

Utjecaj bakterija mliječne kiseline na biodostupnost okratoksina a u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Gradečki, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:729798>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Laura Gradečki

**UTJECAJ BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE NA BIODOSTUPNOST
OKRATOKSINA A U
SIMULIRANIM UVJETIMA
GASTROINTESTINALNOG
TRAKTA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Markov te uz pomoć dr. sc. Željka Jakopovića i dr. sc. Ane Vulić Hrvatski veterinarski institut Zagreb.

ZAHVALA

Ovim putem želim se zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Kseniji Markov na pomoći tokom izrade diplomskog rada. Hvala joj na svom trudu, idejama i savjetima kojima mi je olakšala izradu ovog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Željku Jakopoviću na svojoj pomoći vezanoj uz provedbu ovog istraživanja, podršci, savjetima, brizi i razumijevanju te izrazito ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Želim se zahvaliti svim svojim prijateljima koji su mi sve ove godine tokom fakultetskog obrazovanja pružali bezuvjetnu podršku i motivaciju te što su mi bili spremni pomoći kada mi je najviše trebalo. Hvala vam što ste mi uljepšali i olakšali ovaj period života.

Posebno se želim zahvaliti svom dečku Ivanu što je sve ove godine moja stijena, motivacija, ljubav i najveća podrška u svemu što radim i čemu težim u životu.

Na kraju, najveću zahvalu želim uputiti cijeloj svojoj obitelji, posebno majci Ljiljani te ocu Krešimiru bez čije bezuvjetne podrške, savjeta i ljubavi ne bih bila osoba kakva jesam danas.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

UTJECAJ BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE NA BIODOSTUPNOST OKRATOKSINA A U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Laura Gradečki, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0178113026

Sažetak: Konzumacija hrane kontaminirane okratoksinom A (OTA) mogla bi biti velika prijetnja zdravlju, jer se nakon unosa takve hrane, toksin može djelomično ili potpuno osloboditi tijekom probave u gastrointestinalnom (GI) traktu i biti dostupan za daljnju apsorpciju u organizam. Stoga je cilj ovog rada bio odrediti biodostupnost, tj. postotak OTA koji se oslobađa iz prehrambenog matriksa (kobasica) u simuliranim uvjetima GI trakta, u prisutnosti bakterija mliječne kiseline (BMK). Odabrane BMK pokazale su različitu sposobnost vezanja OTA iz uzoraka sa ili bez dodanog matriksa u *in vitro* modelu probave ovisno o soju i primijenjenom obliku bakterijskih stanica (vlažna biomasa - žive stanice; inaktivirana biomasa - mrtve stanice i stanice u mikroinkapsuliranom obliku). Za kvalitativno određivanje prisutnosti okratoksina A u uzorcima korištena je UHPLC/MS-MS metoda. Biodostupnost OTA iz uzorka s dodanim matriksom bez dodatka BMK je 86,4 %, a u uzorcima s dodanim bakterijama je u rasponu od 18,9 – 69 %.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, biodostupnost, gastrointestinalni trakt, okratoksin A

Rad sadrži: 53 stranice, 13 slika, 10 tablica, 96 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: dr. sc. Željko Jakopović
dr. sc. Ana Vulić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Jadranka Frece (predsjednica)
2. prof. dr. sc. Ksenija Markov (mentorica)
3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (članica)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenska članica)

Datum obrane: 27. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

INFLUENCE OF LACTIC ACID BACTERIA ON BIOAVAILABILITY OF OCHRATOXIN A IN
SIMULATED CONDITIONS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

Laura Gradečki, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0178113026

Abstract: Consumption of food contaminated with ochratoxin A (OTA) could be a major threat to health, because after ingestion of such food, the toxin can be partially or completely released during digestion in the gastrointestinal (GI) tract and be available for further absorption in the body. Therefore, the aim of this work was to determine the bioavailability, i.e. the percentage of OTA that is released from the food matrix (sausage) in simulated conditions of the GI tract, in the presence of lactic acid bacteria (LAC). Selected LAC showed different ability to bind OTA from samples with or without added matrix in an in vitro verification model depending on the strain and applied form of bacterial cells (wet biomass-living cells; inactivated biomass-dead cells and cells in microencapsulated form). The UHPLC/MS-MS method is used for the qualitative determination of the presence of ochratoxin A in the samples. The bioavailability of OTA from the sample with added matrix without the addition of BMK is 86.4 %, and in the samples with added bacteria it is in the range of 18.9 – 69 %.

Keywords: lactic acid bacteria, bioavailability, gastrointestinal tract, ochratoxin A

Thesis contains: 53 pages, 13 figures, 10 tables, 96 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ksenija Markov, PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Željko Jakopović, PhD*
Ana Vulić, PhD

Reviewers:

1. Jadranka Frece, PhD, Full professor (president)
2. Ksenija Markov, PhD, Full professor (mentor)
3. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (member)
4. Jasna Novak, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 27th, 2023

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. MIKOTOKSINI | 3 |
| 2.1.1. Okratoksin A (OTA)..... | 3 |
| 2.1.2. Toksikokinetika OTA..... | 5 |
| 2.1.3. Utjecaj OTA na ljudsko zdravlje..... | 6 |
| 2.1.4. Zakonska regulativa..... | 7 |
| 2.2. GASTROINTESTINALNI TRAKT | 8 |
| 2.2.1. GI modeli za biodostupnost OTA <i>in vitro</i> | 10 |
| 2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE (BMK) | 11 |
| 2.3.1. Postupci pripreme BMK..... | 12 |
| 2.3.2. Uklanjanje mikotoksina djelovanjem BMK..... | 13 |
| 2.4. METODE ZA ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA | 14 |
| 2.4.1. UHPLC - MS/MS metoda..... | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. MATERIJALI | 17 |
| 3.1.1. Mikroorganizmi..... | 17 |
| 3.1.2. Hranjive podloge..... | 17 |
| 3.1.3. Kemikalije..... | 18 |
| 3.1.4. Mikotoksin..... | 19 |
| 3.1.5. Pribor i aparatura..... | 19 |
| 3.2. METODE RADA | 20 |
| 3.2.1. Priprema stock otopine okratoksina A..... | 20 |
| 3.2.2. Uzgoj bakterija mliječne kiseline..... | 20 |
| 3.2.3. Priprema biomase živih i mrtvih stanica bakterija mliječne kiseline..... | 21 |
| 3.2.4. Mikroinkapsulacija stanica bakterija mliječne kiseline..... | 21 |
| 3.2.5. Priprema otopina za simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta..... | 23 |
| 3.2.6. Priprema matriksa..... | 24 |
| 3.2.7. Simulacija <i>in vitro</i> modela GI trakta..... | 25 |
| 3.2.8. UHPLC - MS/MS metoda..... | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 31 |
| 5. ZAKLJUČAK | 43 |
| 6. LITERATURA | 44 |

1. UVOD

Većina namirnica može biti kontaminirana plijesnima te sadržavati njihove metaboličke produkte poput mikotoksina koji predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i životinja. Česta prisutnost mikotoksina u hrani, posljedica je pojavnosti velikog broja različitih vrsta plijesni u sirovinama i hrani za životinje. Jedan od mikotoksina s potencijalnim karcinogenim učinkom na ljudsko zdravlje je okratoksin A (OTA) koji je često prisutan u namirnicama poput žitarica, grožđa, vina, kave te mesnim i mliječnim proizvodima.

Apsorpcija unesenih mikotoksina putem hrane započinje u gastrointestinalnom (GI) traktu, u kojem ujedno dolazi i do primarne obrane organizma od toksičnog djelovanja mikotoksina. Iako crijevna mikroflora, koju čine brojni mikroorganizmi, putem određenih mehanizama može smanjiti toksičnost unesenih mikotoksina, njihovom će apsorpcijom u GI traktu svejedno doći do određenih oštećenja. Stoga je, s obzirom na sveopću prisutnost mikotoksina, potrebno primijeniti metode kojima će se smanjiti njihova biodostupnost, a posljedično i toksični učinak na organizam. Među metodama koje se koriste za smanjenje koncentracije mikotoksina u hrani/krmivu biološke metode sve se više koriste kao modeli dekontaminacije mikotoksina, a uključuju mikroorganizme ili njihove metabolite, antioksidanse i adsorbense. U 2009. godini dodana je nova funkcionalna skupina u kategoriju tehnoloških dodataka hrani za životinje definirana Uredbom Komisije (EZ) br. 386/2009 kao „tvari za smanjenje kontaminacije hrane za životinje mikotoksinima: tvari koje mogu suzbiti ili smanjiti apsorpciju, pospješiti izlučivanje mikotoksina ili modificirati njihov način djelovanja”. Ove tvari (aditivi) poznate su kao sredstva za detoksikaciju, a dodaju se u hranu za životinje (uglavnom svinja, peradi i goveda) kako bi se smanjila apsorpcija mikotoksina iz probavnog trakta i njihova distribucija u krv i ciljne organe. Ovisno o načinu djelovanja, djeluju tako da vežu mikotoksine na svoju površinu (adsorpcija) ili da ih razgrađuju ili pretvaraju u manje toksične metabolite (biotransformacija). Jedna od bioloških metoda koja dovodi do smanjenja biodostupnosti mikotoksina iz hrane podrazumijeva primjenu bakterija mliječne kiseline (BMK) koje pokazuju sposobnost vezanja i/ili razgradnje mikotoksina u namirnicama čime se smanjuje njihova apsorpcija u GI traktu.

Stoga je cilj ovog rada bio utvrditi otpuštanje okratoksina A (OTA) iz odabranog prehrambenog matriksa (sušena kobasica) u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

u odsutnosti i prisutnosti različitih sojeva bakterija mliječne kiseline kao mogućih adsorbensa okratoksina.

2. TEORIJSKI DIO

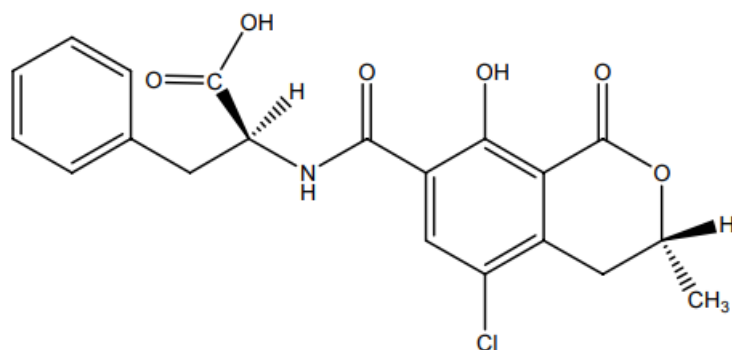
2.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni metaboliti toksikotvornih plijesni, koji nemaju biokemijsku ulogu u rastu i razmnožavanju, međutim njihova je pojavnost već pri niskim koncentracijama toksična za ljude i životinje. Nastaju biokemijskim reakcijama primarnih metabolita kao što su acetati, aminokiseline, malonati i mevalonati, a neke od reakcija odgovornih za njihovu biosintezu su: oksidacija/redukcija, kondenzacija, halogenizacija i alkalizacija (Pleadin i sur., 2018; Bennett i Klich, 2003). Strukturno su građeni od velikog broja komponentni uglavnom male molekulske mase, a prvenstveno od heterocikličkih prstenova molekulske mase do 50 Da. Nastaju tijekom metabolizma specifičnih vrsta plijesni, od kojih su najznačajniji rodovi *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* čiji rast ovisi o uvjetima temperature, vlage, aktiviteta vode i relativne vlažnosti, ali i o vrsti supstrata, a često se pojavljuju u raznim prehrambenim proizvodima namijenjenim za ljudsku konzumaciju, ali i u krmivima namijenjenim za prehranu životinja.

Mikotoksini koji predstavljaju najveći rizik za ljudsko zdravlje su: aflatoksini, ergot alkaloidi, okratoksini, citrinin, fuminozini, trihoteceni i zearalenon. Navedene skupine mikotoksina dokazano imaju karcinogeni, imunosupresivni, teratogeni, mutageni, hepatotoksični i neurotoksični učinak na zdravlje, a u nekim slučajevima mogu djelovati i letalno. Utjecaj mikotoksina na ljudsko zdravlje ovisi o nekolicini faktora, od kojih su najbitniji: koncentracija mikotoksina u hrani te period izloženosti mikotoksinu, uzrokuje li ingestija mikotoksina akutnu ili kroničnu toksičnost, dob te težina osobe (Pleadin i sur., 2019; Freire i sur., 2017).

2.1.1. Okratoksin A (OTA)

Okratoksin A (OTA) najtoksičniji je pripadnik skupine okratoksina, a prvi je puta otkriven 1965. godine kao produkt sekundarnog metabolizma plijesni *Aspergillus ochraceus*. Kasnijim istraživanjima dokazano je da ga proizvode brojni pripadnici rodova *Aspergillus* i *Penicillium* (Markov i sur., 2022; Miller 1995; Bredenkamp i sur., 1989). Po kemijskoj strukturi OTA je L – fenilalanin – N - [(5 – kloro - 3, 4 – dihidro – 8 – hidroksi – 3 – metil – 1 – okso - 1H – 2 – beznopiran – 7 - yl)karbonil] - (R) - izokumarin (slika 1).



Slika 1. Kemijska struktura OTA (Nao i sur., 2020)

U skupini okratoksina najtoksičniji i najistraživaniji je OTA, ali se istražuje i pojavljivanje njegovih analoga kao što su: okratoksin B (OTB), okratoksin C (OTC), okratoksin α (OT α) odnosno izokumarinski derivat OTA, njegov deklorirani analog okratoksin β (OT β), metilokratoksin A (MeOTA), metilokratoksin B (MeOTB) i etilokratoksin B (EtOTB), te njihovu moguću povezanost u pojavljivanju s OTA (tablica 1).

Tablica 1. Karakteristični sastav deriviranih metabolita okratoksina A (el Khoury i Atoui, 2010)

| Naziv | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
|---------------------------------------|----------------------------|----|----|----|----|
| Prirodni okratoksini | | | | | |
| Okratoksin A | Fenilalanin | Cl | H | H | H |
| Okratoksin B | Fenilalanin | H | H | H | H |
| Okratoksin C | Etil - ester, fenilalanin | Cl | H | H | H |
| Okratoksin A Metil - ester | Metil - ester, fenilalanin | Cl | H | H | H |
| Okratoksin B Metil - ester | Metil - ester, fenilalanin | H | H | H | H |
| Okratoksin B Etil - ester | Etil - ester, fenilalanin | H | H | H | H |
| Okratoksin α | OH | Cl | H | H | H |
| Okratoksin β | OH | H | H | H | H |

Uz *A. ochraceus*, neki od najvećih proizvođača OTA u hrani su: *A. carbonarius*, *A.niger*, *P. verrucosum* te *P. nordicum*. *A. carbonarius* obično raste pri povišenim temperaturama te je otporan na djelovanje UV zraka, stoga se često pojavljuje na grožđu i ostalom voću koje dozrijeva pri povišenim temperaturama (Markov i sur., 2022; Pitt i Hocking, 2002). Sukladno tome, ova vrsta odgovorna je za pojavu OTA u vinu te soku od grožđa (Markov i sur., 2022;

Leong, 2004). *A. niger* u usporedbi sa *A. carbonarius*, sintetizira manje količine OTA, međutim njegova je pojava moguća u voću poput jabuka, krušaka, citrusa, manga i dr. (JECFA, 2001). Od svih pripadnika roda *Penicillium* jedino *P. verrucosom* i *P. nordicum* pokazuju sposobnost sinteze OTA. *P. verrucosom* odgovoran je za proizvodnju OTA primarno u žitaricama (Markov i sur., 2022; JECFA, 2001), dok *P. nordicum* pokazuje sposobnost sinteze velikih količina OTA u siru te mesnim proizvodima (Larsen i sur., 2001). U tablici 2 prikazani su optimalni uvjeti temperature i aktiviteta vode potrebni za rast navedenih plijesni.

