

Uklanjanje mikotoksina pomoću organskog otpada

Logarušić, Iva

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:919018>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Iva Logarušić

7533/BT

Uklanjanje mikotoksina pomoću organskog otpada

Modul: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2020.

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

Uklanjanje mikotoksina pomoću organskog otpada

Iva Logarušić, 0058212257

Sažetak: Mikotoksini su štetni metaboliti nekih vrsta plijesni koji se mogu naći u brojnim namirnicama i krmivu. Kontaminacija mikotoksinima može rezultirati ekonomskim gubicima te toksično djelovati na zdravlje ljudi. Od primarne je važnosti suzbiti kontaminaciju mikotoksinima što se ostvaruje fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama. Danas se stavlja veliki naglasak na biološke metode koje se temelje na biotransformaciji i adsorpciji mikotoksina mikrobnim kulturama i njihovim staničnim komponentama. U ovom radu navedeni su rezultati dosadašnjih istraživanja uklanjanja mikotoksina pomoću organskog otpada kao biosorbensa

Ključne riječi: mikotoksini, plijesni, kontaminacija, biosorbensi, organski otpad

Rad sadrži: 26 stranica, 3 slike, 56 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: Iva Čanak, mag. ing.

Datum obrane: Rujan, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology**

Removing of mycotoxins using organic waste

Iva Logarušić, 0058212257

Sažetak: Mycotoxins are harmful metabolites of some types of molds that can be found in numerous foods and feeds. Contamination with mycotoxins can result in economic losses and have a toxic effect on human health. It is of primary importance to reduce mycotoxin contamination, which is possible by physical, chemical and biological methods. Today, great emphasis is placed on biological methods based on biotransformation and adsorption of mycotoxins by microbial cultures and their cellular components. This paper presents the results of previous research on the removal of mycotoxins using organic waste as a biosorbent.

Keywords: mycotoxins, molds, contamination, biosorbents, organic waste

Thesis contains: 26 pages, 3 figures, 56 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: PhD. Ksenija Markov, Full professor

Technical support and assistance: Iva Čanak, mag. ing.

Defence date: September, 2020

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Mikotoksini.....	2
2.1.1 Aflatokisni.....	2
2.1.2. Aflatoksin B1 (AFB1).....	3
2.1.3. Okratoksini.....	4
2.1.3.2. Okratoksin A (OTA).....	4
2.2. Metode uklanjanja mikotoksina.....	5
2.3 Fizikalne metode.....	6
2.4. Kemijske metode.....	8
2.5. Biološke metode.....	9
2.5.1. Inhibicija rasta plijesni i proizvodnje mikotoksina.....	10
2.5.2. Detoksifikacija mikotoksina degradacijom ili vezanjem.....	12
2.5.3. Uklanjanje pomoću organskog otpada.....	15
3. ZAKLJUČAK.....	20
4. POPIS LITERATURE.....	21

1. UVOD

Poljoprivredna dobra širom svijeta su često kontaminirana mikotoksinima što predstavlja značajan problem za sigurnost hrane, rizik za zdravlje i dobrobit ljudi i životinja uz negativan utjecaj na gospodarstvo diljem svijeta. Prevencija rasta plijesni na poljoprivrednim proizvodima i izbjegavanje kontaminacije mikotoksinima je i dalje od velike važnosti.

Razvoj i primjena učinkovitih metoda dekontaminacije je od velikog značaja. Postupci dekontaminacije trebaju ukloniti, uništiti ili inaktivirati mikotoksine, ne smiju dovesti do nastanka toksičnih metabolita, nusproizvoda te trebaju zadržati hranjivu vrijednost hrane, rezultirajući što manjim izmjenama tehnoloških svojstava proizvoda. Metode dekontaminacije mogu se kategorizirati u fizičke, kemijske ili biološke metode. Neke od ovih metoda su se pokazale uspješnima, druge manje, dok su se neke pokazale vrlo uspješnima, ali ih je teško provesti na komercijalnoj razini (Leibetseder, 2006).

Biološke metode uklanjanja sve se više proučavaju jer se smatraju sigurnijima u odnosu na fizikalne i kemijske metode. Mogućnosti uklanjanja mikotoksina mikrobnim kulturama i njihovim staničnim komponentama nameću se kao moguća alternativa fizikalnim i kemijskim metodama (Pleadin i sur., 2017). Iako postoji mnogo inovativnih strategija za smanjenje mikotoksina u hrani i krmivu jedan od najčešći pristupa njihovog uklanjanja uključuje upotrebu različitih veziva, odnosno adsorbenta (Bočarov Stančić i sur., 2018).

Jedna od vrsta adsorbenta je otpadna biomasa agroindustrijskog i urbanog porijekla što predstavlja ekonomski i ekološki isplativ materijal zahvaljujući svom kemijskom sastavu, pristupačnosti, obnovljivoj prirodi i cijeni.

Cilj ovog rada je napraviti kratki pregled metoda dekontaminacije mikotoksina te navesti dosadašnji napredak istraživanja u uklanjanju mikotoksina pomoću organskog otpada.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mikotoksini

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni. Riječ mikotoksin dolazi od grčke riječi „myces“, odnosno gljiva i latinske riječi „toxicum“ što znači otrov (Turner i sur., 2009). Danas je poznato nekoliko stotina mikotoksina koje proizvode plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Trichotecium*.

Plijesan odgovorna za sintezu mikotoksina može proizvoditi i više od jednog toksina, a određene toksine mogu sintetizirati različiti rodovi plijesni (Duraković i Duraković, 2003). Njihova biosinteza ovisi o vrsti toksikotvorne plijesni, o klimatskim i okolišnim uvjetima te o fizikalno-kemijskim faktorima. Vrlo teško ih je jedinstveno sistematizirati zbog njihove različite kemijske strukture, biokemijskog puta sinteze, podrijetla te bioloških učinaka (Bennett i Klich, 2003). Do danas je poznato preko 400 vrsta mikotoksina, a kao kontaminanti hrane najznačajniji su aflatoksini (aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin M1 (AFM1), okratoksini (okratoksin A), zearalenon (ZEA), fumonizini (fumonizin B1, fumonizin B2), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (Hassan i sur., 2015).

Mikotoksini su jedni od najtoksičnijih onečišćivača hrane koji predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje i gospodarski problem širokih razmjera. Induciraju akutne i kronične toksične učinke kod ljudi i životinja. Glavni izvor mikotoksina predstavljaju različite vrste žitarice i proizvodi na bazi žitarica, orašasti plodovi, začini, sušeno voće, kava, čajevi te proizvodi životinjskog podrijetla (Pleadin i sur., 2017).

2.1.1 Aflatoksini

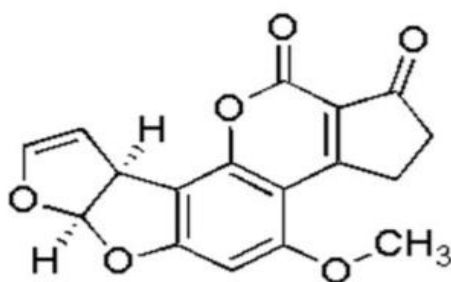
Aflatoksini su prvi puta opisani u Engleskoj 1960. godine, a smatraju se najpoznatijim i najtoksičnijim mikotoksinima. Metaboliti su plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium* te nekih pripadnika roda *Rhizopus* (Perši i sur., 2013). Najznačajnije plijesni koje proizvode aflatoksine su *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* (Bennet i Klich, 2003). Ove plijesni vrlo često kontaminiraju velik broj poljoprivrednih namirnica i krme.

Među 18 identificiranih različitih vrsta aflatoksina, glavni članovi su aflatoksini B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), M1 (AFM1) i M2 (AFM2) koje proizvode *A. flavus* i/ili *A. parasiticus*. Sojevi *A. flavus* mogu varirati od netoksičnih do visoko toksičnih te češće proizvode AFB1 nego AFG1. Sojevi *A. parasiticus* općenito imaju manje varijacije u razini toksičnosti te proizvode AFB1 i različite količine AFB2, AFG1 i AFG2 (Dors i sur., 2011). *A. flavus* producira aflatoksine B1 i B2 na žitaricama poput kukuruza, dok *A. parasiticus* može producirati aflatoksine B1, B2, G1 i G2 na uskladištenim uljaricama.

Aflatoksini M1 i M2 su hidroksilirani metabolički produkti aflatoksina B1 i B2 (Perši i sur., 2013). Prirodni su fluorescirajući spojevi, vidljivi u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Imena aflatoksina B i G nastala su upravo prema njihovom fluorescirajućem svojstvu; B (blue) za plavu i G (green) za zelenu fluorescenciju. Termostabilni su, a u prirodnom stanju vezani su uz proteine koji ih štite od vanjskih utjecaja. Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine. Topivi su u organskim otapalima (alkohol, aceton, kloroform), a gotovo netopljivi u vodi (Perši i sur., 2013).

2.1.2. Aflatoksin B1 (AFB1)

Od mikotoksina iz skupine aflatoksina najtoksičniji je aflatoksin B1 (Domijan i Peraica, 2010). AFB1 se može naći u brojnim namirnicama biljnoga i životinjskoga podrijetla kao što su žitarice, orašasti plodovi, uljarice i začini koji rastu u toplim i vlažnim uvjetima (Gibson i sur., 2011). Prema kemijskoj strukturi AFB1 je derivat furanokumarina (Fetaih i sur., 2014) čija je kemijska struktura prikazana slici 1. Podnosi izuzetno visoke temperature te se stoga ne može ukloniti termičkom obradom namirnice (Allah Ditta i sur., 2019).



Slika 1. Kemijska struktura AFB1 (Gibson i sur., 2011)

Toksično djelovanje AFB1

Mikotoksikoze uzrokovane aflatoksinima nazivaju se aflatoksikoze i mogu biti akutne ili kronične. Ciljni organ djelovanja aflatoksina su jetra, a uz akutni i kronični toksični učinak, također imaju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje (Peraica i sur., 2014).

AFB1 je zbog svoga dokazanog karcinogenog učinka na životinje i ljude, prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer - IARC) svrstan u Skupinu 1 kao jedna od najkancerogenijih tvari (Perši i sur., 2013). Izraženost promjena ovisna je o dozi, dužini izloženosti, životinjskoj vrsti, uzgoju i

uhranjenosti. Trovanje s velikim dozama AFB1 može imati smrtni ishod, dok subletalne doze uzrokuju kronično trovanje. Dugotrajna izloženost niskim dozama uzrokuje maligne tumore, prvenstveno primarni karcinom jetre. Istraživanja načina djelovanja AFB1 dokazuju njegov inhibicijski učinak na replikaciju DNK i RNK te na sintezu proteina (Domaćinović i sur., 2012). AFB1 može uzrokovati karcinom jetre i drugih organa u ljudi i stoke što je i dokazano u nekoliko životinjskih vrsta, pri čemu su prvi simptomi gubitak apetita i gubitak tjelesne mase (Pleadin i sur., 2014).

Ljudi su izloženi AFB1 izravnom konzumacijom onečišćene hrane, ili neizravno konzumacijom proizvoda životinjskoga podrijetla, poput mlijeka i jaja životinja koje su konzumirale krmivo kontaminirano AFB1 (Pleadin i sur., 2017). Neke od najčešće kontaminirane hrane i krmiva uključuju kikiriki, orašaste plodove, smokve, kukuruz, rižu, začine i suho voće (Martinez-Miranda i sur., 2019). Aflatoksin B1 i B2 se u mliječnim žlijezdama sisavaca metaboliziraju u aflatoksini M1 i M2, koji se mogu naći u mlijeku i mliječnim proizvodima. Budući da je stabilan tijekom pasterizacije i sterilizacije, izloženost relativno malim količinama AFM1 može značajno narušiti ljudsko zdravlje, osobito djece koja su glavni konzumenti mlijeka i mliječnih proizvoda (Domaćinović i sur., 2012).

2.1.3. Okratoksini

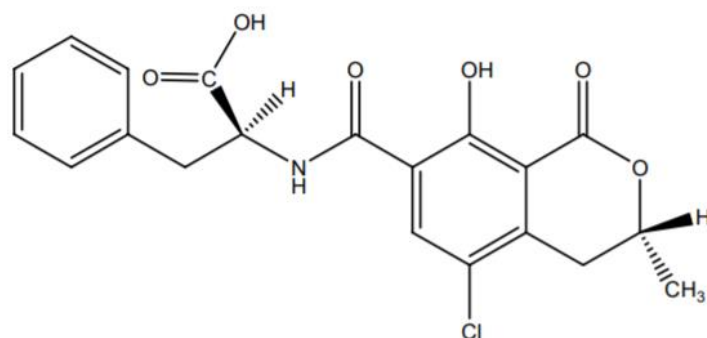
Okratoksini (OTA, OTB, OTC, OTa) su grupa mikotoksina koje proizvode primarno plijesni *Aspergillus* i *Penicillium* vrste. Spomenute plijesni kontaminiraju raznovrsne poljoprivredne usjeve uzrokujući negativne posljedice na zdravlje ljudi i životinja. Najtoksičniji predstavnik ove skupine je okratoksin A (OTA) koji je izoliran iz plijesni *Aspergillus ochraceus* i identificiran 1965. godine u Južnoj Africi (Delaš, 2010).

2.1.4. Okratoksin A (OTA)

Okratoksin A (OTA) je mikotoksin koji se prirodno nalazi u velikom broju poljoprivrednih proizvoda širom svijeta, kao što su žitarice, suho voće, vino i kava. Proizvodi ga nekoliko različitih plijesni, uključujući *A. ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* i *Penicillium verrucosum*. Ove plijesni rastu u širokom rasponu temperature i aktiviteta vode te kontaminiraju različite poljoprivredne proizvode. Kontaminacija se uglavnom događa kao rezultat lošeg skladištenja robe i nedovoljne poljoprivredne prakse tijekom sušenja hrane.

OTA je bezbojan do bijeli prah kristalične strukture. Pod UV svjetlom pokazuje intenzivnu zelenu fluorescenciju u kiselom mediju, a u alkalnim uvjetima plavu fluorescenciju. U kiselom i neutralnom pH području topiv je u organskim otapalima (alkoholi, ketoni, kloroform) te je slabo topiv u vodi. U alkalnim uvjetima topiv je u vodenoj otopini natrijevog

hidrogenbikarbonata. Jedna od značajnih karakteristika OTA je njegova stabilnost pri visokim temperaturama što ukazuje na to da jednom kada su namirnice kontaminirane ovim mikotoksinom vrlo teško ga je ukloniti (Perši i sur., 2013). Kemijska struktura okratoksina A je 7-karboksi-5-kloro-8-hidroksi-3,4-dihidro-(3R)-metil izokumarin, amidno vezan s L-βfenilalaninom, a prikazana je na slici 2 (El Khoury i Atoui, 2010).



Slika 2. Kemijska struktura OTA (El Khoury i Atoui, 2010)

Toksično djelovanje OTA

OTA može djelovati prvenstveno nefrotoksično, a pri izrazito visokim dozama i teratogeno, embriotoksično, imunosupresivno i karcinogeno. Dokazano je da uzrokuje nastanak tumora, stvara DNK adukte i kromosomske aberacije u bubrezima. Toksičnost OTA široko varira ovisno o vrsti, spolu i načinu primjene, a dokazana je u svim životinjskim vrstama, posebno u organima kao što su: bubrezi, jetra i krvožilni sustav (Delaš, 2010). Može se naći u različitim namirnicama, uključujući žitarice, konzervirano meso, svježe i sušeno voće i sir. OTA može biti genotoksičan izravno oštećujući DNK te kancerogeran za bubrege (EFSA, 2020).

OTA se smatrao jedinim uzročnikom odgovornim za bolest Balkanske endemske nefropatije (BEN), teške kronične, obostrane bolesti bubrega te u korelaciji s time i tumora urinarnog trakta, a čija se pojavnost prati u nekim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Bugarske, Rumunjske i Srbije (Leszkowicz i Manderville, 2007). Prema klasifikaciji IARC spadaju u skupinu 2b (potencijalni karcinogen u ljudi).

2.2. Metode uklanjanja mikotoksina

Zbog činjenice da prisutnost mikotoksina u hrani može biti opasna po ljudsko zdravlje i izazvati ogromne gospodarske probleme, sve je veći naglasak na razvoju metoda redukcije mikotoksina kojima bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane. Izuzetno ih je

teško ukloniti ili eliminirati kada uđu u lanac proizvodnje hrane zadržavajući svoja toksična svojstva (Kolosova i Stroka, 2011), dok sama učinkovitost metoda uklanjanja ovisi o brojnim parametrima. Od tih parametara najznačajniji su svojstva proizvoda, njihov sastav, sadržaj vlage i razina onečišćenja (Pleadin i sur., 2014).

Primarne strategije za smanjenje rizika od kontaminacije mikotoksinima uključuju provođenje određenih postupaka na samoj poljoprivrednoj površini kao što su rotacija usjeva, obrađivanje tla, suzbijanje korova i insekata, pažljiva uporaba fungicida. Potrebna je posebna briga i nakon berbe, odnosno žetve kao i pri transportu te skladištenje u suhim i hladnim uvjetima. Postoji nekoliko pristupa za rješavanje problema koji uključuju snižavanje koncentracije mikotoksina u kontaminiranim usjevima fizičkim ili kemijskim metodama, odnosno smanjenje unosa mikotoksina u životinje dodavanjem aditiva krmivu koja djeluju na principu biološke dekontaminacije putem mikroba ili enzima te na temelju adsorpcije mikotoksina na vezivna sredstva, adsorbense u probavnom sustavu životinja (Fruhauf i sur., 2011). Prednosti smanjenja količine mikotoksina treba odvagovati u odnosu na gubitak materijala i hranjivih tvari kojima ovakvi postupci mogu rezultirati (Pleadin i sur., 2017). Metode redukcije mikotoksina mogu se podijeliti na kemijske, biološke i fizikalne.

