

Uklanjanje aflatoksina B₁ pomoću organskog otpada

Radešić, Evelin

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:011038>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Evelin Radešić

7530/BT

UKLANJANJE AFLATOKSINA B₁ POMOĆU ORGANSKOG OTPADA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: Prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Uklanjanje aflatoksina B₁ pomoću organskog otpada **Evelin Radešić, 0058211704**

Sažetak: Mikotoksini su sekundarni metaboliti toksikotvornih plijesni koji izazivaju niz štetnih učinaka na zdravlje ljudi i životinja. Osim što uzrokuju bolesti u ljudi i životinja, kontaminacije mikotoksinima uzrokuju velike ekonomske gubitke. Zbog učestalih kontaminacija i termostabilnosti mikotoksina potrebno je stalno kontrolirati koncentraciju mikotoksina u hrani i po potrebi smanjiti razinu mikotoksina. Metode za uklanjanje mikotoksina se dijele na kemijske, fizikalne i biološke. Biološke metode se smatraju sigurnijima i ekološki prihvatljivijima, a uključuju primjenu mikroorganizama te adsorbensa organskog ili anorganskog porijekla. U ovom radu se ispitala sposobnost vezanja aflatoksina B₁ na biosorbense (koštice masline, ljuske jajeta i kokosovo brašno). Sve tri vrste adsorbensa su pokazale vrlo dobro vezanje AFB₁ već na samom početku eksperimenta kao i mogućnost upotrebe sličnih adsorbensa u dekontaminaciji mikotoksina.

Ključne riječi: aflatoxin B₁, biološke metode, mikotoksin, organski otpad, plijesni

Rad sadrži: 21 stranica, 3 slike, 1 tablica, 29 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: dr.sc. Iva Čanak

Datum obrane: 16. rujna 2021.

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

Removing of aflatoxin B₁ using organic waste

Evelin Radešić, 0058211704

Abstract: Mycotoxins are secondary metabolites of toxic molds that cause a number of adverse effects on human and animal health. In addition to causing disease in humans and animals, mycotoxin contamination causes great economic losses. Due to frequent contamination and thermostability of mycotoxins, it is necessary to constantly monitor the concentration of mycotoxins in food and, if necessary, reduce the level of mycotoxins. Methods for removing mycotoxins are divided into chemical, physical and biological. Biological methods are considered safer and more environmentally friendly and include the use of microorganisms, organic and anorganic adsorbents. In this research, the ability of aflatoxin B₁ to bind to biosorbents (olive pits, egg shells and coconut flour) was examined. All three types of adsorbents showed effective binding of AFB₁ at the very beginning of the experiment as well as the possibility of using similar adsorbents in mycotoxin decontamination.

Keywords: aflatoxin B₁, biological methods, molds, mycotoxin, organic waste

Thesis contains: 21 pages, 3 figures, 1 table, 29 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Full Professor, Ksenija Markov, PhD

Technical support and assistance: Iva Čanak, PhD

Defence date: 16 September 2021

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Mikotoksini	2
2.1.1. Aflatoksini	3
2.1.2. Aflatoksin B ₁	4
2.2. Metode uklanjanja mikotoksina.....	6
2.2.1. Fizikalne metode.....	7
2.2.2. Kemijske metode	7
2.2.3. Biološke metode.....	8
2.2.3.1. Uklanjanje pomoću organskog otpada	9
3. Eksperimentalni dio	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Uzorci	12
3.1.2. Standard AFB ₁	12
3.1.3. Kemikalije.....	12
3.1.4. Pribor i oprema	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Priprema adsorbensa.....	13
3.2.2. Vežanje AFB ₁ na adsorbens.....	13
3.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatography - HPLC).....	14
4. Rezultati i rasprava.....	15
5. Zaključci.....	18
6. Literatura	19

1. Uvod

Mikotoksini su sekundarni metaboliti toksikotvornih plijesni koji izazivaju niz štetnih učinaka na zdravlje ljudi i životinja. Bolesti koje uzrokuju se nazivaju mikotoksikoze, a osim toga posjeduju i snažno karcinogeno, mutageno, teratogeno, hepatotoksično i neurotoksično djelovanje. Učestalost kontaminacije mikotoksinima predstavlja veliki problem zbog čega je neophodna sustavna kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje kako bi se smanjili negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivredi (HAH, 2012). Najčešći mikotoksini koji kontaminiraju hranu su aflatoksini, okratoksini, zearalenon i trihoteceni. S obzirom na njihovu termostabilnost iznimno ih je teško ukloniti te je potrebno poduzeti dodatne mjere kako bi se koncentracija mikotoksina u hrani što više smanjila.

Metode za uklanjanje mikotoksina mogu se podijeliti na kemijske, fizikalne i biološke. Kemijske metode se ne smatraju prikladnima zbog uvjeta temperature i tlaka pri kojima se reakcije provode, škodljivosti nastajanja toksičnih ostataka te negativnog utjecaja za svojstva proizvoda (Pleadin i sur., 2014). Biološke metode se smatraju sigurnijima i ekonomski isplativijima nego fizikalne i kemijske metode. Iako postoji mnogo inovativnih strategija za smanjenje mikotoksina u hrani, sve veći potencijal ima uporaba različitih, nehranjivih (nenutritivnih) veziva tj. biosorbensa zbog njihove niske cijene i pristupačnosti u prirodi.