Tablica 2. Optimalni uvjeti rasta toksikotvornih plijesni (JECFA, 2001)

| PLIJESNI | OPTIMALNA TEMPERATURA (°C) | OPTIMALNI AKTIVITET VODE |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | 24 - 31 | 0,95 - 0,99 |
| <i>Aspergillus carbonarius</i> | 25 - 32 | 0,82 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 35 - 37 | 0,77 |
| <i>Penicillium verucosum</i> | 20 (0 - 30) | 0,80 |

2.1.2. Toksikokinetika OTA

Toksikokinetika OTA, odnosno procesi unosa OTA u organizam, njegova apsorpcija, distribucija i eliminacija su dobro poznati, a proučavani su na različitim vrstama životinja kao što su: svinje, štakori, majmuni, miševi te zečevi (Mantle, 2008; Li i sur., 1997; Hagelberg i sur., 1989; Galtier i sur., 1981).

Dio unesenog OTA razgrađuje crijevna mikroflora prisutna u GI traktu dok se ostali dio akumulira u krvi, tkivima, bubrezima te mlijeku (Hohler i sur., 1999; IARC, 1993). Pasivna apsorpcija OTA započinje nakon njegovog unosa hranom te se odvija iznimno brzo, uglavnom iz želuca i tankog crijeva, što su dokazala istraživanja provedena na miševima i štakorima (Pfohl - Leszkowicz i sur., 2007). Ulaskom OTA u GI trakt narušava se integritet crijevnog epitela čija je glavna funkcija apsorpcija hranjivih tvari te sprječavanje ulaska štetnih tvari u organizam (Buckley i Turner, 2018). Djelovanjem crijevne mikroflore dolazi do hidrolize dijela OTA, odnosno do pucanja peptidnih veza čime nastaje manje toksičan metabolit OT α koji se dalje apsorbira u organizam. Hidroliza se najvećim dijelom odvija u debelom crijevu djelovanjem enzima prisutne mikroflore, a neki od njih su karboksipeptidaza a, tripsin te α -

kimotripsin (Doster i sur., 1972; Pitout 1969). Količina apsorbiranog OTA varira ovisno o životinjskoj vrsti, ali i o sastojcima hrane koji mogu djelovati inhibitorno ili s druge strane povećati apsorpciju OTA (Pfohl - Leszkowicz i sur., 2007). Distribucija OTA odvija se putem krvotoka obzirom na njegov izrazito visoki afinitet prema proteinima krvnog seruma, posebice prema albuminu, a samo vezanje dodatno je potaknuto pasivnom apsorpcijom neioniziranog oblika toksina i objašnjava dugo polu-vrijeme života OTA u tijelu ($t_{1/2}=35$ dana) (McMaster i Vedani, 1999). Vezanje OTA za albumin dovodi do povećanja njegove koncentracije u krvnoj plazmi u odnosu na koncentraciju u crijevima. Tako vezani OTA se dalje distribuira do jetre i bubrega gdje se najveća količina OTA i njegovih metabolita izlučuje urinom. Izlučivanje OTA može se odvijati i putem fecesa, dok je kod sisavaca izlučivanje OTA i njegovih metabolita utvrđeno i putem majčinog mlijeka (Breitholtz -Emanuelsson i sur., 1993; Galtier i sur., 1977). Eliminacija OTA iz organizma odvija se sporo u odnosu na apsorpciju i eliminaciju metabolita prvenstveno zbog odvijanja enterohepatične recirkulacije kojom OTA iz jetre preko žuči ponovno dopijeva u tanko crijevo te zbog reapsorpcije putem bubrega. Istraživanja provedena na štakorima, kozama, pilićima i svinjama pokazala su da se OTA najviše distribuira u bubrezima, nakon čega slijede jetra, mišići te masno tkivo (Ferrufino - Guardia i sur., 2000; Harwing i sur., 1983).

2.1.3. Utjecaj OTA na ljudsko zdravlje

Ljudi su svakodnevno izloženi OTA zbog konzumiranja žitarica i proizvoda od žitarica, kave, vina, piva ali i proizvoda animalnog podrijetla poput mlijeka, mesa i jaja te začina (Di Stefano i sur.; 2014; Markov i sur. 2013). Posebno su opasni zbog visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja sadrži mikotoksine.

Brojna provedena istraživanja dokazala su da OTA ima nefrotoksično, neurotoksično, genotoksično, imunosupresivno, hepatotoksično, teratogeno i karcinogeno djelovanje (Markov i sur., 2022; El Khoury i Atoui, 2010). 1993. godine IARC ga je svrstala u skupinu 2B kao mikotoksin s potencijalnim karcinogenim učinkom. Istraživanje koje su 2007. godine proveli Pfohl-Leszkowicz i Manderville pokazalo je da OTA upravo zbog svoje kisele prirode pasivnom apsorpcijom odlazi u crijeva, gdje zbog afiniteta prema proteinima plazme putem krvi dopijeva do ciljanih organa. Izrazit problem također predstavlja i vrijeme zadržavanja OTA u krvi koje, nakon oralne ingestije, iznosi 840 sati, odnosno 35 dana. Eliminacija OTA iz

jetre odvija se putem proteinskih nosača koji vežu OTA iz kompleksa sa proteinima krvi u hepatocit kojim se OTA izlučuje u žuč (Petzinger i sur., 2002). Jedno od istraživanja kojim je dokazano nefrotoksično djelovanje OTA je ono Di Paola i sur. provedeno 1993. godine u Italiji. Njime je dokazano da su farmeri, nakon nekoliko mjeseci izloženosti pšenici kontaminiranoj s OTA kojeg je proizveo *A. ochraceus*, razvili akutno zatajenje bubrega. Jedan od najvećih slučajeva povezan sa OTA je pojava Balkanske endemske nefropatije (BEN) koja je 1960-ih godina zahvatila područje Jugoistočne Europe. Glavne karakteristike ove bolesti su zatajenje bubrega te moguća pojava raka mokraćne cijevi (uretre). Kao jedan od potencijalnih uzročnika ove bolesti naveden je OTA zbog visoke koncentracije u zemljama Jugoistočne Europe (Radić i sur., 1997). Međutim, zbog ne definiranog mehanizma nastanka DNA - adukata u bubrezima izazvanih OTA, ne može se sa sigurnošću utvrditi da je upravo on odgovoran za pojavu ovog tipa nefropatije. Potencijalni karcinogeni učinak OTA kod ljudi otkriven je istraživanjima provedenim na miševima kod kojih je došlo do razvoja hepatocelularnih tumora te tumora na bubrezima (Huff i sur., 1992). Jedna od mogućih teorija koja opisuje njegov karcinogeni, ali ujedno i genotoksični učinak zasniva se na stvaranju kovalentne veze između OTA ili njegovih reaktivnih metabolita i DNA, čime dolazi do nastanka DNA - adukata u bubrezima (Pfohl - Leszkowicz i Castegnaro, 2005). Međutim, sama priroda veze između OTA i DNA još uvijek nije jasno definirana, stoga se navedena teorija ne može smatrati u potpunosti točnom. Imunotoksičnost i teratogenost OTA dosad su dokazane kod životinja, gdje je utvrđeno da OTA inhibira proliferaciju T i B limfocita, zaustavlja proizvodnju interleukina 2 i njegovih receptora (Lea i sur., 1989) te da putem posteljice (placente) dopijeva do fetusa kod kojeg izaziva brojne morfološke anomalije (El Khoury i Atoui, 2010).

2.1.4. Zakonska regulativa

Obzirom na njegove brojne toksične učinke na ljudsko zdravlje, Europska Unija je na temelju detaljne procjene sigurnosti i izloženosti provela analizu rizika, čime su utvrđene sigurne dnevne izloženosti (TDI - eng. *Tolerable daily intake*) te najveće dopuštene količine (NDK) OTA u hrani. Tako su 19. prosinca 2006. godine Uredbom Komisije (EC) br. 1881/2006 utvrđene i definirane najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani pa tako i OTA. U tablici 3 prikazane su NDK (najveće dopuštene količine) vrijednosti za OTA u pojedenim namirnicama izražene u $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb - eng. *parts-per billion*).

Tablica 3. Najveće dopuštene količine OTA u pojedinoj hrani (Uredba (EC) br. 1881/2006)

| HRANA | NDK ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|---|---------------------------------|
| Neprerađene žitarice | 5,0 |
| Svi proizvodi dobiveni iz neprerađenih žitarica, uključujući prerađene proizvode od žitarica te žitarice namijenjene izravnoj prehrani ljudi | 3,0 |
| Groždice (sve vrste) | 10,0 |
| Pržena zrna kave i mljevena pržena kava | 5,0 |
| Instant kava | 10,0 |
| Vino | 2,0 |
| Prerađena hrana na bazi žitarica i hrana za dojenčad i malu djecu | 0,50 |

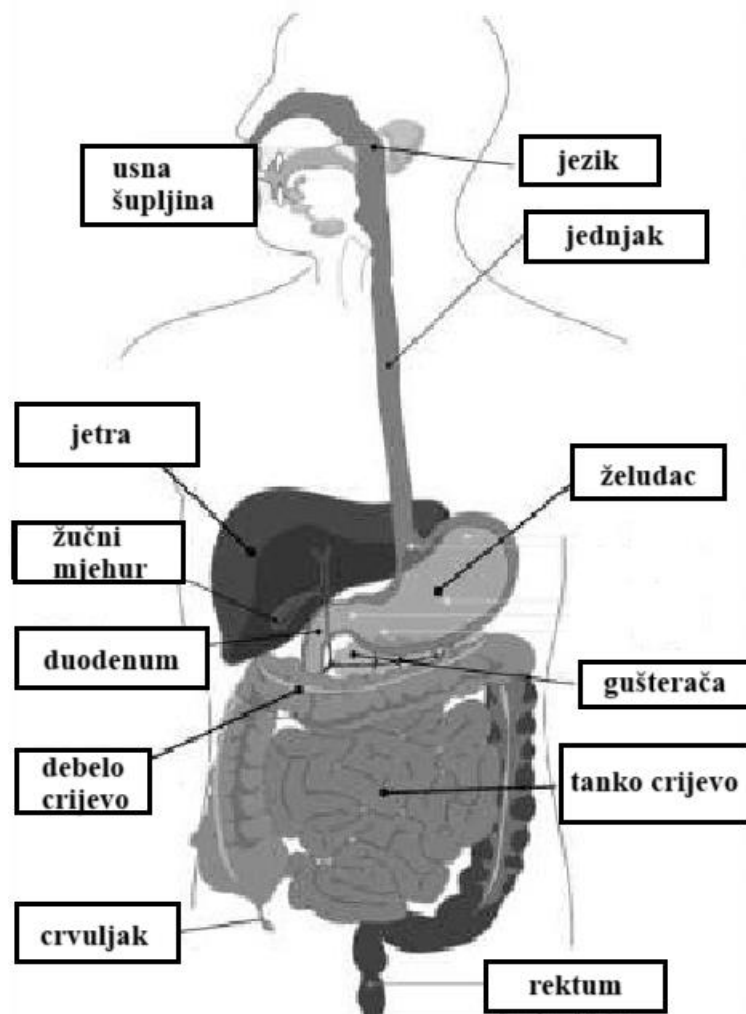
Uredbom Komisije (EZ) br. 401/2006 utvrđene su metode uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razine mikotoksina u hrani. Ovom Uredbom detaljno je propisan način na koji se provodi uzorkovanje te sama analiza za hranu kao što su: žitarice i proizvodi od žitarica, začini, sušeno voće (uključujući groždice), suhe smokve, kava te proizvodi od kave. U Republici Hrvatskoj je na temelju Zakona o hrani (NN 46/07, 84/08, 55/11) donesen Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani čije se odredbe slažu sa aktima Uredbi donesenih na razini Europske Unije.

2.2. GASTROINTESTINALNI TRAKT

Gastorintestinalni (GI) trakt (slika 2) predstavlja prvu barijeru kod imunološke obrane organizma od djelovanja toksičnih tvari poput mikotoksina. Većina istraživanja koja prate metabolički put mikotoksina u GI traktu koriste *in vitro* modele kojima se simuliraju uvjeti ljudskog GI trakta. Probava započinje u usnoj šupljini gdje djelovanjem α - amilaze i lipaze koje se nalaze u slini dolazi do razgradnje sastojaka hrane.

Crijevnu mikrofloru čini nekoliko vrsta mikroorganizama uključujući bakterije, viruse, protozoe i gljivice te je ona odgovorna za apsorpciju hranjivih tvari, sintezu enzima, vitamina i aminokiselina te proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina. Upravo se zbog svoje izrazite

metaboličke aktivnosti i interakcije sa domaćinom putem moždanih stanica smatra „nevidljivim“ organom u ljudskom tijelu.



Slika 2. Gastrointestinalni trakt (Ruiz i Montoto, 2018)

GI trakt igra važnu ulogu u imunološkoj obrani organizma, međutim prisutnost mikotoksina može značajno narušiti to djelovanje time što dolazi do oštećenja crijevnog epitela te pojave oksidativnog stresa (Ren i sur., 2019). Utjecaj OTA na GI trakt očituje se u povećanju propusnosti epitelne barijere te smanjenju održivosti epitelnih stanica (Ren i sur., 2019). Izloženost crijevne mikroflore djelovanju mikotoksina može rezultirati smanjenjem filogenetske raznolikosti mikroflore zbog toksičnog djelovanja mikotoksina ili razgradnjom, tj. metabolizacijom mikotoksina djelovanjem mikroorganizama čime se povećava ili smanjuje njihova toksičnost (Guerre, 2020). Smanjenje raznolikosti mikroflore može dovesti do disbioze za koju se smatra da igra ključnu ulogu kod pojave bolesti kao što su dijabetes, degenerativne bolesti živčanog sustava i rak debelog crijeva (Guerre, 2020).

Mikotoksini pokazuju različitu sposobnost apsorpcije unutar GI trakta. Određeni mikotoksini se ulaskom u GI trakt apsorbiraju u vrlo kratkom vremenu, dok drugi pokazuju puno veću otpornost te u crijevo dopijevaju u svom primarnom obliku, zbog čega kolonociti postaju izloženi najvećim koncentracijama mikotoksina. Istraživanjima kojima je praćen metabolički put mikotoksina u GI traktu, dokazano je postojanje nekoliko mehanizama djelovanja crijevne mikroflore na mikotoksine. Ti mehanizmi uključuju: biotransformaciju, ireverzibilno vezanje, hidrolizu, deaminaciju i dekarboksilaciju te aciliranje mikotoksina (Koirala i Anal, 2021). Navedenim mehanizmima je zajedničko da djelovanjem crijevne mikroflore i njihovih enzima dolazi do transformacije mikotoksina u manje toksične metabolite. OTA se djelovanjem crijevne mikroflore hidrolizira na OT α i fenilalanin čija je toksičnost, u odnosu na sam toksin, značajno manja (Rodrigues i sur., 2009).

2.2.1. GI modeli za biodostupnost OTA *in vitro*

In vitro modeli probave često se koriste u određivanju biodostupnosti različitih kontaminanata hrane, pa tako i mikotoksina, a njihova uloga je na pojednostavljeni način simulirati procese koji se odvijaju u usnoj šupljini, želucu i tankom crijevu u kojem se apsorbira glavina OTA.

