

# Uklanjanje aflatoksina M1 i metala iz mlijeka primjenom bakterija mliječne kiseline i $\beta$ -glukana

---

Kuharić, Željka

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:386095>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-28**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Željka Kuharić

**UKLANJANJE AFLATOKSINA M1 I  
METALA IZ MLIJEKA PRIMJENOM  
BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE I  $\beta$ -  
GLUKANA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof.dr.sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2020



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Željka Kuharić

**REMOVING OF AFLATOXIN M1 AND  
METALS FROM MILK USING LACTIC  
ACID BACTERIA AND  $\beta$ -GLUCAN**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Ksenija Markov, Full Professor

Zagreb, 2020

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

Disertacija

UDK: 582.282.23:615.372:637.1(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### UKLANJANJE AFLATOKSINA M1 I METALA IZ MLIJEKA PRIMJENOM BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE I $\beta$ -GLUKANA

Željka Kuharić, dipl. ing. biotehnologije

Rad je izrađen u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar i Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dio istraživanja ove disertacije odrađen je u sklopu HRZZ projekta IP-2016-06 Inovativni postupci uklanjanja AFM1 biofiksatorima iz mlijeka, voditeljice prof.dr.sc. Ksenije Markov.

**Mentor:** Prof.dr.sc. Ksenija Markov, red. prof.

**Kratki sažetak:** Većina živežnih namirnica, pa tako i mlijeko i mliječni proizvodi, sadrže potencijalno opasne tvari, poput aflatoksina M1 (AFM1) i metala. Zbog zabrinutosti o toksičnosti ovih kontaminanata od iznimne je važnosti kontrolirati njihovu prisutnost i koncentraciju u hrani. Obzirom na navedeno, cilj ovog rada bio je primjena biofiksatora (bakterije mliječne kiseline (BMK) i  $\beta$ -glukan) i razvoj postupaka detoksifikacije AFM1 i metala iz mlijeka. Rezultati istraživanja su pokazali da različiti sojevi BMK u ovisnosti o parametrima (žive, mrtve ili liofilizirane stanice i vrijeme trajanja pokusa) pokazuju različitu učinkovitost vezanja AFM1 i pojedinih metala i predstavljaju alternativu postojećim metodama detoksifikacije. Nadalje, dokazano je da  $\beta$ -glukan izoliran iz kvasca (0,01% i 0,005%) ima sposobnost vezanja AFM1 i pojedinih metala, a samim time i mogućnost uklanjanja navedenih kontaminanata iz mlijeka. Predloženi postupci (filtracija i centrifugiranje) uklanjanja kompleksa biofiksator-toksikant pokazali su se učinkoviti u laboratorijskim uvjetima.

**Broj stranica:** 141

**Broj slika:** 54

**Broj tablica:** 37

**Broj literaturnih navoda:** 204

**Broj priloga:**

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** aflatoxin M1, metali, bakterije mliječne kiseline,  $\beta$ -glukan, vezanje

**Datum obrane:** 09.11.2020.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr.sc. Jadranka Frece, red. prof.
2. Dr.sc. Blaženka Kos, red. prof.
3. Dr.sc. Jasna Bošnjir, izv. prof.

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb** **Ph.D. thesis**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition**

**UDK: 582.282.23:615.372:637.1(043.3)**  
**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Biotechnology**

### **REMOVING OF AFLATOXIN M1 AND METALS FROM MILK USING LACTIC ACID BACTERIA AND $\beta$ -GLUCAN**

**Željka Kuharić, B. Sc. Biotechnology**

**Thesis performed at the Teaching institute of public health dr. Andrija Stampar and Faculty of Food technology and biotechnology University of Zagreb. Part of the research of this dissertation was done as part of the HRZZ project IP-2016-06 Innovative procedures for the removal of AFM1 by biofixators from milk, led by PhD Ksenija Markov, Full Proffesor.**

**Supervisor:** PhD, Ksenija Markov, Full Proffesor

**Short abstract:** Most food products, including milk and dairy products, contain certain potentially dangerous substances, such as aflatoxin M1 (AFM1) and metals. Due to concerns about the toxicity of these contaminants, it is very important to control their presence and quantity in food. In view of above mentioned, the aim of this work was to apply biofixators (lactic acid bacteria (LAB) and  $\beta$ -glucan) and to develop the detoxification processes of AFM1 and metals from milk. The results of this research have shown that different strains of LAB depending on the parameters (viable, heat-treated or lyophilized cells and the duration of the experiment) show different binding efficiency of AFM1 and individual metals and represent an alternative to existing detoxification methods. Furthermore, it has been shown that  $\beta$ -glucan isolated from yeast (0,01% and 0,005%) has the ability to bind AFM1 and individual metals, and thus the ability to remove these contaminants from milk. The proposed procedures (filtration and centrifugation) for removing the biofixator-toxicant complex have been shown to be effective under laboratory conditions.

**Number of pages:** 141  
**Number of figures:** 54  
**Number of tables:** 37  
**Number of references:** 204  
**Number of appendixes:**  
**Original in:** Croatian

**Key words:** aflatoxin M1, metals, lactic acid bacteria,  $\beta$ -glucan, binding

**Date of the thesis defense:** 09.11.2020.

#### **Reviewers:**

1. PhD Jadranka Frece, Full Proffesor
2. PhD Blaženka Kos, Full Proffesor
3. PhD Jasna Bošnjir, Associate Proffesor

**Thesis deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and at the University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.**

Tema doktorskog rada prihvaćena je na X. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akademsku godinu 2018./2019. u Zagrebu održanoj 17. srpnja 2019. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 18. veljače 2020. godine na 6. sjednici u 351. akademskoj godini (2019./2020.).

## SAŽETAK

Iako svjedočimo značajnom porastu pojavljivanja bolesti koje se prenose hranom, a za koje su uzročnici mikrobi podrijetlom iz hrane, ništa manje nisu zabrinjavajući ni kontaminanti kemijskog podrijetla, poput mikotoksina i metala. Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni, česti onečišćivači hrane i uz brojne značajne štete u gospodarstvu, uzročnici su različitih bolesti u ljudi i životinja. Metali su tvari, koji sve češće postaju predmet znanstvenih istraživanja. Sve je veća zabrinutost zbog onečišćenja okoliša određenim metalima, zbog njihove široke primjene u domaćinstvu, industriji, medicini i poljoprivredi. S druge strane, određeni metali su neophodni za biokemijske i fiziološke funkcije u organizmu te njihov nedostatak dovodi do razvoja raznih bolesti i sindroma. Jedno od rješenja za smanjenje koncentracije AFM1 i metala u mlijeku su biofiksatori. Jedna od metoda je uklanjanje kontaminanta mikrobnim kulturama kao što su bakterije mliječne kiseline (BMK) i komponentama stanične stijenke kao što je  $\beta$ -glukan izoliran iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Stoga je cilj ovog rada bio odrediti optimalne parametre za smanjenje i/ili uklanjanje AFM1 i metala iz mlijeka pomoću biofiksatora (BMK i  $\beta$ -glukan), ispitati učinkovitost i primjenjivost metoda filtracije i centrifugiranja i predložiti rješenje uklanjanja nastalog kompleksa biofiksator-toksikant.

Metodologija korištena u ovom radu obuhvatila je: mikrobiološke metode pripreme BMK (žive, mrtve ili liofilizirane stanice) i  $\beta$ -glukana (izoliran iz stanične stijenke kvasca); pripremu uzorka mlijeka za analize vezanja AFM1 i određivanje koncentracije AFM1 tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) uz FLD detektor metodom vanjskog standarda; pripremu uzoraka mlijeka za analizu metala i metodu za određivanje koncentracije metala ICP-MS tehnikom (induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom) nakon digestije u mikrovalnoj pećnici; uklanjanje kompleksa BMK- AFM1/metali metodom centrifugiranja i filtracije uz upotrebu bakterioloških filtera poroznosti 0,45  $\mu\text{m}$ ; uklanjanje kompleksa glukan-AFM1/metali centrifugiranjem uzorka pri 3500 rpm u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100kDa, maksimalnog volumena 70 mL. Istraživanja su obuhvatila 100 uzoraka mlijeka kontaminiranih s AFM1/metalima u kojima su se određivali optimalni parametri za smanjenje i/ili uklanjanje AFM1 i metala a obuhvaćali su: broj živih stanica BMK u broju  $10^6$  i  $10^8$  st/mL; mrtve stanice BMK u koncentraciji 0,5 i 1  $\text{mgmL}^{-1}$ ; koncentracija liofiliziranih stanica BMK od 0,5 i 1,0 % (w/v); optimalne koncentracije  $\beta$ -glukana od 0,01 i 0,005 % (w/v); vrijeme kontakta između toksikanta-biofiksatora, pri kojem će nastali kompleks biti stabilan i neće doći do otpuštanja (desorpcije) AFM1/metala u mlijeko. Uzorci mlijeka s biofiksatorima i toksikantima

sakupljali su se nakon 0-tog (vrijeme 10-15 min nakon što su BMK/ $\beta$ -glukan dodani u kontaminirano mlijeko s AFM1/metalima i uzorci homogenizirani); 2.; 4. i 24. h inkubacije.

Rezultati istraživanja pokazuju da različiti sojevi BMK pokazuju različitu učinkovitost vezanja AFM1 i metala. Proces vezanja ovisi o tome da li su primjenjene žive, mrtve ili liofilizirane stanice. Uspješnost vezanja AFM1 stanicama BMK iznosila je od 15,75-94,49 %, ovisno o korištenom soju, vremenu inkubacije i tretmanu. Pokazalo se da među različitim sojevima BMK postoje značajne razlike u afinitetu prema različitim metalima, zbog čega se javljaju velike razlike u količini vezanih metala. Žive stanice BMK su vezale metale u rasponu od 4-98,50 %, a mrtve stanice u rasponu od 9,38-96,80 %. Učinkovitost vezanja AFM1 i metala  $\beta$ -glukanom ovisi u kojoj je koncentraciji navedeni biofiksator primijenjen.  $\beta$ -glukan od 0,01 % u nultom satu veže značajno više AFM1 u odnosu na 0,005 %  $\beta$ -glukan. Rezultati istraživanja vezanja metala  $\beta$ -glukanom (0,005 % i 0,01 %) su pokazali da učinkovitost vezanja u 0. satu varira od 13,60-98,65 %. Predloženi postupci filtracije i centrifugiranja za uklanjanje kompleksa biofiksator-toksikant pokazali su se učinkoviti u laboratorijskim uvjetima.



## ABSTRACT

Although we are witnessing a significant increase in the occurrence of foodborne diseases caused by microbes originating from food, contaminants of chemical origin, such as mycotoxins and metals, have been of no less concern. Mycotoxins are secondary metabolites produced by molds. Mycotoxins, as frequent food contaminants, in addition to a number of significant damage to the economy, are the cause of various diseases in humans and animals. Metals are substances, which are increasingly becoming the subject of scientific researches. There is a growing concern about environmental pollution by certain metals, due to their widespread use in the household, industry, medicine and agriculture. On the other hand, certain metals are necessary for biochemical and physiological functions in the body and their lack leads to the development of various diseases and syndromes. One of the solutions to reduce the concentration of AFM1 and metals in milk are biofixators. One of the methods is to remove contaminants using microbial cultures such as lactic acid bacteria (LAB) and cell wall components such as  $\beta$ -glucan isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, the aim of this research was to determine the optimal parameters for the reduction and/or removal of AFM1 and metals from milk using biofixators (LAB and  $\beta$ -glucan), to examine the effectiveness and applicability of filtration and centrifugation methods and to propose a solution to remove the biofixator-toxicant complex.

The methodology used in this dissertation included: microbiological methods for preparation of LAB (viable, heat-treated or lyophilized cells) and  $\beta$ -glucan (isolated from cell wall of yeast); preparation of milk samples for analysis of AFM1 binding and determination of AFM1 concentration by HPLC (High-performance liquid chromatography) technique with FLD detector by external standard method; preparation of milk samples for analysis of metals and method for determination of metal concentration by ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry) technique after digestion in the microwave oven; removal of LAB-AFM1/metals complex by centrifugation and filtration using bacteriological filters 0,45  $\mu\text{m}$  porosity; removal of  $\beta$ -glucan-AFM1/metals complex by centrifugation of the sample at 3500 rpm in a Centricon Plus-70 filter, MWCO 100kDa, maximum volume 70 mL. The research included 100 milk samples contaminated with AFM1/metals in which the optimal parameters for the reduction and/or removal of AFM1 and metals were determined and included: number of viable LAB cells in numbers  $10^6$  and  $10^8$  CFU $\text{mL}^{-1}$ ; heat-treated LAB cells at a concentration of 0,5 and 1 mg $\text{mL}^{-1}$ ; concentration of lyophilized LAB cells of 0,5 and 1,0 % (w/v); optimal  $\beta$ -glucan concentrations of 0,01 and 0,005 % (w/v); contact time between toxicant and biofixator in which the resulting

complex will be stable and there will be no release (desorption) of AFM1/metals into milk. Milk samples with biofixators and toxicants were collected after 0h (time 10-15 min after LAB/ $\beta$ -glucan were added to contaminated milk with AFM1/metals and samples were homogenized); 2., 4. and 24.h incubation.

The results of the research show that different strains of LAB show different binding efficiency of AFM1 and metals. The binding process depends on whether viable, heat-treated or lyophilized cells are used. The binding success rate of AFM1 to LAB cells ranged from 15,75-94,49 %, depending on the used strain, the incubation time, and the treatment. It has been shown that there are significant differences in affinity for different metals between different strains of LAB and because of it there are great differences in the amount of bound metals. Viable cells of LAB bound metals in the range of 4–98,50 %, and heat-treated cells in the range of 9,38–96,80 %. The binding efficiency of AFM1 and metals to  $\beta$ -glucan depends on the concentration at which biofixator is applied. 0,01 %  $\beta$ -glucan at 0 h binds significantly more AFM1 compared to 0,005 %  $\beta$ -glucan. The results of the study of metal binding by  $\beta$ -glucan (0,005 % and 0,01 %) showed that the binding efficiency in the 0th hour varies from 13,60- 98,65 %. Proposed filtration and centrifugation methods for removing biofixator-toxicant complexes have been shown to be effective under laboratory conditions.

*Informacije o mentoru:* prof.dr.sc. Ksenija Markov

## ŽIVOTOPIS

Prof.dr.sc. Ksenija Markov rođena je u Zagrebu, gdje je 1982. godine upisala Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 1987. godine i iste godine zaposlila se u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, PBF-a kao pripravnik-postdiplomand. Akademski stupanj magistra biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija stekla je 1991., a akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija, 2005. godine obranivši doktorski rad na PBF-u. Zvanje izvanredne profesorice stječe 2012. godine, a redovite profesorice 2017. Od 2013. godine je pročelnica Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica PBF-a. Kao nastavnik sudjeluje u izvođenju nastave na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima. Nositeljica je kolegija *Mikrobiologija*, *Mikologija* i *Mikrobni indikatori u kontroli kvalitete hrane*; a suradnica na kolegijima *Mikrobiologija namirnica*, *Bakteriologija*, *Sustavi kontrole kvalitete* i *Mikrobiologija hrane*. Od 2019. voditeljica je poslijediplomskog specijalističkog studija „Upravljanje hranom” na PBF-u. Usavršavala se znanstveno iz područja mikrobiologije i mikotoksikologije, a završila je i programe usavršavanja visokoškolske nastave. Koautorica je četiri sveučilišna udžbenika, jedne znanstvene knjige, pet poglavlja u znanstvenim knjigama te tri stručne knjige. Pod njenim mentorstvom izrađena su 29 diplomski i 21 završni rad te obranjena dva doktorska rada i 9 specijalističkih radova. Od 2012. godine član je Uredničkog odbora znanstveno-stručnog časopisa *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. Prof. dr. sc. Ksenija Markov je od 2007. godine članica brojnih odbora i povjerenstva na PBF-u, članica je Povjerenstva pri Ministarstvu zdravlja (2014.-) i Ministarstvu poljoprivrede (2019.-), Stručne radne skupine za *Codex alimentarius* (2018.-), Povjerenstva za utvrđivanje kriterija i potvrdu izbora u zvanja VBT područja (2019.-2021.). Bila je član brojnih znanstvenih i organizacijskih odbora. Sudjelovala je kao suradnica ili kao voditeljica u provedbi 19 domaćih i stranih znanstvenih projekata te kao konzultantica na jednom znanstvenom projektu. Rezultati znanstvenih istraživanja zaštićeni su u 3 nacionalna patenta, a objavila je ukupno 87 znanstvena rada od kojih su 44 rada klasificirana u a1 skupini, 30 u a2, 13 je radova s kongresa i skupova iz kategorije a3 i desetak stručnih radova. Članica je Društva sveučilišnih nastavnika i ostalih znanstvenika u Zagrebu, Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Hrvatskog mikrobiološkog društva u Zagrebu. Od 2019. godine obnaša dužnost predstojnice Zavoda za biokemijsko inženjerstvo PBF-a.

## ZAHVALE

Želim se zahvaliti osobama, koje su uvelike doprinijele da napišem ovu disertaciju. Hvala mojim roditeljima, koji su mi velika potpora cijeli život i koji su mi uvijek omogućili da idem naprijed poticajnim riječima i djelima i da ne posustanem u teškim trenucima. Hvala mom suprugu Saši i sinu Luki, koji daju smisao svakom trenutku, i čija mi ljubav i toplina daju energiju za ispunjenje postavljenih ciljeva.

Hvala mojoj mentorici, prof.dr.sc. Kseniji Markov, koja mi je uvijek ponudila najbolja rješenja, kada sam ostala bez ideja. Želim joj se zahvaliti na ljubaznosti, podršci i stručnom vodstvu koje su uvelike omogućile da ova disertacija bude dovršena.

Hvala prof.dr.sc. Jasni Bošnir na uključenju u projekt iz kojeg su proizašli rezultati prikazani u ovoj disertaciji te na mnogobrojnim savjetima i pomoći prilikom provedbe eksperimentalnog dijela.

Hvala svim ostalim kolegama iz Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, koji su sudjelovali u provođenju eksperimentalnog dijela disertacije. Hvala voditeljici Službe za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju dr.sc. Adeli Krivohlavek na podršci. Hvala i mojoj voditeljici dr.sc. Ani Tot, koja mi je pružila podršku u izradi ove disertacije i koja je uvijek sa mnom nesebično podijelila svoje znanje.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	4
2.1. Kemijske opasnosti u mlijeku.....	5
2.1.1. Mikotoksini .....	5
2.1.2. Metali.....	15
2.2. Bakterije mliječne kiseline.....	21
2.2.1. Sistematika bakterija mliječne kiseline.....	21
2.2.2. Svojstva bakterija mliječne kiseline .....	21
2.3. $\beta$ -glukan.....	22
2.3.1. Izvori $\beta$ -glukana .....	23
2.3.2. Primjena $\beta$ -glukana.....	24
2.4. Vežanje/uklanjanje AFM1 bakterijama mliječne kiseline.....	25
2.4.1. Mehanizam vežanja AFM1 bakterijama mliječne kiseline.....	25
2.4.2. Stabilnost kompleksa mikotoksin–BMK .....	27
2.5. Vežanje/uklanjanje iona metala pomoću bakterija mliječne kiseline.....	28
2.5.1 Mehanizam vežanja iona metala bakterijama mliječne kiseline .....	28
2.6. Vežanje mikotoksina i metala $\beta$ -glukanom.....	30
2.6.1. Mehanizam vežanja mikotoksina $\beta$ -glukanom.....	31
2.6.2. Mehanizam vežanja metala $\beta$ -glukanom.....	33
3. MATERIJALI I METODE.....	34
3.1. Materijali .....	35
3.1.1. Uzorci .....	35
3.1.2. Mikroorganizmi.....	35
3.1.3. $\beta$ - glukan .....	35
3.1.4. Priprema standardnih otopina AFM1 .....	36
3.1.5. Metali.....	36
3.1.6. Hranjive podloge .....	37
3.1.7. Kemikalije.....	37
3.1.8. Pribor .....	38
3.1.9. Instrumenti .....	39
3.2. Metode rada .....	40
3.2.1. Priprema bakterija mliječne kiseline za vežanje AFM1/metala .....	40
3.2.2. Priprema $\beta$ -glukana za vežanje AFM1/metala .....	41
3.2.3. Određivanje koncentracije AFM1 u mlijeku HPLC tehnikom.....	42
3.2.4. Određivanje metala ICP-MS tehnikom.....	46

3.2.5. Uklanjanje kompleksa biofiksator- toksikant.....	52
3.2.6. Statistička analiza .....	53
4. REZULTATI.....	55
4.1. Vežanje AFM1 pomoću BMK.....	56
4.2. Vežanje AFM1 $\beta$ -glukanom .....	63
4.3. Vežanje metala pomoću BMK.....	64
4.4. Vežanje metala $\beta$ -glukanom .....	95
4.5. Uklanjanje kompleksa BMK - AFM1 .....	95
4.6. Uklanjanje kompleksa BMK-metali.....	96
4.7. Uklanjanje kompleksa $\beta$ -glukan-AFM1/metali.....	97
5. RASPRAVA.....	99
5.1. Vežanje AFM1 pomoću BMK.....	100
5.2. Vežanje AFM1 $\beta$ -glukanom .....	105
5.3. Vežanje metala pomoću BMK.....	107
5.3.1. Vežanje Fe .....	108
5.3.2. Vežanje Se.....	109
5.3.3. Vežanje Mo.....	109
5.3.4. Vežanje Cd.....	110
5.3.5. Vežanje Pb .....	111
5.3.6. Vežanje Cu.....	112
5.3.7. Vežanje Al .....	114
5.3.8. Vežanje Mn.....	114
5.3.9. Vežanje Zn.....	115
5.3.10. Vežanje Hg.....	116
5.4. Vežanje metala $\beta$ -glukanom .....	116
5.5. Uklanjanje kompleksa biofiksator- toksikant .....	117
5.5.1. Uklanjanje kompleksa BMK- AFM1 .....	118
5.5.2. Uklanjanje kompleksa BMK-metali.....	119
5.5.3. Uklanjanje kompleksa $\beta$ -glukan - AFM1 .....	120
6. ZAKLJUČCI .....	121
7. LITERATURA .....	123

## **1. UVOD**

Danas je prisutan veliki broj bolesti, koje se prenose hranom i čiji su uzročnici mikrobi podrijetlom iz hrane. Međutim, jednako veliku opasnost predstavljaju kontaminanti kemijskog podrijetla, kao što su mikotoksini i metali. Prema procjeni FAO-a (Organizacija za hranu i poljoprivredu) od ukupne količine proizvedene hrane u svijetu 25 % prehrambenih proizvoda, uglavnom biljnog podrijetla, kontaminirano je mikotoksinima (IARC, 1993; 2002). Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni, koji se mogu javiti u različitim poljoprivrednim kulturama, i to u različitim fazama počevši od rasta biljke pa sve do žetve i skladištenja (Waskiewicz i Golinski, 2013). Glavni izvor mikotoksina za ljude su žitarice i proizvodi na bazi žitarica. Međutim, mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka i putem mesa, jaja, mlijeka i mliječnih proizvoda ako su životinje bile hranjene krmom kontaminiranom plijesnima koje sintetiziraju mikotoksine, ili samim mikotoksinima („carry over” efekt) (Markov i sur. 2013; Di Stefano i sur.; 2014; Giovati i sur., 2015). Najopasnijim mikotoksinom smatra se aflatoxin B1 (AFB1), koji ima karcinogeni učinak na ljude (Ramirez-Guzman i sur., 2018). Najvažniji hidroksilirani metabolit AFB1 je aflatoxin M1 (AFM1) (Marchese i sur., 2018). AFM1 je produkt biološke pretvorbe AFB1 u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom koja je sadržavala spomenuti aflatoxin (Masoero i sur., 2007). AFM1 se osim u mlijeku životinja nalazi i u majčinom mlijeku (Omar, 2016). Najveće dopuštene količine za AFM1 za sirovo mlijeko, toplinski obrađeno mlijeko i mlijeko za proizvodnju mliječnih proizvoda koje propisuje UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (konsolidirana verzija od 01.07.2020. godine) iznosi  $0,05 \mu\text{gkg}^{-1}$ . U Republici Hrvatskoj su na snazi privremene NDK (najviše dozvoljene koncentracije), koje je na temelju procjene rizika od strane Hrvatske agencije za hranu donijelo Ministarstvo poljoprivrede i Ministarstvo zdravlja u vrijeme pojave AFM1 tijekom 2013. godine. Za smanjenje gospodarskih šteta se koriste razni mikofiksatori, koji vežu mikotoksine. No, oni ne predstavljaju najbolje rješenje za uklanjanje mikotoksina, jer osim navedenih spojeva apsorbiraju i potrebne hranjive tvari (Diaz i sur. 2004; Eskandari i sur. 2013; Giovati i sur., 2015). U novije vrijeme istraživanja su usmjerena na daljnju primjenu biofiksatora u uklanjanju odnosno vezanju ili biotransformaciji mikotoksina iz namirnica i krmiva. Kao rješenje se nameću mikroorganizmi, koji mogu ukloniti ili smanjiti količine aflatoksina u hrani i krmu. U mlijeku i mliječnim proizvodima, kao dio mineralnih sastojaka potrebnih za normalno odvijanje funkcija organizma, nalaze se u vrlo malim količinama metali. Široka primjena metala u domaćinstvu, industriji, medicini i poljoprivredi dovela je do njihove rasprostranjenosti u okolišu (Tchounwou i sur., 2014). Mlijeko i mliječni proizvodi prirodno sadrže niske koncentracije željeza, bakra i cinka. Njihova koncentracija u mlijeku ovisi o stupnju laktacije, okolišnim i genetičkim faktorima te



uvjetima u kojima se odvija proizvodnja (Meshref i sur., 2014). Određeni sojevi bakterija mliječne kiseline smatraju se potencijalnim fiksatorima metala. Mogu ih vezati na površinu stanica ili ih transportirati i pohranjivati u stanicama. Vežanje iona metala na bakterije mliječne kiseline je vrlo složen proces, koji ovisi o više faktora kao što su: trenutno stanje okoliša, pH, temperatura, koncentracija iona metala i njihove karakteristike te soj bakterije (Mrvčić i sur., 2012).

## **2. TEORIJSKI DIO**

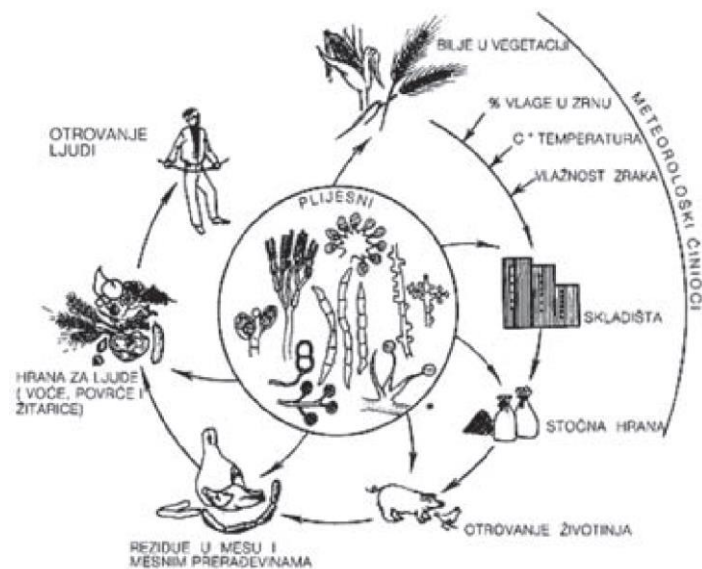
## 2.1. Kemijske opasnosti u mlijeku

### 2.1.1. Mikotoksini

U današnje vrijeme je sveprisutan problem kontaminacije hrane mikroorganizmima i njihovim toksinima. Česti uzročnici kvarenja namirnica različitog podrijetla su razne vrste plijesni. Iako su negativni učinci plijesni poznati još od davnih vremena, tek su posljednjih nekoliko godina određeni povijesni događaji povezani s kontaminacijom pljesnive hrane odnosno mikotoksinima.

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma plijesni, koji se razlikuju po kemijskoj strukturi te biološkoj aktivnosti (Šarkanj i sur., 2010; Pleadin i sur., 2018.). Smatraju se sekundarnim produktima, jer nisu nužni za rast i razmnožavanje plijesni. Njihova uloga je pomoći plijesni da napadne biljno tkivo i kao obrana od insekata ili kompetitivnih plijesni (Fletcher i Blaney., 2016). Međutim, mikotoksini mogu imati toksične učinke kod ljudi i životinja (IARC, 1993; 2002), a do njihove biosinteze dolazi pod određenim okolišnim uvjetima, prikladnoj relativnoj vlažnosti, temperaturi i sadržaju kisika, te u ovisnosti o fizičkom oštećenju supstrata i prisutnosti plijesni (Sassahara i sur., 2005, Sforza i sur, 2006; Pleadin i sur., 2014; Medina i sur., 2014).

Iako su glavni izvor mikotoksina za ljude žitarice i proizvodi na bazi žitarica, postoji zabrinutost oko ulaska mikotoksina u prehrambeni lanac čovjeka, kroz meso, jaja, mlijeko i mliječne proizvode ako su životinje bile hranjene krmom kontaminiranom plijesnima koje sintetiziraju mikotoksine, ili samim mikotoksinima („carry over” efekt) (Šarkanj i sur., 2010.; Markov i sur. 2013; Di Stefano i sur.; 2014; Giovati i sur., 2015) (slika 1).



**Slika 1.** „Carry over“ efekt (Šarkanj i sur., 2010)

Mikotoksini su stabilni spojevi tako da se često nalaze i u gotovom proizvodu, koji je prošao tehnološku obradu, a posebno su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja sadrži mikotoksine.

Riječ mikotoksin složenica je dviju riječi: *mykes* (grč. gljiva) i *toxicum* (lat. otrov) (Bhat i sur., 2010). Mikotoksine se smatra teratogenima i karcinogenima za veliki broj organizama. Proizvode ih razni sojevi filamentoznih gljiva, koje najčešće pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Oni napadaju usjeve te rastu na hrani tijekom pohrane pri njima pogodnim uvjetima (vlaga, temperatura, relativna vlažnost, aktivnost vode). Porastu rizika od nastanka mikotoksina pogoduju loša žetvena praksa, nepropisno rukovanje, pakiranje, pohrana i transport. Mikotoksini imaju veliki utjecaj na zdravlje ljudi i životinja te na trgovinu na globalnoj razini (Di Stefano i sur., 2014; Pleadin i sur., 2018). Do danas je izolirano i opisano oko 300 vrsta plijesni koje produciraju preko 1000 različitih mikotoksina i njihovih metabolita. Najznačajnijima se smatraju aflatoksini (AFB1, AFM1), zearalenon (ZEA, F-2), fumonizini (FB1, FB2), okratoksini (OTA), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (Pleadin i sur., 2018).

Mikotoksini koji utječu na zdravlje ljudi i životinja se većinom nalaze u poslije-žetvenim usjevima, poput žitarica i krmnih smjesa. Generalno gledano, mikotoksini su lipofilne molekule (izuzev fumonizina) te iz tog razloga imaju tendenciju akumuliranja u masnom tkivu. Klasificirani su prema vrsti plijesni, načinu djelovanja i strukturi. Pojedina vrsta plijesni može

proizvesti jedan ili više mikotoksina, a pojedinačni mikotoksin može biti proizveden od strane više vrsta plijesni (tablica 1).

**Tablica 1.** Odabrani mikotoksini i plijesni odgovorne za njihovu sintezu (Köppen i sur., 2010; Delaš, 2010; Pleadin i sur., 2018)

Mikotoksin	Vrsta plijesni odgovorna za sintezu
Aflatoksini (AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> , AFM <sub>1</sub> , AFM <sub>2</sub> )	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. rambellii</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>Emericella astellata</i> , <i>E. venezuelensis</i> , <i>E. olivicola</i>
Citrinin	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. implicatum</i> , <i>P. fellatanum</i> , <i>P. citreo-viride</i> , <i>P. velutinum</i> , <i>P. canascens</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. janseni</i> , <i>P. steckii</i> , <i>P. spinolosum</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Aspergillus niveus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. flavipes</i>
Ergot alkaloidi	<i>Claviceps africanana</i> , <i>Claviceps purpurea</i> , <i>Claviceps fusiformis</i> , <i>Claviceps paspali</i> , <i>Neotyphodium coenophialum</i>
Fumonizini (FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , FB <sub>3</sub> )	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium anthophilum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i>
Mikotoksini roda <i>Alternaria</i> (altenuen, alternariol, alternariol monoetil eter, alteroksin-I, alteroksin-II, altertoksin-III, tenuazonska kiselina)	<i>Alternaia alternate</i> , <i>Alternaria dauci</i> , <i>Alternaria cucumerina</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Alternaia citri</i>
Oktratoksin A	<i>Aspergillus alutaceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. auricomus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. albertensis</i> , <i>A. citricus</i> , <i>A. flocculosus</i> , <i>A. fonsecaeus</i> , <i>A. lanosus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>A. petrakii</i> , <i>A. pseudoelegans</i> , <i>A. roseoglobulosus</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. westerdijakiae</i> , <i>Neopetromyces murictaus</i> , <i>Penicillium viridactum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. carbonarius</i> , <i>P. variable</i>
Patulin	<i>A. clavatus</i> , <i>A. longivesica</i> , <i>A. terreus</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. lapidosum</i> , <i>P. melinii</i> , <i>P. rugulosus</i> , <i>P. equinum</i> , <i>Byssochlamys</i> sp.
Trihoteceni tipa A (T-2, HT-2 toksin, diacetokscirpenol, neosolaniol)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. myrothecium</i> ,

	<i>Cephalosporium</i> sp., <i>Myrothecium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Trichothecium</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Stachybotrys</i> sp., <i>Verticimonosporium</i> sp.
Trihoteceni tipa B (nivalenol, deoksinivalenol, 3-acetildeoksinivalenol, 15- acetildeoksinivalenol, fusarenon X)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F.</i> <i>sporotrichioides</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. lunulosporum</i>
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F.</i> <i>crookwellense</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. avanaceum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F.</i> <i>oxysporium</i>

Prema procjeni Organizacije za prehranu i poljoprivredu (eng. FAO ), 25 % žitarica u svijetu kontaminirano je mikotoksinima. Ostala hrana, poput začina, voća i orašastih plodova može također biti kontaminirana navedenim metabolitima. Prema procjeni Sustava brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF), 2012. godine mikotoksini su predstavljali najveću opasnost prema broju obavijesti o zabrani ulaska u zemlju. Postojao je također značajan broj hitnih obavijesti i obavijesti za pozornost (Marin i sur., 2013).

#### 2.1.1.1. Toksični učinci mikotoksina

Kada se govori o mikotoksinima, aflatoksin B1 (AFB1) i okratoksin A (OTA) se smatraju najvažnijima među mikotoksinima. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je proglasila AFB1 najopasnijim mikotoksinom te ga je svrstala u Grupu 1 karcinogena. Dokazano je kako AFB1 ima karcinogeni učinak na ljude. OTA je svrstana u Grupu 2B jer se smatra potencijalno karcinogenim spojem za ljude (Ramirez-Guzman i sur., 2018). Neke od bolesti uzrokovane mikotoksinima su Rey-eva bolest uzrokovana AFB1, alimentarna toksična aleukija uzrokovana T2 toksinom i balkanska endemska nefropatija koju uzrokuje OTA (Galvano i sur., 2001; Delaš, 2010; Pleadin i sur., 2018). Gotovo svi mikotoksini su citotoksični te narušavaju različite stanične strukture, poput membrana, i ometaju osnovne stanične procese kao što su sinteza RNA i DNA molekula. Oni ulaze u organizam kontaminiranom hranom zaraženom sporama, konidiosporama i/ili fragmentima micelija (Arapcheska i sur., 2015).

Najvažniji mikotoksini koji se mogu naći u žitaricama i za koje je dokazano da uzrokuju bolesti epidemskih razmjera kod ljudi i životinja su aflatoksini, ergot alkaloidi i trihoteceni. Ostali, poput okratoksina, fumonizina i zearalenona uzrokuju bolesti kod životinja, ali nije znanstveno dokazano da uzrokuju bolesti i kod ljudi (Fletcher i Blaney., 2016).

Mikotoksini uneseni u organizam izazivaju bolesti nazvane mikotoksikoze. Otrovanja mikotoksinima mogu biti akutna i/ili kronična, a simptomi trovanja ovise o starosnoj dobi i spolu,

vrsti i koncentraciji mikotoksina, distribuciji u tkivu, odnosno metabolizmu (Delaš, 2010; Pleadin i sur., 2018). Mikotoksini često istovremeno djeluju na različite načine i na više ciljnih mjesta u organizmu, što ovisi o vrsti mikotoksina, dozi i vremenu izloženosti (HAH, 2012; Pleadin i sur., 2018) (tablica 2).

**Tablica 2.** Bolesti koje su povezane s trovanjem mikotoksinima (Pleadin i sur., 2018)

Sustav	Zdravstveni problemi	Mikotoksini
Krvožilni sustav	Smanjena elastičnost žila, unutarnja krvarenja	Aflatoksini, Safratoksini, Roridini
Probavni sustav	Proljev, povraćanje, krvarenje iz crijeva, oštećenje jetre, fibroza, nekroza, anoreksija	Aflatoksini, T-2 toksin, Deoksinivalenol
Dišni sustav	Poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća	Trihoteceni
Živčani sustav	Drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja	Trihoteceni, Termogeni
Koža	Osip, osjet vrućine, fotosenzitivnost	Trihoteceni
Mokraćni sustav	Oštećenje bubrega	Okratoksin, Citrinin
Reproduktivni sustav	Sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima	T-2 toksin, Zearalenon
Imunosustav	Promjene ili potpuno uništenje	Mnogi mikotoksini

#### 2.1.1.2. Zakonska regulativa

Mnoge zemlje su utvrdile, kako je nužno smanjiti razinu mikotoksina u hrani iz više razloga. Prvi razlog je financijski trošak, međutim tu je i pitanje međunarodne trgovine te mogućnost izvoza na atraktivno europsko tržište. Potrebno je provoditi dobru poljoprivrednu praksu, kako bi se smanjila kontaminacija usjeva mikotoksinima što uključuje: ranu žetvu, pravilno sušenje (na taj način se smanjuju uvjeti za rast i proliferaciju plijesni), fizička obrada (sortiranje, pranje i drobljenje pokazali su se efikasnim u uklanjanju mikotoksina jer se kontaminirana zrna odvajaju od *bulka* te mnogo manja površina ostaje kontaminirana), odgovarajuće skladištenje, nadzor nad insektima (Zain, 2011). Međutim, čak ni Dobra poljoprivredna praksa, pravilni uvjeti skladištenja i prerade hrane ne mogu u potpunosti spriječiti kontaminaciju hrane i hrane za životinje mikotoksinima (Galvano i sur., 2005; Pleadin i sur., 2018).

S obzirom da mikotoksini imaju toksičan učinak te su odgovorni za financijske gubitke u proizvodnji hrane i stočarstvu, većina zemalja je izdala uredbu kojom se propisuje najviša dozvoljena koncentracija (NDK) mikotoksina u određenoj vrsti hrane (Uredba komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani, konsolidirana verzija od 01.07.2020. godine). Područje istraživanja mikotoksina u Republici Hrvatskoj provodi se u onoj mjeri koje propisuju zakonski propisi, odnosno provode se monitorinzi hrane biljnog i životinjskog podrijetla od strane nadležnih ministarstava na one mikotoksine za koje postoje propisane najveće dozvoljene količine. Hrvatska je Zakonom o kontaminantima (NN 39/2013, 114/18) uskladila svoju uredbu o mikotoksinima u hrani s regulativom Europske unije (Šegvić Klarić, 2012).

### 2.1.1.3. Utjecaj klimatskih faktora na tvorbu mikotoksina

Plijesni koje proizvode mikotoksine mogu uspijevati u gotovo svim klimatskim područjima svijeta, ako se nađu u njima povoljnim okolišnim uvjetima. Primjerice, sojevi *Aspergillus* i *Penicillium* mogu rasti pri niskom aktivitetu vode ( $a_w$ ) i pri višim temperaturama u odnosu na sojeve *Fusarium*. Uvjeti rasta mogu varirati tijekom pohrane i transporta, jer može doći do velike promjene relativne vlažnosti. Iz navedenog, očito je da proizvodnja određenog toksina ovisi o trenutnim uvjetima koji vladaju (Bhat i sur., 2010).

Smatra se da klimatske promjene imaju znatan utjecaj na kvalitetu i dostupnost osnovnih sirovina za hranu. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) je proučavala potencijalni utjecaj klimatskih promjena u Europi. Moglo bi doći do ekstremnih promjena u količini oborina, povišene temperature i količini CO<sub>2</sub>, koji utječu na proizvodnju hrane. Pretpostavka je da će utjecaj biti štetan ili povoljan ovisno o zemljopisnom položaju (Medina i sur., 2017). Za određena područja klimatski modeli su predviđjeli znatno smanjenje oborina i povećanje temperature u ljetnom razdoblju, što dovodi do velikih suša. Očekuju se promjene u uvjetima okoliša zbog koncentracija atmosferskog CO<sub>2</sub> za koje se očekuje da će rasti po stopi od 1,5 μmol/godini. Zbog porasta i drugih stakleničkih plinova, očekuje se da će globalna temperatura rasti stopom od 0,03 °C /godini. U područjima Zapadne Europe predviđaju se promjene od 2,5-3,5 °C s toplijim i sušim ljetima. U Južnoj Europi može doći do porasta temperature od 4-5 °C s dužim sušnim razdobljima što dovodi do smanjenja prinosa usjeva. U Središnjoj Europi se predviđa više oborina i poplava i porast temperature od 3-4 °C, premda bi produženo razdoblje uzgoja moglo dovesti do povećanja prinosa usjeva. Za Sjevernu Europu se predviđa porast temperature od 3-4,5 °C sa značajnim povećanjem oborina za 30–40 %. Takvi uvjeti mogu dovesti do porasta

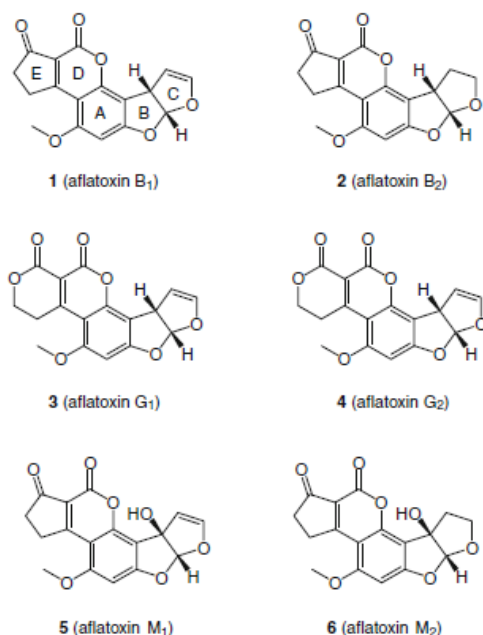


prinosu usjeva. Područje Mediterana se smatra žarištem klimatskih promjena gdje se predviđaju ekstremne promjene koncentracije CO<sub>2</sub>, oborina i temperature. To bi moglo dovesti do porasta migracije patogena kao odgovor na toplija i sušna razdoblja (Magan i sur., 2011; Pleadin i sur., 2018).

#### 2.1.1.4. Aflatoksini

Aflatoksini su derivati difurokumarina, grupa visoko toksičnih, teratogenih, mutagenih i karcinogenih sekundarnih metabolita određenih sojeva plijesni iz roda *Aspergillus*. Čini ih grupa od otprilike 20 metabolita među kojima su najvažniji predstavnici aflatoksini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>.

Strukturno, ovi spojevi sastoje se od 5 prstena. Imaju jedan aromatični, šesteročlani prsten (A), jedan šesteročlani prsten laktona (D), dva furofuran prstena (B i C) te peteročlani pentanon ili šesteročlani prsten laktona (E). Hidroksilirani derivati aflatoksina B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> su M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>, koji imaju hidroksi grupu na spoju dva furanova prstena (slika 2).



**Slika 2.** Strukturne formule glavnih predstavnika aflatoksina (Bräse i sur., 2013)

Aflatoksini su bezbojni do blijedo žuti kristali slabo topljivi u vodi. Topljivi su u polarnim otapalima, poput kloroforma, dimetil-sulfoksida i mentola. To su spojevi, koji su nestabilni pri

ekstremnim pH vrijednostima (<3 ili >10) (Kumar, 2018). Termostabilni su, fotosenzibilni u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine.

Aflatoksine proizvode *A. flavus*, *A. parasiticus* i *A. nomius*, koji kontaminiraju biljke u polju, najviše u tropskim i subtropskim područjima. Međutim, mogu ih kolonizirati i nakon žetve ako biljke nisu dobro osušene. Na nastanak aflatoksina utječe niz abiotičkih i biotičkih čimbenika (Yu, 2012; Pleadin i sur., 2018). Temperatura rasta za ove plijesni kreće se od 12 - 48 °C, međutim optimalne vrijednosti su kod 36-38 °C, dok je za nastanak aflatoksina optimalna temperatura između 28-30 °C. Produkcija aflatoksina se smanjuje pri temperaturi nižoj od 25 °C te kako se približava 37 °C (Hassane i sur., 2017). Kada se govori o utjecaju pH na biosintezu aflatoksina, biosinteza se događa pri pH 3,5-8,0 s optimum blizu pH 6,0 (Sweeney i Dobson, 1998). Još jedan čimbenik, koji znatno utječe na proizvodnju aflatoksina je aktivitet vode ( $a_w$ ). Aktivitet vode je zamijenio mjerenje sadržaja vlage jer se pokazao kao precizniji prikaz dostupnosti vode za mikrobnii rast. Smanjuje se proporcionalno s dostupnom vodom za mikrobnii rast (Mannaa i Kim, 2017).

Aflatoksine B1 i B2 proizvodi *Aspergillus flavus* dok *A. parasiticus* proizvodi aflatoksine B1, B2, G1 i G2. Navedeni aflatoksini, poput većine ostalih heterocikličkih spojeva, fluoresciraju te se i razlikuju po fluorescirajućim svojstvima (Hussein i Brasel, 2001). Vidljivi su u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm, pa su aflatoksini B i G skupine i dobili imena po boji kojom fluoresciraju: B za plavu (blue) i G za zelenu (green) fluorescenciju.

Među aflatoksinima, aflatoksin B1 jedan je od najznačajnijih prirodnih spojeva sa izrazito visokom toksičnošću koji pokazuje snažan karcinogeni učinak kod laboratorijskih životinja te akutne toksikološke učinke na ljude. Kada se govori o utjecaju aflatoksina na organizam životinja, oni imaju različite učinke: uzrokuju akutna oštećenja jetre, cirozu jetre, pojavu tumora, malformacije u prenatalnom razdoblju. Aflatoksini mogu uzrokovati smanjenu proizvodnju mlijeka i jaja, te mogu dovesti do ponovne aktivacije određene infekcije kao rezultat oslabljenog imuniteta. Klinička slika trovanja aflatoksinima kod životinja uključuje smanjenu reproduktivnost, gastrointestinalnu disfunkciju, anemiju i žuticu (Arapcheska i sur., 2015). Osim što aflatoksin B1 u ljudi može uzrokovati karcinom jetre i drugih organa, izloženost ljudi aflatoksinu B1 uključuju hepatitis i fibrozu jetre, sporiji rast kod djece i Reyev sindrom. Istraživanja načina djelovanja ovog mikotoksina otkrila su njegov inhibicijski učinak na replikaciju DNA i RNA te na sintezu proteina (Pleadin i sur., 2018.).

Aflatoksini zbog svoje izrazite toksičnosti i pojavnosti u brojnim žitaricama te namirnicama životinjskog podrijetla predstavljaju najveći rizik u prehrambenom lancu. Pritom onečišćena krmiva koje se koriste u hranidbi životinja sa farmi predstavljaju glavni izvor

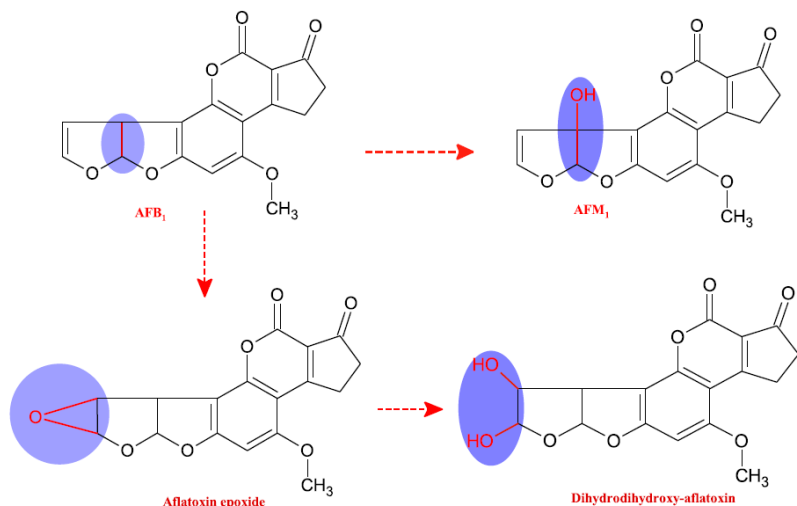
aflatoksina B1 (Pleadin i sur., 2018), kojem su onda izloženi ljudi bilo izravnom konzumacijom onečišćene hrane, bilo neizravno konzumacijom proizvoda životinjskoga podrijetla (npr. meso, suhomesnati proizvodi, mlijeko i jaja).

#### 2.1.1.5. Aflatoksin M1

Intenzivnije proučavanje utjecaja mikotoksina na ljudsko zdravlje počelo je nakon što je dokazano da razgradnjom aflatoksina B1 u jetri nastaju izrazito karcinogeni metaboliti, a kao produkt biološke pretvorbe AFB1 u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom, koja je sadržavala spomenuti aflatoksin, dokazan je AFM1 (Masoero i sur., 2007; Markov i sur., 2010).

Aflatoksin M1 je hidroksilirani metabolit aflatoksina B1. Izlučuje se u mlijeku u mliječnim žlijezdama ljudi i životinja. Otprilike oko 0,3-6,2 % aflatoksina B1 pretvara se u metabolizirani aflatoksin M1 te se izlučuje u mlijeko. To uvelike ovisi o faktorima: genetika životinje, uvjeti okoliša, sezonske varijacije, proces mužnje. Kod preživača, značajan dio unesenog AFB1 razgrađuje se u rumenu i ne ulazi u veliki krvotok. Određeni dio AFB1 transformira se u jetri u brojne metabolite, uključujući hidroksi metabolite AFM1, AFM2 i AFM4. Svi aflatoksini se izlučuju mlijekom, ali AFM2 i AFM4 se javljaju u mlijeku u mnogo nižim koncentracijama nego AFM1. Iz tog razloga se AFM1 smatra glavnim metabolitom AFB1. Generalno gledano, toksikološke opasnosti AFM1, posebice hepatotoksičnost i hepatokarcinogenost, usporedive su s onima kod AFB1, s time da AFM1 ipak ima niži stupanj karcinogenosti nego AFB1 (Frazzoli i sur., 2017).

Prisutnost aflatoksina M1 u mlijeku i mliječnim proizvodima je veoma važno pitanje, jer u mnogim zemljama ljudi svih dobi gotovo redovito konzumiraju navedene proizvode. Navedeni aflatoksin može se naći i u drugim proizvodima, poput sira i jogurta. Pretvorba AFB1 u AFM1 smatra se detoksifikacijskim procesom, zato što je u *in vivo* uvjetima karcinogenost AFM1 samo 10 % vrijednosti AFB1. Kada se radi o *in vitro* metaboličkoj aktivaciji, AFM1 posjeduje samo 10 % mutagenosti AFB1. Relativna karcinogenost AFB1 i AFM1 u korelaciji je s relativnom metaboličkom aktivacijom promatranom u *in vitro* uvjetima koristeći hepatske mikrosome štakora, tj. one vezane uz jetreno tkivo (Iqbal i sur., 2015) (slika 3).



