

# Biološka detoksifikacija i mehanizmi uklanjanja okratoksina A

---

**Vukšić, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:159:980918>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Lucija Vukšić**  
**7478/BT**

**BIOLOŠKA DETOKSIFIKACIJA I MEHANIZMI UKLANJANJA OKRATOKSINA A**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija

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

**Zagreb, 2020.**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za Biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom profesorice dr. sc. Ksenije Markov.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Biološka detoksifikacija i mehanizmi uklanjanja okratoksina A

Lucija Vukšić, 0058211062

#### SAŽETAK:

Okratoksin A (OTA) se smatra jednim od najopasnijih mikotoksina koji se nalaze u prehrambenim proizvodima, a kao glavni izvori OTA u ljudskoj prehrani navode se žitarice i vino. Istraživanja su pokazala da ima nefrotoksično, karcinogeno, imunotoksično, mutageno i neurotoksično djelovanje te je klasificiran kao mogući ljudski karcinogen. Osim preventivnih postupaka koji se primjenjuju kako bi se smanjio rizik od kontaminacije, potrebno je stalno kontrolirati razinu mikotoksina u hrani. Metode koje se koriste za smanjenje OTA dijele se na fizikalne, kemijske i mikrobiološke metode. Zbog ograničene primjene fizikalnih i kemijskih metoda, koriste se mikrobiološke metode koje su ekološki prihvatljive i učinkovite.

**Ključne riječi:** Okratoksin A, fizikalne metode, kemijske metode, mikrobiološke metode, detoksifikacija

**Rad sadrži:** 28 stranica, 3 slike, 6 tablica, 49 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

**Pomoć pri izradi:** Željko Jakopović, mag.ing.techn.aliment.

**Datum obrane:** srpanj, 2020

## 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

### **Biological detoxification and removal mechanisms of ochratoxin A**

**Lucija Vukšić, 0058211062**

#### **ABSTRACT:**

Ochratoxin A (OTA) is considered as one of the most dangerous mycotoxins found in food products, and cereal and wine are reported as a main source of OTA in the human diet. Previous studies have shown that it has nephrotoxic, carcinogenic, immunotoxic, mutagenic and neurotoxic effects and it has been classified as a possible human carcinogenic. Besides preventive procedures that are applied to reduce the risk of contamination, what is necessary is a constant control of the levels of mycotoxins in food. The methods used to reduce OTA are physical, chemical or microbiological. Due to the limited application of physical and chemical methods, more environmentally friendly and efficient methods are more used.

**Key words:** Ochratoxin A (OTA), physical methods, chemical methods, microbiological methods, detoxification

**Thesis contains:** 28 pages, 3 figures, 6 tables, 49 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in 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:** July, 2020

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. MIKOTOKSINI .....	2
2.2. OKRATOKSIN A .....	3
2.2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA OTA .....	6
2.2.2. TOKSIČNO DJELOVANJE OTA .....	7
2.3. ZAKONSKA REGULATIVA .....	9
2.4. METODE UKLANJANJA OKRATOKSINA A .....	11
2.4.1. FIZIKALNE METODE .....	12
2.4.2. KEMIJSKE METODE .....	13
2.4.3. MIKROBIOLOŠKE METODE .....	14
2.4.4. DETOKSIFIKACIJA OTA VEZANJEM ILI DEGRADACIJOM .....	15
3. ZAKLJUČCI .....	22
4. POPIS LITERATURE .....	23

# 1. UVOD

Plijesni su vrlo česti kontaminanti hrane i krmnih smjesa, a toksikotvorne plijesni tijekom rasta sintetiziraju sekundarne metabolite, mikotoksine. Prisutnost mikotoksina u prehrambenim proizvodima predstavlja globalni problem i veliku prijetnju zdravlju ljudi i životinja, a prema procjeni FAO-a (eng. *Food and Agriculture Organization*), 25% godišnje proizvedene hrane kontaminirano je mikotoksinima (Pfliegler i sur., 2015). Tako visok postotak kontaminacije mikotoksinima predstavlja opravdanu zabrinutost zbog tzv. „carry over efekta“, prilikom čega mikotoksini ulaze u prehrambeni lanac čovjeka kroz meso, jaja, mlijeko i druge prehrambene proizvode (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015).

Jednim od najopasnijih mikotoksina smatra se i okratoksin A (OTA) koji je prema IARC-u (eng. *The International Agency for Research on Cancer*) svrstan u skupinu 2B te je klasificiran kao mogući ljudski karcinogen (IARC, 1993). Okratoksin A se ubraja u skupinu mikotoksina koji se nalaze u poljoprivrednim kulturama kao što su kava, grožđe, žitarice, kakao, soja i mnogi drugi, a zbog svoje termostabilnosti prisutan je i u njihovim proizvodima (Heussner i Bingle, 2015). OTA je proizvod sekundarnog metabolizma plijesni iz rodova *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*) i *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, *P. expansum*) što znači da ne sudjeluje u njihovom rastu i razvoju. Budući da navedene plijesni rastu na širokom geografskom području, OTA je sveprisutan.

Prethodna istraživanja pokazala su da OTA ima nefrotoksično, karcinogeno, imunotoksično, mutageno i neurotoksično djelovanje (Mozaffary i sur., 2019). Zbog nefrotoksičnog djelovanja, OTA je povezan s pojavom tumora urinarnog trakta, a smatra se i jednim od uzročnika odgovornih za bolest Balkanske endemske nefropatije (BEN), teške kronične obostrane bolesti bubrega.

Kako bi se smanjio rizik od kontaminacije prehrambenih proizvoda OTA, koriste se preventivni postupci koji uključuju odabir i pravilno skladištenje sirovina (Piotrowska i sur., 2013). Osim preventivnih postupaka potrebna je i stalna kontrola razine mikotoksina u hrani koja se koristi za ljudsku i životinjsku upotrebu. No preventivni postupci i kontrola nisu dovoljni, stoga se u svrhu smanjenja koncentracije i pojavljivanja OTA u prehrambenim proizvodima primjenjuju različite strategije temeljene na fizikalnim, kemijskim i mikrobiološkim procesima.

Cilj ovog rada je sistematizirati i analizirati metode koje se koriste za kontrolu koncentracije OTA s posebnim naglaskom na mikrobiološke metode i mehanizme uklanjanja OTA.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su proizvodi sekundarnog metabolizma toksikotvornih plijesni koji mogu izazvati niz štetnih učinaka na ljude i životinje. Kao što i sam naziv kaže (gr. *mykes* – gljiva, *toxicon* – otrov), riječ je o toksičnim produktima koje plijesni sintetiziraju tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog porijekla te ih izlučuju u svoju okolinu. Zbog svojeg štetnog djelovanja predstavljaju veliki problem i opasnost u svijetu. Budući da do kontaminacije mikotoksinima može doći u polju, tijekom skladištenja, ali i tijekom proizvodnih procesa, postoji velika zabrinutost i realna opasnost od takozvanog „carry over“ efekta (Markov i sur., 2013; Pleadin i sur., 2015), odnosno indirektnog prijenosa mikotoksina u organizam čovjeka. Osim toga, dokazano je kako prisutnost mikotoksina u svim razinama proizvodnje prehrambenih proizvoda i stočne hrane uzrokuje velike ekonomske gubitke (Hatout i Aly, 2014). Uzročnici su različitih bolesti (mikotoksikoza) te se najčešće prenose putem hrane, a rjeđe respiratornim putem (HAH, 2012; HAPIH, 2013).

Izraz „mikotoksini“ nastao je 1962. godine u Engleskoj nakon neuobičajene veterinarske krize. Misteriozna „X-bolest“ usmrtila je više od 100 000 purana što je nagnalo znanstvenike da istraže mogućnost postojanja smrtonosnih metabolita koji potječu od plijesni (Zain, 2011). Radi se o strukturno raznolikoj skupini, u pravilu stabilnih nisko molekularnih spojeva, različitog biološkog učinka, otpornih na visoke temperature, bez boje i okusa. Zbog navedenih svojstava mogu kontaminirati hranu u svim fazama proizvodnje. Danas je poznato više od 300 različitih mikotoksina, a kao najznačajniji kontaminanti hrane izdvajaju se: aflatoksini (AFB<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>), okratoksini (OTA), zearalenon (ZEA, F-2), fumonizini (FB1, FB2), trihoteceni (T-2 toksin), patulin (PAT) i ergot alkalodi (Zain, 2011; HAPIH, 2013). 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. Prema procjeni FAO-a, 25% hrane koja se proizvodi u svijetu kontaminirano je mikotoksinima (HAPIH, 2013).

