

Uklanjanje aflatoksina B1 pomoću otpada riblje industrije

Špoljarić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:131668>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij

Biotehnologija

Lucija Špoljarić
7360/BT

**UKLANJANJE AFLATOKSINA B1 POMOĆU OTPADA
RIBLJE INDUSTRIJE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

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

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

Uklanjanje aflatoksina B₁ pomoću otpada riblje industrije

Lucija Špoljarić, 0058210156

Sažetak: Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma koje plijesni sintetiziraju tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog porijekla. Uz značajne štete koje uzrokuju gospodarstvu, mikotoksini su uzročnici bolesti mikotoksikoza. Iako bi najbolje rješenje kod kontrole mikotoksina u lancu proizvodnje hrane bila sama prevencija onečišćenja, u praksi je to nemoguće. Zbog toga se provode razne metode dekontaminacije. Metode koje se koriste za uklanjanje mikotoksina dijelimo na fizikalne, kemijske i biološke. Fizikalne metode uključuju korištenje visokih temperatura, UV, x i γ-zraka te mikrovalova, dok u kemijske ubrajamo tretiranje s različitim kemijskim sredstvima. Upotreba bioadsorbensa pokazala se kao učinkovit, isplativ i iznimno ekološki prihvatljiv način uklanjanja mikotoksina iz raznih produkata prehrambene industrije. U ovom radu ispitala se sposobnost vezanja aflatoksina B₁ na bioadsorbense koji su ujedno i nusproizvodi pri preradi ribe. Rezultati istraživanja su pokazali dobro vezanje AFB₁ pomoću ribljih ljuski i kosti kao i potencijal ovakve vrste adsorbensa u dekontaminaciji mikotoksina.

Ključne riječi: aflatoksin B₁, bioadsorbens, mikotoksini, riblji otpad,

Rad sadrži: 25 stranica, 4 slike, 3 tablice, 31 literaturni navod, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: dr.sc. Iva Čanak

Datum obrane: 15. srpnja 2021

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of biochemical engineering
Laboratory for Microbiology**

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

Decontamination of Aflatoxin B₁ with the help of fish waste

Lucija Špoljarić, 0058210156

Abstract: Mycotoxins are secondary products of metabolism that molds synthesize during growth on substrates of plant and animal origin. In addition to the significant damage they cause to the economy, mycotoxins can cause a variety of adverse health effects and pose a serious health threat to both humans and livestock. Although the best solution in controlling mycotoxins in the food production chain would be pollution prevention alone, in practice this is impossible. Therefore, various decontamination methods are performed. The methods used to remove mycotoxins are divided into physical, chemical and biological. Physical methods include the use of high temperatures, UV, x and γ-rays and microwaves, while chemical include treatment with various chemical agents. The use of bioadsorbents has proven to be an effective, cost-effective and extremely environmentally friendly way of removing mycotoxins from various products of the food industry. This work examined binding efficiency of aflatoxin B₁ to bioadsorbents, which are also by-products of fish processing. The results of the study showed good binding of AFB₁ by fish shells and bones as well as the potential of this type of adsorbent in mycotoxin decontamination.

Keywords: aflatoxin B₁, bioadsorbents, fish waste, mycotoxins

Thesis contains: 25 pages, 4 figures, 3 tables, 31 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor:, Full professor, Ksenija Markov, PhD

Technical support and assistance: Iva Čanak, PhD

Defence date: July 15th 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Mikotoksini	2
2.1.1. Aflatoksini	5
2.1.1.1. Aflatoksin B ₁	7
2.2. Dekontaminacija mikotoksina	8
2.2.1. Fizikalne metode.....	8
2.2.2. Kemijske metode	9
2.2.3. Biološke metode	10
2.3. Zakoni i regulativa	12
2.4. Otpad riblje industrije	13
3. Eksperimentalni dio	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Uzorak	16
3.1.2. Standard AFB ₁	16
3.1.3. Kemikalije	16
3.1.4. Pribor i oprema.....	17
3.2. Metode	17
3.2.1. Priprema adsorbensa	17
3.2.2. Vežanje AFB ₁ na adsorbens	17
3.2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)	18
4. Rezultati i rasprava	19
5. Zaključci	21
6. Literatura	22