**Slika 3.** Metabolizam aflatoksina B1 u jetri (Iqbal i sur., 2015)

Zbog svog afiniteta prema proteinima mlijeka, AFM1 može biti prisutan i u mliječnim proizvodima, a koncentracija AFM1 ovisi o samom proizvodnom procesu pripreme mliječnih proizvoda, o vrsti proizvoda, udjelu vode i konačnom proizvodu. AFM1 je relativno stabilna molekula u sirovim i obrađenim mliječnim proizvodima i ne može se inaktivirati toplinskim tretmanima poput pasterizacije za vrijeme obrade sira (Govaris i sur., 2002; Markov i sur., 2010). Međutim, neki izvještaji navode smanjenje koncentracije AFM1 za 32 % tijekom sterilizacije mlijeka i tekućih mliječnih proizvoda, pri uobičajenom rasponu temperature od 135-150 °C. Postoje neki izvještaji o pokušajima smanjenja koncentracije AFM1 u mlijeku i mliječnim proizvodima. U tom istraživanju korištena je glina za uklanjanje ili smanjenje kontaminacije AFM1 u mlijeku goveda. Taj postupak pokazao se učinkovitim (Iqbal i sur., 2015).

Treba napomenuti da se AFM1 ne nalazi samo u mlijeku životinja, već i u majčinom mlijeku. Iako se dojenje smatra najboljom prehranom za novorođenčad, jer majčino mlijeko sadrži sve potrebne hranjive tvari i posjeduje antimikrobna svojstva te jača imunitet, majčino mlijeko može sadržavati mnoge toksične tvari. Jedna od njih je i AFM1. Dojenčad je posebno osjetljiva na štetne učinke AFM1 zbog svoje male tjelesne mase, niske sposobnosti detoksikacije i nedovoljno razvijenog središnjeg živčanog sustava (Elaridi i sur., 2017). Istraživanje je pokazalo da su djeca izložena aflatoxinima podložna infekcijama u djetinjstvu i kasnijem životnom razdoblju. Napravljen je niz studija, kojima je dokazana prisutnost AFM1 u majčinom mlijeku. Visoke koncentracije AFM1 kod relativno malog broja majki ukazuju da individualne

prehrambene navike mogu rezultirati izloženošću kontaminaciji čak i nakon dojenja (Jalili i Scotter, 2015).

Iz tog razloga, mnoge države imaju propise kontrole razine AFB1 u hrani za životinje/ljude. Najveće dopuštene količine za AFM1 za sirovo mlijeko, toplinski obrađeno mlijeko i mlijeko za proizvodnju mliječnih proizvoda koje propisuje Uredba o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (1881/2006 – konsolidirana verzija od 01.07.2020. godine) iznosi  $0,05 \mu\text{gkg}^{-1}$ . Za fermentirane proizvode od mlijeka i druge mliječne proizvode ne postoje najveće dozvoljene količine (NDK) za AFM1. U Republici Hrvatskoj su na snazi privremene NDK, koje je na temelju procjene rizika od strane Hrvatske agencije za hranu donijelo Ministarstvo poljoprivrede i Ministarstvo zdravlja u vrijeme pojave aflatoksina M1 tijekom 2013. godine.

### 2.1.2. Metali

Metali su prema definiciji elementi, koji provode električnu energiju, duktilni su, formiraju katione i tvore bazične okside. Prema toj definiciji, većina elemenata mogla bi se smatrati metalima te je potrebno proučiti njihova individualna svojstva i upotrebu, kako bi ih se moglo klasificirati (Duffus, 2002). Živi organizmi ne razgrađuju metale i njihove spojeve te se oni mogu nakupiti u stanicama do štetnih razina. U usporedbi s organskim materijalima, metali čine malu cjelinu te se čini da je njihove reakcije sa živom materijom jednostavno procijeniti. Međutim, istraživanja su pokazala da su reakcije metala sa staničnim makromolekulama vrlo složene. Neki spojevi metala su podložni metaboličkoj transformaciji, poput redukcije do nižeg oksidacijskog stanja (Beyersmann i Hartwig, 2008).

Elementi u tragovima je termin za elemente prisutne u niskim koncentracijama ( $\text{mgkg}^{-1}$  ili manje) u agroekosustavu. Neki elementi u tragovima kao što su bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn), željezo (Fe), molibden (Mo) i bor (B) su esencijalni za rast biljaka i nazivaju se mikronutrijentima. Osim bora, ovi elementi su također teški metali, te su toksični za biljke u visokim koncentracijama. Neki elementi u tragovima poput kobalta (Co) i selena (Se) nisu esencijalni za rast biljaka, ali su potrebni ljudskom i životinjskom organizmu. Ostali, poput kadmija (Cd), olova (Pb), kroma (Cr), nikla (Ni), žive (Hg) i arsena (As) imaju toksičan učinak na žive organizme te se smatraju kontaminantima (He i sur., 2005).

Metali sadržani u mlijeku mogu se podijeliti na esencijalne, poput bakra, cinka i željeza, koji su prisutni u niskim koncentracijama te na neesencijalne ili toksične, poput olova i kadmija.

Neesencijalni metali u mlijeku čak i u niskim koncentracijama mogu dovesti do narušavanja metaboličke ravnoteže s ozbiljnim posljedicama za zdravlje. Njihova prisutnost u mlijeku i mliječnim proizvodima je posebno zabrinjavajuća jer su njihovi veliki konzumenti djeca i dojenčad. Nedostatak esencijalnih metala u mlijeku može imati posljedice na zdravlje, kao i ako su prisutni u previsokim koncentracijama. Životinje koje daju mlijeko unose metale u organizam dok pasu na pašnjacima i dok se hrane kontaminiranim koncentratima. Koncentracija metala u mlijeku ovisi o stupnju laktacije, okolišnim i genetskim faktorima, proizvođačkoj praksi i mogućoj kontaminaciji opreme tijekom proizvodnje (Meshref i sur., 2014).

#### 2.1.2.1. Bakar (Cu)

Bakar je po raširenosti 26. element u Zemljinoj kori te 29. element u periodnom sustavu s dva stabilna i devet radioaktivnih izotopa. Nedostatak bakra je vodeći nedostatak u svijetu kada se govori o bolestima poljoprivrednih životinja. Ljudski organizam sadrži malo više od 100 mg bakra. Jedino jetra i bubrezi sadrže koncentraciju bakra koja je viša od one u mozgu ( $\sim 5 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Povišene koncentracije su vjerojatno povezane s metaboličkom aktivnošću, jer je bakar kofaktor za terminalni enzim u lancu prijenosa elektrona, citokrom c oksidazu. Apsorpcija bakra, koja iznosi od 55–75 %, je znatno viša u odnosu na ostale elemente u tragovima i javlja se u gornjem tankom crijevu. Koncentracija bakra u hrani je važno svojstvo, koje određuje nutritivnu korisnost. Kada se promatra povećanje koncentracije na osnovi težine, mliječni proizvodi, masti i ulja, šećer, tuna i salata imaju nisku koncentraciju bakra ( $< 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Gljive, mahunarke, čokolada, sjemenke i orašasti plodovi imaju visoke koncentracije bakra ( $> 2,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (American Society for Nutrition, 2011).

#### 2.1.2.2. Cink (Zn)

Cink je 24. najzastupljeniji element u Zemljinoj kori. Pripada u skupinu elemenata u tragovima. Smatra se tranzicijskim metalom, koji ima nisku energiju ionizacije. Uključen je u velik broj reakcija staničnog metabolizma te je sastavni dio proteina uključenih u staničnu strukturu i stabilizaciju membrane. Ima ulogu u staničnom disanju, imunološkim funkcijama, sintezi DNA, sintezi proteina i dijeljenju stanica. Zbog svega navedenog, nedostatak cinka ili njegova pretjerana apsorpcija može dovesti do različitih bolesti (posebice onih vezanih uz imunološki sustav) (Bonaventura i sur., 2015).

Pripada u grupu prijelaznih elemenata periodnog sustava te posjeduje određena kemijska svojstva zbog čega se smatra posebno korisnim i važnim u biološkim sustavima. Cink može

utjecati na katalitička svojstva mnogih enzimskih sustava. Povezan je s više od 50 raznih metaloenzima, koji imaju niz funkcija (sinteza nukleinskih kiselina, proteina). Cink ne posjeduje redoks svojstva, te zbog toga u biološkim sustavima ne uzrokuje oksidacijsko oštećenje koje mogu uzrokovati drugi elementi u tragovima (željezo, bakar). Cink se u tijelu apsorbira putem tankog crijeva. Određeni dio cinka se gubi putem urina, menstrualne krvi, kose, noktiju iako je to u puno manjoj mjeri nego što se gubi gastrointestinalnim izlučivanjem.

Ukupan sadržaj cinka kod odraslih osoba varira od 1,5-2,5 g, od čega ga se najviše nalazi u kostima, mišićima, jetri i ostalim organima. Otprilike 90 % zaliha cinka u tijelu se pretvara veoma sporo te nisu odmah spremne za metaboličke reakcije. Ostalih 10 % smatra se brzo izmjenjivim, što je posebno važno za određene funkcije organizma (Brown i sur., 2001).

### 2.1.2.3. Željezo (*Fe*)

Željezo je esencijalni metal za ljudski organizam, s time da višak željeza uzrokuje disfunkciju organa zbog proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta. Značajne posljedice prekomjerne koncentracije željeza su zatajenje vitalnih organa poput jetre i srca te poremećaj endokrinih funkcija.

Željezo je bitno za sintezu hemoglobina, staničnu proliferaciju, oksidacijsko-redukcijske procese. Ukupna količina željeza u tijelu je 3-4 g, od čega dvije trećine otpada na crvene krvne stanice i reciklirano željezo nastalo razaranjem crvenih krvnih stanica. Željezo koje uđe u organizam klasificira se kao ne-hem (non-heme) željezo i hem željezo. Ne-hem željezo potječe od biljaka sastoji se većinom od anorganskog željeza (Fe(III)), dok hem željezo potječe iz mesa i apsorbira se putem proteina nosioca u enterocite.

Željezo se u prirodi nalazi u osam oksidacijskih stanja, od -2 do +6. Smatra se kofaktorom nekoliko enzima. Zbog redoks svojstva smatra se korisnim za reakcije prijenosa elektrona. Potrebno je gotovo svim vrstama (Silva i Faustino, 2015).

### 2.1.2.4. Selen (*Se*)

Selen pripada u skupinu polumetala. U prirodi je relativno rasprostranjen element, međutim nalazi se u vrlo malim koncentracijama. Selen se u Zemljinoj kori najčešće nalazi u koncentracijama od 0,1 - 20 mgkg<sup>-1</sup>. Selen je esencijalni element, koji je redovit sastojak hrane. No, ako je prisutan u previsokim koncentracijama, postane toksičan. Prisutan je u raznim prehrambenim namirnicama (mlijeko, meso, žitarice, morska hrana) te u riječnim vodama. Koncentracija selena u hrani ovisi o vrsti hrane i koncentraciji selena u okolišu. Povrće kao što

su gljive i šparoge prirodno sadrže velike koncentracije selena u svom sastavu. Pokazalo se da se kuhanjem izgubi više od 40 % selena.

Selen je esencijalni oligoelement, koji štiti organizam od oksidacije i stresa uništavanjem peroksida. Do trovanja selenom može doći inhalacijom, putem kože te ingestijom (Bošnjir i Čulig, 2005).

#### 2.1.2.5. Živa (Hg)

Živa je element prirodno prisutan u Zemljinoj kori. Zbog oslobađanja putem antropogenih emisija, postala je vrlo zabrinjavajući faktor. Kao alternativni naziv za živu u engleskom jeziku koristi se i riječ *Quicksilver* (doslovno živo srebro). To je jedini metal koji je na sobnoj temperaturi u tekućem stanju.

Elementarna živa se rijetko nalazi u prirodi, ali se može ekstrahirati toplinom iz anorganskih cinabarskih ruda. Živa se najčešće nalazi u oksidacijskom stanju  $Hg^{2+}$ . Oblik žive koji je najviše neurotoksičan je metil živa. Metil živa ima veću bioraspoloživost od elementarne žive i anorganskih spojeva. Zbog toga i zato što je jako topiva u lipidima, može difundirati iz stanica i akumulirati se u vodama gdje ju apsorbiraju planktoni i ostali maleni organizmi, čime metil živa postaje uključena u prehrambeni lanac. Zbog sporog izlučivanja i bioakumulacije, metil živa se u velikim predatorskim ribama nalazi u milijun puta većoj koncentraciji u odnosu na vodu. Posebno veliki problem je kod riba koje imaju više masnog tkiva zbog visoke topivosti žive u lipidima. Ljudi unose  $Hg^{2+}$  i metil živu u organizam putem kontaminiranih biljaka i ribe. Elementarna živa ulazi u sva tkiva i akumulira se u središnjem živčanom sustavu i bubrežima (Martinez-Finley i Aschner, 2014).

#### 2.1.2.6. Kadmij (Cd)

Kadmij je metal koji se vrlo rijetko nalazi u prirodi. Što se tiče izvora u okolišu, kadmij potječe od prirodnih i antropogenih izvora. Rijetko se javlja kao samostalna ruda grinokit i otavit. U sedimentnim stijinama i morskim fosfatima može biti akumulirano čak do  $500 \text{ mgkg}^{-1}$  kadmija, koji se onda erozijom i abrazijom stijena prenosi u mora i oceane.

Kadmij se može unijeti u ljudski organizam inhalacijom ili probavnim sustavom, a ponekad i putem kože. Preko dišnog sustava kadmij se unosi u industrijskim postrojenjima. Probavnim traktom se unosi onečišćenom hranom, vodom i pušenjem. Pokazalo se da jedna cigareta sadrži 1-2  $\mu\text{g}$  kadmija, s time da se od te količine udahne oko 10 % (0,1-0,2  $\mu\text{g}$ ). Kadmij



ometi procese sinteze nukleinskih kiselina i oksidativnu fosforilaciju te inhibira enzime koji sadržavaju sulfhidrilne skupine. U ljudskom organizmu kadmij nema nikakvu ulogu.

Kada se govori o prisutnosti kadmija u namirnicama, najveće koncentracije mogu se očekivati u žitaricama i lisnatom povrću zbog relativno lagane apsorpcije kadmija iz zemlje (preko korijenja iz tekuće faze tla). Kronična trovanja kadmijem uključuju dugotrajnu izloženost relativno niskim koncentracijama kadmijevih para i pigmentske prašine. Najčešće se očituju oštećenjem pluća i poremećajima u bubrežnim funkcijama.

Do akutnog trovanja kadmijem može doći i konzumiranjem kiselog napitka, koji je uskladišten u posudi galvaniziranoj kadmijem. Nije točno utvrđena letalna oralna doza tijekom akutnog trovanja, ali se smatra da ta doza iznosi više stotina miligrama (Bošnjir i Čulig, 2005).

#### *2.1.2.7. Olovo (Pb)*

Olovo je teški, nisko topivi metal koji se prirodno javlja u Zemljinoj kori. Najčešće se javlja u kombinaciji s dva ili više elementa. U okolišu ga se najviše nalazi zahvaljujući ljudskoj aktivnosti. Koncentracije olova su u okolišu porasle više od 1000 puta tijekom posljednja tri stoljeća. Prije 50-tih godina 20. stoljeća olovo se koristilo u pesticidima, koji su se primjenjivali na voćnjake. Olovo se otpušta u zrak tijekom sagorijevanja ugljena, ulja ili otpada. Kada se nađe u tlu, čvrsto se zalijepi za čestice te može ostati u gornjem sloju tla i mnogo godina, što uvelike ovisi i o fizikalno-kemijskim karakteristikama tla.

Hrana može sadržavati male koncentracije olova, no u današnje vrijeme ga se više ne koristi u konzervama te je izloženost tim putem smanjena na minimum. Povrće također može sadržavati olovo ako raste na zagađenom tlu.

Što se tiče utjecaja na zdravlje, učinak je isti neovisno da li olovo ulazi u organizam respiratornim ili probavnim traktom. Trovanje olovom može uzrokovati oštećenje mozga i bubrega kod odraslih i djece, a kod trudnica može dovesti do pobačaja (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007).

#### *2.1.2.8. Aluminij (Al)*

Aluminij je po zastupljenosti treći element u Zemljinoj kori. Prirodno je prisutan u okolišu, pitkoj vodi, namirnicama, kozmetičkim proizvodima (krema za sunčanje, pasta za zube, antiperspiranti) te raznim materijalima (ambalaža za hranu, folija, posuđe). Izloženost aluminiju ovisi o putu izloženosti. Potencijalno za zdravlje opasna izloženost aluminiju događa se zbog kiselih kiša, koje uzrokuju progresivno zakiseljavanje tla i pritom dolazi do masivne migracije

aluminija iz Zemljine kore do površinskih voda. Posljedica je izloženost biljaka, životinja i ljudi apsorbirajućim specijama aluminija. Koncentracija aluminija u hrani je jako varijabilna što ovisi o originalnom sadržaju namirnica te o njihovoj interakciji s materijalom u kojemu se pohranjuju ili termički obrađuju. Na primjer, koncentracija aluminija u pićima koja su pohranjena u aluminijskim limenkama je pet do sedam puta veća u usporedbi s koncentracijom aluminija u pićima pohranjenim u bocama.

Što se tiče toksičnosti aluminija, neki od simptoma trovanja su: zaboravljivost, smanjena intelektualna funkcija, oštećenje govora, epileptični napadaji, halucinacije. Iako nije znanstveno dokazano, pretpostavka je da je aluminij u direktnoj vezi s Alzheimer-ovom bolesti (Crisponi i sur., 2013).

#### *2.1.2.9. Molibden (Mo)*

Molibden je prijelazni metal, koji je veoma važan za većinu bioloških sustava. Pojavljuje se u velikom broju metaloenzima kod bakterija, algi, gljiva, biljaka i životinja. Navedeni metal je biološki inaktivan sve dok nije vezan za određeni kofaktor. Prisutan je u oceanima u obliku  $\text{MoO}_4^{2-}$  aniona. Anion molibdata je jedini oblik molibdena, koji je dostupan za biljke i životinje. Enzimi koji sadrže molibden imaju važnu ulogu u biogeokemijskim redoks ciklusima dušika, ugljika i sumpora na Zemlji (Mendel i Bittner, 2006).

#### *2.1.2.10. Mangan (Mn)*

Mangan se smatra esencijalnom hranjivom tvari za ljude te je potreban u tragovima za održavanje staničnih procesa. Manjak mangana je kod ljudi izrazito rijetka pojava, dok je toksičnost zbog prekomjerne izloženosti mnogo češća. Koncentracija mangana u tijelu se kontrolira homeostatskom regulacijom apsorpcije i izlučivanja. Mangan je u ljudskom organizmu potreban za regulaciju šećera u krvi, reprodukciju, probavu, rast kostiju, koagulaciju krvi. Što se tiče izvora mangana, biljke sadrže mnogo veću koncentraciju mangana nego životinje. Najveću koncentraciju mangana sadrže cjelovite žitarice (pšenične klice, zob i mekinje), riža i orašasti plodovi (lješnjaci, bademi). Manganom su bogate i dagnje, čokolada, čaj, mahunarke, špinat, začini (šafiran, klinčići, čili u prahu). Do toksičnih efekta mangana dolazi zbog prisutnosti u okolišu: u zraku i pitkoj vodi (American Society for Nutrition, 2017).

## 2.2. Bakterije mliječne kiseline

Zanimanje za bakterije mliječne kiseline kao mikroorganizme potaknuto je pitanjima vezanim uz prehrambenu industriju i fermentaciju. Bakterije mliječne kiseline su kroz povijest usko povezane s dobrobiti čovjeka. Prirodno su povezane s mukoznim slojem gastrointestinalnog trakta. Uključuju neke patogene kao što je rod *Streptococcus* te neprocjenjivo važne nepatogene rodove, koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, mesa, povrća, te za proizvodnju vina, kave, silaže. Bakterije mliječne kiseline su također neprocjenjiv izvor inhibicijskih tvari, antimikrobnih spojeva diacetila, vodikovog peroksida, ugljikovog monoksida i bakteriocina (Makarova i Koonin, 2007; Frece i sur., 2005.; Šušković i sur., 2010.).

Bakterije mliječne kiseline imaju široku primjenu kao starter kulture u industrijskoj proizvodnji različitih fermentiranih prehrambenih proizvoda zbog svog GRAS statusa (Generally Recognized As Safe) prema FDA (Američka Agencija za hranu i lijekove), odnosno QPS statusa (Qualified Presumption of Safety) prema zakonodavstvu Europske unije (Šušković i sur., 2010.; Frece i sur., 2010.).

### 2.2.1. Sistematika bakterija mliječne kiseline

To su gram-pozitivne bakterije, koje pripadaju koljenu *Firmicutes* s niskim udjelom ( $\leq 55$  mol %) gvanina i citozina u DNA (Holzapfel i Wood, 2014). Tvore dvije linije potomstva: *Clostridium* i *Actinomyces*. Tipične bakterije mliječne kiseline su pripadnici *Clostridium* grane. Podijeljene su na šest porodica, 36 rodova i sve većeg broja vrsta ( $>200$  do kraja 2011.g.). Obuhvaćaju slijedeće rodove: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium* (Šušković i Kos, 2000.; Holzapfel i Wood, 2014).

Začetnik taksonomije bakterija mliječne kiseline bio je Orla-Jensen, koji je predložio podjelu s obzirom na fermentaciju šećera, formiranje plinova, morfologiju (koki ili štapićasti) te optimalnu temperaturu rasta (mezofili ili termofili). Njegova ideja opstala je do razvoja moderne biokemije i molekularne biologije (Rehm i sur., 1993).

### 2.2.2. Svojstva bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su organizmi, koji zahtijevaju kompleksnu hranjivu podlogu za rast (ugljikohidrati, minerali, vitamini, aminokiseline). Javljaju se u obliku štapića i koka,

razgrađuju ugljikohidrate i srodne spojeve putem različitih metaboličkih putova. Proizvode mliječnu kiselinu kao jedini ili glavni krajnji produkt metabolizma ugljikohidrata u procesu fermentacije i uglavnom ne proizvode enzim katalazu.

Dijele se na homofermentativne i heterofermentativne te fakultativno heterofermentativne bakterije. Kod homofermentativnih, konačni produkt je samo mliječna kiselina (*Streptococcus*, *Pediococcus* te različite vrste roda *Lactobacillus*), dok kod heterofermentativnih, osim mliječne kiseline, nastaje i značajna količina CO<sub>2</sub> i etanola (*Leuconostoc* i neke vrste roda *Lactobacillus*) (Šušković i Kos, 2000.; Endo i Dicks, 2014.; Frece i Markov, 2016.)

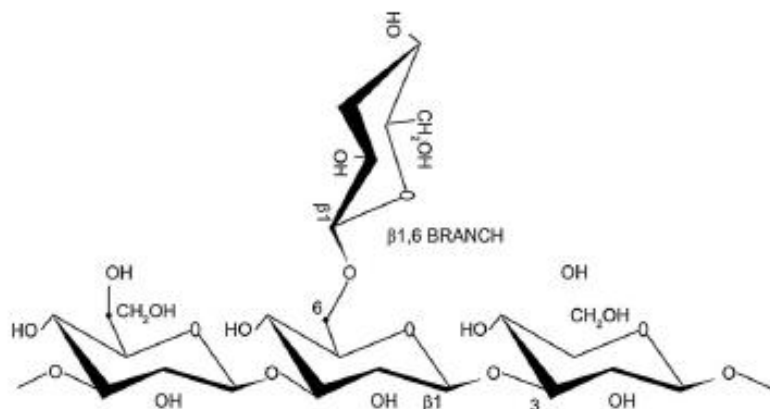
Predstavnike bakterija mliječne kiseline može se naći u različitim staništima i u ekstremnim uvjetima. Različiti mehanizmi mogu biti osnova za njihovo preživljavanje ili prilagodbu. Način preživljavanja može biti određen reakcijama na stres ili konstitutivnim svojstvima vrste. Navedeni faktori mogu biti povezani s karakteristikama stanične stijenke te sa sposobnošću održavanja homeostaze u okolišu pri uvjetima visokog osmotskog tlaka ili niske pH vrijednosti. Sposobnost preživljavanja ili prilagodbe na ekstremne uvjete također uključuje toleranciju na visoku ili nisku temperaturu i žučne soli (Holzapfel i Wood, 2014).

Neki sojevi bakterija mliječne kiseline, posebice oni koji pripadaju rodu *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koji su inače izvorno prisutni u ljudskom probavnom sustavu i tradicijski se primjenjuju u fermentiranim mliječnim proizvodima smatraju se dijetalnim sastojcima prehrane te promicateljima zdravlja (Šušković i sur., 2000.; Frece, 2003.; Frece, 2007.). Probiotik je pripravak živih organizama, koji kada se primijeni na ljude i životinje, ima koristan učinak tako da poboljšava svojstva crijevne mikroflore. Dugogodišnji empirijski dokazi, koji su povezivali upotrebu fermentiranih mliječnih proizvoda (jogurt, mlijeko) sa zdravom probavom, u današnje vrijeme su znanstveno potvrđeni. Antimikrobni spojevi, koje proizvode bakterije mliječne kiseline, omogućuju im prednost pred drugim mikroorganizmima (Soomro i sur., 2002).

### 2.3. $\beta$ -glukan

$\beta$ -glukani su polisaharidi monomera D-glukoze povezanih  $\beta$ -glikozidnim vezama (slika 4). Jedna su vrsta dijetalnih vlakana u žitaricama, kvascima, gljivama, lišajevima, nekim bakterijama i algama.  $\beta$ -glukani iz različitih izvora imaju različite vrste veza, različito se granaju i imaju različite molekulske mase. Makromolekularna struktura  $\beta$ -glukana ovisi o izvoru i metodi

izolacije, varirajući većinom u raspodjeli i duljini bočnih lanaca (Du i sur., 2014). Okosnicu linearne strukture glukana čine monomeri molekula D-glukoze, koji su povezani  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama. Bočne lance čine  $\beta$ -1,6 ili  $\beta$ -1,4-glikozidne veze. Karakteristična svojstva 1,3- $\beta$ -D-glukana: topljivost, stupanj razgranatosti, molekulsku masu, polimerni naboj. Oni imaju ulogu u biološkoj aktivnosti glukana, koja se može poboljšati kemijskom modifikacijom. Naime, čestice  $\beta$ -1,3-D-glukana nisu prikladne za mnoge medicinske svrhe te mogu biti odgovorne za štetne učinke poput nastanka granuloma, upale i mikroembolizacije. U svrhu poboljšanja topljivosti primjenjuju se procesi derivatizacije poput sulfacije i fosfatacije. Primjenjuju se i različite metode uključujući kiseli i alkalni hidrolizu, enzimsku digestiju i ultrazvučno zračenje, kako bi se depolimeriziralo netopljivu makromolekularnu strukturu i proizvelo se topljivi  $\beta$ -1,3-D-glukan (Zeković i Kwiatkowski, 2005).



**Slika 4.** Prikaz linearne strukture glukana, koju čine monomeri molekula D-glukoze povezani bočnim lancima, koje čine  $\beta$ -1,6-glikozidne veze (Bashir i Choi, 2017)

### 2.3.1. Izvori $\beta$ -glukana

Glavni izvor  $\beta$ -glukana su žitarice, među kojima se ističu zob i ječam. Oni sadrže veći postotak  $\beta$ -glukana od ostalih žitarica: ječam 2-11 % i zob 2-7,5 %. Za pšenicu i raž taj postotak varira od 0,5–1 % odnosno 1,4-2,6 % . Među navedenim žitaricama sadržaj  $\beta$ -glukana može se razlikovati od sorte do sorte. Nekada okolišni uvjeti imaju značajan učinak na sadržaj  $\beta$ -glukana, a ponekad skoro nikakav. Određeni genotipovi ječma imaju povišenu razinu amiloze s niskim

udjelom škroba i visokim sadržajem  $\beta$ -glukana. Da bi se dobio što veći sadržaj  $\beta$ -glukana, potrebno je izabrati izvor iz kojeg će se najlakše ekstrahirati navedeni polisaharid. Istraživanja su pokazala da su visoke razine dušika dovele do povećanog sadržaja  $\beta$ -glukana kod ječma. Negativna korelacija utvrđena je između navodnjavanja i  $\beta$ -glukana kod zrna ječma (Ahmad i sur., 2012).

2008. godine FDA je dodijelila GRAS status  $\beta$ -glukanima izoliranim iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasac *S. cerevisiae* je genetski dobro definiran kvasac, koji predstavlja dobar model za proučavanje stanične stijenke kvasca. Kod navedenog kvasca, stanična stijenka čini 15 - 30 % suhe tvari stanice i 25 – 50 % volumena stanice, što stanicu štiti od osmotskog tlaka i negativnih okolišnih uvjeta te određuje oblik stanice. Stanična stijenka *S. cerevisiae* sastoji se od dva sloja, koji su napravljeni od četiri vrste makromolekula: manoproteina,  $\beta$ -1,3-glukana,  $\beta$ -1,6-glukana i hitina. Sve navedene komponente međusobno su povezane kovalentnim vezama. Manoproteini čine otprilike 35 – 40 % suhe tvari stanične stijenke. Više od pola stanične stijenke (50 - 55 %) čini  $\beta$ -1,3-glukan. Molekule  $\beta$ -1,3-glukana izgrađene su od oko 1500 glukoznih jedinica međusobno povezanih  $\beta$ -1,3-glikozidnom vezom i sadrže 40-50 glukoznih jedinica uključenih u grananje preko  $C_6$  atoma (Shokri i sur., 2008).

### 2.3.2. Primjena $\beta$ -glukana

$\beta$ -glukan izoliran iz pekarskog ili pivskog kvasca može se koristiti u proizvodnji smrznutih deserti, preljeva za salatu, umaka, jogurta i ostalih mliječnih proizvoda, tijesta i ostalih proizvoda. Sposobnost  $\beta$ -glukana da zadrži vodu može se iskoristiti u proizvodnji kobasica i drugih mesnih proizvoda (Zechner-Krpan i sur., 2009).  $\beta$ -glukan je jedna vrsta vlakna, koja ima široku primjenu na održavanje ljudskog zdravlja. Smatra se aktivnim sastojkom u sprječavanju nastanka bora, zacjeljivanju rana, ima hidratantni učinak te antioksidativno djelovanje (Du i sur., 2014). Veliki broj istraživanja pokazao je učinkovitost  $\beta$ -glukana protiv raznih bolesti i poremećaja. Ima ulogu u smanjenju pojave kolorektalnog karcinoma, pruža pomoć u borbi protiv konstipacije, ima ulogu u smanjenju glikemijskog indeksa i razine kolesterola te prevenciji rezistencije na inzulin. Napravljena istraživanja ukazuju da  $\beta$ -glukan i ostala dijetalna vlakna imaju ulogu u sprječavanju ili odgađanju početka kroničnih bolesti poput koronarne bolesti srca, šećerne bolesti i raka (Ahmad i sur., 2012).

## 2.4. Vežanje/uklanjanje AFM1 bakterijama mliječne kiseline

Zbog činjenice da prisutnost plijesni i/ili mikotoksina u hrani može biti opasna po ljudsko zdravlje i predstavljati gospodarski problem enormnih razmjera, sve je veći naglasak na razvoj metoda redukcije mikotoksina kojima bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane (Pleadin i sur. 2014.; Jakopović i sur., 2018.). Trenutačno ne postoji tehnologija koja bi potpuno uklonila mikotoksine iz hrane i prehrambenog lanca. Kako bi se uklonili aflatoksini ili smanjila njihova prisutnost u hrani i hrani za životinje, primjenjuju se fizikalne, kemijske i biološke metode (Jaynes i Zartman, 2011.; Hathout i Aly, 2014.; Jakopović i sur., 2018.). U posljednjih nekoliko godina biološke metode dekontaminacije su sve značajnije jer se smatraju sigurnijima u usporedbi s fizikalnim i kemijskim metodama (Pleadin i sur. 2018.; Jakopović i sur., 2018.). Provedena su brojna ispitivanja staničnih stijenki kvasaca i bakterija zbog njihove sposobnosti formiranja kompleksa s mikotoksinima, kako bi detoksificirali hranu i krmivo (Jakopović i sur., 2018.; Assaf i sur., 2019;).

Bakterije mliječne kiseline (BMK) se nameću kao jedan od izbora budući da se od davnina zna da imaju pozitivan učinak na crijevnu mikrofloru čovjeka s mnogobrojnim dokazima o korisnom djelovanju, te im to daje značajan potencijal za primjenu u funkcionalnoj hrani, a znanstvena istraživanja su im pridodala i sposobnost vezanja mikotoksina (Haskard i sur. 2001; Peltonen i sur. 2001; Markov i sur. 2010; Khoury i sur., 2011; Elsanhoty i sur., 2014, Frece i Markov, 2016).

### 2.4.1. Mehanizam vezanja AFM1 bakterijama mliječne kiseline

Iako se većina istraživanja o mehanizmima vezanja mikotoksina bakterijama mliječne kiseline odnosi na aflatoksine, i to na AFB1, došlo se do modela koji predlaže da se mehanizam vezanja odvija u dva procesa: vezanje (adsorpcija) i otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice mikroorganizma. Tim je modelom ustanovljeno da je učinkovitost vezanja AFB1 pomoću bakterija mliječne kiseline *in vitro* i *in vivo* povezana sa sojem bakterije, kao i s brojem mjesta vezanja na površini stanice (Bueno i sur., 2007).

Vezanje AFB1 *in vitro* pokazalo se kao brz i reverzibilan proces, te je napravljen matematički model, kojim se objašnjava uklanjanje AFB1 *in vitro*.

Teoretski model koji predstavlja adsorpciju AFB1 na površinu bakterija mliječne kiseline (Dalić i sur., 2010):

$$AFB1 + S \leftrightarrow S - AFB1 \quad [1]$$

$$K_{eq} = \frac{[S-AFB1]}{[AFB1]} \frac{1}{[s]} = \frac{[Xsa]}{[AFB1]} \frac{1}{[Xs]} \quad [2]$$

$$Xsa + Xs = 1 \quad \text{i} \quad \theta = Xsa \quad [3]$$

$$Xs = 1 - \theta \quad \text{i} \quad K_{eq} = \theta / [AFB1] (1 - \theta) \quad [4]$$

$$\theta = [AFB1]K_{eq} / 1 + [AFB1]K_{eq} \quad [5]$$

$$\text{Adsorpcija} = M \times \theta \quad \text{i} \quad \text{Adsorpcija} = \frac{M[AFB1]K_{eq}}{1+[AFB1]K_{eq}} \quad [6]$$

*S*: količina slobodnih mjesta na površini stanice

*sa*: zauzeta mjesta na površini stanice i ekvivalent *sa* S-AFB1, definirano kao AFB1 vezan na stanicu

[AFB1]: koncentracija AFB1 u ravnotežnom stanju sustava, definirano kao slobodni AFB1 u mediju

*Xsa*  $\theta$ : molarna frakcija zauzetih mjesta

*Xs* (1- $\theta$ ): molarna frakcija slobodnih mjesta

*Adsorpcija*: količina molekula AFB1 vezanih po stanici (*M* x  $\theta$ )

Pomoću ovog modela određuje se broj mjesta vezanja AFB1 (*M*), ekvilibracijska konstanta (*k<sub>eq</sub>*) i učinkovitost stanica za uklanjanjem AFB1 iz tekućeg medija (*M* x *k<sub>eq</sub>*). Ovim modelom dokazalo se da je različita sposobnost sojeva za vezanjem AFB1 direktno povezana s brojem mjesta vezanja (*M*) karakteristična za svaki mikroorganizam (Dalić i sur., 2010).

Dva glavna elementa odgovorna za vezanje mutagena bakterijama mliječne kiseline su polisaharid i peptidoglikan stanične stijenke. Time se omogućuje adsorpcija AFB1 na staničnu stijenku i jedinice membrane, koji nisu dostupni kada bakterija nije okružena mutagenima. Prema provedenom istraživanju, autoklaviranje i upotreba ultrazvuka nisu pridonijeli oslobađanju mjerljivih koncentracija AFB1 iz bakterijskog ekstrakta, koji je ispran vodom pet puta. Zaključak je da je adsorpcija AFB1 pretežno izvanstanično za žive i mrtve stanice te da denaturacija pri visokim temperaturama ne uzrokuje otpuštanje najjače vezane molekule AFB1 (Shahin, 2007). Pokazalo se da preduvjet za uklanjanje AFB1 nisu isključivo žive ili isključivo mrtve stanice. Smatra se da postoje dvije mogućnosti što se tiče vezanja AFB1 na staničnu stijenku bakterija mliječne kiseline. Jedna je da se vezanje odvija kationskim principom, a druga je da je u vezanje



uključen peptidoglikan stanične stijenke (El-Nezami i sur., 1998). Došlo se do zaključka da žive i mrtve stanice (tretirane kiselinom i toplinom) učinkovito uklanjaju AFB1 iz vodenih otopina. Učinkovitost mrtvih bakterijskih stanica ukazuje na to da se AFB1 ne uklanja metabolizmom, već da se stvara fizička veza između AFB1 i bakterija. Stoga se smatra da za vezanje nisu odgovorne kovalentne veze, već slabe nekovalentne veze. Upotreba pronaze E dovodi do zaključka da su proteini uključeni u proces uklanjanja AFB1 te da su mjesta vezanja proteinske građe. Tretiranje lipazom nije dovelo do promjena, što znači da lipidi nemaju ulogu u vezanju AFB1 (Haskard i sur., 2000).

Prema rezultatima istraživanja, jasno je da je uklanjanje toksina brz i reverzibilan proces, da ne uključuje kemijsku modifikaciju AFB1, da se jednaki rezultati dobiju sa živim i mrtvim stanicama te da je koncentracija uklonjenog toksina ovisna o koncentraciji toksina i bakterije. Veze koje su uključene u proces su slabe Van der Waals veze, vodikove veze ili hidrofobne interakcije (Bueno i sur., 2007).

Postoji veći broj istraživanja, kojima je tema vezanje AFB1 probiotičkim bakterijama, ali mali broj istraživanja se bavi sposobnošću tih bakterija za uklanjanjem AFM1 u *in vitro* modelima. Vezanje AFM1 je različito od vezanja AFB1 zbog prisutnosti dodatne –OH grupe kod AFM1 molekule što uzrokuje veću polarnost. Zahvaljujući tome, molekula AFM1 postaje hidrofilnija te raste tendencija otapanja u vodenim otopinama (Serrano- Niño i sur., 2013). Provedeni su pokusi, kojima je proučavana sposobnost sojeva bakterija mliječne kiseline da uklone AFM1 iz kontaminiranog obranog mlijeka i fosfatnog pufera. Rezultati su pokazali da žive i mrtve stanice mogu smanjiti koncentraciju AFM1 u tekućem mediju, što znači da preduvjet za uklanjanje toksina nisu isključivo žive stanice (Blagojev i sur., 2012).

Isto su potvrdila i istraživanja Kabak i Var-a u kojima je dokazano da preduvjet za uklanjanje aflatoksin-a nisu žive bakterijske stanice. Pretpostavka je da hidrofobnost površine stanica igra ulogu u mehanizmu vezanja. Međutim, ispitani sojevi nisu pokazali hidrofobnost te nije dokazana korelacija između hidrofobnosti površine stanica i vezanja AFM1 bakterijama (Kabak i Var, 2008).

#### 2.4.2. Stabilnost kompleksa mikotoksin–BMK

Istraživanjima je ustanovljeno da stabilnost kompleksa mikotoksin–BMK značajno ovisi o soju bakterije, okolišnim uvjetima te o aminokiselinskoj strukturi peptidoglikana (Niderkorn i sur., 2009). U slučaju slabih veza, mikotoksini se mogu otpustiti kontinuiranim ispiranjem u gastrointestinalnom (GI) traktu.

Neka istraživanja su pokazala da je vezanje AFM1 na staničnu stijenku bakterija djelomično reverzibilan proces te da su male količine AFM1 (do 8,54 %) vraćene u otopinu PBS-a. U drugim istraživanjima je dokazano da je dio AFM1 vraćen u otopinu PBS-a nakon nekoliko ispiranja, ali u većem postotku (do 87 %). Velike razlike u postotku vezanog AFM1 objašnjavaju se razlikama u mjestima vezanja između sojeva. Stabilnost kompleksa AFM1-bakterija je veoma važna, jer stabilan kompleks osigurava sigurno izlučivanje mikotoksina iz ljudskog tijela (Assaf i sur., 2019). Neke BMK vezane na stanice GI trakta gube mogućnost adhezije ukoliko je na njima vezan neki mikotoksin što rezultira brzim izlučivanjem BMK-mikotoksin kompleksa iz tijela (Kankaanpää i sur., 2000.; Gratz i sur., 2007).

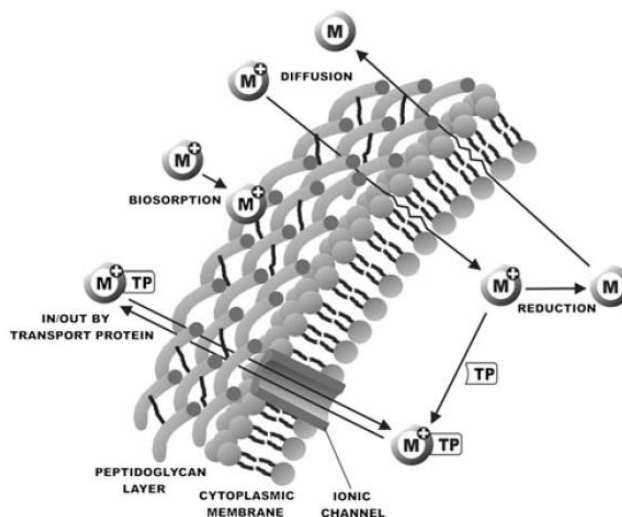
## **2.5. Vezanje/uklanjanje iona metala pomoću bakterija mliječne kiseline**

Metode za uklanjanje iona metala iz vodenih otopina uključuju većinom fizikalne i kemijske procese. Međutim, primjerice taloženje i elektrokemijski procesi nisu naročito učinkoviti, posebice ako se koncentracija iona metala kreće između 1-100 mgL<sup>-1</sup>. Izmjena iona i membranska tehnologija su jako skupe metode ako se radi s velikim količinama voda, koje sadrže niske koncentracije metala. Alternativa je biosorpcija prilikom koje se koriste različiti prirodni materijali biološkog porijekla (bakterije, kvasci, alge), kojima se smanjuje koncentracija iona metala od mgL<sup>-1</sup> do µgL<sup>-1</sup>. Neke vrste biosorbenta vežu veliki dio metala bez prioriteta, dok neki djeluju specifično, na određenu vrstu metala (Wang i Chen, 2009). Bakterije mliječne kiseline nameću se kao izbor, jer osim što pozitivno utječu na zdravlje, određeni sojevi imaju probiotička svojstva. Vezanje iona metala bakterijama mliječne kiseline je složeni proces, koji ovisi o više čimbenika: karakteristikama iona metala, fiziološkim svojstvima sojeva bakterija mliječne kiseline i fizikalno-kemijskim karakteristikama okoliša (temperatura, pH, koncentracija iona metala) (Mrvčić i sur., 2012).

### **2.5.1 Mehanizam vezanja iona metala bakterijama mliječne kiseline**

Ioni metala se vežu na stanice različitim mehanizmima, ovisno o soju bakterije i okolišnim uvjetima. Upravo zbog te varijabilnosti, znanje o tim procesima je nepotpuno (Gavrilescu, 2004). Postoje dva osnovna mehanizma vezanja: biosorpcija i bioakumulacija. Biosorpcija je pasivni proces vezanja iona metala na staničnu stijenku bakterija mliječne kiseline, koji ne uključuje metaboličke procese. Bioakumulacija je proces vezan uz metabolizam prilikom

kojeg ioni metala prolaze kroz staničnu membranu i akumuliraju se u stanici (slika 5). Ioni metala se vežu na staničnu stijenkku i izvanstanične polisaharide uključujući procese adsorpcije, izmjene iona, stvaranje kompleksa, keliranje i mikroprecipitaciju (Mrvčić i sur., 2012).



**Slika 5.** Mehanizmi vezanja iona metala mikroorganizmima (Mrvčić i sur., 2012)

Općenito, bakterijska stanična stijenkka je polielektrolit te reagira s ionima u otopini, kako bi se održala elektroneutralnost. Mehanizmi kojim se ioni metala vežu na površinu stanica uključuju elektrostatske veze, van der Waals-ove veze, redoks interakcije, kovalentno vezanje ili kombinaciju navedenih procesa (Gavrilescu, 2004).

Rađena su istraživanja vezana uz uklanjanje teških metala bakterijama mliječne kiseline i pokazalo se da se navedeni metali pasivno vežu na površinu bakterija elektrostatskim i hidrofobnim vezama. Uklanjanje kadmija i olova pokazalo se brzim procesom, koji se odvija na površini bakterija mehanizmom ionske izmjene. Bakterije mliječne kiseline imaju površinu negativnog naboja pa su idealne za vezanje kationa (Elsanhoty i sur., 2016). Proučavan je i utjecaj pH na uklanjanje teških metala. Rezultati su pokazali da je uklanjanje ovisno o pH s najboljim rezultatima uklanjanja pri pH blizu neutralne vrijednosti. Rast pH vrijednosti uzrokovao je gotovo linearan rast uklanjanja pri čemu je najveća učinkovitost uklanjanja postignuta kod pH 7. Kod pH ispod 2-3 se postiže vrlo niska učinkovitost uklanjanja, dok je kod pH iznad 3 postignut nagli rast učinkovitosti uklanjanja. Pretpostavka je da je utjecaj pH rezultat natjecanja za negativno nabijena mjesta vezanja između kationa teških metala i protona  $H^+$  (Elsanhoty i sur., 2016).

Površina bakterija mliječne kiseline je sastavljena od gustog sloja peptidoglikana, proteina, polisaharida i (lipo)teihoičnih kiselina. Takva struktura sadrži različite nabijene grupe poput karboksilnih, fosfatnih i hidroksilnih grupa. Zato bakterije mliječne kiseline imaju veliki broj liganda sposobnih za vezanje kationa poput kadmija i olova. Povećanje učinkovitosti uklanjanja metala s porastom biomase objašnjava se većim brojem mjesta vezanja (Halttunen i sur., 2007).

Neke bakterijske stanice mogu akumulirati metale unutar stanice. To je proces ovisan o metabolizmu te o energiji. Dok je unutarstanična akumulacija obično sporiji proces nego adsorpcija, njome se veže veća koncentracija metala. Kod nekih sojeva moguće je da se dogode oba procesa. Primjerice, utvrđeno je da su se ioni bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ) adsorbirali na stanicu iza čega je slijedila unutarstanična akumulacija, koja je posljedica izmjene iona bakra s ionima magnezija i kalcija preko stanične stijenke (Gavrilescu, 2004).

Mrvčić i sur. su radili istraživanje vezano uz vezanje bakra različitim sojevima bakterija mliječne kiseline Langmuirovim modelom. To je model, koji se najčešće koristi za opisivanje jednostavnih sorpcijskih izoterma i za usporedbu različitih biosorbenata. Tijekom biosorpcije se uspostavlja brza ravnoteža između adsorbiranih iona metala na bakterijsku stanicu ( $q_{eq}$ ) i neadsorbiranih iona metala u otopini ( $C_{eq}$ ). Langmuirova jednadžba je važeća za jednoslojnu sorpciju i glasi:

$$q_{eq} = Q_0 b C_{eq} / (1 + b C_{eq}) \quad [7]$$

gdje je:

$q_{eq}$  vezanje specifičnih iona metala ( $\text{mg g}^{-1}$  biomase),  $Q_0$  je maksimalna količina iona metala po jedinici mase bakterija da bi se formirao jednosloj na površini vezanja,  $b$  je konstanta povezana s afinitetom mjesta vezanja, tj. afinitet između sorbenta i sorbata;  $C_{eq}$  je koncentracija slobodnih iona metala u ravnoteži.  $Q_0$  i  $b$  se mogu odrediti iz linearnog odnosa  $C_{eq}/q_{eq}$  prema  $C_{eq}$ .

Istraživanja su rađena na sojevima *L. mesenteroides*, *L. brevis* i *L. plantarum*. Pokazalo se da su za sojeve *L. mesenteroides* i *L. brevis*  $Q_0$  vrijednosti visoke, što ukazuje na visoku učinkovitost vezanja iona bakra (Mrvčić i sur., 2009).

## 2.6. Vezanje mikotoksina i metala $\beta$ -glukanom

Kao dobri biofiksatori mikotoksina i teških metala, uz bakterije, kvasce, plijesni, aktinomicete i alge, pokazale su se i komponente stanične stijenke, kao što je  $\beta$ -glukan izoliran

iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Hodnik i Anderluh, 2009; Habschied i sur., 2011; Čvek i sur., 2012; Zoghi i sur., 2014). *In vitro* studije pokazale su da stanična stijenka kvasca *S. cerevisiae* može vezati širok raspon toksina, što ga čini jednim od najučinkovitijih modelnih organizama za vezanje toksikanata (Corassin i sur., 2013).

Ranija istraživanja vezanja mikotoksina/metala uključivala su dodavanje kulture živih stanica kvasca. Najveći postotak vezanja živim stanicama kvasca dokazan je tijekom rane eksponencijalne faze rasta. Sposobnost vezanja je značajno pala za vrijeme rane i kasne stacionarne faze. Ovakav rezultat istraživanja ukazuje da su strukture zadužene za vezanje dostupnije tijekom eksponencijalne faze rasta, a dostupnost navedenih struktura se značajno smanjuje kada stanice uđu u stacionarnu fazu (Shetty i sur., 2007). Međutim, s vremenom se pokazalo da mrtve stanice imaju jednaku ili čak veću sposobnost vezanja u odnosu na žive stanice. Njihova prednost je da nemaju potrebu za hranom, nisu osjetljive na ekstremne pH vrijednosti ili povećanu koncentraciju toksikanta. Još uvijek nije do kraja razjašnjeno da li je bolje koristiti žive ili mrtve stanice kvasca, ali rezultati mnogobrojnih istraživanja vode zaključku da je vezanje fizički fenomen, koji se odvija u prva 2-3 sata procesa (Rahaie i sur., 2010).

Glukani iz kvasca imaju razgranatu strukturu, koja sadrži glavne lance  $\beta$ -D-glukopiranozila povezanih  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 vezom te nasumično raspoređene bočne lance  $\beta$ -D-glukopiranoznih jedinica povezanih 1 $\rightarrow$ 6 vezama, što im omogućuje reguliranje prisutnosti toksikanata (Vetvicka, 2014).

Istraživanja interakcije glukana i aflatoksina B1 pokazala su da su hidroksilne, laktonske i ketonske skupine sudjelovale u formiranju vodikovih veza i van der Wallsovih interakcija između glukana i aflatoksina B1 (Vetvicka, 2014). Do interakcija između teških metala i glukana najvjerojatnije dolazi zbog visokog sadržaja ugljika, dostupnosti mjesta vezanja teških metala kroz specifične skupine (hidroksilne skupine u slučaju polisaharida) i poroznu površinu (Nowak i sur., 2019).