Od 100 000 vrsta plijesni koje su do danas otkrivene, više od 200 vrsta sintetizira mikotoksine. Najvažniji rodovi mikotoksikogenih plijesni su: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Stachybotrys* (Zain, 2011). Vrste plijesni i mikotoksini koji se najčešće pojavljuju u Hrvatskoj navedeni su u tablici 1 (Pepeljnjak i Šegvić, 2004).



Za pojavu plijesni i njihovih metabolita odgovorni su (HAH, 2012; Pleadin i sur., 2018):

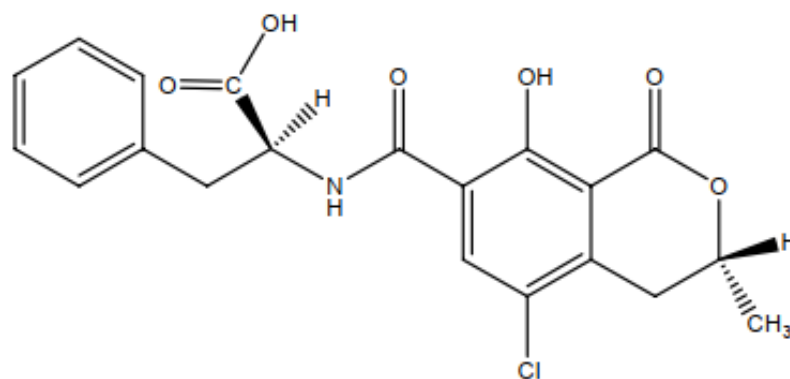
- odgovarajući sadržaj vlage,
- pogodne temperature,
- prisutnost kisika,
- fizička oštećenja na usjevima i
- prisutnost gljivičnih spora

**Tablica 1.** Popis plijesni i miotoksina koje sintetiziraju (Pepeljnjak i Šegvić, 2004)

<b>VRSTA PLIJESNI</b>	<b>MIKOTOKSINI</b>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Okratoksin A
<i>Aspergillus flavus</i>	Alfatoksin B <sub>1</sub>
	Alfatoksin B <sub>2</sub>
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocistin
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Alfatoksin B <sub>1</sub>
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenon
<i>Trichoderma viridae</i>	Diacetoksirpenol
<i>Rhizopus nigricans</i>	Alfatoksin B <sub>1</sub>
	Alfatoksin B <sub>2</sub>
<i>Penicillium expansum</i>	Citrinin
<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumozin B <sub>1</sub>

## 2.2. OKRATOKSIN A

Okratoksin A (OTA) je najtoksičniji predstavnik mikotoksina iz skupine okratoksina, a prvi puta su ga opisali Van der Merwe i suradnici (1965). Kemijska struktura okratoksina A je 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-(3R)-metil izokumarin, amidno vezan s L-β-fenilalaninom, a prikazana je na slici 1 (El Khoury i Atoui, 2010).

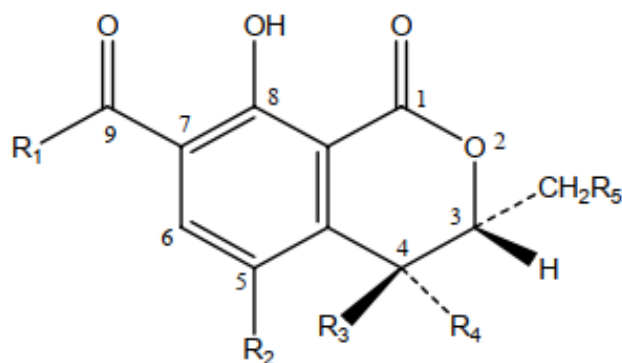


**Slika 1.** Kemijska struktura okratoksina A (El Khoury i Atoui, 2010)

Pripada skupini okratoksina koju čine i okratoksin B, okratoksin C, okratoksin  $\alpha$  i okratoksin  $\beta$ . Okratoksin B je neklorirani oblik okratoksina A, dok je okratoksin C, etilni ester okratoksina A. Okratoksin  $\alpha$  je izokumarinski derivat OTA, a okratoksin  $\beta$  je njegov besklorni analog. U tablici 2 prikazan je pregled navedenih okratoksina (El Khoury i Atoui, 2010; Heussner i Bingle, 2015). Na slici 2 prikazana je opća struktura zajednička svim okratoksinima, a u tablici 3 karakteristični sastavi različitih okratoksina.

**Tablica 2.** Pregled okratoksina (Heussner i Bingle, 2015)

OKRATOKSIN	OTA	OTB	OTC	OT $\alpha$	OT $\beta$
MOLEKULSKA FORMULA	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>6</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> ClO <sub>5</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
MOLARNA MASA (g/mol)	403,8	369,4	431,9	256,64	222,19



**Slika 2.** Opća struktura okratoksina (El Khoury i Atoui, 2010)

**Tablica 3.** Karakteristični sastav različitih okratoksina (El Khoury i Atoui, 2010)

IME	R1	R2	R3	R4	R5
Okratoksin A	Fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin B	Fenilalanin	H	H	H	H
Okratoksin C	Etil-ester, fenilalanin	Cl	H	H	H
Okratoksin $\alpha$	OH	Cl	H	H	H
Okratoksin $\beta$	OH	H	H	H	H

Okratoksin A je sekundarni metabolit plijesni iz rodova *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*) i *Penicillium* (*P. verrucosum*), a prvi puta je izoliran iz kulture plijesni *Aspergillus ochraceus*. U tablici 4 navedene su vrste plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium* koje sintetiziraju okratoksin A, optimalna temperatura za rast plijesni te prehrambeni proizvodi na kojima najčešće rastu i u kojima je detektirana prisutnost OTA.

**Tablica 4.** Vrste plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*, optimalna temperatura rasta te supstrat na kojem se pojavljuje plijesan i OTA (Bui-Klimke i Wu, 2015)

VRSTA PLIJESNI	OPTIMALNA TEMPERATURA (min-max) °C	SUPSTRATI NA KOJI DJELUJU
<i>A. ochraceus</i>	24-31 (8–37)	Dimljena i slana sušena riba, suhi grah, sušeno meso, soja, slanutak, uljana repica, papar, suho voće i sezam, orašasti plodovi, riža, ječam, kukuruz, pšenica, brašno, mekinje, zrna kave
<i>A. niger</i>	35–37 (6–47)	Orašasti plodovi, jabuke, kruške, breskve, citrusi, grožđe, smokve, jagode, mango, rajčica, dinja, luk, češnjak
<i>A. carbonarius</i>	25-32 (N/A* i 40)	Grožđe i proizvodi od grožđa, uključujući stolno grožđe, vina i suho voće
<i>P. verrucosum</i>	20 (0–30)	Žitarice, sir, mesni proizvodi

\*N/A, nema podataka

Kontaminacija OTA općenito nastaje kao rezultat lošeg skladištenja sirovine ili proizvoda i ne poštivanja pravila dobre poljoprivredne prakse (Bui-Klimke i Wu, 2015). Do biosinteze OTA uglavnom dolazi tijekom rasta spomenutih toksikotvornih plijesni na žitaricama (ječam, kukuruz, zob, pšenica), ali i u drugim namirnicama biljnog i životinjskog podrijetla kao što su kruh, pivo, sušeno voće, kakao, vino, čaj, začini te meso i mesni proizvodi.

### 2.2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA OTA

Okratoksin A je slaba organska kiselina, molarne mase 403,8 g/mol, čija je pKa vrijednost 7,1. S kristaličnom strukturom koja varira od bezbojne do bijele boje, ova molekula posjeduje intenzivnu zelenu fluorescenciju pod UV svjetlom u kiselom mediju te plavu fluorescenciju u lužnatom mediju. U kiselim i neutralnim uvjetima, OTA je topljiv u polarnim organskim otapalima kao što su alkoholi, ketoni i kloroform, slabo topljiv u vodi, a netopljiv u naftnim eterima i zasićenim ugljikovodicima. U alkalnim uvjetima, OTA je topiv u vodenoj otopini natrijevog bikarbonata te općenito u svim alkalnim otopinama. Ima talište od oko 90 °C kada kristalizira iz benzena kao otopine. Međutim, ne otopljeni kristali dobiveni iz ksilena

imaju talište na 169 °C i pogodni su za rendgensku strukturnu analizu. OTA je optički aktivan i njegove spektralne karakteristike prikazane su u tablici 5.

Posebnost OTA je njegova stabilnost i otpornost na kiselost i visoke temperature. 1982. godine, Müller je dokazao da se OTA za vrijeme kuhanja razgradi samo djelomično, a u uvjetima sterilizacije pod visokim tlakom i temperaturom od 121°C može opstati čak 3h. Štoviše, njegovo uništenje nije potpuno čak ni pri 250 °C. Gama zračenje OTA u etanolu ne uzrokuje degradaciju. Međutim, opaža se razgradnja kod niske koncentracije vlage, kada je OTA tretiran s viškom natrijeva hipoklorita (NaOCl) (El Khoury i Atoui, 2010).