1. UVOD

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma koje plijesni sintetiziraju tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog porijekla. To su kemijski spojevi različite strukture, različitog biološkog učinka, u pravilu bez boje, okusa i mirisa (HAPIH 2020.). Stabilni su i otporni na povišenu temperaturu što znači da se termičkom obradom namirnica njihova koncentracija samo neznatno smanjuje pa je uklanjanje mikotoksina iznimno zahtjevan proces koji poskupljuje proizvodnju. Uz značajne štete koje uzrokuju gospodarstvu, mikotoksini su uzročnici bolesti mikotoksikoza, koje se najčešće prenose preko hrane, a rjeđe respiratornim putem. Mikotoksikoze u ljudi i životinja mogu biti akutne, kao posljedica jednokratnog uzimanja namirnica s visokom koncentracijom mikotoksina i/ili kronične, nastale konzumiranjem namirnica s umjerenim do niskim koncentracijama mikotoksina tijekom dužeg vremenskog perioda i povezuju se s malignim bolestima (HAPIH, 2020). Metode koje se koriste za uklanjanje mikotoksina dijele se na fizikalne, kemijske i biološke. Fizikalne metode uključuju korištenje visokih temperatura, UV, x i γ -zraka te mikrovalova, dok u kemijske ubrajamo tretiranje s različitim kemijskim sredstvima. Nedostatak ovih metoda je što često nisu ekonomski isplative i učinkovitost ne zadovoljava standarde koji su iznimno visoki kada je hrana u pitanju. Korištenje mineralnih adsorbensa pokazalo se kao iznimno efikasna metoda za uklanjanje mikotoksina, međutim loša strana je varirajuća kemijska struktura između različitih vrsta mineralnih adsorbensa koja utječe na afinitet i kapacitet vezanja određenog mikotoksina (Bočarov-Stančić i sur., 2018). U posljednje vrijeme počele su se sve više primjenjivati biološke metode koje uključuju korištenje bioadsorbensa i živih, mrtvih ili liofiliziranih stanica određenih mikroorganizama. Upotreba bioadsorbensa pokazala se kao učinkovit, isplativ i iznimno ekološki prihvatljiv način uklanjanja mikotoksina iz raznih produkata prehrambene industrije. Stoga je cilj ovog rada ispitati sposobnosti vezanja aflatoksina B₁ na bioadsorbense koji su ujedno i nusproizvodi pri preradi ribe. Upotrebom nusproizvoda se osim dekontaminacije, u isto vrijeme smanjuje količina otpada koja nastaje u industriji prerade ribe, odnosno prenamijenjuje otpad u koristan alat za uklanjanje mikotoksina

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mikotoksini

Plijesni proizvode mnoge spojeve različitih kemijskih struktura. Određene vrste plijesni su izrazito poželjne (u prehrambenoj industriji npr. u proizvodnji određenih vrsta sireva kao što su Brie, Camembert, Gorgonzola te u proizvodnji pršuta i kobasica) (Canel i sur., 2019; Mihovlić, 2014). Određeni metaboliti koje proizvode plijesni koriste se kao važni antibiotici u borbi protiv bakterijskih infekcija (penicilin, cefalosporin) (Shibamoto i Bjeldanes, 2009). S druge strane metaboliti poput mikotoksina su snažni akutni ili kronični toksični agensi ili karcinogeni. Razlikujemo dvije vrste kontaminacije mikotoksinima, ovisno o vrsti hrane koja je kontaminirana. Kod primarne kontaminacije mikotoksinima zahvaćena je hrana biljnog podrijetla tj. pojava mikotoksina je posljedica rasta plijesni na žitaricama, voću i povrću dok je kod sekundarne kontaminacije u pitanju hrana životinjskog podrijetla u koju spada meso, jaja, mlijeko. Kod hrane životinjskog podrijetla govorimo o „carry-over“ efektu tj. o reziduama mikotoksina u organizmu životinja koje su hranjene stočnom hranom kontaminiranom plijesnim producentima mikotoksina ili samim mikotoksinima (Kuharić, 2021; Prtenjača, 2017).