#### 2.6.1. Mehanizam vezanja mikotoksina $\beta$ -glukanom

Istraživanja su pokazala da  $\beta$ -D-glukani, posebice oni vezani  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 vezom, a na mjestima grananja  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6 vezom, mogu regulirati prisutnost aflatoksina. Pod fiziološkim uvjetima (posebno se to odnosi na temperaturu), glukani mogu vezati do 50% mikotoksina zearalenona. To je moguće zahvaljujući vodikovim vezama između hidroksilnih, laktonskih i ketonskih skupina molekula zearalenona i pojedinačnog heliksa glukana te van der Wallsovim vezama između ostataka fenila i  $\beta$ -D-glukopiranoze (Vetvicka, 2014). Vezanje molekule AFB1

unutar strukture  $\beta$ -D-glukana odvija se u dva koraka. U prvom koraku molekula AFB1 je zarobljena unutar jednostrukog heliksa lanca povezanog  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 vezom. U drugom koraku razgranati lanci glukana povezani  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6 vezom obavijaju molekulu toksina i zadržavaju je unutar heliksa. Unutar pojedinačnog heliksa AFB1 se može smjestiti na više različitih pozicija (Yiannikouris i sur., 2006). Proces adsorpcije uvelike ovisi o trodimenzionalnoj organizaciji D-glukana, koja uključuje jednostruke i/ili trostruke heliks konformacije D-glukana vezanih  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 vezama (Yiannikouris i sur., 2004). Pošto se pokazalo da strukturna konformacija ima glavnu ulogu u adsorpcijskim mehanizmima, napravljena su mnoga istraživanja. Utvrđeno je da se  $\beta$ -D-glukani mogu nalaziti u obliku nasumične zavojnice ili u obliku uređene strukture te se ovisno o tome mijenjaju i dostupna mjesta vezanja. Kako se mijenja prostorna organizacija  $\beta$ -D-glukana, tako dolazi i do jače, tj. slabije adsorpcije molekula toksina (Yiannikouris i sur., 2004). Interakcije između molekula mikotoksina i  $\beta$ -D-glukana ovise o pH vrijednosti. Neutralni uvjeti djeluju povoljnije na stabilnost stvaranja kompleksa od kiselih uvjeta. Blago alkalni uvjeti su se pokazali nepovoljnima za vezanje mikotoksina  $\beta$ -D-glukanima, posebice onih vezanim  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 vezom bez razgranatih glukana povezanih  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6 vezom. Stoga se može zaključiti da prisutnost razgranatih lanaca poboljšava adsorpcijski kapacitet  $\beta$ -D-glukana i stabilizira stvaranje kompleksa pod različitim pH uvjetima. (Yiannikouris i sur., 2004). Umjereno bazični uvjeti smanjuju učinkovitost stvaranja kompleksa zbog destabilizirajućeg utjecaja na prostornu organizaciju molekula  $\beta$ -D-glukana (Yiannikouris i sur., 2004). Istraživanja koja su proveli Jouany i sur. (2005) su pokazala da okolišni uvjeti mijenjaju stabilnost strukture D-glukana čime se smanjuje sposobnost stvaranja kompleksa s mikotoksinima. Takvi rezultati ukazuju na to da su u stvaranje kompleksa uključene nekovalentne veze pa se zaključuje da se radi o adsorpcijskom vezanju. Učinkovitost vezanja ovisi o molekularnim strukturama mikotoksina i glukana. Geometrija molekule AFB1 omogućuje joj da jednostavno ulazi u otvorenu strukturu heliksa D-glukana. Aromatski prsten, laktanske i ketonske skupine molekule AFB1 stvaraju polarne ili elektronske veze s glukoznim jedinicama u pojedinačnom heliksu D-glukana (Jouany i sur., 2005). Istraživanja rađena u *in vitro* uvjetima pokazala su da  $\beta$ -D-glukan može vezati AFB1, što dovodi do smanjenja bioraspoloživosti u probavnom traktu. Pretpostavka je da se  $\beta$ -D-glukan omota oko mutagena te navedeni spojevi tvore supramolekularni kompleks. Do tog zaključka se došlo proučavajući talište, koje se smatra kriterijem za ispitivanje čistoće. Vrijednost tališta kristala AFB1- $\beta$ -D-glukan je srednja vrijednost tališta izmjenjenih za pojedinačne spojeve. Mjeren je i spektar kristala AFB1- $\beta$ -D-glukan i on ne odgovara karakteristikama  $\beta$ -D-glukana, a u strukturi mikotoksina nisu uočene promjene (Madrigal-Bujaidar i sur., 2015).

## 2.6.2. Mehanizam vezanja metala $\beta$ -glukanom

U vezanje metala kvascima uključene su karboksilne, amino, hidroksil i amidne skupine proteina i ugljikohidrata (vjerojatno manoproteina, glukana i hitina), koji se nalaze u staničnoj stijenci. Uklanjanje iona metala kvascem *S. cerevisiae* odvija se najčešće u dva koraka. Prvi korak je biosorpcija, koja je brzi proces i odvija se u prvih nekoliko minuta nakon kontakta s metalima. To je proces neovisan o metabolizmu i događa se kod živih i mrtvih stanica. Drugi korak je bioakumulacija, koja se odvija kod živih stanica, smatra se procesom ovisnim o metabolizmu i povezuje se s unosom metala u stanicu putem stanične membrane (Machado i sur., 2009).  $\beta$ -glukan se nameće kao dobar izbor za uklanjanje teških metala zbog toga što je jeftin i ekološki prihvatljiv. Prednost  $\beta$ -glukana izoliranog iz kvasca je netopivost u vodi, tako da može služiti kao sorbent metala u vodenim otopinama (Nowak i sur., 2019). Glukan ima dobru sorptivnu sposobnost zbog dobro razvijene površine i velikog broja hidroksilnih skupina na površini. Mehanizam vezanja se temelji na stvaranju veza na površini glukana sa skupinama, koje sadrže kisik (Nowak i sur., 2019). U istraživanju koje su radili Faure i sur. (2015) ispitan je utjecaj pH na vezanje iona željeza  $\beta$ -glukanom. Rezultati su pokazali da kod vrlo niskih pH vrijednosti (pH = 2,7)  $\beta$ -glukan ne veže ione željeza. Kod viših vrijednosti (pH=4,7)  $\beta$ -glukan stvara kompleks s ionima željeza. To je u skladu s prijašnjim istraživanjima, koja su pokazala da u kiselim uvjetima (pH = 2,0) udio vezanog željeza iznosi oko 60 %. Kod pH=5,7 taj udio iznosi oko 95 %. Kada se radi o probavnom sustavu,  $\beta$ -glukan će otpustiti ione željeza u želucu gdje je pH=2. No, čim pH vrijednost poraste na 6-6,5 u dvanaesniku,  $\beta$ -glukan će ponovno vezati ione željeza, što dovodi do smanjenja apsorpcije željeza.

### **3. MATERIJALI I METODE**



### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Uzorci

Određivanje učinkovitosti uklanjanja AFM1 i metala iz mlijeka primjenom bakterija mliječne kiseline i  $\beta$ -glukana provedeno je na steriliziranom kravljem mlijeku s 2,8% mliječne masti (Dukat), koje je nabavljeno u trgovini.

Za istraživanja je postavljeno 100 uzoraka mlijeka kontaminiranih s AFM1/metalima iz kojih su načinjeni poduzorci u kojima su se određivali parametri: broj živih stanica BMK u broju  $10^6$  i  $10^8$  CFU $mL^{-1}$ ; mrtve stanice BMK u koncentraciji 0,5 i 1 mg $mL^{-1}$ ; koncentracija liofiliziranih stanica BMK od 0,5 i 1,0 % (w/v); optimalne koncentracije  $\beta$ -glukana od 0,01 i 0,005 % (w/v); vrijeme kontakta između AFM1/metala-BMK, AFM1/metala- $\beta$ -glukana.

#### 3.1.2. Mikroorganizmi

Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu dio su zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, a izolirani su iz svježeg kravljeg mlijeka, svježeg kravljeg sira i vrhnja.

Odabrani sojevi BMK: *Lactobacillus plantarum* SM1 (*L. plantarum* SM1); *Lactobacillus plantarum* SMB (*L. plantarum* SMB); *Lactobacillus plantarum* MM (*L. plantarum* MM); *Lactobacillus plantarum* KM (*L. plantarum* KM); *Lactobacillus paracasei* KM (*L. paracasei* KM); *Lactobacillus rhamnosus* KM (*L. rhamnosus* KM); *Lactobacillus plantarum* SMA (*L. plantarum* SMA); *Lactobacillus plantarum* SS1 (*L. plantarum* SS1); *Lactobacillus helveticus* S9 (*L. helveticus* S9) i *Lactococcus lactis* 5MS1 (*Lc. lactis* 5MS1). Kulture su čuvane u MRS bujonu (de Man, Rogosa, & Sharpe, Biolife, Milano, Italija) pri temperaturi od 4 °C do izvođenja pokusa.

#### 3.1.3. $\beta$ -glukan

$\beta$ -glukan je izoliran iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 20, koji je dio zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Izolacija iz stanične stijenke kvasca napravljena je prema Zechner-Krpan i sur. (2010). Biomasa svježeg kvasca podvrgnuta je alkalno kiseloj ekstrakciji uz uklanjanje manoproteina, a dobiveni mokri talog osušen je na

zraku pri sobnoj temperaturi. Izolirani  $\beta$ -glukan potvrđen je komercijalno dostupnim Megazyme kitom za  $\beta$ -glukan (Megazyme, Wicklow, Irska).

#### 3.1.4. Priprema standardnih otopina AFM1

U odmjernoj tikvici od 10 mL acetonitrilom se razrijedi određeni volumen certificiranog referentnog materijala AFM1 (čistoće  $99\pm 1\%$ , Romer Labs Diagnostic GmbH, Austrija), kako bi se dobila koncentracija od  $50\text{ ng mL}^{-1}$ . Daljnjim razrjeđivanjem smjesom acetonitril/voda (2:8) u odmjernim tikvicama od 10 mL dobiva se radni standard, koji se čuva u hladnjaku u ambalaži od tamnog stakla.

#### 3.1.5. Metali

Popis metala korištenih u ovom radu je prikazan u tablici 3, a korišteni su certificirani referentni materijali.

**Tablica 3.** Popis certificiranih referentnih materijala

Naziv	Kratica	Čistoća	Proizvođač
Aluminij	Al	$1000\pm 3,2\text{ mg L}^{-1}$	Cpa Chem Ltd., Bugarska
Bakar	Cu	$1000\pm 2\text{ mg L}^{-1}$	Reagecon Diagnostics Ltd, Irska
Cink	Zn	$995,5\pm 5\text{ mg L}^{-1}$	Cpa Chem Ltd., Bugarska
Kadmij	Cd	$999,3\pm 5,1\text{ mg L}^{-1}$	Cpa Chem Ltd., Bugarska
Mangan	Mn	$1000\pm 2,7\text{ mg L}^{-1}$	Cpa Chem Ltd., Bugarska
Molibden	Mo	$999\pm 2\text{ mg L}^{-1}$	Reagecon Diagnostics Ltd, Irska
Olovo	Pb	$1000\pm 2\text{ mg L}^{-1}$	Reagecon Diagnostics Ltd, Irska
Selen	Se	$1001\pm 2\text{ mg L}^{-1}$	Reagecon Diagnostics Ltd, Irska
Željezo	Fe	$1000,3\pm 5,8\text{ mg L}^{-1}$	Cpa Chem Ltd., Bugarska
Živa	Hg	$995\pm 5\text{ mg L}^{-1}$	Fisher Chemical, SAD
ERM-BD 150 mlijeko u prahu			Institute for Reference Materials and Measurements, Belgija

### 3.1.6. Hranjive podloge

#### a) Podloge za bakterije mliječne kiseline

- MRS agar (De Man, Rogosa i Sharpe) sastava: pepton 10,0 gL<sup>-1</sup>; govedji ekstrakt 10,0 gL<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 5,0 gL<sup>-1</sup>; glukoza 20,0 gL<sup>-1</sup>; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 gL<sup>-1</sup>; natrijev acetat 5,0 gL<sup>-1</sup>; amonijev citrat 2,0 gL<sup>-1</sup>; magnezijev sulfat 0,2 gL<sup>-1</sup>; manganov sulfat 0,05 gL<sup>-1</sup>; agar 15,0 gL<sup>-1</sup>; Tween 80 1,0 gL<sup>-1</sup>; voda (destilirana) 1L; pH 6,5; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min.

- MRS bujon- istog sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/15 min.

#### b) Podloga za kvasce

- Sladni agar sastava: sladni ekstrakt (praškasti) 20 g; pepton 6 g; glukoza 20 g; agar 15g; voda (destilirana) 1 L; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min.

### 3.1.7. Kemikalije

Uz certificirane referentne materijale korišteni su i kemikalije i reagensi navedeni u tablici 4.

**Tablica 4.** Popis korištenih kemikalija i reagensa

Naziv	Kratica	Čistoća	Proizvođač
Acetonitril	ACN	HPLC	PanReac AppliChem, Španjolska
Deionizirana voda		0,055 μS/cm	Nirosta VV System, Nirosta water technologies, Osijek, Hrvatska
Natrijev klorid	NaCl	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Dinatrijev hidrogen fosfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	p.a.	Scharlab, S.L., Španjolska
Kalijev dihidrogen fosfat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	p.a.	PanReac AppliChem, Španjolska
Kalijev klorid	KCl	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Nitratna kiselina	HNO <sub>3</sub>	≥ 65% w/w	Scharlab, S.L., Španjolska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Merck, Njemačka

Kloridna kiselina	HCl	37%	Scharlab, S.L., Španjolska
Vodikov peroksid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30%	Fisher, Velika Britanija
Interni standard (mix In, Bi, Rh, Sc)			Agilent, SAD
Argon	Ar	6.0	Messer, Austrija
Helij	He	6.0	Messer, Austrija
Dušik	N <sub>2</sub>	4.6	Messer, Austrija
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	96 %	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	p.a.	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Zagreb, Hrvatska
enzimski kit za β- glukan			Megazyme, Wicklow, Irska
Natrijev dihidrogenfosfat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	p.a.	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrijev acetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	p.a.	Kemika, Zagreb, Hrvatska

### 3.1.8. Pribor

- pipete proizvođača Brand (Njemačka)
- Erlenmeyerova tikvica
- kolona za tekućinsku kromatografiju Synergi polar RP 80A (duljina 150 mm x 3 mm unutarnjeg promjera, veličine čestica 4 μm), Phenomenex (Sjedinjene Američke Države)
- stakleni štapić
- laboratorijska čaša
- imunoafinitetne kolone s antitijelima za AFM1 Vicam (SAD)
- sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi (vakuum kadica s pumpom) Supelco (SAD)
- epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- odmjerna tikvica od 10 mL, 20 mL, 50 mL i 1000 mL
- filteri- Acrodisc, najlonska membrana, promjera 13 mm, veličine pora 0,2 μm (Pall Corporation, SAD)
- rotaciona tresilica Ika Vortex Genius 3 (Merck, Njemačka)
- predmetnica

- kiveta
- tikvica
- vodena kupelj
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- brojač kolonija
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- vibro mikser
- bakteriološki filteri poroznosti 0,22-0,45 µm
- membranska filtracija
- filter Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa (Merck, Njemačka)

### 3.1.9. Instrumenti

- analitička vaga osjetljivosti 0,001 g, Ohaus (Sjedinjene Američke Države)
- centrifuga Rottina 38 (Hettich, Belgija)
- mikrovalna pećnica SpeedWave 4/DAK100/4 (Berghof, Njemačka)
- mikroskop Olympus
- centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- termostat
- pH metar
- visoko djelotvorni tekućinski kromatograf (HPLC) Agilent 1100 Series (SAD) opremljen autoinjektorom, dvije binarne pumpe, uređajem za otklanjanje plinova, grijačem kolone, jedinicom za kontrolu sustava, UV-detektorom s nizom fotodioda i fluorescencijskim detektorom (FLD). Program za upravljanje instrumentom i obradu podataka ChemStation.
- uređaj induktivno spregnute plazme s masenim detektorom (ICP-MS) 7800 (Agilent, SAD)
- spektrofotometar Helios β UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema bakterija mliječne kiseline za vezanje AFM1/metala

#### 3.2.1.1. Priprema živih i mrtvih stanica BMK

Odabrane BMK koje se čuvaju pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  u MRS bujonu (Biolife, Milano, Italija) s 30 % (v/v) glicerola prvo se revitaliziraju naciepljivanjem u MRS bujon i inkubiraju na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 48 sati. Zatim se za svaki bakterijski soj aktivirane prekonoćne stanice naciepljuju u 25 mL de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) bujona (Biolife, Italija) sakupe pod aseptičkim uvjetima centrifugiranjem (3000 rpm/10 min) na sobnoj temperaturi, isperu tri puta s 5 mL sterilne deionizirane vode i resuspendiraju u sterilnoj deioniziranoj vodi i podijele u dvije skupine. Prva skupina su žive stanice, a druga stanice tretirane u vodenoj kupelji na  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 60 minuta (toplinski obrađene stanice). Broj živih stanica određuje se serijom decimalnih razrijeđenja, brojanjem poraslih kolonija na MRS agaru, a izražava se kao CFU vrijednost. Broj stanica za provođenje pokusa vezanja AFM1 je  $10^6$  i  $10^8$  CFU $\text{mL}^{-1}$ .

Druga skupina stanica (mrtve stanice) tretirana je termički u laboratorijskoj vodenoj kupelji pri  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 60 minuta. Stanice BMK tretirane u vodenoj kupelji odvojene su centrifugiranjem na 3000 rpm tijekom 10 minuta i pripremljena je biomasa u količini od 1 i 5 mg biomase/mL. Odsutnost živih stanica BMK u termički tretiranim uzorcima provjerena je određivanjem CFU vrijednosti.

#### 3.2.1.2. Liofilizirane stanice BMK

Liofilizacija stanica BMK provodi se na liofilizatoru „Christ Alpha 1-2 LD plus“. Prvi korak u pripremi stanica BMK za liofilizaciju je uzgoj bakterijskih kultura na MRS hranjivoj podlozi pri  $37^{\circ}\text{C}$  preko noći. Potom slijedi centrifugiranje pri 4000 rpm tijekom 10 min, ispiranje sterilnom destiliranom vodom i resuspenzija u obranom mlijeku (10 %) zajedno s 5 % glicerola. Pripremljene suspenzije stanica zamrzavaju se preko noći na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  te se liofiliziraju u liofilizatoru. Zamrzavanje stanica provodi se pola sata pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a nakon toga slijedi sušenje 5 sati pri 0,03 mbara i temperaturi oko  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Broj živih stanica prije i nakon liofilizacije određuje se indirektnom metodom pripremom serije decimalnih razrijeđenja, brojanjem poraslih kolonija na MRS agaru i izražava se kao CFU $\text{g}^{-1}$ .

### 3.2.1.3. Vežanje AFM1 pomoću BMK

Suspenzije BMK (žive stanice  $10^6$  i  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), biomasa toplinski tretiranih stanica, mrtve stanice (1 i 5 mg mL<sup>-1</sup> mlijeka) i liofilizirane stanice (0,5 i 1,0 % (w/v)) su naciepljene u 3x100 mL uzorka mlijeka u koje je dodan AFM1 do konačne koncentracije 0,01; 0,05 i 0,5 µg L<sup>-1</sup>. Uzorci su inkubirani na 4 °C tijekom 24 sata. Nakon 0, 2, 4 i 24 h inkubacije uzorci su centrifugirani (3000 rpm/20 min) i dva puta isprani destiliranom vodom. Supernatant uzoraka sakupljen nakon centrifugiranja analiziran je na količinu nevezanog AFM1 koja je određena HPLC tehnikom.

### 3.2.2. Priprema β-glukana za vežanje AFM1/metala

#### 3.2.2.1 Izolacija β-glukana iz kvasca *S. cerevisiae*

Kako bi se omogućila izolacija β-glukana iz stanica kvasca, potrebno je napraviti pripremu kvašćeve biomase. Kultura kvasca *S. cerevisiae* čuva se na -70 °C uz dodatak 30 % (v/v) glicerola. Kao podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj kvasca korištena je sladovina (Biolife, Milano, Italija), koja se priprema prema uputama proizvođača i sterilizira pri 121 °C/15 min. Prvi korak je naciepljivanje kvasca u 3x5 mL sladovine i inkubacija na 37 °C tijekom 48h kako bi se stanice kvasca revitalizirale. Nakon revitalizacije kultura kvasca se precijepi u tikvicu sa 100 mL sladovine i inkubira na 37 °C tijekom 48h. Poslije provedenog uzgoja kvasac se centrifugira 15min na 4000 rpm te se dobivena biomasa koristi za izolaciju β-glukana. Izolacija β-glukana se provodi iz svježe kvašćeve biomase, 160 g biomase pomiješa se sa 128 mL 6%-tne NaOH i ostavi 2 h na 60 °C. Kada je izolacija završena, provodi se neutralizacija s 1,5 M klorovodičnom kiselinom te se uzorak centrifugira 10 min na 12 000 rpm. Dobiveni talog stanica se ispiru vodom tri puta, a nakon toga acetatnim puferom (pH 3,8) sve dok pH nakon ispiranja ne postane jednak pH vrijednosti prije ispiranja.

#### 3.2.2.2 Dokazivanje prisutnosti β-glukana enzimskim postupkom

β-glukan izoliran iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 20 potvrđen je enzimskom metodom upotrebom Megazyme kita. Izolirani β-glukan doda se u 3 mL uzorka mlijeka, prenese u epruvetu i zagrijava u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 5 min. Uzorak se ohladi na sobnu temperaturu te mu se doda 5 mL 95 % etanola i intenzivno izmiješa. Doda se još 5 mL 95 %

etanola, dobro izmiješa i centrifugira na 3 000 rpm tijekom 10 min. Talog se otopi u 8 mL 50 % (v/v) etanola, promiješa i ponovno centrifugira (3 000 rpm/10 min). Dobiveni peleti se resuspendiraju u 4 mL 20 mM natrij fosfatnog pufera pH 6,5 i inkubiraju 5 min na 50 °C. Uzorku se doda 0,2 mL lihenaze, promiješa i inkubira 1 h na 50 °C uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije doda se 5 mL 200 mM natrij acetatnog pufera pH 4 i dobro izmiješa na vibro mikseru. Uzorak se ohladi na sobnu temperaturu i centrifugira 10 min na 1000 rpm. Alikvoti od 0,1 mL se prenese u tri epruvete. U dvije epruvete se doda  $\beta$ -glukozidaza (0,1 mL) u 50 mM natrij acetatnom puferu pH 4, a u treću epruvetu koja služi kao slijepa proba se doda samo 0,1 mL 50 mM acetatnog pufera pH 4. Svi uzorci se inkubiraju na 50 °C tijekom 10 min. 3 mL glukoza oksidaza/peroksidaza (GOPOD) reagensa se doda u svaku epruvetu na 50 °C i pričekava još 20 min, a zatim se izmjeri apsorbancija uzoraka pri 510 nm. Metoda se zasniva na nizu reakcija razgradnje glukana do glukoze koja dodatkom GOPOD reagensa (glukoza oksidaza/peroksidaza/4-aminoantipirin) prelazi u obojeni produkt kinonimin koji se mjeri spektrofotometrijski pri  $A_{520}$  (žuto obojenje  $\beta$ -glukan je prisutan u uzorku).

### 3.2.2.3. Vežanje AFM1 $\beta$ -glukanom

$\beta$ -glukan izoliran iz kvasca u koncentracijama 0,01 i 0,005 % (w/v) dodan je u 3x100 mL uzorka mlijeka u koje je dodan AFM1 do konačne koncentracije 0,01; 0,05 i 0,5  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Uzorci su inkubirani na 4 °C tijekom 24 sata. Nakon 0-tog, 2., 4. i 24. h inkubacije uzorci su centrifugirani (3000 rpm/20 min) i dva puta isprani destiliranom vodom. Supernatant uzoraka sakupljen nakon centrifugiranja pripremljen je za određivanje količine nevezanog AFM1 HPLC tehnikom.

### 3.2.3. Određivanje koncentracije AFM1 u mlijeku HPLC tehnikom

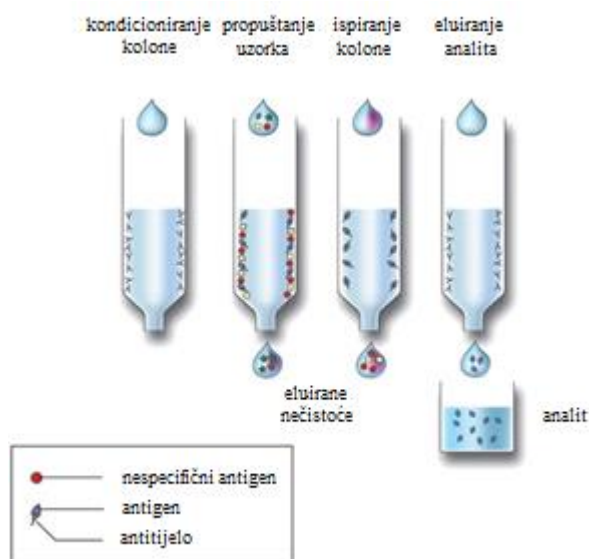
#### 3.2.3.1. Priprema uzoraka mlijeka (Interna uputa RU-22-054, NZJZ dr. Andrija Štampar)

Uzorak mlijeka (70 g) se centrifugira 15 min pri 4200 rpm/min. Masnoća se s površine odstrani staklenim štapićem. Potom se 10-20 g supernatanta odvaže u laboratorijsku čašu i propusti kroz imunoafinitetnu kolonu (slika 6), prethodno kondicioniranom s 10 mL PBS-puferu. Brzina propuštanja uzorka ne smije prelaziti 3  $\text{mLmin}^{-1}$ . Punilo kolonice ne smije se osušiti. Imunoafinitetna kolona se ispiru s 10 mL deionizirane vode i osuši se pod vakuumom do suhoga. Aflatoksin M1 se eluira propuštanjem 4 mL acetonitrila kroz kolonu. Eluat se skuplja u epruvetu



i upari do suhog u struji dušika. Ekstrakt uzorka priprema se za analizu dodatkom 500  $\mu\text{L}$  smjese acetonitril/voda (2:8) mikrolitarskom špricom, filtrira preko filtera ( $0,2 \mu\text{m}$ ) te se postavlja u automatski uzorkivač instrumenta prethodno pripremljenog za rad.

Priprema PBS pufera: U 900 mL deionizirane vode otopi se 8 g NaCl; 1,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 2 g KCl. Otopinom NaOH (0,8 %) pH vrijednost se podesi na 7,4 i nadopuni vodom do oznake.



**Slika 6.** Princip razdvajanja analita pomoću imunoafinitetnih kolona (Jong i sur., 2011)

### 3.2.3.2. Uvjeti rada na HPLC-u

AFM1 se određuje HPLC tehnikom (tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti) (slika 7). Razdvaja se na koloni Synergi Polar. Tijekom analize je korišten FLD detektor (fluorescentni detektor) pod uvjetima: valna duljina pobuđivanja od 365 nm i valna duljina emisije od 455 nm. Temperatura kolone pri analizi održavana je na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Protok pokretne faze podešen je na  $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$ , a volumen injektiranog uzorka bio je  $50 \mu\text{L}$ . Kao mobilna faza korištena je otopina  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  u omjeru  $v/v=60:40$ .

HPLC tehnika je vrsta kromatografije, koja se koristi u analizama u svrhu razdvajanja, identifikacije i kvantificiranja spojeva. Najvažniji dijelovi HPLC sustava su kolona (sadrži stacionarnu fazu), pumpa (potiskuje mobilnu fazu kroz kolonu) i detektor (pokazuje retencijsko

vrijeme molekula). Retencijsko vrijeme je vrijeme u kojem se tvar eluira i karakteristično je za određenu tvar. Ono varira ovisno o interakcijama između stacionarne faze, molekula koje se analiziraju i korištenih otapala. Mali volumen uzorka unosi se u tok mobilne faze te na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, sastavu mobilne faze i stacionarnoj fazi. Uobičajena otapala koja se koriste uključuju smjesu vode i organskih otapala (najčešće su to metanol i acetonitril) (Bansal V. i sur., 2010).



**Slika 7.** Tekućinski kromatograf s fluorescencijskim detektorom Agilent 1100 (NZJZ dr. Andrija Štampar)

### 3.2.3.3. Kvantitativno određivanje AFM1 (SOP-25-053, NZJZ dr. Andrija Štampar)

Metoda za određivanje masenog udjela AFM1 u mlijeku je validirana i akreditirana prema normi HRN EN ISO 14501:2008. Validacijom metode (tablica 5) postignuta je granica kvantifikacije (eng. Limit of quantification, LOQ) metode od  $0,010 \mu\text{gkg}^{-1}$ . Prisutnost aflatoksina M1 u uzorku utvrđuje se usporedbom retencijskog vremena ( $R_t$ ) pika na kromatogramu uzorka s retencijskim vremenom pika radnog standarda (slika 8a, b). Aflatoksin M1 je prisutan ukoliko se retencijsko vrijeme pika na kromatogramu uzorka razlikuje od retencijskog vremena pika radnog standarda za  $\pm 2,5 \%$  (prema Pravilniku o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata NN 2/2005).

Za svaki pokus uključena je bila i pozitivna (samo AFM<sub>1</sub> u mlijeku) kontrola. Svi pokusi su provedeni u triplicatu.

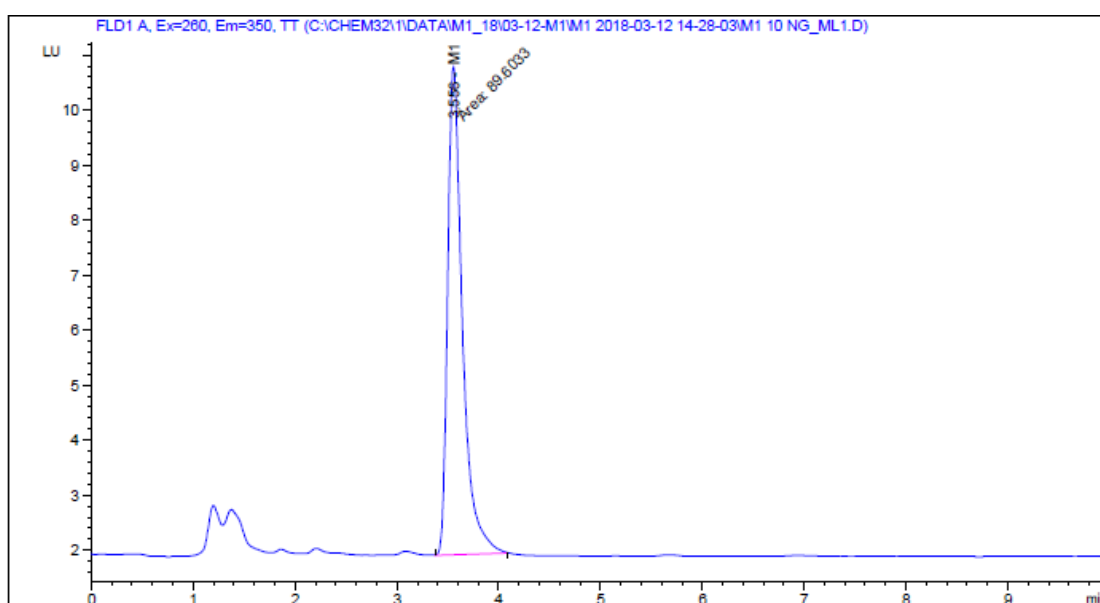
**Tablica 5.** Parametri validacije

Parametar	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati
Selektivnost	Informacija <sup>b</sup>	zadovoljava
Iskorištenje	0,005 µgkg <sup>-1</sup> ⇒ informacija <sup>b</sup>	57,0 %
	0,01 µgkg <sup>-1</sup> ⇒ informacija <sup>b</sup>	58,9 %
	0,05 µgkg <sup>-1</sup> ⇒ informacija <sup>b</sup>	79,1 %
	> 0,05 µgkg <sup>-1</sup> ⇒ 70 do 110 % <sup>a</sup>	102 %
Preciznost - preciznost mjerenja	RSD ≤ 20% <sup>c</sup>	1,92 %
Linearnost	k ≥ 0,999 <sup>b</sup>	0,999
Granica detekcije	≤ 1/3MDK (0,017 µgkg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0,0025 µgkg <sup>-1</sup>
Granica kvantifikacije	≤ 1/2MDK (0,025 µgkg <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0,005 µgkg <sup>-1</sup>

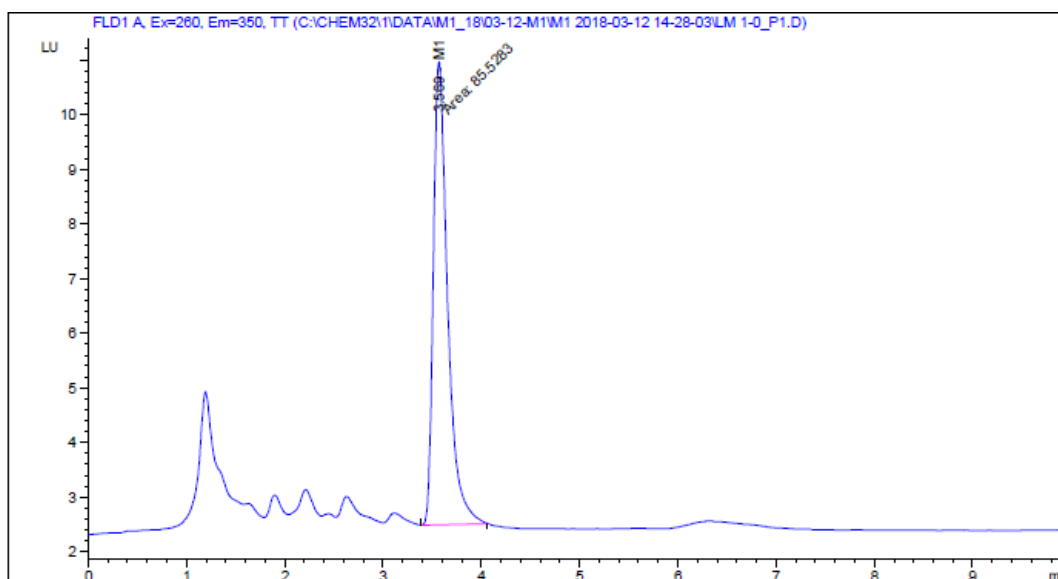
a prema Uredbi komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani

b prema rezultatima validacijskih eksperimenata

c Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (NN 02/05)



a) radna otopina standarda aflatoksina M1 (Rt = 3,556 min)



b) uzorak mlijeka s liofiliziranim mrtvim stanicama nakon 0.-tog sata ( $R_t = 3,569$  min)

**Slika 8.** Kromatogrami standarda aflatoksina M1 (a) i uzorka mlijeka s dodanim BMK (b)

Maseni udio aflatoksina M1 u uzorku,  $w_{M1}$ , određuje se metodom vanjskog standarda uzimajući u obzir srednje iskorištenje postupka pripreme uzorka prema formuli:

$$w_{M1} = \frac{P_U \times C_{RS} \times V_E}{P_{RS} \times m_U \times I} [\mu\text{gkg}^{-1}] \quad [8]$$

$P_U$  - površina pika M1 na kromatogramu uzorka (LU\*s)

$P_{RS}$  - površina pika radnog standarda M1 (LU\*s)

$C_{RS}$  - koncentracija radnog standarda ( $\text{ngmL}^{-1}$ )

$V_E$  - volumen ekstrakta iz kojeg je uzorak injektiran (mL)

$m_U$  - masa uzorka u ekstraktu (g)

$I$  – iskorištenje postupka pripreme

### 3.2.4. Određivanje metala ICP-MS tehnikom

#### 3.2.4.1. Priprema standardnih otopina metala (Cu, Zn, Fe, Se, Hg, Cd, Pb, Al, Mo, Mn)

U odmjernu tikvicu od 50 mL odpipetira se 250  $\mu\text{L}$  certificiranog referentnog materijala. Tikvica se do oznake nadopuni s 2 % nitratnom kiselinom i promućka. Odgovarajućim

razrjeđivanjem tako pripremljene početne otopine standarda pripremaju se standardi nižih koncentracija (radni standardi), koji se koriste za pripremu kalibracijskih otopina. Otopine radnih standarda se pripremaju dnevno prije mjerenja.

#### 3.2.4.2. Vežanje metala pomoću BMK

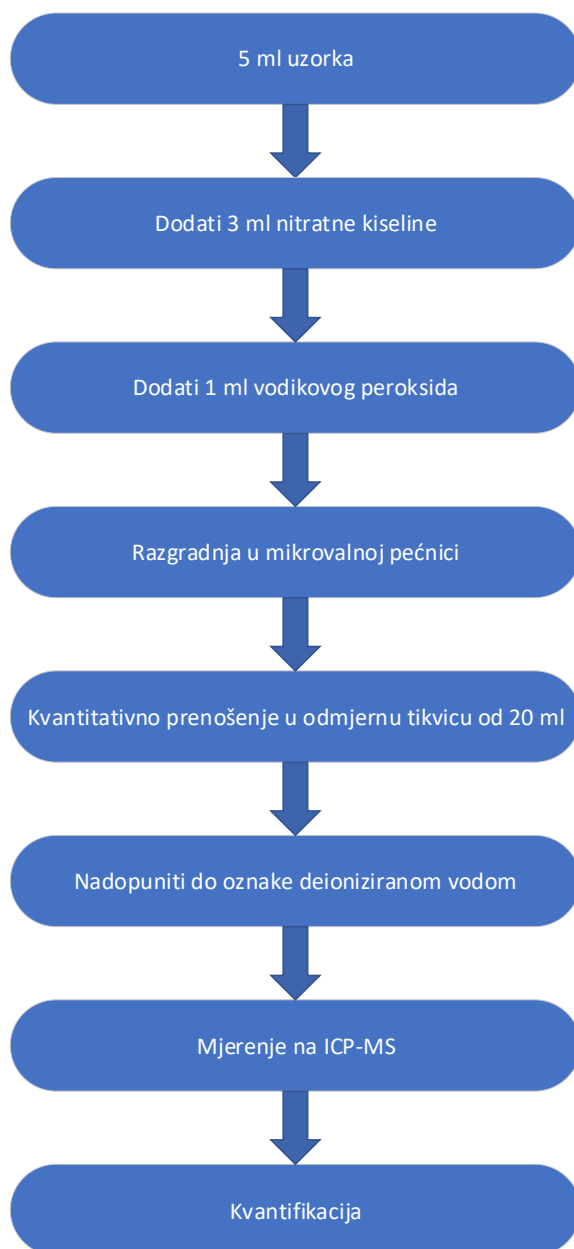
Suspenzije BMK (žive stanice  $10^6$  i  $10^8$  CFU $mL^{-1}$ ) i biomasa toplinski tretiranih stanica, mrtve stanice (1 i 5 mg $mL^{-1}$  mlijeka), su nacijepljene u 5 mL uzorka mlijeka u koje su dodani metali u sljedećim koncentracijama: Hg, Pb, Cd 2  $\mu gL^{-1}$ ; Mo i Se 10  $\mu gL^{-1}$ , Mn i Cu 50  $\mu gL^{-1}$ ; Fe 100  $\mu gL^{-1}$ ; Al 500  $\mu gL^{-1}$ ; Zn 1 mg $L^{-1}$ . Uzorci su inkubirani na 4 °C tijekom 24 sata. Nakon 0-tog, 2., 4. i 24. h inkubacije uzorci su centrifugirani (3000 rpm/ 20 min) i dva puta isprani deioniziranom vodom. Supernatant uzoraka sakupljen nakon centrifugiranja analiziran je na količinu nevezanog metala, koja je određena ICP-MS tehnikom.

#### 3.2.4.3. Vežanje metala $\beta$ -glukanom

$\beta$ -glukan izoliran iz kvasca u koncentracijama 0,01 i 0,005 % (w/v) dodan je u 5 mL uzorka mlijeka u koje su dodani metali u sljedećim koncentracijama: Hg, Pb, Cd 2  $\mu gL^{-1}$ ; Mo i Se 10  $\mu gL^{-1}$ , Mn i Cu 50  $\mu gL^{-1}$ ; Fe 100  $\mu gL^{-1}$ ; Al 500  $\mu gL^{-1}$ ; Zn 1 mg $L^{-1}$ . Uzorci su inkubirani na 4 °C tijekom 24 sata. Nakon 0-tog sata inkubacije uzorci su centrifugirani (3000 rpm/ 20 min) i dva puta isprani destiliranom vodom. Supernatant uzoraka sakupljen nakon centrifugiranja pripremljen je za određivanje koncentracije nevezanog metala ICP-MS tehnikom.

#### 3.2.4.4. Priprema uzoraka mlijeka za određivanje metala ICP-MS tehnikom (Interna uputa RU-1-054, NZJZ dr. Andrija Štampar)

Uzorci mlijeka promućkaju se na vorteksu. Zatim se pripremaju prema shemi na slici 9.

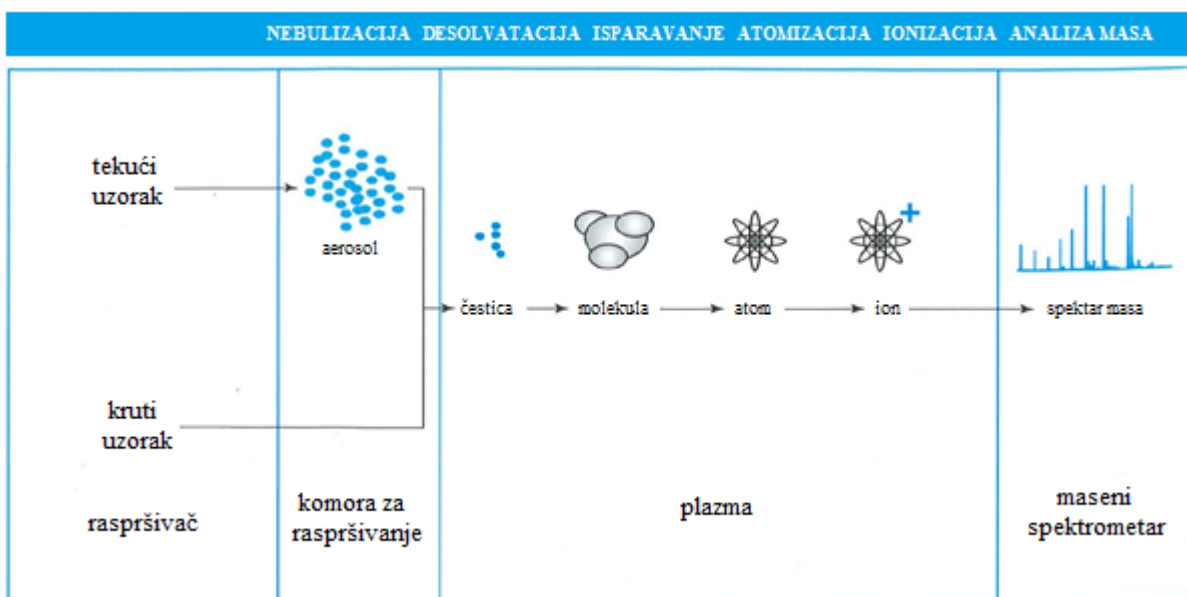


**Slika 9.** Shematski prikaz pripreme uzoraka mlijeka za mjerenje na instrumentu ICP-MS.

#### 3.2.4.5. Uvjeti rada na ICP-MS-u

ICP-MS je danas najbrže rastuća tehnika određivanja elemenata u tragovima. Otopina uzorka se pomoću peristaltičke pumpe uvodi u raspršivač (*nebulizer*). Tamo se raspršuje pomoću struje argona, koji služi kao plin nosioc. Formira se aerosol, koji prolazi kroz komoru za raspršivanje (*spray chamber*) čija je temperatura regulirana Peltier uređajem. U komori se kolizijom uklanjaju veće kapljice uzorka. Manje kapljice uzorka ulaze direktno u cijev

horizontalno postavljene baklje instrumenta (*torch*). Zahvaljujući jako visokoj temperaturi plazme, koja može rasti do 10 000 K, kapljice aerosola prolaze faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i konačno ionizacije kojom se uklanja po jedan elektron svakog atoma. Pozitivno nabijeni ioni proizvedeni u plazmi uvode se u vakuum sustav pomoću konusa (*sample i skimmer cone*). Leće (*lenses*) fokusiraju ione u analizator masa (kvadropol). Tamo se razdvajaju na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ), a detektiraju se pomoću multiplikatora elektrona (*electron multiplier*) (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies) (slika 10).



**Slika 10.** Shematski prikaz procesa u ICP-MS instrumentu od uvođenja uzorka do analize masa (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies)

Metali su identificirani i kvantificirani na uređaju induktivno spregnute plazme s masenim detektorom (ICP-MS, engl. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) (slika 11). Metoda je validirana i akreditirana, čime je dokazana njena prihvatljivost za navedena ispitivanja (tablica 6).

**Tablica 6.** Uvjeti rada na instrumentu ICP-MS

UVJETI NA ICP-MS-u	
Rf-snaga	1180 W
Protok plina plazme	15,0 Lmin <sup>-1</sup>
Protok plina raspršivača	0,94 Lmin <sup>-1</sup>
Protok pomoćnog plina	1,20 Lmin <sup>-1</sup>
Vrijeme integriranja	1500 ms
Točke po piku	20
Broj replika	5



**Slika 11.** Uređaj induktivno spregnute plazme s masenim detektorom (ICP-MS 7800) proizvođača Agilent (NZJZ dr. Andrija Štampar)



### 3.2.4.6. Kvantitativno određivanje metala (SOP-298-053, NZJZ dr. Andrija Štampar)

Pojedinačni standardi korišteni su za pripremu kalibracijskih pravaca (slika 12). Svaki koncentracijski nivo mjeri se uzastopno tri puta. Za kalibracijski pravac svakog elementa postignuta je linearnost od  $\geq 0,999$ . U svrhu osiguranja kvalitete rezultata mjeren je certificirani referentni materijal mlijeka u prahu (ERM BD-150) pripremljen istim postupkom kao i uzorci mlijeka. Iza svakog desetog uzorka mjerena je slijepa proba i standard iz kalibracije. Korišten je interni standard (mix In, Bi, Rh, Sc) za otklanjanje interferencija.

Kalibracijska jednadžba:

$$s_i = a\gamma_i + b \quad [9]$$

gdje je:

- $s_i$  izmjerena vrijednost signala analita u kalibracijskoj otopini
- $a$  nagib kalibracijskog pravca
- $\gamma_i$  masena koncentracija analita u kalibracijskoj otopini ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )
- $b$  odsječak na ordinati kalibracijskog pravca

Ukoliko je provjera kalibracijskog pravca uspješna ( $R^2 \geq 0,995$ ) mjeri se kontrolni standard (CRM ili uzorak preostao iz MLU). Ako su dobivene vrijednosti za CRM (prema certifikatu proizvođača) ili za uzorak preostao iz MLU (prema izvještaju distributera interkalibracije) u granicama prihvatljivosti, pristupa se mjerenju pripremljenih uzoraka. Nakon svakog desetog uzorka radi kontrole stabilnosti kalibracije i rada instrumenta mjeri se kalibracijska slijepa proba (2 %  $\text{HNO}_3$ ) i jedan od standarda iz kalibracijskog pravca.

Masena koncentracija pojedinog metala ( $\omega$ ) računa se prema formuli:

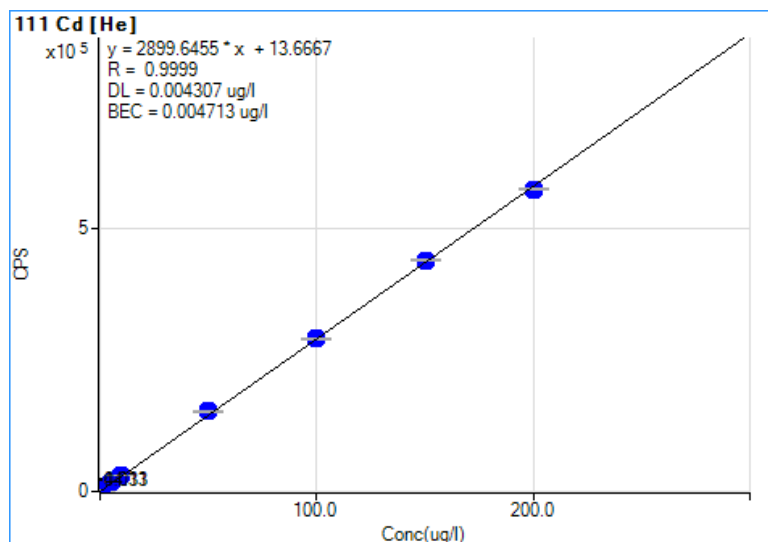
$$\omega = \frac{\gamma \times V_{ot}}{1000 \times V} [\text{mgkg}^{-1}] \quad [10]$$

$\omega$  - masena koncentracija metala u uzorku ( $\text{mgkg}^{-1}$ )

$\gamma$  - koncentracija određivanog metala u pripremljenoj otopini uzorka ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )

$V_{ot}$  - volumen otopine pripremljenog uzorka (mL)

$V$  - volumen uzorka (mL)



**Slika 12.** Kalibracijski pravac kadmija

### 3.2.5. Uklanjanje kompleksa biofiksator- toksikant

#### 3.2.5.1. Uklanjanje kompleksa BMK- AFM1/metali

BMK kao žive ( $10^8$  CFU $mL^{-1}$ ), mrtve (1 mg $mL^{-1}$ ) i liofilizirane stanice (0,5 %) naciepljene su u uzorak mlijeka koji je umjetno kontaminiran s AFM1/metalima, a uzorci su uzimani u 0-tom satu (10-15 minuta nakon homogenizacije uzorka kada su BMK dodane u kontaminirano mlijeko s toksikantima). Uklanjanje kompleksa BMK-toksikant provedeno je metodom membranske filtracije uz upotrebu bakterioloških filtera poroznosti 0,45  $\mu m$ . Parametri filtracije bili su brzina protoka od 0,5 ml $min^{-1}$ . Da bi se dobio učinkovit način uklanjanja kompleksa uzorak je prvo centrifugiran (6000 rpm tijekom 30 minuta), a zatim je uslijedila filtracija. U dobivenim filtratima određena je količina nevezanog AFM1 odnosno metala, a naciepljivanjem uzoraka na MRS agar i određivanjem CFU vrijednosti provjerena je učinkovitost primjenjenih metoda uklanjanja kompleksa.

#### 3.2.5.2. Uklanjanje kompleksa $\beta$ -glukan - AFM1/metali

$\beta$ -glukan izoliran iz kvasca *S. cerevisiae* upotrijebljen je za vezanje toksikanata iz umjetno kontaminiranog mlijeka s AFM1 i/ili metalima. Iz uzoraka je nakon 0-tog sata (10-15 minuta nakon što je  $\beta$ -glukan dodan u uzorak mlijeka s AFM1/metalima i homogeniziran) uklonjen nastali kompleks  $\beta$ -glukan-toksikant centrifugiranjem uzorka pri 3500 rpm u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa (slika 13), maksimalnog volumena 70 mL. Za provjeru

metode da je kompleks uklonjen upotrijebljen je Megazyme enzimski kit (Wicklow, Irska). Enzimskim postupkom upotrebom Megazyme enzimskog kita potvrđeno je da u uzorku mlijeka nakon centrifugiranja u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa nema  $\beta$ -glukana. Koncentracija nevezanog AFM1 određena je HPLC tehnikom, a metala ICP-MS tehnikom.



**Slika 13.** Uklanjanje kompleksa  $\beta$ -glukan-AFM1/metali iz mlijeka centrifugiranjem u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa (vlastita fotografija)

### 3.2.6. Statistička analiza

Svi pokusi provedeni su u triplikatu. Za statističku obradu podataka upotrijebljen je program IBM SPSS Statistics, verzija 25.0, neparametrijski Kruskal Wallis test (jednosmjerna ANOVA), Dunn-Bonferroni test, prema kojem se statistički značajnim smatra rezultat gdje je  $P < 0,05$ . Uspoređene su srednje vrijednosti vezanja AFM1 BMK/ $\beta$ -glukanom te metala  $\beta$ -glukanom i statistički značajne razlike između biofiksatora i primijenjenih postupaka centrifugiranja i filtracije na učinkovitost uklanjanja nastalog kompleksa biofiksator-toksikant iz mlijeka.