**Tablica 5.** Spektralne karakteristike OTA (El Khoury i Atoui, 2010)

SPEKTAR	OTAPALO	KARAKTERISTIKE
UV-VIS	Etanol	$\lambda_{\max}=213\text{nm}$ ( $\epsilon$ 36.800) $\lambda_{\max} =332\text{nm}$ ( $\epsilon$ 6.400)
Fluorescencija	Etanol 96% Apsolutni etanol	$\lambda_{\max} =467\text{nm}$ $\lambda_{\max} =428\text{nm}$
IR	$\text{CHCl}_3$	3380; 2988; 1723; 1674; 1528; 1425; 1381; 1304; 1260; 1170; 1140; 1107; 827 $\text{cm}^{-1}$
NMR $^1\text{H}$ 250-MHZ	$\text{CDCl}_3$	$\delta$ 12,70; $\delta$ 10,80; $\delta$ 8,55 (3H); $\delta$ 7,23; $\delta$ 7,15 (aromatski vodik); $\delta$ 4,71; $\delta$ 5,07 (CH); $\delta$ 2,78; $\delta$ 3,2 (CH <sub>2</sub> ); $\delta$ 1,55 (CH <sub>3</sub> )
MS	-	m/z 239/241 m/z 255/257 molekularni ion m/z 403

### 2.2.2. TOKSIČNO DJELOVANJE OTA

Brojne studije pokazale su da OTA može imati nefrotoksično, hepatotoksično, neurotoksično, teratogeno i imunotoksično djelovanje na određene životinje te uzrokovati tumor bubrega i jetre kod miševa i štakora (El Khoury i Atoui, 2010; Pleadin i sur., 2018).

Međutim, njegova toksičnost varira ovisno o spolu, vrsti životinja i tipu stanica koje su korištene za istraživanje (El Khoury i Atoui, 2010). Iako ne postoje odgovarajuće studije o povezanosti OTA i nastanku karcinoma kod ljudi, OTA je prema IARC-u (eng. *The International Agency for Research on Cancer*) svrstan u skupinu 2B te je klasificiran kao mogući ljudski karcinogen (IARC, 1993).

Kao glavni izvori OTA u ljudskoj prehrani navode se žitarice i vino. Nedavna istraživanja pokazala su visoke koncentracije OTA u vinima, moštu i sokovima od grožđa (do 7 µg po litri). Također, njegova prisutnost detektirana je i u zrnima kave, mahunarkama, začинима, mesu, proizvodima od sira i u pivu (El Khoury i Atoui, 2010; Pleadin i sur., 2018).

#### *Nefrotoksično djelovanje*

Nefropatija je glavni toksični učinak okratoksina A, koji potencijalno može biti nefrotoksičan za sve sisavce nepreživače (vodenkonji, svinje, pekariji). Epidemiološke studije provedene u Danskoj, Mađarskoj, Skandinaviji i Poljskoj pokazale su da igra važnu ulogu u etiologiji svinjske nefropatije. Također, OTA se povezuje s ljudskom nefropatijom i sumnja se da je uzrok smrtonosne bolesti, Balkanske endemske nefropatije (BEN), koja pogađa populaciju jugoistočne Europe (Hrvatska, Bosna, Bugarska, Rumunjska). Isto tako, smatra se glavnim uzrokom Tuniške nefropatije (TCIN) (El Khoury i Atoui, 2010).

#### *Neurotoksično djelovanje*

Pokazalo se da primjena OTA u vrijeme trudnoće štakora uzrokuje mnoge malformacije u središnjem živčanom sustavu te se može smatrati mogućim uzrokom određenih lezija kao i oštećenjem na cerebralnoj razini (El Khoury i Atoui, 2010).

#### *Teratogeno djelovanje*

OTA je snažan teratogen za laboratorijske životinje. Može proći placentu i nakupljati se u tkivu fetusa te uzrokovati razne morfološke anomalije. Zabilježeno je da potiče prenatalnu dismorfogenezu kod miševa, hrčaka i embrija pilića (El Khoury i Atoui, 2010).

#### *Imunotoksično djelovanje*

Pod određenim uvjetima, OTA ima imunosupresivni učinak koji se primjećuje kod visoke ili niske doze. Zabilježene su nekroze limfoidnih tkiva što ukazuje na visoku osjetljivost na OTA. Holmberg i suradnici (1988) opisali su utjecaj OTA na humoralni i stanični imunitet. Smatra se

da je uzrok limfopenije, regresije timusa i supresije imunološkog odgovora. Nakon ovih rezultata, OTA se uzima kao važno imunosupresorsko sredstvo (El Khoury i Atoui, 2010).

### *Karcinogeno djelovanje*

OTA se opravdano smatra karcinogenim za ljude s obzirom na brojne dokaze o karcinogenosti kod pokusnih životinja. Nakon primjene u prehrani miševa, kod muških miševa primijećeni su hepatocelularni tumori, tumori bubrežnih stanica, hepatomi i hiperplastični jetreni čvorovi. U drugom istraživanju, primjena OTA u hrani inducirala je hepatocelularne karcinome i adenome kod ženskih miševa. OTA je kod muških i ženskih štakora rezultirao češćim adenomima bubrežnih stanica i adenokarcinomima, nadalje, zabilježene su metastaze tumora bubrežnih stanica. Također, povećao je učestalost i količinu fibroadenoma mliječnih žlijezda ženskih štakora. Međutim, ne postoje odgovarajuće studije koje potvrđuju povezanost OTA i karcinoma kod ljudi. Učestalost i smrtnost od urotelijalnih tumora mokraćnog sustava bila je povezana s geografskom rasprostranjenošću Balkanske endemske nefropatije u Bugarskoj i Jugoslaviji (El Khoury i Atoui, 2010).

## **2.3. ZAKONSKA REGULATIVA**

S obzirom na toksičnost, pojavnost i sveukupnu opasnost koju OTA predstavlja u prehrambenom lancu ljudi, Europska komisija (EC) je utvrdila maksimalne razine OTA za žitarice i proizvode od žitarica, sušeno voće od vinove loze, kavu, vino, sok od grožđa, prerađenu hranu na bazi žitarica i dječju hranu za dojenčad i malu djecu, dijetalnu hranu za posebne medicinske svrhe, posebno za dojenčad, začine i slatkiše, Uredbom Komisije (EC) broj 1881/2006 (European Commission, 2006) i naknadnim izmjenama (European Commission, 2010; European Commission, 2012; European Commission, 2015). Maksimalne dopuštene razine OTA prikazane su u tablici 6.

**Tablica 6.** Maksimalne dozvoljene koncentracije OTA u prehrambenim proizvodima propisanim od strane Europske Komisije (Huertas-Perez i sur., 2017; Pleadin i sur., 2018)

	PREHRAMBENI PROIZVODI	MAKSIMALNE DOZVOLJENE KONCENTRACIJE (µg/kg)
1.	Neprerađene žitarice	5
2.	Svi proizvodi dobiveni iz neprerađenih žitarica, uključujući proizvode od obrađenih žitarica i žitarice namijenjene za izravnu prehranu ljudi s iznimkom za prehrambene proizvode pod rednim brojem 9., 10. i 13.	3
3.	Osušeno voće od vinove loze (ribizli, groždice, sultanije)	10
4.	Pržena zrna kave i mljevena pržena kava, osim instant kave	5
5.	Topljiva kava (instant kava)	10
6.	Vino (uključujući pjenušavo vino, isključujući likerska vina i vina s udjelom alkohola od najmanje 15 vol.%) i voćna vina	2
7.	Aromatizirano vino, aromatizirana pića na bazi vina i aromatizirani kokteli od vinskih proizvoda	2
8.	Sok od grožđa, rekonstituirani koncentrirani sok od grožđa, groždani nektar, rekonstituiran groždani mošt i koncentrirani groždani mošt, namijenjeni izravnoj prehrani ljudi	2
9.	Prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za bebe za dojenčad i malu djecu	0,50
10.	Dijetalna hrana za posebne medicinske svrhe namijenjena posebno dojenčadi	0,50
11.	Začini, uključujući sušene začine:	
	<i>Piper</i> spp (plodovi istih, uključujući bijeli i crni papar) <i>Myristica fragrans</i> (muškatni oraščić) <i>Zingiber officinale</i> (đumbir) <i>Curcuma longa</i> (kurkuma)	15
	<i>Capsicum</i> spp. (sušeno voće, cijelo ili mljeveno, uključujući čili, čili u prahu, kajenski i papriku)	20
	Mješavine začina koje sadrže jedan od gore navedenih začina	15
12.	Sladić ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> i druge vrste)	



	12.1. Slatki korijen, sastojak biljnih infuzija	20
	12.2. Ekstrakt slatkog korijena za upotrebu u hrani, posebno u pićima i slatkišima	80
13.	Pšenični gluten koji se ne prodaje izravno potrošačima	8

Hrvatska je među državama koje imaju najstrože propise o dozvoljenim koncentracijama kontaminanata u hrani. Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim koncentracijama (NDK) kontaminanata u hrani, koncentracije OTA kreću se u granicama od 0,5 do 10 µg/kg (NN 154/2008-4198). Najveća dopuštena koncentracija OTA je u groždicama i instant kavi (10 µg/kg), a najmanja dopuštena koncentracija OTA je hrani koja je namijenjena dojenčadi, prerađenoj hrani na bazi žitarica i hrani za malu djecu (0,5 µg/kg). A na temelju godišnjeg plana uzorkovanja provodi se sustavna kontrola namirnica biljnog i životinjskog podrijetla na mikotoksine u ovlaštenim laboratorijima za kontrolu zdravstvene ispravnosti hrane (HAH, 2012).