Kod simuliranja ljudskog GI trakta bitno je da se sve reakcije provode na 37 °C što je tjelesna temperatura čovjeka, a parametri na koje također treba obratiti pozornost prilikom postavljanja modela su: pH, ionska snaga, enzimska aktivnost te sastav želučanog/crijevnog soka. Neke od bitnih značajki za optimizaciju *in vitro* modela probave su: sličnost fizioloških procesa onima u ljudskom organizmu, dinamičnost procesa probave koja uključuje razgradnju i apsorpciju sastojaka hrane, sukladnost biokemijskih reakcija sa kinetikom probave, prisutnost anaerobnih uvjeta i crijevne mikroflore te jednostavnost, primjenjivost i ponovljivost same metode (Minekus, 2005; Versantvoort i sur., 2004). Većina korištenih *in vitro* modela probave su statični modeli kojima se simulira prolazak hrane kroz GI trakt upravo zbog jednostavnosti njihove izvedbe te mogućnosti obrade velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. U simuliranim uvjetima, pH sline iznosi 6,8, a sama otopina sline sastoji se od elektrolita kao što su: KCl, NaH₂PO₄, NaSO₄, NaCl te NaHCO₃. Želučana faza započinje lučenjem želučanog soka koji se sastoji od sluzi, klorovodične kiseline, vode i enzima. Prisutnost klorovodične kiseline značajno smanjuje pH želuca koji se kreće između 1 i 3, a glavni enzim odgovoran za proteolitičku aktivnost želučanog soka je pepsin. Simulirana otopina želučanog soka najčešće

sadrži pepsin, elektrolite (NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃) te lipazu. Hrana potom odlazi u duodenum gdje se zahvaljujući peristaltičkoj aktivnosti miješa sa crijevnim tekućinama, a potom prolazi kroz tanko crijevo i u konačnici dolazi u debelo crijevo. pH simulirane otopine crijeva iznosi od 6 do 8,2, a sama otopina se sastoji od elektrolita te pankreatina (Gonzalez - Arias i sur., 2013).

Jedan od često korištenih *in vitro* modela ljudske probave za određivanje biodostupnosti OTA je RIVM model Versantvoorta i sur. (2004). Model se sastoji od tri koraka (odjeljka) koji simuliraju probavne procese u usnoj šupljini, želucu i tankom crijevu, a provedba uključuje dodatak simuliranih otopina fizioloških sokova u svakom koraku te inkubaciju na 37 °C. Navedeni model također je korišten u istraživanju Kabaka i sur. (2009) u kojem je određena biodostupnost OTA iz heljde i hrane za dojenčad iznosila od 29 do 32 %. Jedan od dinamičnih *in vitro* modela ljudske probave je TIM-1 koji podrazumijeva računalno upravljanje sustavom koji simulira peristaltiku želuca i tankog crijeva miješajući sadržaj kroz simulirane otopine GI trakta (Minekus, 1998). U istraživanju Avantaggiata i sur. (2007) navedeni je model korišten za određivanje biodostupnosti OTA i ostalih mikotoksina iz umjetno kontaminiranog kukuruza, a određena biodostupnost OTA iznosila je 88 %.

2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE (BMK)

BMK se često nalaze u brojnim namirnicama biljnog i životinjskog podrijetla kao što su mliječni proizvodi (mlijeko, jogurt, kefir, sir), fermentirani mesni proizvodi, fermentirano povrće, alkoholna pića (vino, pivo), a osim navedenog, također su sastavi dio ljudske i životinjske mikroflore (Hammes i sur., 1991). Jedan od glavnih benefita BMK je njihovo probiotičko djelovanje, koje se javlja zahvaljujući proizvodnji polisaharida, fermentaciji laktoze i citrata, proizvodnji vitamina i antimikrobnih tvari te sposobnosti adhezije i kolonizacije u probavnom sustavu (LeBlanc i sur., 2011; Lee i Kang, 2009; Oliveira i sur., 2008; Ananou i sur., 2007). Utjecaj BMK na sastav crijevne mikroflore dokazan je u istraživanju Butorac i sur. (2020) u kojem je kombinirana primjena sojeva *L.plantarum* SF9C i *L.brevis* SF9B dovela do povećanja brojnosti roda *Lactobacillus* kod štakora. Najčešće se primjenjuju kao starter kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda, posebice mlijeka i sireva, upravo zbog poboljšanja teksture, okusa, nutritivne vrijednosti te produljena roka trajanja proizvoda. Iako su BMK prirodno prisutne u mlijeku, prilikom industrijske proizvodnje velikih količina mlijeka

i ostalih mliječnih proizvoda, potreban je dodatan BMK kao starter kultura kako bi se u konačnici poboljšala kvaliteta gotovog proizvoda. Zahvaljujući njihovoj proteolitičkoj aktivnosti čime dolazi do konverzije proteina mlijeka, u fermentiranom mlijeku ispoljavaju se poželjna organoleptička svojstva (Moulay i sur., 2013; Yamina i sur. 2013), a pojava blago kiselog i svježeg okusa posebice je poželjna u proizvodima poput jogurta i sira (Kongo, 2013; Griffiths i Tellez, 2013). Zahvaljujući njihovom antimikrobnom djelovanju kojeg postižu zakiseljavanjem mlijeka na $\text{pH} < 4$ putem proizvodnje mliječne, octene i propionske kiseline, mlijeko postaje nepovoljan medij za rast i razmnožavanje patogenih mikroorganizama koji su česti uzročnici kvarenja hrane te pojava bolesti kod ljudi.

2.3.1. Postupci pripreme BMK

Zbog široke upotrebe BMK bilo kao starter kultura u prehrambenoj industriji, probiotika ili kao adsorbenta mikotoksina, stalno se traže postupci pripreme najprihvatljivijeg oblika stanica BMK za transport i njihovu primjenu. Cilj takvih postupaka je dobiti optimalnu formulaciju stanica BMK kako bi se osigurala sigurnost hrane i/ili hrane za životinje bez štetnih učinaka na ljude i životinje. Razni postupci pripreme bakterija uključuju: vlažnu biomasu (žive stanice bakterija); inaktiviranu biomasu (mrtve stanice) biomasa tretirana visokom temperaturom ili kiselinom; liofilizirane bakterije; mikroinkapsulirane stanice, a u novije vrijeme i primjenu zelene tehnologije (3D printanje za dobivanje npr. probiotičkih pasti).

2.3.1.1. Mikroinkapsulacija

Mikroinkapsulacija je proces oblaganja čvrstih čestica, kapljica tekućine ili plinova sa polimerima čime nastaju mikroinkapsulati sferičnog oblika. Neke od bioaktivnih komponenata koje se u prehrambenoj industriji najčešće inkapsuliraju su: polifenoli, aditivi, enzimi, stabilizatori te bakterije. Materijali koji se koriste za njihovo oblaganje moraju biti inertni te stabilizirati i kontrolirati otpuštanje inkapsuliranih komponenata pri određenim uvjetima. Polimeri kao što su gume, ugljikohidrati, masti, proteini i celuloze najčešće se koriste kao materijali za oblaganje. Prilikom odabira materijala u obzir je potrebno uzeti svojstva poput veličine i oblika mikroinkapsulata, permeabilnosti, kemijskih svojstava te sposobnost razgradnje. Na otpuštanje inkapsuliranih sastojaka utječu pH, temperatura, enzimska aktivnost, vrijeme, itd. Neke od tehnika mikroinkapsulacije su: sušenje raspršivanjem, liofilizacija, fluidizacija, ekstruzija, koakcervacija, inkluzija te geliranje. Primjena mikroinkapsulacije donosi brojne benefite kao što su: imobilizacija enzima i bakterija, zaštita od visokih

temperatura, UV zračenja i oksidacije, maskiranje nepoželjnih okusa i mirisa te produljenje roka trajanja (Jyothi i sur., 2012; Nazzaro i sur., 2012).

Jedna od čestih primjena mikroinkapsulacije u prehrambenoj tehnologiji jest inkapsulacija BMK. Prilikom mikroinkapsulacije BMK najvažnije je odabrati adekvatan materijal za njihovo oblaganje kako bi bakterijske stanice ostale žive te kako bi se kasnije prolaskom kroz gastrointestinalni (GI) trakt mogle progresivno otpuštati kroz polupropusnu membranu polimera koji ih oblaže. Mikroinkapsulacija omogućava preživljavanje BMK u kiselim uvjetima želuca te njihovo otpuštanje u crijevima. Svojstva kapsula koja utječu na vitalnost bakterijskih stanica su: početni broj stanica i soj bakterije, vrsta i koncentracija materijala upotrijebljenog za oblaganje te veličina čestica (Chen i sur., 2005). Alginat, kitozan, pektin, škrob te proteini sirutke jedni su od najčešće korištenih polimera za oblaganje stanica BMK. Navedeni polimeri se prilikom oblaganja mogu koristiti individualno ili u kombinaciji tvoreći višeslojne mikroinkapsulate koji imaju veću otpornost na kisik te niže pH vrijednosti (Nazzaro i sur., 2012). U laboratorijskoj primjeni, za mikroinkapsulaciju BMK, najčešće se koriste alginati, upravo zbog jednostavnosti i brzine pripreme takvih kapsula, koja uključuje miješanje suspenzije bakterijskih stanica (dobivene centrifugiranjem) u otopini alginata. Priprema alginatnih kapsula u kalcijevom kloridu vrlo je pogodna za inkapsuliranje osjetljivih materijala poput BMK zbog netoksičnosti alginata, održavanja vitalnosti bakterijskih stanica, formiranja čvrstih kapsula visoke mehaničke stabilnosti te lakšeg i bržeg otpuštanja inkapsuliranih bakterija sekvestracijom iona kalcija (Kailasapathy K, 2002; Shah i Ravula, 2000; Sheu i sur., 1993).

2.3.2. Uklanjanje mikotoksina djelovanjem BMK

Jedan od potencijalnih načina smanjenja biodostupnosti mikotoksina u hrani je upravo djelovanjem BMK, što potvrđuju i dosad provedena istraživanja (Haskard i sur., 2001). Neki od mehanizama kojim BMK utječu na biodostupnost mikotoksina uključuju inhibiciju rasta toksikotvornih plijesni zakiseljavanjem medija putem proizvodnje organskih kiselina te vezanje mikotoksina za staničnu stijenkku bakterija. Faktori koji utječu na sposobnost adhezije mikotoksina za staničnu stijenkku su: vrsta medija, koncentracija mikotoksina, ukupan broj bakterijskih stanica, pH, temperatura inkubacije te koristi li se bakterijska biomasa od živih ili mrtvih stanica. Provedenim istraživanjima utvrđeno je da se korištenje bakterijske biomase od mrtvih stanica pokazalo učinkovitije u uklanjanju mikotoksina. Adhezija mikotoksina postiže

se zahvaljujući hidrofobnosti stanične stijenke metabolički neaktivnih stanica, koja se postiže toplinskim tretmanom (Kuharić i sur., 2018; Haskard i sur., 2001; Haskard i sur., 2000;). Primjena toplinskog tretmana značajno utječe na integritet tj. strukturu stanične stijenke prilikom čega dolazi do pucanja glikozidnih veza u polisaharidima te amidnih veza u proteinima čime je omogućeno vezanje mikotoksina (Haskard i sur., 2001). Kod živih bakterijskih stanica površina je uglavnom hidrofilna, međutim prisutnost hidrofobnih džepova također omogućava vezanje manjih količina mikotoksina za staničnu stijenku (Haskard i sur., 2001). Kuharić i sur. (2018) svojim su istraživanjem dokazali da prirodno prisutne BMK u kravljem mlijeku imaju sposobnost vezanja metabolita AFM₁. Također, provedenim istraživanjem uočeno je da veću sposobnost vezanja mikotoksina pokazuju mrtve bakterijske stanice. Ionska izmjena, hidrofobne interakcije te kompleksacija odgovorne su za vezanje mikotoksina za staničnu stijenku BMK (Afshar i sur., 2020; Ben Taheur i sur., 2017; Dalie i sur., 2010). Osim hidrofobnosti stanične stijenke, na vezanje mikotoksina također utječe i struktura stanične stijenke koja je građena od višeslojnog peptidoglikanskog sloja koji okružuje citoplazmatsku membranu, a sastoji se od proteina, polisaharida te teihoične kiseline (Chapot - Chartier i Kulakauskas, 2014). Neka istraživanja su pokazala da do vezanja mikotoksina sa BMK dolazi tijekom prvih nekoliko minuta njihovog kontakta, stoga dulje vrijeme inkubacije neće rezultirati sa većim stupnjem vezanja, a posljedično niti dekontaminacija neće biti veća tijekom duljeg perioda izlaganja (Muaz i sur., 2021). Jedno od istraživanja koje potvrđuje navedenu tezu je ono Bova i sur. (2013) u kojem su biomase bakterija koje su činile žive odnosno mrtve stanice BMK pokazale jednaku sposobnost vezanja AFM₁ nakon tretmana 15 min i nakon tretmana 24 sata.

2.4. METODE ZA ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA

Analitičke metode koje se koriste za detekciju mikotoksina mogu se podijeliti na kromatografske i imunološke metode. Neke od najčešće korištenih kromatografskih metoda su: tankoslojna kromatografija (TLC - eng. *Thin Layer Chromatography*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC - eng. *High Performance Liquid Chromatography*), tekućinska kromatografija (LC - eng. *Liquid Chromatography*) u kombinaciji sa fluorescentnim detektorom ili masenim spektrometrom (LC - MS). Od imunoloških metoda, u detekciji OTA svoju primjenu su pronašle: ELISA, radioimunotest (RIA - eng. *Radioimmunoassay*), kemiluminiscentna imunometoda (CLIA), fluorescentna imunometoda (FIA) te imunosenzori (biosenzori).

2.4.1. UHPLC - MS/MS metoda

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC, eng. *Ultra - high performance liquid chromatography*) danas se smatra najpopularnijom analitičkom tehnikom za određivanje rezidua i ostataka kontaminanata u hrani. U kombinaciji sa masenom spektrometrijom (MS) vrlo često se primjenjuje za detekciju mikotoksina u hrani.

Vrlo česta primjena UHPLC - MS/MS metode leži u vrlo visokoj osjetljivosti i selektivnosti same metode koju mikotoksini zahtijevaju, s obzirom da se u hrani obično pojavljuju u vrlo niskim koncentracijama. Također, ova metoda omogućava multimikotoksinsku analizu, odnosno njome je moguće detektirati široki raspon mikotoksina i njihovih metabolita, za razliku od HPLC - a u kombinaciji sa UV ili fluorescentnim detektorom koji omogućava detekciju samo jedne skupine mikotoksina. Istovremena mogućnost detekcije nekoliko različitih vrsta komponenata prikazana je u istraživanju Mola i sur. (2008) u kojem je primjena UHPLC – MS/MS sustava omogućila detekciju 170 različitih vrsta spojeva u vremenskom periodu od 20 minuta. Kod UHPLC - a koriste se C18 kolone koje u usporedbi sa C8 kolonama pokazuju veću učinkovitost odvajanja mikotoksina (Ren i sur., 2007). Kao mobilna faza koristi se smjesa vodene otopine i organskog otapala, a najčešće se koriste metanol ili acetonitril. Mravlja ili octena kiselina te amonijev format i amonijev acetat najčešće se upotrebljavaju kao modifikatori mobilne faze, koji poboljšavaju oblik kromatografskog pika, povećavaju količine iona te suzbijaju natrijeve adukte (Al - Taher i sur., 2013; Fang i sur., 2013). Obzirom da UHPLC proizvodi vrlo uske pikove (1 - 3 s), MS analizatori koji se upotrebljavaju u kombinaciji sa UHPLC - om moraju biti vrlo brzi i osjetljivi kako bi se mogao odrediti veliki broj analita niskih koncentracija u vrlo kratkom vremenu. Danas se sve češće javlja trend kombiniranja UHPLC - a sa nekoliko MS analizatora kako bi se omogućilo istovremeno određivanje nekoliko desetaka različitih vrsta kontaminanata. Kod UHPLC sustava upotrebljavaju se čestice veličine manje od 2 mm čime se postiže bolja rezolucija te oštrina pikova (Narwate i sur., 2014). Maseni spektrofotometar sastoji se od izvora iona te analizatora mase koji navedene ione razdvaja prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Prednost MS - MS detektora leži u većoj osjetljivosti koja omogućava detektiranje vrlo niskih koncentracija analita.