Što se tiče statističke obrade podataka BMK-metali, priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone, a razlike između nezavisnih skupina su analizirane Mann-Whitney U testom. Razlike u dinamici pojedinih vrijednosti (razlika u ponavljanim mjerenjima vezanja metala tijekom promatranog vremenskog razdoblja unutar 24 sata) analizirana je

Friedmanovim testom za svaku ispitivanu skupinu te su grafički prikazani pojedini medijani svakog mjerenja uz odgovarajuće interkvartilne raspone (rasponi vrijednosti između 25. i 75. centile). P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. Z vrijednosti su usko vezane uz P vrijednost. Naime, ako je apsolutna vrijednost dobivene Z vrijednosti veća od 1,96, onda je razlika značajna. U analizi se koristila licencirana programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).

## **4. REZULTATI**

Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti optimalne parametre za smanjenje i/ili uklanjanje AFM1 i metala iz mlijeka pomoću biofiksatora; bakterija mliječne kiseline i  $\beta$ -glukana, kao i ispitati učinkovitost metoda filtracije i centrifugiranja za uklanjanje nastalog kompleksa toksikant-biofiksator. Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 14-54 i u tablicama 7-37.

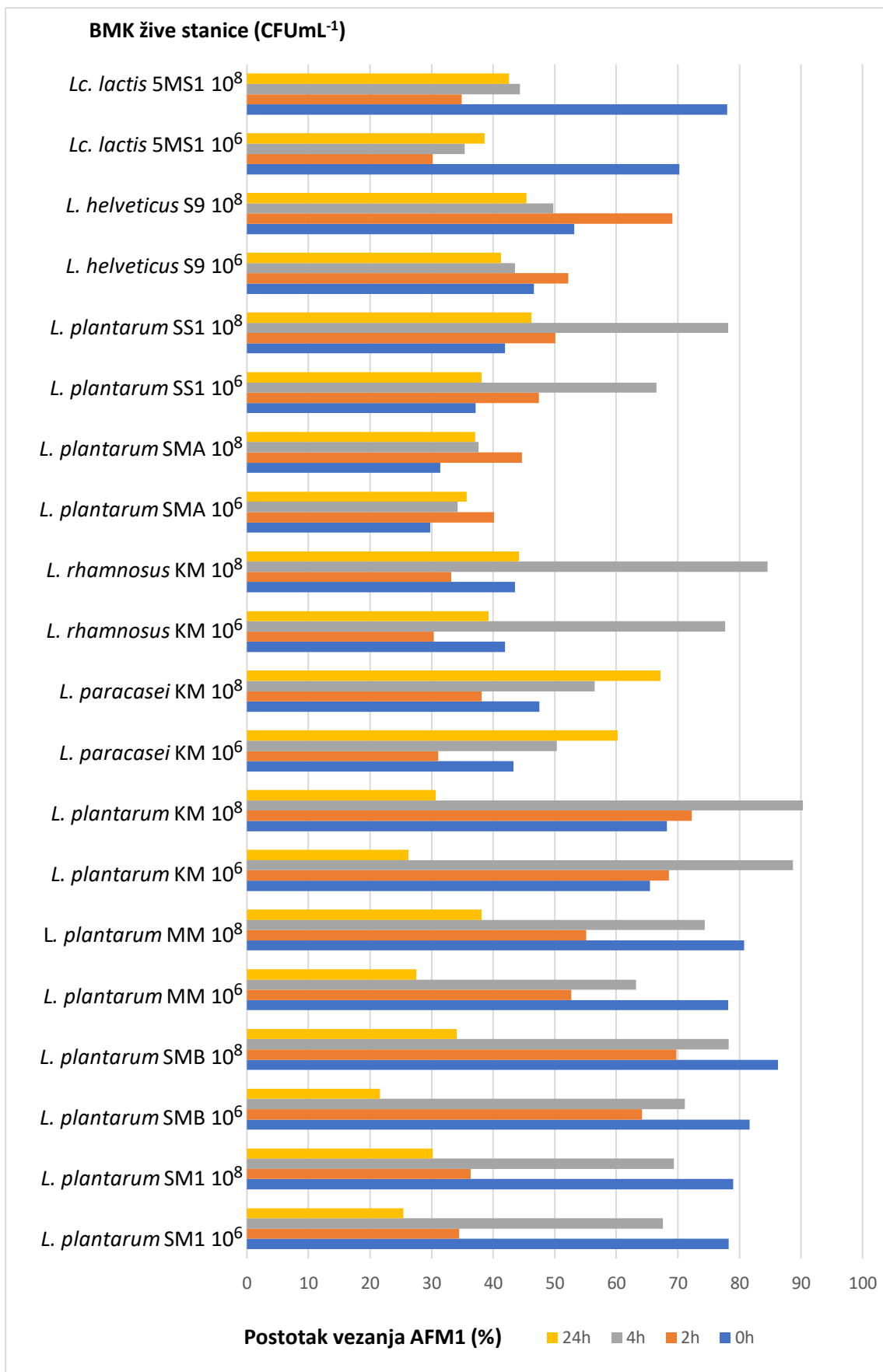
#### **4.1. Vežanje AFM1 pomoću BMK**

Za istraživanje sposobnosti vežanja AFM1 u mlijeku odabrano je deset sojeva BMK. Prilikom provođenja eksperimenata korištene su: suspenzija živih stanica BMK u koncentraciji  $10^6$  i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup>, biomasa toplinski tretiranih stanica u količini od 1 i 5 mgmL<sup>-1</sup> mlijeka i liofilizirane stanice u koncentraciji 0,5 i 1,0 % (w/v). Sojevi BMK su dodani u uzorke mlijeka umjetno kontaminiranih s AFM1 konačne koncentracije 0,01; 0,05 i 0,5  $\mu$ gL<sup>-1</sup>. Postotak vezanog AFM1 određivan je HPLC tehnikom nakon 0-tog, 2., 4. i 24. h inkubacije, a rezultati istraživanja su prikazani na slikama 14-19.

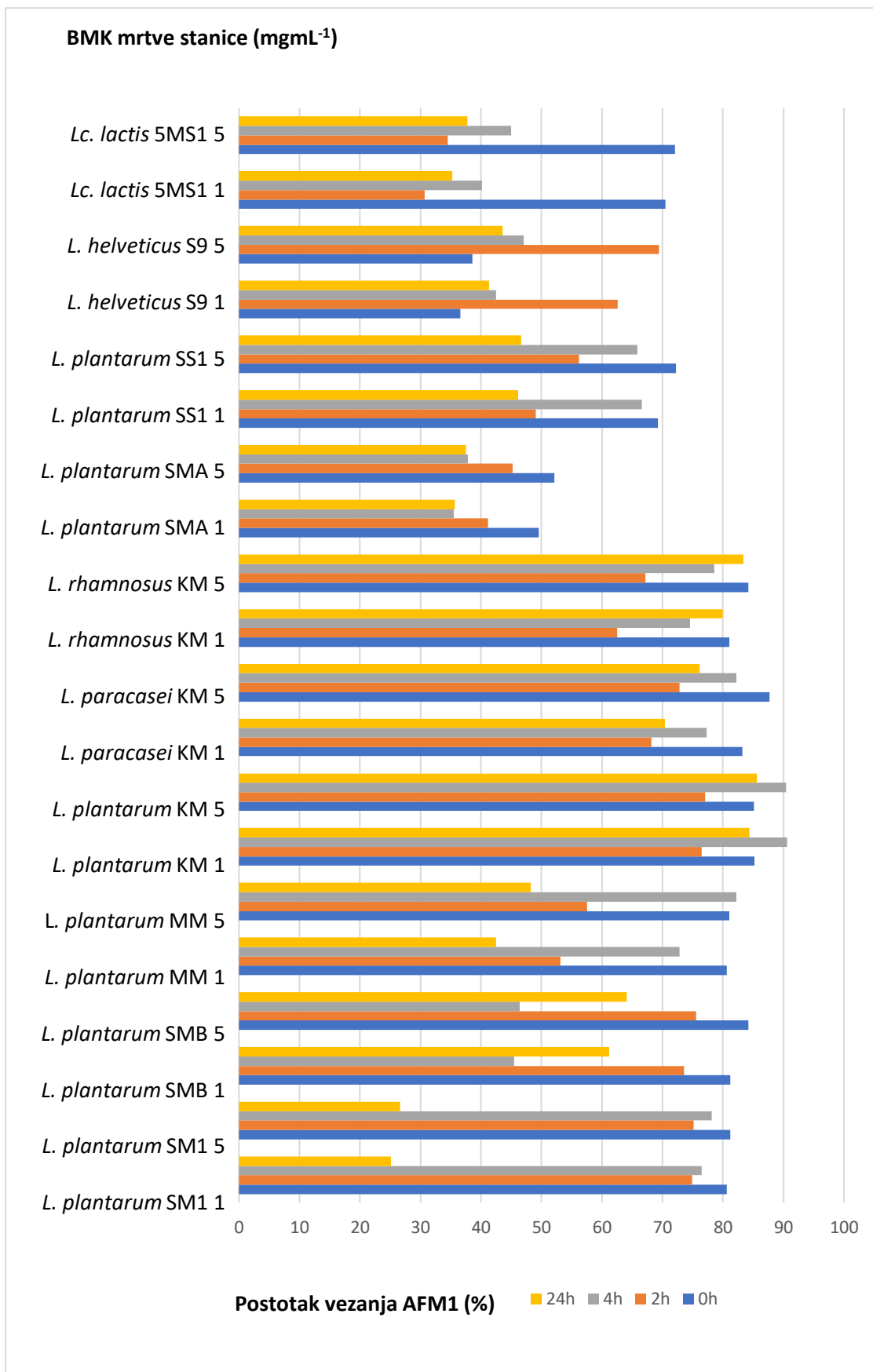
U svim je uzorcima mlijeka s dodanim AFM1 od 0,01  $\mu$ gL<sup>-1</sup> i nacijepjenim živim ( $10^6$  i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup>), mrtvim (1 i 5 mg biomase/mL) i liofiliziranim stanicama BMK u količini 0,5 i 1,0 % (w/v) tijekom 24 sata, količina nevezanog AFM1 bila <0,010  $\mu$ gkg<sup>-1</sup>.

Na slikama 14-16 prikazani su rezultati utjecaj vremena inkubacije živih, mrtvih i liofiliziranih stanica BMK na vežanje AFM1 u koncentraciji od 0,05  $\mu$ gL<sup>-1</sup>.

Na slikama 17-19 prikazani su rezultati utjecaj vremena inkubacije živih, mrtvih i liofiliziranih stanica BMK na vežanje AFM1 u koncentraciji od 0,5  $\mu$ gL<sup>-1</sup>.

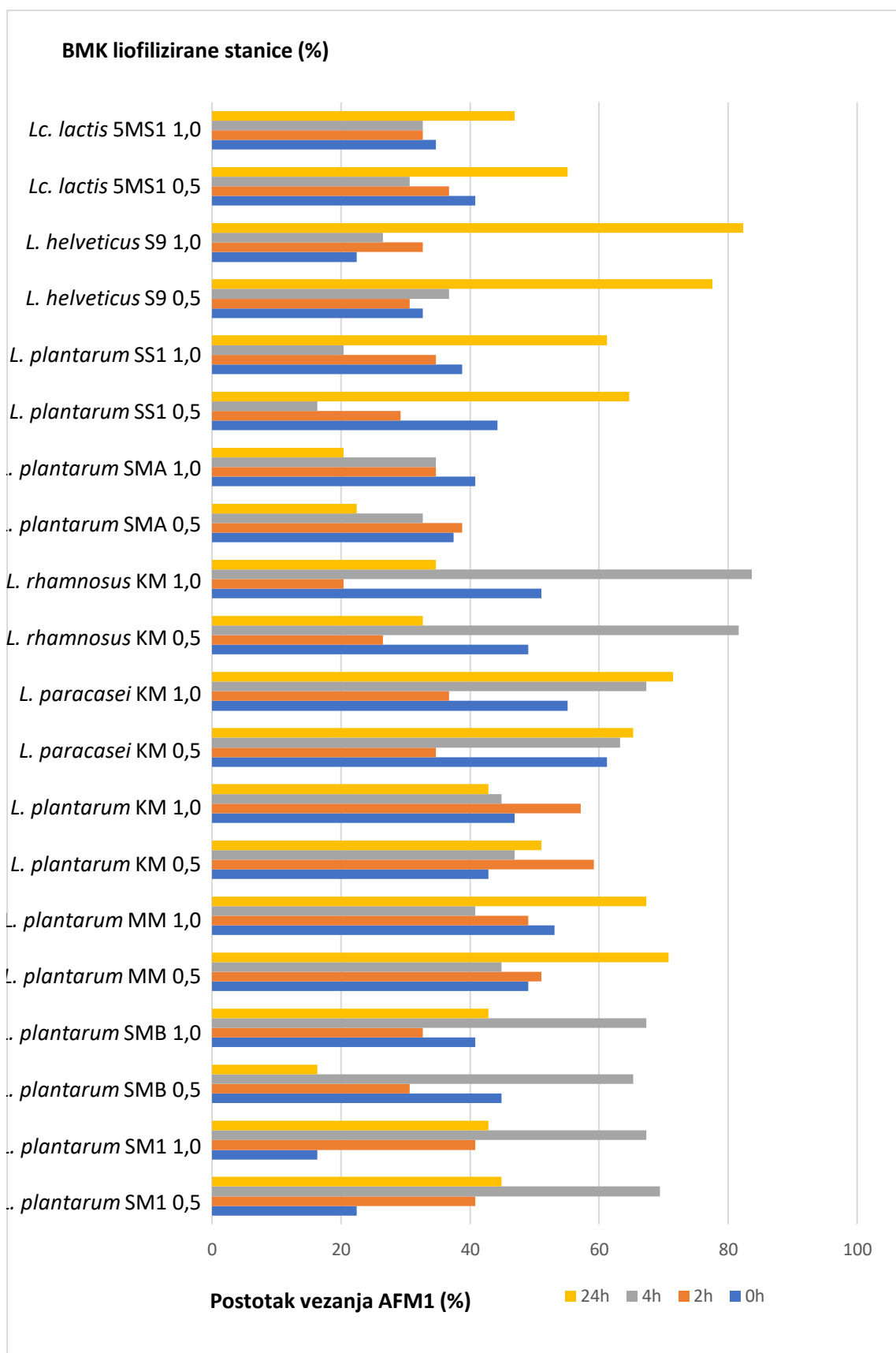


**Slika 14.** Utjecaj vremena inkubacije i živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta na vezanje AFM1 (0,05  $\mu\text{gL}^{-1}$ )

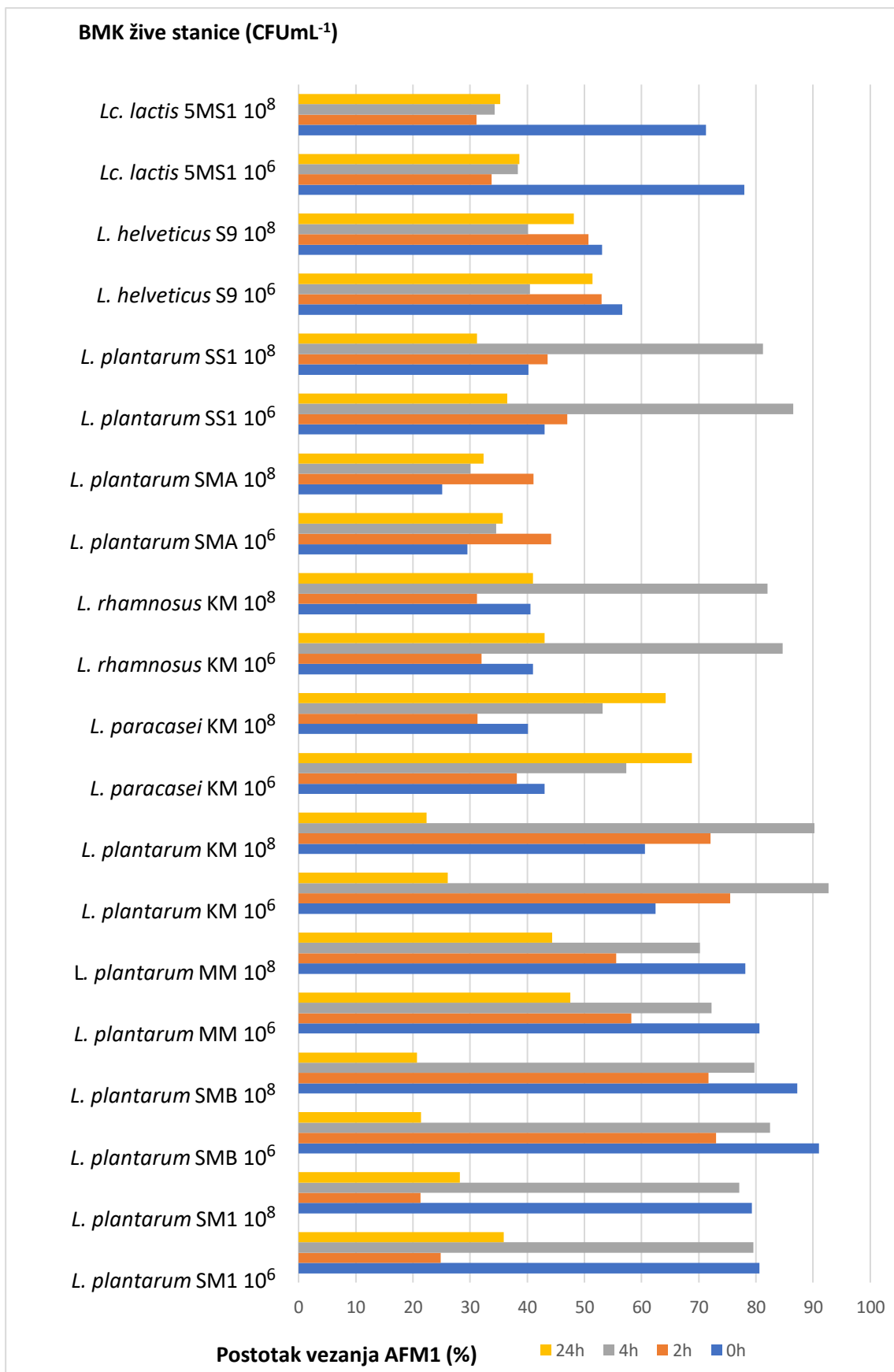


**Slika 15.** Utjecaj vremena inkubacije i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta na vezanje AFM1 (0,05 µg<sup>-1</sup>)

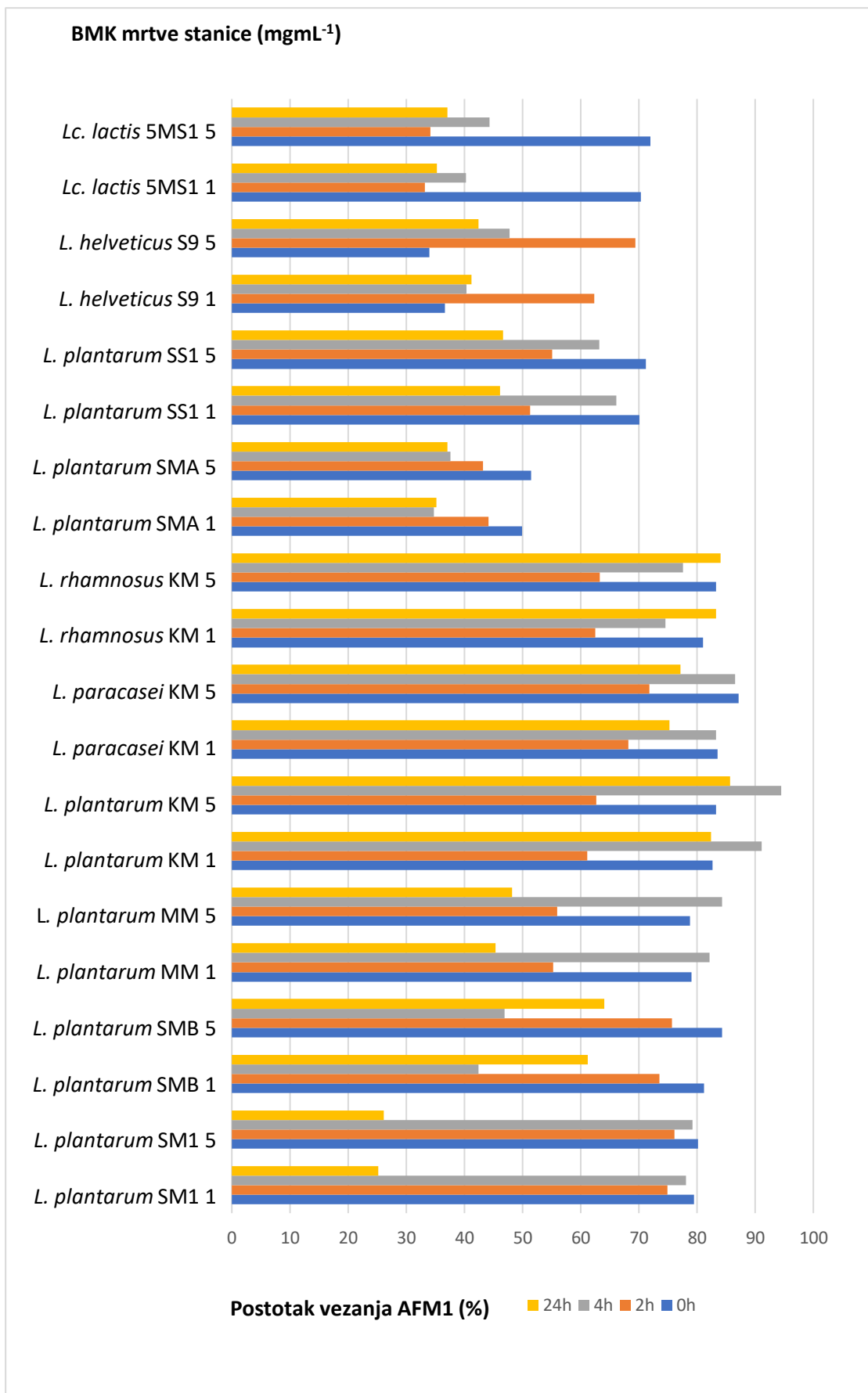




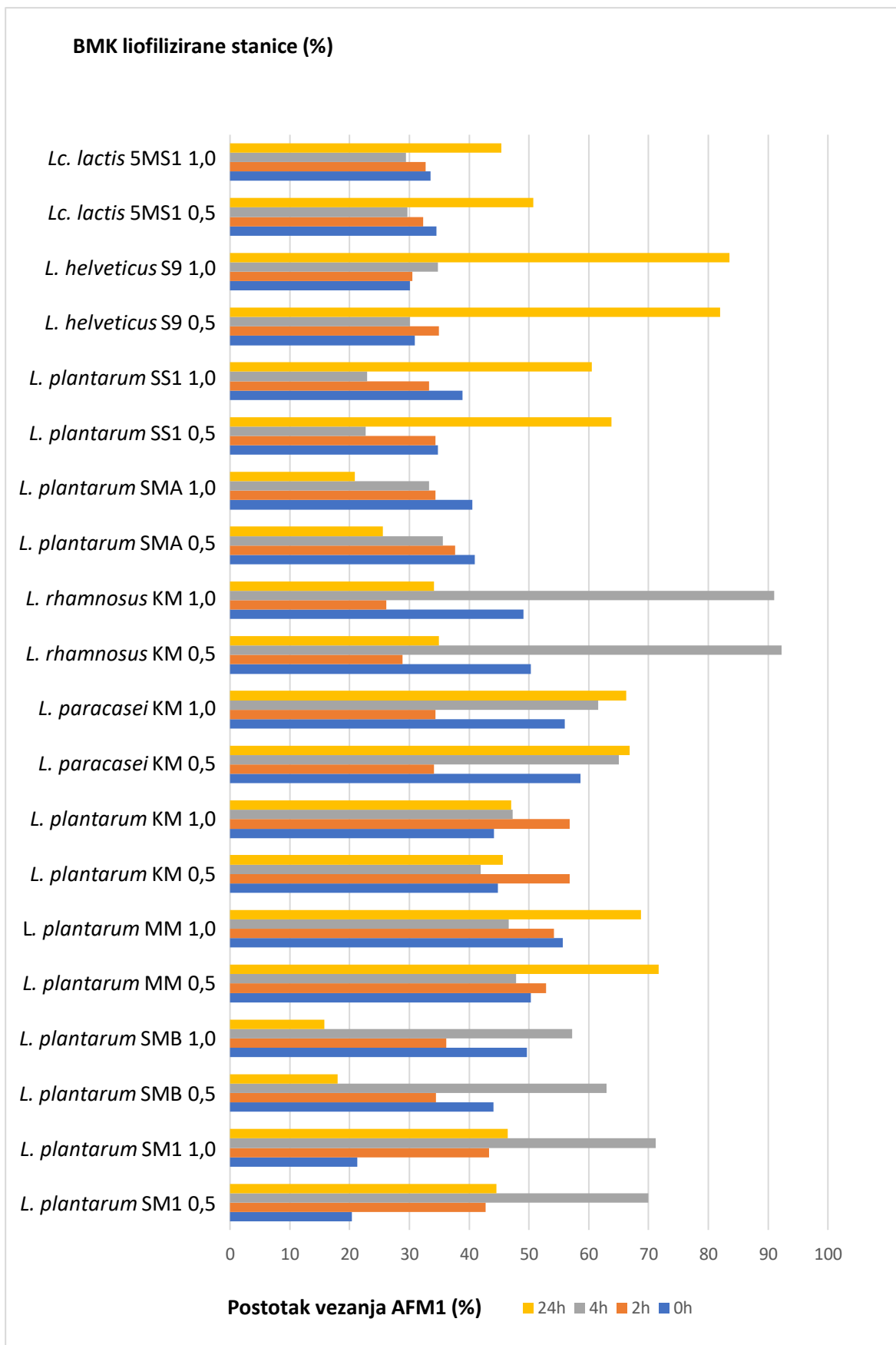
**Slika 16.** Utjecaj vremena inkubacije i liofiliziranih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta na vezanje AFM1 ( $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$ )



**Slika 17.** Utjecaj vremena inkubacije i živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta na vezanje AFM1 (0,5 μg<sub>L</sub><sup>-1</sup>)



**Slika 18.** Utjecaj vremena inkubacije i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta na vezanje AFM1 (0,5 µg<sup>L</sup><sup>-1</sup>)

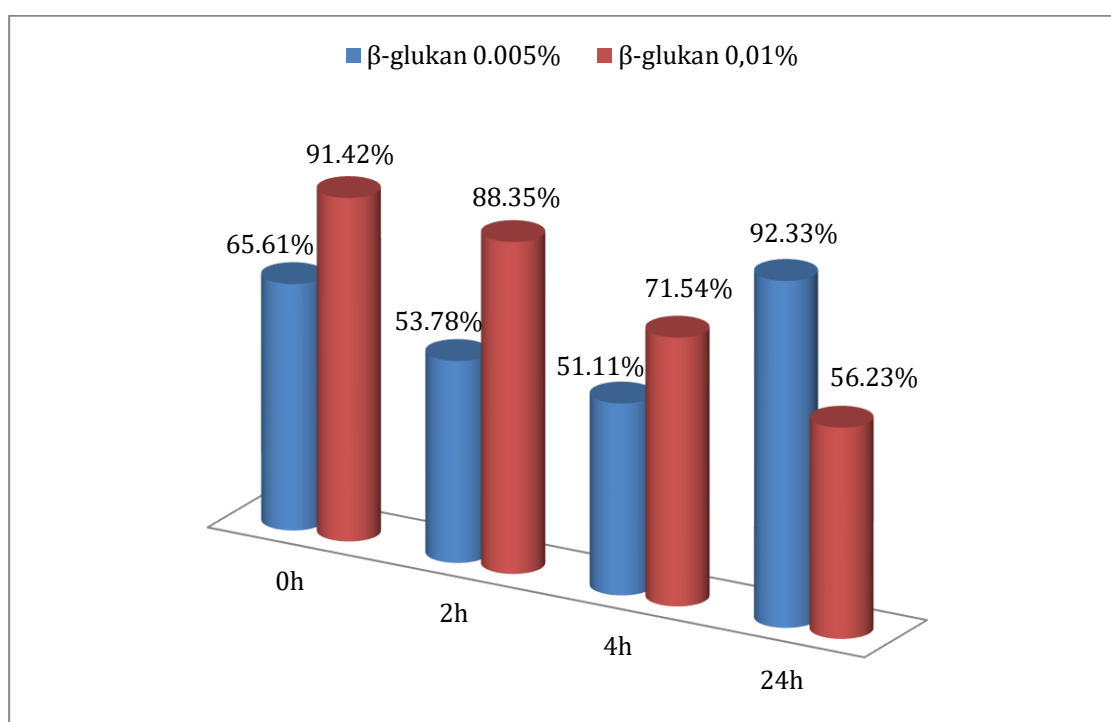


**Slika 19.** Utjecaj vremena inkubacije i liofiliziranih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta na vezanje AFM1 ( $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ )

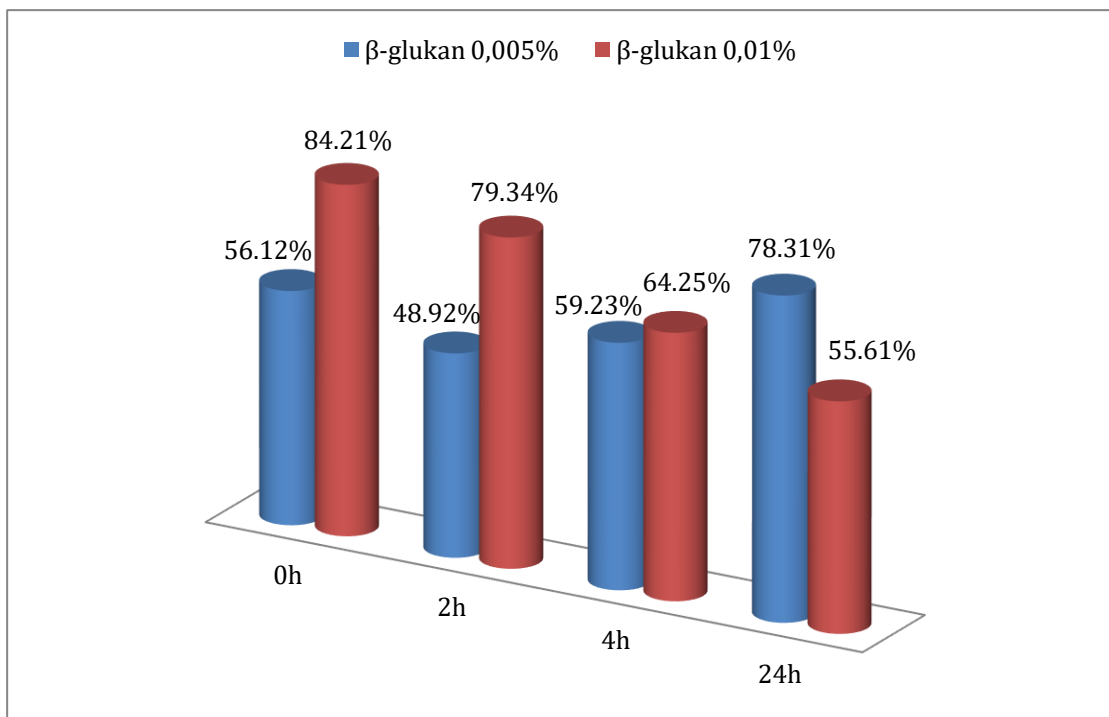
## 4.2. Vezanje AFM1 $\beta$ -glukanom

Za istraživanje sposobnosti vezanja AFM1 u mlijeku  $\beta$ -glukanom korišten je  $\beta$ -glukan izoliran iz kvasca u koncentracijama 0,01 i 0,005 % (w/v). Uzorci mlijeka su umjetno kontaminirani AFM1 do konačne koncentracije 0,01; 0,05 i 0,5  $\mu\text{gkg}^{-1}$ . Postotak vezanog AFM1 određivan je HPLC tehnikom nakon 0-tog, 2., 4. i 24. h inkubacije, a rezultati istraživanja su prikazani na slikama 20-21.

U pokusima s dodanim AFM1 od 0,01  $\mu\text{gkg}^{-1}$  i dodanim  $\beta$ -glukanom u obje istraživane koncentracije tijekom 24 sata, koncentracija nevezanog AFM1 je bila  $<0,010 \mu\text{gkg}^{-1}$ .



**Slika 20.** Postotak vezanja AFM1 ( $0,5 \mu\text{gkg}^{-1}$ )  $\beta$ -glukanom (0,01 i 0,005 %) izoliranim iz kvasca



**Slika 21.** Postotak vezanja AFM1 ( $0,05 \mu\text{gkg}^{-1}$ )  $\beta$ -glukanom (0,01 i 0,005 %) izoliranim iz kvasca

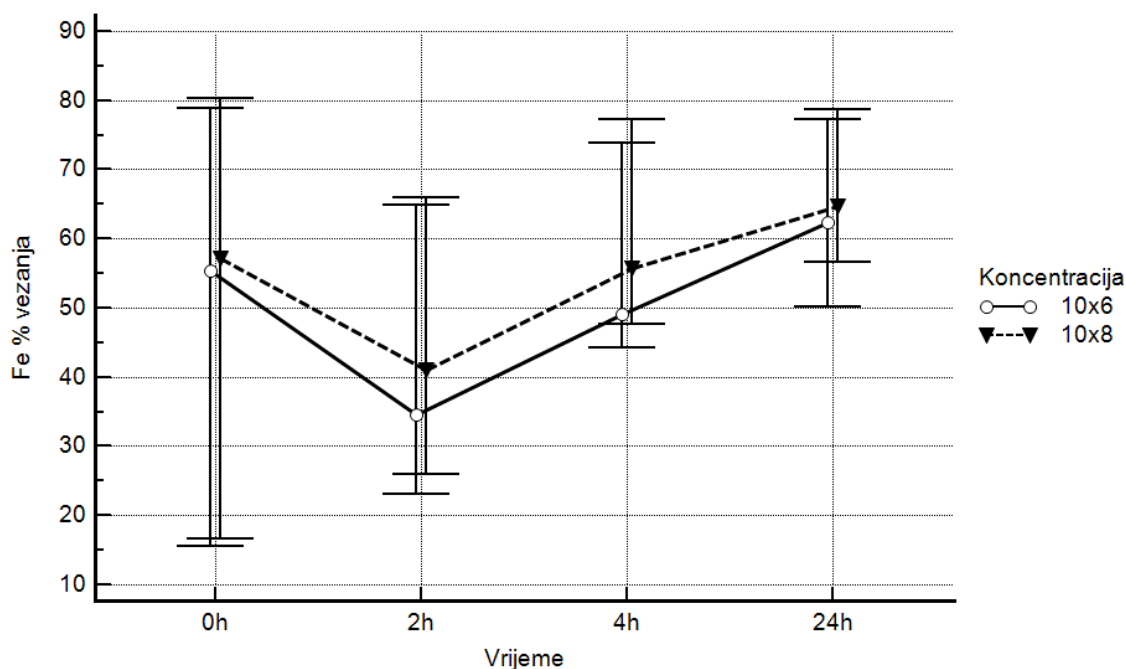
#### 4.3. Vežanje metala pomoću BMK

Za ispitivanje sposobnosti vežanja metala (Cu, Zn, Fe, Se, Hg, Cd, Pb, Al, Mo, Mn) u mlijeku odabrano je deset sojeva BMK. Prilikom provođenja eksperimenata korištene su: suspenzija živih stanica BMK u koncentraciji  $10^6$  i  $10^8$  CFU $\text{mL}^{-1}$  i biomasa toplinski tretiranih stanica u količini od 1 i 5 mg $\text{mL}^{-1}$  mlijeka. Uzorci mlijeka su umjetno kontaminirani metalima u sljedećim koncentracijama: Hg, Pb, Cd  $2 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Mo i Se  $10 \mu\text{gL}^{-1}$ , Mn i Cu  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Fe  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Al  $500 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Zn  $1 \text{mgL}^{-1}$ . Postotak vezanih metala određivan je ICP-MS tehnikom nakon 0-tog, 2., 4. i 24. h inkubacije. Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 22-51 i u tablicama 7-36.

**Tablica 7.** Razlike u udjelu vezanja Fe<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Fe							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	10 <sup>6</sup>	48,68%	31,93%	13,38%	79,97%	15,33%	55,33%	79,10%
	10 <sup>8</sup>	50,37%	31,94%	14,45%	82,24%	16,39%	57,20%	80,64%
2	10 <sup>6</sup>	42,63%	24,07%	13,40%	81,06%	22,94%	34,61%	65,63%
	10 <sup>8</sup>	45,96%	23,21%	16,56%	82,35%	25,53%	41,01%	66,95%
4	10 <sup>6</sup>	52,43%	26,79%	6,56%	87,13%	37,29%	49,02%	75,38%
	10 <sup>8</sup>	56,53%	26,93%	7,71%	90,02%	40,50%	55,72%	78,88%
24	10 <sup>6</sup>	55,44%	27,82%	6,83%	83,11%	39,45%	62,31%	77,46%
	10 <sup>8</sup>	59,52%	26,14%	13,39%	86,63%	46,01%	64,77%	79,04%

	Mann-Whitney U	Z	P
Fe % vezanja 0h	39,000	-0,832	0,406
Fe % vezanja 2h	41,000	-0,680	0,496
Fe % vezanja 4h	39,000	-0,832	0,406
Fe % vezanja 24h	39,000	-0,832	0,406

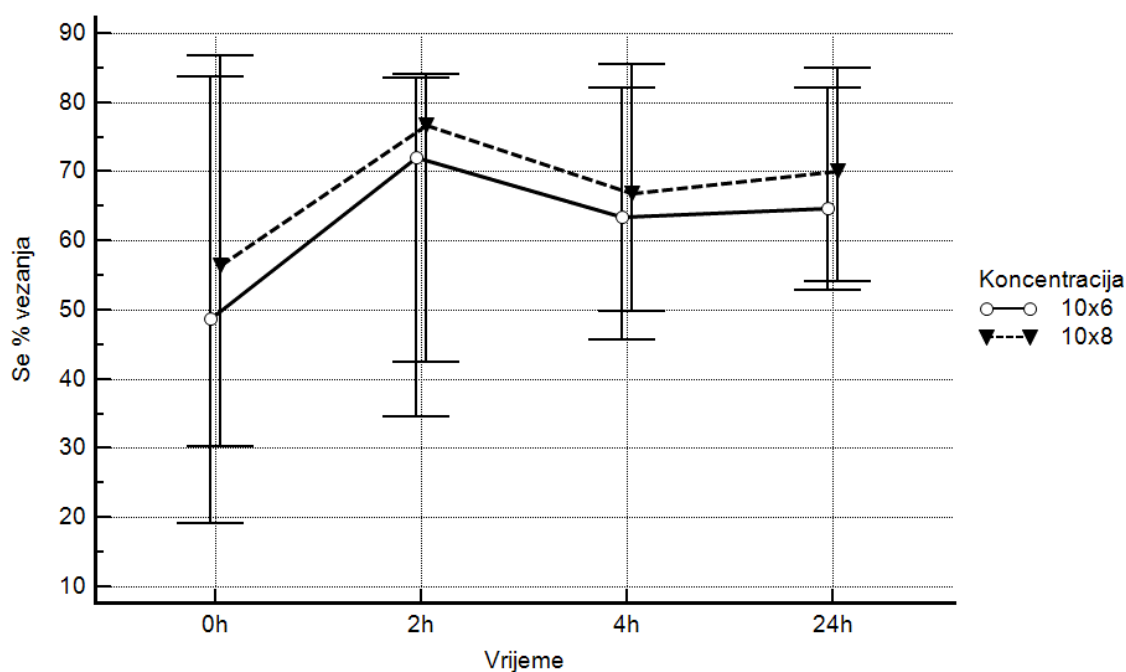


**Slika 22.** Razlike u dinamici vezanja Fe<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,472 ; i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,451) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 8.** Razlike u udjelu vezanja  $\text{Se}^{4+}$  obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Se							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	$10^6$	49,84%	34,04%	7,37%	84,92%	18,55%	48,66%	83,68%
	$10^8$	55,60%	31,76%	11,41%	88,13%	28,30%	56,47%	86,80%
2	$10^6$	58,11%	30,08%	5,86%	86,19%	30,91%	72,01%	83,74%
	$10^8$	61,70%	29,73%	6,70%	87,71%	37,29%	76,66%	84,90%
4	$10^6$	59,38%	25,66%	17,29%	87,15%	39,31%	63,44%	82,50%
	$10^8$	62,96%	24,83%	19,81%	87,91%	44,48%	66,88%	85,62%
24	$10^6$	64,02%	18,87%	28,55%	82,92%	50,91%	64,70%	82,27%
	$10^8$	68,19%	17,99%	33,93%	85,66%	52,59%	70,16%	85,01%

	Mann-Whitney U	Z	P
Se % vezanja	34,000	-1,209	0,226
Se % vezanja 2h	42,000	-0,605	0,545
Se % vezanja 4h	42,000	-0,605	0,545
Se % vezanja 24h	37,000	-0,983	0,326



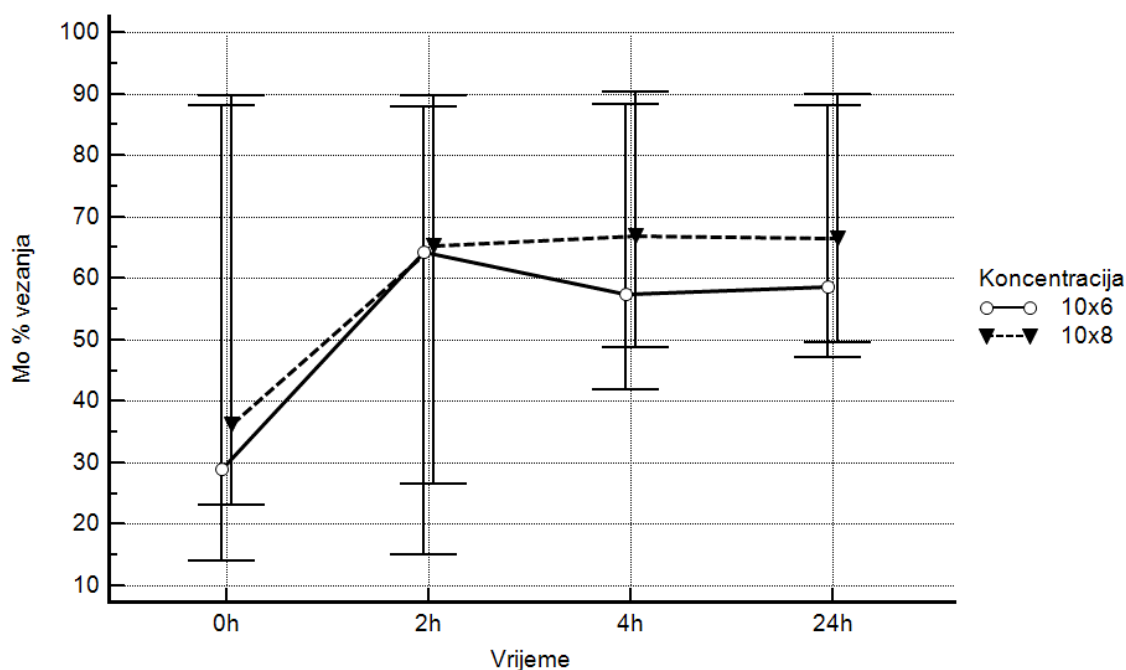
**Slika 23.** Razlike u dinamici vezanja  $\text{Se}^{4+}$  obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,971 ; i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,948) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test



**Tablica 9.** Razlike u udjelu vezanja Mo<sup>4+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Mo							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	10 <sup>6</sup>	45,74%	37,36%	7,06%	88,80%	13,14%	28,89%	88,19%
	10 <sup>8</sup>	50,51%	35,04%	11,27%	91,19%	20,79%	36,29%	89,82%
2	10 <sup>6</sup>	54,26%	35,89%	13,50%	90,13%	14,95%	64,29%	87,97%
	10 <sup>8</sup>	58,27%	32,56%	18,70%	91,10%	24,75%	65,23%	89,65%
4	10 <sup>6</sup>	60,87%	28,73%	15,67%	95,51%	38,72%	57,45%	89,32%
	10 <sup>8</sup>	67,47%	24,61%	29,25%	96,25%	45,94%	66,95%	91,24%
24	10 <sup>6</sup>	62,64%	25,25%	16,65%	88,32%	44,33%	58,69%	88,11%
	10 <sup>8</sup>	67,97%	22,03%	27,49%	90,54%	49,29%	66,46%	89,96%

	Mann-Whitney U	Z	P
Mo % vezanja	36,000	-1,058	0,290
Mo % vezanja 2h	37,000	-0,983	0,326
Mo % vezanja 4h	42,000	-0,605	0,545
Mo % vezanja 24h	36,000	-1,058	0,290

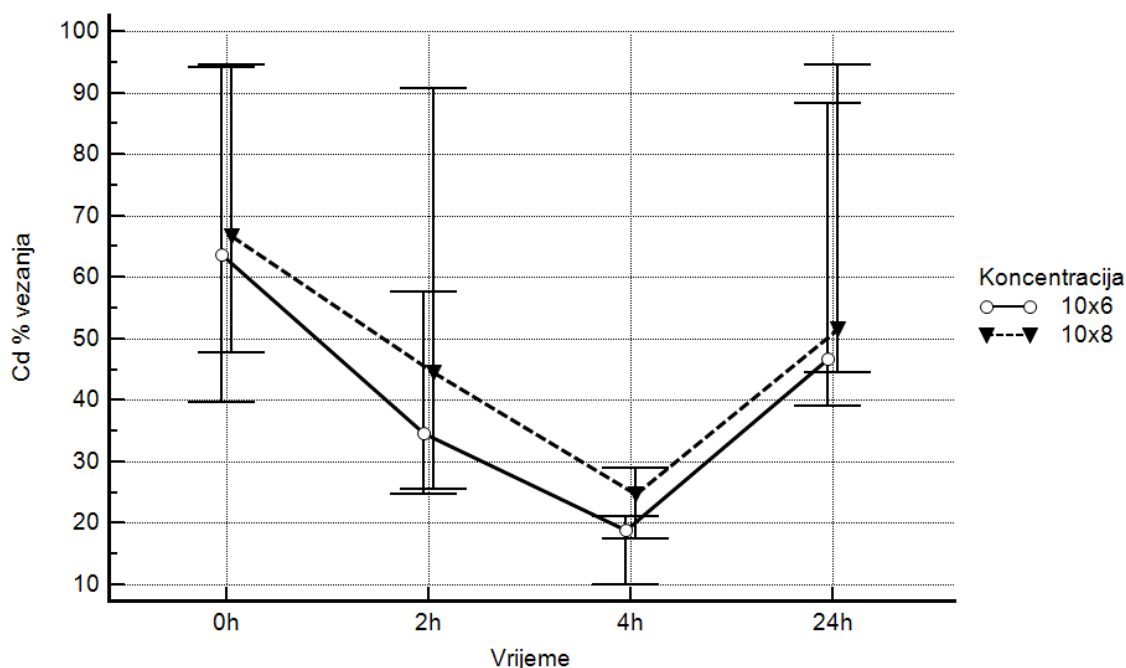


**Slika 24.** Razlike u dinamici vezanja Mo<sup>4+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,118 ; i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,106) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 10.** Razlike u udjelu vezanja Cd<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Cd							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	10 <sup>6</sup>	61,99%	28,74%	12,90%	95,55%	37,04%	63,65%	94,21%
	10 <sup>8</sup>	65,43%	26,22%	22,25%	96,25%	43,68%	66,65%	94,68%
2	10 <sup>6</sup>	44,74%	26,74%	12,90%	96,90%	24,18%	34,53%	63,43%
	10 <sup>8</sup>	53,07%	29,77%	18,60%	97,45%	25,19%	44,45%	91,11%
4	10 <sup>6</sup>	30,65%	34,80%	4,00%	98,15%	9,04%	18,98%	39,10%
	10 <sup>8</sup>	35,64%	32,77%	7,95%	98,50%	15,90%	24,75%	45,31%
24	10 <sup>6</sup>	57,80%	25,02%	34,90%	95,60%	38,63%	46,65%	90,04%
	10 <sup>8</sup>	62,28%	24,38%	35,70%	97,00%	44,23%	51,65%	94,94%

	Mann-Whitney U	Z	P
Cd % vezanja	43,000	-0,529	0,597
Cd % vezanja 2h	41,000	-0,680	0,496
Cd % vezanja 4h	31,500	-1,399	0,162
Cd % vezanja 24h	37,000	-0,983	0,326

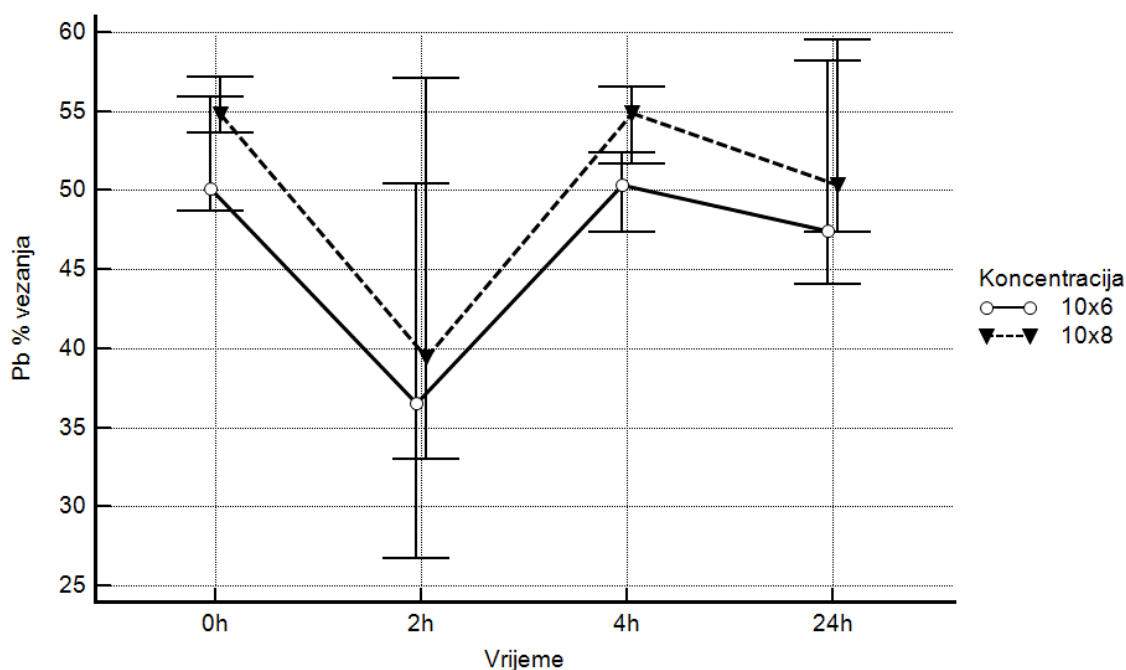


**Slika 25.** Razlike u dinamici vezanja Cd<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,019 ; i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,029) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 11.** Razlike u udjelu vezanja Pb<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Pb							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	10 <sup>6</sup>	51,62%	6,60%	40,14%	64,32%	48,44%	50,12%	56,49%
	10 <sup>8</sup>	55,82%	7,26%	41,29%	69,92%	53,45%	54,84%	58,48%
2	10 <sup>6</sup>	40,48%	15,45%	23,06%	69,07%	26,58%	36,57%	52,06%
	10 <sup>8</sup>	44,97%	15,21%	25,66%	70,30%	32,90%	39,41%	58,09%
4	10 <sup>6</sup>	50,22%	2,92%	46,30%	54,38%	47,22%	50,38%	52,63%
	10 <sup>8</sup>	54,75%	3,80%	49,63%	60,78%	51,30%	54,92%	57,42%
24	10 <sup>6</sup>	47,97%	11,71%	29,73%	65,91%	40,58%	47,43%	58,26%
	10 <sup>8</sup>	51,93%	11,60%	30,55%	70,04%	45,92%	50,36%	61,35%