## 2.4. METODE UKLANJANJA OKRATOKSINA A

Za kontrolu prisutnosti plijesni i njihovih toksina, razvijene su brze, osjetljive i precizne metode, ali još uvijek nisu pronađene točne, pouzdane i učinkovite strategije uklanjanja prisutnih mikotoksina, već se za smanjenje kontaminacije plijesnima pa time i mikotoksinima u pravilu koristi samo dobra agrotehnološka praksa (Pleadin i sur., 2018; Giovati i sur., 2015). Stoga se traže sva moguća rješenja za smanjenje količine mikotoksina, a da pri tom budu zdravstveno prihvaćena. Učinkovitost metoda uklanjanja mikotoksina ovisi o brojnim parametrima, primjerice o svojstvima hrane, sastavu i sadržaju vode te o razini onečišćenja. Međutim, jedinstvena metoda, ujedno djelotvorna za sve materijale i sve mikotoksine, ipak ne postoji (Pleadin i sur., 2018).

Metode uklanjanja OTA mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i mikrobiološke metode kojima je cilj efikasno smanjiti ili ukloniti OTA uz maksimalnu ekonomičnost i uvjet da ne mijenjaju sastav prehrambenih proizvoda (Amézqueta i sur., 2009).

### 2.4.1. FIZIKALNE METODE

Fizikalne metode uključuju mehaničko uklanjanje visoko onečišćenih frakcija iz sirovih materijala sortiranjem, čišćenjem, mljevenjem i ljuštenjem (Loi i sur., 2017; Pleadin i sur., 2018). U početku se smatralo da se uklanjanjem vanjskih slojeva koji su bili u doticaju s toksikotvornim plijesnima može spriječiti nastanak okratoksina A. Međutim, u slučaju žitarica i grožđa ovaj se postupak pokazao previše kompleksan i neizvediv. Termičkim tretmanima može se smanjiti, ali ne i u potpunosti ukloniti OTA. UV i gama zračenjem te procesom smrzavanja i odmrzavanja može se smanjiti broj konidija plijesni, ali jedino gama zračenje može uništiti OTA (Amézqueta i sur., 2009).

U radu koji su objavili Boudra i suradnici (1995) ispitana je razgradnja OTA u pšenici pri različitim temperaturama i vlažnosti. Izračunato vrijeme poluraspada OTA bilo je 707 minuta, 201 minuta, 12 minuta i 6 minuta pri 100 °C, 150 °C, 200 °C i 250 °C za suhu pšenicu, odnosno 145 minuta, 60 minuta i 19 minuta pri 100 °C, 150 °C i 200 °C za pšenicu grijanu u vlažnim uvjetima. Dokazali su da vlaga igra važnu ulogu u razgradnji OTA, budući da je prisutnost vode (50%) povećala razgradnju OTA pri 100 °C i 150 °C, dok je suprotan učinak zabilježen pri 200 °C. Nakon termičkog tretmana od 100-250 °C u suhim i vlažnim uzorcima pšenice OTA je još uvijek bio prisutan, što znači da je OTA moguće pronaći u konačnim proizvodima i nakon termičkog tretmana (Boudra i sur., 1995).

U radu koji su objavili Sumbal i suradnici (2016) ispitan je utjecaj UV zračenja i sunčeve svjetlosti na uklanjanje OTA iz kontaminirane hrane za perad. Istraživanje su proveli na prirodno kontaminiranim uzorcima hrane za perad i na uzorcima hrane u koje je dodan OTA. Svi uzorci su bili ozračeni UV svjetlom na udaljenosti od 25 cm. Isti uzorci ozračeni su i sunčevom svjetlošću te analizirani ELISA metodom. Rezultati su pokazali da je u uzorcima hrane koji sadrže 500 µg/kg OTA nakon 180 minuta UV zračenja došlo do potpune dekontaminacije, dok je u istim uzorcima ozračenim sunčevom svjetlošću kroz 8 sati udio OTA smanjen na 70-95 µg/kg. Utvrdili su da je dovoljan samo 1 sat zračenja s UV svjetlom kako bi se razina OTA smanjila na najvišu dopuštenu granicu u hrani za perad (100 µg/kg), a za postizanje iste razine ozračivanjem sa sunčevom svjetlošću bilo je potrebno čak 8 sati. (Sumbal i sur., 2016).

Domijan i suradnici (2015) su istražili učinkovitost gama zračenja na uklanjanje OTA prisutnog u suhomesnatim proizvodima koji su dobiveni od namjerno kontaminiranih sirovina svinjskog mesa tretiranih OTA. Nakon gama zračenja u dozama koje se inače koriste u prehrambenoj industriji (3, 7 i 10kGy), došlo je do smanjenja količine OTA, ali nedovoljno

značajnog smanjenja. Kao što je bilo i očekivano, doza od 10 kGy (najveća doza) dovela je do najvećeg ukupnog smanjenja OTA. Analizom dobivenih podataka, utvrđena je poveznica između uklanjanja OTA i sastava suhomesnatog proizvoda. Nakon provedenog zračenja, u proizvodima s većim udjelom masti, detektirana je manja količina OTA. Rezultati su pokazali da gama zračenje može smanjiti razinu OTA u suhomesnatim proizvodima, ali samo u ograničenoj mjeri zbog složenosti matriksa (Domijan i sur., 2015).

Calado i suradnici (2018) su istražili učinkovitost gama zračenja na uklanjanje OTA iz više različitih matriksa. OTA je zračen u suhom obliku, u vodenim i metanolnim otopinama, u pšeničnom brašnu, soku od grožđa te vinu. Uz to, ispitali su i toksičnost OTA ozračenog u vodi. Osušeni OTA je izuzetno otporan na doze zračenja do 8,6 kGy. U vodenim otopinama se razgradilo više od 90% OTA s dozama zračenja većim od 2,5 kGy, a dodatno su primijetili i dvostruko smanjenje citotoksičnosti. Unatoč povećanju vlage u pšeničnom brašnu, s dozom zračenja od 30 kGy uklonjeno je najviše 24 % OTA. U tekućim matriksima kao što su sok od grožđa i vino nisu postignuta daljnja poboljšanja uklanjanja OTA. Viši sadržaj vlage u prehrambenim matriksima nije značajno povećao eliminaciju OTA. Zaključili su da je OTA vrlo osjetljiv na zračenje u vodenim otopinama, ali je otporan u suhom obliku i u prehrambenim matriksima te zbog toga gama zračenje nije izvediva tehnologija detoksifikacije prehrambenih proizvoda (Calado i sur., 2018).

#### **2.4.2. KEMIJSKE METODE**

Za uklanjanje OTA kemijskim metodama, isprobani su različiti adsorpcijski materijali kao što su aktivni ugljen, bentonit, natrijev i kalcijev aluminijev silikat, zeolit i sl. Ti mikofiksatori imaju sposobnost vezivanja mikotoksina, međutim, nedostatak je da se osim adsorpcije mikotoksina apsorbiraju i potrebne hranjive tvari, pa je njihova upotreba ograničena. Nakon testiranja u *in vivo* uvjetima jedino je aktivni ugljen pokazao zadovoljavajuću aktivnost. Sredstva za fino pranje vina kao što su kalijev kazeinat ili aktivirani ugljik pokazala su se učinkovitima za uklanjanje OTA, ali su narušila kvalitetu vina. S ciljem uklanjanja OTA iz tekućih prehrambenih proizvoda i piva tijekom kuhanja, razvijena su netopljiva biljna vlakna koja adsorbiraju OTA. Trenutno se najboljim adsorpcijskim materijalom smatra modificirani zeolit (Amézqueta i sur., 2009).