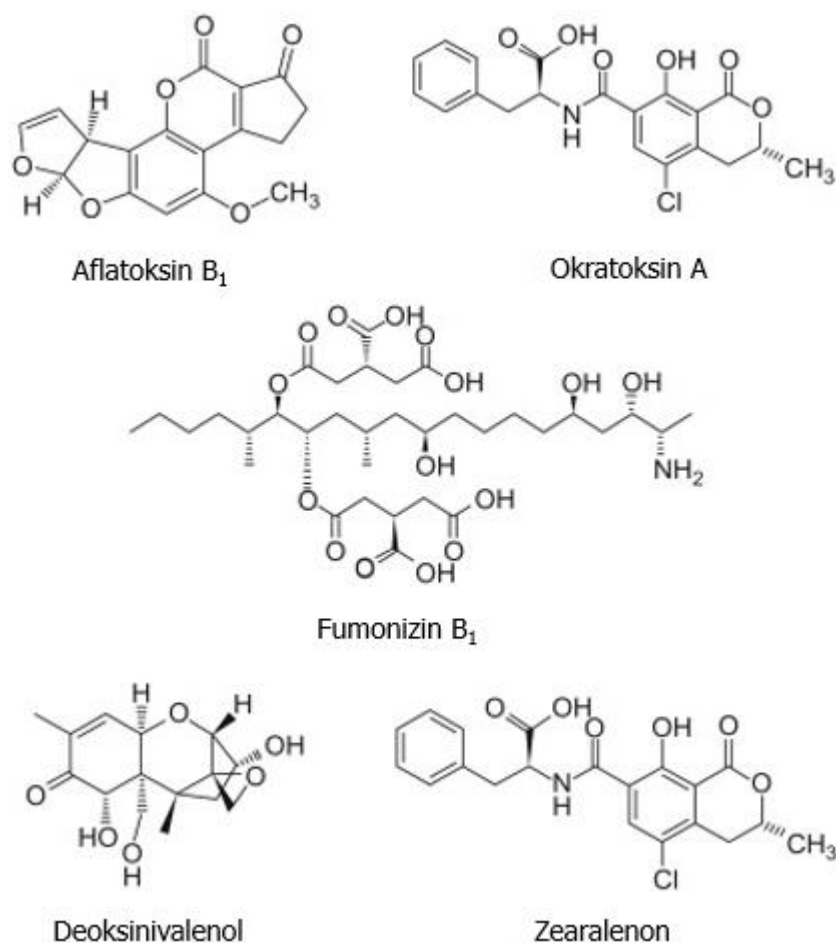
Stoga je cilj ovog rada bio ispitati sposobnost vezanja aflatoksina B₁ na tri različita adsorbensa (ljuske jajeta, kokosovo brašno i koštice maslina). Ljuske jajeta i koštica masline spadaju u organski otpad te je njihova primjena u dekontaminaciji mikotoksina ekonomski i ekološki isplativa.

2. Teorijski dio

2.1. Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni niske molekularne mase koji učestalo kontaminiraju hranu i hranu za životinje (Pleadin i sur., 2020). Ovi spojevi se razlikuju po kemijskoj strukturi, biološkoj aktivnosti, putu biosinteze te po vrsti plijesni koja ih proizvodi. Široko su rasprostranjeni u prirodi i predstavljaju stabilne kemijske spojeve koji mogu izdržati procese termičke obrade hrane (Adamović i sur., 2013) te da mogu kontaminirati hranu u različitim fazama hranidbenog lanca (Bennett i Klich, 2003).

Najznačajnije predstavnike mikotoksina sintetiziraju plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Stachybotrys* (Zain, 2011). Znanstvenici su identificirali više od 400 različitih mikotoksina među kojima su najznačajniji aflatoksini (AFB₁ i AFM₁), okratoksini (OTA), zearalenon (ZEA), deksinivalenol (DON), trihoteceni (T-2 toksin) i fumonizini (FB₁ i FB₂) (Stančić i sur., 2018) a njihove kemijske strukture su prikazane na slici 1.



Slika 1. Kemijske strukture mikotoksina: AFB₁, OTA, FB₁, DON i ZEA (Pitt, 2013)

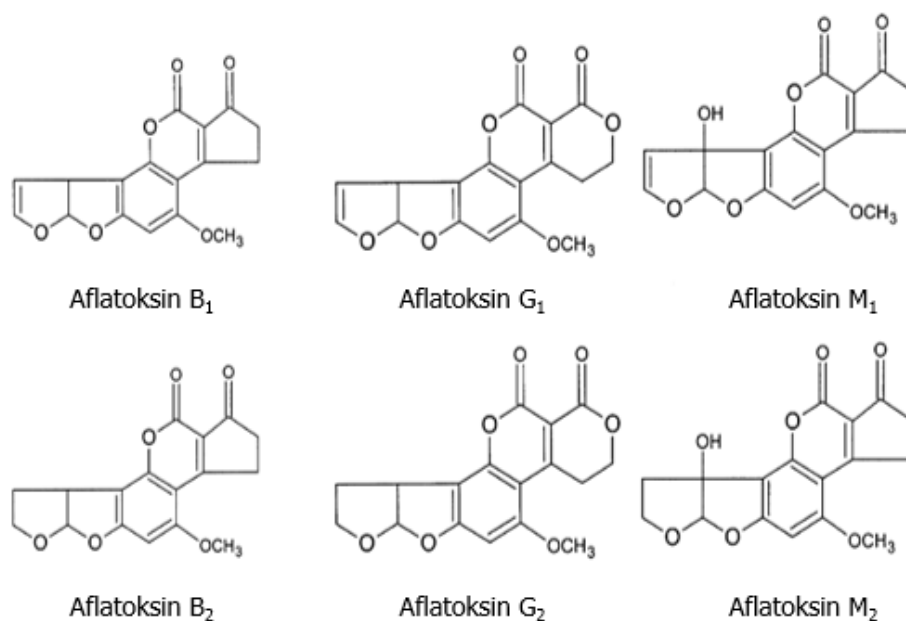
Bolesti koje uzrokuju mikotoksini nazivaju se mikotoksikoze i one mogu biti akutne i kronične. Mikotoksikoze se ne mogu liječiti i ne uzrokuju stvaranje antitijela. Općenito, izlaganje mikotoksinima je češće u dijelovima svijeta gdje su metode skladištenja i rukovanja hranom loše, gdje je pothranjenost problem i gdje postoji malo propisa koji štite izložene populacije (Bennett i Klich, 2003).

Mikotoksini mogu izazvati niz štetnih učinaka na ljude i životinje (karcinogenost, imunotoksičnost, probavne smetnje, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivna i razvojna toksičnost, i dr.), pri čemu često mogu istovremeno djelovati na različite načine i na više ciljnih mjesta u organizmu, što ovisi o samoj tvari, dozi i vremenu izloženosti (HAH, 2012).