	Mann-Whitney U	Z	P
Pb % vezanja	29,000	-1,587	0,112
Pb % vezanja 2h	39,000	-0,832	0,406
Pb % vezanja 4h	16,000	-2,570	0,010
Pb % vezanja 24h	37,000	-0,983	0,326

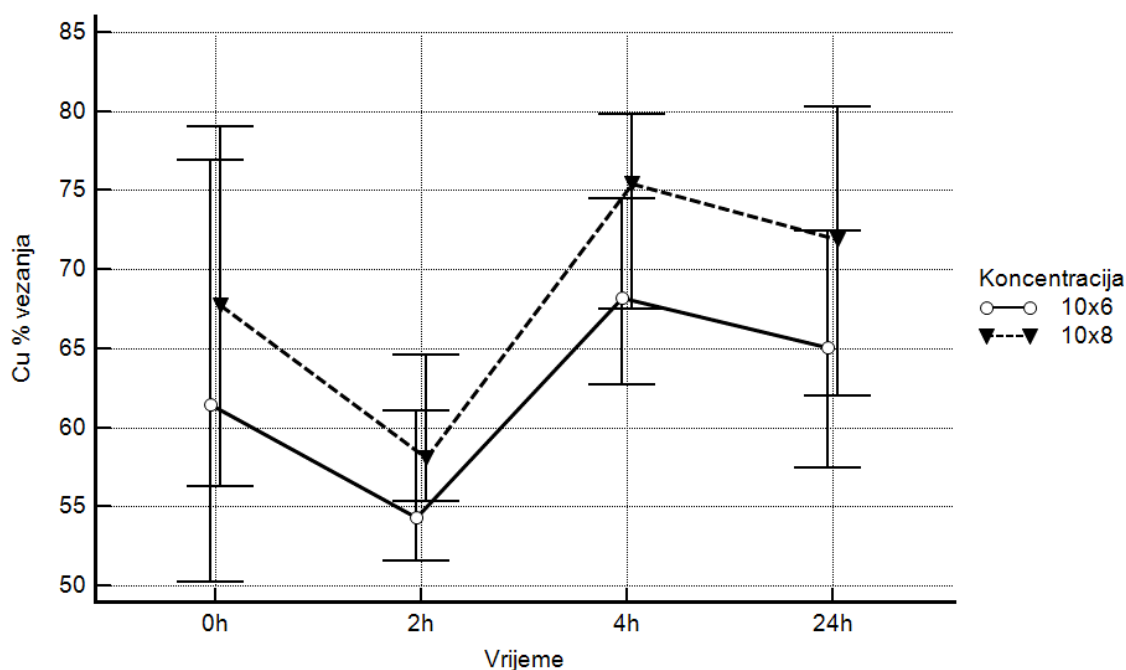


**Slika 26.** Razlike u dinamici vezanja Pb<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,564 ; i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,506) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 12.** Razlike u udjelu vezanja  $\text{Cu}^{2+}$  obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Cu							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	$10^6$	63,63%	12,49%	49,22%	81,85%	50,23%	61,48%	77,23%
	$10^8$	67,97%	11,29%	51,86%	83,49%	55,85%	67,72%	79,64%
2	$10^6$	57,45%	11,82%	42,23%	81,30%	50,48%	54,28%	64,17%
	$10^8$	61,44%	12,44%	44,88%	87,13%	54,47%	58,08%	67,90%
4	$10^6$	68,42%	9,66%	53,77%	84,15%	61,40%	68,21%	75,68%
	$10^8$	73,76%	10,38%	57,44%	88,96%	65,65%	75,44%	81,14%
24	$10^6$	64,39%	9,29%	51,83%	76,67%	56,12%	65,10%	73,36%
	$10^8$	70,37%	9,48%	56,87%	80,80%	60,88%	71,91%	80,32%

	Mann-Whitney U	Z	P
Cu % vezanja	38,000	-0,907	0,364
Cu % vezanja 2h	36,000	-1,058	0,290
Cu % vezanja 4h	33,500	-1,248	0,212
Cu % vezanja 24h	34,000	-1,210	0,226

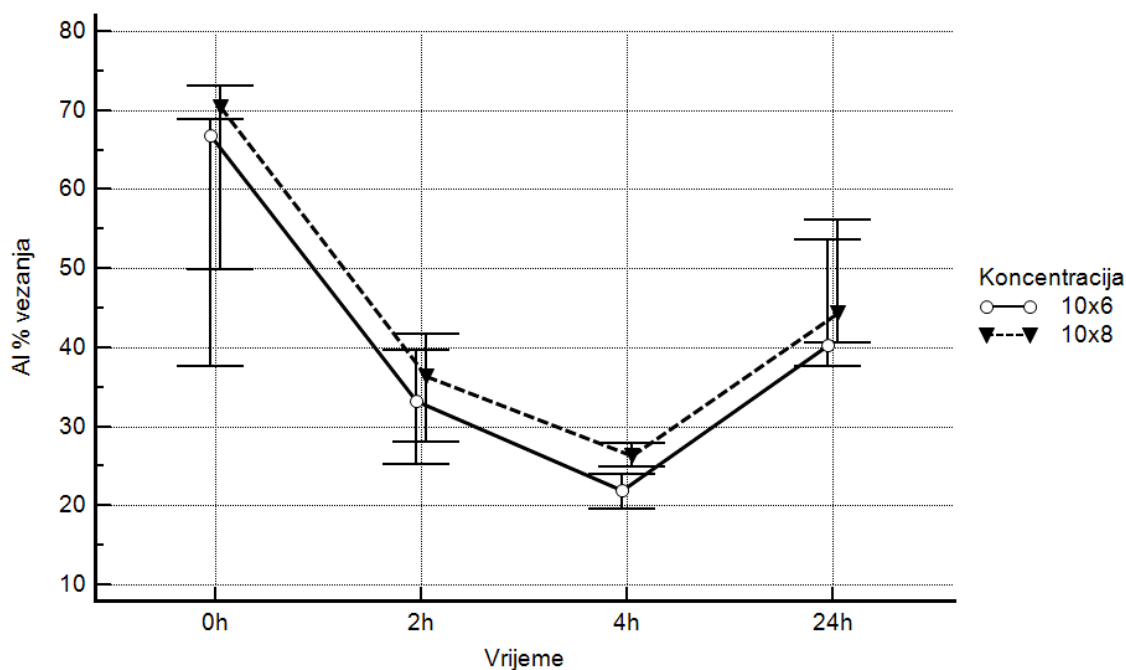


**Slika 27.** Razlike u dinamici vezanja  $\text{Cu}^{2+}$  obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,197 ; i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,197) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 13.** Razlike u udjelu vezanja Al<sup>3+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Al							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	10 <sup>6</sup>	54,18%	22,36%	10,13%	72,42%	34,09%	66,79%	69,13%
	10 <sup>8</sup>	60,27%	18,35%	28,76%	74,96%	44,59%	70,43%	73,42%
2	10 <sup>6</sup>	30,99%	10,57%	10,13%	44,91%	24,28%	33,16%	40,40%
	10 <sup>8</sup>	33,87%	10,28%	14,07%	47,23%	27,02%	36,29%	42,60%
4	10 <sup>6</sup>	22,36%	3,20%	18,63%	29,00%	19,43%	21,94%	24,34%
	10 <sup>8</sup>	26,61%	3,04%	22,36%	33,35%	24,61%	26,39%	27,95%
24	10 <sup>6</sup>	43,42%	8,72%	30,95%	55,84%	37,52%	40,21%	54,11%
	10 <sup>8</sup>	46,78%	8,68%	33,39%	59,24%	40,56%	44,31%	56,74%

	Mann-Whitney U	Z	P
Al % vezanja	31,000	-1,436	0,151
Al % vezanja 2h	4<0,001	-0,756	0,450
Al % vezanja 4h	16,000	-2,570	0,010
Al % vezanja 24h	33,000	-1,285	0,199

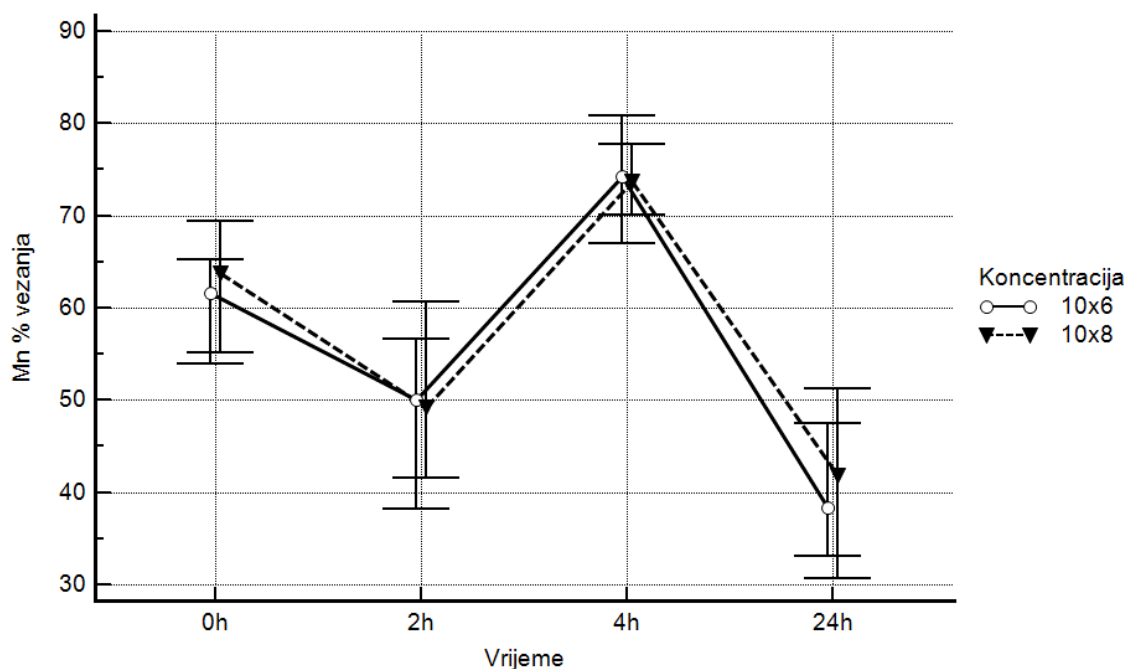


**Slika 28.** Razlike u dinamici vezanja Al<sup>3+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,001 ; i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P<0,001) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 14.** Razlike u udjelu vezanja Mn<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Mn							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	10 <sup>6</sup>	61,02%	10,23%	46,00%	81,59%	52,55%	61,66%	65,80%
	10 <sup>8</sup>	63,88%	10,36%	49,96%	86,04%	54,71%	63,75%	69,79%
2	10 <sup>6</sup>	48,40%	11,44%	29,98%	64,18%	37,83%	50,05%	57,83%
	10 <sup>8</sup>	50,69%	11,13%	33,02%	65,81%	41,02%	49,18%	61,19%
4	10 <sup>6</sup>	73,22%	7,42%	60,98%	82,60%	66,68%	74,20%	81,16%
	10 <sup>8</sup>	74,69%	6,53%	65,11%	85,82%	69,47%	73,71%	79,11%
24	10 <sup>6</sup>	40,28%	12,42%	21,23%	61,62%	31,24%	38,28%	49,26%
	10 <sup>8</sup>	42,60%	12,37%	28,42%	64,04%	30,46%	41,79%	52,65%

	Mann-Whitney U	Z	P
Mn % vezanja	41,000	-0,680	0,496
Mn % vezanja 2h	43,000	-0,529	0,597
Mn % vezanja 4h	45,000	-0,378	0,705
Mn % vezanja 24h	45,000	-0,378	0,705

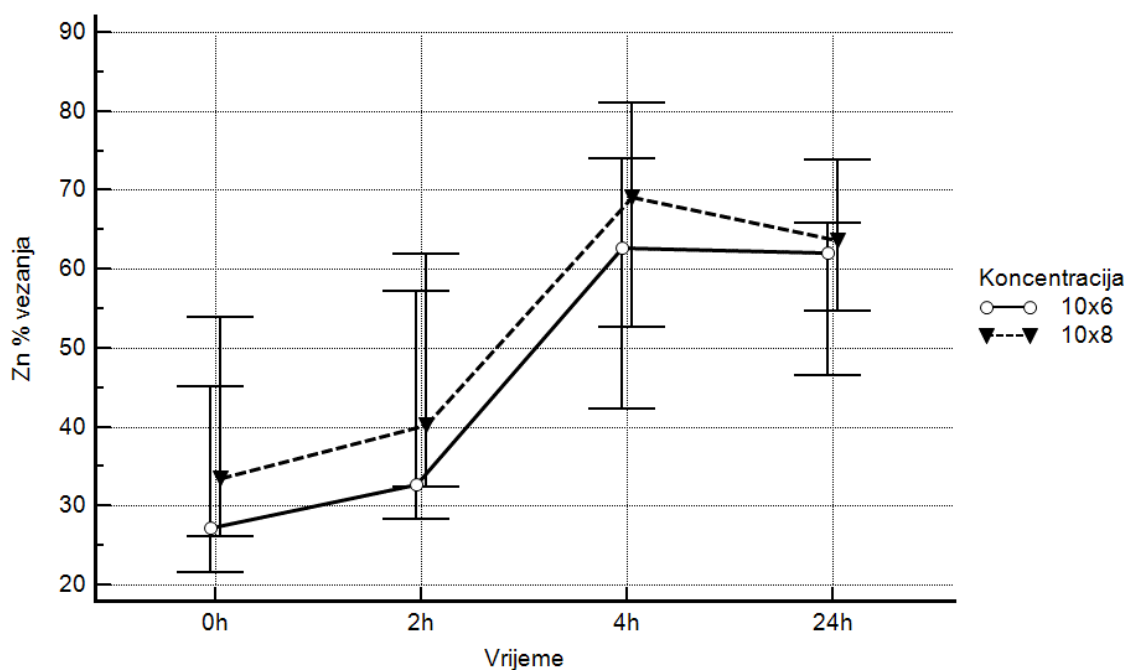


**Slika 29.** Razlike u dinamici vezanja Mn<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P<0,001 ; i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P<0,001) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 15.** Razlike u udjelu vezanja  $Zn^{2+}$  obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Zn							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	$10^6$	33,16%	13,20%	18,81%	52,37%	21,24%	27,18%	46,23%
	$10^8$	38,29%	13,86%	20,86%	57,21%	25,82%	33,44%	54,24%
2	$10^6$	38,91%	13,71%	27,07%	59,27%	28,24%	32,71%	57,38%
	$10^8$	43,86%	13,63%	29,24%	63,04%	32,05%	40,31%	62,10%
4	$10^6$	56,96%	18,58%	30,42%	82,41%	39,87%	62,61%	74,14%
	$10^8$	64,35%	17,26%	37,90%	85,47%	49,63%	69,12%	81,02%
24	$10^6$	56,72%	14,30%	36,02%	75,10%	43,92%	62,01%	67,47%
	$10^8$	61,98%	13,85%	38,69%	81,36%	52,07%	63,66%	74,14%

	Mann-Whitney U	Z	P
Zn % vezanja	34,000	-1,209	0,226
Zn % vezanja 2h	29,000	-1,587	0,112
Zn % vezanja 4h	39,000	-0,832	0,406
Zn % vezanja 24h	39,000	-0,832	0,406

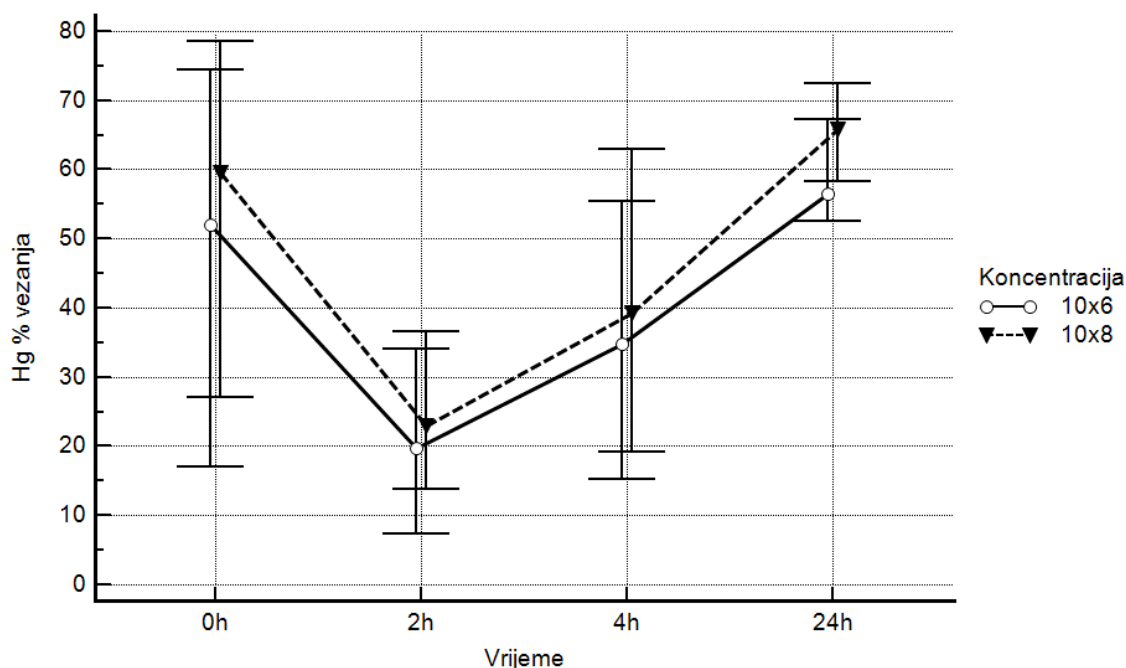


**Slika 30.** Razlike u dinamici vezanja  $Zn^{2+}$  obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $10^6$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,014 ; i  $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup> P=0,014) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 16.** Razlike u udjelu vezanja Hg<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup>) za deset različitih sojeva BMK: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Hg							
	CFUmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	10 <sup>6</sup>	47,40%	31,08%	4,15%	83,50%	14,31%	52,10%	74,85%
	10 <sup>8</sup>	53,97%	30,07%	10,90%	88,50%	23,46%	59,55%	80,41%
2	10 <sup>6</sup>	21,13%	14,58%	6,05%	45,85%	7,34%	19,70%	35,34%
	10 <sup>8</sup>	25,56%	14,24%	10,40%	52,20%	13,53%	22,88%	38,04%
4	10 <sup>6</sup>	35,65%	20,40%	11,35%	61,55%	14,88%	34,80%	56,43%
	10 <sup>8</sup>	41,38%	23,53%	15,30%	72,40%	18,29%	39,23%	64,84%
24	10 <sup>6</sup>	57,30%	15,26%	22,65%	78,55%	51,61%	56,45%	67,79%
	10 <sup>8</sup>	63,31%	14,23%	28,85%	81,20%	57,83%	65,90%	72,45%

	Mann-Whitney U	Z	P
Hg % vezanja	39,000	-0,832	0,406
Hg % vezanja 2h	38,000	-0,907	0,364
Hg % vezanja 4h	37,500	-0,945	0,345
Hg % vezanja 24h	31,000	-1,436	0,151



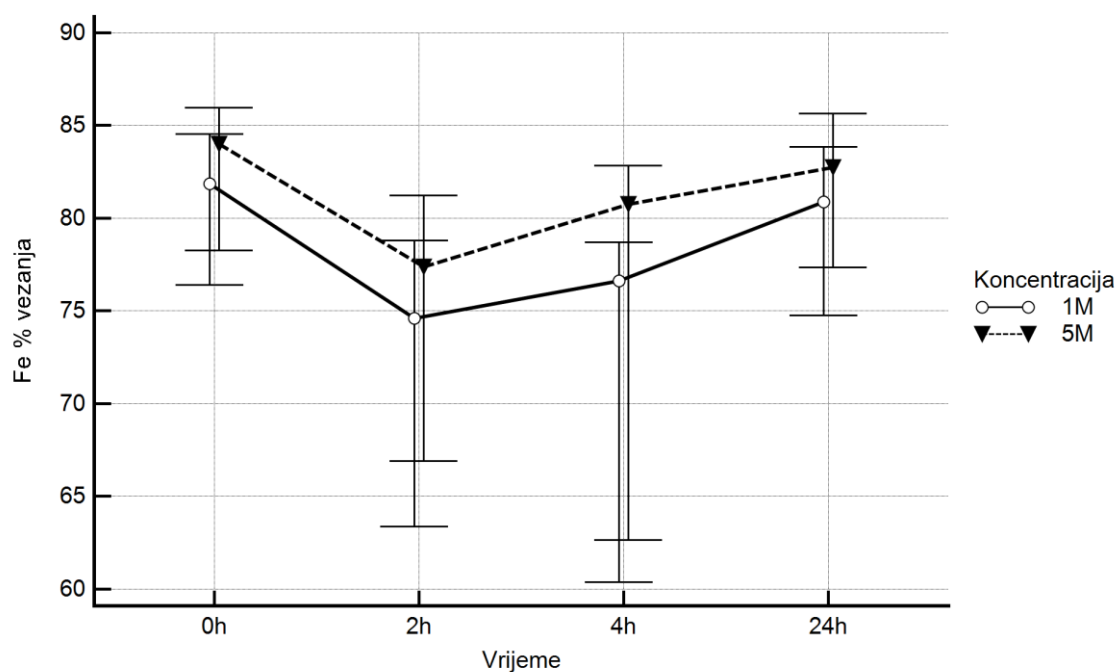
**Slika 31.** Razlike u dinamici vezanja Hg<sup>2+</sup> obzirom na broj živih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (10<sup>6</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,008 ; i 10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup> P=0,003) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test



**Tablica 17.** Razlike u udjelu vezanja Fe<sup>2+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=10) u koncentraciji 1 mgmL<sup>-1</sup> i 5 mgmL<sup>-1</sup>: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Fe							
	Konc. mgmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	73,93%	18,07%	32,02%	86,20%	76,40%	81,90%	84,50%
	5	76,45%	17,28%	35,55%	88,98%	78,30%	84,00%	85,90%
2	1	69,98%	15,03%	41,74%	85,73%	63,40%	74,60%	78,80%
	5	72,41%	15,25%	43,69%	89,57%	66,90%	77,40%	81,20%
4	1	67,96%	19,21%	22,93%	86,74%	60,40%	76,60%	78,70%
	5	71,24%	18,85%	26,59%	87,42%	62,60%	80,70%	82,80%
24	1	73,75%	20,22%	17,99%	85,87%	74,80%	80,90%	83,90%
	5	75,80%	19,97%	20,37%	86,57%	77,30%	82,80%	85,70%

	Mann-Whitney U	Z	P
Fe % vezanja 0h	37,500	-0,945	0,345
Fe % vezanja 2h	41,000	-0,680	0,496
Fe % vezanja 4h	39,000	-0,832	0,406
Fe % vezanja 24h	39,000	-0,832	0,406

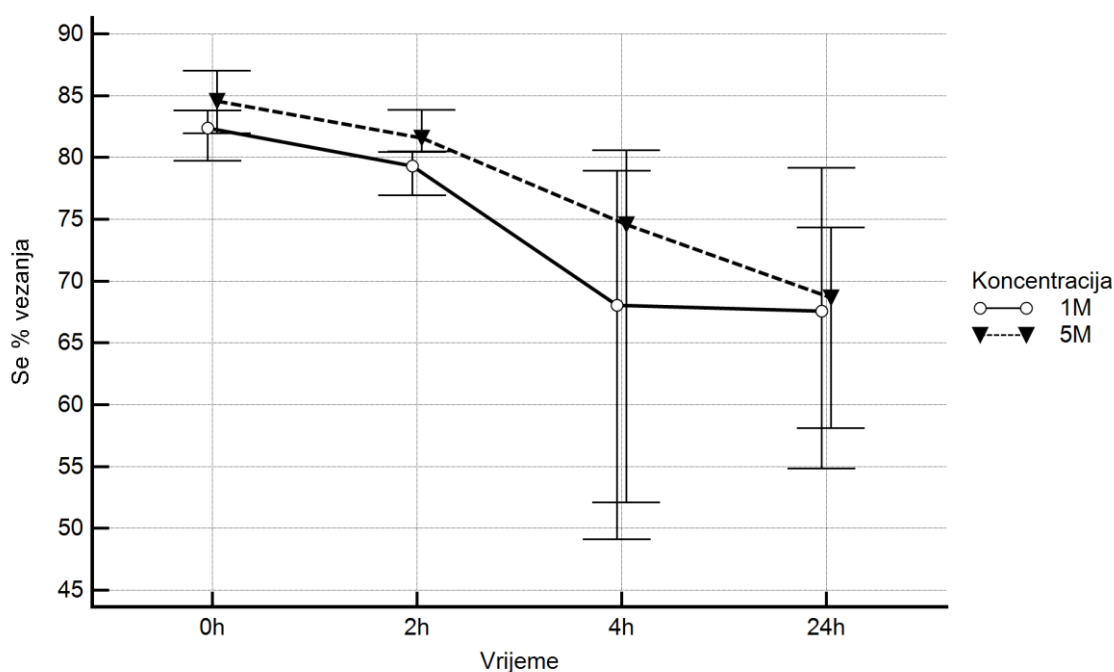


**Slika 32.** Razlike u dinamici vezanja Fe<sup>2+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (1 mgmL<sup>-1</sup>, P=0,696; 5 mgmL<sup>-1</sup>, P=0,753) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 18.** Razlike u udjelu vezanja  $\text{Se}^{4+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji  $1 \text{ mgmL}^{-1}$  i  $5 \text{ mgmL}^{-1}$ : Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Se							
	Konc. $\text{mgmL}^{-1}$	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	78,32%	9,24%	59,25%	84,36%	79,70%	82,40%	83,80%
	5	82,14%	7,18%	67,11%	87,47%	82,00%	84,60%	87,00%
2	1	71,82%	17,97%	28,96%	83,95%	77,00%	79,30%	80,40%
	5	75,19%	16,48%	35,32%	85,12%	80,50%	81,60%	83,80%
4	1	62,70%	17,36%	36,68%	84,43%	49,10%	68,10%	78,90%
	5	66,85%	16,97%	42,63%	85,82%	52,10%	74,60%	80,60%
24	1	64,48%	15,78%	30,15%	80,97%	54,90%	67,60%	79,20%
	5	65,46%	14,21%	35,88%	83,96%	58,10%	68,70%	74,40%

	Mann-Whitney U	Z	P
Se % vezanja 0h	28,000	-1,663	0,096
Se % vezanja 2h	28,000	-1,663	0,096
Se % vezanja 4h	38,000	-0,907	0,364
Se % vezanja 24h	46,000	-0,302	0,762

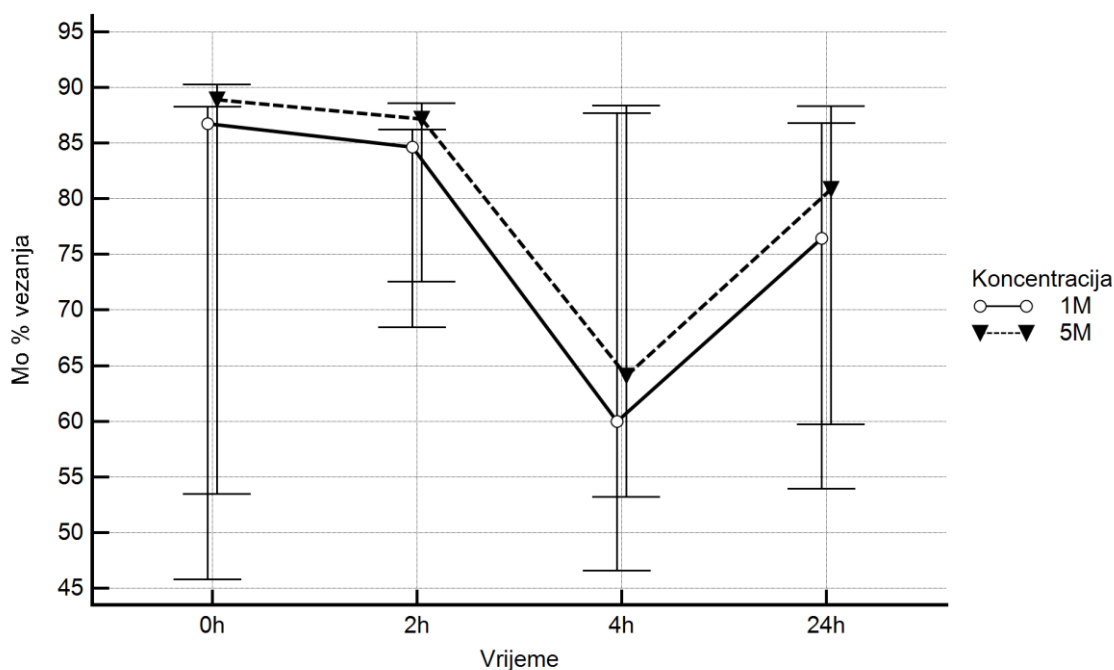


**Slika 33.** Razlike u dinamici vezanja  $\text{Se}^{4+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste ( $1 \text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,014$ ;  $5 \text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,001$ ) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 19.** Razlike u udjelu vezanja Mo<sup>4+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji 1 mgmL<sup>-1</sup> i 5 mgmL<sup>-1</sup>: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Mo							
	Konc. mgmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	68,63%	26,56%	16,40%	88,60%	45,80%	86,70%	88,30%
	5	72,97%	23,38%	27,54%	91,07%	53,50%	88,90%	90,30%
2	1	78,17%	12,51%	55,46%	88,23%	68,40%	84,60%	86,20%
	5	81,29%	11,12%	61,74%	90,41%	72,50%	87,20%	88,60%
4	1	65,29%	20,29%	39,29%	88,34%	46,60%	60,00%	87,70%
	5	69,01%	18,02%	45,14%	89,82%	53,20%	64,10%	88,40%
24	1	72,43%	15,61%	52,73%	88,17%	54,00%	76,40%	86,80%
	5	76,54%	14,35%	55,50%	90,28%	59,70%	80,90%	88,30%

	Mann-Whitney U	Z	P
Mo % vezanja 0h	34,000	-1,209	0,226
Mo % vezanja 2h	3<0,001	-1,512	0,131
Mo % vezanja 4h	37,000	-0,983	0,326
Mo % vezanja 24h	33,000	-1,286	0,199

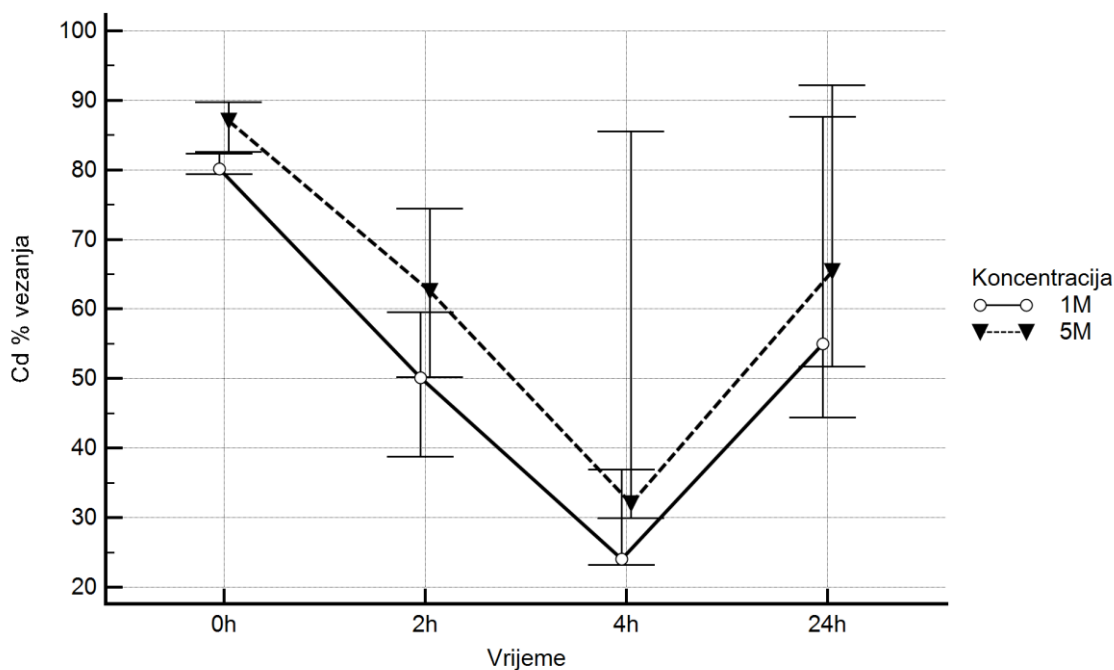


**Slika 34.** Razlike u dinamici vezanja Mo<sup>4+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (1 mgmL<sup>-1</sup>, P=0,896 ; 5 mgmL<sup>-1</sup>, P=0,540) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 20.** Razlike u udjelu vezanja Cd<sup>2+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji 1 mgmL<sup>-1</sup> i 5 mgmL<sup>-1</sup>: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Cd							
	Konc. mgmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	80,29%	5,85%	69,85%	89,90%	79,40%	80,20%	82,30%
	5	85,77%	7,57%	74,05%	96,80%	82,60%	87,10%	89,70%
2	1	51,12%	21,32%	13,25%	95,35%	38,80%	50,10%	59,50%
	5	63,44%	22,80%	23,40%	97,70%	50,20%	62,50%	74,50%
4	1	32,70%	23,11%	16,40%	95,65%	23,20%	24,00%	37,00%
	5	49,70%	29,89%	25,60%	97,60%	29,90%	32,00%	85,50%
24	1	61,70%	20,77%	40,55%	95,65%	44,40%	55,00%	87,70%
	5	71,17%	20,62%	45,05%	97,60%	51,80%	65,40%	92,20%

	Mann-Whitney U	Z	P
Cd % vezanja 0h	25,500	-1,853	0,064
Cd % vezanja 2h	31,000	-1,436	0,151
Cd % vezanja 4h	21,000	-2,193	0,028
Cd % vezanja 24h	32,000	-1,361	0,173

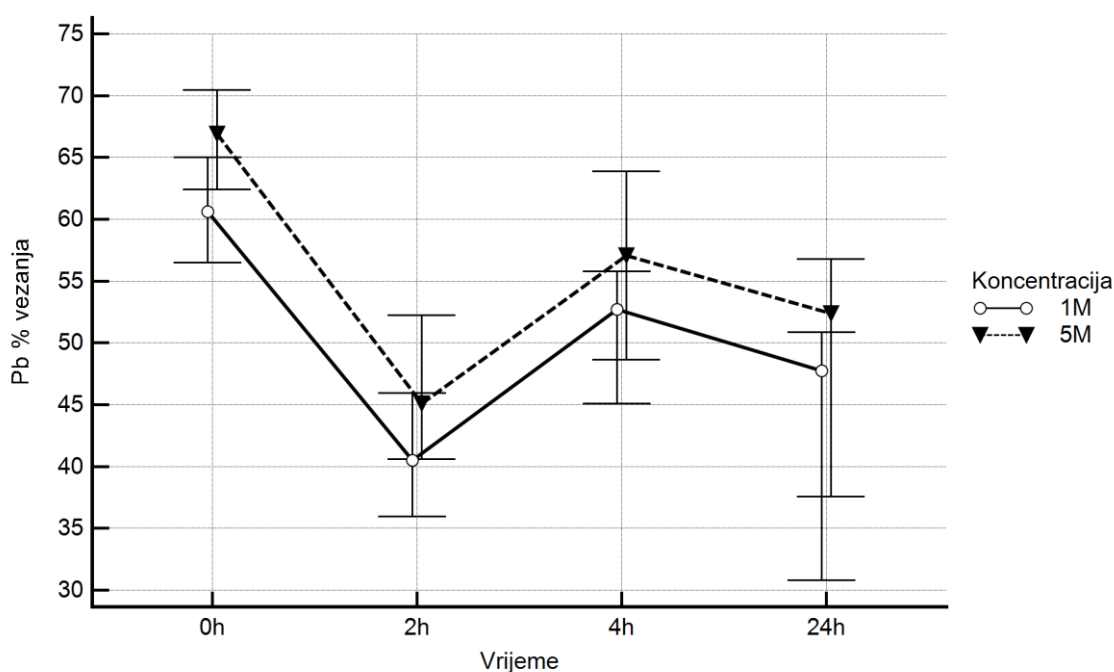


**Slika 35.** Razlike u dinamici vezanja Cd<sup>2+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (1 mgmL<sup>-1</sup>, P=0,002; 5 mgmL<sup>-1</sup>, P=0,053) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 21.** Razlike u udjelu vezanja  $Pb^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji  $1\text{ mgmL}^{-1}$  i  $5\text{ mgmL}^{-1}$ : Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Pb							
	Konc. $\text{mgmL}^{-1}$	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	56,90%	12,17%	32,17%	69,68%	56,50%	60,60%	65,00%
	5	63,62%	10,91%	42,44%	76,29%	62,40%	66,90%	70,50%
2	1	42,37%	11,95%	25,07%	63,99%	35,90%	40,50%	45,90%
	5	47,89%	11,89%	33,44%	68,98%	40,60%	45,10%	52,20%
4	1	50,84%	8,12%	34,97%	61,60%	45,10%	52,70%	55,80%
	5	57,13%	8,27%	44,80%	69,77%	48,70%	57,10%	63,90%
24	1	42,05%	14,29%	9,38%	54,79%	30,80%	47,80%	50,90%
	5	47,79%	14,49%	13,77%	61,60%	37,60%	52,40%	56,80%

	Mann-Whitney U	Z	P
Pb % vezanja 0h	26,000	-1,814	0,070
Pb % vezanja 2h	35,000	-1,134	0,257
Pb % vezanja 4h	31,000	-1,436	0,151
Pb % vezanja 24h	29,000	-1,587	0,112

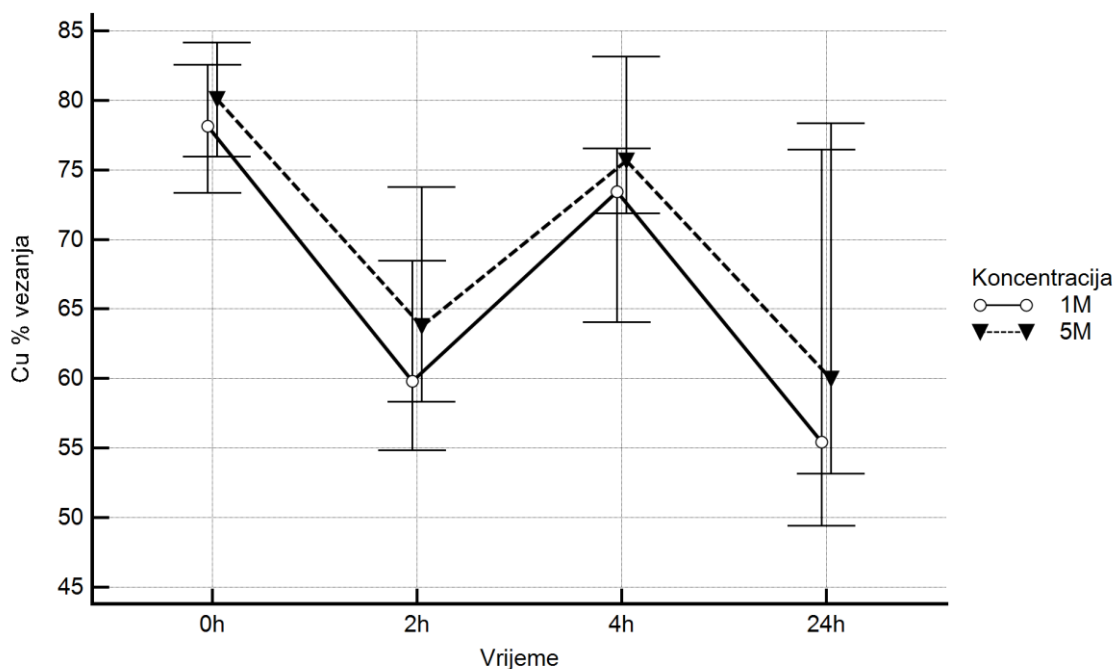


**Slika 36.** Razlike u dinamici vezanja  $Pb^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste ( $1\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,026$ ;  $5\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,069$ ) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 22.** Razlike u udjelu vezanja  $\text{Cu}^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji  $1 \text{ mgmL}^{-1}$  i  $5 \text{ mgmL}^{-1}$ : Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Cu							
	Konc. $\text{mgmL}^{-1}$	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	76,62%	7,51%	62,18%	83,88%	73,40%	78,10%	82,50%
	5	78,83%	6,66%	64,90%	84,93%	76,00%	80,10%	84,10%
2	1	60,61%	9,65%	46,98%	77,46%	54,90%	59,80%	68,50%
	5	64,50%	9,36%	50,09%	80,88%	58,30%	63,80%	73,80%
4	1	70,92%	9,68%	51,76%	82,81%	64,00%	73,40%	76,60%
	5	75,48%	9,31%	54,62%	85,05%	71,90%	75,60%	83,20%
24	1	60,92%	14,65%	46,75%	84,51%	49,40%	55,40%	76,40%
	5	64,46%	13,53%	50,96%	86,77%	53,10%	60,00%	78,30%

	Mann-Whitney U	Z	P
Cu % vezanja 0h	31,000	-1,437	0,151
Cu % vezanja 2h	36,000	-1,058	0,290
Cu % vezanja 4h	35,000	-1,134	0,257
Cu % vezanja 24h	34,000	-1,209	0,226

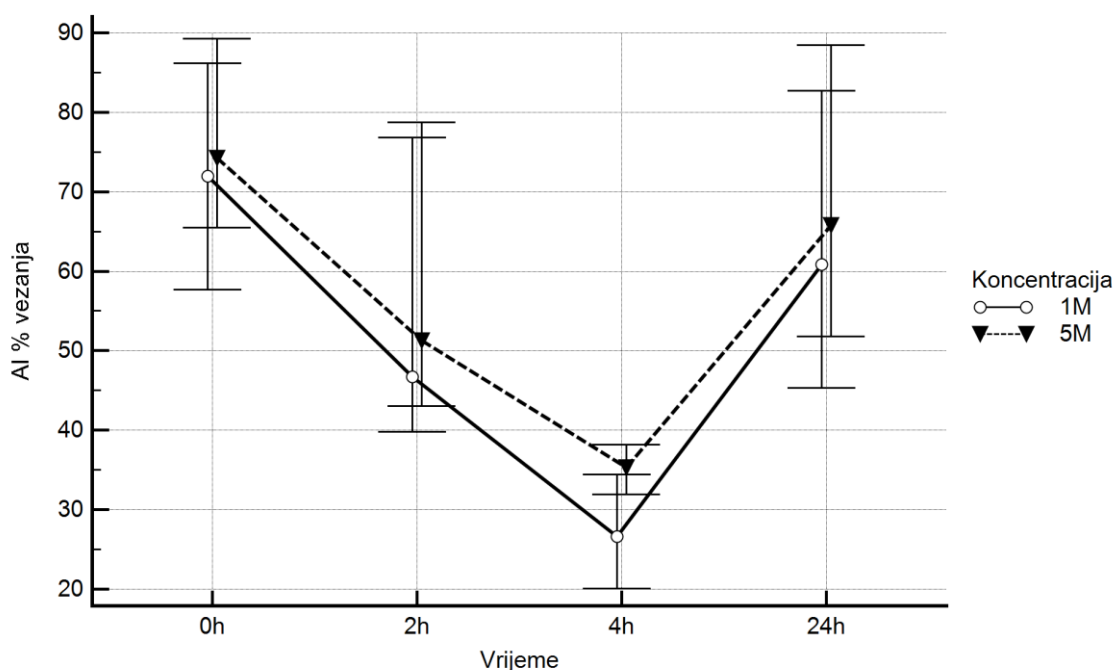


**Slika 37.** Razlike u dinamici vezanja  $\text{Cu}^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste ( $1 \text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,056$ ;  $5 \text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,031$ ) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 23.** Razlike u udjelu vezanja  $Al^{3+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji  $1\text{ mgmL}^{-1}$  i  $5\text{ mgmL}^{-1}$ : Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Al							
	Konc. $\text{mgmL}^{-1}$	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	69,74%	17,02%	41,70%	89,54%	57,70%	72,00%	86,20%
	5	73,44%	16,50%	44,73%	90,69%	65,50%	74,20%	89,30%
2	1	52,87%	22,67%	23,51%	89,33%	39,80%	46,70%	76,80%
	5	56,26%	22,41%	26,13%	90,84%	43,00%	51,30%	78,70%
4	1	31,39%	19,01%	17,63%	82,09%	20,10%	26,60%	34,40%
	5	38,42%	18,08%	19,96%	86,37%	31,90%	35,30%	38,10%
24	1	62,83%	19,24%	36,06%	89,98%	45,30%	60,90%	82,70%
	5	66,81%	18,79%	39,19%	92,43%	51,80%	65,80%	88,40%

	Mann-Whitney U	Z	P
Al % vezanja 0h	39,000	-0,832	0,406
Al % vezanja 2h	39,000	-0,832	0,406
Al % vezanja 4h	26,000	-1,815	0,070
Al % vezanja 24h	4<0,001	-0,756	0,450

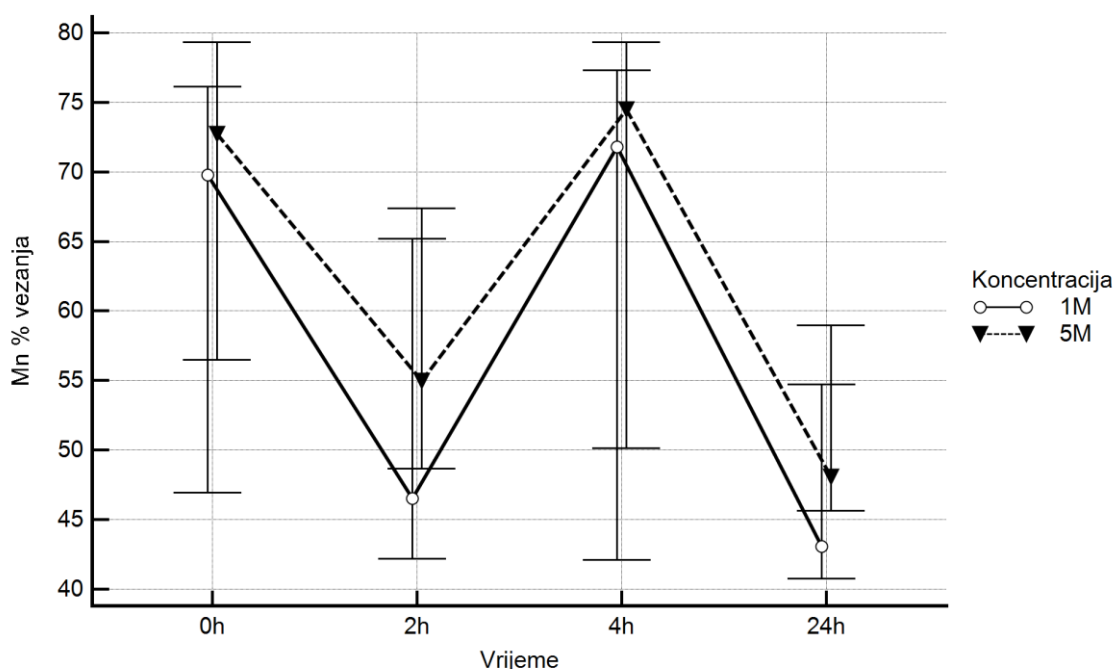


**Slika 38.** Razlike u dinamici vezanja  $Al^{3+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste ( $1\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,004$ ;  $5\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,009$ ) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 24.** Razlike u udjelu vezanja  $Mn^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji  $1\text{ mgmL}^{-1}$  i  $5\text{ mgmL}^{-1}$ : Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Mn							
	Konc. $\text{mgmL}^{-1}$	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	62,22%	19,00%	22,58%	80,07%	46,90%	69,80%	76,20%
	5	67,14%	16,67%	30,00%	81,63%	56,50%	72,70%	79,30%
2	1	49,86%	15,26%	24,05%	72,77%	42,20%	46,50%	65,20%
	5	56,35%	12,80%	35,15%	75,26%	48,70%	55,00%	67,40%
4	1	62,86%	21,15%	20,04%	82,40%	42,10%	71,80%	77,30%
	5	66,96%	18,17%	30,53%	84,59%	50,10%	74,50%	79,30%
24	1	45,39%	15,50%	22,81%	76,54%	40,80%	43,10%	54,70%
	5	50,27%	13,86%	30,35%	78,17%	45,60%	48,10%	59,00%

	Mann-Whitney U	Z	P
Mn % vezanja 0h	39,000	-0,832	0,406
Mn % vezanja 2h	34,000	-1,209	0,226
Mn % vezanja 4h	4<0,001	-0,756	0,450
Mn % vezanja 24h	37,000	-0,983	0,326



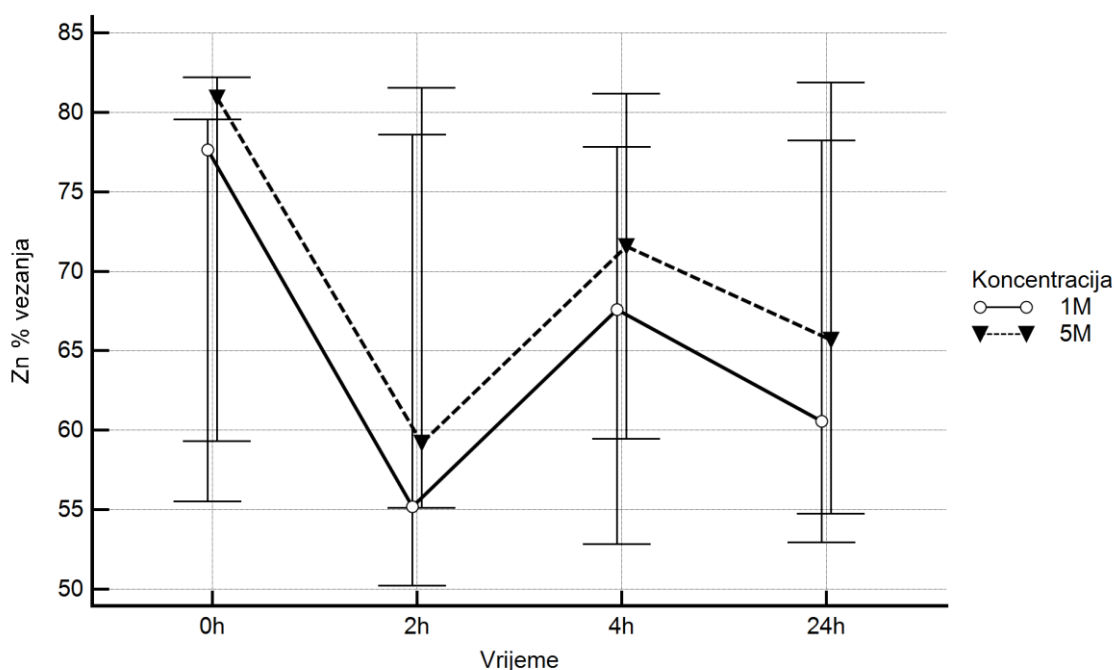
**Slika 39.** Razlike u dinamici vezanja  $Mn^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste ( $1\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,365$ ;  $5\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,099$ ) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test