Udio OTA u žitaricama može se smanjiti tretiranjem žitarica s otopinom etanola i primjenom ultrazvuka. Isto tako može se koristiti alkalni vodikov peroksid, natrijev hidroksid ili amonij s kalcijevim hidroksidom. Dokazano je da neki fungicidi, pesticidi i insekticidi uspješno

manjuju koncentraciju OTA u grožđu i vinu. Što se tiče kave, tretmani etil acetatom, diklorometanom i mravljom kiselinom s metilen kloridom mogu smanjiti udio OTA. Istraživanja koja su proveli Amézqueta i suradnici (2009) pokazala su da se više od 98% OTA prisutnog u kakau može eliminirati alkalnim tretmanom. Razvoj elektrokemijskih tehnika omogućio je upotrebu ozona za uklanjanje OTA u namirnicama kao što su žitarice, orašasti plodovi ili povrće, do razina koje se više ne mogu detektirati (Amézqueta i sur., 2009).

### **2.4.3. MIKROBIOLOŠKE METODE**

Fizikalne i kemijske metode imaju ograničenu primjenu zbog nedovoljno saznanja o produktima degradacije te zbog promjena nutritivnog sastava i organoleptičkih svojstava hrane (Pleadin i sur., 2019). Zbog navedenih nedostataka traže se alternativni načini smanjenja koncentracije OTA, gdje do izražaja dolaze mikrobiološke metode. Istraživanja mogućnosti uklanjanja mikotoksina mikrobnim kulturama i njihovim staničnim komponentama sve više se nameću kao moguća alternativa postojećim fizikalnim i kemijskim metodama detoksifikacije.

Mikrobiološke metode detoksifikacije definiraju se kao metode koje koriste mikroorganizme i/ili enzime koji mogu metabolizirati, uništiti ili deaktivirati toksine do stabilnih, manje toksičnih ili bezopasnih spojeva. Biološki agensi i njihovi enzimi omogućuju specifičan, nepovratan, ekološki prihvatljiv i učinkovit pristup, s malim utjecajem na organoleptička svojstva i nutritivnu vrijednost hrane u odnosu na kemijske agense (Loi i sur., 2017). Međutim, mikrobiološke metode su znatno manje istraživane od fizikalnih i kemijskih metoda (Pleadin i sur., 2018, Pleadin i sur., 2019). Za primjenu mikrobiološke detoksifikacije važno je utvrditi točne grupe unutar kemijske strukture koje su odgovorne za toksičan učinak OTA. Toksičnost se uglavnom pripisuje njegovom izokumarinskom dijelu, dok karboksilna skupina fenilalaninskog dijela i Cl skupina pogoduju toksičnosti (Vanhoutte i sur., 2016).

Tijekom godina otkriveni su brojni mikroorganizmi koji mogu razgraditi i/ili adsorbirati OTA uključujući aktinomicete, bakterije, plijesni, kvasce i alge.

Jedna od najčešće korištenih strategija detoksifikacije/biorazgradnje mikotoksina uključuje izolaciju mikroorganizama koji mogu razgraditi određeni mikotoksin, a među tim mikroorganizmima kvasci i bakterije mliječne kiseline (BMK) pokazuju golem potencijal kao mogući mikofiksatori.

#### 2.4.4. DETOKSIFIKACIJA OTA VEZANJEM ILI DEGRADACIJOM

Biološka detoksifikacija mikotoksina odvija se uglavnom pomoću dva glavna procesa, sorpcije (adsorpcije-vezanje i desorpcije-otpuštanje) i enzimske razgradnje.

##### *Vežanje OTA s pomoću kvasaca i BMK*

Dokazano je da i žive i mrtve stanice mikroorganizama mogu vezati mikotoksine, stoga se pretpostavlja da su stanične komponente kao što su manani i  $\beta$ -glukan u kvasca, odnosno polisaharidi i peptidoglikan u bakterija, odgovorne za fizičko vezanje mikotoksina, a da se ne radi o kovalentnom vezanju ili biotransformaciji.

Bakterije mliječne kiseline kao prirodni biološki antagonisti, uz dokazanu antifungalnu aktivnost mogu stupati i u interakcije i vezati mikotoksine te ih tako ukloniti iz sredine u kojoj se nalaze. Smatra se da je adsorpcija OTA na staničnu stijenku BMK glavni mehanizam uklanjanja OTA. Istraživanjima o mehanizmima vezanja mikotoksina BMK došlo se do sličnih zaključaka da ugljikohidratne i/ili proteinske komponente igraju glavnu ulogu u vezanju mikotoksina, da su peptidoglikani stanične stijenke odgovorni za vezanje toksina, da masne kiseline nisu uključene u interakciju jer tretiranje BMK lipazama nije utjecalo na vezanje mikotoksina, da je veza između BMK i mikotoksina najvjerojatnije hidrofobna i da obrada BMK visokom temperaturom i kiselinom uzrokuje denaturaciju proteina što dovodi do povećanja broja hidrofobnih površina (El-Nezami i sur., 2002). Istraživanja su pokazala da stanice dvaju sojeva *L. rhamnosus* koje su tretirane toplinom i kiselinom efikasnije uklanjaju OTA iz fosfatnih puferiranih otopina od živih stanica. Sojevi su uklonili 36% do 76% u puferiranoj otopini pH 7,4 nakon 2 sata na 37 °C. Piotrowska i Zakowska (2005) potvrdili su da su *L. acidophilus* i *L. rhamnosus* uzrokovali smanjenje OTA za 70% i 87% od 1 mg OTA/L nakon pet dana na 37 °C te da je u staničnoj stijenci bakterija nakon centrifugiranja prisutna značajna količina OTA. Del Prete i suradnici (2007) su testirali 15 sojeva BMK kako bi odredili *in vitro* sposobnost uklanjanja OTA. Testiranje je pokazalo da je *Oenococcus oeni* najučinkovitiji, s redukcijom OTA od 28%. Utvrđeno je sudjelovanje mehanizama za vezanje stanica, jer se do 57% OTA apsorbiranog od strane stanica ekstrahiralo metanolom iz peleta bakterija; sirovi ekstrakti bez stanica nisu mogli razgraditi OTA; i proizvodi razgradnje nisu otkriveni. Ipak, neki autori smatraju da metabolizam također može biti uključen. Dokazano je da vijabilne stanice *L. acidophilus* uklanjaju OTA učinkovitije od neživih stanica. Soj *L. acidophilus* smajio je  $\geq 95\%$  OTA u puferiranim otopinama (pH 5,0) koje sadrže 0,5 i 1 mg OTA/L nakon inkubacije od 4 sata na 37 °C. Ostali sojevi *L. acidophilus* pokazali su samo umjereno smanjenje OTA što

sugerira da je učinkovitost uklanjanja OTA specifična za svaki soj. Zaključno, neke BMK adsorbiraju OTA mehanizmom vezanja na staničnu stijenku, iako može biti uključen i neki neotkriveni katabolizam. Otkrivanje ovog katabolizma OTA može biti moguće samo pomoću radioaktivno označenog OTA. Potencijal BMK kao sredstava za dekontaminaciju mikotoksina proučavan je u različitim fermentacijskim procesima. Intenzivno se proučava udio OTA, njegova sudbina tijekom proizvodnje vina i mogućnosti njegove degradacije. Mateo i suradnici (2007) i Varga i Kozakiewicz (2006) objavili su preglede koji se odnose na prisutnost i sudbinu OTA u grožđu, vinu i pivu. Iako većina istraživača promatra smanjenje udjela OTA u tekućoj fazi tijekom procesa vinifikacije, izvješća su kontroverzna u vezi s mehanizmom uklanjanja OTA. To je rezultat malolaktičke fermentacije uslijed djelovanja BMK ili adsorpcije na staničnu stijenku kvasca.

Najvažniji faktor koji utječe na kapacitet adsorpcije OTA kod mikroorganizama je sastav stanične stijenke (Chen i sur., 2018). U posljednjih nekoliko godina, znanstvena istraživanja usredotočena su na kvasac kao potencijalni adsorpcijski materijal za uklanjanje OTA. Smanjenje koncentracije OTA bazirano na adsorpcijskom mehanizmu, rezultat je fizikalnog vezanja za staničnu stijenku kvasca. Za vezanje OTA na staničnu stijenku odgovorni su  $\beta$ -glukan, njegov esterificirani oblik te manoproteini stanične stijenke kvasca (Quintela i sur., 2013; Petruzzi i sur., 2014b; Pereyra i sur., 2015; Piotrowska i sur., 2013). Piotrowska i suradnici (2013) su korištenjem vinskih i pekarskih sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dokazali kako je moguće smanjiti koncentraciju OTA u tekućem mediju od 21 do 35%. Daljnjim ispitivanjima, dokazali su da uklanjanje OTA ovisi o mediju i soju primijenjenog kvasca. Tako su na primjer, korištenjem termički inaktivirane biomase kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uspješno uklonili do 64% OTA iz različitih medija kao što su na primjer mošt bijelog grožđa i mošt crnog ribiza. Veći postotak dekontaminacije OTA korištenjem inaktiviranih stanica kvasca upućuje na fizičko vezanje i uklanjanje OTA iz medija.