Brojna istraživanja su kroz godine potvrdila vrlo visoku efikasnost navedene metode za analizu mikotoksina u namirnicama poput mlijeka, čaja, kave te raznih sjemenki i žitarica. Jedno od novijih istraživanja je ono Manizana i sur. (2018) kojim je dokazano da je primjena

UHPLC - MS/MS metode omogućila detekciju 77 različitih skupina mikotoksina u proizvodima od kukuruza, riže te kikirikija. Osim u detekciji mikotoksina, ova se metoda često upotrebljava za detekciju lijekova poput antibiotika, antidepresiva te analgetika, za detekciju veterinarskih lijekova te rezidua pesticida u hrani (Rathod i sur., 2019; Frenich i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Kako bi se ispitaio utjecaj bakterija mliječne kiseline na biodostupnost OTA iz umjetno kontaminirane domaće, suhe kobasice u simuliranim uvjetima GI trakta, korišteni su sojevi bakterija *Lactiplantibacillus plantarum* K₁ (izoliran iz domaćeg kulena) i *Lactiplantibacillus plantarum* A₂ (humanog podrijetla) dobiveni iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Bakterijski sojevi čuvaju se na -20 °C u MRS bujonu s 30 % (v/v) glicerola.

3.1.2. Hranjive podloge

U tablici 4 prikazan je sastav hranjivih podloga korištenih tijekom provedbe ovog pokusa.

Tablica 4. Sastav hranjivih podloga

| HRANJIVE PODLOGE | SASTOJCI | KOLIČINA (g/L) |
|------------------|---------------------------|----------------|
| MRS agar | pepton | 10,0 |
| | goveđi ekstrakt | 10,0 |
| | ekstrakt kvasca | 5,0 |
| | glukoza | 20,0 |
| | dinatrijev hidrogenfosfat | 2,0 |
| | natrijev acetat | 5,0 |
| | amonijev citrat | 2,0 |
| | magnezijev sulfat | 0,2 |
| | manganov sulfat | 0,05 |
| | agar | 15,0 |
| | Tween 80 | 1,0 |

Tablica 4. Sastav hranjivih podloga – *nastavak*

| | | |
|------------------|---------------------------|------|
| MRS bujon | pepton | 10,0 |
| | goveđi ekstrakt | 10,0 |
| | ekstrakt kvasca | 5,0 |
| | glukoza | 20,0 |
| | dinatrijev hidrogenfosfat | 2,0 |
| | natrijev acetat | 5,0 |
| | amonijev citrat | 2,0 |
| | magnezijev sulfat | 0,2 |
| | manganov sulfat | 0,05 |
| | Tween 80 | 1,0 |

pH vrijednost MRS agara iznosi 6,5 te je steriliziran pri 121 °C, 15 min. Sterilizacija MRS bujona također je provedena pri 121 °C, 15 min.

3.1.3. Kemikalije

- Acetonitril, HPLC grade
- Alginat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Amonij acetat, (za masenu spektrometriju)
- Kalcijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- KCl, p. a.
- KH₂PO₄, p. a.
- Klorovodična kiselina (Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka)
- Metanol (Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka)
- Metanol, p.a. i HPLC grade
- Mononatrijev fosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Mravlja kiselina, p. a. (za masenu spektrometriju)
- Na₂HPO₄
- NaCl, p. a.
- Natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Natrijev citrat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- Natrijev sulfat (Gram - mol, Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina, p. a. (za masenu spektrometriju)
- Tween 20
- Ultračista voda
- Urea (Alkaloid, Skopje, Makedonija)

3.1.4. Mikotoksin

Standard OTA:

- OTA u obliku kristalića (Trilogy Analytical Laboratory, Washington, SAD)

3.1.5. Pribor i aparatura

- Adapter/spremnik za imunoafinitetne kolonice - Reservoir tank (Agilent)
- Analitička vaga (Sartorius, Njemačka)
- Autoklav (Sutjeska, Srbija)
- Automatske pipete (100 - 1000 μ L) (Eppendorf, Njemačka)
- Bunsenov plamenik
- Centrifuga
- Centrifuga Z206A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Centrifuga Z446K (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Čepovi za vijale
- Erlenmeyerove tikvice (300-500 mL)
- Falkonove epruvete (15 i 50 mL)
- HPLC (Infinity 1260, Agilent); maseni detektor (QQQ 6410, Agilent)
- Imunoafinitetne kolonice AFLAOCHRAPREP® (R - BIOPHARM)
- Jednokanalne pipete, 10 – 5000 μ L
- Kolona: Gemini, 150 x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex
- Konusne epruvete, PTFE, sa čepom na navoj, volumena 50 mL
- Laboratorijska vaga (Sartorius, Njemačka)

- Laboratorijske čaše (50 - 300 mL)
- LCMS
- Magnetska mješalica, Lab Stir (Gilson, Middleton, WI, SAD)
- Menzure, 50 – 1000 mL
- Mikrobiološke epruvete
- Petrijeve zdjelice (ϕ 10 cm)
- pH-metar MP220 (Mettler Toledo, Švicarska)
- Predkolona: SecurityGuard™ Cartridges, Gemini® C18 4 x 3.0 mm ID
- Staklene epruvete za jednokratnu uporabu, volumena 10 mL
- Štapići po Drigalskom
- Štapni mikser
- Uređaj za pročišćavanje – Vacuum manifold
- Vibromikser, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)
- Vijali za HPLC, volumena 3 mL, sa i bez inserata
- Vodena kupelj (Inkolab, Hrvatska)
- Žličice

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema stock otopine okratoksina A

Stock otopina OTA pripremljena je otapanjem 1 μ g kristalića OTA u 5 mL metanola.

3.2.2. Uzgoj bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline *L. plantarum* K₁ i *L. plantarum* A₂ revitalizirane su naciepljivanjem u 5 mL MRS bujona i inkubiranjem na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije i vidljivog porasta biomase, 0,5 mL svake kulture precijepljeno je u 9 epruveta s 5 mL MRS bujona (ukupno 18 epruveta) te su potom inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata.

3.2.3. Priprema biomase živih i mrtvih stanica bakterija mliječne kiseline

Nakon preko noćnog uzgoja u MRS bujonu, bakterijske stanice svakog soja su centrifugiranjem pri 6000 okretaja/min u trajanju od 10 min izdvojene iz bujona. Supernatant je izdvojen, a istaložene stanice su resuspendirane u 9 mL sterilne vode te je postupak centrifugiranja i ispiranja sa sterilnom vodom ponovljen ukupno tri puta. Nakon toga suspenzije BMK su podijeljene u dvije skupine – prvu skupinu su činile žive, ne tretirane stanice, dok su drugu skupinu činile stanice termički tretirane u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 60 min.

3.2.3.1. Neizravno određivanje broja živih stanica

Iz suspenzija bakterijskih stanica načinjene su serije decimalnih razrjeđenja kako bi se indirektnom metodom naciepljivanja poznatog volumena suspenzija (100 µL) na čvrstu podlogu (MRS agar) odredio broj živih stanica bakterija mliječne kiseline. Kolonije porasle na čvrstoj podlozi predstavljaju stvaran broj živih stanica, a dobivene vrijednosti izražene su kao CFU vrijednost (eng. *Colony Forming Units*). Broj živih stanica bakterija mliječne kiseline izračunat je prema jednadžbi (1), a rezultati su prikazani u tablici 5.

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija (N)}}{\text{upotrebljeni volumen uzorka (mL)}} \times \text{recipročna (obratna) vrijednost razrjeđenja} \quad (1)$$

3.2.4. Mikroinkapsulacija stanica bakterija mliječne kiseline

U prethodno pripremljene biomase živih odnosno mrtvih bakterijskih stanica oba bakterijska soja dodano je po 15 mL otopljenog natrijevog alginata (2 %) i dobro homogenizirano. Pomoću šprice volumena 10 mL postupno su dodavane u alginatu suspendirane bakterijske stanice u 150 mL 3 % - tne otopine kalcijevog klorida uz miješanje na magnetskoj mješalici, čime su formirani mikroinkapsulati (slika 3). Formirani mikroinkapsulati su potom ostavljeni 30 minuta u otopini kalcijevog klorida kako bi očvrsnuli, nakon čega su ostavljeni da se posuše na zraku (slika 4). Ukupno su pripremljene 4 različite vrste mikroinkapsulata: dvije su sadržavale žive stanice sojeva *L. plantarum* K₁ i A₂, a druge dvije mrtve (termički tretirane) stanice navedenih kultura.



Slika 3. Formiranje mikrokapsula s BMK (vlastita fotografija)



Slika 4. Sušenje mikrokapsula na zraku (vlastita fotografija)

3.2.4.1. Neizravno određivanje broja živih stanica u mikroinkapsulatima

Kako bi se odredio broj živih mikroinkapsuliranih bakterijskih stanica, odvagano je 2 g formiranih mikroinkapsulata te su otopljeni u 60 mL 2 % - tne otopine natrijevog citrata uz miješanje na magnetskoj miješalici u trajanju od 30 minuta. Iz dobivene suspenzije načinjena su decimalna razrjeđenja koja su nacijepljena na čvrstu podlogu (MRS agar). Kolonije porasle na čvrstoj podlozi predstavljaju ukupan broj živih bakterijskih stanica (tablica 5), dok u Petrijevim zdjelicama s MRS agarima na koje su nacijepljene mrtve (termički tretirane) stanice oba bakterijska soja, nije došlo do njihovog rasta.

Svi pokusi napravljeni su u duplikatu.

Tablica 5. Broj živih stanica BMK u uzorcima vlažne biomase i u mikroinkapsuliranom obliku izražen u CFU/mL, odnosno CFU/g

| UZORAK | Koncentracija |
|------------------------------------|--------------------------|
| Vlažna biomasa BMK | |
| <i>L. plantarum</i> K ₁ | $7,7 \times 10^8$ CFU/mL |
| <i>L. plantarum</i> A ₂ | $5,1 \times 10^8$ CFU/mL |
| Mikroinkapsulirani oblik BMK | |
| <i>L. plantarum</i> K ₁ | $9,9 \times 10^7$ CFU/g |
| <i>L. plantarum</i> A ₂ | $1,74 \times 10^8$ CFU/g |

3.2.5. Priprema otopina za simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta

Uvjeti gastrointestinalnog trakta simulirani su u *in vitro* modelu probavnog sustava prema Kabak i sur. (2009), a odgovarajuće otopine pripremljene su prema Marques i sur. (2011).

3.2.5.1. Priprema simulirane otopine usne šupljine

Prirodni uvjeti usne šupljine simulirani su pripremom otopine sastava (g/L): KCl 0,1789, NaH₂PO₄ 0,1776, Na₂SO₄ 0,336, NaHCO₃ 0,336, CO(NH₂)₂ 0,0396. pH vrijednost pripremljene otopine podešena je na $6,8 \pm 0,5$ pomoću koncentrirane klorovodične kiseline.

3.2.5.2. Priprema simulirane otopine želučanog soka

Prirodni uvjeti želuca simulirani su otapanjem pepsina (3 g/L) u otopini sastava (g/L): NaCl 3,6, KCl 0,3578, NaH₂PO₄ 0,3550, Na₂SO₄ 0,672, NaHCO₃ 0,672, CO(NH₂)₂ 0,0792. pH vrijednost pripremljene otopine podešena je na $3,0 \pm 0,5$ pomoću koncentrirane klorovodične kiseline.

3.2.5.3. Priprema simulirane otopine tankog crijeva

Prirodni uvjeti crijeva simulirani su otapanjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (3,0 g/L) u otopini sastava (g/L): NaCl 3,6, KCl 0,3578, NaH₂PO₄ 0,355, Na₂SO₄ 0,672, NaHCO₃ 0,672, CO(NH₂)₂ 0,0792. pH vrijednost pripremljene otopine iznosila je $6,5 \pm 0,5$.

3.2.6. Priprema matriksa

Pomoću štapnog miksera samljeveno je 50 g sušene kobasice dobavljene s domaćeg gospodarstva iz okolice Zagreba. Potom je u zasebnim staklenim laboratorijskim čašama odvagano po 4,5 g samljevene kobasice te je svaki uzorak kontaminiran stock otopinom OTA do konačne koncentracije 40 µg/kg. Nakon dodatka OTA, sadržaj u čašama je dodatno homogeniziran pomoću štapnog miksera te potom prebačen u zasebne Falkonove epruvete.

U prethodno označene Falkonove epruvete s kontaminiranim uzorcima kobasica, dodani su sojevi BMK *L. plantarum* K₁ i *L. plantarum* A₂ u obliku: vlažne biomase (žive stanice u koncentraciji 10⁸ CFU/g kobasice); inaktivirane biomase (mrtve stanice u koncentraciji 0,2 mg/g kobasice), odnosno u mikroinkapsuliranom obliku koji je sadržavao žive stanice u koncentraciji 10⁷ do 10⁸ CFU/g kobasice te 0,2 mg/g kobasice inaktivirane biomase.

Oznaka i opis uzoraka je naveden u tablici 6.

Tablica 6. Oznake i opis uzoraka kobasice kontaminirane s OTA i tretirane bakterijama mliječne kiseline

| UZORAK | OPIS UZORKA |
|--------|---------------------------|
| 1 | M+OTA+K ₁ (ž) |
| 2 | M+OTA+K ₁ (m) |
| 3 | M+OTA+K ₁ (žk) |
| 4 | M+OTA+K ₁ (mk) |
| 5 | M+OTA+A ₂ (ž) |
| 6 | M+OTA+A ₂ (m) |
| 7 | M+OTA+A ₂ (žk) |
| 8 | M+OTA+A ₂ (mk) |
| 9 | K ₁ (ž)+OTA |
| 10 | K ₁ (m)+OTA |
| 11 | K ₁ (žk)+OTA |
| 12 | K ₁ (mk)+OTA |
| 13 | A ₂ (ž)+OTA |
| 14 | A ₂ (m)+OTA |
| 15 | A ₂ (žk)+OTA |
| 16 | A ₂ (mk)+OTA |
| 17 | M+OTA |
| 18 | M |

M – matriks; K₁/A₂ (ž) – K₁/A₂ žive bakterijske stanice; K₁/A₂ (žk) – K₁/A₂ kapsule sa živim stanicama; K₁/A₂ (m) – K₁/A₂ mrtve bakterijske stanice; K₁/A₂ (mk) – K₁/A₂ kapsule sa mrtvim stanicama