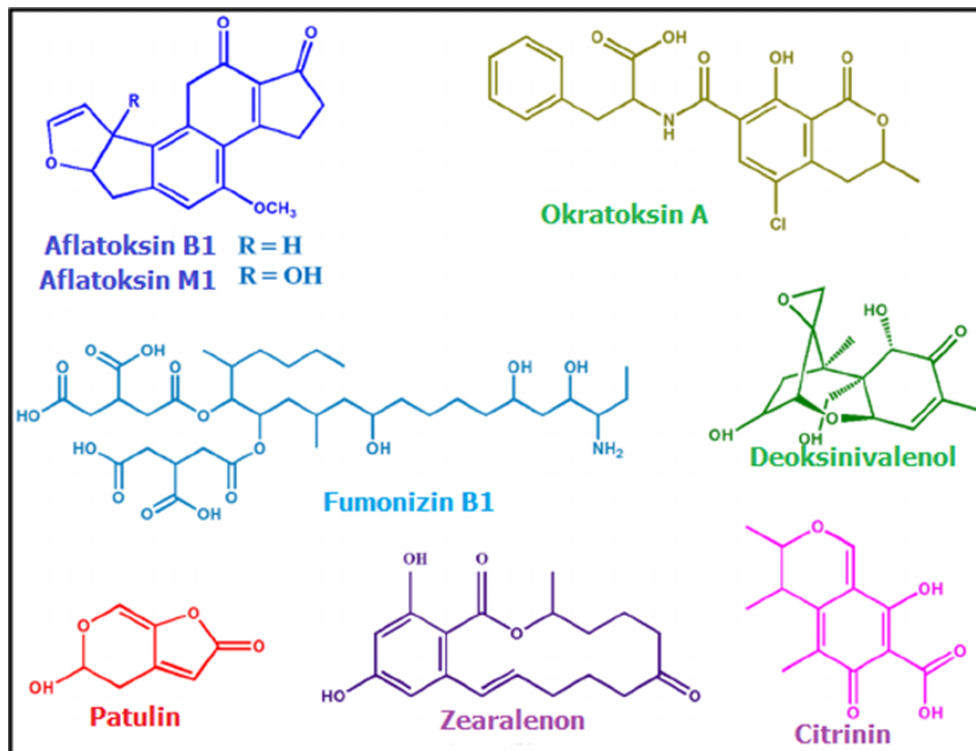
Većina mikotoksina je termostabilna što znači da se termičkom obradom namirnica njihova koncentracija samo neznatno smanjuje što uklanjanje čini iznimno zahtjevnim procesom koji poskupljuje proizvodnju. Zbog toga je najjednostavnije rješenje prevencija rasta plijesni na prehrambenim namirnicama biljnog podrijetla. Bolesti uzrokovane mikotoksinima djelimo na kronične i akutne (Peraica i sur., 2014). Akutne mikotoksikoze pojavljuju se kao epidemije u tropskim krajevima, a njihov je uzrok izloženost visokim koncentracijama aflatoksina u hrani. Epidemije se pojavljuju onda kada su ljudi i životinje prisiljeni, zbog ratova, gladi ili prirodnih katastrofa, hraniti se pljesnivom hranom (Peraica i sur., 2014). Kronične mikotoksikoze su rezultat dugotrajne izloženosti niskim koncentracijama mikotoksina. U tom slučaju, simptomi nisu tako brzo vidljivi kao kod akutnih bolesti. Dugotrajna izloženost niskim koncentracijama mikotoksina može uzrokovati kronične bolesti i maligne tumore. Osim toksičnog, mikotoksini mogu imati mutageno, genotoksično, imunotoksično i karcinogeno djelovanje (Peraica i Domijan, 2010). Žitarice su rijetko kontaminirane samo jednim mikotoksinom jer se na prirodnim supstratima obično nalazi više vrsta plijesni, koje mogu proizvoditi jedan ili više različitih mikotoksina. U posljednje vrijeme učestalo se istražuje toksični rizik izloženosti više mikotoksina pa je nađeno da oni mogu imati sinergističko, aditivno, ali i antagonističko