Nekoliko vinskih praksi uključuje produljeni kontakt između kvasaca i vina, a istraživanja sugeriraju da bi kvasci mogli igrati značajnu ulogu u uklanjanju OTA na kraju procesa fermentacije (Petruzzi i sur., 2014a), a prisutnost OTA u vinu uglavnom je rezultat kontaminacije grožđa s toksikotvornim plijesnima i prije i poslije berbe.

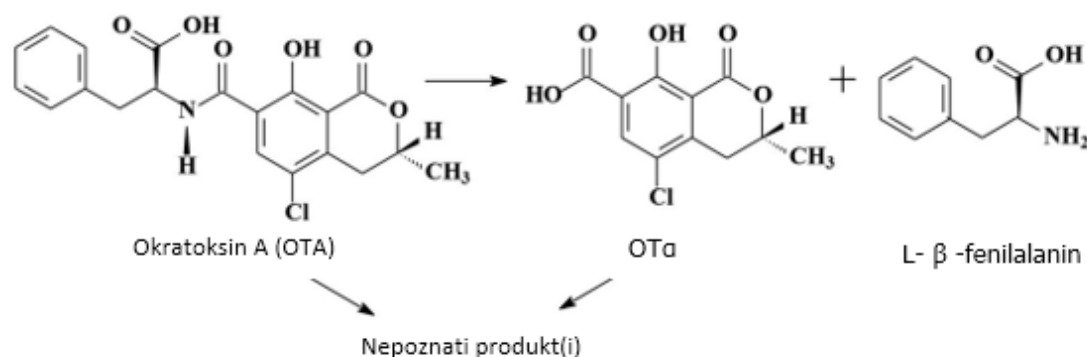
Tako su Bejaoui i suradnici (2004) ispitivali sposobnost uklanjanja OTA iz vina korištenjem termički i kiselinski inaktiviranih stanica. Njihovo istraživanje pokazalo je da tako inaktivirane stanice mogu vezati znatno veće količine OTA, u usporedbi sa živim stanicama kvasca. Zagrijavanje može uzrokovati denaturaciju proteina ili dovesti do stvaranja produkata Maillardovih reakcija. Kiseli uvjeti mogu utjecati na polisaharide oslobađanjem monomera, koji

se nakon propada glikozidnih veza dalje fragmentiraju u aldehide. Na taj način dolazi do povećanja površine za vezanje OTA i povećanja slobodnih mjesta adsorpcije, u usporedbi sa živim stanicama. Također, smanjenje debljine stijenke peptidoglikana i/ili povećanje pora pod utjecajem temperature i kiseline mogu učiniti i druga mjesta u stanicama kvasaca dostupnijima za adsorpciju OTA (El-Nezami i sur., 2002). Kinetička ispitivanja adsorpcije OTA pokazala su da je vezanje OTA brza reakcija budući da u prvih 5 minuta inkubacije veže 90% OTA, a ostaje adsorbiran tijekom 72 sata. Slično su dokazali i Petruzzi i suradnici (2014a) pokazavši da termički inaktivirane stanice mogu u potpunosti ukloniti OTA u samo 5 minuta.

Mozaffary i suradnici (2019) su ispitivali učinak količine kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i temperature fermentacije na smanjenje OTA u pšeničnom kruhu. Rezultati su pokazali da količina kvasca i temperatura fermentacije imaju značajan utjecaj na smanjenje OTA, a autori su predložili korištenje koncentracije kvasca od 2% w/w i primjenu temperature od 35 °C kako bi se razina OTA u pšeničnom kruhu značajno smanjila (Mozaffary i sur., 2019).

#### Degradacija ili biotransformacija OTA

Dokazano je da neki mikroorganizmi proizvode enzime koji mogu promijeniti strukturu mikotoksina i/ili proteina koji ih mogu spajati, čineći ih manje aktivnim (Juodeikiene i sur., 2012). Mikroorganizmi poput aktinomiceta (rod *Streptomyces*), bakterija (*Bacillus licheniformis*, *Phenylobacterium immobile*, *Pediococcus parvulus*), filamentoznih gljiva (*Aspergillus niger*, *A. japonicus*, *Aspergillus tubingensis*) i kvasaca (rodovi *Trichosporon* i *Rhodotorula* te *Saccharomyces cerevisiae* i *Kloeckera apiculata*) mogu razgraditi OTA. Najvažniji mehanizam biorazgradnje je razgradnja OTA do OTa (slika 3). Produkti razgradnje su L-β-fenilalanin i OTa koji nastaju hidrolizom amidne veze pomoću hidrolitičkih enzima kao što su karboksipeptidaza A, lipaza A, proteaza A, okratoksinaza.



**Slika 3.** Mehanizam biorazgradnje OTA (Chen i sur., 2018)

Rodrigues i suradnici (2009) izvijestili su da OTa nije toksičan, ili da je barem 500 puta manje toksičan od OTA. Međutim, postoji i drugi, više hipotetski postupak koji podrazumijeva razgradnju OTA hidrolizom laktonskog prstena. U ovom slučaju, konačni produkt razgradnje je otvoreni laktonski oblik OTA koji je slične toksičnosti kao OTA kada se daje štakorima, ali je manje toksičan za miševе i *Bacillus brevis*. Iako je ovo hipotetski, vjerojatno će se dogoditi, budući da su mikrobne laktonohidrolaze, koje provode sličnu transformaciju, česte (Juodeikiene i sur., 2012).

Istraživanje koje su proveli Ferenczi i suradnici (2014) je pokazalo da je kod mužjaka miševa, koji su prisilno oralno hranjeni s OTA, došlo do značajnog povećanja koncentracije OTA u krvi, transkripcijskih promjena u OTA ovisnim genima i histopatoloških promjena u bubrežnoj kori. Ove promjene primijećene kod mužjaka miševa nisu primijećene u skupini kod koje je OTA razgrađen u OTa tretiranjem OTA s *Cupriavidus basilensis* kroz 5 dana. Rodriguez i suradnici (2011) potvrdili su da je 0,04 µg/mL OTA u potpunosti pretvoreno u OTa pomoću *Brevibacterium* spp. sojeva koji se prenose hranom (*B. casei*, *B. linens*, *B. iodinum*, *B. epidermidis*). Ispitivani soj, *B. casei* bi mogao u potpunosti razgraditi OTA čak pri koncentraciji 40 µg/mL, što je 1000 puta veća koncentracija od uobičajene koncentracije OTA u hrani. Bejaoui i suradnici (2006) izvjestili su da se OTa dalje razgradio u nepoznate produkte. *Aspergillus niger*, *A. japonicus* i *A. carbonarius* mogu razgraditi 99%, 89% odnosno 83% OTA u OTa u roku 5 dana, a zatim je OTa pretvoren u nepoznat, ne identificiran spoj nakon 9 dana inkubacije. Mali broj autora je izvjestio da OTA može biti direktno razgrađen u nepoznate produkte (Chen i sur., 2018).

Razgradnja OTA istim mikroorganizmom u različitim medijima kulture ima različite manifestacije. Treba spomenuti atoksični *A. niger* koji može u potpunosti razgraditi OTA (2,5 µg/mL) u OTa u krutom mediju u roku 5 dana, dok je u tekućem mediju potrebno 7 dana. OTa u krutom mediju, dalje je razgrađen u nepoznati spoj u roku 7 dana. Između 55 izoliranih sojeva plijesni iz rodova *Rhizopus* i *Mucor*, mnogi *Rhizopus* sojevi su pokazali sposobnost razgradnje OTA (7,5 µg/mL) ispod granice detekcije u tekućem mediju u roku od 10 dana. *A. niger* je razgradio više od 90% OTA u roku 6 dana, dok je *R. stolonifer* var. *stolonifer* bilo potrebno više od 12 dana da razgradi oko 90% OTA u tekućem mediju, a samo 10 dana kako bi razgradio 96,5% OTA (7,5 µg/g) u navlaženoj pšenici. *Pediococcus parvulus* je uspio razgraditi 90% OTA (1 µg/mL) unutar 25 sati u MRS mediju, dok je samo 80% OTA (7 µg/L) razgrađeno nakon 6 sati inkubacije u moštu. Nadalje, nije bilo očite razgradnje OTA (7 µg/L) u sintetičkom vinu (Chen i sur., 2018).