3.2.7. Simulacija *in vitro* modela GI trakta

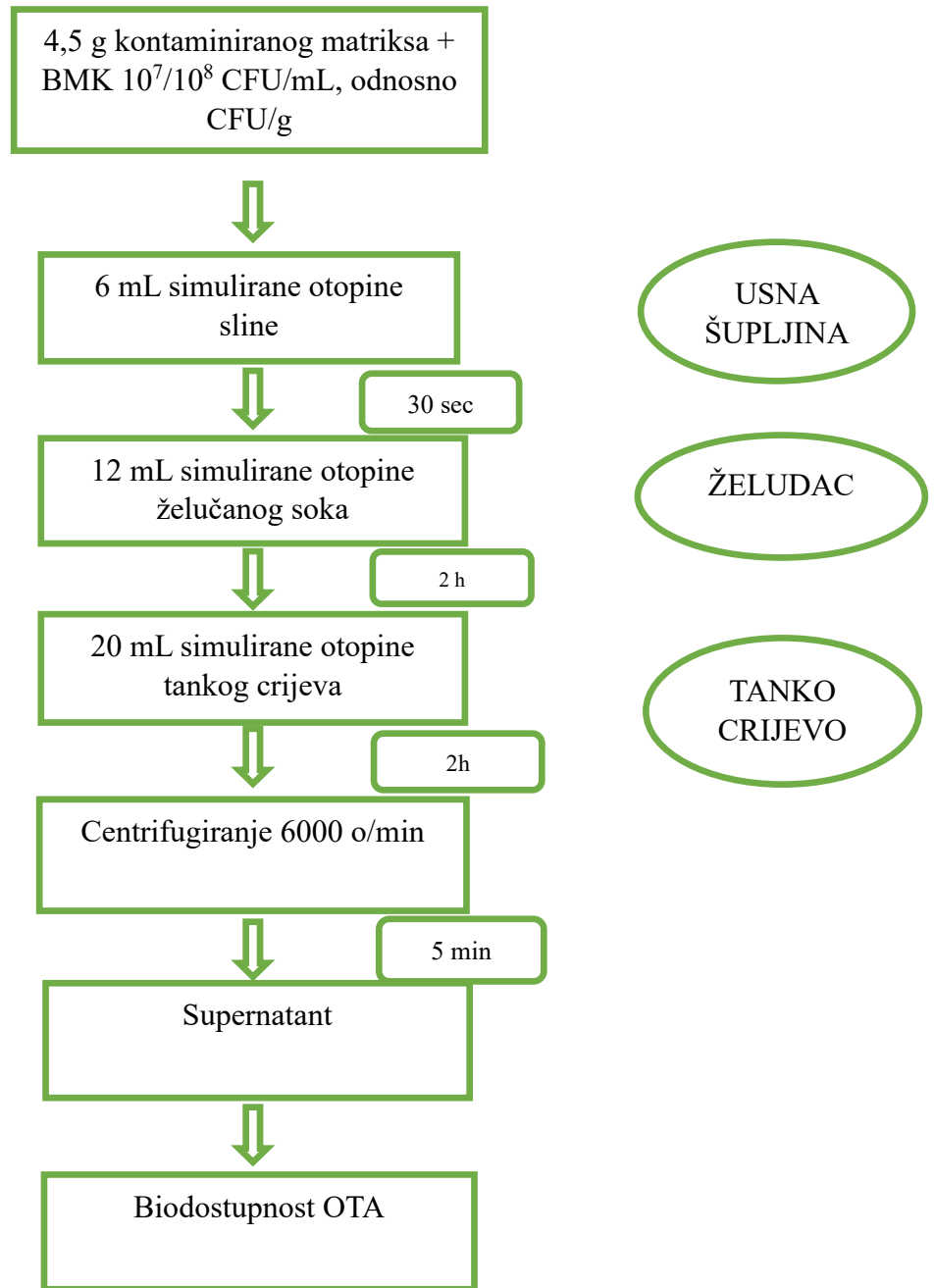
Kako bi se ispitaio utjecaj odabranih kultura BMK na biodostupnost OTA u kontaminiranoj sušenoj kobasici tijekom izlaganja simuliranim uvjetima GI trakta, u Falkonovu epruvetu s kontaminiranim uzorkom kobasice (4,5 g), dodano je najprije 6 mL simulirane otopine usne šupljine. Potom je nakon 30 sekundi zadržavanja u simuliranim uvjetima sline, dodano 12 mL simulirane otopine želučanog soka te su tako pripremljene Falkonove epruvete stavljene na tresilicu na 2 sata pri 37 °C uz vrtnju od 120 rpm. Nakon 2 sata, u svaki uzorak je dodano 20 mL simulirane otopine tankog crijevna te su takvi uzorci ponovno stavljene na tresilicu u iste uvjete na 2 sata (slika 5).



Slika 5. Simulacija uvjeta gastrointestinalnog trakta (vlastita fotografija)

Po završetku simulacije uvjeta GI trakta, svi uzorci su centrifugirani na 6000 o/min tijekom 5 minuta kako bi se odvojio supernatant. Sakupljeni uzorci su stavljeni na led do provedbe određivanja koncentracije OTA UHPLC - MS/MS metodom.

Postupak *in vitro* modela za određivanje biodostupnosti OTA u simuliranim uvjetima GI trakta prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz provedbe *in vitro* modela probave za određivanje biodostupnosti OTA

3.2.8. UHPLC - MS/MS metoda

3.2.8.1. Priprema otopina

Priprema 5M otopine amonijevog acetata

Za pripremu 5M otopine amonijevog acetata otopljeno je 3,85 g amonijevog acetata u 10 mL ultračiste vode.

Priprema mobilnih faza A i B

Za pripremu mobilne faze A pomiješano je 900 mL ultračiste vode i 100 mL metanola (HPLC grade). Zatim je pomoću pipete oduzeto 11 mL navedene otopine te je dodano 10 octene kiseline i 5 mL 5M amonijevog acetata.

Za pripremu mobilne faze B pomiješano je 970 mL metanola (HPLC čistoće) i 30 mL ultračiste vode. Zatim je pomoću pipete oduzeto 11 mL pripremljene otopine te je dodano 10 mL octene kiseline i 1 mL 5M amonijevog acetata.

Priprema 80 % - tne otopine metanola

80 % - tna otopina metanola pripremljena je miješanjem metanola i deionizirane vode u omjeru 80:20.

Priprema 0,1 % Tween 20 u PBS

U 900 mL deionizirane vode otopljeno je 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 i 1,16 g Na_2HPO_4 . pH vrijednost je pomoću 1M otopine NaOH podešena na 7,4. Potom je dodan 1 mL Tween 20 te je deioniziranom vodom napunjeno do 1000 mL.

Priprema PBS - a

U 900 mL deionizirane vode otopljeno je 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 i 1,16 g Na_2HPO_4 . pH vrijednost otopine je pomoću 1M otopine NaOH podešena na 7,4 te je deioniziranom vodom napunjeno do 1000 mL.

Provedba UHPLC - MS/MS metode

U tikvici volumena 100 mL razrijeđeno je 12 mL supernatanta sa 60 mL 0,1 % Tween u PBS te je otopina uzorka lagano promiješana. Potom je 48 mL otopine uzorka aplicirano na imunoafinitetnu kolonicu pomoću pipete i adaptera. Kolonica je potom isprana sa 20 mL PBS - a te je nakon ispiranja osušena primjenom vakuuma. Zatim je kolonica eluirana sa 1 mL metanola (HPLC grade), a dobiveni eluat je još tri puta propušten kroz kolonicu uz povratno ispiranje. Potom je na kolonicu dodan 1 mL ultračiste vode te je ponovno primijenjeno sušenje vakuumom. Na kraju su uzorci vortexirani i stavljeni u vijale za HPLC. Parametri analize prikazani su u tablicama 7 i 8.

Tablica 7. Parametri analize

| Trajanje analize | 22 min |
|---------------------|----------|
| Temperatura | 25 °C |
| Protok mobilne faze | 1 mL/min |
| Početni tlak | 115 bar |
| Capillary current | 42 nA |
| Izvor | ESI |
| Delta EMV | 500 |

Tablica 8. Parametri izvora

| Parametar | + | - |
|------------------------|------|------|
| Temperatura plina (°C) | 350 | 350 |
| Protok plina (L/min) | 12 | 12 |
| Nebulizer (L) | 20 | 20 |
| Capillary | 2000 | 4000 |

Za kvalitativno određivanje prisutnosti okratoksina A u uzorcima korištena je UHPLC/MS - MS metoda, a parametri validacije koeficijent korelacije, limit detekcije i limita kvantifikacije te iskorištenje prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Parametri validacije metode

| Parametar | Rezultat |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Granica detekcije (LOD) | 0,18 $\mu\text{g/kg}$ |
| Granica kvantifikacije (LOQ) | 0,59 $\mu\text{g/kg}$ |

4. REZULTATI I RASPRAVA

Budući da mikotoksini kontaminiraju brojne namirnice biljnog i životinjskog podrijetla, konzumacija hrane kontaminirane OTA mogla bi biti velika prijetnja zdravlju ljudi i životinja. Međutim, količina mikotoksina koja se hranom unese u organizam ne odražava uvijek količinu ovog spoja koji je dostupan za ispoljavanje svog toksičnog djelovanja u ciljanom organu u tijelu, budući da će samo dio progutanog spoja biti bioraspoloživ. Bioraspoloživost mikotoksina predstavlja dio progutanog mikotoksina, u određenoj matrici hrane, koji dopijeva u sistemsku cirkulaciju i distribuira se po cijelom tijelu kako bi ispoljio svoj toksični učinak. Zapravo, oralna bioraspoloživost sastoji se od tri različita i uzastopna procesa (González - Arias i sur., 2013; Brandon i sur., 2006.):

a) otpuštanje mikotoksina iz matrice hrane tijekom probave u GI traktu. U ovom koraku mjeri se biodostupni mikotoksin.

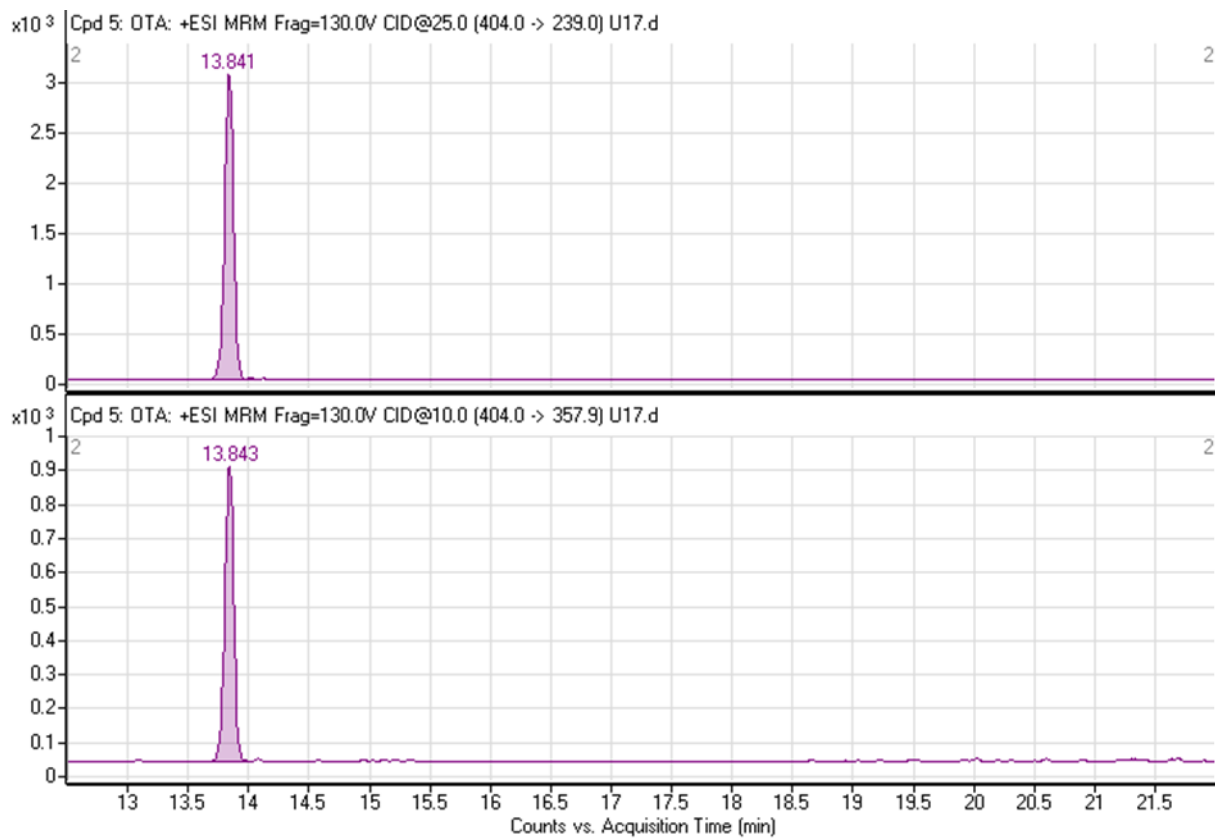
b) apsorpcija biodostupnog mikotoksina kroz intestinalne epitelne stanice GI trakta, pri čemu se mikotoksin transportira u krvotok (ili limfu).

c) metabolizam mikotoksina prije dospjevanja u sistemsku cirkulaciju (tj. biotransformacija i izlučivanje crijevnim epitelom ili jetrom), tzv. efekt prvog prolaza.

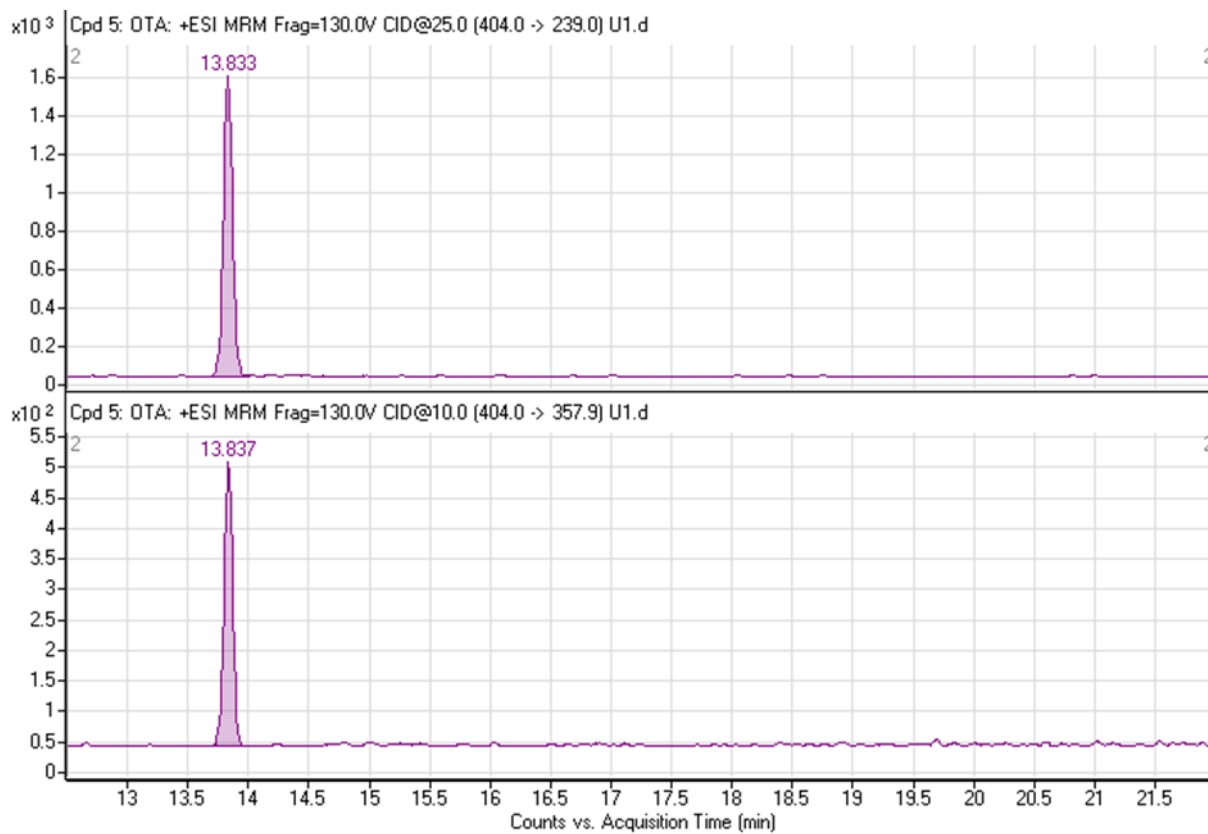
Iako je za sada biodostupnost mikotoksina određena samo u *in vitro* sustavima, postala je važna jer predstavlja količinu mikotoksina koja može dospjeti u krv nakon apsorpcije u tankom crijevu i doprinijeti toksičnoj izloženosti organizma. Nakon gutanja hrane, toksin se može djelomično ili potpuno osloboditi iz matrice (hrane) tijekom probave u GI traktu, a ta biodostupna frakcija mikotoksina dostupna je za transport kroz crijevni epitel. Međutim, poznato je da gastrointestinalni trakt predstavlja prvu barijeru kod imunološke obrane organizma od štetnih tvari pa tako i OTA - e. U GI traktu u obrani organizma od djelovanja toksina sudjeluju brojni mikroorganizmi koji čine crijevnu mikrofloru, koji svojim djelovanjem u određenim količinama mogu smanjiti štetni utjecaj mikotoksina. Međutim djelovanje mehanizama prisutne mikroflore nije dovoljno kako bi se u većoj mjeri spriječio negativan utjecaj toksina na ljudsko zdravlje stoga je potrebno uvesti dodatne metode koje će pridonijeti smanjenju biodostupnosti OTA u GI traktu. Primjena BMK pokazala se djelotvornom za smanjenje koncentracije OTA u brojnim namirnicama kao što su mlijeko i mliječni proizvodi te meso i mesni proizvodi (Kongo, 2013; Arihara i sur., 1998). Sve zanimljiviji pristup dekontaminaciji mikotoksina mogao bi biti usmjeren na korištenje funkcionalne hrane koja sadrži korisne mikroorganizme, koji mogu vezati OTA u ljudskom GI traktu.