**Tablica 25.** Razlike u udjelu vezanja  $Zn^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji  $1\text{ mgmL}^{-1}$  i  $5\text{ mgmL}^{-1}$ : Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Zn							
	Konc. $\text{mgmL}^{-1}$	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	69,37%	12,61%	52,50%	80,82%	55,50%	77,60%	79,60%
	5	72,40%	12,19%	55,23%	82,64%	59,30%	80,90%	82,20%
2	1	62,89%	14,00%	49,70%	79,84%	50,20%	55,20%	78,60%
	5	66,35%	13,08%	54,15%	82,64%	55,10%	59,20%	81,60%
4	1	63,56%	16,78%	27,59%	79,22%	52,80%	67,60%	77,80%
	5	68,08%	16,57%	33,16%	83,71%	59,50%	71,60%	81,20%
24	1	62,43%	16,24%	38,86%	81,01%	52,90%	60,60%	78,20%
	5	66,94%	17,14%	44,05%	89,90%	54,70%	65,70%	81,90%

	Mann-Whitney U	Z	P
Zn % vezanja 0h	27,000	-1,739	0,082
Zn % vezanja 2h	29,000	-1,587	0,112
Zn % vezanja 4h	38,000	-0,907	0,364
Zn % vezanja 24h	37,000	-0,983	0,326

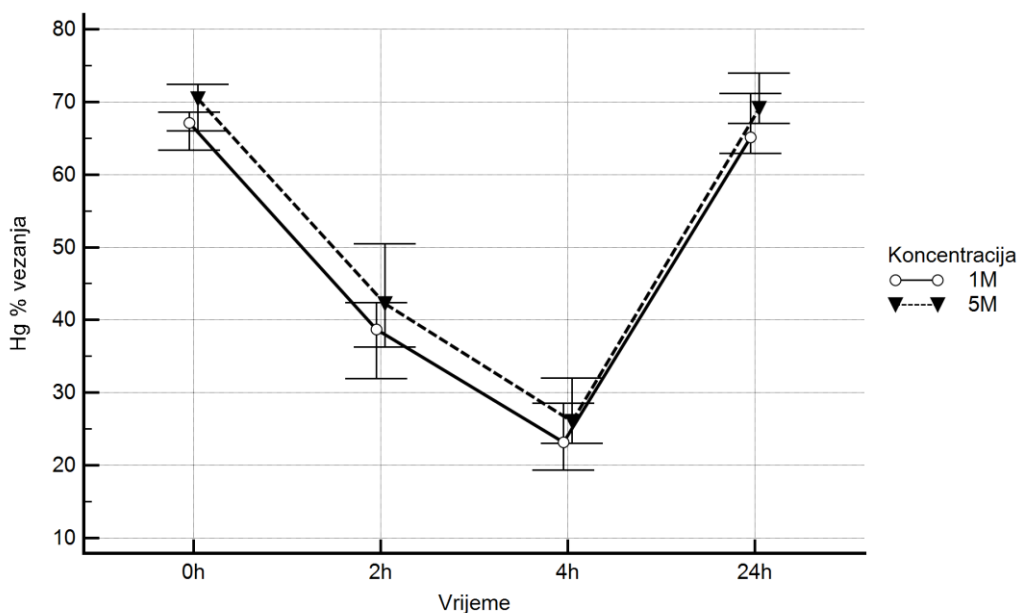


**Slika 40.** Razlike u dinamici vezanja  $Zn^{2+}$  obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste ( $1\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,430$ ;  $5\text{ mgmL}^{-1}$ ,  $P=0,293$ ) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 26.** Razlike u udjelu vezanja Hg<sup>2+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (N=10) u koncentraciji 1 mgmL<sup>-1</sup> i 5 mgmL<sup>-1</sup>: Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Hg							
	Konc. mgmL <sup>-1</sup>	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	1	65,06%	5,52%	51,75%	70,55%	63,40%	67,20%	68,60%
	5	68,73%	5,62%	55,15%	74,30%	66,00%	70,50%	72,40%
2	1	38,27%	6,75%	27,65%	48,45%	31,90%	38,70%	42,40%
	5	42,87%	8,05%	32,50%	55,90%	36,30%	42,30%	50,50%
4	1	23,17%	5,67%	15,00%	32,90%	19,40%	23,20%	28,60%
	5	26,91%	5,54%	19,40%	36,60%	23,00%	26,10%	32,00%
24	1	61,99%	15,28%	20,65%	75,00%	62,90%	65,10%	71,20%
	5	66,00%	15,05%	25,40%	78,45%	67,10%	69,10%	74,00%

	Mann-Whitney U	Z	P
Hg % vezanja 0h	25,000	-1,890	0,059
Hg % vezanja 2h	33,000	-1,285	0,199
Hg % vezanja 4h	31,000	-1,436	0,151
Hg % vezanja 24h	33,000	-1,286	0,199

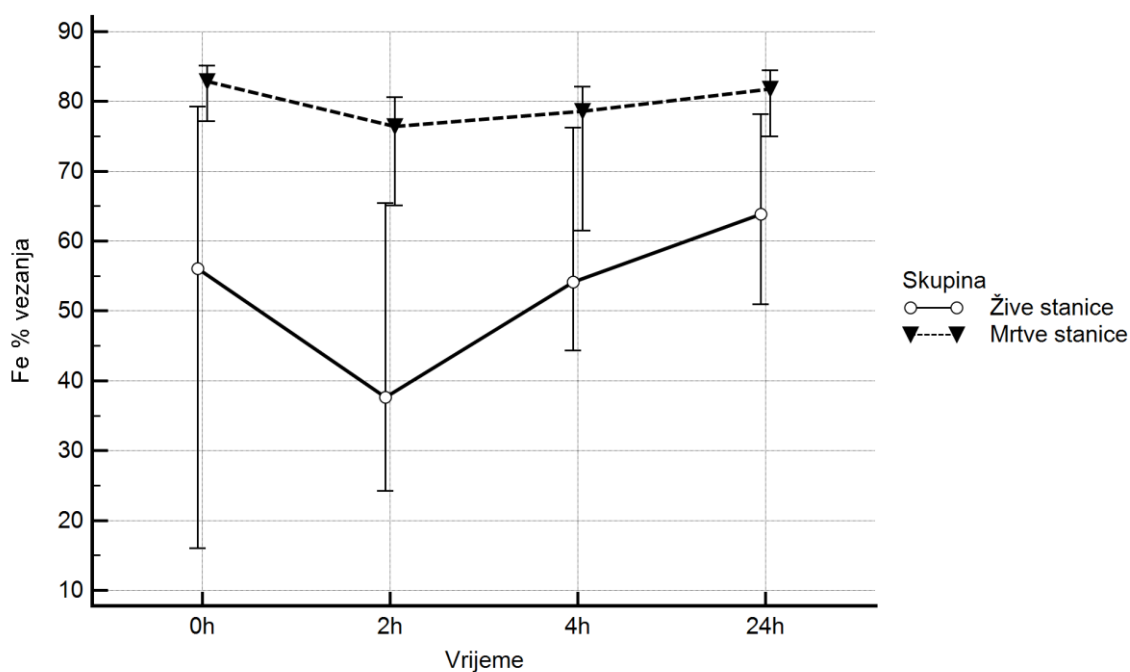


**Slika 41.** Razlike u dinamici vezanja Hg<sup>2+</sup> obzirom na mrtve stanice bakterija *Lc. lactis* i odabrane *Lactobacillus* vrste (1 mgmL<sup>-1</sup>, P<0,001; 5 mgmL<sup>-1</sup>, P<0,001) za deset različitih sojeva BMK: Friedmanov test

**Tablica 27.** Razlike u udjelu vezanja Fe<sup>2+</sup> između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Fe							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	49,52%	31,09%	13,38%	82,24%	15,90%	56,08%	79,43%
	Mrtve stanice	75,19%	17,26%	32,02%	88,98%	76,78%	82,89%	85,27%
2	Žive stanice	44,29%	23,08%	13,40%	82,35%	24,08%	37,68%	65,72%
	Mrtve stanice	71,19%	14,79%	41,74%	89,57%	64,25%	76,42%	80,94%
4	Žive stanice	54,48%	26,23%	6,56%	90,02%	44,28%	54,17%	76,76%
	Mrtve stanice	69,60%	18,60%	22,93%	87,42%	60,95%	78,57%	82,49%
24	Žive stanice	57,48%	26,36%	6,83%	86,63%	50,57%	63,90%	78,31%
	Mrtve stanice	74,78%	19,59%	17,99%	86,57%	74,86%	81,82%	84,63%

	Mann-Whitney U	Z	P
Fe % vezanja 0h	71,000	-3,490	<0,001
Fe % vezanja 2h	67,000	-3,598	<0,001
Fe % vezanja 4h	122,000	-2,110	0,035
Fe % vezanja 24h	91,000	-2,948	0,003

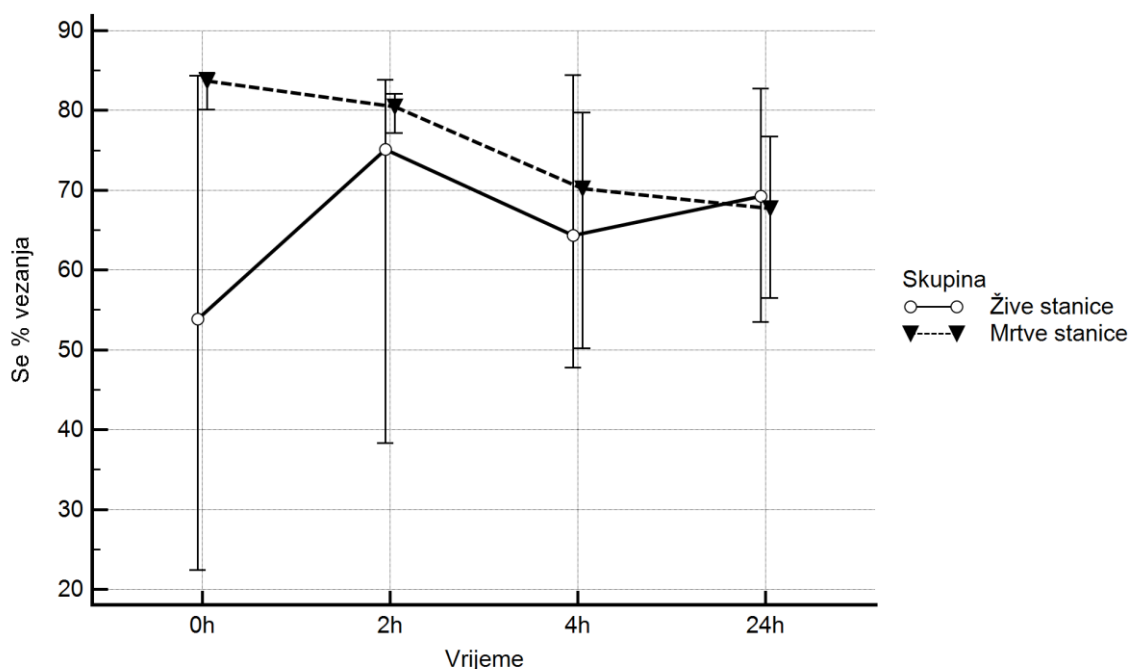


**Slika 42.** Razlike u dinamici vezanja Fe<sup>2+</sup> između živih stanica (P=0,173) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (P=0,516): Friedmanov test

**Tablica 28.** Razlike u udjelu vezanja  $Se^{4+}$  između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Se							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	52,72%	32,18%	7,37%	88,13%	22,38%	53,88%	84,63%
	Mrtve stanice	80,23%	8,29%	59,25%	87,47%	79,93%	83,72%	84,93%
2	Žive stanice	59,91%	29,17%	5,86%	87,71%	36,45%	75,14%	83,96%
	Mrtve stanice	73,51%	16,87%	28,96%	85,12%	77,07%	80,45%	82,08%
4	Žive stanice	61,17%	24,64%	17,29%	87,91%	46,75%	64,36%	84,90%
	Mrtve stanice	64,78%	16,84%	36,68%	85,82%	49,67%	70,24%	79,90%
24	Žive stanice	66,10%	18,07%	28,55%	85,66%	53,21%	69,24%	82,82%
	Mrtve stanice	64,97%	14,62%	30,15%	83,96%	55,68%	67,75%	77,96%

	Mann-Whitney U	Z	P
Se % vezanja 0h	12<0,001	-2,164	0,030
Se % vezanja 2h	179,000	-0,568	0,570
Se % vezanja 4h	196,000	-0,108	0,914
Se % vezanja 24h	176,000	-0,649	0,516

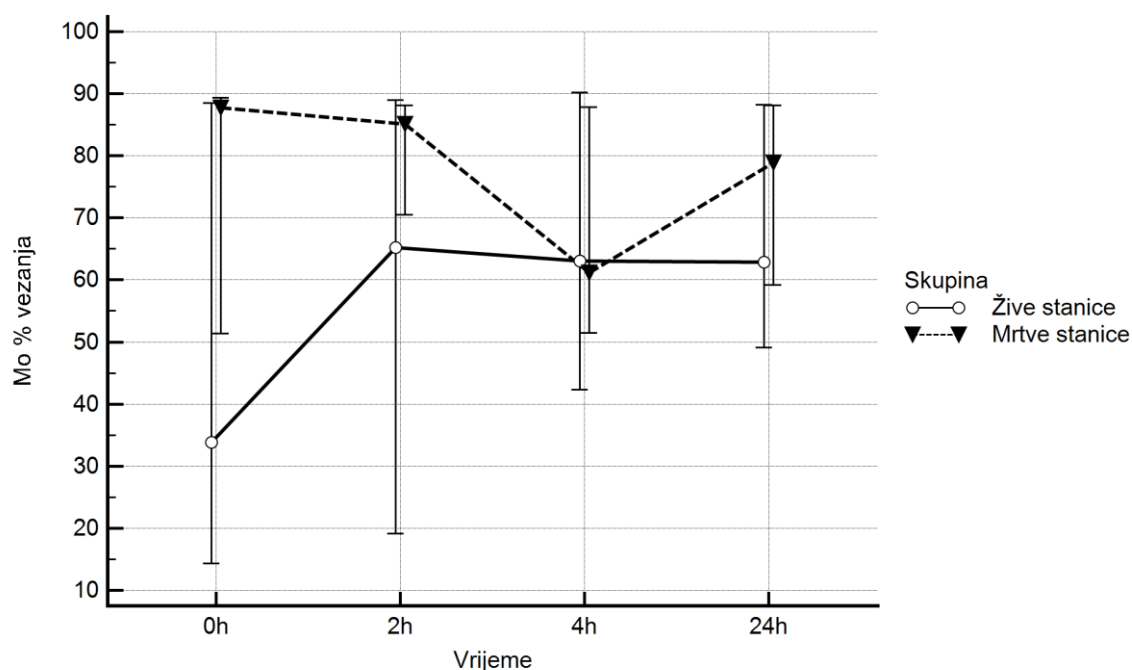


**Slika 43.** Razlike u dinamici vezanja  $Se^{4+}$  između živih stanica (P=0,936) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (P<0,001): Friedmanov test

**Tablica 29.** Razlike u udjelu vezanja Mo<sup>4+</sup> između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Mo							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	48,13%	35,34%	7,06%	91,19%	14,17%	33,89%	88,68%
	Mrtve stanice	70,80%	24,45%	16,40%	91,07%	50,30%	87,77%	89,70%
2	Žive stanice	56,26%	33,41%	13,50%	91,10%	18,93%	65,23%	89,20%
	Mrtve stanice	79,73%	11,63%	55,46%	90,41%	69,47%	85,12%	88,17%
4	Žive stanice	64,17%	26,26%	15,67%	96,25%	42,08%	63,07%	90,20%
	Mrtve stanice	67,15%	18,78%	39,29%	89,82%	51,40%	61,18%	87,84%
24	Žive stanice	65,30%	23,23%	16,65%	90,54%	48,92%	62,83%	88,29%
	Mrtve stanice	74,49%	14,75%	52,73%	90,28%	58,93%	78,90%	88,17%

	Mann-Whitney U	Z	P
Mo % vezanja 0h	126,000	-2,002	0,045
Mo % vezanja 2h	153,000	-1,271	0,204
Mo % vezanja 4h	195,000	-0,135	0,892
Mo % vezanja 24h	171,000	-0,784	0,433

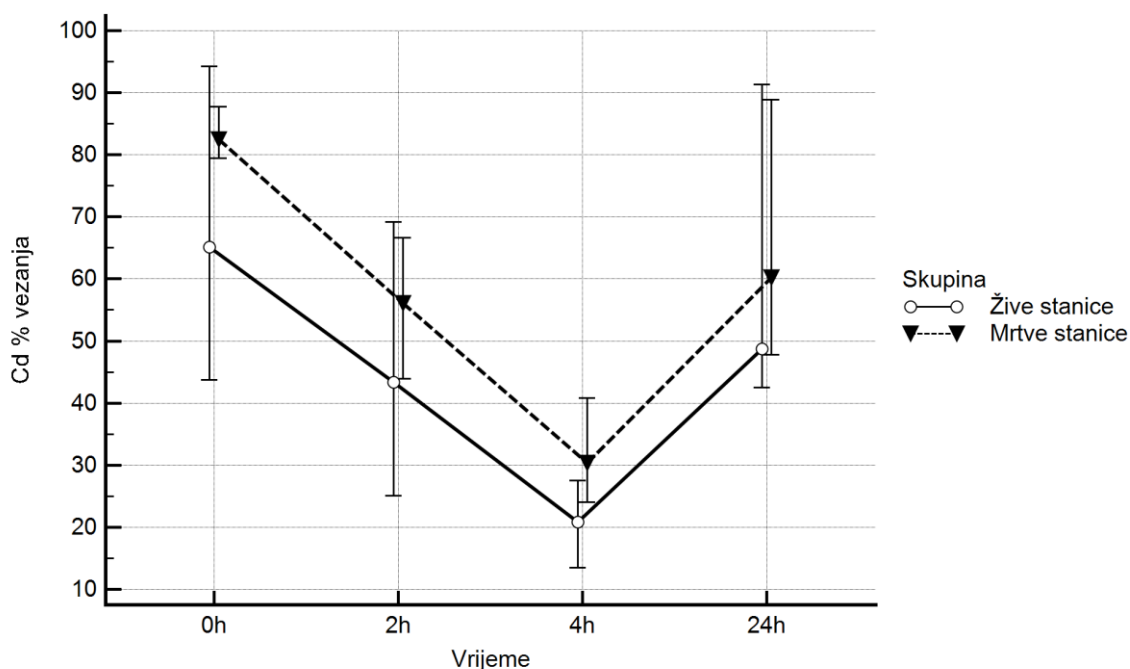


**Slika 44.** Razlike u dinamici vezanja Mo<sup>4+</sup> između živih stanica (P=0,008) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (P=0,577): Friedmanov test

**Tablica 30.** Razlike u udjelu vezanja Cd<sup>2+</sup> između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Cd							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	63,71%	26,83%	12,90%	96,25%	41,76%	65,10%	94,24%
	Mrtve stanice	83,03%	7,16%	69,85%	96,80%	79,39%	82,43%	87,95%
2	Žive stanice	48,91%	27,87%	12,90%	97,45%	24,89%	43,38%	74,98%
	Mrtve stanice	57,28%	22,39%	13,25%	97,70%	43,73%	56,10%	67,20%
4	Žive stanice	33,14%	33,00%	4,00%	98,50%	12,44%	20,88%	28,20%
	Mrtve stanice	41,20%	27,43%	16,40%	97,60%	23,96%	30,33%	42,23%
24	Žive stanice	60,04%	24,15%	34,90%	97,00%	42,19%	48,75%	92,93%
	Mrtve stanice	66,43%	20,72%	40,55%	97,60%	47,23%	60,28%	89,49%

	Mann-Whitney U	Z	P
Cd % vezanja 0h	117,000	-2,245	0,025
Cd % vezanja 2h	144,000	-1,515	0,130
Cd % vezanja 4h	112,500	-2,367	0,018
Cd % vezanja 24h	152,500	-1,285	0,199

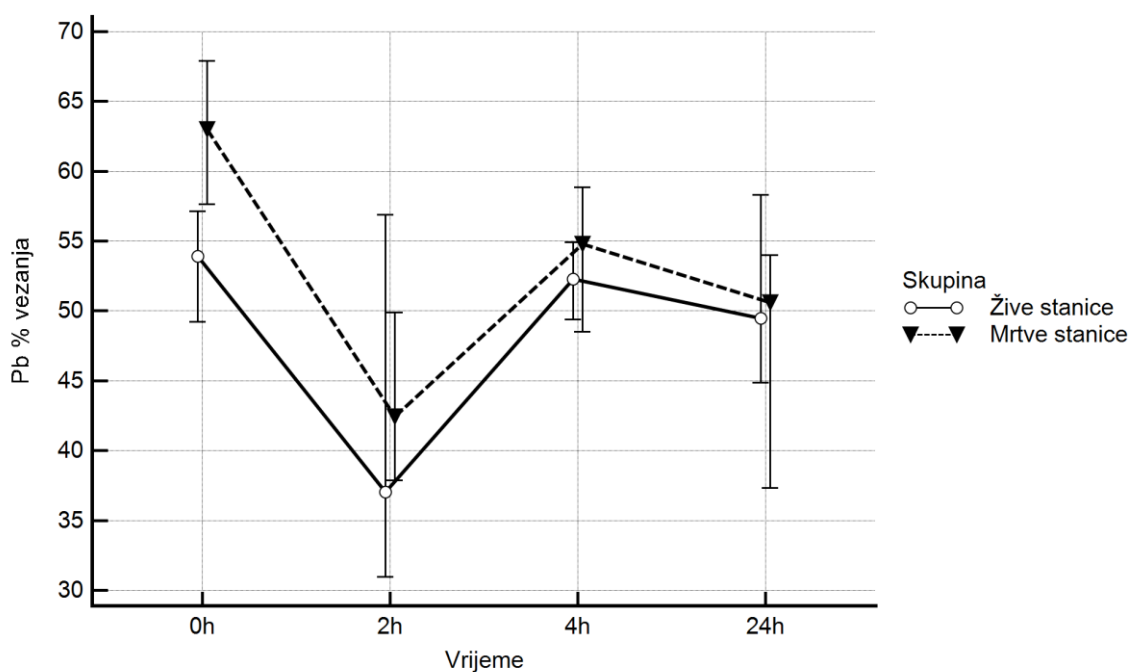


**Slika 45.** Razlike u dinamici vezanja Cd<sup>2+</sup> između živih stanica (P<0,001) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (P<0,001): Friedmanov test

**Tablica 31.** Razlike u udjelu vezanja Pb<sup>2+</sup> između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Pb							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	53,72%	7,09%	40,14%	69,92%	49,14%	53,91%	57,15%
	Mrtve stanice	60,26%	11,77%	32,17%	76,29%	57,07%	63,02%	68,11%
2	Žive stanice	42,72%	15,10%	23,06%	70,30%	30,16%	37,04%	56,97%
	Mrtve stanice	45,13%	11,95%	25,07%	68,98%	37,81%	42,45%	51,07%
4	Žive stanice	52,48%	4,04%	46,30%	60,78%	49,25%	52,30%	55,12%
	Mrtve stanice	53,98%	8,60%	34,97%	69,77%	48,41%	54,79%	58,85%
24	Žive stanice	49,95%	11,52%	29,73%	70,04%	44,47%	49,48%	58,35%
	Mrtve stanice	44,92%	14,31%	9,38%	61,60%	37,19%	50,59%	54,39%

	Mann-Whitney U	Z	P
Pb % vezanja 0h	103,000	-2,624	0,009
Pb % vezanja 2h	171,000	-0,784	0,433
Pb % vezanja 4h	169,500	-0,825	0,409
Pb % vezanja 24h	18<0,001	-0,541	0,589

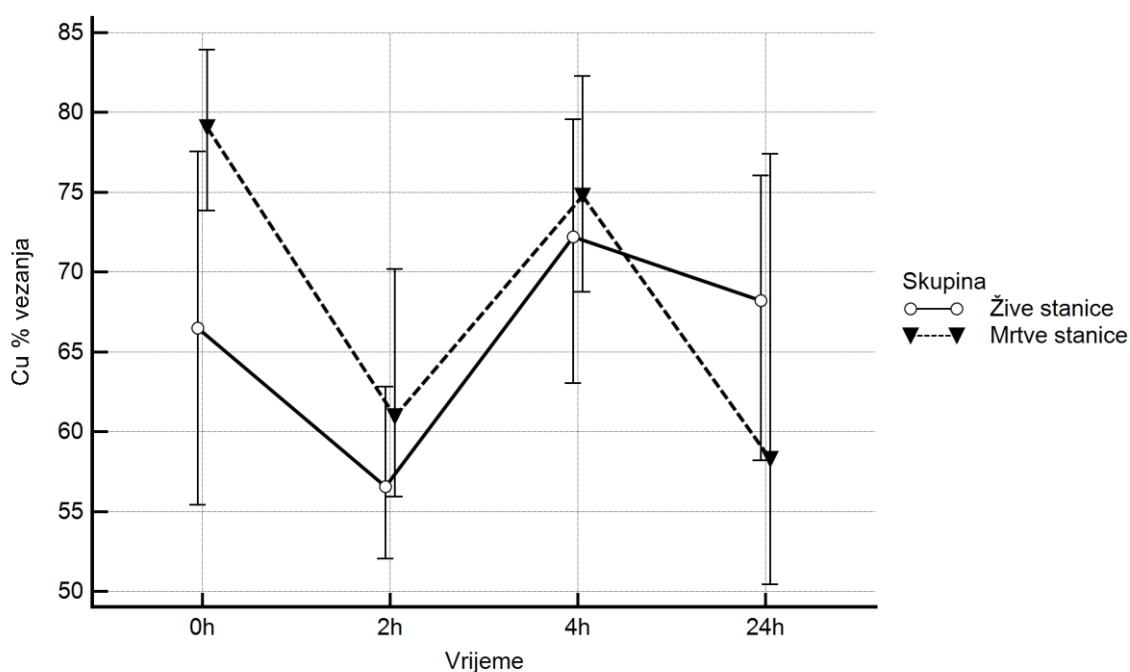


**Slika 46.** Razlike u dinamici vezanja Pb<sup>2+</sup> između živih stanica (P=0,300) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (P<0,001): Friedmanov test

**Tablica 32.** Razlike u udjelu vezanja  $\text{Cu}^{2+}$  između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Skupina	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
Cu % vezanja 0h	Žive stanice	65,80%	11,80%	49,22%	83,49%	54,99%	66,49%	77,92%
	Mrtve stanice	77,72%	7,00%	62,18%	84,93%	73,61%	79,07%	83,95%
Cu % vezanja 2h	Žive stanice	59,45%	11,99%	42,23%	87,13%	51,93%	56,56%	63,72%
	Mrtve stanice	62,55%	9,47%	46,98%	80,88%	55,69%	60,97%	71,03%
Cu % vezanja 4h	Žive stanice	71,09%	10,13%	53,77%	88,96%	62,88%	72,21%	79,71%
	Mrtve stanice	73,20%	9,53%	51,76%	85,05%	68,27%	74,78%	82,31%
Cu % vezanja 24h	Žive stanice	67,38%	9,64%	51,83%	80,80%	57,87%	68,21%	76,08%
	Mrtve stanice	62,69%	13,85%	46,75%	86,77%	50,19%	58,28%	77,87%

	Mann-Whitney U	Z	P
Cu % vezanja 0h	78,000	-3,300	0,001
Cu % vezanja 2h	153,000	-1,271	0,204
Cu % vezanja 4h	173,000	-0,730	0,465
Cu % vezanja 24h	151,000	-1,326	0,185



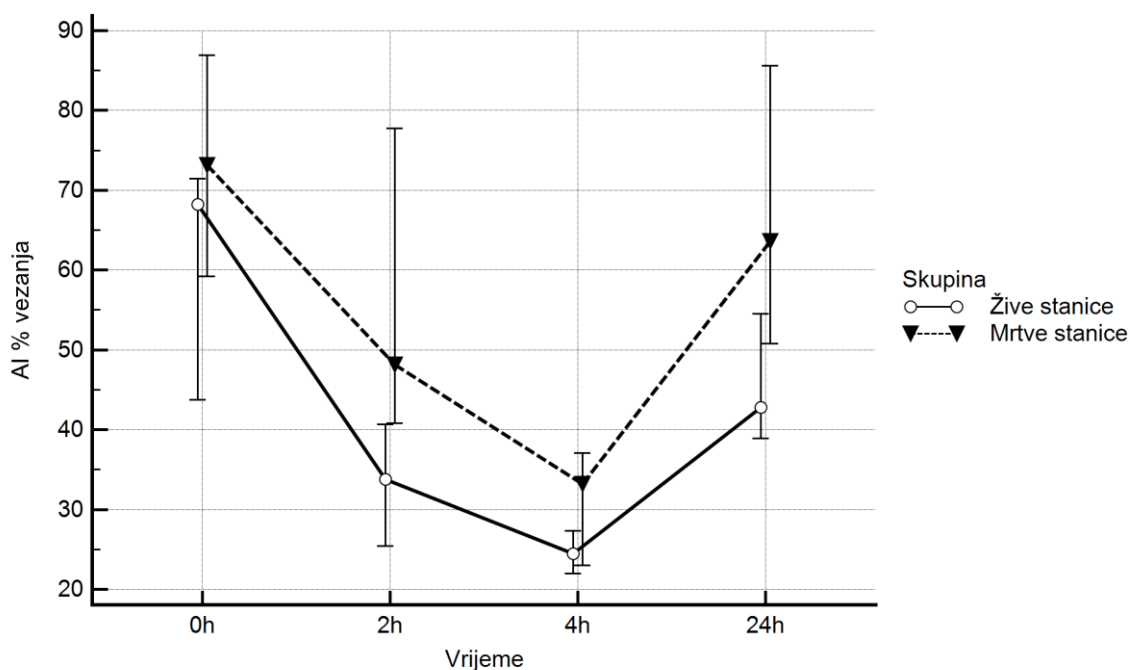
**Slika 47.** Razlike u dinamici vezanja  $\text{Cu}^{2+}$  između živih stanica ( $P=0,025$ ) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $P=0,001$ ): Friedmanov test



**Tablica 33.** Razlike u udjelu vezanja  $Al^{3+}$  između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Al							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	57,23%	20,15%	10,13%	74,96%	40,70%	68,26%	71,93%
	Mrtve stanice	71,59%	16,42%	41,70%	90,69%	58,47%	73,13%	87,05%
2	Žive stanice	32,43%	10,26%	10,13%	47,23%	25,31%	33,76%	41,19%
	Mrtve stanice	54,57%	22,01%	23,51%	90,84%	40,30%	48,13%	78,25%
4	Žive stanice	24,48%	3,74%	18,63%	33,35%	21,75%	24,45%	27,49%
	Mrtve stanice	34,90%	18,41%	17,63%	86,37%	22,66%	33,17%	37,12%
24	Žive stanice	45,10%	8,64%	30,95%	59,24%	38,43%	42,81%	54,96%
	Mrtve stanice	64,82%	18,62%	36,06%	92,43%	50,31%	63,63%	87,00%

	Mann-Whitney U	Z	P
Al % vezanja 0h	121,000	-2,137	0,033
Al % vezanja 2h	67,000	-3,598	<0,001
Al % vezanja 4h	114,000	-2,326	0,020
Al % vezanja 24h	72,000	-3,463	0,001

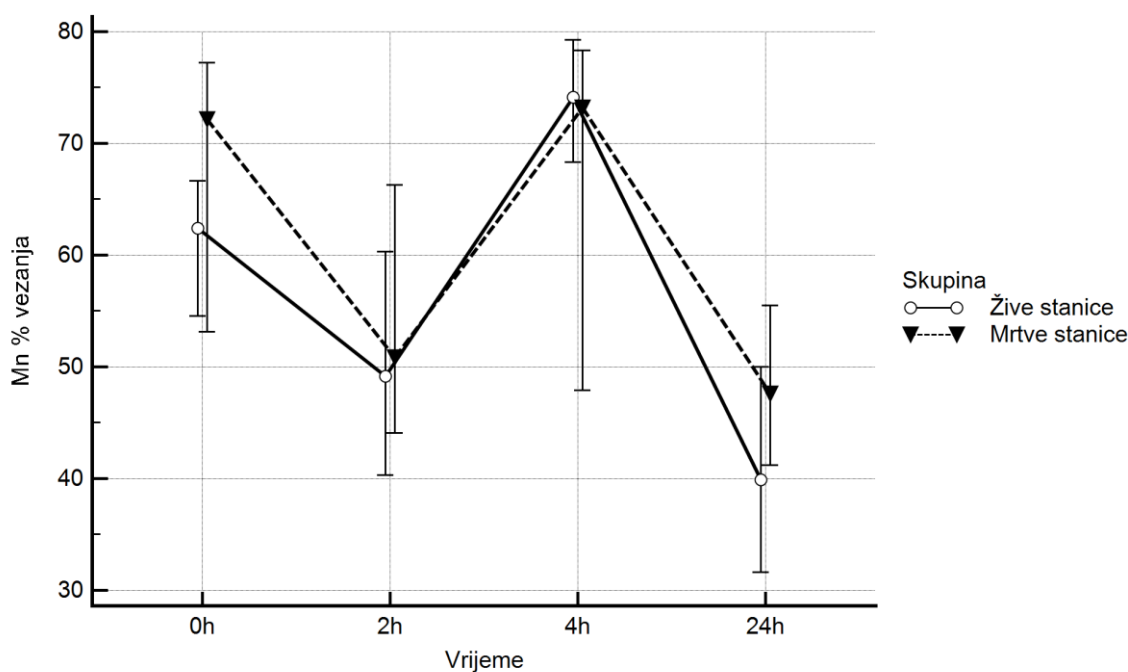


**Slika 48.** Razlike u dinamici vezanja  $Al^{3+}$  između živih stanica ( $P<0,001$ ) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $P<0,001$ ): Friedmanov test

**Tablica 34.** Razlike u udjelu vezanja  $Mn^{2+}$  između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Mn							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	62,45%	10,13%	46,00%	86,04%	54,25%	62,42%	67,11%
	Mrtve stanice	64,68%	17,58%	22,58%	81,63%	51,46%	72,14%	77,30%
2	Žive stanice	49,55%	11,05%	29,98%	65,81%	39,81%	49,18%	60,52%
	Mrtve stanice	53,11%	14,11%	24,05%	75,26%	43,44%	50,82%	66,82%
4	Žive stanice	73,96%	6,84%	60,98%	85,82%	68,04%	74,12%	80,06%
	Mrtve stanice	64,91%	19,31%	20,04%	84,59%	46,76%	73,22%	78,81%
24	Žive stanice	41,44%	12,12%	21,23%	64,04%	31,12%	39,88%	50,64%
	Mrtve stanice	47,83%	14,53%	22,81%	78,17%	40,97%	47,58%	55,87%

	Mann-Whitney U	Z	P
Mn % vezanja 0h	144,000	-1,515	0,130
Mn % vezanja 2h	168,000	-0,866	0,387
Mn % vezanja 4h	168,000	-0,866	0,387
Mn % vezanja 24h	15<0,001	-1,353	0,176

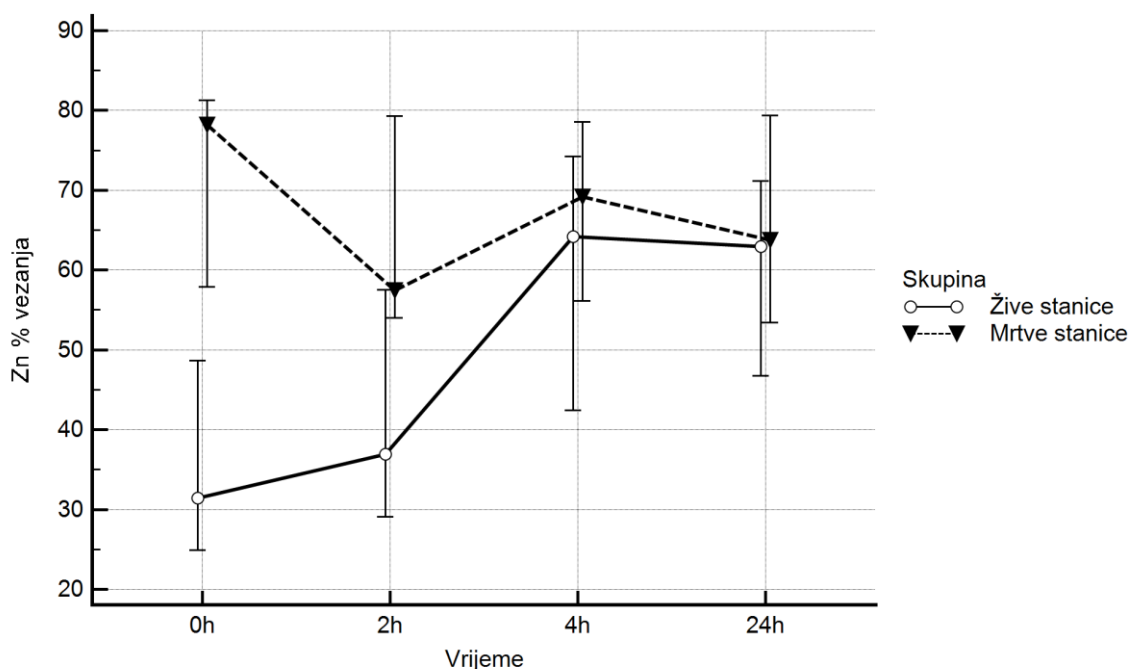


**Slika 49.** Razlike u dinamici vezanja  $Mn^{2+}$  između živih stanica ( $P<0,001$ ) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $P=0,028$ ): Friedmanov test

**Tablica 35.** Razlike u udjelu vezanja  $Zn^{2+}$  između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20) : Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Zn							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	35,73%	13,43%	18,81%	57,21%	24,90%	31,42%	49,13%
	Mrtve stanice	70,88%	12,17%	52,50%	82,64%	57,41%	78,20%	81,45%
2	Žive stanice	41,38%	13,54%	27,07%	63,04%	28,96%	36,95%	57,62%
	Mrtve stanice	64,62%	13,31%	49,70%	82,64%	53,93%	57,49%	79,50%
4	Žive stanice	60,65%	17,86%	30,42%	85,47%	42,37%	64,22%	74,35%
	Mrtve stanice	65,82%	16,40%	27,59%	83,71%	54,50%	69,15%	78,90%
24	Žive stanice	59,35%	13,96%	36,02%	81,36%	46,61%	62,93%	71,81%
	Mrtve stanice	64,68%	16,41%	38,86%	89,90%	53,18%	63,79%	79,47%

	Mann-Whitney U	Z	P
Zn % vezanja 0h	9,000	-5,167	<0,001
Zn % vezanja 2h	67,000	-3,598	<0,001
Zn % vezanja 4h	164,000	-0,974	0,330
Zn % vezanja 24h	161,000	-1,055	0,291

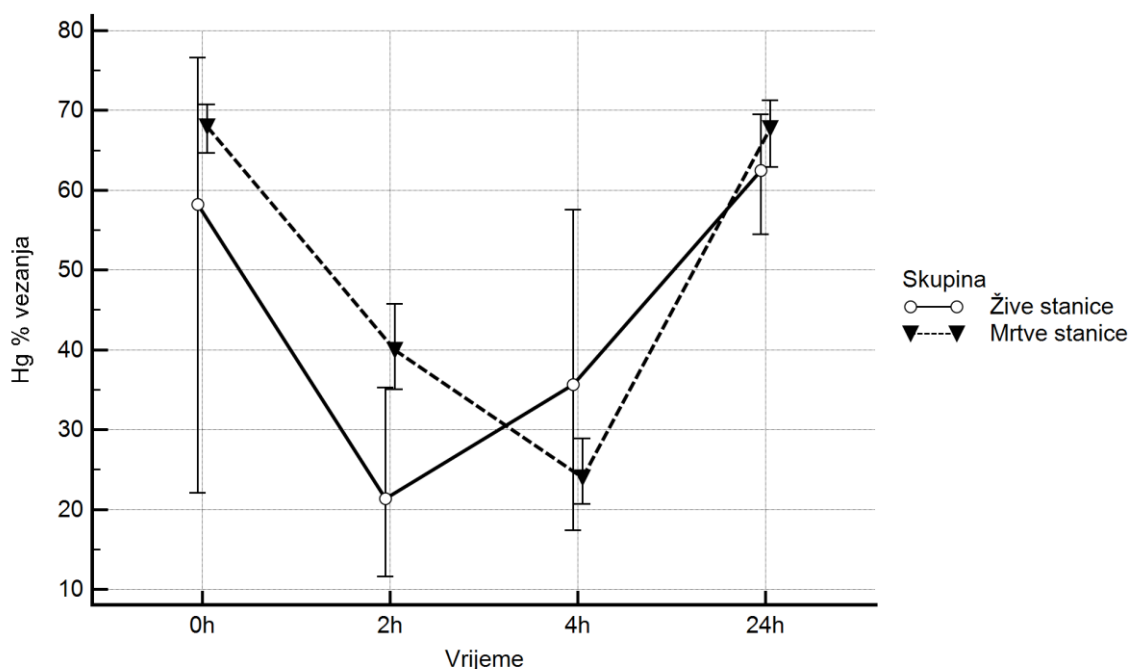


**Slika 50.** Razlike u dinamici vezanja  $Zn^{2+}$  između živih stanica ( $P<0,001$ ) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $P=0,141$ ): Friedmanov test

**Tablica 36.** Razlike u udjelu vezanja  $Hg^{2+}$  između živih i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta (N=20): Mann-Whitney U test

Vrijeme inkubacije (h)	% vezanja Hg							
	BMK	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
						25.	Medijan	75.
0	Žive stanice	50,68%	29,95%	4,15%	88,50%	19,54%	58,25%	76,76%
	Mrtve stanice	66,89%	5,74%	51,75%	74,30%	64,23%	67,98%	70,89%
2	Žive stanice	23,34%	14,21%	6,05%	52,20%	11,01%	21,35%	35,91%
	Mrtve stanice	40,57%	7,61%	27,65%	55,90%	34,78%	39,98%	46,48%
4	Žive stanice	38,51%	21,63%	11,35%	72,40%	16,56%	35,65%	58,55%
	Mrtve stanice	25,04%	5,78%	15,00%	36,60%	20,65%	23,98%	29,03%
24	Žive stanice	60,30%	14,69%	22,65%	81,20%	54,41%	62,50%	69,70%
	Mrtve stanice	63,99%	14,90%	20,65%	78,45%	62,95%	67,73%	71,28%

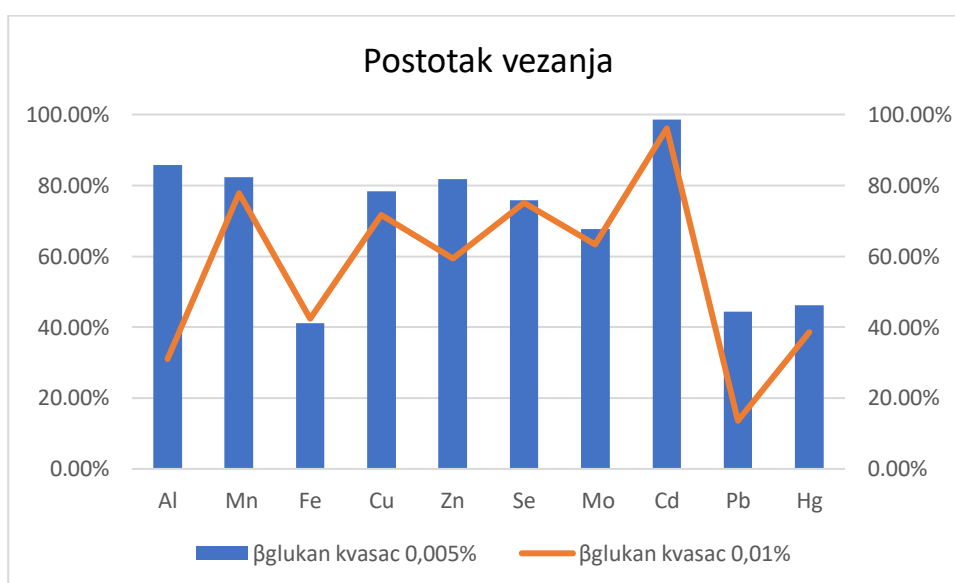
	Mann-Whitney U	Z	P
Hg % vezanja 0h	18<0,001	-0,541	0,589
Hg % vezanja 2h	66,500	-3,611	<0,001
Hg % vezanja 4h	157,000	-1,163	0,245
Hg % vezanja 24h	153,000	-1,272	0,204



**Slika 51.** Razlike u dinamici vezanja  $Hg^{2+}$  između živih stanica ( $P<0,001$ ) i mrtvih stanica bakterija *Lc. lactis* i odabranih *Lactobacillus* vrsta ( $P<0,001$ ): Friedmanov test

#### 4.4. Vežanje metala $\beta$ -glukanom

Za ispitivanje sposobnosti vežanja metala u mlijeku  $\beta$ -glukanom korišten je  $\beta$ -glukan izoliran iz kvasca u koncentracijama 0,01 i 0,005 % (w/v). Uzorci mlijeka su umjetno kontaminirani metalima u sljedećim koncentracijama: Hg, Pb, Cd  $2 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Mo i Se  $10 \mu\text{gL}^{-1}$ , Mn i Cu  $50 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Fe  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Al  $500 \mu\text{gL}^{-1}$ ; Zn  $1 \text{mgL}^{-1}$ . Postotak vežanih metala određivan je ICP-MS tehnikom nakon 0-tog sata inkubacije. Rezultati istraživanja prikazani su na slici 52.

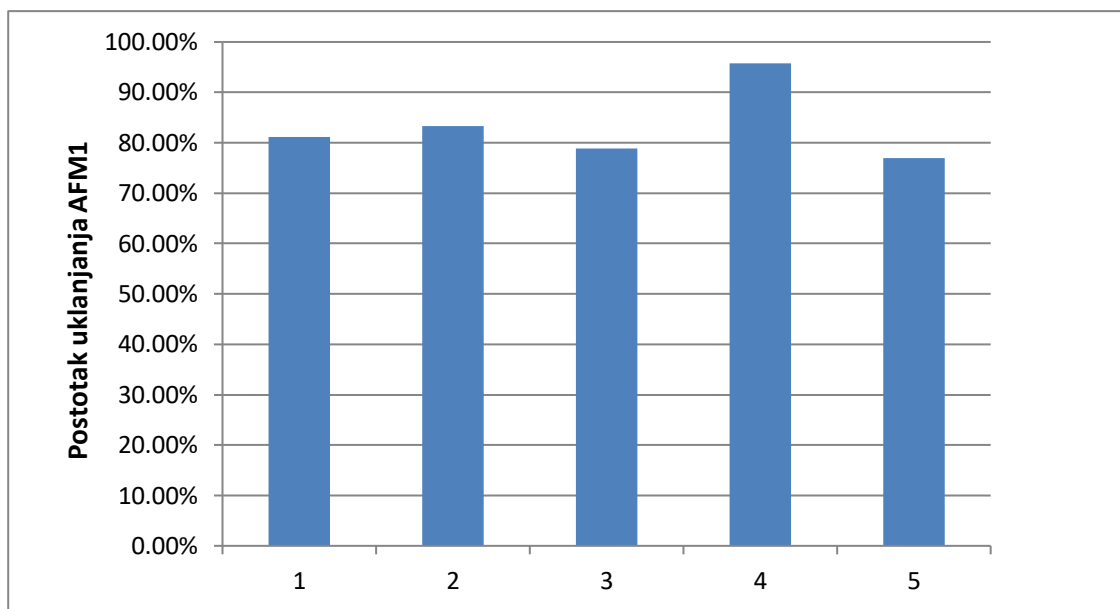


Slika 52. Postotak vežanja metala  $\beta$ -glukanom (0,01 i 0,005 %) izoliranim iz kvasca

#### 4.5. Uklanjanje kompleksa BMK - AFM1

Na osnovu rezultata vežanja AFM1 odabranim sojevima BMK, za daljnje istraživanje uklanjanja kompleksa BMK-AFM1 odabran je soj *L. plantarum* KM, koji je pokazao najbolju sposobnost vežanja AFM1. Bakterije su u uzorak mlijeka kontaminiran s AFM1 dodane kao žive ( $10^8 \text{CFUmL}^{-1}$ ), mrtve ( $1 \text{mgmL}^{-1}$ ) i liofilizirane stanice (0,5 %). Uzorci su uzimani u 0-tom satu (10-15 min nakon homogenizacije uzorka). Kompleks BMK-AFM1 izdvojen je iz uzorka mlijeka postupkom centrifugiranja (6000 rpm tijekom 30 minuta), nakon čega je uslijedila filtracija (brzina protoka od  $0,5 \text{mLmin}^{-1}$ ). Supernatant uzorka sakupljen nakon uklanjanja kompleksa BMK-AFM1 pripremljen je za određivanje postotka nevezanog AFM1 HPLC tehnikom. Za

svaki pokus uključena je bila i pozitivna kontrola (samo AFM1 u mlijeku). Rezultati istraživanja su prikazani na slici 53.



**Slika 53.** Usporedba učinkovitosti metoda uklanjanja kompleksa BMK- AFM1

1 - Uklanjanje AFM1 (0,5 µg/L) iz mlijeka filtracijom; 2 - uklanjanje AFM1(0,5 µg/L) iz mlijeka filtracijom i centrifugiranjem; 3 - uklanjanje AFM1 + žive stanice *L. plantarum* KM filtracijom i centrifugiranjem; 4 - uklanjanje AFM1 + mrtve stanice *L. plantarum* KM filtracijom i centrifugiranjem; 5 - uklanjanje AFM1 + liofilizirane stanice *L. plantarum* KM filtracijom i centrifugiranjem

#### 4.6. Uklanjanje kompleksa BMK-metali

Uklanjanje kompleksa BMK-metali provedeno je pomoću soja *L. plantarum* SM1 koji je pokazao najbolju sposobnost vezanja metala. U uzorak mlijeka kontaminiran metalima (Hg, Pb, Cd 2 µgL<sup>-1</sup>; Mo i Se 10 µgL<sup>-1</sup>, Mn i Cu 50 µgL<sup>-1</sup>; Fe 100 µgL<sup>-1</sup>; Al 500 µgL<sup>-1</sup>; Zn 1 mgL<sup>-1</sup>) dodane su bakterije *L. plantarum* SM1 kao žive (10<sup>8</sup> CFUmL<sup>-1</sup>) i mrtve (1 mgmL<sup>-1</sup>) stanice. Uzorci su uzimani u 0-tom satu (10-15 min nakon homogenizacije uzorka). Kompleks BMK-metali izdvojen je iz uzorka mlijeka postupkom centrifugiranja (6000 rpm tijekom 30 minuta), nakon čega je uslijedila filtracija (brzina protoka od 0,5 mLmin<sup>-1</sup>). Supernatant uzorka sakupljen nakon

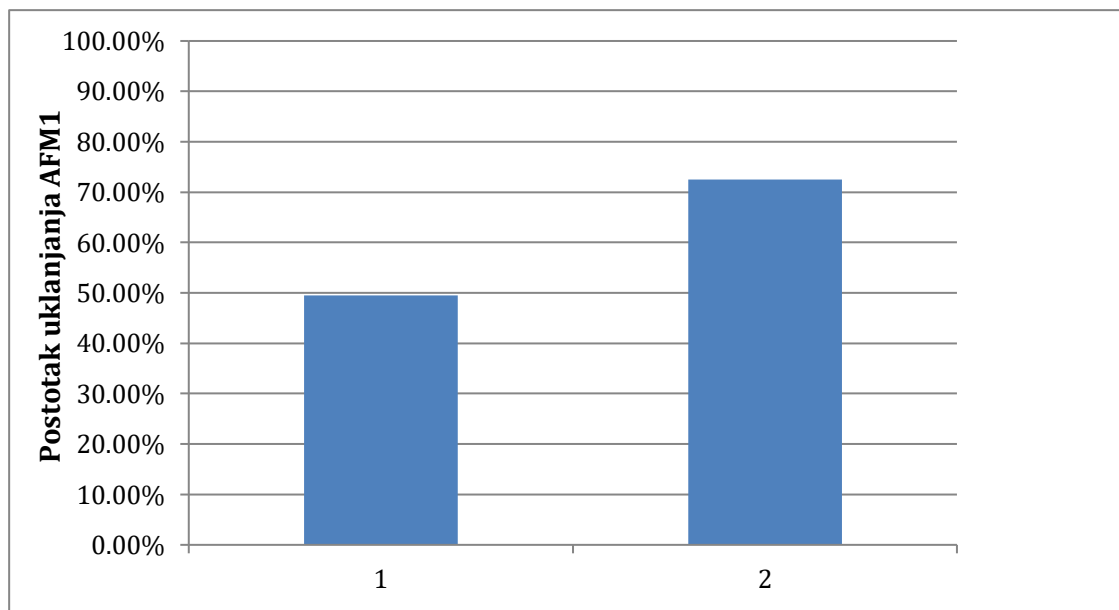
uklanjanja kompleksa BMK-metali pripremljen je za određivanje postotka nevezanih metala ICP-MS tehnikom. Za svaki pokus uključena je bila i pozitivna kontrola (samo metali u mlijeku). Rezultati učinkovitosti metoda uklanjanja kompleksa BMK-metali prikazani su u tablici 37.