djelovanje (Peraica i Rašić, 2020). Do danas je otkriveno oko 400 vrsta mikotoksina a među najvažnije mikotoksine, prema toksičnosti i pojavnosti, spadaju aflatoksin B₁, B₂, G₁ i G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), okratoksin A (OTA), citrinin (CTN), zearalenon (ZEN), fumonizini B₁, B₂ i B₃ (FB₁, FB₂, FB₃), deoksinivalenol (DON) i drugi trihoteceni, patulin (PAT) i ergot alkaloidi (EA) (Palfi i sur., 2020). Neki od najznačajnijih mikotoksina prikazani su u tablici 1, a njihove kemijske strukture na slici 1.

Tablica 1. Najznačajniji mikotoksini i toksikogene plijesni koje ih proizvode (Palfi i sur., 2020)

Mikotoksini	Mikroorganizam producent
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Citrinin	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>Monascus ruber</i> , <i>M. purpureus</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. odoratum</i> , <i>P. radicola</i> , <i>P. verrucosum</i>
Deoksinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. pseudograminearum</i>
Fumonizini	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. dlamini</i>
Okratoksin A	<i>Aspergillus affinis</i> , <i>A. albertensis</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. welwitschiae</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. cretensis</i> , <i>A. flocculosus</i> , <i>A. lacticoffeatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. pseudoelegans</i> , <i>A. roseoglobulosus</i> , <i>A. sclerotioniger</i> , <i>A. sclerotiorum</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>Neopetromyces muricatus</i> , <i>Penicillium nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i>
Patulin	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. giganteus</i> , <i>A. longivesica</i> , <i>Paecilomyces fulvus</i> , <i>P. niveus</i> , <i>P. saturatus</i> , <i>Penicillium antarcticum</i> , <i>P.</i>

	<p><i>carneum</i>, <i>P. clavigerum</i>, <i>P. compactum</i>, <i>P. concentricum</i>, <i>P. coprobium</i>, <i>P. dipodomycicola</i>, <i>P. expansum</i>, <i>P. gladioli</i>, <i>P. glandicola</i>, <i>P. griseofulvum</i>, <i>P. marinum</i>, <i>P. novae-zeelandiae</i>, <i>P. paneum</i>, <i>P. psychrosexualis</i>, <i>P. samsonianum</i>, <i>P. sclerotigenum</i>, <i>P. vulpinum</i>, <i>Xylaria longiana</i></p>
Zearalenon	<p><i>Fusarium graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. crookwellense</i></p>
Ergot alkaloidi	<p><i>Claviceps purpurea</i>, <i>C. paspali</i></p>
T-2 i HT-2 toksin	<p><i>Fusarium sporotrichioides</i>, <i>F. langsethiae</i>, <i>F. poae</i>, <i>F. sambucinum</i></p>

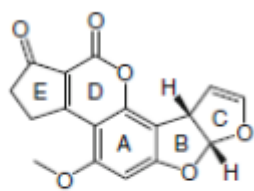


Slika 1. Kemijske strukture mikotoksina (Malhotra i sur., 2014)