2.1.1. Aflatoksini

Aflatoksini su najtoksičniji mikotoksini, a proizvode ih plijesni iz roda *Aspergillus*, prvenstveno vrste *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* (Bennett i Klich, 2003). *A. flavus* i *A. parasiticus* inficiraju mnoge usjeve na polju, tijekom berbe, skladištenja i prerade. *A. flavus* producira aflatoksine B na žitaricama poput pšenice i kukuruza, na sjemenkama pamuka i orasima. *A. flavus* veći dio svog životnog ciklusa postoji u obliku micelija ili konidija, međutim pod nepovoljnim uvjetima, poput nedostatka hranjivih tvari i vode, micelij gljive će se transformirati u sklerocije, koje su otporne strukture i mogu preživjeti u ekstremno teškim okolišnim uvjetima (Yu, 2012). Naime, *A. flavus* može rasti na temperaturama između 12 i 48 °C, dok je optimalna temperatura za rast u rasponu od 28 °C – 37 °C. *A. parasiticus* može producirati aflatoksine B i G na uskladištenim uljaricama poput suncokreta i kikirikija. (Kumar i sur., 2017).

Aflatoksini predstavljaju derivate difuranokumarina koji su sintetizirani poliketidnim putem (Zain, 2011). Poznato je više od 20 aflatoksina, a najvažniji predstavnici su aflatoksin B₁ i B₂ (AFB₁ i AFB₂), aflatoksin G₁ i G₂ (AFG₁ i AFG₂), aflatoksin M₁ i M₂ (AFM₁ i AFM₂), aflatoksikol (AFL₁), aflatoksin Q₁ (AFQ₁), aflatoksin P₁ (AFP₁) i aflatoksin B_{2a} (AFB_{2a}). Oznake B i G označavaju boju (*eng.* B-Blue, plavo; G-Green, zeleno) kojom aflatoksini fluoresciraju u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm, a M prema supstratu (*eng.* Milk, mlijeko) iz kojeg su izolirani (HAPIH, 2013). Kemijske strukture aflatoksina prikazane su na slici 2.



Slika 2. Kemijske strukture aflatoksina B (AFB₁ i AFB₂), aflatoksina G (AFG₁ i AFG₂) i aflatoksina M (AFM₁ i AFM₂) (Zain, 2011)

Mikotoksikoze uzrokovane aflatoksinima nazivaju se aflatoksikoze. Aflatoksini su štetni za zdravlje ljudi i životinja, primarno djeluju na jetra, međutim aflatoksini nisu samo toksični za jetru nego imaju i druga neželjena svojstva kao što su imunosupresivnost, mutagenost, teratogenost i karcinogenost. Među njima najznačajniji je aflatoksin B₁ (AFB₁) koji predstavlja naj snažniji hepatokarcinogen poznat u sisavaca, a Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC; *eng.* International Agency for Research on Cancer) svrstava ga u karcinogene 1. skupine (IARC, 1993; Pleadin i sur., 2014).

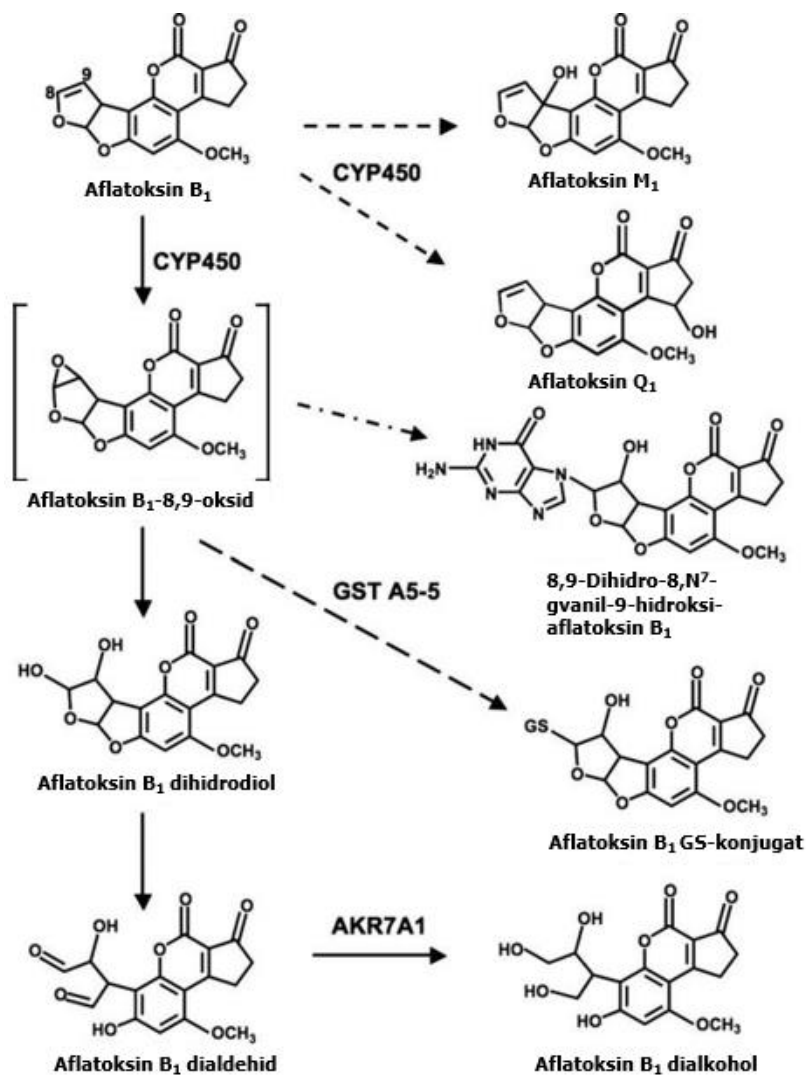
Mnogi biotički i abiotički čimbenici okoliša utječu na biosintezu aflatoksina uključujući prehrambene čimbenike poput izvora ugljika i dušika, ekološke učinke poput aktiviteta vode i temperature te fiziološke uvjete kao što su pH i bioaktivni agensi (Yu, 2012).

2.1.2. Aflatoksin B₁

Aflatoksin B₁ je najtoksičniji aflatoksin koji se nalazi u raznim namirnicama biljnoga i životinjskoga podrijetla. Nakon pojave „X-bolesti“ peradi u Engleskoj 1962. godine izoliran je iz plijesni *A. flavus* (HAH, 2012). Otrovanje aflatoksinima nastaje najčešće ingestijom, no u organizam aflatoksin B₁ može ući i preko kože ili inhalacijom prašine kontaminirane aflatoksinima (Pleadin i sur., 2020).