Stoga je u ovom radu ispitan utjecaj dva soja bakterija mliječne kiseline *Lactiplantibacillus plantarum* (K₁) i *Lactiplantibacillus plantarum* (A₂) na biodostupnost OTA iz umjetno kontaminirane domaće kobasice s OTA koncentracije od 40 µg/kg u simuliranim uvjetima GI trakta. Tijekom provedbe eksperimenata osim određivanja biodostupnosti OTA iz prehrambenog matriksa (kobasice), u simuliranim uvjetima GI trakta određena je i biodostupnost OTA iz uzorka bez dodanog matriksa, a samo s dodatkom BMK.

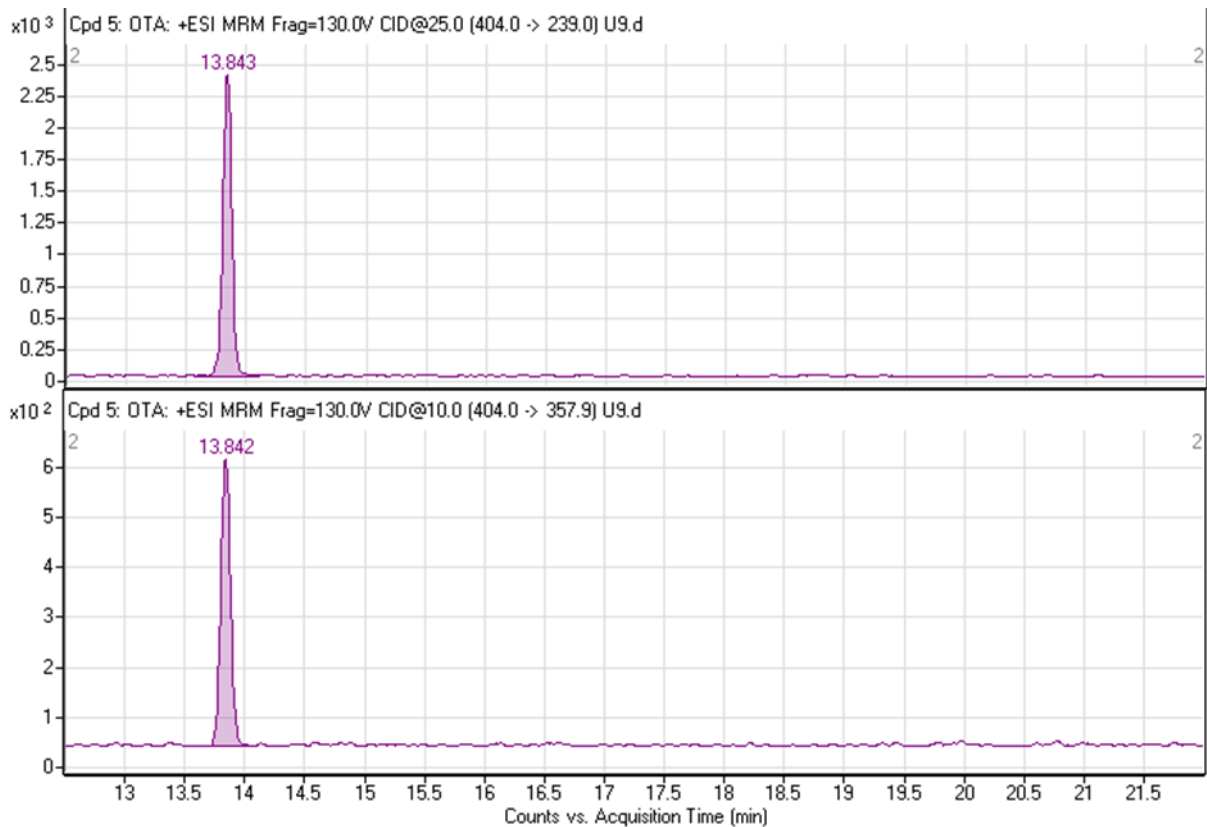
Rezultati istraživanja prikazani su na slikama 7 - 13 te u tablici 10. Zbog visoke osjetljivosti, za kvalitativno određivanje prisutnosti okratoksina A u uzorcima korištena je UHPLC/MS - MS metoda, a primjeri razvijenih kromatograma su prikazani na slikama 7 – 9. U tablici 10 su prikazane dostupne koncentracije OTA nakon tretiranja uzoraka (BMK + OTA i matriks + BMK + OTA) u simuliranim uvjetima GI trakta.



Slika 7. Primjer UHPLC - MS/MS kromatograma tijekom određivanja koncentracije OTA u uzorku s matriksom i OTA u koncentraciji 40 µg/kg (U17 (M+OTA))



Slika 8. Primjer UHPLC - MS/MS kromatograma tijekom određivanja koncentracije OTA u uzorku s matriksom i dodatkom živih stanica *L. plantarum* K₁ i OTA u koncentraciji 40 µg/kg (M + OTA + K₁(ž))



Slika 9. Primjer UHPLC - MS/MS kromatograma tijekom određivanja koncentracije OTA u uzorku s dodatkom živih stanica *L. plantarum* K₁ i OTA u koncentraciji 40 µg/kg (K₁(ž)+OTA)

Iz prikazanih primjera kromatograma vidljivo je da postoje razlike u pikovima za OTA između uzoraka u kojima je dodan matriks (slika 7 i 8) i između uzoraka u kojima su dodane žive stanice BMK (slika 8 i 9). U oba slučaja vidljivo je da je najmanji pik za OTA dobiven u uzorcima u kojima su i matriks i BMK.

Da bi se BMK koristile kao starter kulture ili kao probiotici potrebno je provesti njihovu karakterizaciju koja uključuje tehnološke, selekcijske, funkcionalne i sigurnosne kriterije. Kako je jedno od funkcionalnih svojstava BMK vezanje mikotoksina, u ovom radu ispitana je sposobnost sojeva BMK *L. plantarum* K₁ i *L. plantarum* A₂ da vežu OTA i na taj način smanje dostupnost OTA za apsorpciju u gastrointestinalnom traktu, a rezultati su prikazani u tablici 10 i na slikama 10 i 11. Postotak vezanog OTA izračunat je prema jednadžbi (2).

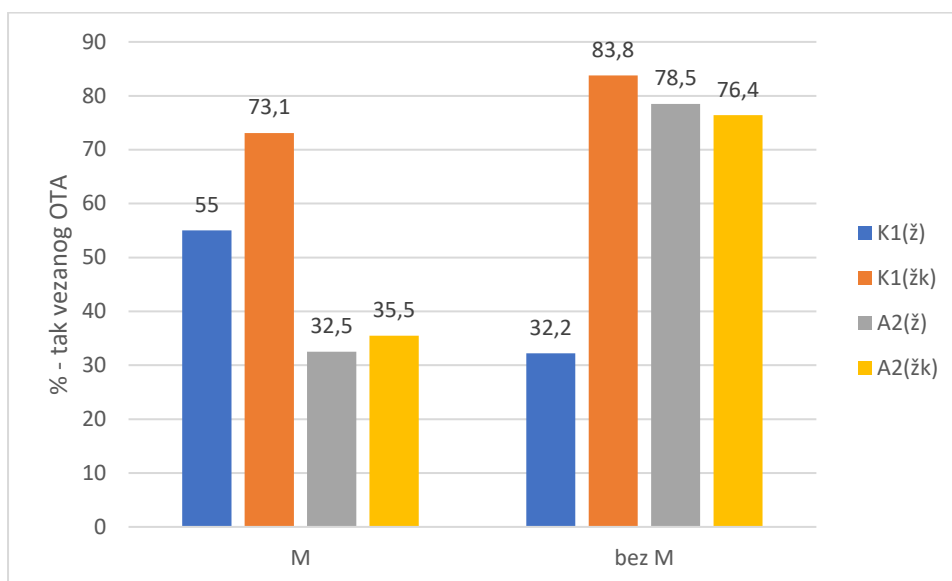
$$\% - \text{tak vezanog OTA} = 100 - \frac{c}{40 \mu\text{g/kg}} \times 100 \quad (2)$$

Tablica 10. Koncentracije OTA u uzorcima sa i bez dodanog matriksa i u prisutnosti različitih formulacija BMK dobivene provedbom UHPLC-MS/MS analize

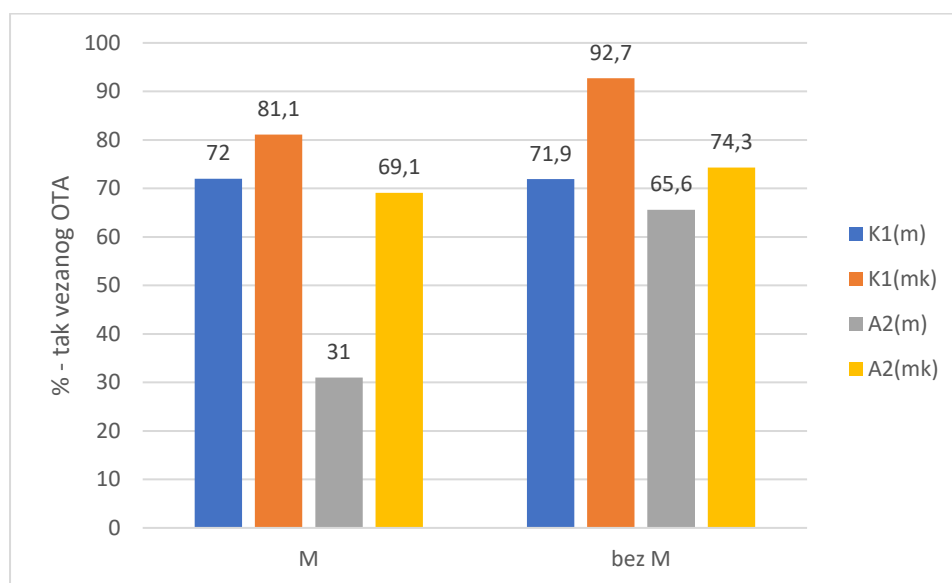
| Oznaka uzorka | OTA (μg/kg) |
|--------------------------------|-------------|
| 1 (M+OTA+ K ₁ (ž)) | 17,98 |
| 2 (M+OTA+ K ₁ (m)) | 11,20 |
| 3 (M+OTA+ K ₁ (žk)) | 10,76 |
| 4 (M+OTA+ K ₁ (mk)) | 7,56 |
| 5 (M+OTA+A ₂ (ž)) | 27,00 |
| 6 (M+OTA+A ₂ (m)) | 27,58 |
| 7 (M+OTA+A ₂ (žk)) | 25,80 |
| 8 (M+OTA+A ₂ (mk)) | 12,36 |
| 9 (K ₁ (ž)+OTA) | 27,12 |
| 10 (K ₁ (m)+OTA) | 11,22 |
| 11 (K ₁ (žk)+OTA) | 6,48 |
| 12 (K ₁ (mk)+OTA) | 2,92 |
| 13 (A ₂ (ž)+OTA) | 8,60 |
| 14 (A ₂ (m)+OTA) | 13,76 |
| 15 (A ₂ (žk)+OTA) | 9,44 |
| 16 (A ₂ (mk)+OTA) | 10,28 |
| 17 (M+OTA) | 34,56 |
| 18 (M) | < 0,18 |

M – matriks; K₁/A₂ (ž) – K₁/A₂ žive bakterijske stanice; K₁/A₂ (žk) - K₁/A₂ kapsule sa živim stanicama; K₁/A₂ (m) - K₁/A₂ mrtve bakterijske stanice; K₁/A₂ (mk) - K₁/A₂ kapsule sa mrtvim stanicama

Iz rezultata prikazanih u tablici 10 vidljivo je da je raspon koncentracije OTA u uzorcima s dodanim živim stanicama BMK (n = 8) bez obzira na formulaciju, soj bakterija i dodatak matriksa u simuliranom modelu GI trakta između 6,48 μg/kg - 27,12 μg/kg, a u uzorcima s inaktiviranom biomasom (mrtve stanice) (n = 8) između 2,92 - 27,58 μg/kg.



Slika 10. Usporedni prikaz % - tka vezanog OTA živim stanicama BMK *L. plantarum* K₁ i *L. plantarum* A₂ u obliku biomase i mikrokapsula u uzorcima sa i bez dodanog matriksa



Slika 11. Usporedni prikaz % - tka vezanog OTA mrtvim stanicama BMK *L. plantarum* K₁ i *L. plantarum* A₂ u obliku biomase i mikrokapsula u uzorcima sa i bez dodanog matriksa

Iz rezultata prikazanih u tablici 10 i na slikama 10 i 11 vidljivo je da je bakterijski soj *L. plantarum* K₁, bez obzira na formulaciju dodanih stanica i prisutnost matriksa pokazao bolju sposobnost vezanja OTA, odnosno uočeno je značajnije smanjenje koncentracije OTA na 7,56 do 17,98 µg/kg u usporedbi sa sojem *L. plantarum* A₂ koji je vezanjem OTA smanjio

koncentraciju u rasponu od 12,36 - 27,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u usporedbi s početnom koncentracijom OTA od 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U uzorcima u kojima je dodan matriks soj K_1 veže OTA u rasponu od 55 – 81 %, a kod uzoraka u koje nije dodan matriks (kobasica), a uzorci su sadržavali biomasu i kapsulirane stanice (žive i mrtve), *L. plantarum* K_1 pokazuje još bolju sposobnost vezanja OTA koja je iznosila od 32 % do visokih 93 %. Za razliku od soja K_1 koji veže samo 32 % OTA u uzorcima bez matriksa kada je dodan u formi živih stanica, soj *L. plantarum* A_2 veže OTA od 78 %, dok je u uzorcima s dodanom kobasicom soj K_1 vezao 55 % OTA, a soj A_2 samo oko 30 %.

Razlika u dobivenim rezultatima može se objasniti podrijetlom pojedinog soja. Tako je *L. plantarum* K_1 izoliran iz mesnih proizvoda, a *L. plantarum* A_2 iz fecesa bebe, pa je bilo i za očekivati da će se određeni soj brže prilagoditi uvjetima sredine iz koje je izoliran i izraziti svoja svojstva.