**Tablica 37.** Usporedba učinkovitosti metoda uklanjanja kompleksa BMK-metali

Metal	uklanjanje metala iz mlijeka filtracijom	uklanjanje metala iz mlijeka filtracijom i centrifugiranjem	uklanjanje metala + žive <i>st L. plantarum</i> SM1 filtracijom i centrifugiranjem	uklanjanje metala + mrtve <i>st L. plantarum</i> SM1 filtracijom i centrifugiranjem
Al	40,34%	67,55%	40,06%	68,21%
Mn	72,26%	57,26%	69,27%	45,70%
Fe	39,25%	30,51%	43,28%	21,93%
Cu	65,28%	50,60%	67,12%	52,16%
Zn	45,60%	47,66%	56,38%	27,20%
Se	41,22%	46,91%	62,55%	42,17%
Mo	67,21%	30,87%	63,17%	44,42%
Cd	94,85%	86,18%	93,90%	88,89%
Pb	54,23%	31,48%	27,71%	20,03%
Hg	35,02%	23,57%	18,51%	25,96%

#### 4.7. Uklanjanje kompleksa $\beta$ -glukan-AFM1/metali

Nakon provedenih istraživanja vezanja AFM1/metala  $\beta$ -glukanom u nastavku se željelo vidjeti da li se i taj kompleks može određenim postupcima izdvojiti iz tekućeg medija, u ovom slučaju mlijeka. U uzorak mlijeka kontaminiran s  $0,50 \mu\text{gL}^{-1}$  AFM1 dodan je  $\beta$ -glukan izoliran iz kvasca *S. cerevisiae*. Uzorci su uzimani u 0-tom satu (10-15 min nakon homogenizacije uzorka). Nastali kompleks  $\beta$ -glukan-AFM1 izdvojen je iz uzorka mlijeka centrifugiranjem pri 3500 rpm u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa maksimalnog volumena 70 mL. Supernatant uzorka sakupljen nakon uklanjanja kompleksa  $\beta$ -glukan-AFM1 pripremljen je za određivanje postotka nevezanog AFM1 HPLC tehnikom (slika 54). Za svaki pokus uključena je bila i pozitivna (samo AFM1 u mlijeku) kontrola.



**Slika 54.** Usporedba učinkovitosti metoda uklanjanja kompleksa  $\beta$ -glukan-AFM1 iz mlijeka nakon centrifugiranja u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa

*1-uklanjanje AFM1 ( $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ) iz mlijeka bez dodatka  $\beta$ -glukana*

*2-uklanjanje AFM1 ( $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ ) iz mlijeka uz dodatak  $\beta$ -glukana izoliranog iz kvasca*

Međutim iz uzoraka mlijeka kontaminiranih odabranim metalima i dodanim  $\beta$ -glukanom, nastali kompleks  $\beta$ -glukan-metali nije se mogao izdvojiti centrifugiranjem pri 3500 rpm u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa maksimalnog volumena 70 mL, jer su uzorci bili jako viskozni, došlo je do zgrušavanja mlijeka što je otežavalo filtriranje i uzorci nisu bili iskoristivi za daljnju provedbu pokusa.



## **5. RASPRAVA**

Učinkovitost metoda uklanjanja/vezanja mikotoksina ovisi o brojnim parametrima: vrsti mikotoksina, svojstvima hrane, sastavu i sadržaju vode te o razini onečišćenja. Međutim, jedinstvena i ujedno djelotvorna metoda za sve mikotoksine i materijale, ipak ne postoji. Stoga, suvremena znanstvena istraživanja, ukazuju na potrebu za daljnjim razvojem primjene biofiksatora u uklanjanju/vezanju ili biotransformaciji mikotoksina iz namirnica i krmiva. Takvi postupci trebaju omogućiti inaktivaciju mikotoksina, uništiti štetne metabolite plijesni, a da se hranjiva vrijednost i organoleptičke osobine namirnice, koja se obrađuje ne promijeni. Mnogi mikroorganizmi, mogu ukloniti ili smanjiti količine aflatoksina u hrani i krmi. Među tim potencijalnim mikroorganizmima, BMK predstavljaju jedinstvenu skupinu koja se naširoko koristi u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda, a znanstvena istraživanja su im pridodala i sposobnost vezanja mikotoksina (Haskard i sur. 2001; Peltonen i sur. 2001; Markov i sur. 2010; Khoury i sur., 2011; Elsanhoty i sur., 2014, Frece i Markov, 2016). Uz BMK kao dobri biofiksatori mikotoksina pokazale su se i komponente stanične stijenke, kao što je  $\beta$ -glukan izoliran iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Hodnik i Anderluh, 2009; Habschied i sur., 2011; Čvek i sur., 2012; Zoghi i sur., 2014).

### 5.1. Vezanje AFM1 pomoću BMK

U eksperimentima su korištene žive, mrtve i liofilizirane stanice BMK. Rezultati vezanja AFM1 pomoću BMK su prikazani u Poglavlju 4.1. (slike 14-19). Ovisno o korištenom soju, vremenu inkubacije i odabranom parametru, uspješnost vezanja AFM1 stanicama BMK iznosila je od 15,75-94,49 %. Različita učinkovitost vezanja različitih sojeva potvrđena je u istraživanju, koje su proveli Pierides i sur. (2000). Napravljena je usporedba vezanja AFM1 sojevima *L. rhamnosus* GG i *L. rhamnosus* 1/3. Uočena je velika razlika u učinkovitosti vezanja, iako su navedeni sojevi genetski relativno slični. Stoga, smatra se da srodni sojevi mogu posjedovati različitu biološku aktivnost. Peltonen i sur. (2001) također navode, kako je vezanje AFB1 specifično za soj: sojevi *Lactobacillus* su vezali 17,3-59,7 % AFB1, sojevi *Bifidobacterium* 18,0-48,7 % te sojevi *Lactococcus* 5,6-41,1 % AFB1. Uzroci specifičnosti sojeva za vezanje AFB1 su nepoznati, ali se smatra da imaju veze s različitostima u komponentama stanične stijenke, posebice peptidoglikana (Ma i sur., 2017). Muhialdin i sur. (2020) su proučavali detoksifikaciju aflatoksina pomoću BMK. Rezultati su pokazali da se uporabom sojeva *L. rhamnosus* GG i *L. rhamnosus* LC-705 koncentracija AFB1 smanjila za 80%.

U ovom istraživanju kao najefikasniji soj pokazao se *L. plantarum* KM nakon 4 sata inkubacije, bilo da se radi o živim ili mrtvim stanicama. Međutim, toplinska obrada stanica je značajno povećala učinkovitost vezanja (s 92,7-94,5 %,  $P < 0,05$ ). Ovi rezultati su u skladu s onima autora Kabak i Var (2008), koji su također primijetili rast u vezanju između živih (7,9–25,9 %) i mrtvih stanica (12,9–27,3 %) sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* nakon 4 sata inkubacije. Pierides i sur. (2000) su također primijetili da se učinkovitost uklanjanja AFM1 kod sojeva *Lactobacillus* značajno poboljšala nakon toplinske obrade.

Svi navedeni rezultati ukazuju na to da bakterije mliječne kiseline ne trebaju biti žive, kako bi vezale AFM1. Iako mehanizam vezanja nije još uvijek do kraja razjašnjen, pretpostavka je da se molekule AFM1 fizički vežu na komponente bakterijske stijenke, umjesto stvaranja kovalentnih veza ili umjesto da budu metabolizirane (Lahtinen i sur., 2004; Shetty i Jespersen, 2006). Nadalje, čini se kako toplinska obrada povećava dostupnu površinu za vezanje AFM1 (Haskard i sur., 2001). Istraživanje provedeno u ovom doktorskom radu također je pokazalo da je vezanje AFM1 reverzibilno: svi odabrani sojevi BMK su otpustili dio vezanog AFM1 tijekom inkubacije. Žive stanice soja *L. plantarum* KM su nakon 24 sata otpustile veliki postotak AFM1, što dodatno naglašava prednost upotrebe mrtvih stanica (slike 14,15,17 i 18).

U uzorcima mlijeka s dodanim AFM1 se kod svih sojeva BMK pokazalo da žive stanice u koncentraciji od  $10^8$  CFU $\text{mL}^{-1}$  bolje vežu AFM1 nego stanice u koncentraciji od  $10^6$  CFU $\text{mL}^{-1}$ . Primjerice, za žive stanice soja *Lc. lactis* 5MS1 se u 0-tom satu pokazala uspješnost vezanja od 70,23 % za  $10^6$  CFU $\text{mL}^{-1}$  i 77,98 % za  $10^8$  CFU $\text{mL}^{-1}$  (slika 14). Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Ma i sur. (2017). Uzeli su deset bakterijskih sojeva te su istraživali uspješnost vezanja AFB1. Kada je primijenjena koncentracija stanica od  $10^6$  CFU $\text{mL}^{-1}$ , od svih sojeva samo je *Lactobacillus plantarum* PT5B pokazao sposobnost vezanja (4 %). Kada je primijenjena koncentracija stanica od  $10^9$  CFU $\text{mL}^{-1}$ , svi sojevi vezali su AFB1 s time da se najveća učinkovitost vezanja kretala od 23,9–33 %. Navedeno istraživanje je pokazalo da učinkovitost vezanja ovisi o broju stanica. Ovu pretpostavku dodatno potvrđuje i istraživanje drugih autora (El-Nezami i sur., 1998), koji su ustanovili kako je koncentracija stanica najvažniji faktor, koji utječe na uklanjanje aflatoksina. Njihovo istraživanje je pokazalo, kako je potrebna minimalna koncentracija od  $2 \times 10^9$  CFU $\text{mL}^{-1}$  za značajno uklanjanje AFB1. Line i Brackett (1995) su također utvrdili najnižu koncentraciju stanica potrebnu za uklanjanje AFB1, a to je prema njima  $1 \times 10^9$  CFU $\text{mL}^{-1}$ . El-Nezami i sur. (1998) su pri koncentraciji stanica od  $2 \times 10^{10}$  CFU $\text{mL}^{-1}$  postigli učinkovitost vezanja od 99 % za soj *L. rhamnosus* GG te 87 % za *L. rhamnosus* LC-705. Line i Brackett (1995) su pri koncentraciji stanica od  $10^{10}$  CFU $\text{mL}^{-1}$

postigli učinkovitost vezanja od 80 % za soj *F. aurantiacum*. U istraživanju koje su radili Kabak i Var (2008) također je uočena ovisnost učinkovitosti vezanja AFM1 o koncentraciji stanica. Pri koncentraciji stanica od  $10^7$  CFU $\text{mL}^{-1}$  učinkovitost vezanja AFM1 iznosila je 0-5,02 % za sve odabrane sojeve, bez obzira na vrijeme inkubacije.

Statistički značajno ( $P < 0,05$ ) vezanje AFM1 ( $0,50 \mu\text{gL}^{-1}$ ) uočeno je kod soja *L. plantarum* KM živim i mrtvim stanicama nakon 4 sata inkubacije u usporedbi s liofiliziranim stanicama (58,37 % odnosno 59,18 %) (slika 14-19). Najveći postotak vezanja zabilježen je kod mrtvih stanica soja *L. plantarum* KM u 4. satu (94,49 %) (slika 18). Najmanji postotak vezanja AFM1, bilo da se radi o koncentraciji 0,05 ili  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ , među svim živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama zabilježen je kod liofiliziranog soja *L. plantarum* SMB u 24-tom satu (15,75 %) (slika 19). Na slikama 14-19 je vidljivo da liofilizirane stanice slabije vežu AFM1 u 0-tom satu u odnosu na žive i mrtve stanice. Nakon 24 sata nema značajne promjene u vezanju ( $p > 0,05$ ). Mrtve stanice soja *L. plantarum* SM1 pokazuju znatno veći postotak vezanja AFM1 (74,93 %) u 2. satu u odnosu na žive (24,90 %) i liofilizirane stanice (42,74 %) ( $P < 0,05$ ) (slika 17-19). Na slikama 14-16 je vidljivo da za soj *L. rhamnosus* KM nema velike razlike u vezanju AFM1 između živih, mrtvih i liofiliziranih stanica nakon 4 sata. U 0., 2. i 24. satu su uočene velike razlike u vezanju. Mrtve stanice su vezale značajno više AFM1 u odnosu na žive stanice (do 44,62 %) i na liofilizirane stanice (do 50,73 %) ( $P < 0,05$ ). Više je mogućih razloga slabijeg vezanja AFM1 liofiliziranim stanicama. Za proces liofilizacije najprije je potrebno smrznuti uzorak te vodu ukloniti sublimacijom. Tijekom procesa zamrzavanja izvan stanica se stvaraju kristali te se povećava izvanstanična osmolalnost. Čim se formira led izvan stanica, počinje dehidracija stanica. Kako pada temperatura, unutarstanična i izvanstanična koncentracija otopine raste dok se ne dostigne eutektička točka (Bovo i sur., 2014). Kristali leda mogu biti preveliki i oštetiti strukturu bakterijske stanice (Morgan i sur., 2006). Liofilizacija (faza sušenja) može dovesti do oštećenja stanične stijenke, stanične membrane i DNA (Carvalho i sur., 2004). El Nezami i sur. (1998) također su pretpostavili da do razlika u vezanju između živih i mrtvih stanica te liofiliziranih dolazi zbog promjena u komponentama stanične stijenke.

Razlike u vezanju između kultiviranih i liofiliziranih bakterijskih stanica mogu se javiti zbog promjena u komponentama stanične stijenke, koje mogu biti potaknute kultiviranjem stanica. Naime, medij za kultivaciju može se razlikovati od medija za liofilizaciju (Haskard i sur., 2001).

U suprotnosti je istraživanje koje su radili Pierides i sur. (2000). Pokazalo se da je postotak uklanjanja AFM1 živim i mrtvim te liofiliziranim stanicama sojevima *L. rhamnosus* GG i *L. rhamnosus* 705 vrlo sličan. Malena razlika uočena je jedino između mrtvih i liofiliziranih stanica kod soja *L. rhamnosus* 705 (51,6 % i 57,4 %).

Za soj *L. plantarum* SS1 se pokazalo da mrtve stanice bolje vežu AFM1 od živih stanica, što je posebno izraženo u 0-tom satu (razlika do 35,1 %) (slika 14 i 15). Mrtve stanice soja *L. paracasei* KM pokazuju znatno veći postotak vezanja AFM1 u odnosu na žive stanice tijekom cijelog vremena inkubacije (razlika do 44,48 %) (slika 14 i 15) ( $P < 0,05$ ). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem, koje navode Bovo i sur. (2014). Istraživanje provedeno na bifidobakterijama je pokazalo da žive stanice vežu 4-56 %, a mrtve vežu 12-82 % AFB1. Utvrđeno je da se vezanje aflatoksina bakterijama mliječne kiseline ne temelji na detoksifikacijskom procesu izvanstaničnim metabolitima, nego glavnu ulogu imaju komponente stanične stijenke bakterija mliječne kiseline (Damayanti i sur., 2017). Prema Bueno i sur. (2007) uklanjanje AFB1 bakterijama mliječne kiseline ne ovisi o vijabilnosti stanica te kod bakterija ne dolazi do metaboličke konverzije toksina. S obzirom da mrtve stanice pokazuju sposobnost vezanja toksina, zaključeno je da ne dolazi do kovalentnog vezanja ili metaboličke razgradnje. Haskard i sur. (2001) smatraju da se molekule AFB1 na bakteriju vežu slabim nekovalentnim vezama. Polisaharidi i peptidoglikan su najvažnije komponente stanične stijenke odgovorne za vezanje (Bata i Lasztity, 1999; Lahtinen i sur., 2004). Pretpostavka je da između molekula AFB1 i bakterijskih stanica nastaju slabe Van der Waals-ove veze, vodikove veze ili hidrofobne interakcije (Pizzolitto i sur., 2011). Ringot i sur. (2007) navode, kako složenost mikrobne strukture ukazuje na postojanje više načina zarobljavanja toksina unutar bakterijske stanice. Vezanje na površinu stanica je brz, fizikalno-kemijski proces, koji se odvija između toksina i funkcionalnih grupa na površini stanice. Temelji se na fizičkoj adsorpciji, izmjeni iona i stvaranju kompleksa. Stanična stijenka mikroorganizama je većinom sastavljena od polisaharida, proteina i lipida, koji sadrže mnogo različitih funkcionalnih grupa (karboksilne, hidroksilne, fosfatne, amino grupe i hidrofobna mjesta pogodna za adsorpciju toksina). Pretpostavka je da u vezanju AFB1 ulogu imaju i teihoične kiseline prisutne u staničnoj stijenci gram pozitivnih bakterija, te da njihova odsutnost smanjuje učinkovitost vezanja (Hernandez-Mendoza i sur., 2009). To stavlja naglasak na važnu ulogu građe stanične stijenke u vezanju toksina. Jedan od razloga boljeg vezanja AFM1 mrtvim stanicama mogao bi biti što tijekom procesa zagrijavanja dolazi do denaturacije proteina i povećanja hidrofobnosti površine stanice. Drugi razlog je nastanak produkata Maillardovih reakcija između polisaharida i peptida i proteina. Kiseline mogu razoriti

glikozidne veze u molekulama polisaharida, odnosno amidne veze kod peptida i proteina (Haskard i sur., 2001; El-Nezami i sur., 2002). Denaturacija omogućava molekuli AFM1 da se veže na komponente stanične stijenke, koje nisu bile dostupne kada je stanica bila netaknuta (Haskard i sur., 2001). U skladu s tim istraživanjima je i ono provedeno od strane Pieridesa i sur. (2000). Njihovi rezultati su pokazali, kako inaktivacija stanica zagrijavanjem dovodi do efikasnijeg uklanjanja AFM1 (Pizzolitto i sur., 2011). U istraživanju koje su proveli Haskard i sur. (2000) se pokazalo da uništavanje određenih komponenti bakterijske stanične stijenke (npr. ugljikohidrata i proteina) kod soja *Lb. rhamnosus* GG dovodi do smanjenja vezanja AFB1.

U ovom istraživanju kao izuzetak je soj *L. plantarum* SMB za koji se pokazalo da žive stanice u 4. satu vežu do 40 % više AFM1 nego mrtve stanice (slika 17 i 18). To je u skladu s dobivenim rezultatima istraživanja, koje su proveli Kabak i Var (2008). Prema njima, mrtve stanice nisu pokazale veću učinkovitost uklanjanja AFM1 iz otopine PBS-a. Ma i sur. (2017) su u svojim istraživanjima za soj *Pediococcus acidilactici* EQ01 pokazali da žive stanice bolje vežu AFB1 nego mrtve (21,92 % prema 2,44 %).

Kod nekih sojeva je uočen mehanizam vezanje – otpuštanje – vezanje AFM1 (soj *L. plantarum* SM1, slika 14 i 17), kod nekih je uočeno bolje vezanje (*L. plantarum* SS1, slika 14 i 17), a kod nekih je postotak vezanog AFM1 održavan tijekom inkubacije (*L. plantarum* SMA, slika 15 i 18). Pizzolitto i sur. (2011) su proučavali uklanjanje AFB1 bakterijama mliječne kiseline u različitim vremenima inkubacije te nisu uočili značajne promjene. U vremenima od 1, 5, 60 i 360 min za soj *L. fermentum cellobiosus* 408 dobivene vrijednosti uklanjanja AFB1 iznosile su 61,5, 64,3, 62,8 i 63,8 %. To je u skladu s rezultatima, koje su dobili ostali autori (El-Nezami i sur., 1998; Peltonen i sur., 2001), koji upotrebom nekoliko sojeva bakterija mliječne kiseline nisu uočili značajne razlike u vezanju AFB1 nakon 72 sata. Budući se pokazalo da za proces vezanja treba tako malo vremena (1 min), pretpostavka je da molekule AFB1 ne ulaze u stanicu, kao što je već navedeno (Karaman i sur., 2005; Lahtinen i sur., 2004; Raju i Devegowda, 2000). Kabak i Var (2008) također nisu uočili značajnu razliku u uklanjanju AFM1 tijekom različitih perioda inkubacije. Primjerice, žive stanice soja *L. acidophilus* NCC 36 unutar 0, 4 i 24 h vezale su 22,23, 23,47 i 22,24 % AFM1. U radovima drugih autora se također navodi da je vezanje AFM1 mikrobnim stanicama brzi proces te da se se maksimalno vezanje dogodi u prvih par minuta kontakta (Bovo i sur., 2013; Corassin i sur., 2013; Serrano-Nino i sur., 2013). Mehanizam vezanje – otpuštanje – vezanje uočen je u radu autora El-Nezami i sur. (1998). Ispitivano je vezanje AFB1 različitim sojevima tijekom 0, 4, 24, 48, 72 h. Skoro svi sojevi otpustili su određeni postotak AFB1 nakon 24 sata, a vezanje se ponovno nastavilo nakon 48 h.

Bueno i sur. (2007) su napravili model, koji predlaže da se mehanizam vezanja odvija u dva procesa: vezanje (adsorpcija) i otpuštanje (desorpcija) za/od mjesta vezanja na površini stanice mikroorganizma. Tim je modelom ustanovljeno da je učinkovitost vezanja AFB1 pomoću bakterija mliječne kiseline *in vitro* i *in vivo* povezana sa sojem bakterije, kao i s brojem mjesta vezanja na površini stanice.

Što se tiče utjecaja koncentracije toksina na učinkovitost vezanja, pokazalo se da s promjenom koncentracije toksina nije došlo do promjene u učinkovitosti vezanja. Primjerice, soj *Lc. lactis* 5MS1 je pri kontaminaciji AFM1 od  $0,05 \mu\text{gL}^{-1}$  pokazao učinkovitost vezanja od 77,98 %, dok je pri kontaminaciji AFM1  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$  pokazao učinkovitost vezanja od 77,93 % (slika 14 i 17) ( $P > 0,05$ ). Ti rezultati su u skladu s istraživanjima, koja su proveli Kabak i Var (2008). Kod njih se za sojeve *L. acidophilus* NCC12 i *L. acidophilus* NCC36 pokazalo da u 0-tom satu pri koncentraciji AFM1 od  $5 \text{ ngmL}^{-1}$  vežu 24,08 % i 26,38 % AFM1. Za te iste sojeve se pokazalo da u 0-tom satu pri koncentraciji AFM1 od  $20 \text{ ngmL}^{-1}$  vežu 24,75 % i 26,22 % AFM1. El-Nezami i sur. (1998) su također utvrdili, kako učinkovitost uklanjanja AFB1 ne raste s porastom koncentracije AFB1.

Na temelju dosad provedenih istraživanja, uočeno je da je uspješnost uklanjanja nešto manja za AFM1 nego za AFB1. Mogući razlog je što molekula AFM1 ima dodatnu –OH skupinu i to povećava polarnost same molekule AFM1. Samim time molekula AFM1 je hidrofилnija i ima tendenciju zaostajanja u vodenoj otopini (Pierides i sur., 2000). Na temelju istraživanja, koje su proveli Brackett i Marth uočena je povezanost AFM1 s mliječnim proteinom, kazeinom. Smatra se da se AFM1 veže na kazein, te da je zbog toga manja uspješnost uklanjanja AFM1 nego AFB1 (Brackett i Marth, 1982).

## 5.2. Vezanje AFM1 $\beta$ -glukanom

Jedan od ciljeva ovoga rada bio je ispitati sposobnost vezanja AFM1 iz umjetno kontaminiranog mlijeka pomoću  $\beta$ -glukana izoliranog iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao biofiksatora. Prema saznanju nedostatnih je literaturnih podataka o upotrebi  $\beta$ -glukana za vezanje AFM1 iz mlijeka, već su istraživanja uglavnom provedena sa zearalenonom (ZEN). Yiannikouris i sur. (2006) su proučavali vezanje mikotoksina  $\beta$ -D-glukanom. Pokazalo se da  $\beta$ -D-glukani, posebice oni vezani  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 vezom, a na mjestima grananja  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6 vezom,

pokazuju afinitet prema mikotoksinima. Proučavanjem mehanizma vezanja na molekuli ZEN-a utvrđeno je da hidroksilne, laktonske i keto grupe ZEN-a stvaraju vodikovu vezu s hidroksilnim skupinama zavojnice (1→3)-β-D-glukana. Van der Waalsove veze se stvaraju između fenil skupina ZEN-a i β-D-glukopiranoznih skupina (1→3)-β-D-glukana. Piotrowska i Masek (2015) u svom radu navode dobro vezanje okratoksina glukonom izoliranim iz stanične stijenke kvasca.

U ovom radu upotrijebljen je β-glukan u koncentracijama 0,01 % i 0,005 %. Rezultati vezanja prikazani su na slikama 20 i 21. Početna koncentracija AFM1 u mlijeku iznosila je 0,5 μgkg<sup>-1</sup>, odnosno 0,05 μgkg<sup>-1</sup>. U ovom istraživanju se pokazalo da koncentracija AFM1 nema značajnu ulogu na sposobnost vezanja β-glukana, s obzirom da su upotrebom obje koncentracije dobiveni slični rezultati. Dobiveni rezultati mogu se usporediti s istraživanjima drugih autora (Pizzolitto i sur., 2011), iako autori nisu istraživanja proveli s β-glukanom i AFM1, već su ispitivali sposobnost vezanja AFB1 različitim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri tri različite koncentracije AFB1. Primjerice, za soj *S. cerevisiae* 01 se pri koncentracijama AFB1 od 50 ngmL<sup>-1</sup>, 100 ngmL<sup>-1</sup> i 500 ngmL<sup>-1</sup> postigla učinkovitost vezanja od 38,6 %, 31,7 % i 32,8 %. Suprotno tome, Goncalves i sur. (2017) su napravili istraživanje, koje je pokazalo da se učinkovitost vezanja mikotoksina kvascem *S. cerevisiae* povećala kad su primijenjene niže koncentracije mikotoksina (Goncalves i sur., 2017). Armando i sur. (2011) su proučavali da li promjenom koncentracije AFB1 dolazi do promjene u učinkovitosti vezanja. Kod nekih sojeva je primijećen linearan pad, kod nekih linearan rast, a kod nekih nelinearan pad, odnosno rast. El-Nezami i sur. (1998) su u svom radu utvrdili da je s porastom koncentracije AFB1 porasla i količina vezanog AFB1, ali učinkovitost uklanjanja se nije značajno promijenila. Uz sve navedeno, može se zaključiti da su potrebna dodatna istraživanja vezana uz ovisnost koncentracije mikotoksina i učinkovitosti uklanjanja.

Kada se promatra vezanje β-glukana, uočljivo je da 0,01 % β-glukana u nultom satu veže značajno više AFM1 ( $P < 0,05$ ) u odnosu na 0,005 % β-glukana. Na slikama 20 i 21 je također vidljivo, kako upotrebom 0,01 % β-glukana sposobnost vezanja AFM1 pada linearno s vremenom. Kada je u mlijeko dodan AFM1 u koncentraciji od 0,5 μgkg<sup>-1</sup>, niža koncentracija β-glukana pokazala je pad sposobnosti vezanja AFM1 do 4. sata. Međutim, nakon 4. sata primijećen je rast vezanja AFM1, a maksimum je postignut u 24. satu (slika 20).

U pokusima kada je u mlijeko dodan AFM1 u koncentraciji od 0,05 μgkg<sup>-1</sup>, dokazano je da se sposobnost vezanja AFM1 β-glukanom povećava nakon 2. sata do svog maksimuma u 24. satu. Takav nelinearan pad, odnosno rast objašnjava se činjenicom da je reakcija nastajanja kompleksa između AFM1 i β-glukana reverzibilna reakcija, što je u skladu s rezultatima drugih



autora (Faucet-Marquis i sur., 2014; Yiannikouris i sur., 2006, Pizzolitto i sur., 2012). Istraživanja pokazuju da je adsorpcija mikotoksina reverzibilni proces, koji se može definirati kao kemijska ravnoteža (Ramos i Hernandez, 1996; Grant i Phillips, 1998).

U ovom radu rezultati primjene  $\beta$ -glukana pokazuju dobro vezanje u 0.-tom satu, što je u skladu s istraživanjima drugih autora. Istraživanja drugih autora (Aazami i sur., 2018; Bovo i sur., 2013; El-Nezami i sur., 1998) pokazuju da razlike između vezanja AFB1 nakon 30 min, 5 h i 24 h nisu značajne iz čega se može zaključiti, kako je vezanje aflatoksina vrlo brzi proces. Faucet-Marquis i sur. (2014) su u svom radu istraživali utjecaj vremena inkubacije na vezanje mikotoksina pomoću stanične stijenke kvasca. Njihovi rezultati su također pokazali da je vezanje brzi proces, jer je u manje od 5 min vezana jednaka količina mikotoksina kao i nakon 90 min.

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti kako mehanizam vezanja AFM1 i  $\beta$ -glukana još uvijek nije dovoljno razjašnjen te nema dovoljno podataka za usporedbu s rezultatima ovog doktorskog rada.

### **5.3. Vezanje metala pomoću BMK**

Akumulacija iona metala gljivama i kvascima dobro je istražena, ali se malo zna o vezanju metala pomoću bakterija mliječne kiseline. Proces biosorpcije metala od strane mikroorganizama uglavnom ovisi o ionima metala, vanjskim uvjetima i vrsti mikroorganizama. Sposobnost vezanja teških metala bakterijama ovisi o vrsti, građi i funkcionalnim skupinama na površini stanične stijenke (Mrvčić i sur., 2009). Neke BMK posjeduju u vanjskom dijelu stanične stijenke tzv. S-sloj za koji se smatra da sudjeluje u vezanju metala, te bakterije koje ga posjeduju mogu postići veću učinkovitost vezanja (Selenska-Pobell i Merroun, 2010).

U ovom je radu ispitano vezanje metala (Cu, Zn, Fe, Se, Hg, Cd, Pb, Al, Mo, Mn) pomoću BMK, a rezultati istraživanja su prikazani u tablicama 7 - 28 i na slikama 22 – 43. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su se odabrani sojevi BMK pokazali kao dobri biofiksatori metala. U ovisnosti o parametrima (žive i mrtve stanice, broj stanica, vrijeme inkubacije) BMK vežu metale u rasponu od 4-98,50 % (žive stanice), odnosno u rasponu od 9,38–96,80 % kao mrtve stanice.

Rezultati ovih istraživanja su u suglasju s rezultatima Ibrahim i sur. (2006) koji su također pokazali da među različitim sojevima postoje značajne razlike u afinitetu prema različitim metalima, te stoga postoje i velike razlike u količini vezanih metala. Ameen i sur. (2020) su

također istraživali sposobnost vezanja pojedinih metala pomoću BMK i rezultati su pokazali da se sojem *L. plantarum* MF042018 uspješno uklanjaju ioni nikla i kroma.

### 5.3.1. Vezanje Fe

Rezultati vezanja Fe odabranim sojevima BMK u ovisnosti o parametrima provedbe pokusa (žive, mrtve stanice, broj živih stanica i vrijeme inkubacije) pokazuju da su žive stanice vezale od 6,56-90,02 %, a mrtve od 17,99-89,57 % Fe.

Nije bilo značajnih razlika u udjelu vezanja željeza obzirom na broj živih stanica BMK ( $P=0,406$  za 0-ti sat) kao ni u dinamici vezanja unutar pojedine skupine živih stanica (tablica 7 i slika 22). Također, nije primijećena značajna razlika u udjelu vezanja Fe pri koncentraciji biomase mrtvih stanica BMK od  $5 \text{ mgmL}^{-1}$  mlijeka kao ni u dinamici vezanja unutar pojedine skupine (tablica 17 i slika 32). To je u skladu s rezultatima koje su dobili Cabuk i sur. (2007) koji su dokazali da povećanjem koncentracije biomase dolazi do formiranja stanica u nakupine i pritom se smanjuje učinkovitost vezanja.

Razlike u udjelu vezanja Fe između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne u svim vremenima mjerenja (0-ti sat, 2., 4. i 24. sat), a kao efikasnije su se pokazale mrtve stanice, dok nije bilo značajnih razlika u dinamici vezanja između živih stanica ( $P=0,173$ ) i mrtvih stanica BMK ( $P=0,516$ ) (tablica 27 i slika 42).

Rezultati su u suglasju s istraživanjima Hassan i sur. (2009), koji također navode bolje vezanje mrtvim stanicama. Pretpostavka je da zbog izostanka metabolizma i odsutnosti gradijenta protona može doći do stvaranja negativnog naboja na površini mrtvih stanica i posljedično se stvara veći afinitet za katione metala.

Jedan od razloga vezanja iona Fe bakterijama mliječne kiseline je sprječavanje patogenih mikroorganizama da ga koriste (Kammler i sur., 1993). Prema istraživanju koje su proveli Kot i sur. (1995) svi sojevi bakterija mliječne kiseline pokazali su sposobnost vezanja Fe. Učinkovitost vezanja za soj *L. plantarum* pokazala se ovisna o prisutnosti molekula glukoze. U odsutnosti glukoze akumulacija iona Fe bila je vrlo niska za sve sojeve osim za *L. acidophilus* i *L. bulgaricus*. U prisutnosti glukoze vezanje Fe pomoću bakterija mliječne kiseline naglo je poraslo.

### 5.3.2. Vežanje Se

Selen je esencijalni mikronutrijent za živa bića, koji pomaže u održavanju normalnih fizioloških funkcija organizma. S druge strane, ima i toksični potencijal ako se u organizmu nađe u visokim koncentracijama (Mörschbacher i sur., 2018). Iz navedenih razloga istraženo je vežanje Se bakterijama mliječne kiseline. Rezultati su pokazali da se učinkovitost vežanja Se kretala od 5,86-88,13 % za žive te od 28,96-87,47 % za mrtve stanice. Kao najbolji biofiksator Se pokazao se soj *L. plantarum* SM1. Mörschbacher i sur. (2018) su istraživali sposobnost vežanja Se pomoću 8 sojeva bakterija mliječne kiseline. Svi sojevi pokazali su sposobnost vežanja Se, s time da su se najefikasniji pokazali *L. paracasei* ML13 i *L. paracasei* CH135 ( $38,1 \pm 1,7 \text{ mgg}^{-1}$  i  $40,7 \pm 1,1 \text{ mgg}^{-1}$ ).

Iz rezultata prikazanih u tablici 8 i na slici 23 vidi se da nije bilo značajnih razlika u udjelu vežanja Se ( $P > 0,05$ ) s obzirom na broj živih stanica BMK kao ni u dinamici vežanja unutar pojedine skupine živih stanica BMK. Također nije primijećena ni značajna razlika u udjelu vežanja Se s obzirom na mrtve stanice BMK ( $P > 0,05$ ) (tablica 18). Dinamika vežanja bila je značajno različita unutar obje ispitivane skupine mrtvih stanica ( $P = 0,014$  za skupinu stanica koncentracije  $1 \text{ mgmL}^{-1}$  i  $P = 0,001$  za skupinu stanica koncentracije  $5 \text{ mgmL}^{-1}$ ) (slika 33).

Za obje koncentracije biomase mrtvih stanica ( $1$  i  $5 \text{ mgmL}^{-1}$ ) se pokazalo da je najbolje vežanje postignuto u 0-tom satu što je u skladu s Mrvčić i sur. (2009), koji navode da je prva faza vežanja brz, pasivni proces vežanja na staničnu stijenku.

Razlike u udjelu vežanja Se između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne u početnom mjerenju (mrtve stanice su u 0-tom satu vezale za 29,84 % više Se nego žive stanice) (tablica 28), dok su razlike u dinamici vežanja bile značajne u skupini mrtvih stanica ( $P < 0,001$ ) (slika 43). Skupina mrtvih stanica pokazala je mehanizam vežanja – otpuštanja – vežanja metala, a isti takav mehanizam je primijećen i u pokusima vežanja AFM1 s BMK .

### 5.3.3. Vežanje Mo

Molibden je esencijalni mikroelement važan za biljke i životinje. Postoji značajna varijabilnost u toksičnosti Mo, koja ovisi o kemijskom obliku u kojem se nalazi. Njegov metabolizam je povezan s metabolizmom bakra te ima sposobnost inhibicije apsorpcije Cu i Fe u crijevima (Vyskočil i Viau, 1999).

Iz dobivenih rezultata (tablica 9 i slika 24) vidljivo je da nije bilo značajnih razlika u udjelu vezanja Mo s obzirom na broj živih stanica BMK, odnosno da je postotak vezanja Mo podjednak za obje koncentracije živih stanica ( $10^6$  i  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) (u 0-tom satu P = 0,290). U pokusima s mrtvim stanicama BMK također nije primijećena značajna razlika u udjelu vezanja Mo s obzirom na koncentracije mrtvih stanica kao ni u dinamici vezanja unutar pojedine skupine. Za skupinu stanica koncentracije 1 mgmL<sup>-1</sup> dobivena je vrijednost P=0,896, a za skupinu stanica koncentracije 5 mgmL<sup>-1</sup> dobivena je vrijednost P=0,540 (tablica 19 i slika 34).

Razlike u udjelu vezanja Mo između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne u 0-tom satu gdje su mrtve stanice vezale za 53,88 % više Mo nego žive stanice (P=0,045) (tablica 29). Razlike u dinamici vezanja bile su značajne u skupini živih stanica (P=0,008). U 2. satu je vezano za 31,34 % više Mo nego u 0-tom satu te se taj postotak vezanja održavao tijekom cijelog vremena inkubacije. Mrtve stanice su najveći dio Mo vezale već u 0-tom satu (slika 44), što ukazuje na pasivni mehanizam vezanja (Mrvčić i sur., 2009).

Kao najbolji soj za vezanje Mo pokazao se soj *L. plantarum* SS1, koji je u ovisnosti o parametrima uzgoja vezao od 55,46-96,25 % Mo.

#### 5.3.4. Vezanje Cd

U provedenom istraživanju učinkovitost vezanja Cd kretala se od 4,0-98,50 % za žive stanice te od 13,25-97,70 % za mrtve stanice (tablice 10 i 20). Dobiveni rezultati su djelomično sukladni istraživanjima drugih autora koji su dobili manju učinkovitost vezanja Cd BMK. Tako su Zhai i sur. (2015) dobili raspon uklanjanja Cd s pomoću 33 soja BMK u rasponu od 3,56-31,34 %. Od svih ispitanih sojeva, 10 njih je pokazalo učinkovitost vezanja iznad 18 %. Kao najbolji soj pokazao se *L. plantarum* CCFM8610 (31,34±0,14 %). Istraživanja ostalih autora (Bhakta i sur., 2012a; Bhakta i sur., 2012b; Halttunen i sur., 2008) su pokazala da biosorpcija Cd mikroorganizmima varira od eksperimenta do eksperimenta zbog različitih uvjeta, koji vladaju prilikom nastajanja kompleksa. U istraživanju koje su proveli Kinoshita i sur. (2013) svi odabrani sojevi (103 soja) pokazali su sposobnost vezanja (0,459±0,016 ppm do 0,951±0,007 ppm), ali se ona razlikovala za svaki pojedinačni soj.

Što se tiče utjecaja broja bakterijskih stanica na sposobnost vezanja, u ovom radu se pokazalo da je sposobnost vezanja Cd u blagom porastu s porastom broja živih stanica ( $10^8$  CFUmL<sup>-1</sup>), ali taj rast nije statistički značajan (tablica 10). Elsanhoty i sur. (2016) su zabilježili porast učinkovitosti vezanja s porastom koncentracije stanica na soju *L. plantarum*. Pretpostavka

je da je to zbog povećanog broja dostupnih mjesta za vezanje. Puranik i Paknikar (1999), Halttunen i sur. (2007) i Teemu i sur. (2008) su uočili da pri jako visokoj koncentraciji biomase dolazi do smanjenja sposobnosti uklanjanja metala zbog nastajanja nakupina stanica, koje smanjuju površinu dostupnu za vezanje.

Ispitivanje razlike u udjelu vezanja Cd biomasom mrtvih stanica pokazalo je da je nakon 4 h skupina stanica koncentracije  $5 \text{ mgmL}^{-1}$  imala značajno veće vrijednosti u udjelu vezanja Cd od skupine stanica koncentracije  $1 \text{ mgmL}^{-1}$  ( $P=0,028$ ) (tablica 20). Dinamika vezanja bila je značajno različita unutar skupine stanica koncentracije biomase  $1 \text{ mgmL}^{-1}$  ( $P=0,002$ ) (slika 35).

Najveća učinkovitost vezanja Cd kod živih i mrtvih stanica zabilježena je u 0. satu (tablice 10 i 20), a dobiveni rezultati se razlikuju od rezultata nekih autora koji su dokazali da je najveća učinkovitost vezanja zabilježena na kraju vremena inkubacije (300 min) (Elsanhoty i sur., 2016), odnosno razlikuje se od istraživanja Halttunen i sur. (2007) i Teemu i sur. (2008), koji navode kako vrijeme inkubacije nema nikakav utjecaj na vezanje Cd. Međutim, dobiveni rezultati u ovom radu su s druge strane u suglasju s rezultatima Ibrahim i sur. (2006), koji su dokazali kako vrijeme inkubacije utječe na vezanje metala probiotičkim bakterijama i da se najveći dio Cd vezao u vremenu između 5 min i 1 h. U radu autora Kirillova i sur. (2017) nije uočena nikakva povezanost između karakteristika površine stanice (hidrofobnost, naboj) i uklanjanja Cd. To ukazuje na pretpostavku da se radi o akumulaciji Cd unutar stanice, što ne ovisi o fizičkim karakteristikama površine stanice. U prilog toj tvrdnji ide i činjenica da se uklanjanje Cd pomoću BMK odvijalo unutar 24 h inkubacije.

Razlike u udjelu vezanja kadmija između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne u početnom mjerenju ( $P=0,025$ ) i nakon 4 h ( $P=0,018$ ), dok su razlike u dinamici vezanja između živih i mrtvih stanica BMK bile značajne u obje skupine ( $P<0,001$ ) (tablica 30 i slika 45).

### 5.3.5. Vezanje Pb

Iz rezultata prikazanih u tablicama 11 i 21 vidljivo je da žive stanice BMK vežu Pb od 23,06-70,30 %, a mrtve od 9,38-76,29 %. Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima istraživanja Halttunen i sur. (2008) koji su također dobili veliki raspon učinkovitosti vezanja Pb između sojeva od 39,7-69,6 %. U istraživanju koje su proveli Liu i sur. (2019) uzeto je 10 sojeva BMK, koji su prethodno izolirani iz tradicionalnih fermentiranih mliječnih proizvoda i provedeni su pokusi dokazivanja učinkovitosti vezanja Pb u vodenim otopinama i na MRS agaru. Rezultati su pokazali da je adsorpcijski kapacitet svakog soja mnogo manji na MRS agaru, nego u vodenoj otopini. Najveći adsorpcijski kapacitet su pokazali sojevi *L. plantarum* (70-100 % u vodenoj

otopini i 60-78 % na MRS agaru). Sojevi *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* i *Streptococcus thermophilus* su pokazali manju učinkovitost vezanja (60–80 % u vodenoj otopini i 30–50 % na MRS agaru). Pretpostavka je da organski spojevi prisutni u MRS agaru sprječavaju BMK da vežu Pb (Liu i sur., 2019).

Iz rezultat prikazanih u tablici 11 vidljivo je da je nakon 4 h bio značajno veći udio vezanja Pb u skupini s brojem živih stanica BMK  $10^8$  CFU $mL^{-1}$  ( $P=0,010$ ). To je u skladu s Elsanhoty i sur. (2016), koji su zabilježili porast učinkovitosti vezanja s porastom koncentracije stanica. Dinamika vezanja nije bila značajno različita unutar obje ispitivane skupine živih stanica ( $P>0,05$ ) (slika 26). Kada se radila usporedba vezanja Pb obzirom na koncentraciju biomase mrtvih stanica BMK, nije bilo značajnih razlika. Unutar obje skupine stanica (1 i 5 mg  $mL^{-1}$ ) prisutan je mehanizam vezanja – otpuštanja – vezanja, s time da je dinamika vezanja značajno različita unutar skupine stanica koncentracije 1 mg $mL^{-1}$  ( $P=0,026$ ) (tablica 21 i slika 36).

Razlike u udjelu vezanja Pb između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne u početnom mjerenju, gdje su mrtve stanice vezale za 9,11 % više Pb nego žive stanice ( $P=0,009$ ) (tablica 31). Najveća učinkovitost vezanja je postignuta u 0-tom satu (slika 46). To je u skladu s rezultatima autora Lin i sur. (2019), koji su pokazali da se u kratkom vremenu (1 h) može vezati veliki dio iona Pb bakterijama mliječne kiseline, što znači da najvažniju ulogu što se tiče mehanizma vezanja ima biosorpcija. Nakon što je većina mjesta za vezanje metala na površini stanica zauzeta, dolazi do procesa bioakumulacije. Slične rezultate prikazali su i autori Fein i sur. (1997). U suprotnosti je istraživanje autora Tobin i sur. (1984), koji navode kako je maksimalna koncentracija Pb sojem *Rhizopus arrhizus* vezana nakon 18 h inkubacije.

#### 5.3.6. Vezanje Cu

U pokusima vezanja Cu dobivene su vrijednosti od 42,23-88,96 % što ukazuje na različitu sposobnost vezanja različitih sojeva, a u ovisnosti o parametrima vođenja pokusa. Prema dosadašnjim spoznajama razlike u sposobnosti vezanja Cu među različitim sojevima mogu se pripisati razlikama u strukturi i funkcionalnim grupama. Pretpostavka je da je biosorpcija Cu BMK povezana s fizičkom i kemijskom adsorpcijom te izmjenom iona na površini bakterijske stanice (Tian i sur., 2015). U radu autora Mrvčić i sur. (2009) dokazano je da se ioni bakra mogu uspješno vezati sojevima *L. mesenteroides* i *L. brevis*, dok se soj *L. plantarum* pokazao manje efikasnim. Također se navodi, kako do razlika u sposobnosti vezanja različitih sojeva dolazi zbog različitih svojstava bakterija, poput strukture, funkcionalnih grupa i površine dostupne za vezanje.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da nije bilo značajnih razlika u udjelu vezanja Cu s obzirom na broj živih stanica BMK kao ni u dinamici vezanja unutar pojedine skupine (tablica 12 i slika 27). Nije bilo značajnih razlika u udjelu vezanja Cu ni s obzirom na koncentraciju biomase mrtvih stanica BMK. Dinamika vezanja bila je značajno različita unutar skupine stanica koncentracije biomase  $5 \text{ mgmL}^{-1}$  ( $P=0,031$ ) (tablica 22 i slika 37).

Razlike u udjelu vezanja Cu između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne u početnom mjerenju (0-ti sat) gdje su mrtve stanice vezale više Cu nego žive stanice (razlika 12,58 %,  $P=0,001$ ). Razlike u dinamici vezanja bile su značajne u obje skupine ( $P=0,025$  za žive stanice i  $P=0,001$  za mrtve stanice) (tablica 32 i slika 47).

Autori Schut i sur. (2011) i Mrvčić i sur. (2009), su u svojim radovima pokazali da vezanje Cu bakterijama mliječne kiseline slijedi linearni obrazac. Međutim rezultati drugih autora navode da mrtve stanice imaju veći afinitet za katione metala (Hassan i sur., 2009), odnosno da zagrijavanjem biomase dolazi do povećanja broja mjesta dostupnih za vezanje iona metala te se time povećava i učinkovitost vezanja (Halttunen i sur., 2003; Halttunen i sur., 2007). Suprotne rezultate dobili su Tian i sur. (2015), koji su pomoću 16 bakterijskih sojeva istraživali razliku u vezanju Cu između živih i mrtvih stanica. Pokazalo se da svi živi sojevi vežu Cu bolje od mrtvih sojeva, pa autori pretpostavljaju da se zagrijavanjem stanična struktura oštetila i na taj način se smanjio broj mjesta za vezanje metala. Slične rezultate dobili su i drugi autori (Tian i sur., 2012; Zhai i sur., 2013; Aksu i sur., 2001).

U istraživanju koje su proveli Schut i sur. (2011) ispitivana je sposobnost vezanja Cu različitim sojevima bakterija mliječne kiseline. Za sojeve *L. buchneri* DSM 20057 i *L. hilgardii* DSM 20176 u različitim vremenima inkubacije (5 min, 30 min, 1 h, 2 h i 24 h) visoka učinkovitost vezanja postignuta je već nakon 5 min, što ukazuje na pasivni mehanizam vezanja. Stanice soja *L. plantarum* DSM 20174 pokazale su smanjenje učinkovitosti vezanja Cu, dok su stanice soja *L. vini* DSM 20605 pokazale stalni rast tijekom vremena inkubacije od 30 min do 2 h. Iz toga se može zaključiti da kod nekih sojeva tijekom vremena dolazi do otpuštanja Cu, dok ga neki sojevi aktivno akumuliraju. Maksimalni kapacitet vezanja mrtvim stanicama postignut je nakon 30 min. Pretpostavka je da je do tog vremena sustav došao u stanje ravnoteže u kojem je broj vezanih iona jednak broju nevezanih (Naja i sur., 2010). Mrvčić i sur. (2009) u svom radu navode, kako se vezanje iona Cu odvija u dvije faze. Prva faza se odvija unutar prva 3 sata u kojima je vezana većina Cu. Međutim, s daljnjim porastom vremena inkubacije dolazi do daljnjeg porasta učinkovitosti vezanja.

### 5.3.7. Vežanje Al

Aluminij je metal, koji je široko rasprostranjen u okolišu te je našao svoju primjenu u svakodnevnom životu. Može imati različite fiziološke učinke kod ljudi i životinja (Yu i sur., 2015).

U ovom radu učinkovitost vežanja Al bakterijama mliječne kiseline se kretala od 10,13-74,96 % za žive stanice i od 17,63-92,43 % za mrtve stanice. Kao najbolji soj pokazao se *L. plantarum* SMA, a slične rezultate su dobili Yu i sur. (2015), koji su dokazali da je najbolju učinkovitost uklanjanja Al pokazao soj *L. plantarum* CCFM639 (64,54 %).

Skupina živih stanica BMK od  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> pokazala je značajno veći udio vežanja Al, i to nakon 4 h (P=0,010). Dinamika vežanja bila je značajno različita obzirom na broj živih stanica BMK ( $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> P=0,001 ;  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> P<0,001) (tablica 13 i slika 28).

Istraživanjima nije dokazana značajna razlika u udjelu vežanja Al s obzirom na koncentraciju biomase mrtvih stanica BMK (tablica 23). Razlike u udjelu vežanja Al između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne u svim vremenima mjerenja (0, 2, 4 i 24 h) (P<0,05) (tablica 33). Razlike u dinamici vežanja bile su značajne u obje skupine (žive i mrtve stanice) (P<0,001) Rast vežanja je zabilježen u 0-tom (68,26 % za žive i 73,13 % za mrtve stanice) i 24. satu (42,81 % za žive stanice i 63,63 % za mrtve stanice) (slika 48).

S obzirom da je visoka učinkovitost vežanja postignuta već u 0-tom satu, radi se o brzom procesu vežanja (pasivni mehanizam) što je u skladu s radom autora Schut i sur. (2011).