Kisik je također jedan od važnih čimbenika koji utječu na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Pored određenih aerobnih mikroorganizama, neki anaerobni također mogu razgraditi OTA. Anaerobni *Eubacterium biforme*, izoliran iz svinjskih crijeva, razgradio je 77,1% OTA (0,1 µg/mL) u modificiranom M 98-5 tekućem mediju unutar 12 sati pri 39 °C. Ovaj soj bi mogao u potpunosti razgraditi 0,1 µg/mL OTA u čvrstom kukuruznom supstratu u roku od 24 sata pri 39 °C, što sugerira da bi anaerobni mikroorganizmi mogli biti prikladni za razvoj aditiva za krmiva koji bi djelovali u ciljanim životinjskim crijevima. Isto tako je važno naglasiti da je 26% OTA (0,1 µg/mL) uklonjeno u negativnoj kontroli (kukuruz) unutar 24 sata pri 39 °C. Štoviše, anaerobni *E. callanderi* je razgradio 95% OTA (0,2 µg/mL) do OTA unutar 6 sati (Chen i sur., 2018).

Neki mikroorganizmi imaju dvostruku funkciju, mogu razgraditi OTA i inhibirati biosintezu OTA. Nekoliko sojeva aktinomiceta iz roda *Streptomyces* razgradilo je 22,83 – 52,68% OTA (0,095 µg/mL) u roku 5 dana, a u isto vrijeme neke su adsorbirale 16,07 – 33,93% OTA (0,045 µg/mL) unutar 1 sata. Nadalje, ekspresija gena za biosintezu (*acOTAnrps*, *acpks* i *acOTApks*) i regulatornog gena (*veA*) za OTA u *A. carbonarius* inhibirana je pomoću određenih aktinobakterija iz roda *Streptomyces*. Neki mikroorganizmi imaju dvostruku funkciju razgradnje i adsorpcije OTA. Shi i suradnici (2014) su izvijestili da supernatant iz stanica bakterije *Bacillus subtilis* može razgraditi 97,6% OTA (6 µg/mL) unutar 24 sata, ali produkt razgradnje nije otkriven. S druge strane, žive i mrtve stanice *Bacillus subtilis* adsorbirale su 66,6 % odnosno 87,9 % OTA. Péteri i suradnici (2007) su potvrdili da *Phaffia rhodozyma* može razgraditi 90% OTA (7,5 µg/mL) u roku 15 dana i adsorbirati 23% OTA (3 µg/mL) u roku 2 dana (Chen i sur., 2018).

Enzimi za razgradnju OTA mogu biti sirovi ili pročišćeni. Prvo izvješće o biodetoksifikaciji OTA potječe iz 1969. godine, što je samo 4 godine nakon otkrića OTA. Za cijepanje OTA korištena je karboksipeptidaza A iz goveđe gušterače (Chen i sur., 2018).

### *Karboksipeptidaze*

Najvažniji detoksifikacijski put je hidroliza amidne veze između izokumarinskog ostatka i fenilalanina pomoću karboksipeptidaze. Poznata su dva razreda karboksipeptidaza koje su povezane sa razgradnjom OTA, karboksipeptidaza A (CPA) i karboksipeptidaza Y (CPY). Glavna razlika je upotreba cinkovog iona unutar proteina za hidrolizu peptida na C-terminalnom kraju aminokiselina (Vanhoutte i sur., 2016). CPA koristi jedan cinkov ion u proteinu za hidrolizu, dok je CPY karboksipeptidaza serin-tipa i ne sadrži cinkov ion u aktivnom mjestu. Prva peptidaza za koju je prijavljeno da može hidrolizirati OTA je CPA izolirana iz goveđe gušterače,

što je rezultiralo sposobnošću provođenja degradacijske reakcije s Km vrijednošću  $1.5 \cdot 10^{-4}$  pri 25 °C. Dokazano je da CPY izolirana iz *Saccharomyces cerevisiae* hidrolizira OTA s maksimalnom vrijednošću pri pH 5,6 i 37 °C. Njezina specifična aktivnost bila je vrlo niska s obzirom da je nakon 5 dana inkubacije samo 52% OTA pretvoreno u OTa. Isti enzim uspješno je imobiliziran na elektroaktivnim površinama kako bi se razvio biosenzorski sustav za izravno otkrivanje OTA u maslinovom ulju (Loi i sur., 2017). Gotovo svi sojevi za koje se navodi da razgrađuju OTA koriste ovaj put razgradnje što rezultira stvaranjem L-  $\beta$  -fenilalanina i OTa (Vanhoutte i sur., 2016). Iako je ovo vrlo direktan način smanjenja količine OTA u hrani, važno je naglasiti da učinkovitost razgradnje OTA ovisi o aktivnosti peptidaze. Nekoliko istraživanja napravljenih s *Pediococcus parvulus* i kvascima kao što je *Pfaffia rhodozyma*, pokazalo je da karboksipeptidaze imaju visoku optimalnu temperaturu (30 °C ili više) koja bi mogla ometati praktičnost primjene (Vanhoutte i sur., 2016). Karboksipeptidaza A dobiva se iz atoksikogenih sojeva *Aspergillus niger*. Isto tako određene bakterije koje pripadaju rodovima *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Butyribrio*, *Phenyllobacterium*, *Pleurotus*, *Bacillus* i *Acinetobacter* i određene gljive koje pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Phaffia*, *Penicillium*, *Saccharomyces* i *Rhizopus* mogu razgraditi OTA (Amézqueta i sur., 2009).

#### *Deoksigenaze, lipaze, amidaze i proteaze*

Ostali enzimi koji također mogu provesti ovu reakciju su deoksigenaze, lipaze, amidaze i nekoliko komercijalnih proteaza. Iako, ovisno o enzimu, međuprodukti mogu biti različiti, krajnji produkt je uvijek OTa (Vanhoutte i sur., 2016).

Pregledom različitih komercijalnih hidrolaza, pokazalo se da lipazni pripravak iz vrste *Aspergillus niger* hidrolizira OTA u fenilalanin i OTa. Izoliranje čistog proteina omogućeno je pročišćavanjem u jednom koraku pomoću izmjene anionskom kromatografijom. Lipazna priroda enzima potvrđena je ispitivanjem cijepanja p-nitrofenil palitata. Pročišćeni enzim je hidrolizirao 50  $\mu$ g OTA u OTa nakon 120 minuta inkubacije u 1 mL reakcijske smjese. Komercijalne proteaze za koje se navodi da hidroliziraju OTA su proteaza A iz *Aspergillus niger* i pankreatin iz svinjske gušterače. Ovi enzimi su pokazali značajnu hidrolaznu aktivnost pri pH 7,5 što je rezultiralo cijepanjem 87,3% i 43,4% od 1  $\mu$ g OTA nakon 25 sati inkubacije u 1 mL reakcijske smjese.

Protein, nazvan amidaza 2, kodiran je otvorenim okvirom čitanja iz *Aspergillus niger*. Ispitivanje razgradnje provedeno je u 300  $\mu$ L reakcijske smjese koja je sadržavala 160 ng/mL amidaze 2 i 50  $\mu$ g/mL OTA. Enzim je uspio smanjiti koncentraciju OTA za 83%. Amidaza 2

testirana je i u nekim prehrambenim proizvodima kao što su mlijeko i kukuruzno brašno. U mlijeku se sadržaj OTA smanjio sa 47 ppb do nemjerljive razine, a slično tome, koncentracija OTA u kukuruznom brašnu se smanjila sa 38 ppb na manje od 2 ppb nakon 20 sati inkubacije (Loi i sur., 2017).

### 3. ZAKLJUČCI

1. Brojna istraživanja dokazala su nefrotoksično, karcinogeno, imunotoksično, mutageno i neurotoksično djelovanje OTA te je zbog toga potrebno smanjiti koncentraciju OTA u prehrambenim proizvodima primjenom fizikalnih, kemijskih ili mikrobioloških metoda.
2. Fizikalne i kemijske metode imaju ograničenu primjenu zbog nedovoljno saznanja o produktima degradacije te zbog promjena nutritivnog sastava i organoleptičkih svojstava hrane.
3. Zbog navedenih nedostataka fizikalnih i kemijskih metoda, velik je interes i mogućnost primjene mikrobioloških metoda koje su ekološki prihvatljive i učinkovite, a imaju mali utjecaj na organoleptička svojstva i nutritivnu vrijednost hrane.
4. Mikroorganizmi koji mogu razgraditi i/ili adsorbirati OTA su aktinomicete, bakterije, plijesni, kvasci i alge.
5. Kvasci mogu vezati OTA za staničnu stijenku i na taj način smanjiti koncentraciju OTA u prehrambenim proizvodima, a kapacitet adsorpcije OTA ovisi o sastavu stanične stijenke.
6. Najvažniji mehanizam biorazgradnje pomoću mikroorganizama i enzima karboksipeptidaze, deoksigenaze, lipaze, amidaze i proteaze je razgradnja OTA do OTa koji nije toksičan.