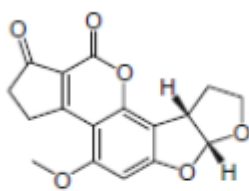
2.1.1. Aflatoksini

Pljesniva hrana je uvijek asocijalna na bolesti i druge štetne posljedice kod domaćih životinja. Smatralo se da takva kontaminacija smanjuje prinose i kvalitetu proizvoda poljoprivrednicima i stočarima no nitko nije razmišljao da može imati i izuzetno štetne učinke na zdravlje ljudi. U Engleskoj se 1960.-ih pojavila bolest nazvana „turkey-X-disease“ koja je uzrokovala ekstenzivnu nekrozu jetre od koje je uginulo 100 000 mladih purana. U isto vrijeme zabilježen je veliki porast pojave tumora jetre te uginuća pastrvi uzgojenih u mrijestilištu iz Oregona (Shibamoto i Bjeldanes, 2009). To je navelo znanstvenike da provjere postoji li povezanost između ova dva događaja. Utvrđeno je da su obje vrste hrane korištene kod ishrane ovih životinja bile kontaminirane plijesni *Aspergillus flavus*. Iz plijesni su izolirani i okarakterizirani aktivni toksini koji su nazvani aflatoksini. Aflatoksini predstavljaju derivate difuranokumarina koje proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* (Pleadin i sur., 2020). *A. flavus* je česti dio mikroflore zraka i zemlje diljem svijeta (Shibamoto i Bjeldanes, 2009). Uzrokuje truljenje raznih žitarica kada su uskladištene pri niskoj vlažnosti jer tada ne ulazi u kompeticiju s invazivnijim vrstama kod kojih je vlažnost iznimno bitna za rast i razmnožavanje. U pravilu ne kontaminira sjeme živih biljaka.

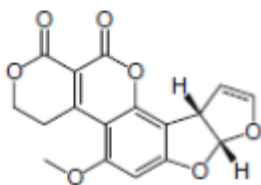
Aflatoksini su bezbojni do blijedo žuti kristali slabo topljivi u vodi. Topljivi su u polarnim otapalima, poput kloroforma, dimetil-sulfoksida i mentola. Nestabilni pri izrazito niskim ili visokim pH vrijednostima ($\text{pH} < 3$ ili $\text{pH} > 10$) (Kuharić, 2021). Termostabilni su, fotosenzibilni u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine. Poznato je dvadesetak aflatoksina, no najvažniji od njih jesu aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ i M₁ i M₂ (slika 2). Strukturno se ovi spojevi sastoje od 5 prstena. Imaju jedan aromatični, šesteročlani prsten (A), jedan šesteročlani prsten laktona (D), dva furofuran prstena (B i C) te peteročlani pentanon ili šesteročlani prsten laktona (E) (slika 2). Hidroksilirani derivati aflatoksina B₁ i B₂ su M₁ i M₂, koji imaju hidroksi grupu na spoju dva furanova prstena (slika 2) (Kuharić, 2021). Ovi spojevi nastaju hidroksilacijom u jetri. Aflatoksini su vidljivi u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm, pa su aflatoksini B i G skupine i dobili imena po boji kojom fluoresciraju: B za plavu (blue) i G za zelenu (green) fluorescenciju. Oznaka M kod aflatoksina M₁ označava proizvod u kojem je pronađen (mlijeko).