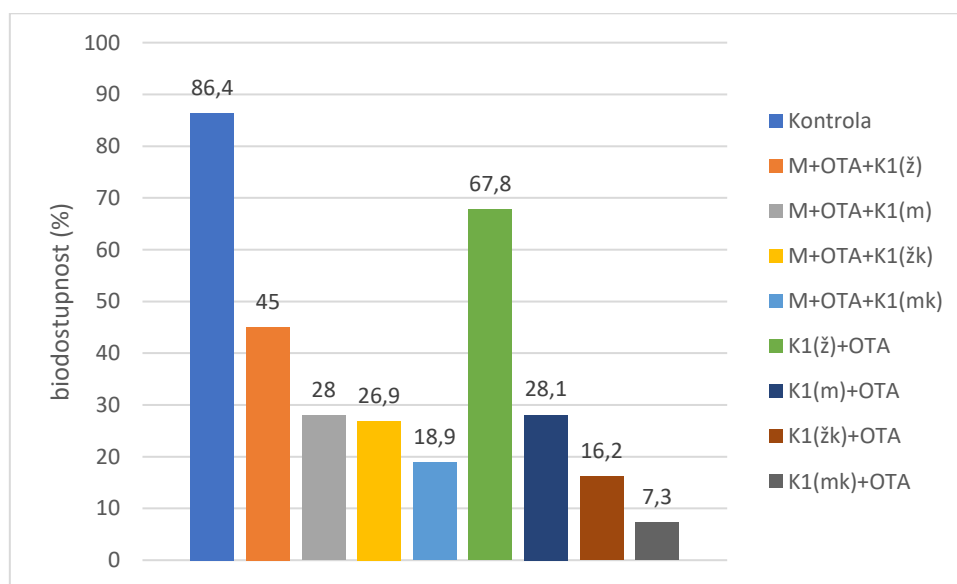
Najmanju sposobnost vezanja OTA pokazale su žive stanice u svim uvjetima provedbe pokusa, osim za soj *L. plantarum* A_2 u uvjetima simuliranih uvjeta GI trakta bez dodanog matriksa (tablica 10, slike 10 i 11). To može voditi zaključku da je taj soj, izoliran iz fecesa bebe, dio crijevne mikroflore organizma i ima određenu ulogu u obrani organizma od štetnih tvari. Mrtve stanice BMK i u obliku inaktivne biomase i forme mikrokapsula pokazuju značajno smanjenje koncentracije OTA nakon prolaska uzoraka kroz simulirane uvjete GI trakta (tablica 10 i slika 11). Dobiveni rezultati potvrđuju činjenicu da toplinski tretman kod mrtvih bakterijskih stanica uzrokuje hidrofobnost stanične stijenke te promjenu njezine strukture što dovodi do boljeg vezanja OTA za staničnu stijenku bakterija čime se posljedično, u većoj mjeri smanjuje njegova biodostupnost u hrani (Haskard i sur., 2001; Haskard i sur., 2000). Jedno od brojnih istraživanja kojim se potvrđuje efikasnost vrste *L. plantarum* u smanjenju koncentracije OTA u hrani je ono Escrive i sur. (2023) kojim je dokazano da navedena vrsta uzrokuje redukciju OTA u kruhu do 34 % u odnosu na početnu koncentraciju. Hashemi i sur. (2018) dokazali su da prisutnost vrste *L. plantarum* tijekom proizvodnje fermentiranog vrhnja uzrokuje smanjenje koncentracije OTA u vrhnju za više od 50% u odnosu na početnu koncentraciju, dok je u istraživanju Belkacem-Hanfija i sur. (2014) *L. plantarum* uzrokovala redukciju OTA za više od 97 % u određenim uvjetima temperature (27 - 38 °C) i pH (4,8 - 6).

U procjeni rizika od oralne biorasploživosti mikotoksina, prvi korak je određivanje njegove biodostupnosti, tj. postotka mikotoksina koji se oslobađa iz matrice hrane tijekom probave u gastrointestinalnom (GI) traktu, a koji se može apsorbirati kroz crijevni epitel. *In vitro* metode nude alternativu istraživanjima na ljudima i životinjama, a mogu biti brze, jednostavne i relativno jeftine. Mogu se provoditi u dobro kontroliranim uvjetima i mogu pružiti

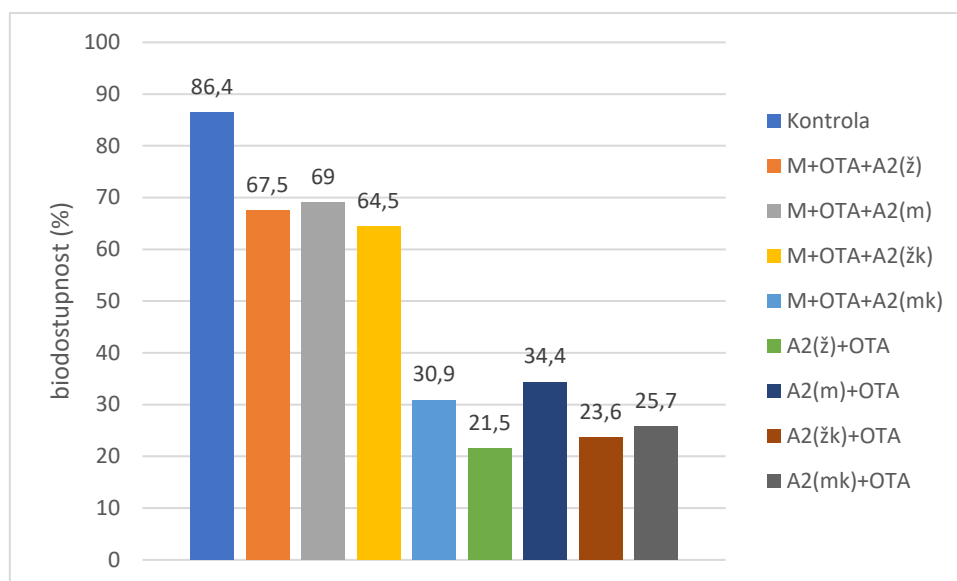
uvide koji se ne mogu postići u istraživanjima na životinjama. Međutim, ti *in vitro* modeli imaju i nedostatke, jer u mnogim slučajevima ne uzimaju u obzir važne fiziološke čimbenike kao što je nedostatak crijevne sluznice, imunološki sustav te u većini slučajeva ne uzimaju u obzir postojanje crijevne mikrobiote koja posjeduje enzimske sposobnosti koje mogu presudno utjecati na otpuštanje mikotoksina iz matrice hrane ili na biokonverziju ovih toksina u GI traktu. Pa ipak, uporaba ovih *in vitro* modela probave u kombinaciji s drugim tehnikama koje koriste intestinalne stanične linije, kao što su Caco - 2 stanice, može ponuditi cjelovitiju sliku onoga što se događa u crijevnom traktu tijekom probave. Stoga je u ovom radu ispitan učinak dva soja BMK *L. plantarum* K₁ i *L. plantarum* A₂ na dostupnost OTA iz uzoraka sa i bez dodanog prehrambenog matriksa za potencijalnu apsorpciju u gastrointestinalnom traktu, a rezultati istraživanja su prikazani na slikama 12 i 13. Postotak biodostupnosti OTA iz kobasica u prisutnosti različitih oblika BMK izračunat prema jednadžbi (3),

$$\% \text{ biodostupnosti} = \frac{c}{40 \mu\text{g/kg}} \times 100 \quad (3)$$

gdje je c = koncentracija OTA izmjerene UHPLC - MS/MS metodom izražena u $\mu\text{g/kg}$, a 40 $\mu\text{g/kg}$ konačna koncentracija OTA u umjetno kontaminiranoj kobasici.



Slika 12. Prikaz % - tka biodostupnosti OTA u uzorcima sa i bez matriksa u prisutnosti *L. plantarum* K₁



Slika 13. Prikaz % - tka biodostupnosti OTA u uzorcima sa i bez matriksa u prisutnosti *L. plantarum* A₂

Nakon provedbe *in vitro* modela probave u kontrolnom uzorku u kojem je bio dodani samo umjetno kontaminirani matriks (kobasica) s 40 µg/kg OTA, izmjerena dostupnost OTA, odnosno količina otpuštenog toksina iz matriksa, iznosila je 86,4 %. U svim ostalim uzorcima biodostupnost OTA se kretala u rasponu od 18,9 – 69 % za uzorke s matriksom, odnosno od 7,3 – 67,8 % u uzorcima bez matriksa. Slična istraživanja proveli su Kabak i sur. (2009), u kojem je praćen utjecaj određenih vrsta BMK (*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) na biodostupnost OTA i AFB₁ u simuliranim uvjetima GI trakta iz različitih vrsta hrane (pistacio, heljda, hrana za dojenčad). Rezultati su pokazali da se biodostupnost za AFB₁ do visokih 90 %, dok za OTA u prosjeku oko 30 %. Visok postotak biodostupnosti OTA dobiven u ovom radu u odnosu na istraživanje Kabaka i sur. (2009) može se objasniti visokom koncentracijom OTA kojom je kobasica kontaminirana, a kao bitan faktor ističe se i različita vrsta upotrijebljenih matriksa, što također značajno utječe na biodostupnost OTA. Međutim, bitno je naglasiti da neće sav OTA nakon prolaska kroz GI trakt biti u potpunosti apsorbiran dalje u organizam zbog njegovog stupanja u interakcije sa crijevnom mikroflorom koja ga metabolizira i na taj način smanjuje količinu OTA koji se apsorbira u ostala tkiva i organe.

Usporede li se rezultati dobiveni primjenom stanica soja *L. plantarum* K₁ u obliku biomase s rezultatima dobivenim u obliku mikroinkapsulata, vidljivo je da je primjena mikroinkapsulata djelotvornija u smanjenju koncentracije OTA koja se otpušta iz matriksa i na taj način smanjuje biodostupnosti OTA u GI traktu. Najmanja biodostupnost OTA uočena je

kod primjene mikroinkapsulata s mrtvim bakterijskim stanicama te je iznosila 18,9 % (slika 12). Dobiveni rezultati mogu se objasniti boljim preživljavanjem BMK u kiselim uvjetima želuca kada se nalaze u formi kapsula, što im u konačnici omogućava pravilno otpuštanje u crijevima. Djelotvornost mikroinkapsulata također ovisi i o vrsti polimera koja se koristi za oblaganje stanica BMK. Jedno od istraživanja koje potvrđuje učinkovitost alginatnih kapsula (koje su korištene i u ovom radu) je ono Kebarya i sur. (1998) kojim je dokazano da je preživljavanje bifidobakterija u kapsulama dobivenim pomoću alginata bilo veće u odnosu na kapsule dobivene oblaganjem kapakaragenanom.

Bakterijski soj *L. plantarum* A₂ također se pokazao prikladnim za smanjenje biodostupnosti OTA iz domaće, sušene kobasice, što je vidljivo iz rezultata prikazanih u tablici 10 i na slici 13. Kod primjene biomase živih odnosno mrtvih bakterijskih stanica, postignuto je smanjenje koncentracije OTA na 27,00 µg/kg odnosno na 27,58 µg/kg u odnosu na kontrolni uzorak. Iz navedenih rezultata vidljivo je da vitalnost bakterijskih stanica ovog soja, odnosno primjena mrtvih bakterijskih stanica nije uzrokovala značajnije smanjenje koncentracije OTA, kao što je slučaj kod soja *L. plantarum* K₁. Međutim, uočeno je kako primjenom mikroinkapsuliranih mrtvih stanica soja *L. plantarum* A₂, dolazi do značajnog pada koncentracije OTA (12,36 µg/kg) u usporedbi s primjenom mikroinkapsuliranih živih stanica istog soja (25,80 µg/kg), odnosno došlo je do značajnog smanjenja biodostupnosti OTA na 30,9 % (slika 13).

Efikasnost bakterijskih kultura *L. plantarum* K₁ i *L. plantarum* A₂ u smanjenju biodostupnosti OTA potvrđuju i rezultati dobiveni iz uzoraka koji su sadržavali biomasu, odnosno mikroinkapsulate navedenih kultura te OTA u sintetskom mediju (MRS), bez dodanog prehranbenog matriksa (slika 12 i 13). Biodostupnost za OTA za soj *L. plantarum* K₁ za sve kombinacije bakterijskih stanica bio je u rasponu od 7,3 do 67,8 %, a za soj *L. plantarum* A₂ od 21,5 do 34,4 %. Kod navedenih uzoraka veći pad koncentracije OTA u odnosu na kontrolni uzorak uočen je tijekom primjene soja *L. plantarum* A₂, kod kojeg je zabilježena manja biodostupnost OTA primjenom biomase i mikroinkapsulata sa živim bakterijskim stanicama (slika 13). Iako mrtve bakterijske stanice zbog hidrofobnosti stanične stijenke obično imaju veću sposobnost vezanja toksina, žive bakterijske stanice zbog posjedovanja hidrofobnih džepova također mogu vezati toksine, ponekad čak i u većoj mjeri što posebice zavisi o vrsti medija. U istraživanju Piotrowske (2004) također je praćen utjecaj bakterijskih biomasa koje su činile žive i mrtve stanice vrsta *L. plantarum*, *L. brevis* i *L. sanfranciscensis* u MRS bujonu i PBS puferu. Rezultati su pokazali da je u oba medija veći stupanj dekontaminacije postignut

djelovanjem bakterijske biomase koju su činile mrtve stanice. Veća djelotvornost mrtvih bakterijskih stanica u odnosu na žive bakterijske stanice koje su se u ovom radu pokazale efikasnije u smanjenju biodostupnosti, može se objasniti primjenom različitih sojeva BMK, različitih koncentracija OTA te uporabom različitih vrsta medija.

Smanjenje biodostupnosti OTA te njegov utjecaj na crijevnu mikrofloru praćen je i u istraživanju Sobrala i sur. (2022). U navedenom istraživanju praćena je interakcija između OTA i AFB₁ tijekom njihovog prolaska kroz GI trakt, a rezultati su pokazali da istovremena prisutnost ovih dvaju toksina u hrani dovodi do smanjenja biodostupnosti OTA, dok se biodostupnost AFB₁ u GI traktu povećava. Što se tiče njihovog utjecaja na crijevnu mikrofloru, prisutnost oba toksina ubrzala je proces odumiranja stanica otpuštanjem laktat dehidrogenaze iz citosola. Također, istraživanjem je utvrđeno da oba toksina imaju kratko vrijeme zadržavanja u želucu (30 min) čime vrlo brzo postaju dostupni za apsorpciju u crijevima gdje se ispoljavaju njihovi toksični učinci.

Kao vrlo bitan faktor o kojem u konačnici ovisi u kojoj će mjeri BMK utjecati na biodostupnost OTA u hrani pokazala se vrsta medija. Iako je u uzorcima koji nisu sadržavali matriks (kobasicu), bakterijski soj *L. plantarum* A₂ pokazao veći utjecaj na smanjenje biodostupnosti OTA, u uzorcima koji su sadržavali matriks soj *L. plantarum* K₁ pokazao je znatno veću efikasnost te potencijalno može predstavljati pogodno rješenje za detoksifikaciju mesnih proizvoda, no potrebna su daljnja i detaljnija istraživanja.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Dokazan je utjecaj odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline na smanjenje dostupnosti okratoksina A u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta
2. Sojevi *Lactiplantibacillus plantarum* K₁ i *Lactiplantibacillus plantarum* A₂ pokazali su sposobnost smanjenja koncentracije okratoksina A u svim uzorcima u *in vitro* modelu probave.
3. Soj *Lactiplantibacillus plantarum* K₁ pokazao se učinkovitijim u smanjenju koncentracije OTA u svim analiziranim uzorcima, u odnosu na soj *Lactiplantibacillus plantarum* A₂ bez obzira na oblik primijenjenih stanica.
4. Stanice BMK u obliku mikroinkapsulata pokazale su bolju sposobnost vezanja OTA i time utjecaj na smanjenje biodostupnosti OTA u simuliranim uvjetima GI trakta, u odnosu na primjenu biomase bakterijskih stanica.
5. *In vitro* modeli probave pokazali su se djelotvornim alatom za proučavanje sposobnosti bakterija mliječne kiseline da mogu vezati mikotoksine u gastrointestinalnom traktu i tako utjecati na njihovu biodostupnost za apsorpciju

6. LITERATURA

Afshar P, Shokrzadeh M, Raeisi SN, Ghorbani-HasanSaraei A, Nasiraii LR (2020) Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon* **178**, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.007>

Al-Taher F, Banaszewski K, Jackson L, Zweigenbaum J, Ryu D, Cappozzo J (2013) Rapid method for the detection of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *J Agric Food Chem* **61**, 2378–2384. <https://doi.org/10.1021/jf304729f>

Ananou S, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E (2007). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. *FORMATEX* **1**, 475-487.