## 4. POPIS LITERATURE

Amézqueta S., González-Peñas E., Murillo-Arbizu M., De Cerain, A.L. (2009) Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* **20**(4): 326-333.

Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A. (2004) Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 1038-1044.

Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A. (2006) Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: A potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and must. *FEMS Microbiology Letters* **255**: 203-208.

Boudra H., Le Bars P., Le Bars J. (1995) Thermostability of Ochratoxin A in Wheat under Two Moisture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(3): 1156–1158.

Bui-Klimke T.R., Wu F. (2015) Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**(13): 1860-1869.

Calado T., Fernández-Cruz M.L., Cabo Verde S., Venâncio A., Abrunhosa L. (2018) Gamma irradiation effects on ochratoxin A: degradation, cytotoxicity and application in food. *Food Chemistry* **240**: 463-471.

Chen W., Li C., Zhang B., Zhou Z., Shen Y., Liao X., Yang J., Wang Y., Li X., Li Y., Shen X.L. (2018) Advances in Biotoxification of Ochratoxin A-A Review of the Past Five Decades. *Frontiers in Microbiology* **9**: 1-11.

Del Prete V., Rodriguez H., Carrascosa A.V., Rivas B.D.L., Garcia-Moruno E., Munoz R. (2007) In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* **70**(9): 2155-2160.

Domijan A.-M., Pleadin J., Mihaljević B., Vahčić N., Frece J., Markov K. (2015) Reduction of ochratoxin A in dry-cured meat products using gamma-irradiation. *Food Additives and Contaminants: Part A* **32**(7): 1185-1191.

El Khoury A., Atoui A. (2010) Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* **2**(4): 461-493.

El-Nezami H., Polychronaki N., Salminen S., Mykkänen H. (2002) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3545–3549.

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

European Commission (2010) Regulation (EC) No. 105/2010 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union* **35**: 7–8.

European Commission (2012) Regulation (EC) No. 594/2012 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non-dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **176**: 43–45.

European Commission (2015) Regulation (EU) No. 1137/2015 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards the maximum level of ochratoxin A in *Capsicum* spp. spices. *Official Journal of the European Union* **185**: 11–12.

Ferenczi S., Cserhati M., Krifaton C., Szoboszlay S., Kukolya J., Szoke Z., Koszegi B., Albert M., Barna T., Mezes M., Kovacs K.J., Kriszt B. (2014) A New Ochratoxin A Biodegradation Strategy Using *Cupriavidus basilensis* Or16 Strain. *PLoS ONE* **9**(10):1-10.

Giovati L., Magliani W., Ciociola T., Santinoli C., Conti S., Polonelli L. (2015) AFM1 in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination. *Toxins* **7**: 4330-4349.

HAH (2012) Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatska <<https://www.hah.hr/znanstveno-misljenje-mikotoksini-u-hrani-za-zivotinje/>>. Pristupljeno 27. ožujka 2020.

HAPIH (2013) Što su mikotoksini?, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatska <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>>. Pristupljeno 27. ožujka 2020.

Hathout S.A., Aly S.E. (2014) Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology* **64**(3): 905-909.

Heussner A.H., Bingle L.E.H. (2015) Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins* **7**(10): 4253-4282.

Holmberg T., Thauvander A., Hult K. (1988) Ochratoxin A as a suppressor of mitogen-induced blastogenesis of porcine blood lymphocytes. *Acta Veterinaria Scandinavica* **29**: 219-223.

Huertas-Perez J.F., Arroyo-Manzanares N., Garcia-Campana A.M., Gamiz-Garcia L (2017) Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **57**(16): 3405-3420.

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 Risks to Humans* **56**: 245-395.

Juodeikiene G., Basinskiene L., Bartkiene E., Matusевичius P. (2012) Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewables using fermentation processes. U: Structure and Function of Food Engineering, Ayman A.E., ur., InTech, str. 171-204.

Loi M., Fanelli F., Liuzzi V.C., Logrieco A.F., Mulè G. (2017) Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins* **9**(4): 1-31.

Markov K., Pleadin J., Bevardi M., Vahčić N., Sokolić-Mihalak D., Frece J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* **34**(2): 312-317.

Mateo R., Medina A., Mateo E.M., Mateo F., Jimenez M. (2007) An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology* **119** (1-2): 79-83.

Mozaffary P., Milani J.M., Heshmati A. (2019) The influence of yeast level and fermentation temperature on Ochratoxin A decrement during bread making. *Food Science and Nutrition* **7**(6): 2144-2150.

Pepeljnjak S., Šegvić M. (2004) An Overview of Mycotoxins and Toxigenic Fungi in Croatia. U: An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe, 1. izd., Logrieco A., Visconti A., ur., Kluwer Academic Publisher, str. 33-50.

Pereyra C.M., Cavaglieri L.R., Keller K.M., Chiacchera S.M., Rosa C.A.D.R., Dalcerro A.M. (2015) *In vitro* Ochratoxin A adsorption by commercial yeast cell walls. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* **37**(1): 1-4.

Peteri Z., Teren J., Vagvikgyi C., Varga J. (2007) Ochratoxin A degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology* **24**: 205-210.

Petruzzi L., Corbo M.R., Sinigaglia M., Bevilacqua A. (2014a) Yeast cells as adsorbing tools to remove ochratoxin A in a model wine. *International Journal of Food Science and Technology* **49**(3): 936–940.

Petruzzi L., Sinigaglia M., Corbo M. R., Campaniello D., Speranza B., Bevilacqua A. (2014b) Decontamination of ochratoxin A by yeasts: possible approaches and factors leading to toxin removal in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**(15): 6555–6567.

Pfliegler W.P., Pusztahelyi T., Pócsi I. (2015) Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology* **55** (7): 805-818.

Piotrowska M., Nowak A., Czyzowska A. (2013) Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *European Food Research and Technology* **236**(3): 441–447.

Piotrowska M., Zakowska Z. (2005) The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish journal of microbiology* **54**(4): 279-286.

Pleadin J., Frece J., Markov K. (2015) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje Fusarium mycotoxins in food and feed. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **10**(1-2): 6–13.



Pleadin J., Vasilj V., Petrović D. (2018) Mikotoksini – Pojavnost, prevencija i redukcija. Sveučilište u Mostaru, Mostar.

Pleadin J., Zdravec M., Frece J., Rezić T., Kmetič I., Markov K. (2019) Biološka detoksifikacija mikotoksina: dosadašnje spoznaje i budući aspekti. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **14**(1-2): 39-46.

Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2008) *Narodne novine* **154** (NN 154/2008).

Rodrigues I., Bidner E.M., Schatzmayr G. (2009) Microorganisms and their enzymes for detoxifying mycotoxins posing a risk to livestock animals. U: *Mycotoxin prevention and Control in Agriculture*, 1. izd., Appell M., Kendra D.F., Trucksess M.W., ur., American Chemical Society, str. 107-117.

Rodriguez H., Reveron I., Doria F., Constantini A., De Las Rivas B., Munoz R., Garcia-Moruno E. (2011) Degradation of Ochratoxin A by *Brevibacterium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 10755-10760.

Shi L., Liang Z., Li J., Hao J., Xu J., Huang K., Tian J., He X., Xu W. (2014) Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW14. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**(9):1879-1885.

Quintela S., Villaran M.C., de Armentia I.L., Elejalde E. (2013) Ochratoxin A removal in wine: a review. *Food Control* **30**(2): 439-445.

Sumbal G.A., Shar Z.H., Sherazi S.T.H., Sirajuddin, Nizamania S.M., Mahesara S.A. (2016) Decontamination of poultry feed from ochratoxin A by UV and sunlight radiations. *Journal of the science of food and agriculture* **96**(8): 2668–2673.

Van der Merve K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B., Theron J.J. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature* **205**: 1112-1113.

Vanhoutte I., Audenaert K., De Gelder L. (2016) Biodegradation of Mycotoxins: Tales from Known and Unexplored Worlds. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1-20.

Varga J., Kozakiewicz Z. (2006) Ochratoxin-A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology* **17**(2): 72-81.

Zain M. E. (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* **15**(2): 129-144.

## 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.*

---

Lucija Vukšić