### 5.3.8. Vežanje Mn

Odabrani sojevi BMK pokazali su sposobnost vežanja Mn u rasponu od 21,23 - 86,04 % za žive stanice i od 20,04-84,59 % za mrtve neovisno o upotrijebljenoj koncentraciji stanica (tablice 14 i 24). Nije bilo značajnih razlika u udjelu vežanja Mn obzirom na broj živih stanica (P=0,705 u 24. satu) (tablica 14), iako je dinamika vežanja bila značajno različita (P<0,001) unutar obje ispitivane skupine ( $10^6$  i  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), a primijećen je i mehanizam vežanja – otpuštanja – vežanja (slika 29).

Nije bilo značajnih razlika u udjelu vežanja Mn obzirom na različite koncentracije biomase mrtvih stanica BMK, a najveća učinkovitost vežanja je zabilježena u 4. satu od 71,80 % kod 1 mg mL<sup>-1</sup> odnosno od 74,50 % kod upotrijebljene biomase od 5 mg mL<sup>-1</sup> (tablica 24 i slika 39). Napravljena je usporedba vežanja Mn živim i mrtvim stanicama BMK, te se pokazalo da nema značajnih razlika u vežanju (u 0-tom satu P=0,130). U 2. i 4. satu vežanje izraženo u %



bilo je gotovo jednako kod živih i mrtvih stanica. Žive stanice su u 2. satu vezale 49,18 % Mn, dok su mrtve vezale 50,82 % Mn. U 4. satu žive stanice su vezale 74,12 % Mn, a mrtve su vezale 73,22 % Mn (tablica 34 i slika 49).

### 5.3.9. Vežanje Zn

Cink se smatra esencijalnim mineralom, koji je prisutan u svim organima i tkivima. Najvažnija uloga mu je održavanje normalne funkcije imunološkog sustava te se njegov nedostatak u organizmu može nadoknaditi obogaćivanjem hrane kompleksom BMK-Zn. S druge strane, višak Zn u organizmu može dovesti do zdravstvenih problema, a iznad određene doze može imati i smrtni ishod te bi uklanjanje navedenog metala pomoću BMK bilo vrijedna javnozdravstvena spoznaja.

U provedenom istraživanju BMK vezale su Zn od 18,81-85,47 % za žive stanice te od 27,59-89,90 % za mrtve stanice. Najbolje vežanje pokazale su mrtve stanice soja *L. plantarum* KM (89,90 %), a najlošije žive stanice *L. paracasei* KM (18,81 %). U istraživanju koje su proveli Mrvčić i sur. (2009) pokazalo se da se vežanje Zn bakterijama mliječne kiseline značajno razlikuje od soja do soja. Najbolju učinkovitost vežanja je pokazao soj *L. mesenteroides*. Razlike u vežanju među sojevima se mogu objasniti promjenama u pH vrijednosti, koncentraciji biomase i temperature (Halttunen i sur., 2007).

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da nije bilo značajnih razlika u udjelu vežanja Zn obzirom na broj živih stanica (tablica 15), kao ni značajnih razlika u udjelu vežanja Zn obzirom na koncentraciju biomase mrtvih stanica BMK (tablica 25). Dinamika vežanja bila je značajno različita obzirom na broj živih stanica BMK ( $P=0,014$ ) (slika 30).

U radu autora Mrvčić i sur. (2009) je povećanje koncentracije stanica dovelo do povećanja količine vezanih iona Zn, što se može objasniti povećanjem broja slobodnih mjesta za vežanje. Za određivanje mehanizma vežanja Zn pomoću BMK proučavan je utjecaj vremena inkubacije. Rezultati su pokazali da se u prvoj fazi (unutar 3 sata) vezala većina Zn, a u produljenom vremenu inkubacije dolazi do daljnog porasta vežanja Zn. Pretpostavka je da je prva faza vežanja brz, pasivni proces vežanja na staničnu stijenkku, a u drugoj fazi dolazi do sporog transporta iona metala u stanicu.

U ovom doktorskom radu su razlike u udjelu vežanja Zn između živih i mrtvih stanica BMK bile značajne u početnom mjerenju i nakon 2h ( $P<0,001$ ), dok su razlike u dinamici vežanja bile značajne u skupini živih stanica BMK ( $P<0,001$ ) (tablica 35 i slika 50).

### 5.3.10. Vežanje Hg

Odabrani sojevi BMK u ovisnosti o uvjetima uzgoja pokazali su sposobnost vežanja Hg od 4,15-88,50 % za žive stanice te od 15,0-78,45 % za mrtve stanice. Rezultati istraživanja ukazuju da nije bilo značajnih razlika u udjelu vežanja Hg s obzirom na broj živih stanica ( $P > 0,05$ ) (tablica 16). Dinamika vežanja bila je značajno različita unutar obje ispitivane skupine živih stanica ( $P < 0,05$ ) (slika 31). Najveća učinkovitost vežanja je postignuta nakon 24 h, što je u skladu s istraživanjima Jadan-Piedra i sur. (2017), koji navode kako je visoka učinkovitost vežanja Hg bakterijama mliječne kiseline postignuta nakon dužeg vremena inkubacije. U pokusima koji su uključivali mrtve stanice BMK nije bilo značajnih razlika u udjelu vežanja Hg (tablica 26), a dinamika vežanja bila je značajno različita unutar obje skupine stanica ( $P < 0,001$ ) (slika 41). Žive stanice su pokazale mehanizam vežanja – otpuštanja – vežanja (slika 51).

Razlike u udjelu vežanja Hg između živih i mrtvih stanica BMK bile su značajne nakon 2h (mrtve stanice su vezale za 18,63 % više Hg u odnosu na žive stanice) (tablica 36). Jadan-Piedra i sur. također su pokazali da mrtve stanice posjeduju veći afinitet za vežanje Hg od živih stanica, što je u skladu s rezultatima ovog doktorskog rada. Njihova pretpostavka je da bakterije mogu posjedovati veći afinitet za druge komponente matriksa nego za Hg i iz tog razloga može doći do slabijeg vežanja Hg.

Neki autori su proveli istraživanja vežanja Hg s pomoću BMK u realnom sustavu. Tako su Jadan-Piedra i sur. (2017) istraživali vežanje glavnih oblika Hg u hrani (Hg(II) i CH<sub>3</sub>Hg) pomoću 10 sojeva bakterija mliječne kiseline. Ispitivanje je provedeno u simuliranim uvjetima probavnog sustava. Svi ispitani sojevi pokazali su značajnu sposobnost vežanja Hg. Za Hg(II) učinkovitost vežanja je iznosila 78–98 %, dok je za CH<sub>3</sub>Hg iznosila 74–97 %. Kinoshita i sur. (2013) su provjeravali učinkovitost vežanja Hg(II) pomoću 11 sojeva bakterija mliječne kiseline. Dobiveni rezultati su bili u rasponu od 80–90 %.

### 5.4. Vežanje metala β-glukanom

Prema dostupnoj literaturi nedostatnih je podataka o upotrebi β-glukana za vežanje metala, već su istraživanja uglavnom provedena s kvascem ili staničnom stijenkom kvasca. Stoga se u ovom doktorskome radu željelo odrediti optimalne parametre za vežanje metala iz mlijeka pomoću β-glukana.

U provedenom istraživanju se pokazalo da učinkovitost vezanja metala  $\beta$ -glukanom (0,005 % i 0,01 %) u 0-tom satu varira od 13,60-98,65 % (slika 52).  $\beta$ -glukan u koncentraciji 0,005 % je za elemente Al, Mn, Cu, Zn, Mo, Cd, Pb, Hg pokazao veću učinkovitost vezanja od  $\beta$ -glukana koncentracije 0,01 %. Statistički značajna razlika uočena je za Al i Pb, gdje je razlika u vezanju iznosila 54,76 %, odnosno 30,86 % ( $P < 0,05$ ). Za Se i Fe nema značajne razlike u vezanju između navedene dvije koncentracije  $\beta$ -glukana. Iz rezultata prikazanih na slici 52 vidljivo je da  $\beta$ -glukan pokazuje najveću sposobnost vezanja Cd i to 96,10 % u koncentraciji 0,01 %, odnosno 98,65 % u koncentraciji 0,005 %, dok najslabiji afinitet  $\beta$ -glukan pokazuje prema ionima Fe, Pb i Hg (42,31 %, 13,60 % i 38,51 % odnosno 41,13 %, 44,46 % i 46,21 %) Visoki postoci vezanja u 0-tom satu pokazuju da je proces brz, što je u skladu s radom autora Bzducha-Wrobel i sur. (2012) čije je istraživanje pokazalo brzo vezanje iona Mg na staničnu stijenkku kvasca. Učinkovitost vezanja ovisi o promjenama u sastavu i sadržaju  $\beta$ -glukana. Machado i sur. (2009) navode brzo vezanje Zn (unutar 10 min) s kvascem *Saccharomyces cerevisiae*. El-Sayed (2013) također navodi kako vezanje metala staničnom stijenkku kvasca uključuje inicijalni brzi proces u kojem je vezan najveći postotak iona metala. Brady i Duncan (1994) su u svom radu pokazali da blokiranjem amino, karboksilnih i hidroksilnih grupa u staničnoj stijenci dolazi do smanjenja sposobnosti vezanja iona Cu, što potvrđuje uključenost  $\beta$ -glukana u vezanje iona metala.

U istraživanju koje su radili Nowak i sur. (2019) je također pokazana dobra sposobnost glukana za vezanje iona Pb. Pretpostavka je da se taj proces odvija zahvaljujući velikom broju hidroksilnih skupina na površini.

Budući da nema puno podataka za usporedbu s rezultatima ovog istraživanja potrebna su daljnja ispitivanja vezana uz biološku dekontaminaciju metala  $\beta$ -glukanom.

## **5.5. Uklanjanje kompleksa biofiksator- toksikant**

Jedan od ciljeva ovog doktorskog rada bio je ispitati učinkovitost i primjenjivost metoda filtracije i centrifugiranja za uklanjanje nastalog kompleksa biofiksator- toksikant iz mlijeka.

### 5.5.1. Uklanjanje kompleksa BMK- AFM1

Nizom pokusa (poglavlje 4.1) pokazano je da svi odabrani izolati BMK bez obzira na broj živih stanica, količinu biomase mrtvih stanica i postotak liofiliziranih stanica dobro vežu AFM1 u ovisnosti o vremenu inkubacije. Kod nekih izolata uočeno je vezanje – otpuštanje-vezanje AFM1 (mehanizam vezanja koji još u potpunosti nije objašnjen), dok je kod drugih zabilježen rast vezanja ili je postotak vezanog AFM1 održavan tijekom inkubacije. Na osnovu dobivenih rezultata (slike 14 -19) vidljivo je da se kao soj koji pokazuje najbolje vezanje AFM1 pokazao *L. plantarum* KM pa su daljnji pokusi uklanjanja kompleksa BMK - AFM1 provedeni samo s tim sojem.

Na slici 53 prikazana je učinkovitost uklanjanja AFM1 iz mlijeka filtracijom sa ili bez centrifugiranja, uz/bez dodatka soja *L. plantarum* KM. Uspješnost uklanjanja AFM1 iz umjetno kontaminiranog mlijeka bez dodatka BMK procesom filtracije iznosila je 81,2 %, dok je u kombinaciji s centrifugiranjem iznosila 83,3 %. Suprotno tome, uklanjanje kompleksa AFM1-žive stanice BMK u kombinaciji s centrifugiranjem i filtracijom pokazalo se manje uspješnim i iznosilo je 78,9 %. Uklanjanje kompleksa u kombinaciji s centrifugiranjem i filtracijom značajno je poraslo na 95,7 % nakon što su primijenjene mrtve stanice. Navedeni rast uspješnosti uklanjanja kompleksa mrtvim stanicama ima veze s njihovom većom sposobnosti vezanja AFM1. Uklanjanje kompleksa AFM1-liofilizirane stanice *L. plantarum* KM filtracijom i centrifugiranjem pokazalo se najmanje učinkovitim (76,1 %). Rezultati istraživanja navedenih u ovom doktorskom radu u skladu su s rezultatima drugih autora. Assaf i sur. (2018) su u svom radu proučavali stabilnost kompleksa *L. rhamnosus* GG-AFM1 pri različitim uvjetima: filtracija, zagrijavanje i centrifugiranje. Kada su provjeravali uspješnost uklanjanja AFM1 bez dodatka bakterija mliječne kiseline filtracijom, rezultat je bio 45,1 %. Pretpostavka je da je filter uključen u zadržavanje AFM1 jer djeluje kao barijera za prolazak. Do toga može doći zbog adsorpcije AFM1 na membranu filtera. Kada su proučavali uklanjanje kompleksa AFM1-mrtve stanice BMK filtracijom i centrifugiranjem, dobili su rezultat od 49,71 %. U pokusima u kojima su koristili postupak filtracije bez centrifugiranja, rezultat je bio samo 41,43 %. Uklanjanja kompleksa pomoću živih stanica u kombinaciji filtracije i centrifugiranja se pokazala manje uspješnim (33,34 %) nego sam postupak filtracije (41,94 %). Pretpostavka je da centrifugiranje ima značajan utjecaj na uklanjanje AFM1. Mogući razlog je povećana površina kontakta između AFM1 i bakterija. No, čini se da važnu ulogu ima i postupak zagrijavanja prije centrifugiranja čime može doći do stvaranja elektrostatskih veza, poput vodikovih i Van der Waals-ovih. Nadalje, centrifugiranjem se poboljšalo zadržavanje molekula AFM1, jer je AFM1 bio vezan za

komponente mlijeka, poput masnoća ili kazeina odvojenih iz mlijeka centrifugiranjem. Afinitet AFM1 prema proteinima mlijeka dokazali su Brackett i Marth (1982).

U ovom doktorskom radu se pokazalo da je učinkovitost uklanjanja kompleksa AFM1-žive stanice *L. plantarum* KM postupkom centrifugiranja niža. Pretpostavka je da je to zato što se centrifugiranjem prekidaju elektrostatske veze između živih stanica i AFM1.

Filtracija se kao metoda pokazala učinkovita u uklanjanju AFM1 iz mlijeka, ali je za vrijeme trajanja filtracije došlo do površinskog začepljenja pora filtra, stvorio se sloj, tzv. "kolač" što je ujedno i limitirajući faktor pri protoku filtrata, ali ujedno zadržava i AFM1, pa bi bilo dobro provesti istraživanja s filtrima veličine pora 0,8 µm i većim.

Kako bi se potvrdila učinkovitost metoda iz uzorka iz kojega je izdvojen kompleks BMK-AFM1, određivan je broj poraslih kolonija BMK naciepljivanjem 0,1 mL uzorka na površinu MRS agara. Nakon inkubacije na 30 °C/48 sati, na pločama nije bilo poraslih kolonija što potvrđuje učinkovitost metode.

#### 5.5.2. Uklanjanje kompleksa BMK-metali

Metode za uklanjanje iona metala iz vodenih otopina se uglavnom sastoje od fizikalnih, kemijskih i bioloških postupaka. Međutim tijekom proteklog desetljeća, sve je veći naglasak na primjeni mikroorganizama kao što su bakterije, alge, kvasci i plijesni, za uklanjanje problema onečišćenja teškim metalima.

Istraživanja u ovom doktorskom radu pokazala su da BMK kao žive i toplinski tretirane stanice imaju sposobnost vezanja metala (poglavlje 4.3.). Između odabranih sojeva, soj *L. plantarum* SM1 je pokazao bolju sposobnost vezanja metala, stoga su pokusi uklanjanja kompleksa BMK- metali provedeni samo s tim sojem.

U tablici 37 je prikazana učinkovitost uklanjanja pojedinih metala iz mlijeka filtracijom sa ili bez centrifugiranja, uz/bez dodatka bakterijskog soja *L. plantarum* SM1. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su iz mlijeka uklonjeni metali u rasponu od 20,03-94,85 %. Uspješnost uklanjanja Al, Zn i Se iz umjetno kontaminiranog mlijeka bez dodatka BMK procesom filtracije bila je niža nego u kombinaciji s centrifugiranjem. Značajna razlika uočena je za Al te je iznosila 27,21 % ( $P < 0,05$ ). Za metale Mn, Fe, Cu, Mo, Cd, Pb i Hg se pokazalo da je efikasnije uklanjanje postignuto kada je primijenjen samo proces filtracije. Najveća razlika je uočena za Mo te je iznosila 36,34 %. Nema podataka za usporedbu s drugim istraživanjima, ali se na temelju rada

autora Assaf i sur. (2018) može pretpostaviti da je filter uključen u zadržavanje jer djeluje kao barijera za prolazak.

Za sve metale, osim za Al i Hg, se pokazalo da je uklanjanje kompleksa BMK- metal u kombinaciji s centrifugiranjem i filtracijom efikasnije kada su primjenjene žive stanice. Bolje uklanjanje kompleksa živim stanicama veže se uz pretpostavku da se zagrijavanjem stanična struktura oštećuje i na taj način se smanjuje broj dostupnih mjesta za vezanje (Tian i sur., 2015).

Izostanak poraslih kolonija na pločama s MRS agarom potvrđuje učinkovitost metode uklanjanja kompleksa BMK-metali provedena centrifugiranjem (6000 rpm tijekom 30 minuta), a zatim membranskom filtracijom uz upotrebu bakterioloških filtera poroznosti od 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 5.5.3. Uklanjanje kompleksa $\beta$ -glukan - AFM1

Na slici 54 su prikazani rezultati uklanjanja AFM1 iz mlijeka uz/bez dodatka  $\beta$ -glukana postupkom centrifugiranja u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa. Iz uzoraka mlijeka bez dodanog  $\beta$ -glukana primijenjenim postupkom uklonjeno je 50 % AFM1, dok je uz dodatak  $\beta$ -glukana izoliranog iz kvasca postignuta učinkovitost uklanjanja kompleksa  $\beta$ -glukana – AFM1 od 72 %. Predloženi postupak uklanjanja kompleksa  $\beta$ -glukan-AFM1 iz mlijeka pokazao se uspješnim, a učinkovitost metode potvrđena je upotrebom Megazyme enzimskog kita jer u uzorku mlijeka nakon uklanjanja kompleksa,  $\beta$ -glukan nije dokazan.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti da:

1. Različiti sojevi BMK u ovisnosti o parametrima (žive, mrtve, liofilizirane stanice i vrijeme trajanja pokusa) pokazuju različitu učinkovitost vezanja aflatoksina M1 koja se kretala od 15,75-94,49 %.
2. Mrtve stanice BMK pokazuju bolju sposobnost vezanja AFM1 u umjetno kontaminiranom mlijeku u odnosu na žive i liofilizirane stanice, jer se termičkom obradom stanica povećava dostupna površina za vezanje AFM1.
3. Vezanje AFM1 je reverzibilan proces, jer su neki od odabranih sojeva BMK tijekom inkubacije otpustili dio vezanog AFM1, a zatim ga ponovo vezali, dok je kod drugih sojeva uočeno da je postotak vezanog AFM1 uglavnom održavan tijekom inkubacije.
4. Vezanje AFM1 stanicama BMK je brzi proces, a maksimum vezanja se dogodi u prvih par minuta i za neke sojeve BMK iznosi > 80 %.
5. Postoje značajne razlike u afinitetu BMK prema različitim metalima, zbog čega se javljaju velike razlike u količini vezanih metala pa su tako žive stanice BMK vezale metale u rasponu od 4-98,50 %, a mrtve stanice u rasponu od 9,38-96,80 %.
6.  $\beta$ -glukan izoliran iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pokazao je sposobnost vezanja AFM1 i metala u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji.  $\beta$ -glukan od 0,01 % u nultom satu veže značajno više AFM1 u odnosu na 0,005 %  $\beta$ -glukana, dok u pokusima s metalima u nultom satu kod obje odabrane koncentracije  $\beta$ -glukana javljaju se velike razlike u količini vezanih metala od 13,60-98,65 %.
7. Predloženi postupci filtracije i centrifugiranja za uklanjanje kompleksa toksikant-biofiksator pokazali su se učinkoviti u laboratorijskim uvjetima.
8. Uklanjanje kompleksa BMK-AFM1 od 95,71% u kombinaciji s centrifugiranjem i filtracijom pokazalo se najučinkovitijim nakon što su primijenjene mrtve stanice bakterije *Lactobacillus plantarum* KM.
9. Za sve odabrane metale, osim za Pb i Hg, se pokazalo da je uklanjanje kompleksa BMK-metal od 40,06-93,90 % u kombinaciji s centrifugiranjem i filtracijom efikasnije kada su primijenjene žive stanice bakterije *Lactobacillus plantarum* SM1.
10. Postupak uklanjanja kompleksa  $\beta$ -glukan-AFM1 iz mlijeka nakon centrifugiranja u filteru Centricon Plus-70, MWCO 100 kDa pokazao se uspješnim jer je uklonjeno 72,50 % nastalog kompleksa.
11. Dobiveni podaci upućuju na mogućnost primjene BMK i  $\beta$ -glukana, kao i predloženih postupaka za uklanjanje nastalog kompleksa biofiksator-AFM1/metali iz mlijeka.



## **7. LITERATURA**

Aazami, M.H., Nasri, M.H.F., Mojtahedi, M., Mohammadi, S.R. (2018) In Vitro Aflatoxin B1 Binding by the Cell Wall and (1→3)-β-D-Glucan of Baker's Yeast. *Journal of Food Protection*. 81( 4), 670-676.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007) Toxicological Profile for Lead. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, 1-9.

Ahmad, A., Anjum, F.M., Zahoor, T., Nawaz, H., Dilshad, S.M.R. (2012) Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52, 207.

Ahmad, A., Munir, B., Abrar, M., Bashir, S., Adnan, M., Tabassum, T. (2012) Perspective of β-Glucan as Functional Ingredient for Food Industry. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 2 (2), 1-6.

Aksu, Z., Dönmez, G. (2001) Comparison of copper (II) biosorptive properties of live and treated *Candida* sp. *J Environ Sci Health A*. 36(3), 367–381.

Ameen, F.A., Hamdan, A.M., El-Naggar, M.Y. (2020) Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Scientific Reports*. 10(314), 1-11.

American Society for Nutrition (2011) Copper. *Advances in Nutrition*. 2, 520-522.

American Society for Nutrition (2017) Manganese<sup>1,2</sup>. *Advances in Nutrition*. 8, 520.

Arapcheska, M., Jovanovska, V., Jankuloski, Z., Hajruali –Musliu, Z., Uzunov, R. (2015) Impact Of Aflatoxins On Animal And Human Health. *IJISSET - International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*. 2(2), 156-159.

Armando, M.R., Dogi, C.A., Pizzolitto, R.P., Escobar, F., Peirano, M.S., Salvano, M.A., Sabini, L.I., Combina, M., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with in vitro aflatoxin B1 binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin Journal*. 4(1), 59-68.

Assaf, J.C., Atoui, A., El Khoury, A., Chokr, A., Louka N. (2018) A comparative study of procedures for binding of aflatoxin M1 to *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Braz J Microbiol*. 49, 120-127.

Assaf, J.C., Nahle, S., Chokr, A., Louka, N., Atoui, A., El Khoury, A. (2019) Assorted Methods for Decontamination of Aflatoxin M1 in Milk Using Microbial Adsorbents. *Toxins*. 11 (304), 11.

Åvall-Jääskeläinen, S., Palva, A. (2005) Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiological Reviews*. 29, 511–529.

Bansal V., M.R., O.P., P., P.K., S. (2010) High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2(5), 22.

Bashir, K.M.I., Choi, J.S. (2017) Clinical and Physiological Perspectives of  $\beta$ -Glucans: The Past, Present, and Future. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 2.

Bata, A., Lásztity, R. (1999) Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Science and Technology*. 10(6-7), 223-228.

Beyersmann, D., Hartwig, A. (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*. 82, 493.

Bhakta, J., Munekage, Y., Ohnishi, K., Jana, B. (2012a) Isolation and identification of cadmium-and lead-resistant lactic acid bacteria for application as metal removing probiotic. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 9(3), 433-440.

Bhakta, J., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., Wei, M. (2012b) Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology*. 112(6), 1193-1206.

Bhat, R., Ravishankar, V., Rai, Karim, A., A. (2010) Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9, 58-61.

Blagojev, N., Škrinjar, M., Vesković-Moračanin, S., Šošo, V. (2012) Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters*. 17 (3), 7223.

Bonaventura, P., Benedetti, G., Albarède, F., Miossec, P. (2015) Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmunity Reviews*. 14, 278.

Bošnjir, J., Čulig, J. (2005) Osnovna svojstva važnijih metala i polimetala u okolišu. U: Keros, P. (ed): *Metali i polimetali u okolišu*, str. 33-39; 71-73. Zdravstveno veleučilište.

Bovo, F., Corassin, C. H., Rosim, R. E., de-Oliveira, C. A. F. (2013) Efficiency of Lactic Acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M1 in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food Bioprocess Technology*. 6, 2230-2240.

Bovo, F., Franco, L.T., Rosim, R.E., Trindade, C.S.F., Oliveira, C.A.F. (2014) The Ability of Lactobacillus rhamnosus in Solution, Spray-Dried or Lyophilized to Bind Aflatoxin B1. *Journal of Food Research*. 3(2), 35-40.

- Brackett, R. E., Marth, E.H. (1982) Association of aflatoxin M1 with casein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174, 439–441.
- Brady, D., Duncan, J.R. (1994) Binding of heavy metals by the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 16, 633–638.
- Bräse, S., Gläser, F., Kramer, C., Lindner, S., Linsenmeier, A.M., Masters, K.S., Meister, A., C., Ruff, B., M., Zhong, S. (2013) Aflatoxins. U:Kinghorn, A., D., Falk, H., Kobayashi, J. (ed): *The Chemistry of Mycotoxins (Progress in the Chemistry of Organic Natural Products)*, str. 4- 5. Springer.
- Brown, K.H., Wuehler, S.E., Peerson, J.M. (2001) The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food and Nutrition Bulletin.* 22 (2), 113-114.
- Bueno, D.J., Casale, C.H., Pizzolitto, R.P., Salvano, M.A., Oliver, G. (2007) Physical Adsorption of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A Theoretical Model. *Journal of Food Protection.* 70 (9), 2148-2154.
- Bzducha-Wrobel, A., Blazejak, St., Tkacz, K. (2012) Cell wall structure of selected yeast species as a factor of magnesium binding ability. *European Food Research and Technology.* 235, 355-366.
- Cabuk, A., Akar, T., Tunali, S., Gedikli, S. (2007) Biosorption of Pb(II) by industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on the biomatrix of cone biomass of *Pinus nigra*: equilibrium and mechanism analysis. *Chem Eng J.* 131, 293–300.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* 14, 835-847.
- Claus, H., Akca, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.P., Harris, R., Schlott, B., König, H. (2005) Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Canadian Journal of Microbiology.* 51, 731–743.
- Corassin, C.H., Bovo, F., Rosim, R.E., Oliveira, C.A.F. (2013) Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control.* 31, 80-83.
- Crisponi, G., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., Nurchi, V.M., Crespo-Alonso, M., Lachowicz, J.I., Faa, G. (2013) The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-related diseases. *BioMol Concepts.* 4(1), 77- 83.

Čvek, D., Markov, K., Frece, J., Friganović, M., Duraković, L., Delaš, F. (2012) Adhesion of Zearalenone to the Surface of Lactic Acid Bacteria Cells. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 7, 49-52.

Dalić, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F. (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*. 21, 375-376.

Damayanti, E., Istiqomah, L., Saragih, J.E., Purwoko, T., Sardjono (2017) Characterization of Lactic Acid Bacteria as Poultry Probiotic Candidates with Aflatoxin B1 Binding Activities. *Earth and Environmental Science*. 101, 1-6.

Delaš, F. (2010) Mikrobni toksini. U: Hengl, B. (ed.): *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, str. 31-49. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, Hrvatska.

Di Stefano, V., Pitonzo, R., Cicero, N., D'Oca, M.C. (2014) Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 31(12), 2034.

Di Stefano, V., Pitonzo, R., Cicero, N., D'Oca, M. C. (2014) Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Additives & Contaminants Part A*. 31(12), 2034-2039.

Diaz, D.E., Hagler, J.W.M., Blackwelder, J.T., Eve, J.A., Hopkins, B.A., Anderson, K.L., Jones, F.T., Whitlow, L.W. (2004) Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*. 157, 233–241.

Du, B., Bian, Z., Xu, B. (2014) Skin Health Promotion Effects of Natural Beta-Glucan Derived from Cereals and Microorganisms: A Review. *Phytotherapy Research*. 28, 159-166.

Duffus, J.H. (2002) Heavy metals— a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry*. 74 (5), 794-795.

Elaridi, J., Bassil, M., Kharm, J.A., Daou, F., Hassan, H.F. (2017) Analysis of Aflatoxin M1 in Breast Milk and Its Association with Nutritional and Socioeconomic Status of Lactating Mothers in Lebanon. *Journal of Food Protection*. 80 (10), 1737.

El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. & Ahokas, J. (1998) Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protection*. 61(4), 466-468.

El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*. 36, 321-326.

El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998) Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria To Remove Aflatoxin from Contaminated Media. *Journal of Food Protection*. 61 (4), 467-468.

Elsanhoty, R.M., Al-Turki, I.A., Fawzy Ramadan, M. (2016) Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water. *Water Science & Technology*. 74.3, 625-636.

Elsanhoty, R.M., Salam, S.A., Ramadan, M.F., Badr, F.H. (2014) Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control*. 43, 129–134.

El-Sayed, M.T. (2013) Removal of lead(II) by *Saccharomyces cerevisiae* AUMC 3875. *Annals of Microbiology*. 63, 1459–1470.

Endo, A., Dicks, L.M.T. (2014) Physiology of the LAB. U: Holzappel, W., H., Wood, B., J., B. (ed): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, str. 13-16. John Wiley & Sons, Ltd.

Eskandari, M.H., Zarei, M., Shekarforoush, S.Sh. (2013) Aflatoxin M1 removal from milk by adsorbent clays. *Scientific Research Iranian Veterinary Journal*. 8 (4), 13-20.

Faucet-Marquis, V., Joannis-Cassan, C., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., Pfohl-Leszkowicz, A. (2014) Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98, 7583–7596.

Faure, A.M., Koppenol, W.H., Nyström, L. (2015) Iron(II) binding by cereal beta-glucan. *Carbohydrate Polymers*. 115, 739-743.

Fein, J.B., Daughney, C.J., Yee, N., Davis, T.A. (1997) A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 61, 3319-3328.

Fletcher, MT, Blaney, BJ (2016) Mycotoxins. *Reference Module in Food Sciences*, 1.

Frazzoli, C., Gherardi, P., Saxena, N., Belluzzi, G., Mantovani, A. (2017) The Hotspot for (Global) One Health in Primary Food Production: Aflatoxin M1 in Dairy Products. *Frontiers in Public Health*. 4 (294), 3.

Frece J., Markov K. (2016) Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: Food biology, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis.

Frece, J. (2003) *In vitro i in vivo* istraživanja probiotičkog mehanizma djelovanja bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Magistarski rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Frece, J. (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Frece, J. i Markov, K. (2016) Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: Food biology, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis.

Frece, J., Čvek, D., Kovačević, D., Gobin, I., Tihana, K., Markov, K. (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“ kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso*. XII (4), 208-214.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 98, 285-292.

Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., Galvano, G. (2001) Dietary Strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins: A Review. *Journal of Food Protection*. 64 (1), 120.

Galvano, F., Ritieni, A., De Lorenzo, A., Piva, G., Pietri, A. (2005) Mycotoxins in the human food chain. In: *Mycotoxin Blue Book* (D. Diaz, ed). Nottingham University Press, UK, pp. 187-224.

Gavrilescu, M. (2004) Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Eng. Life Sci.* 4 (3), 223.

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

Goncalves, B.L., Goncalves, 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), 126-131.

Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P.A., Botsoglou, N.A. (2002) Distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt. *Food Additives and Contaminants*. 19 (11), 1043-1050.

- Grant, P.G., Phillips, T.D. (1998) Isothermal adsorption of aflatoxin B1 on HSCAS clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(2), 599-605.
- Gratz, S., Wu, Q.K., El-Nezami, H., Juvonen, R.O., Mykkänen, H., Turner, P.C. (2007) Lactobacillus Rhamnosus Strain GG Reduces Aflatoxin B1 Transport, Metabolism, and Toxicity in Caco-2 Cells. *Appl Environ Microbiol*. 73 (12), 3958-3964.
- Habschied, K., Šarkanj, B., Klepac, T. (2011) Veza između mikotoksina i beta-glukana u ječmu. Okolišno prihvatljiva proizvodnja kvalitetne i sigurne hrane – Zbornik radova. 27-8.
- Halttunen, T., Collado, M., El-Nezami, H., Meriluoto, J., Salminen, S. (2008) Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*. 46(2), 160-165.
- Halttunen, T., Kankaanpää, P., Tahvonen, R., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2003) Cadmium removal by specific lactic acid bacteria. *Biosci Microflora*. 22, 93–97.
- Halttunen, T., Salminen, S., Tahvonen, R. (2007) Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 114(1), 30-35.
- Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J. (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*. 128, 39-49.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. (2001) Surface Binding of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (7), 3086-3091.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (7), 3086-3091.
- Hassan, S.H.A., Kim, S.J., Jung, A.Y., Joo, J.H., Oh, S.E., Yang, J.E., 2009. Biosorptive capacity of Cd(II) and Cu(II) by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 55, 27–34.
- Hassane, A.M.A., El-Shanawany, A.A., Abo-Dahab, N.F., Abdel-Hadi, A.M., Abdul-Raouf, U.M., Mwanza, M. (2017) Influence of Different Moisture Contents and Temperature on Growth and Production of Aflatoxin B1 by a Toxigenic *Aspergillus flavus* Isolate in Wheat Flour. *Journal of Ecology of Health and Environment*. 5(3), 78.
- Hathout, S.A., Aly, S.E. (2014) Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology*. 64(3), 905-909.



- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J. (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 19, 125.
- Hernandez-Mendoza, A., Guzman-de-Peña, D., Garcia, H. S. (2009) Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 107(2), 395–403.
- Hodnik, V., Anderluh, G. (2009) Toxin Detection by Surface Plasmon Resonance. *Sensors*. 9(3), 1339-1354.
- Holzapfel, W., H., Wood, B., J., B. (2014) Introduction to the LAB.U: Holzapfel, W., H., Wood, B., J., B. (ed): *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, str. 1-6. John Wiley & Sons, Ltd.
- Hussein, Hussein, S., Brasel, Jeffrey, M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167, 102-104.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) 56/93, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) 62/02, Aflatoxins. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
- Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R., Salminen, S. (2006) Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Can. J. Microbiol.* 52, 877-885.
- ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies, str. 6-7.
- Interna uputa RU-22-054 (Radna uputa za pripremu mlijeka i mliječnih proizvoda za određivanje količine aflatoksina M1), NZJZ dr. Andrija Štampar.
- Interna uputa RU-1-054 (Radna uputa o pripremi uzoraka za određivanje elemenata u tragovima u hrani i hrani za životinje), NZJZ dr. Andrija Štampar.
- Iqbal, S.Z., Jinap, S., Pirouz, A.A., Ahmad Faizal, A.R. (2015) Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 46, 111-115.
- Jadan-Piedra, C., Alcantara, C., Monedero, V., Zuniga, M., Velez, D., Devesa, V. (2017) The use of lactic acid bacteria to reduce mercury bioaccessibility. *Food Chemistry*. 228, 158-166.

- Jakopović, Ž., Čanak, I., Frece, J., Bošnjir, J., Ivešić, M., Kuharić, Ž., Pavlek, Ž., Markov, K. (2018) Uklanjanje kompleksa  $\beta$ -glukan-AFM1 iz mlijeka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 13 (3-4), 136-139.
- Jalili, M., Scotter, M. (2015) A review of aflatoxin M1 in liquid milk. *Iranian Journal of Health, Safety & Environment*. 2 (2), 287.
- Jaynes, W.F., Zartman, R.E. (2011) Aflatoxin Toxicity Reduction in Feed by Enhanced Binding to Surface-Modified Clay Additives. *Toxins*. 3, 551-565.
- Jong, W.H.A., Vries, E.G.E., Kema, I.P. (2011) Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines. *Clinical Biochemistry*. 44, 101.
- Jouany, J-P, Yiannikouris, A., Bertin, G. (2005) The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archiva Zootechnica*. 8, 26-36.
- Kabak, B., Var, I. (2008) Factors affecting the removal of aflatoxin M1 from food model by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 43, 617-624.
- Kammler, M., Schiin, C., Hantke, K. (1993) Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 175, 6212.
- Kankaanpää, P., Tuomola, E., El-Nezami, H.S., Ahokas, J., Salminen, S. (2000) Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. *Journal of food protection*. 63 (3), 412-414.
- Karaman, M., Basmacioglu, H., Ortatli, M., Oguz, H. (2005) Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science*. 46(3), 394-400.
- Khoury, A.E., Atoui, A., Yaghi, J. (2011) Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*. 22, 1695-1699.
- Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., Saito, T., Kimura, K. (2013) Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology*. 164(7), 701-709.

- Kirillova, A.V., Danilushkina, A.A., Irisov, D.S., Bruslik, N.L., Fakhrullin, R.F., Zakharov, Y.A., Bukhmin, V.S., Yarullina, D.R. (2017) Assessment of Resistance and Bioremediation Ability of Lactobacillus Strains to Lead and Cadmium. *International Journal of Microbiology*. 2017, 1-7.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86, 1595-1612.
- Kot, E., Furmanov, S., Bezkorovainy, A. (1995) Accumulation of Iron in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Food Science*. 60(3), 547-550.
- Kumar, V.V. (2018) Aflatoxins: Properties, Toxicity and Detoxification. *Nutrition & Food Science International Journal*. 6(5), 1.
- Lahtinen, S. J., Haskard, C. A., Ouwehand, A. C., Salminen, S.J., Ahokas, J. T. (2004) Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of Lactobacillus rhamnosus strain GG. *Food Additives and Contaminants*. 21(2), 158-164.
- Lin, D., Cao, H., Zhong, Y., Huang, Y., Zou, J., He, Q., Ji, R., Qin, T., Chen, Y., Wang, D., Wu, Z., Qin, W., Wu, D., Chen, H., Zhang, Q. (2019) Screening and identification of Lactic acid bacteria from Ya'an pickle water to effectively remove Pb<sup>2+</sup>. *AMB Expr*. 9:10, 1-11.
- Line, J. E., Brackett, R. E. (1995) Factors affecting aflatoxin B1 removal by Flavobacterium aurantiacum. *Journal of Food Protection*. 58, 91-94.
- Liu, S., Zheng, Y., Ma, Y., Sarwar, A., Zhao, X., Luo, T., Yang, Z. (2019) Evaluation and Proteomic Analysis of Lead Adsorption by Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Mol. Sci*. 20, 1-18.
- Ma, Z.X., Amaro, F.X., Romero, J.J., Pereira, O.G., Jeong, K.C., Adesogan, A.T. (2017) The capacity of silage inoculant bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro and in artificially contaminated corn silage. *J. Dairy Sci*. 100, 1-13.
- Machado, M.D., Janssens, S., Soares, H.M.V.M., Soares, E.V. (2009) Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of Saccharomyces cerevisiae: advantages of using dead biomass. *Journal of Applied Microbiology*. 106, 1792-1804.
- Madrigal-Bujaidar, E., Morales-González, J.A., Sánchez-Gutiérrez, M., Izquierdo-Vega, J.A., Reyes-Arellano, A., Álvarez-González, I., Pérez-Pasten, R., Madrigal-Santillán, E. (2015) Prevention of Aflatoxin B1-Induced DNA Breaks by  $\beta$ -D-Glucan. *Toxins*. 7, 2151-2152.

- Magan, N., Medina, A., Aldred D. (2011) Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*. 60, 150-152.
- Makarova, K.S., Koonin, E.V. (2007) Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 189(4), 1199.
- Mannaa, M., Kim, K.D. (2017) Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage. *Mycobiology*. 45(4), 245.
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., Severino, L. (2018) Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins*. 10, 2.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 60, 219.
- Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., Delaš, F. (2010) Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo*. 60 (4), 244.
- Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., Delaš, F. (2010) Aflatoxin M1 in raw milk and binding of aflatoxin by lactic acid bacteria. *Mljekarstvo*. 60 (4), 244-251.
- Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*. 34, 312-317.
- Martinez-Finley, E., J., Aschner, M. (2014) Recent Advances in Mercury Research. *Current Environmental Health Reports*. 1, 163-171.
- Masoero, F.; Gallo, A.; Moschini, M.; Piva, G.; Diaz, D. (2007) Carry-over of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*. 1(9), 1344–1350.
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., Magan, N. (2017) Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough?. *Fungal biology reviews*. 31, 143-144.
- Medina, A., Rodriguez, A., Magan, N. (2014) Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*. 5, 1-7.
- Mendel, R.R., Bittner, F. (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763, 621-623.

Meshref, A. M. S., Moselhy, W.A., Hassan, Nour, El-H. Y. (2014) Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products. *Food Measure*. 8, 382.

Meshref, A.M.S., Moselhy, W.A., Hassan, Nour El-Houda, Y. (2014) Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products. *Food Measure*. 8, 381-382.

Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying: a review. *Journal of Microbiological Methods*. 66, 183-193.

Mörschbacher, A.P., Dullius, A., Dullius, C.H., Bandt, C.R., Kuhn, D., Brietzke, D.T., Kuffel, F.J.M., Etgeton, H.P., Altmayer, T., Goncalves, T.E., Schweizer, Y.A., Oreste, E.Q., Ribeiro, A.S., Lehn, D.N., Souza, C.F.V., Hoehne, L. (2018) Assessment of selenium bioaccumulation in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 101, 10626–10635.

Mrvčić, J., Prebeg, T., Barišić, L., Stanzer, D., Bačun-Družina, V., Stehlik-Tomas, V. (2009) Zinc Binding by Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 47(4), 381-388.

Mrvčić, J., Stanzer, D., Bačun-Družina, V., Stehlik-Tomas, V. (2009) Copper Binding by Lactic Acid Bacteria (LAB). *Bioscience Microflora*. 28 (1), 1-6.

Mrvčić, J., Stanzer, D., Šolić, E., Stehlik-Tomas, V. (2012) Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28, 2771-2773.

Mrvčić, J., Stanzer, D., Šolić, E., Stehlik-Tomas, V. (2012) Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World J Microbiol Biotechnol*. 28, 2771–2782.

Muhaladin, B.J., Saari, N., Hussin, A.S.M. (2020) Review on the Biological Detoxification of Mycotoxins Using Lactic Acid Bacteria to Enhance the Sustainability of Foods Supply. *Molecules*. 25(11), 1-12.

Naja, G.M., Murphy, V., Volesky, B. (2010) Biosorption, Metals. U: Flickinger, M.C. (ed.): *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, str. 1-28. Wiley.

Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Aboab, B., Lemaire, M., Boudra, H. (2009) Cell Wall Component and Mycotoxin Moieties Involved in the Binding of Fumonisin B1 and B2 by Lactic Acid Bacteria. *J Appl Microbiol*. 106 (3), 977-985.

Nowak, K., Wiater, A., Choma, A., Wiącek, D., Bieganowski, A., Siwulski, M., Waśko, A. (2019) Fungal (1 → 3)- $\alpha$ -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. *International Journal of Biological Macromolecules*. 137, 960–965.

- Omar, S.S. (2016) Aflatoxin M1 levels in raw milk, pasteurised milk and infant formula. *Italian Journal of Food Safety*. 5(3), 158-160.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. (2001) Aflatoxin B1 binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 84 (10), 2152-2156.
- Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonem, K., Salminen, S., Ahokas, J. (2000) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal of Food Protection*. 63(5), 645-650.
- Piotrowska, M., Masek, A. (2015) Saccharomyces Cerevisiae Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination. *Toxins*. 7, 1151-1162.
- Pizzolitto, R.M., Armando, M.R., Combina, M., Cavaglieri, L.R., Dalcerro, A.M., Salvano, M.A. (2012) Evaluation of Saccharomyces cerevisiae strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J Environ Sci Health Part B*. 47, 933-941.
- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcerro, A.M., Salvano, M.A. (2011) Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology. U: Guevara-Gonzalez, R.G. (ed): Binding of Aflatoxin B1 to Lactic Acid Bacteria and Saccharomyces cerevisiae in vitro: A Useful Model to Determine the Most Efficient Microorganism, str. 323-341. InTech, Rijeka, Hrvatska.
- Pleadin J., Vasilj V., Petrović D., (2018) MIKOTOKSINI-Pojavnost, prevencija i redukcija, Sveučilište u Mostaru, ZIRAL-Mostar 2018.
- Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2014) Aflatoksini -Onečišćenje, učinci i metode redukcije. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 9 (3-4), 75-82.
- Pleadin, J., Markov, K., Frece, J., Vulić, A., Perši, N. (2014) Bio-Prevalence, Determination and Reduction of Aflatoxin B1 in Cereals. U: Aflatoxins: Food Sources, Occurrence and Toxicological Effects, (Faulkner A.G., ured.), Nova Science Publishers, USA, str. 1-34.
- Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata NN 2/2005.
- Puranik, P. R., Paknikar, K. M. (1999) Biosorption of lead, cadmium, and zinc by Citrobacter strain MCM B-181: characterization studies. *Biotechnology Progresses*. 15(2), 228-237.

- Rahaie, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S.H., Mazaheri, M. (2010) Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nuts. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41, 82-90.
- Raju, M., Devegowda, G. (2000) Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis. *British Poultry Science*. 41(5), 640-650.
- Ramirez-Guzman, K, N., Torres-León, C, Martínez-Terrazas, E., De la Cruz-Quiroz, R., Flores-Gallegos, A., C., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. (2018) Biocontrol as an Efficient Tool for Food Control and Biosecurity. U: Grumezescu, A., M., Holban, A.M. (ed): *Food Safety and Preservation*, str. 173. Academic Press.
- Ramos, A.J., Hernandez, E. (1996) In vitro aflatoxic adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Animal Feed Science and Technology*. 62, 263-269.
- Rehm, H.J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, P. (1993) Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology*. 1, str. 326; 328.
- Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J-P., Auclair, E., Larondelle, Y. (2007) In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*. 98(9), 1812-1821.
- Sassahara, M., Pontes Neto, D., Yanaka, E.K. (2005) Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food and Chemical Toxicology*. 43, 981.
- Sassahara, M., Pontes Netto, D., Yanaka, E.K. (2005) Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chemical Toxicology*. 43, 981-984.
- Schut, S., Zauner, S., Hampel, G., König, H., Claus, H. (2011) Biosorption of copper by wine-relevant lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*. 145, 126-131.
- Selenska-Pobell, S., Merroun, M. (2010) Accumulation of heavy metals by microorganisms: biomineralization and nanocluster formation. U: König, H., Claus, H., Varma, A. (ed): *Prokaryotic Cell Wall Compounds Structure and Biochemistry*, str. 483–500. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Serrano-Niño, J.C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M.G., San Martín-González, M.F., García, H.S. (2013) Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control*. 31, 202-207.

- Sforza, S., Dall' Astra, C., & Marchelli, R. (2006) Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 25(1), 54-76.
- Shahin, A.A.M. (2007) Removal of Aflatoxin B1 from Contaminated Liquid Media by Dairy Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Agriculture & Biology*. 9 (1), 73.
- Shetty, P.H., Hald, B., Jespersen, L. (2007) Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*. 113, 41-44.
- Shetty, P.H., Jespersen, L. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci Tech*. 17, 48-55.
- Shokri, H., Asadi, F., Khosravi, A.R. (2008) Isolation of  $\beta$ -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Natural Product Research*. 22 (5), 414-415.
- Silva, B., Faustino, P. (2015) An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1852, 1347-1349.
- Soomro, A.H., Masud, T., Anwaar, K. (2002) Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health - A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1(1), 22.
- SOP-25-053 (Određivanje količine aflatoksina M1 u hrani visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom prema HRN EN ISO 14501:2008), NZJZ dr. Andrija Štampar.
- SOP-298-053 (Određivanje metala u uzorcima hrane atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom i induktivno spregnutom plazmom sa spektrometrijom masa), NZJZ dr. Andrija Štampar.
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W. (1998) Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 43, 141-148.
- Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić-Rački, Đ., Delaš, F., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapac, T. (2010) Mikrobni toksini. U: Hengl, B. (ed): *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, str. 31-36. Hrvatska agencija za hranu, Osijek, Hrvatska.
- Šegvić Klarić, M. (2012) Adverse effects of combined mycotoxins. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 63, 519.
- Šušković, J., Kos, B. (2000). Probiotici i prebiotici- Interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.



Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K. i Matošić, S. (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48 (3), 296-307.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48 (3), 299.

Tchounwou, P. B, Yedjou, C. G, Patiolla, A. K., Sutton, D. J (2014) Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. 133-134.

Teemu, H., Seppo, S., Jussi, M., Raija, T., Kalle, L. (2008) Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 170–175.

Tian, F., Xiao, Y., Li, X., Zhai, Q., Wang, G., Zhang, Q., Zhang, H., Chen, W. (2015) Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against Copper Toxicity in Mice. *PLOS One*. 10(11), 1-14.

Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., Zhang, H., Zhang, H., Chen, W. (2012) *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice. *Biol Trace Elem Res*. 150(1–3), 264–271.

Tobin, J.M., Cooper, D.G., Neufeld, R.J. (1984) Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol*. 47, 821-824.

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani (konsolidirana verzija od 01.07.2020. godine).

Vetvicka, V. (2014) Effects of  $\beta$ -glucan on some environmental toxins: An overview. *Biomedical Papers*. 158 (1), 1.

Vyskočil, A., Viau, C. (1999) Assessment of Molybdenum Toxicity in Humans. *Journal of Applied Toxicology*. 19, 185-192.

Wang, J., Chen, C. (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 27, 196.

Waskiewicz, A., Golinski, P. (2013) Mycotoxins in foods, feeds and their components. *Krmiva*. 55, 36.

- Yiannikouris, A., Andre, G., Buleon, A., Jeminet, G., Canet, I., Francois, J., Bertin, G., Jouany, J.P. (2004) Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with  $\beta$ -D-Glucans. *Biomacromolecules*. 5, 2176-2177.
- 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 Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with  $\beta$ -D-Glucans. *Biomacromolecules*. 7, 1147-1155.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany, J.P. (2004) Adsorption of Zearalenone by  $\beta$ -D-Glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Journal of Food Protection*. 67(6), 1199.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.P. (2004) Influence of pH on Complexing of Model  $\beta$ -D-Glucans with Zearalenone. *Journal of Food Protection*. 67(12), 2745.
- Yu, J. (2012) Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*. 4, 1025-1037.
- Yu, L., Zhai, Q., Liu, X., Wang, G., Zhang, Q., Zhao, J., Narbad, A., Zhang, H., Tian, F., Chen, W. (2015) *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviates aluminium toxicity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(4), 1891-1900.
- Zain, M.E. (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15, 138-139.
- Zakon o kontaminantima (Narodne novine, broj 39/2013, 114/18).
- Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Gospodarić, I., Sajli, L., Đaković, S., Filipović-Grčić, J. (2010) Characterization of  $\beta$ -Glucans Isolated From Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. *Food Technology and Biotechnology*. 48(2), 189-197.
- Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Panjkota-Krbavčić, I., Grba, S., Berković, K. (2009) Potential Application of Yeast  $\beta$ -Glucans in Food Industry. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 74 (4), 280.
- Zeković, Dj., B., Kwiatkowski, S. (2005) Natural and Modified (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25, 205-206.
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Chen, W. (2013) Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl Environ Microb*. 79(5), 1508–1515.

Zhai, Q., Yin, R., Yu, L., Wang, G., Tian, F., Yu, R., Zhao, J., Liu, X., Chen, Y.Q., Zhang, H., Chen, W. (2015) Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. *Food Control*. 54, 23-30.

Zoghi, A.; Khosravi-Darani, K.; Sohrabvandi, S. (2014) Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. *Medicinal Chemistry*. 14 (1), 84-98.