Ananou S, Maqueta M, Martínez-Bueno M, Valdivia E (2007) Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. *Appl Microbiol* **1**, 475–486. 10.12691/jfnr-6-5-2

Arihara K, Ota H, Itoh M, Kondo Y, Sameshima T, Yamanaka H i sur. (1998) *Lactobacillus acidophilus* Group Lactic Acid Bacteria Applied to Meat Fermentation. *J Food Sci* **63**, 544-547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15782.x>

Avantaggiato G, Havenaar R, Visconti A (2007) Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate based product in an in vitro gastrointestinal model. *J Agric Food Chem* **55**, 4810-4819. <https://doi.org/10.1021/jf0702803>

Belkacem-Hanfi N, Fhoula I, Semmar N, Guesmi A, Perraud-Gaime I, Ouzari HI i sur. (2014) Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control* **76**, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.001>

Ben Taheur F, Fedhila K, Chaieb K, Kouidhi B, Bakhrouf A, Abrunhosa L (2017) Adsorption of aflatoxin B₁, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *Int. J Food Microbiol* **251**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.021>

Bennet JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* **16**, 497-516. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>

Bovo F, Corassin CH, Rosim RE, de Oliveira CAF (2013) Efficiency of lactic acid bacteria strains for decontamination of aflatoxin M₁ in phosphate buffer saline solution and in skimmed milk. *Food Bioprocess Technol* **6**, 2230–2234. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0770-9>

- Brandon EFA, Oomen AG, Rempelberg CJM, Versantvoort CHM, van Engelen JGM, Sips AJAM (2006) Consumer product *in vitro* digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* **44**, 161-171.
- Breitholtz-Emanuelsson A, Palminger-Hallen I, Wohlin PO, Oskarsson A, Hult K, Olsen M (1993) Transfer of ochratoxin A from lactating rats to their offspring: a short term study, *Nat Toxins* **1**, 347–352. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010605>
- Buckley A, Turner JR (2018) Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, 10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029314>
- Butorac K, Banić M, Novak J, Leboš Pavunc A, Uroić K, Durgo K i sur. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microb Cell Fact* **19**, 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01365-6>
- Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S (2014) Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* **13**. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-s1-s9>
- Chen KN, Chen MJ, Liu RJ, Lin CW, Chiu HY (2005) Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. *J Food Sci* **70**, 260-266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09981.x>
- Dalie DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* **21**, 370-380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
- Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F (2010) Lactic acid bacteria—potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food Control* **21**, 370–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
- Di Paolo N, Guarnieri A, Loi F, Sacchi G, Mangiarotti A, di Paolo M (1993) Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron* **64**, 621–625. <https://doi.org/10.1159/000187411>
- Di Stefano V, Pitonzo R, Cicero N, D'Oca MC (2014) Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Addit Contam Part A* **31**, 2034-9. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.968882>

Doster RC, Sinnhuber RO (1972) Comparative rate of hydrolysis of ochratoxin A and B in vitro. *Food Cosmet Toxicol* **10**, 389–394. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(72\)80257-8](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(72)80257-8)

e Souza de Azevedo P O, Mendonça CMN, Moreno ACR, Bueno, AVI, de Almeida SRY, Seibert L i sur. (2020) Antibacterial and antifungal activity of crude and freeze-dried bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Pediococcus pentosaceus*. *Sci Rep* **10**, 12291. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68922-2>

El Khoury A, Atoui A (2010) Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins (Basel)* **2**, 461–493. <https://doi.org/10.3390%2Ftoxins2040461>

Escriva L, Calpe J, Lafuente C, Moreno A, Musto L, Meca G i sur. (2023) Aflatoxin B₁ and ochratoxin A reduction by *Lactobacillus spp.* during bread making. *J Sci Food Agric* <https://doi.org/10.1002/jsfa.12796>

Fang LX, Xiong AZ, Wang R, Ji S, Yang L, Wang ZT (2013) A strategy for screening and identifying mycotoxins in herbal medicine using ultra-performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Sep Sci* **36**, 3115–3122. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300488>

Ferruffino-Guardia EV, Tangni EK, Larondelle Y, Ponchaut S (2000) Transfer of ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via milk of rabbit does fed a naturally contaminated feed, *Food Addit Contam* **17**, 167–175. <https://doi.org/10.1080/026520300283522>

Frenich AG, Romero-González R, del Mar Aguilera-Luiz M (2014) Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS. *TrAC* **63**, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.020>

Galtier P, Baradat C, Alvinerie M (1977) Etude d'élimination d'ochratoxin A par le lait chez la lapine. *Ann Nutr Alim* **31**, 911–918.

Galtier P, Alvinerie M, Charpentreau JL (1981) The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbit and chicken. *Food Cosmet Toxicol* **19**, 735–738. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90528-9](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90528-9)

González-Arias CA, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ (2013) Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: A review. *World Mycotoxin J* **6**, 167–184. <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2012.1521>

- Griffiths MW, Tellez AM (2013) Lactobacillus helveticus: The Proteolytic System. *Front Microbiol* **4**, 1-9, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00030>
- Guerre P (2020) Mycotoxin and Gut Microbiota Interactions. *Toxins* **12**, 769. <https://doi.org/10.3390/toxins12120769>
- Guerre P (2020) Mycotoxin and Gut Microbiota Interactions. *Toxins* **12**, 769. <https://doi.org/10.3390/toxins12120769>
- Hagelberg S, Hult K, Fuchs R (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol* **9**, 91-96. <https://doi.org/10.1002/jat.2550090204>
- Hammes WP (1991) Fermentation of non-dairy food. *Food Biotechnol* **5**, 293-303. <https://doi.org/10.1080/08905439109549811>
- Harwing J, Kuiper-Goodman T, Scott PM (1983) Microbial food toxicant: ochratoxins. U: Rechcigl M (ured.) Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin, CRC Press, Boca Raton, str. 192–238.
- Hashemi SMB i Gholamhosseinpour A (2018) Fermentation of table cream by Lactobacillus plantarum strains: effect on fungal growth, aflatoxin M1 and ochratoxin A. *Int J Food Sci Technol*. **54** <https://doi.org/10.1111/ijfs.13943>
- Haskard C, Binnion C, Ahokas J (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact* **128**, 39–49. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00186-1)
- Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpaa PE, Salminen S, Ahokas, JT (2001) Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3086–3091. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3086-3091.2001>
- Hendrickse RG (1985) Kwashiorkor: 50 years of myth and mystery. Do aflatoxins provide a clue? *Acta Leiden* **53**, 11–30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3939172/>
- Höhler D, Südekum KH, Wolffram S i sur. (1999) Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep. *J Anim Sci* **77**, 1217–1223. <https://doi.org/10.2527/1999.7751217x>
- Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD (1992) Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poult Sci* **71**, 64–69. <https://doi.org/10.3382/ps.0710064>

JECFA (2001) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>. Pristupljeno 28. svibnja 2023.

Jyothi Sri S, Seethadevi A, Suria Prahba K, Muthuprasanna P, Pavitra P (2012) Microencapsulation: A review. *IJPBS* **3**, 509-531.

Kabak B, Brandon EFA, Var I, Blokland M, Sips AJAM (2009) Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B₁ and ochratoxin A using in vitro digestion model under fed conditions. *J Environ Sci Health* **4**, 472-480. <https://doi.org/10.1080/03601230902935154>

Kailasapathy K (2002) Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr Issues Intest Microbiol* **3**, 39-48.

Koirala S, Anal AK (2021) Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Future Foods* **3**, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100013>

Kongo JM (2013) Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. U: Kongo JM (ured.) Lactic Acid Bacteria, InTech, Rijeka, str. 3-23.

Kuharić Ž, Jakopović Ž, Čanak I, Frece J, Bošnjir J, Pavlek Ž i sur. (2018) Removing aflatoxin M₁ from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Arh Hig Rada Toksikol* **69**, 334-339. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3160>

Larsen TO, Svendsen A, Smedsgaard J (2001) Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3630–3635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3630-3635.2001>

Lea T, Steien K, Stormer C (1989) Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia* **107**, 153–159. <https://doi.org/10.1007/bf00707553>

LeBlanc JG, Laino JE, Juárez VM, Vannini V, Van Sinderen D, Taranto MP i sur. (2011) B-Group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol* **111**, 1297– 1309 86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>

Lee SY, Kang DH (2009) Combined effects of heat, acetic acid, and salt for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media. *Food Control* **20**, 1006–1012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.002>

- Leong S, Hocking, AD, Pitt JI (2004) Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section Nigri) on some drying varieties of irrigated grapes. *Aust. J Grape Wine Res* **10**, 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00010.x>
- Li L, Yang B, Humza M, Geng H, Wang G, Zhang C i sur. (2021) A novel strain *Lactobacillus brevis* 8-2B inhibiting *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin a production. *LWT Food Sci Technol* **136**, 110308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110308>
- Li S, Marquardt RR, Frohlich AA, Vitti TG, Crow G (1997) Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolite sin Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **145**, 82-90. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8155>
- Mantle PG (2008) Interpretation of the pharmacokinetics of ochratoxin A in blood plasma of rats, during and after acute or chronic ingestion. *Food Chem Toxicol* **46**, 1808-1816. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.020>
- Markov K, Pleadin J, Jakopović Ž, Zadavec M, Frece J (2022) Plijesni-odabrane značajke, izolacija i identifikacija, Sveučilišni udžbenik, Zagreb
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.002>
- Markov K (2005) Utjecaj odabranih parametara na rast plijesni i mješovitim kulturama i biosintezi patulina i zearalenona (disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Manizan AL, Oplatowska-Stachowiak MO, Piro-Metayer I, Campbell K, Koffi-Nevry R, Elliott C i sur. (2018) Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Cote d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control* **87**, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.032>
- Marquez JG, Rojas CEG (2007) Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo “telita” elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Soc Venez Microbiol* **27**,108–111.
- McMaster DR, Vedani A (1999) Ochratoxin, A binding to phenylalanine-tRNA synthetase: computational approach to the mechanism of ochratoxicoses and its antagonism, *J Med Chem* **42**, 3075–3086. <https://doi.org/10.1021/jm991040k>

Minekus M (1998) Development and validation of a dynamic model of the gastrointestinal tract (doktorski rad), University of Utrecht, Elinkwijk, Utrecht

Minekus M (2005) Models of the gastrointestinal tract to study microbial interaction. U: Holzapfel WH i Naughton PJ (ured.) Microbial ecology in growing animals. Elsevier, Amsterdam, str. 142-154.

Mol HGJ, Plaza-Bolaños P, Zomer P, de Rijk TC, Stolker AAM, Mulder PPJ (2008) Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal Chem* **80**, 9450–9459. <https://doi.org/10.1021/ac801557f>

Moulay M, Benlancén K, Aggad H, Kihal M (2013) Diversity and Technological Properties of predominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian raw goat milk. *Adv Environ Biol* **7**, 999-1007.

Muaz K, Riaz M, Oliveira CAF, Akhtar S, Ali SW, Nadeem H i sur. (2021) Aflatoxin M₁ in milk and dairy products: global occurrence and potential decontamination strategies. *Toxin Rev* **41**, 1–18. <http://dx.doi.org/10.1080/15569543.2021.1873387>

Nao SC, Wang W, Wu K (2020) Recent Progress and Development of G-Quadruplex-Based Luminescent Assays for Ochratoxina A Detection. *Front Chem* **8**, 767. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2020.00767>

Narwate BM, Ghule PJ, Ghule AV, Darandale AS, Wagh JG (2014) Ultra performance liquid chromatography: A new resolution in chromatography. *Int J Pharm Drug Anal* **2**, 25–34. 10.1186/s43094-019-0007-8

Nazzaro F, Orlando P, Fratianni F, Coppola R (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *COBIOT* **23**, 182-186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>

Oliveira RBP, Oliveira AL, Glo'ria MBA (2008) Screening of lactic acid bacteria from vacuum packaged beef for antimicrobial activity. *Braz J Microbiol* **39**, 368–374. <https://doi.org/10.1590%2FS1517-838220080002000031>

Petzinger E, Weidenbach A (2002) Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livest Prod Sci* **76**, 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00124-0)

- Pfohl-Leszkowicz A, Castegnaro M (2005) Further arguments in favour of direct covalent binding of Ochratoxin A (OTA) after metabolic biotransformation, *Food Addit Contam* **22**, 75-87. <https://doi.org/10.1080/02652030500309400>
- Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA (2007) Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr* **51**, 61-99. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>
- Pitout MJ (1969) The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem Pharmacol* **18**, 485–491. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(69\)90224-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(69)90224-x)
- Pleadin J, Frece J, Markov K (2019) Mycotoxins in food and feed. *Adv Food Nutr Res* **89**, 297-345. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>
- Pleadin J, Vasilj V, Petrović D (2018) Mikotoksini pojavnost, prevencija i redukcija, Sveučilište u Mostaru, Mostar
- Radić B, Fuchs R, Peraica M, Lucić A (1997) Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol Lett* **91**, 105–109. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(97\)03877-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(97)03877-0)
- Rajeev B, Alias AK, Ravishnakar RV (2010) Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **9**, 57-81. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
- Ramjee G, Berjak P, Adhikari M, Dutton MF (1992) Aflatoxins and kwashiorkor in Durban, South Africa. *Ann Trop Paediatr* **12**, 241–247. <https://doi.org/10.1080/02724936.1992.11747579>
- Rathod RH, Chaudhari SR, Patil AS, Shirkhedkar AA (2019) Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future J Pharm Sci* **5**. <http://dx.doi.org/10.1186/s43094-019-0007-8>
- Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H i sur. (2007) Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1143**, 48–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.064>

Ren Z, Guo C, Yu S, Zhu L, Wang Y, Hu H, Deng J (2019) Progress in Mycotoxins Affecting Intestinal Mucosal Barrier Function. *Int J Mol Sci* **20**, 2777. <https://doi.org/10.3390%2Fijms20112777>

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

Ruiz ME, Montoto SS (2018) Routes of Drug Administration: Dosage, Design, and Pharmacotherapy Success. U: Talevi A i Quiroga AM (ured.) *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences*, Springer Cham, str. 97-133.

Schillinger U, Geisen R, Holzapfel WH (1996) Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trend Food Sci Technol* **7**,158–164. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)81256-8](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)81256-8)

Shah NP, Ravula RR (2000) Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *The Aust J Dairy Technology* **55**, 139- 144.

Sheu TY, Marshall RT, Heymann H (1993) Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *J Dairy Sci* **76**, 1902-1907. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(93\)77523-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(93)77523-2)

Sobral MMC, Goncalves T, Martins ZE, Baurel C, Cortes-Macias E, Collado MC, Ferreira IMPLVO (2022) Mycotoxin Interactions along the Gastrointestinal Tract: In Vitro Semi-Dynamic Digestion and Static Colon Fermentation of a Contaminated Meal. *Toxins (Basel)* **14**, 28. <https://doi.org/10.3390/toxins14010028>

Uredba (2006) Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani, Službeni list Europske unije, L 364/5. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881> Pristupljeno 28. svibnja 2023.

Uredba (2006) Uredba Komisije (EZ) br. 401/2006 o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani, Službeni list Europske unije, L 70/12. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R0401&qid=1693131765176> Pristupljeno 28. svibnja 2023.

Uredba (2006) Uredba Komisije (EZ) br. 386/2009 o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1831/2003 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu uvođenja nove funkcionalne skupine dodataka hrani za životinje, Službeni list Europske unije, L 118/66. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0386> Pristupljeno 28. svibnja 2023.

Versantvoort CHM, Van de Kamp E, Rompelberg CJM (2004) Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. RIVM report 320102002/2004.

Yamina M, Wassila C, Kenza Z, Amina Z, Noureddien S, Eddine HJ, Mebrouk K (2013) Physico chemical and Microbiological Analysis of Algerian raw camel's milk and identification of predominating thermophilic Lactic Acid Bacteria. *J Food Sci Eng* **3**, 55-63.

Zain ME (2011) Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc* **15**, 129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LAURA GRADEČKI izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis