

TLC je u ovom istraživanju korištena isključivo za kvalitativnu analizu, za dokazivanje prisutnosti, tj. sinteze mikotoksina od strane navedenih vrsta plijesni.

## 5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Dokazana je sposobnost sinteze mikotoksina određenih vrsta plijesni nakon inkubacije u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.
2. Kultura plijesni *Aspergillus parasiticus* sintetizira aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) nakon 28 dana uzgoja pri temperaturi od 28°C.
3. Kulture plijesni *Aspergillus ochraceus* i zeleni *Penicillium sp.* sintetiziraju okratoksin A (OTA) nakon 28 dana uzgoja pri temperaturi od 28°C.
4. Tankoslojna kromatografija se pokazala kao jednostavna i brza *screening* metoda za dokazivanje aflatoksina B<sub>1</sub> i okratoksina A.

## 6. POPIS LITERATURE

Baker S.E., Bennett J.W. (2010.) An Overview of the Genus *Aspergillus*, str. 4.

Bennett J. W. & Klich M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **16(3)**: 497–516.

Braicu C., Puia C., Bodoki E., Socaciu C. (2008) Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography-densitometry. *Journal of Food Quality* **31(1)**: 108–120.

Cao S., McMillin D.W., Tamayo G., Delmore J., Mitsiades C.S., Clardy J. (2012) Inhibition of tumor cells interacting with stromal cells by xanthones isolated from a Costa Rican *Penicillium sp.* *J Nat Prod.* **75 (4)**: 793-797.

Duraković S. (1991) Prehrambena mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb

Duraković S. i Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb

Duraković S. i Redžepović S. (2002) Uvod u opću mikrobiologiju, Kugler, Zagreb, str. 343-375.

Filtborg O., Frisvad J.C. (1980) A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensm. Wiss. Technol.* **13**: 128-130.

Filtborg O., Frisvad J.C., Svendsen J.A. (1983) Simple screening method for 45 toxigenic molds producing intracellular mycotoxins in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 580-585.

Giovati L., Magliani W., Ciociola T., Santinoli C., Conti S., Polonelli L. (2015) AFM<sub>1</sub> in Milk: Physical, Biological and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins* **7**: 4330-4349.

Gorst-Allman C. P. Steyn P. S. (1979) Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. *Journal of Chromatography* **175**: 325-331.

HAH (2012.) Znanstveno mišljenje – mikotoksini u hrani za životinje. HAH – Hrvatska agencija za hranu <<https://www.hah.hr/znanstveno-misljenje-mikotoksini-u-hrani-za-zivotinje/>> pristupljeno 19.6.2019.

HAH (2013) Što su mikotoksini? HAH - Hrvatska agencija za hranu, <<https://www.hah.hr/stosu-mikotoksini/>> pristupljeno 20. lipnja 2019.

Hussein H. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167(2)**: 101–134.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* **56**: 245-395.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2002) Aflatoxins. *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* **82**: 171. Lyon, France: World Health Organization.

Lin L., Zhang J., Wang P., Wang Y., Chen J. (1998) Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* **815(1)**: 3–20.

Markov, K. (2005) Utjecaj odabranih parametara na rast plijesni u mješovitim kulturama i biosintezi patulina i zearalenona. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., & Delaš, F. (2010) Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **60**: 244-251.

Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalek D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* **34**: 312-317.

Oancea, S., Stoia, M. (2008) A Review of Toxicology, Analytical Methods and Health Risks. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology* **12**: 19–31.

Pleadin J., Frece J., Markov K. (2014) Aflatoksini – Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **9**: 3-4;75-82.

Pleadin J., Frece J., Markov K. (2015) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje  
Fusarium mycotoxins in food and feed. **10**: 6–13.

Pleadin, Jelka; Vasilj, Višnja; Petrović, Danijela (2018) Mikotoksini: pojavnost, prevencija i redukcija, Mostar: Sveučilište u Mostaru, 2018 (Sveučilišni udžbenik)

Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2012.) *Narodne novine* **146** (NN 146/2012).

Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (2010) *Narodne novine* **80** (NN 80/2010).

Pravilnik o dopuni Pravilnika o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (2010) *Narodne novine* **111** (NN 111/2010)

Pravilnik o izmjenama Pravilnika o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje kojim se provode uredbe Europske komisije o izmjenama direktive 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 7. svibnja 2002. o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (2012) *Narodne novine* **124** (NN 124/2012).

Rapić V. (2008) Postupci pripreve i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb, str. 62-63.

Sweeney M. (1998) Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* **43(3)**: 141–158.

Vasić-Rački D., Galić K., Delaš F., Klapac T., Kipčić D., Katalenić M., Dimitrov N. i Šarkanj B. (2010) Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu (HAH), str. 31-40.

Zheng M. Z., Richard J. L., & Binder J. (2006) A Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins. *Mycopathologia* **161(5)**: 261–273.



## Izjava o izvornosti

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

Edina Memović

ime i prezime studenta