2.3. Fizikalne metode

Koncentraciju mikotoksina u uskladištenim namirnicama moguće je smanjiti fizikalnim metodama kao što su sortiranje, flotacija, sortiranje prema gustoći, blanširanje i prženje, a također podrazumijevaju ekstrakciju pomoću otapala, adsorpciju, termičku obradu ili uklanjanje ozračivanjem (Pleadin i sur., 2018).

Sortiranje i prosijavanje

Neobrađene žitarice često sadrže različite primjese, ispucana i oštećena zrnja koja predstavljaju problem budući da je razina mikotoksina u njima obično najveća. Nakon žetve provodi se prva faza prerade poljoprivrednih dobara koja obično uključuje sortiranje, pranje ili mljevenje (Grenier i sur., 2014). Izvorna metoda sortiranja podrazumijevala je sortiranje zrnja u rinfuzi korištenjem centrifugalne sile i flotiranja u struji zraka. Zatim je uvedeno optičko sortiranje, a temelji se na nizu optičkih senzora koji omogućuju prepoznavanje zrna koje se svojom bojom razlikuje od drugih. Time se pokreće magnetski ventil koji omogućuje odstranjivanje takvog zrna iz struje čime se smanjuje mogućnost kontaminacije. Problem predstavlja kontaminacija poljoprivrednih proizvoda mikotoksinima koji nemaju vidljivih znakova kontaminacije što uzrokuje ograničenje metode optičkoga sortiranja kao metode za

redukciju mikotoksina. Uklanjanje pljesnivog i ispučanog zrnja te prljavštine može se postići i putem prosijavanja (Pleadin i sur., 2018).

Termička obrada

Izlaganje povišenoj temperaturi odnosno termička obrada jedan je od najvažnijih procesa kojim se može utjecati na sadržaj mikotoksina u gotovim prehrambenim proizvodima. Termička obrada hrane uključuje reakcije pretvorbe i nastanak novih manje toksičnih spojeva (Karlovsky i sur., 2016). Većina mikotoksina ima termičku stabilnost pa je potrebna obrada na višim temperaturama koje se koriste pri prženju, ekstruziji i pečenju kako bi se umanjila kontaminacija mikotoksinima.

Bullerman i Bianchini (2007) su dokazali da je ekstruzijom moguće smanjiti razinu aflatoksina za 50-80 % ovisno o vlažnosti zrnja žitarica i temperaturi, dok se sam proces može pospješiti tretmanom lužinom. Uvjeti prženja, temperatura i vrijeme, uvelike ovise o vrsti namirnice i načinu uporabe što uzrokuje varijacije u količini uklonjenog AFB1. Prženjem pistacija na 90–150 °C tijekom 30–120 minuta uzrokuje smanjenje aflatoksina od 17 do 63 % (Yazdanpanah i sur., 2005). Raters i Matissek (2008) su uspjeli uništiti AFB1 obradom na temperaturama iznad 160 °C, pri čemu su koristili soju kao matriks što je ubrzalo proces. Uklanjanje okratoksina A uvelike ovisi o proizvodu kojeg ovaj mikotoksin kontaminira. Uklanjanje mikotoksina u mesu i mesnim proizvodima pretežno se odnosi na uklanjanje OTA koji pokazuje izrazitu stabilnost pri visokim temperaturama te nakon tretmana kiselinom (Pleadin i sur. 2017). Kuhanjem (100 °C) mesnih proizvoda kontaminiranih okratoksinom A postignuta je redukcija od 7,4 %, a prženjem (170 °C) redukcija od 12,6 %. Značajna redukcija ovog mikotoksina od 75,8 % postignuta je prženjem na temperaturama 190-220 °C u razdoblju od 60 minuta (Pleadin i sur., 2014). Oliveira i sur. (2013) su uspjeli postupkom prženja smanjiti sadržaj OTA u zrnima kave za 97 %. Razgradnja OTA u pšenici putem zagrijavanja i ekstruzije nije značajno učinkovita.

Ozračivanje

Ozračivanje prehrambenih proizvoda je jedna od često korištenih metoda kojom se postiže uklanjanje različitih onečišćivača. Energiju zračenja apsorbiraju i sastojci hrane i kontaminanti, dovodeći do različitih reakcija koje mijenjaju njihovu molekularnu strukturu. Postoje dvije vrste zračenja, neionizirajuća (UV, mikrovalna, solarna) i ionizirajuća (gama) zračenja (Pleadin i sur., 2018). Ova zračenja mogu smanjiti sadržaj patogenih mikroorganizama u hrani ili ih potpuno ukloniti te mogu djelomično smanjiti sadržaj mikotoksina u hrani (Karlovsky i sur., 2016).

Herzallah i sur. (2008) proveli su istraživanja koja pokazuju da se razina aflatoksina u žitaricama može smanjiti za 40 % izravnim izlaganjem sunčevoj svjetlosti u razdoblju od 3 sata, a nakon izlaganja od 30 sati za do 75 %. Također su ustanovili da je izlaganje sunčevoj svjetlosti učinkovitije od 10-minutnoga zagrijavanja u mikrovalnoj pećnici što uzrokuje smanjenje razine mikotoksina od 32 %, odnosno da je učinkovitije od ozračivanja gama-zrakama u dozi od 25 kGy pri čemu se razina mikotoksina smanji za 43 %.

2.4. Kemijske metode

Uporaba kemikalija u svrhu inaktivacije, vezivanja ili uklanjanja mikotoksina uključuje tretman kiselinama (octena kiselina, fosforna, mravlja kiselina, propionska kiselina, natrijev hipoklorit), bazama (amonijev hidroksid, natrijev hidroksid, kalcijev hidroksid), reducensima (natrijev bisulfit, šećeri: D-glukoza ili D-fruktoza) te uporabu oksidansa (ozon, vodikov peroksid) (Čolović i sur., 2019). Primjenom kemikalija dolazi do konverzije mikotoksina u druge manje toksične spojeve, kao što su kiseline, lužine, oksidansi, plinovi i bisulfiti, no moguća je konverzija i u toksičnije spojeve. Ključno je da tretman ne narušava nutritivna i senzorska svojstva proizvoda, što se primjenom ovih metoda teško postiže. Kemijske metode se smatraju nepraktičnim i nepoželjnim zbog uvjeta tlaka i temperature pri kojima se reakcije provode, škodljivosti zbog stvaranja toksičnih ostataka te negativnog utjecaja na nutritivna, funkcionalna i senzorska svojstva proizvoda (Pleadin i sur., 2018). Iako kemijske metode redukcije mogu u velikoj mjeri smanjiti kontaminaciju mikotoksinima, one ipak ne zadovoljavaju sve zahtjeve FAO-a, ograničavajući na taj način njihovu široku upotrebu (Grenier i sur., 2014). Stoga su kemijske metode redukcije mikotoksina do danas odobrene isključivo za uklanjanje izrazito toksičnog mikotoksina AFB1 i to samo za krmiva (Pleadin i sur., 2018).

Tretman kiselinama

Većina do sad poznatih mikotoksina je otporna na slabe kiseline, dok jake kiseline imaju različit utjecaj što dovodi do raznovrsnih učinka odnosno do nastanka novih spojeva. Tretman jakim kiselinama uništava biološku aktivnost AFB1 i AFG1 tako što uzrokuje konvertiranje u monohidroksilirane derivate AFB2a, odnosno AFG2a. Pri tretmanu žitarica, uz primjenu razrijeđene octene, limunske i mliječne kiseline u uvjetima sličnim kuhanju, najznačajniji učinak pokazuje mliječna kiselina, koja AFB1 konvertira u AFB2, u tragovima i u AFB2a, kao glavni produkt (Pleadin i sur., 2018). Određene kiseline, male molekularne mase, kao što su karboksilne kiseline, osim za uklanjanje aflatoksina mogu se koristiti za inhibiciju rasta plijesni, odnosno kao konzervansi (Karlovsy i sur., 2016).

Tretman lužinama

Jedna od čestih metoda tretmanom lužinama je razgradnja aflatoksina pomoću amonijaka. Temelji se na činjenici da aflatoksini u alkalnim uvjetima postaju nestabilni. Učinkovitost procesa amonifikacije ovisi o temperaturi, tlaku, količini vlage, trajanju i supstratu, odnosno vrsti mikotoksina (Pleadin i sur., 2018). U posljednjih nekoliko godina u određenim zemljama, amonijak se uspješno koristio za dekontaminaciju zrna kukuruza, posebno radi smanjenja količine aflatoksina u krmivima. Amonijak je obično najučinkovitiji prema AFB₁, pri čemu nastaje aflatoksin D₁, koji je znatno manje toksičan od aflatoksina B₁ (Čolović i sur., 2019). Amonifikacijom je moguće smanjiti razinu aflatoksina u kukuruzu za više od 75 % (Park i sur., 2001). Također je ovom metodom moguće gotovo potpuno razgraditi OTA prisutan u kukuruzu, pšenici i ječmu. Postupak amonifikacije ne dovodi do formiranja i nakupljanja toksičnih produkata razgradnje mikotoksina u poljoprivrednim proizvodima, ali su uočene promjene senzornih i nutritivnih svojstava što ograničava uporabu ove metode (Varga i sur., 2010).

Iako su istraživanja provedena u zadnjih par desetljeća dala zadovoljavajuće rezultate, amonifikacija prehrambenih proizvoda još nije odobrena niti u jednoj državi Europske unije (Pleadin i sur., 2018).

Uporaba oksidansa

Uporaba oksidansa, primjerice ozona omogućuje djelomičnu razgradnju aflatoksina prisutnih u različitim namirnicama. Aflatoksini poput AFB₁, AFM₁ i AFG₁ koji u dihidrofuranskom prstenu sadrže dvostruku vezu, osjetljiviji su na primjenu ozona i drugih oksidansa u odnosu na druge vrste aflatoksina. Elektrofilnom reakcijom između ozona i dvostruke veze između C₈-C₉ u furanskome prstenu aflatoksina te slijedom reakcija dolazi do stvaranja primarnih ozonida te pretvorbe u derivate kao što su aldehidi, ketoni i organske kiseline (Pleadin i sur., 2018). Proctor i sur. (2014) su u svome istraživanju ustanovili da se nakon tretmana ozonom u trajanju od 10 minuta pri temperaturi od 75 °C razine AFB₁ u kikirikiju može smanjiti za 77 %.

Uporaba reducensa

Jedan od najčešćih reducensa za uništavanje mikotoksina je natrijev bisulfit (NaHSO₃) koji je uobičajen dodatak hrani. Redukcijski agensi poput natrijevog bisulfita imaju afinitet da reagiraju s aflatoksinima. Njihov mehanizam djelovanja uključuje stvaranje sulfonatnih derivata pri čemu peroksid i toplina pospješuju uništavanje AFB₁ natrijevim bisulfitom (Čolović i sur., 2019). Korištenjem natrijeva bisulfita može se postići učinkovita razgradnja

niskih i visokih razina mikotoksina u kukurzu (Karlovsky i sur., 2016). Korištenjem 0,5 % i 2 % natrijevog bisulfita, može se smanjiti razina AFB1 u kukurzu za 80 %, odnosno za 90 % (Doyle i sur., 1982).

2.5. Biološke metode

Uklanjanje mikotoksina mikrobnim kulturama i njihovim staničnim komponentama predstavlja moguću alternativu fizikalnim i kemijskim metodama. Mnogi mikroorganizmi, kao što su bakterije, kvasci, plijesni, aktinomicete i alge imaju sposobnost smanjivanja, odnosno uklanjanja mikotoksina iz hrane i krmiva, ali je mehanizam djelovanja u dosta slučajeva i dalje nepoznat (Pleadin i sur., 2017). Postoje dva osnovna slučaja smanjenja razine mikotoksina. Prvi slučaj se odnosi na inhibiciju rasta plijesni i inhibiciju proizvodnje mikotoksina te posljedično smanjenje nastanka mikotoksina, dok se drugi slučaj odnosi na uklanjanje već nastalih mikotoksina.

2.5.1. Inhibicija rasta plijesni i proizvodnje mikotoksina

Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su prirodno prisutne u različitim namirnicama, a njihovi produkti metabolizma poput kiselina i bakteriocina poboljšavaju okus i teksturu proizvoda, produljujući mu prirodno rok trajnosti. Posjeduju GRAS i QPS status čime je dodatno potvrđena njihova sigurnost za ljudsko zdravlje. Brojna istraživanja pokazala su da mnoge vrste BMK mogu ukloniti mikotoksine. Raspon učinkovitosti uklanjanja je od malih koncentracija do gotovo potpunog uklanjanja. Najefikasnije vrste su *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus termophilus* i *Bifidobacterium bifidum*. Svaka vrsta djeluje različito i na različite mikotoksine. Jedna od značajnijih vrsta je *L. rhamnosus*, koja učinkovito uklanja istodobno nekoliko mikotoksina. Parametri koji utječu na uklanjanje su pH vrijednosti, vitalnost stanica BMK te koncentracija mikotoksina (Perczak i sur., 2018).

BMK mogu utjecati na rast plijesni koje proizvode mikotoksine tako što djeluju inhibitorno na njihov rast. Zaustavljanje rasta plijesni rezultat je kompeticije za hranjivim tvarima, proizvodnje kiselina i antifungalnih metabolita ili kombinacija ovih faktora. Ovaj učinak posljedica je proizvodnje spojeva niske molekularne mase, kao što su organske kiseline (octena i mliječna kiselina), vodikov peroksid, proteini, reuterin, hidroksilne masne kiseline i

fenolne kiseline. Mliječna kiselina uzrokuje snižavanje pH što dovodi do inhibicije rasta različitih mikroorganizama ili čak do uništavanja osjetljivih bakterija. Niski pH također povećava antifungalno djelovanje raznih soli propionske kiseline koje mogu nastati heterofermentacijom BMK. Posebno zanimljiva komponenta uključena u inhibiciju rasta plijesni je reuterin, spoj koji nastaje fermentacijom glicerola od strane različitih rodova BMK u anaerobnim uvjetima. Reuterin suzbija aktivnost ribonukleaze, enzima uključenog u biosintezi DNK te inhibira rast plijesni rodova *Fusarium* i *Aspergillus*. Optimalno razdoblje za inhibiranje rasta plijesni koji tvore mikotoksine je oko 48 h, a najoptimalnija temperatura iznosi između 25 i 30 °C. Ovi uvjeti pogoduju proizvodnji organskih kiselina, koje inhibiraju rast patogenih plijesni (Perczak i sur., 2018).

Kvasci

Kvasci su eukariotski, jednostanični mikroorganizmi koji pripadaju carstvu gljiva te su značajni u redukciji mikotoksina. Neke vrste kvasaca mogu djelovati tako da inhibiraju rast filamentoznih gljiva producenata mikotoksina prisutnih na usjevima, u hrani i krmivima. Prisutnost kvasca može izazvati inhibiciju proizvodnje mikotoksina određenih plijesni, što je neovisno o učinku suzbijanja rasta. Nadalje, stanične stijenke određenih vrsta kvasca su sposobne adsorbirati mikotoksine iz poljoprivrednih proizvoda te ih učinkovito dekontaminirati (Pfliegler i sur., 2015).

Kvasci su postali predmet brojnih istraživanja jer pojedine vrste pokazuju obećavajuća antagonistička svojstva prema uobičajenim plijesnima koje kontaminiraju plodove, povrće, žitarice ili suhomesnate proizvode. Antagonističke značajke kvasaca mogu se pripisati nadmetanju za hranjivim tvarima i prostorom, izlučivanjem antifungalnih spojeva, parazitizmom na gljivičnim patogenima ili stvaranjem biofilma. Ovi antagonistički kvasci mogu smanjiti gospodarske gubitke uzrokovane pojavom toksičnih plijesni, pomoći u sprječavanju kontaminacija raznih proizvoda mikotoksinima, a ujedno su i ekološki prihvatljivi. Inhibicija rasta toksičnih plijesni ne znači uvijek i istodobnu redukciju proizvodnje mikotoksina, dok proizvodnja toksina ovisi o raznim ekološkim, epidemiološkim i genetskim čimbenicima (Pfliegler i sur., 2015). Nekoliko studija izravno je povezalo smanjenje rasta toksigenih plijesni sa smanjenjem razine mikotoksina u različitim proizvodima u laboratorijskim uvjetima. Armando i sur. (2013) su u svom istraživanju dokazali da sojevi pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* efikasno smanjuju rast plijesni *A. carbonarius* i *Fusarium graminearum*, a istovremeno inhibiraju proizvodnju okratoksina A u laboratorijskim uvjetima.

Osim što može mogu utjecati na rast plijesni, određene vrste kvasaca mogu proizvesti metabolite koji imaju inhibitorni učinak na ekspresiju gena potrebnih u biosintezi mikotoksina. Značajan spoj kojeg proizvodi kvasac *Pichia anomala* je 2-feniletanol koji inhibira biosintezu aflatoksina B1 (AFB1) kod plijesni *Aspergillus flavus*. Nakon tretmana 2-feniletanolom ekspresija određenih gena potrebnih u biosintezi aflatoksina poput aflC (poliketid sintaza), aflR (pozitivni regulator puta aflatoksina), aflS (pojačivač transkripcije), aflO (O-metiltransferaza B) se smanjuje i do 10 000 puta što inhibira sintezu AFB1 u kulturama *A. flavus*. Uz to, 2-feniletanol ima utjecaj i na ekspresiju gena potrebnih za modifikaciju kromatina što za posljedicu ima suzbijanje rast plijesni. U slučaju inhibicije biosinteze OTA, sojevi *P. anomala* i *S. cerevisiae* imaju značajan učinak na *P. verrucosum* i sintezu OTA. Temeljni mehanizmi nisu detaljno istraženi, ali nije uočena adsorpcija niti razgradnje toksina, što ukazuje da je biosinteza OTA inhibirana (Pfliegler i sur., 2015).

2.5.2. Detoksifikacija mikotoksina degradacijom ili vezanjem

Biološka detoksifikacija mikotoksina odvija se uglavnom pomoću dva glavna procesa biotransformiranja i adsorpcije-vezanja.

Biotransformiranje

Jedna od strategija razgradnje mikotoksina u netoksične metabolite je primjena agensa za biotransformiranje poput bakterija, kvasca, plijesni ili enzima (Bouderuge i sur., 2009). Živi organizmi, uključujući bakterije, gljivice, biljke i životinje, kao i izolirani enzimi su u stanju metabolizirati, uništiti ili deaktivirati mikotoksine u stabilne, manje toksične ili čak netoksične proizvode. Biotransformacijske metode, koje imaju visoku specifičnost, proizvode bezopasne proizvode, pa čak i dovode do potpune detoksikacije u blagim i ekološki prihvatljivim uvjetima, obećavajuće su rješenje za dekontaminaciju mikotoksina.

Vrste reakcija koje su uključene u biotransformacije mikotoksina sumirane su prema klasama kemijskih reakcija: hidroksilacija, oksido-redukcija između alkohola i ketona, hidrogeniranje dvostruke veze ugljik-ugljik, deepoksidacija, metilacija, glikozilacija i glukuronidacija, esterifikacija, hidroliza, sulfatacija, demetilacija i deaminacija (Li i sur., 2020).

Uklanjanje i detoksikacija AFB1 biotransformacijom ispituje se dugi niz godina, ali postoji malo radova koji govore o toksičnosti i identifikaciji transformiranog proizvoda. Jedna od prvih bakterija koje su proučavane zbog svoje sposobnosti uklanjanja AFB1 bila je *Flavobacterium aurantiacum*, također poznata kao *Nocardia corynebacterioides* (Jard i sur., 2012). Ciegler i sur. (1966) izvijestili su da je *F. aurantiacum* (NRRL B-184) u mogućnosti ukloniti aflatoksin iz tekućeg medija bez stvaranja toksičnih nusproizvoda te da pokazuje

visoku sposobnost detoksikacije aflatoksina. Određene bakterije, plijesni, kvasci i biljke su u stanju transformirati OTA, od kojih većina može transformirati OTA u manje toksičan OTa uz nastajanje fenilalanina (Jard i sur., 2012). Markov i sur. (2019) su primjenom živih i mrtvih stanica bakterije *Gluconobacter oxydans* uspješno uklonili različite mikotoksine (AFB1, CIT, OTA, PAT) u rasponu od 26-94 %. Žive stanice pokazale su najbolju sposobnost vezivanja okratoksina i patulina (80,8 % odnosno 93,8 %), dok su termički obrađene stanice vezale manje od 50 % testiranih mikotoksina. Analizom FTIR spektra zaključeno je da je došlo do promjena nakon kontakta s mikotoksinima te da *G. oxydans* ima potencijal u biotransformaciji mikotoksina.

Adsorpcija

Jedna od strategija za smanjenje razine mikotoksina je dodatak raznih adsorpcijskih agensa krmivima, što dovodi do smanjenja količine unosa mikotoksina, kao i distribucije u krv i ciljne organe (Bouderuge i sur., 2009). Mikotoksinska veziva su nutritivno inertni adsorbensi koji smanjuju apsorpciju mikotoksina iz gastrointestinalnog trakta čime se smanjuje i sprječava mogućnost pojava mikotoksikoza i transport mikotoksina u životinjske proizvode (Čolović i sur., 2019). Kao potencijalna sredstva za adsorpciju istražene su različite tvari, uključujući aktivirane ugljikovodike, minerale gline (bentonit, zeolit), složene neprobavljive ugljikohidrate (celuloza, lignin, polisaharide u staničnim stijenkama kvasca i bakterija) i sintetičke polimere (kolestiramin, polivinilpirolidon i derivati). Njihova upotreba kao krmnih dodataka regulirana je u Europskoj uniji Uredbom Komisije br. 386 / 2009.7 (Greco i sur., 2018). Veziva trebaju biti netoksična, imati visoku sposobnost adsorpcije, dok vezanje mikotoksina mora biti selektivno i nepovratno pri različitim pH vrijednostima i u složenim sustavima poput probavnog trakta (Fruhauf i sur., 2011). Adsorbens mora biti učinkovit u cijelom gastrointestinalnom sustavu te kompleks mikotoksin-adsorbant mora biti stabilan da se spriječi desorpcija toksina tijekom digestije te da se vezani mikotoksini izlučuju urinom i izmetom. Svojstva adsorbensa i mikotoksina igraju važnu ulogu u učinkovitosti adsorpcije. Svojstva mikotoksina, poput polarnosti, topljivosti, molekularne veličine, oblika, konstante raspodjele naboja i disocijacije od velike su važnosti (Bouderuge i sur., 2009).

Biosorpcija se može definirati kao uklanjanje određenih iona i drugih molekula iz otopina pomoću određenih biomolekula ili vrsta biomase, kao što su bakterije, plijesni, kvasci, alge i poljoprivredni, prehrambeni, industrijski i gradski otpad (Stojanović i sur., 2012).

Bakterije mliječne kiseline

Postoji nekoliko mehanizama uklanjanja, ali najučinkovitija je vezanje mikotoksina na površinu stanice, odnosno interakciji mikotoksina s komponentama stanične stijenke bakterija. Površina stanica BMK može vezati razne molekule, kao što su toksini i ioni metala. Stanične stijenke BMK sadrže peptidoglikane, neutralne polisaharide, teihonsku i lipoteihonsku kiselinu i proteine koji igraju važnu ulogu u vezanju mikotoksina. Međutim, polisaharidi i peptidoglikani smatraju se najvažnijim za uklanjanje. Termički inaktivirane BMK zbog promjena na površini stanice pokazuju veću sposobnost uklanjanja. Vezanje može biti trajno samo ako su BMK mrtve, dok žive bakterije s vremenom mogu otpustiti dio mikotoksina. Drugi mehanizam uklanjanja mikotoksina je adhezija. Učinkovitost ovisi o koncentraciji bakterija, a dio mikotoksina se oslobađa s vremenom, stoga se ova metoda ne koristi (Perczak i sur., 2018).

Hernandez-Mendoza i sur. (2009) proučavali su vezanje AFB1 s *Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus casei* pri različitim pH vrijednostima (6, 7,2 i 8) i vremenu inkubacije (0, 4 i 12 sati). Oba soja su pokazala najveću sposobnost vezanja AFB1 pri pH 7,2 nakon 4 i 12 h inkubacije (67,8 % i 55,6 % za *L. casei* te 80% za *L. reuteri* u oba slučaja). Sezer i sur. (2013) su istraživanjem učinkovitosti *L. lactis* i *L. plantarum* i njihovih bakteriocina u uklanjanju AFB1 iz tekuće kulture zaključili da se *L. plantarum* pokazao efikasnijim (46 %) u odnosu na *L. lactis* (27 %), ali djelotvornost je bila još veća dodatkom bakteriocina. Kombinacijom ova dva soja postignuto je uklanjanje AFB1 od 81 %.

Kuharić i sur. (2018) su u svome istraživanju proveli vezanje AMF1 pomoću sojeva BMK iz mlijeka ili mliječnih proizvoda. Izolirali su i identificirali 10 autohtonih sojeva BMK, te inkubirali njihove žive ili termički obrađene stanice u mlijeku u kojem je dodano 0,5 µg/ml AFM1 na 4 °C tijekom 0, 2, 4 i 24 sata i odredili količinu nevezanog AFM1. Učinkovitost vezanja kretala se od 21 do 92 % za žive stanice i od 26 do 94 % za termički tretirane stanice. Žive i termički obrađene stanice *Lactobacillus plantarum* KM su pokazale najbolje rezultate, te su korištene za sljedeći korak uklanjanja AMF1 toplinskom obradom u kombinaciji s filtracijom i centrifugiranjem čime je postignuto uklanjanje čak 96 % AMF1.

Nastavno na prethodno istraživanje, Jakopović i sur. (2018a) ispitali su i usporedili sposobnosti, živih, mrtvih i liofiliziranih stanica BMK za vezanje aflatoksina M1 (AFM1) u umjetno kontaminiranom mlijeku. U eksperimentu su korišteni *L. plantarum* KM, *Lactobacillus paracasei* KM, *Lactobacillus rhamnosus* KM i *Lactococcus lactis* 5MS1. Ovisno o korištenom soju, vremenu inkubacije i tretmanu, uspješnost vezanja AFM1 stanicama BMK iznosila je 23,73-94,49 %. Najveći postotak vezanja AFM1 za soj *L. plantarum* KM uočen je nakon 4 sata inkubacije za žive i mrtve stanice te je iznosio više od 90 %. Najmanju

sposobnost vezanja pokazale su žive i mrtve stanice *L. lactis* SMS1 čiji postotak nije prešao 80 %.

Kvasci

Stanična stijenka kvasca zahvaljujući svojim komponentama ima sposobnost adsorbirati niz spojeva iz okoline. Stabilne stanice kvasca, mrtve stanice i komponente stanične stijenke visokom adsorpcijskom sposobnošću mogu smanjiti razinu mikotoksina u hrani i krmivima, kao i u probavnom sustavu životinja. Vrste kvasca su vrlo raznolike po sastavu stanične stijenke te time posljedično i u kapacitetu adsorpcije (Pfliegler i sur., 2015).

Komponente stanične stijenke kao što su beta-D-glukan, glukomanani i mananligosaharidi igraju važnu ulogu prilikom adsorpcije mikotoksina. Dokazano je da su mrtve stanice uglavnom učinkovitije po svom adsorpcijskom kapacitetu te da je uklanjanje toksina vrlo brz proces prilikom čega brzo dolazi do zasićenja vezanja. Količina uklonjenih mikotoksina ovisi o vrsti mikotoksina koji se želi ukloniti, koncentraciji mikroorganizma i o sadržaju stanične stijenke (Pfliegler i sur., 2015). Sastojci staničnih stijenki kvasaca se proučavaju i zbog sposobnosti vezanja mikotoksina bez štetnog djelovanja za okoliš ili utjecaja na smanjenje određenih hranjivih sastojaka hrane. Komponente stanične stijenke *Saccharomyces cerevisiae* koje selektivno vežu mikotoksine mogu se dodati u kontaminiranu hranu, odnosno krmiva ili kao dodatak hrani za životinje. Korištenjem komponenti stanične stijenke kao aditiva u hrani za životinje omogućuje se da mikotoksinu prođu kroz probavni trakt bez negativnog utjecaja na životinje ili prenošenja na jestive životinjske proizvode kao što su mlijeko, jaja ili meso (Yiannikouris i sur., 2006).

β-glukan

β-glukani su polisaharidi D-glukoze koji se prirodno nalaze u mnogim prokariotskim i eukariotskim organizmima kao što su bakterije, alge, kvasci, gljive te u višim biljkama poput zobi i ječma (Petraović-Tominac i sur., 2010). Sastavni su dio stanične stijenke kvasaca povezani s ostalim komponentama stanične stijenke kao što je hitin, te zajedno predstavljaju oko 50-60 % težine stijenke. Najvažniji čimbenici za određivanje biološke aktivnosti β-glukana su primarna struktura, topljivost, stupanj razgranatosti i molekulska masa (Fruhauf i sur., 2011). Korištenje β-glukana nameće se kao alternativno rješenje naspram tradicionalnih fizikalnih, kemijskih i fizikalno-kemijskih metoda redukcije aflatoksina budući da ne dolazi do sinteze negativnih nusproizvoda (Jakopović i sur., 2018b).

Yiannikouris i sur. (2006) su provodili *in vitro* istraživanja interakcija između mikotoksina i β - D-glukana iz nekoliko različitih izvora pri tri pH vrijednosti koje se nalaze duž

gastrointestinalnog trakta životinja (3, 6 i 8). U kiselim i neutralnim uvjetima najviše se adsorbirao AFB1 zatim deoksinivalenol (DON) te OTA. Alkalni uvjeti, zbog destruktivnog djelovanja na glukane nisi bili povoljni za adsorpciju ovih mikotoksina. Jakopović i sur. (2018b) su ispitali vezanje AMF1 u umjetno kontaminiranom mlijeku pomoću komercijalnog β -glukana dobivenog iz zobi i β -glukana izoliranog iz biomase kvasca. Rezultati istraživanja su pokazali da je nakon uklanjanja kompleksa β -glukan-AFM1 u uzorku mlijeka zaostalo 35 % AFM1 korištenjem β -glukana iz zobi, odnosno 36,4 % AFM1 kada je korišten β -glukan izoliran iz kvasca.

2.6. Uklanjanje pomoću organskog otpada

Organski otpad je bilo koji materijal koji je biorazgradiv te dolazi od biljke ili životinje. Uključuje zeleni otpad, zeleni dio komunalnog otpada, biomasu iz parkova i vrtova urbanih područja, ostatke hrane.

Zbog velikih količina koje nastaju u gradovima, organski otpad se odlaže na odlagališta i podvrgava anaerobnoj razgradnji (zbog nedostatka kisika) uz stvaranje metana, snažnog stakleničkog plina. Zbog velikih količina otpada, te za pravilno gospodarenje otpadom, potrebno je omogućiti njegovo prikupljanje, transport i obradu. To zahtijeva ulaganje u dodatnu opremu za sakupljanje, kamione, radnike i postrojenja za anaerobnu digestiju ili kompost što uzrokuje velike troškove (CCAC, 2012). Dio problema oko zbrinjavanja i nakupljanja organskog otpada mogao bi se riješiti njegovim korištenjem kao biosorbensa mikotoksina.

Biosorbensi

Biosorbensi mogu biti primarni poljoprivredni otpad (slama, pljeva, ljuska, kukuruzne krupice), nusproizvodi prehrambene industrije (kaša od šećerne repe, istrošeno zrno iz pivovara, sjeme i pulpa plodova, ljuska oraha, lješnjaka, badema, kokosa) ili drvne industrije (kora, piljevina, drvena iverica, lišće, borove iglice, mahovina) (Adamović i sur., 2013). Poljoprivredni otpadni materijal se sastoji od celuloze, lignina, hemiceluloze, pektina, lipida i drugih organskih spojeva koji sadrže različite funkcionalne skupine odgovorne za vezanje (Lopičić i sur., 2013a). Biosorbensi imaju i višeslojnu, poroznu strukturu što im daje veliki volumen po jedinici površine što je povoljno u procesu biosorpcije. Mehanizmi na kojima se zasniva biosorpcija su pojedinačna ili višestruka ionska izmjena, stvaranje kompleksa, adsorpcija, elektrostatičke interakcije, taloženje i stvaranje kelata (Bočarov Stančić i sur., 2018). Efikasnost biosorbensa može se povećati kemijskom (kiselinama i bazama), fizičkom

(termički, ultrazvučni ili mehanokemijski tretman) i mikrobiološkom aktivacijom (Adamović i sur., 2013).

Prisutnost tri biološka polimera (celuloza, lignin i hemiceluloza) uzrokuje bogatstvo hidroksilnim i fenolnim skupinama koje mogu biti dalje kemijski modificirane za proizvodnju adsorbensa s poboljšanim svojstvima. Kemijska modifikacija celuloznih materijala često se koristi za poboljšanje određenih svojstava materijala ili nekih njegovih komponenti, poput hidrofилnih ili hidrofobnih svojstava materijala, njegove elastičnosti, toplinskih svojstava ili njegove otpornosti na mikroorganizme, ali u većini slučajeva, kemijska modifikacija služi za poboljšanje sposobnosti adsorbiranja materijala. Kiselinska predobrada služi za uklanjanje topivih organskih nečistoća, promjenu strukture funkcionalnih staničnih spojeva i izlaganje mjesta vezivanja mikotoksina u svrhu poboljšanja biosorpcijog kapaciteta (Lopičić i sur., 2013a).

Učinkovitost adsorpcije prirodnih adsorbensa izražena je adsorpcijom indeksa, gdje je C_i početna, a C_{eq} ravnotežna koncentracija određenog mikotoksina:

$$\text{Indeks adsorpcije} = [(C_i - C_{eq}) / C_i] \times 100$$

Adamović i sur. (2013) su u svome radu proveli *in vitro* istraživanje korištenja otpadne biomase vodenog korova *Myriophyllum spicatum* i koštice breskve i višnje, u prirodnom i modificiranom obliku (aktivirane s 1 M HCl), kao potencijalnih biosorbensa mikotoksina. Koštice breskve i višnje po kemijskom sastavu su vrlo slične u većini sastojaka. U oba materijala, sadržaj masti i proteina je izuzetno mali. Sadržaj celuloze, NDF (celuloza + hemiceluloza + lignin) i ADF (celuloza + lignin) dominira i iznosi više od 50 %. Sadržaj lignina je također visok i iznosi više od 16 %. Iz kemijskog sastava koštica breskve i višnje vidljivo je da se ne sastoje od elementa koji mogu biti toksični za žive organizme te se mogu koristiti kao aditiv za hranu za životinje u svrhu adsorpcije mikotoksina.

Indeks biosorpcije je ispitivan pri pH 3, 6,9 i 7 u 0,1 M K_2HPO_4 kao elektrolitu. Visoki indeks biosorpcije aflatoksina B1 utvrđen je za algu *M. spicatum* te je iznosio 94,70 % pri pH 6,9 odnosno 96 % pri pH 3. Nemodificirane koštice breskve su vezale manje količine AFB1, 73,3 % pri pH 6, 9 odnosno 80 % pri pH 3, dok je kod nemodificirane koštice višnje adsorpcija istog mikotoksina bila znatno slabija te je iznosila 58,82 % pri pH 3 odnosno 41,18 % pri pH 7. Modificirane koštice breskve, vezale su znatno manje AFB1 (41,18 % pri pH 3 i 7), dok su modificirane koštice višnje vezale 58,82 % AFB1 pri pH 3 i 7, slično kao i nemodificirane.

Vrijednosti biosorpcije OTA ovisno o biosorbensu i pH vrijednosti znatno su varirale (od 20 do 76,2 %). Indeks biosorpcije OTA za algu *M. spicatum* iznosio je 50 % pri pH 3 i 30 % pri pH

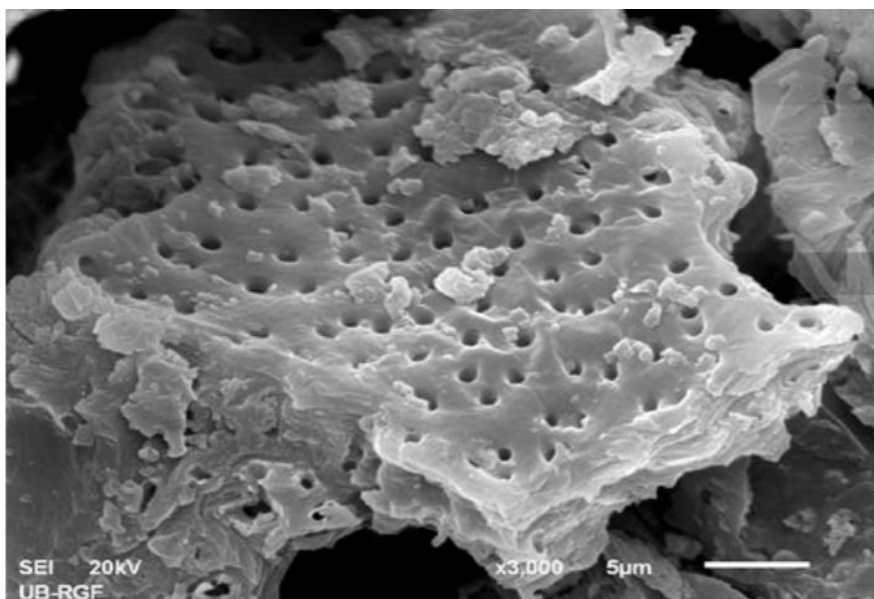
6,9. Nemodificirane koštice breskve vezale su veće količina OTA pri istim pH vrijednostima, 66,67 % pri pH 3 te 50 % pri pH 6,9, dok je kod nemodificirane koštice višnje adsorpcija istog mikotoksina iznosila 66,66 %, odnosno 20 %. Modificirane koštice breskve vezale su manje OTA od nemodificiranih i to 42,86 % pri pH 3 i 33,32 % pri pH 7, dok su modificirane koštice višnje pri pH 3 vezale 76,2 %, te 20 % OTA pri pH 7.

Vežanje ostalih mikotoksina (DON, ZON, DAS, T-2) je bilo značajno manje i variralo je ovisno o biosorbensu i pH vrijednosti. Dobiveni rezultati ukazuju da su ispitivane otpadne biomase u prirodnom ili modificiranom obliku bile efikasni biosorbenti pojedinih mikotoksina s najvećim afinitetom za AFB1.

Bočarov Stančić i sur. (2018) su u svome istraživanju također koristili vodeni korov *M. spicatum* i koštice breskve i višnje u svrhu adsorpcije mikotoksina. Dobiveni rezultati su vrlo slični rezultatima istraživanja Adamović i sur. (2013) s razlikom što su nemodificirane koštice breskve vezale manje količine AFB1 (58,82 % pri pH 3 i 7).

Lopičić i sur. (2013a) su u svom istraživanju opisali *in vitro* model za procjenu sposobnosti adsorpcije mikotoksina pomoću koštice breskve (nemodificirana i modificirana). Modifikacije je provedena s 1 M HCl. Koštice breskve dobivene su kao nusproizvod iz tvornice sokova.

Morfologija i površinska priroda koštice prikazani su na SEM (Scanning electron microscope) mikrografiji (slika 3) pri povećanju od 3000 x. Na slici je vidljivo da čestice koštica imaju višeslojnu poroznu površinu nepravilne laminirane strukture. Prosječni promjer pora je manji od 1 μm , što je korisno za difuziju i adsorpciju mikotoksina.



Slika 3. SEM mikrografija nemonificiranih čestica koštica breskve (Lopičić i sur., 2013a)

Indeks biosorpcije ispitivan je pri pH 3 i 7 u elektrolitu 0,1 M K₂HPO₄. Nemodificirane koštice breskve vezale su 58,82 % AFB1 pri pH 3 i 7, dok su modificirane koštice vezale manje količine AFB1 (41,18 % pri pH 3,9 i 6,9). Modificirane i nemodificirane koštice su vezale jednake količine OTA pri istim pH vrijednostima, 42,86 % pri pH 3 te 33,32 % pri pH 7, što je neznatno manje u odnosu na količinu vezanog AFB1.

U daljnjim istraživanjima, Lopičić i sur. (2013b) su ispitali sposobnost koštice višnje (nemodificirana i modificirana), kao adsorbenta istih mikotoksina. Nemodificirane koštice višnje vezale su 58,82 % AFB1 pri pH 3 odnosno 41,18 % pri pH 7, a adsorpcija OTA pri istim pH vrijednostima iznosila 66,66 % odnosno 20 %. Koštice modificirane klorovodičnom kiselinom vezale su 58,82 % AFB1 pri pH 3 i 7 %, dok je adsorpcija OTA iznosila 76,20 % pri pH 3 te 20% pri 7.

Avantaggiato i sur. (2013) istraživali su sposobnost komine grožđa kao novog potencijalnog biosorbensa za uklanjanje mikotoksina iz tekućih medija. Vinarstvo stvara otpad u obliku komine koja nastaje nakon prešanja grožđa, te se procjenjuje da otprilike 20 % ukupne težine grožđa odlazi u otpad. Uklanjanje komine je skupo, a ako se pravilo ne postupa, predstavlja ozbiljan problem zaštite okoliša.

Cilj istraživanja bio je ispitati mogućnost korištenja komine grožđa kao jeftinog biosorbensa za dekontaminaciju mikotoksina. Autori su ispitali sposobnost komine u istovremenoj adsorbpciji različitih mikotoksina iz tekućeg medija pri fiziološkom pH. Dobiveni rezultati su pokazali da je AFB1 bio najviše adsorbirani mikotoksin nakon čega slijedi ZEA, OTA i fumonizin B1 (FB1), dok je adsorpcija deoksinivalenola (DON) bila zanemariva. Na adsorpciju AFB1 i ZEA nije utjecala promjena pH vrijednosti u rasponu pH 3-8, dok je adsorpcija OTA i FB1 ovisna o pH vrijednosti. Krivulje vremena kontakta pokazale su da je adsorpcija mikotoksina kominom grožđa brza, što je od značajne važnosti. Zaključeno je i da je adsorpcija mikotoksina pomoću komine grožđa stabilna unutar vrijednosti pH koja se može naći u gastrointestinalnom traktu životinja.

ZAKLJUČAK

Zbog utjecaja mikotoksina na ljudsko zdravlje kao i na gospodarstvo širom svijeta, sve je veći naglasak na razvoju metoda uklanjanja mikotoksina kako bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane. Fizikalne i kemijske metode uklanjanja imaju ograničenu primjenu zbog nedovoljno saznanja o produktima degradacije te zbog promjena nutritivnog sastava i organoleptičkih svojstava hrane. Nekolicina dosadašnjih istraživanja s krutom biomasom ukazala je na zadovoljavajuće postotke adsorpcije pojedinih mikotoksina. Primjena biosorbenasa mikotoksina na bazi otpadne biomase je efikasno, ekološko i ekonomski prihvatljivo rješenje naspram postojećih fizikalnih i kemijskih metoda. Korištenje otpadne biomase na ovaj način doprinijeti će rješavanju problema njenog iskorištavanja, kruženju organske tvari u prirodi i efikasnijem upravljanju organskog otpada.

POPIS LITERATURE

- Adamović M., Stojanović M., Lopičić Z., Milojković J., Lačnjevac Č. , Petrović J., Bočarov Stančić A. (2013) Biosorpcija mikotoksina otpadnom biomasom. *Zaštita materijala* **54**: 327-333.
- Allah Ditta Y., Mahad S., Bacha U. (2019) Aflatoxins: Their toxic effect on poultry and recent advances in their treatment. U: *Mycotoxins - Impact and Management Strategies*, Njobeh P.B., ur., IntechOpen, str. 125-147.
- Armando M. R., Galvagn M. A., Dogi C. A., Cerrutti P., Dalcerro A. M., Cavaglieri L. (2013) Statistical optimization of culture conditions for biomass production of probiotic gut-borne *Saccharomyces cerevisiae* strain able to reduce fumonisin B₁. *Journal of Applied Microbiology* **114**: 1338–1346.
- Avantaggiato G., Greco D., Damascelli A., Solfrizzo M., Visconti A. (2013) Assessment of Multi-mycotoxin Adsorption Efficacy of Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62** (2): 497–507.
- Bennett J. W., Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **3**: 497– 516.
- Bočarov Stančić A. S., Lopičić Z. R., Bodroža Solarov M. I., Stanković S. Ž., Janković S. M., Milojković J. V ., Krulj J.A. (2018) *In vitro* removing of mycotoxins by using different inorganic adsorbents and organic waste materials from Serbia. *Food and Feed Research* **45** (2): 87-96.
- Boudergue C., Burel C., Dragacci S., Favrot M. C., Fremy J., Massimi C., Prigent P. , Debongnie P., Pussemier L., Boudra H. Morgavi D., Oswald I., Pérez A., Avantaggiato G. (2009) Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications* **6** (9): 22-24.
- Bullerman L. B., Bianchini A. (2007) Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* **119**: 140–146.
- Ciegler A., Lillehoj E. B., Peterson R. E., Hall H. H. (1966) Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology* **14** (6): 934–939.
- CCAC (2012) CCAC -Climate and Clean Air Coalition, <<https://www.ccacoalition.org/en/activity/organic-waste-diversion>> Pristupljeno 7. rujna 2020.

- Čolović R., Puvača N., Cheli F., Avantaggiato G., Greco D., Đuragić O., Kos J., Pinotti L. (2019) Decontamination of Mycotoxin-Contaminated Feedstuffs and Compound Feed. *Toxins* **11**: 617.
- Delaš F. (2010) Mikrobni toksini. U: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hengl B., ur., Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek str. 31-49.
- Domaćinović M., Ćosić J., Klapac T., Peraica M., Mitak M. (2012) Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje, Hrvatska agencija za hranu.
- Domijan A. M., Peraica M. (2010) Carcinogenic mycotoxins. U: Charlene A. McQueen, *Comprehensive Toxicology*, vol. 14, Elsevier, Oxford Academic Press, str. 125-13.
- Dors G. C., Caldas S. S., Feddern V., Heidtmann Bemvenuti R., Hackbart H. C. S., Souza M. M., Oliveira M. S., Buffon J. G., Primel E., Furlong E. B. (2011) Aflatoxins: Contamination, Analysis and Control. *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology* **20**: 415-438.
- Doyle M. P., Applebaum R. S., Brackett R. E., Marth E. H. (1982) Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *Journal of Food Protection* **45**: 964–971.
- Duraković S., Duraković L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb.
- EFSA (2020) EFSA - European Food Safety Authority, <<https://www.efsa.europa.eu/en/news/ochratoxin-food-public-health-risks-assessed>>
Pristupljeno 18. kolovoza 2020.
- El Khoury A., Atoui A. (2010) Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins* **2** (4): 461-493.
- Fetaih H.A., Dessouki A.A., Hassanin A.A.I., Tahan A.S. (2014) Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats. *Pathol - Res Pract*, **210**: 1079–1089.
- Fruhauf S., Schwartz H., Ottner F., Krska R., Vekiru E. (2011) Yeast cell based feed additives: Studies on aflatoxin B1 and zearalenone. *Food Additives and Contaminants, Part A* **29** (2): 217-231.
- Gibson N. M., Luo T. J. M., Brenner D. W., Shenderova O. (2011) Immobilization of mycotoxins on modified nanodiamond substrates. *Biointerphases* **6** (4): 210–217.

- Greco D., D'Ascanio V., Santovito E., Logrieco A. F., Avantaggiato G. (2018) Comparative efficacy of agricultural byproducts in sequestering mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99** (4):1623-1634.
- Grenier B., Bracarense A. P., Leslie J. F., Oswald I. P. (2014) Physical and chemical methods for mycotoxin decontamination in maize. U: Mycotoxin reduction in grain chains, Leslie J. F., Logrieco A. F., ur., John Wiley & Sons, str. 116-129.
- Hassan Y. I., Zhou T., Bullerman L., B. (2015) Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. *Food Science and Technology International* **22** (1): 79–90.
- Hernandez-Mendoza A., Guzman-de-Peña D., Garcia HS. (2009) Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 395-403.
- Herzallah S., Al Shawabkeh K., Al Fataftah A. (2008) Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ -radiation, and microwave heating. *Journal of Applied Poultry Research* **17**: 515–521.
- Jakopović Ž., Čanak I., Romac A. , Željka Ž., Bošnjir J. , Ivešić M., Frece J., Pavlek Ž., Markov K. (2018a) Usporedba vezanja AFM1 iz mlijeka živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **13** (1-2): 32-37.
- Jakopović Ž., Čanak I. , Frece J., Bošnjir J., Ivešić M., Kuharić Ž., Pavlek Ž., Markov K. (2018b) Uklanjanje kompleksa β -glukan-AFM1 iz mlijeka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **13** (3-4): 136-139.
- Jard G., Liboz T., Mathieu F., Guyonvarc'h A., Lebrihi A. (2011) Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A* **28** (11): 1590–1609.
- Karlovsky P., Suman M., Berthiller F., De Meester J., Eisenbrand G., Perrin I., Oswald I. P., Speijers G., Chiodini A., Recker T., Dussort P. (2016) Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research* **32**: 179-205.
- Kolosova, A., Stroka, J. (2011) Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal* **4** (3): 225-256.
- Kuharić Ž., Jakopović Ž., Čanak I., Frece J., Bošnjir, J., Pavlek Ž., Ivešić M., Markov K. (2018) Removing aflatoxin M1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **69** (4): 334-339.

- Leibetseder J. (2006) Decontamination and detoxification of mycotoxins. U: *Biology of Nutrition in Growing Animals*, Mosenthin R., Zentek J., Zebrowska T. ur., Elsevier, str. 439–465.
- Leszkowicz A. P., Manderville R. A. (2007) Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**: 61-99.
- Li P., Su R., Yin R., Lai D., Wang M., Liu Y., Zhou L. (2020) Detoxification of Mycotoxins through Biotransformation. *Toxins* **12** (2): 121.
- Lopičić Z., Bočarov Stančić A., Stojanović M., Milojković J., Pantić V., Mihajlović M., Adamović M. (2013a) *In vitro* evaluation of the efficacy of peach stones as mycotoxin binders. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* **124**: 287-296.
- Lopičić Z., Bočarov Stančić A., Stojanović M., Milojković J., Pantić V., Mihajlović M., Adamović M. (2013b) In vitro mycotoxins adsorption by sour cherry stones. *Proceedings of the 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production*, 1142-1153.
- Markov K., Frece J., Pleadin J., Bevardi M., Barišić L., Kljusurić J. G., Vulić A., Jakopović Ž., Mrvčić J. (2019) *Gluconobacter oxydans*–potential biological agent for binding or biotransformation of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, **12**(2): 153-161.
- Martinez-Miranda M. M., Rosero-Moreano M., Taborda-Ocampo G. (2019) Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control* **98**: 359–366.
- Oliveira G., da Silva D. M., Pereira R. G. F. A., Paiva L. C., Prado G., Batista L. R. (2013) Effect of different roasting levels and particle sizes on ochratoxin A concentration in coffee beans. *Food Control* **34**: 651–656.
- Park D. L., Price W. D. (2001) Reduction of aflatoxin hazards using ammoniation. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **171**: 139–175.
- Peraica M., Rašić D., Gluščić V. (2014) Utjecaj aflatoksina na zdravlje ljudi. *Glasilo biljne zaštite* **4**: 310-316.
- Perczak A., Goliński P., Bryła M., Waśkiewicz A. (2018) The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **69** (1): 32–45.
- Perši, N, Pleadin, J., Vulić, A., Zadravec, M, Mitak, M. (2011) Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. *Veterinarska Stanica* **42** (4): 335-345.

- Petravić-Tominac V., Zechner-Krpan V., Grba S., Srećec S., Panjkota-Krbavčić I., Vidović L. (2010) Biological Effects of Yeast β -Glucans. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **75** (4): 149-158.
- Pfliegler W.P., Pusztahelyi T., Pócsi I. (2015) Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology* **55** (7): 805–818.
- Pleadin J., Perši N., Kovačević D., Vulić A., Frece J., Markov K. (2014) Ochratoxin A reduction in meat sausages using processing methods practiced in households. *Food Additives and Contaminants: Part B* **7**: 239-246.
- Pleadin J., Frece J., Markov K. (2017) Utjecaj postupaka prerade na transformaciju i smanjenje koncentracije mikotoksina u određenim skupinama hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **12** (1-2): 4-13.
- Pleadin J., Kiš M., Frece J., Markov K. (2018) Primjena fizikalnih i kemijskih metoda u uklanjanju mikotoksina iz hrane i hrane za životinje. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **13** (1-2): 24-31.
- Proctor A. D., Ahmedna M., Kumar J. V., Goktepe I. (2004) Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants* **21**: 786–793.
- Raters M., Matissek R. (2008) Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Mycotoxin Research* **24**: 130–134.
- Sezer C., Güven A., Bilge Oral N., Vatansever L. (2013) Detoxification of aflatoxin B1 by bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* **37** (5): 594-601.
- Stojanović M., Lopičić Z., Milojković J., Lačnjevac Č. , Mihajlović M., Petrović J., Kostić A. (2012) Biomass waste material as potential adsorbent for sequestering pollutants. *Zaštita materijala* **53**: 231-237.
- Turner N. W., Subrahmayam S., Piletsky S. A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chimica Acta* **632**: 168-180.
- Varga J., Kocsubé S., Péteri Z., Vágvölgyi C., Tóth B. (2010) Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. *Toxins* **2** (7): 1718–1750.

Yazdanpanah H., Mohammadi T., Abouhossain G., Cheraghali A. M. (2005) Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology* **43** (7): 1135–1139.

Yiannikouris A., Andre G., Poughon L., Francois J., Dussap C. G., Jeminet G., Bertin G., Jouany J.P. (2006) Chemical and conformational study of the interaction involved in mycotoxin complexation with β -d-glucans. *Biomacromolecules* **7** (4): 1147-1155.

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.

Iva Logaršič

ime i prezime studenta