Rizik od kontaminacije aflatoksinom B₁ je visok u dijelovima svijeta gdje vlada tropska ili suptropska klima pa se poseban nadzor primjenjuje nad AFB₁ u krmivima kao što su kukuruz, pogače kikirikija i suncokreta, ekstrahirani kopar, gluten podrijetlom iz kukuruza, rižine posije, sjeme pamuka, ljuske palme i sojino zrnje, uvezenim iz trećih zemalja, za koje je utvrđeno da su glavni izvori AFB₁. U brojnim zemljama svijeta utvrđeno je i onečišćenje mliječnih proizvoda, sjemena pamuka, ječma, zrnja soje, peletirane pšenice, ljuski kikirikija te krmiva na bazi kukuruza i sirka. Aflatoksini su stabilni kemijski spojevi koje postupci prerade hrane uglavnom ne mogu uništiti, a s obzirom da su žitarice čest izvor AFB₁ posljedično su onečišćeni i gotovi proizvodi na bazi žitarica (Pleadin i sur., 2014).

Metaboličkom transformacijom aflatoksina B₁ nastaje aflatoksin M₁, uglavnom u jetri životinja koje su hranjene onečišćenom hranom, a izlučuje se preko mliječnih žlijezda preživača (HAPIH, 2013). Osnovne molekule i njihovi metaboliti mogu se naći u krvi i urinu, u majčinom i kravljem mlijeku te u mliječnim proizvodima (slika 3).



Slika 3. Metabolizam aflatoksina B₁ (Hayes i sur., 2010)

2.2. Metode uklanjanja mikotoksina

Postupcima prerade hrane može se postići smanjenje količine mikotoksina, njihova razgradnja, eliminacija ili transformacija u manje toksične derivate, ali potpuno uklanjanje mikotoksina iz prehrambenog lanca tijekom procesiranja je teško postići.

Prije primjene tehnika uklanjanja mikotoksina potrebno je utvrditi kemijski sastav i toksičnost nastalih produkata reakcije. Cilj primjene ovih metoda je sprječavanje učinaka mikotoksina koji su štetni na ljudsko zdravlje, pri čemu se trebaju sačuvati hranjiva i organoleptička svojstva, kako sirovina, tako i gotovih proizvoda (Pleadin i sur., 2017). Za određivanje koncentracije mikotoksina koriste se različite analitičke metode kao što su imunoenzimska (ELISA) metoda, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija/masena spektrometrija (LC/MS) (Pleadin i sur., 2014).

Učinkovitost metoda uklanjanja mikotoksina iz hrane i hrane za životinje ovisi o brojnim parametrima, među kojima su najznačajniji svojstva onečišćenog materijala, odnosno njegov sastav, primarno sadržaj vode, te razina onečišćenja. Primarno se odnosi na žitarice s obzirom da spadaju u grupu najviše kontaminirane hrane (Pleadin i sur., 2018).

Istraživanja postupaka detoksikacije aflatoksina u kontaminiranim prehrambenim proizvodima se u pravilu provode korištenjem dva glavna pristupa, jedan s ciljem modifikacije kemijske strukture toksina u manje toksične spojeve (dekontaminacija) i drugi, s ciljem uklanjanja nepromijenjenih aflatoksina iz proizvoda ili smanjenja njegove bioraspodivnosti u hrani. U oba slučaja, postupci se temelje na fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama (Gonçalves i sur., 2017).

Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/12) te Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/10, NN 111/10, NN 124/12) propisane su najviše dopuštene količine mikotoksina ($\mu\text{g}/\text{kg}$ jestivog dijela namirnice) u hrani i hrani za životinje u Republici Hrvatskoj (HAPIH, 2013).

2.2.1. Fizikalne metode

Uklanjanje mikotoksina fizikalnim metodama je vrlo učinkovito: ručno sortiranje žitarica, orašastih plodova i voća od strane poljoprivrednika, kao i automatsko sortiranje u industriji značajno snižavaju koncentraciju mikotoksina. Daljnja obrada, poput mljevenja, natapanja i ekstruzije, također mogu smanjiti sadržaj mikotoksina (Karlovsky i sur., 2016).

U fizikalne metode uklanjanja mikotoksina ubrajaju se i ekstrakcija pomoću otapala, adsorpcija i toplinska inaktivacija ili inaktivacija ozračivanjem. Među najznačajnijim metodama mogu se navesti sortiranje po boji i gustoći, ljuštenje i mljevenje, flotacija, blanširanje i prženje, a u posljednje vrijeme postala je i vrlo značajna primjena gama zračenja i hladne plazme. Gama zračenjem se hrana sterilizira tako što energija velike prodorne moći prolazi kroz materijal i putem ionizacije uzrokuje izravno oštećenje DNK te nastanak mutacije i posljedično smrt stanica (Pleadin i sur., 2014; Markov i sur. 2015; Pleadin i sur., 2018).

2.2.2. Kemijske metode

Kemijske metode podrazumijevaju primjenu kemikalija čijom uporabom dolazi do konverzije mikotoksina u druge manje toksične spojeve kao što su to kiseline, lužine, oksidansi, bisulfiti i plinovi, no moguća je konverzija i u toksičnije spojeve. Za inaktivaciju, uklanjanje ili vezivanje aflatoksina koriste se propionska kiselina, amonijak, bakreni sulfat, benzojeva kiselina, limunska kiselina i neke druge kemikalije koje reagiraju s aflatoksinima.

Kemijske metode uklanjanja mikotoksina se za razliku od fizikalnih metoda smatraju nepoželjnim s obzirom na visoke vrijednosti tlaka i temperature pri kojima se reakcije provode, škodljivost uslijed stvaranja toksičnih ostataka te radi negativnog utjecaja na nutritivna, funkcionalna i senzorska svojstva proizvoda. Zbog toga su kemijske metode odobrene isključivo za smanjenje prisutnosti AFB₁ u krmivima (Pleadin i sur., 2014).

2.2.3. Biološke metode

U posljednjih nekoliko godina biološke metode dekontaminacije su sve značajnije jer se smatraju sigurnijima u usporedbi s fizikalnim i kemijskim metodama. Biološke metode detoksifikacije mikotoksina iz hrane i hrane za životinje temelje se na uporabi mikroorganizama ili enzima koji su sposobni metabolizirati, uništiti ili inaktivirati mikotoksine do stabilnih, manje toksičnih ili bezopasnih spojeva. U takve mikroorganizme ubrajaju se razne bakterije, kvasci, plijesni, aktinomiceti i alge, ali je u većini slučajeva mehanizam njihova djelovanja i dalje nepoznat (Pleadin i sur., 2017).

Najveći potencijal u uklanjanju mikotoksina iz hrane pokazuju bakterije mliječne kiseline (BMK) te kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, bilo da ih vežu na površinu stanice ili transformiraju u manje toksične produkte.

Jakopović i sur. (2018) su proveli *in vitro* istraživanje uklanjanja mikotoksina iz mlijeka pomoću β -glukana. β -glukan je sastavni dio stanične stijenke kvasca i plijesni te se nameće kao alternativno rješenje naspram tradicionalnih fizikalnih, kemijskih i fizikalno-kemijskih metoda redukcije aflatoksina jer je ekološki prihvatljiv za uklanjanje aflatoksina bez sinteze negativnih nusproizvoda. Korišten je β -glukan izoliran iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i komercijalni β -glukan dobiven iz zobi. Rezultati istraživanja su pokazali da oba ispitivanja β -glukana (iz kvasca i iz zobi) imaju sposobnost vezanja AFM₁, odnosno formiranja kompleksa AFM₁- β -glukan, a time i sposobnost uklanjanja AFM₁ iz mlijeka. β -glukan iz zobi je ostvario vezanje 65 % AFM₁, a β -glukan iz kvasca 63,6 % AFM₁.

Jedna od obećavajućih metoda za redukciju mikotoksina u kontaminiranoj hrani i hrani za životinje je i upotreba mikotoksinskih veziva. Ova sredstva detoksificiraju hranu za životinje dok prolaze kroz probavni sustav životinja tako što selektivno adsorbiraju i/ili razgrađuju mikotoksine pod pH, temperaturom i vlažnim uvjetima u probavnom sustavu. Nastali kompleks veziva i mikotoksina uklanja se izmetom. Ovi aditivi smanjuju unos mikotoksina i naknadnu distribuciju u krv i ciljne organe.

Učinkovitost adsorbenasa ovisi o svojstvima veziva i mikotoksina – fizičkoj strukturi veziva (ukupni naboj i raspodjela naboja, veličina pora, površinska dostupnost itd.) i fizikalnim i kemijskim svojstvima mikotoksina (polarnost, topljivost, molekularna veličina itd.)

Najčešće se koriste adsorbensi anorganskog podrijetla kao što prirodni i modificirani bentonit i zeolit, dijatomejska zemlja i određen broj proizvoda na bazi različitih vrsta glina. Bentoniti (BEN) su hidratizirani aluminosilikati vulkanskog podrijetla koji mogu adsorbirati neke

mikotoksine, kao i radionuklide, toksične metale i amonijak. Dijatomejska zemlja (DIA) je sediment visokog sadržaja silicijevog dioksida. DIA ima veliku poroznost i posljedično, visoku sposobnost adsorpcije zbog čega se koristi kao komponenta za proizvodnju određenih adsorbensa mikotoksina. Zeoliti (ZEO) su hidratizirani aluminosilikati alkalijskih i zemnoalkalijskih metala i mogu kao i bentoniti adsorbirati neke mikotoksine, radionuklide, toksične metale i amonijak (Bočarov Stančić i sur., 2018).

2.2.3.1. Uklanjanje pomoću organskog otpada

Biosorpcija se pokazala kao efikasna, jeftina i održiva metoda koja za uklanjanje koristi jeftine i obilne biomaterijale, koji se obično deklariraju kao otpad (Lopičić i sur., 2013a). Može se definirati kao uklanjanje iona ili molekula iz otopine pomoću određenih biomolekula (ili vrsta biomase) poput bakterija, plijesni, kvasaca, algi i poljoprivrednog, prehrambenog i urbanog otpada (Stojanović i sur., 2012).

Otpadna biomasa agroindustrijskog i urbanog porijekla je ekonomski i ekološki isplativ materijal zahvaljujući svom kemijskom sastavu, pristupačnosti, obnovljivoj prirodi i cijeni. Najčešće je to primarni poljoprivredni otpad (slama, pljeva, ljuska, kukuruzni klipovi, mahune graška itd.), nusproizvodi prehrambene industrije (pulpa šećerne repe, pivski trop, koštice i pulpa voća, ljuska oraha, lješnjaka, badema i kokosa), drvne industrije (kora, piljevina, drvna sječka, lišće, borove iglice, mahovina) ili industrije morskih plodova (ljuštura školjki, rakova) (Adamović i sur., 2013). Poljoprivredni otpad se obično sastoji od celuloze, lignina, hemiceluloze, pektina, lipida i drugih organskih spojeva koji su bogati različitim funkcionalnim grupama odgovornim za vezanje mikotoksina.

Biosorbensi imaju višeslojnu, poroznu strukturu, ispunjenu šupljinama i kanalima koji pružaju ogroman volumen po jedinici površine sorbensa, što je povoljno u procesu biosorpcije. Prosječni promjer pora manji od 1 μm mogao bi biti koristan za difuziju i adsorpciju mikotoksina. Temeljni mehanizmi u procesu biosorpcije su jednokratna ili višestruka ionska izmjena, stvaranje kompleksa, adsorpcija, elektrostatičke interakcije, taloženje i stvaranje kelata (Bočarov Stančić i sur., 2018).

Efikasnost biosorbenasa može se povećati kemijskom (kiselinama i bazama), fizičkom (termički, ultrazvučni ili mehanokemijski tretman) i mikrobiološkom aktivacijom (Adamović i sur., 2013). U većini slučajeva kemijskom modifikacijom celuloznih materijala povećava se adsorpcijski kapacitet materijala, a kiselinskim predtretmanom se mogu ukloniti topljive

organske nečistoće što mijenja strukturu i rezultira povećanjem broja mjesta za vezanje (Lopičić i sur., 2013a).

Lopičić i sur. (2013a) su proveli *in vitro* istraživanje kako bi procijenili sposobnost adsorpcije koštice breskve za različite mikotoksine. Koristili su nemodificirane koštice breskve i koštice breskve modificirane klorovodičnom kiselinom. Koštice breskve imaju višeslojnu poroznu površinu sa nepravilnom laminiranom strukturom s prosječnim promjerom pora manjim od 1 μm , što je korisno za difuziju i adsorpciju mikotoksina. Koštice su se sastojale uglavnom od celuloze (58,02 %), hemiceluloze (16,54 %) i lignina (5,02 %).

Efikasnost adsorpcije biomase se izražava preko indeksa adsorpcije (jednadžba 1), gdje je C_i početna, a C_{eq} ravnotežna koncentracija mikotoksina:

$$\text{Indeks adsorpcije} = [(C_i - C_{eq}) / C_i] * 100 \quad (1)$$

Nemodificirane koštice breskve su pri pH 3 i 7 vezale više aflatoksina B₁ (58,82 %) nego modificirane koštice breskve (41,18 %). Modifikacija sa 1 M HCl je uzrokovala promjenu adsorpcijskog indeksa, ali pri vezanju aflatoksina B₁ nije dovela do povećane adsorpcije.

Adamović i sur. (2013.) su ispitivali učinak biosorpcije korištenjem otpadne biomase vodenog korova *Myriophyllum spicatum* i koštica voća (breskve i višnje), u prirodnom i modificiranom obliku. Koštice breskve i višnje po kemijskom sastavu imaju dosta sličnosti u većini sastojaka. U oba materijala, sadržaj proteina i masti je izuzetno mali, a sadržaj celuloze, NDF (celuloza + hemiceluloza + lignin) i ADF (celuloza + lignin) dominira i iznosi više od 50 %, a također je visok i sadržaj lignina (>16,50 %).

Indeks biosorpcije je ispitivan u 0,1 M elektrolitu K₂HPO₄ na pH vrijednostima 3,0, 6,9 i 7 s obzirom da se u najvećem dijelu probavnog trakta životinja pH nalazi u opsegu ispitivanih vrijednosti. Visok indeks biosorpcije aflatoksina B₁ (AFB₁) utvrđen je za biljku *Myriophyllum spicatum* (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 modificirane koštice breskve adsorpcija istog mikotoksina bila dosta slabija (41,18 % pri pH 3 i 7).

Biosorpcija AFB₁ za modificiranu i nemodificiranu košticu višnje je bila vrlo slična i u većini slučajeva je iznosila 58,82 %. Samo je pri pH 7 kod nemodificirane koštice višnje bila nešto niža (41,18 %). Na temelju ostvarenih rezultata, zaključili su da se otpadna biomasa ispitivanih materijala može koristiti i kao biosorbens pojedinih mikotoksina i supstituent komercijalnih biosorbenasa.

Bočarov-Stančić i sur. (2018) su proveli *in vitro* istraživanje uklanjanja mikotoksina korištenjem različitih anorganskih adsorbenata (bentonit, diatomit i zeolit) i organskog otpada. Kao organski otpad također su ispitivali vodeni korov *Myriophyllum spicatum* i koštice breskve i višnje. Istraživanje su proveli pod istim uvjetima kao i Adamović i sur. (2013) te su dobili vrlo slične rezultate. Izuzetak su nemodificirane koštice breskve koje su pokazale manju sposobnost adsorpcije aflatoksina B₁ (58,82 %) u usporedbi s istraživanjem kojeg su proveli Adamović i sur. (2013).

Assaf i sur. (2018) su proveli istraživanje sposobnosti vezanja aflatoksina M₁ na hitin i ljuske škampa (samljevene i nesamljevene) u PBS puferu. Također su testirali stabilnost adsorbens-AFM₁ kompleksa u mlijeku pri različitom vremenu inkubacije i različitoj temperaturi. Povećanjem vremena inkubacije koncentracija vezanog AFM₁ je porasla kod hitina i nesamljevenih ljuski u PBS puferu. Međutim koncentracija vezanog AFM₁ na samljevenim ljuskama je ostala nepromijenjena u vremenu. U mlijeku, povećanje vremena inkubacije i smanjenje temperature negativno je utjecalo na vezanje AFM₁ s nesamljevenim ljuskama, a pozitivno na hitin. Rezultati su pokazali da hitin i ljuske škampa imaju sposobnost vezanja AFM₁ i u mlijeku i u PBS puferu.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Kokosovo brašno, crne stolne masline i svježa jaja nabavljeni su u trgovini mješovite robe.

3.1.2. Standard AFB₁

Stock otopina mikotoksina pripremljena je otapanjem kristaliničnog AFB₁ (Sigma, St. Louis, MO, SAD) u acetonitrilu (Honeywell, Offenbach, Njemačka) do osnovne koncentracije od 2,5 mg/mL i pohranjena na 4 °C do daljnjih analiza.

3.1.3. Kemikalije

- Fosfatni pufer (PBS) sastava (g/L destilirane vode): natrijev klorid 8; kalijev klorid 0,2; natrijev hidrogen fosfat 1,44 i kalijev dihidrogen fosfat 0,24. pH je podešen na vrijednost 7,4 pomoću klorovodične kiseline te je dodana destilirana voda do volumena od 1 L.
- Kemikalije korištene za HPLC analizu su bile analitičke čistoće:
 - metanol (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
 - acetonitril (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
 - octena kiselina (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
 - amonij acetat (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
 - Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
 - KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
 - KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
 - Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

3.1.4. Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska mješalica (Tehnica, Slovenija)
- centrifuga Z 206 A (Hermle, Labortechnik GmbH, Njemačka)
- tehnička vaga (Sartorius, Njemačka)
- pH – metar (Mettler Toledo, Švicarska)
- HPLC uređaj (Infinity 1260, Agilent, SAD); maseni detektor (QQQ 6410, Agilent, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema adsorbensa

Maslinama je uklonjen plod, a koštica je isprana sterilnom vodom, osušena i usitnjena u tarioniku. Ljuska jajeta je nakon uklanjanja unutarnje opne isprana sa sterilnom vodom, osušena i usitnjena u tarioniku. Obje vrste adsorbensa isprane su u destiliranoj vodi i osušene na sobnoj temperaturi u Petrijevim zdjelicama tijekom 2 dana. Kokosovo brašno korišteno je u svom originalnom obliku.

3.2.2. Vezanje AFB₁ na adsorbens

Po 1 g svakog adsorbensa (ljuska jajeta, koštica masline, kokosovo brašno) dodano je u 3x40 mL PBS pufera (pH 7,4) u koji je dodan AFB₁ do konačne koncentracije od 0,2 µg/kg. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi, a za određivanje količine nevezanog AFB₁ po 12 mL uzorka je uzimano u nultom satu (vrijeme odmah nakon dodatka toksina i adsorbensa), nakon 4 i 24 sata. Supernatant uzoraka je odvojen centrifugiranjem pri 6000 rpm tijekom 20 min i pohranjen na -4 °C do HPLC analize.

3.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

HPLC analiza provedena je na Hrvatskom veterinarskom institutu prema akreditiranoj metodi.

Prije HPLC analize, 12 mL uzorka razrijeđeno je sa 60 mL 0,1 % Tween u PBS-u (pH 7,4) u tikvici volumena 100 mL te lagano promiješano. Uzorci su pročišćeni imunoafinitetnim kolonama uz dodatak 20 mL PBS pufera. Brzina protoka nije prelazila 1 mL/min. Nakon ispiranja kolona i sušenja u vakuumu, AFB₁ je eluiran s 1 mL metanola. Dobiveni eluat je još 3 puta propušten kroz kolonice. 1 mL ultračiste vode je dodan na kolonice i zatim je primijenjen vakuum. Uzorci su izmiješani i stavljeni u vijale. Koncentracija preostalog AFB₁ u uzorcima određena je sustavom HPLC (Infinity 1260, Agilent) uz maseni detektor (QQQ 6410, Agilent).

Uvjeti rada:

Gradijent mobilne faze:

t(min)	A	B
0	100	0
14	0	100
18,10	0	100
20,5	100	0

Trajanje analize: 22 min

Protok mobilne faze: 1 mL/min

Temperatura: 25°C

Početni tlak: 115 bar

Capillary current: 42 nA

Izvor: ESI

4. Rezultati i rasprava

Sve je veća zabrinutost zbog onečišćenja okoliša mikotoksinima, zbog njihove široke pojavnosti u poljoprivredi, ali i u domaćinstvu i industriji. Jedno od rješenja za smanjenje koncentracije mikotoksina je primjena poljoprivrednog otpada kao adsorbensa. Upotreba biološkog ili organskog otpada, koji je moguće primijeniti u osnovnom obliku ili ga djelomično modificirati određenim fizičko-kemijskim procesima, predstavlja jednu od najaktualnijih alternativnih metoda za uklanjanje kontaminanata kemijskog podrijetla kao što su metali i mikotoksini.

U ovom radu ispitala se sposobnost adsorpcije aflatoksina B₁ na koštice masline, ljuske jajeta i kokosovo brašno tijekom 24 sata. Navedeni materijali mogu predstavljati otpad u domaćinstvu ili poljoprivredi, nisu štetni za okolinu, ne dovode do sekundarnog zagađenja, te su sigurni za upotrebu.

Ljuska jajeta je porozna što je čini pogodnim za upotrebu kao adsorbensa. Karakteristika ljuske jajeta je i njena slojevita struktura: vanjski sloj koji je keramičkog podrijetla, središnji spužvast sloj i unutrašnji lisnati sloj, čine troslojnu građu ljuske. Slojevita struktura omogućava postojanje velikog broja pora, od kojih su neke i nanometarskih dimenzija, pa ljuska jajeta predstavlja učinkoviti prirodni materijal za adsorpciju različitih kontaminanata (Koumanova i sur., 2002). Koštica masline i kokosovo brašno se uglavnom sastoje od celuloze, lignina, hemiceluloze, pektina, lipida i drugih organskih spojeva koji su bogati različitim funkcionalnim skupinama, odgovornim za vezanje onečišćujućih tvari. Ova vrsta biosorbensa također ima višeslojnu poroznu strukturu ispunjenu šupljinama i kanalićima, koji daju veliki volumen po jedinici površine adsorbensa pospješujući proces vezanja (Bočarov-Stančić i sur., 2018).

Rezultati istraživanja uklanjanja AFB₁ košticama masline, ljuskom jajeta i kokosovim brašnom prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Uklanjanje aflatoksina B₁ pomoću organskih adsorbensa tijekom 24 h

Adsorbens	Vrijeme inkubacije (h)	AFB₁ (µg/kg)
koštica masline	0	<LOD
	4	<LOD
	24	<LOD
ljuska jajeta	0	<LOD
	4	<LOD
	24	<LOD
kokosovo brašno	0	<LOD
	4	<LOD
	24	<LOD

LOD = 0,03 µg/kg

Pozitivna kontrola = 0,19 µg/kg

Početna koncentracija AFB₁ u puferu iznosila je 0,19 µg/kg što predstavlja minimalno odstupanje od početno izračunate koncentracije od 0,2 µg/kg a može se objasniti ljudskom pogreškom tijekom pripreme.

Rezultati iz tablice 1. pokazuju da su sve tri vrste adsorbensa jednako dobro vezale AFB₁. Koncentracija nevezanog AFB₁ je već na početku eksperimenta pala ispod limita detekcije, odnosno ispod 0,03 µg/kg. Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima drugih autora koji su pokazali da se proces adsorpcije uglavnom odvija u dvije faze. Tijekom prve faze, a naročito na samom početku, adsorpcija se odvija velikom brzinom, a zatim duljim vremenom trajanja opada. Prva faza uglavnom traje 5-60 minuta. U drugoj fazi, proces se značajno usporava do postizanja ravnoteže između kontaminanta i adsorbensa, nakon čega se proces smatra završenim (Goyal i sur., 2008).

Bočarov-Stančić i sur. (2018) su dobili slične rezultate ispitivanjem vezanja različitih mikotoksina uključujući i AFB₁ na različite anorganske adsorbense i organski otpad. Koštice breskve i višnje su pokazale dobru sposobnost vezanja aflatoksina B₁ čiji je postotak nakon 1 sata inkubacije iznosio oko 58 %. Najbolja sposobnost vezanja zabilježena je primjenom vodenog korova *Myriophyllum spicatum*, pomoću kojeg je uspješno uklonjeno oko 95 % AFB₁.

Još bolje rezultate uklanjanja AFB₁ zabilježili su Greco i sur. (2018) primjenom različitih vrsta poljoprivrednog otpada, prilikom čega je korištenjem rogača došlo do 100 % vezanja ovog mikotoksina u puferu. Isti autori postigli su dobru efikasnost vezanja AFB₁ (94 %) i primjenom komine grožđa vrsta Malvazija i Sangiovese. Korist otpada poljoprivredne industrije u uklanjanju AFB₁ ispitali su i Zavala-Franco i sur. (2018) korištenjem kore od banane, lišća grmolike biljke *Pyracantha koidzumii* i praha aloe vere. Najveći postotak adsorpcije AFB₁ dobiven je primjenom *P. koidzumii* u iznosu od 69 %. Budući da su rezultati ovog završnog rada bolji po uspješnosti vezanja od nekolicine dosadašnjih ispitivanja adsorpcije AFB₁, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se otkrio mehanizam vezanja, te primijeniti različite vrste poljoprivrednih otpadaka s ciljem pronalaska novih, još boljih adsorbensa i smanjenja količine industrijskog otpada.

5. Zaključci

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

1. Sve tri vrste adsorbensa (koštice masline, kokosovo brašno i ljuske jajeta) su vrlo uspješno vezale aflatoksin B₁
2. Kod sva tri adsorbensa vidljivo je da se adsorpcija odvija vrlo brzo, jer su koncentracije AFB₁ već na samom početku pokusa bile ispod LOD
3. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na primjenjivost koštica maslina, ljuske jaja i kokosovog brašna kao biosorbenta, a njihova prednost pred drugim adsorbensima je u tome što su dostupni u količinama i jednostavni za upotrebu.

6. Literatura

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.

Assaf J. C., El Khoury A., Atoui A., Louka N., Chokr A. (2018) A novel technique for aflatoxin M₁ detoxification using chitin or treated shrimp shells: *in vitro* effect of physical and kinetic parameters on the binding stability. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102** (15): 6687–6697.

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

Bočarov-Stančić A., Lopičić Z., Bodroža-Solarov M., Stanković S., Janković S., Milojković J., Krulj J. (2018). *In vitro* removing of mycotoxins by using different inorganic adsorbents and organic waste materials from Serbia. *Food and Feed Research* **45**: 87-96.

Gonçalves B.L., Gonçalves C., Rosim R.E., Oliveira C.A.F., Corassin C.H. (2017) Evaluations of Different sources of *Saccharomyces cerevisiae* to binding capacity of aflatoxin B₁ utilizing their adsorption isotherms, *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology* **3** (4): 126-132.

Goyal P., Sharma P., Srivastava S., Srivastava M.M. (2008) *Saraca indica* leaf powder for decontamination of Pb: removal, recovery, adsorbent characterization and equilibrium modeling, *Environmental Science & Technology* **5**(1): 27-34.

Greco D., D'Ascanio V., Santovito E., Logrieco A. F., Avantaggiato G. (2019) Comparative efficacy of agricultural byproducts in sequestering mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99** (4): 1623-1634.

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 12. svibnja 2021.

HAPIH (2013) Što su mikotoksini?, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatska <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>>. Pristupljeno 12. svibnja 2021.

Hayes J., McMahon M., Chowdhry S., Dinkova-Kostova A. (2010) Cancer Chemoprevention Mechanisms Mediated Through the Keap1-Nrf2 Pathway. *Antioxidants & redox signaling* **13**: 1713-48.

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

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002) Aflatoxins. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **82**: 171–300.

Jakopović Ž., Čanak I., Frece J., Bošnjir J., Ivešić M., Kuharić Ž., Pavlek Ž., Markov K. (2018) Uklanjanje kompleksa β -glukan-AFM₁ iz mlijeka. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **13** (3-4): 136-139.

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**(4): 179–205.

Koumanova B., Peeva P., Allen S.J., Gallagher K.A., Healy M.G., (2002) Biosorption from aqueous solutions by eggshell membranes and *Rhizopus oryzae*: equilibrium and kinetic studies. Journal of Chemical Technology and Biotechnology **77**(5): 539-545.

Kumar P., Mahato D. K., Kamle M., Mohanta T. K., Kang S. G. (2017) Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. Frontiers in microbiology **7**: 2170.

Lopičić Z., Bočarov Stančić A., Stojanović M., Milojković J., Pantić V., Adamović M. (2013a) In vitro evaluation of the efficacy of peach stones as mycotoxin binders. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke **124**: 287-296.

Markov K., Mihaljević B., Domijan A. M., Pleadin J., Delaš F., Frece J. (2015) Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of aflatoxin B₁ *in vitro* and *in situ* using gamma irradiation. Food control **54**: 79-85.

Peraica M., Rašić D. i Gluščić V. (2014). Utjecaj aflatoksina na zdravlje ljudi. Glasilo biljne zaštite **14** (4): 310-316.

Pleadin J., Frece J. i Markov K. (2014) Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **9** (3-4): 75-82.

Pleadin J., Frece J. i Markov K. (2017) Utjecaj postupaka prerade na transformaciju i smanjenje koncentracije mikotoksina u određenim skupinama hrane. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **12** (1-2): 4-13.

Pleadin J., Kiš, M., Frece J. i Markov K. (2018) Primjena fizikalnih i kemijskih metoda u uklanjanju mikotoksina iz hrane i hrane za životinje. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **13** (1-2): 24-31.

Pleadin J., Lešić T., Kmetič I., Markov K., Zadavec M., Frece J., Kiš M., Šarkanj B. (2020) Toksični učinci mikotoksina: Mehanizam djelovanja i mikotoksikoze. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **15** (1-2):3-10.

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

Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje. Narodne novine (NN 80/2010, NN 111/2010, NN 124/2012)

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.

Yu J. (2012) Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination Toxins **4**: 1024-1057.

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

Zavala-Franco A., Hernández-Patlán D., Solís-Cruz, B., López-Arellano R., Tellez-Isaias G., Vázquez-Durán A., Méndez-Albores A. (2018) Assessing the aflatoxin B₁ adsorption capacity between biosorbents using an *in vitro* multicompartamental model simulating the dynamic conditions in the gastrointestinal tract of poultry. Toxins **10** (11): 484.

Izjava o izvornosti

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

ime i prezime studenta