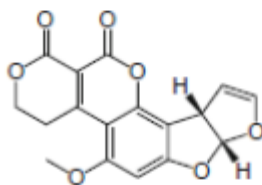
1 Aflatoksin B1



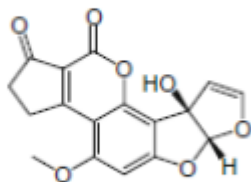
2 Aflatoksin B2



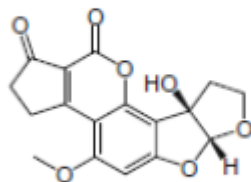
3 Aflatoksin G1



4 Aflatoksin G2



5 Aflatoksin M1



6 Aflatoksin M2

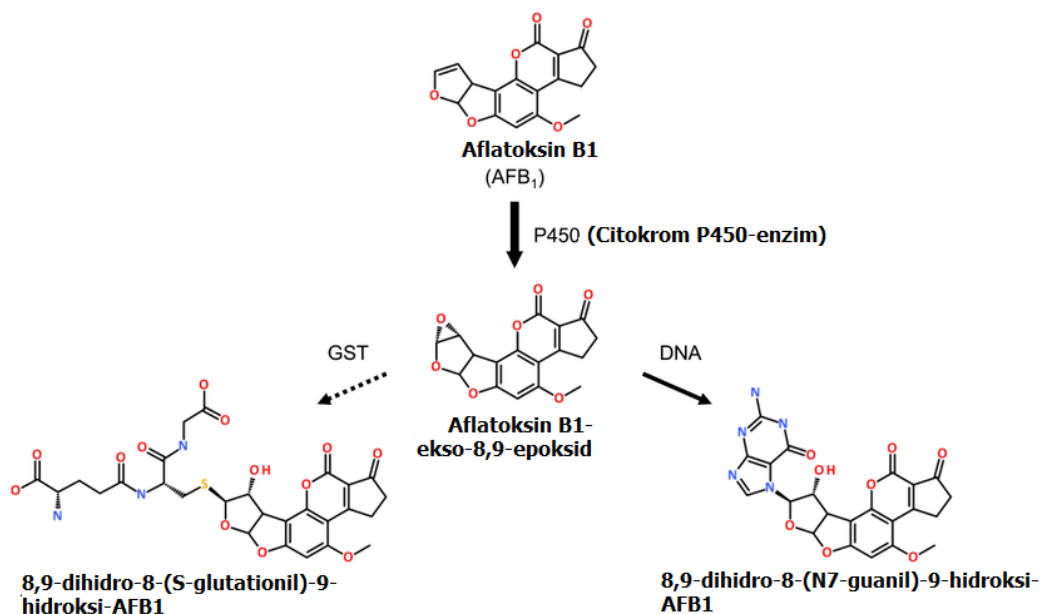
Slika 2. Strukturne formule glavnih predstavnika aflatoksina (Kuharić, 2021)

2.1.1.1. Aflatoksin B₁

Najčešće prisutan i najtoksičniji od svih aflatoksina je aflatoksin B₁. Prethodnik AFB₁ u sintezi je sterigmatocistin čije je kancerogeno i toksično djelovanje dokazano na laboratorijskim životinjama. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je proglasila AFB₁ najopasnijim mikotoksinom te ga je svrstala u Grupu 1 karcinogena. Način djelovanja AFB₁ je kroz inhibiciju replikacije DNK i RNK te sinteze proteina (Yitbarek i Tamir, 2013).

Aflatoksin B₁ treba biti biološki transformiran prije nego izazove reakciju u živom organizmu. Kao rezultat biotransformacije, specifični enzimi citokromi P450 u jetri metaboliziraju aflatoksin B₁ u reaktivne kisikove spojeve (aflatoksin-8,9-epoksid), koji se mogu onda vezati za proteine i uzrokovati akutnu toksičnost (aflatoksikozu) ili vezati za DNK i izazvati rak jetre (slika 3) (Yitbarek i Tamir, 2013).

S napretkom analitičkih metoda detekcije, brzo je postalo jasno da je aflatoksin sveprisutan u velikom broju važnih prehrambenih proizvoda uključujući ječam, kukuruz, sirak, grašak, sezam, soju, slatki krumpir, žitarice itd. Zbog prirodne pojave i vrlo široke rasprostranjenosti, potpuno uklanjanje aflatoksina iz navedenih proizvoda je nemoguće. Stoga su napori za određivanje relativno sigurnih razina izloženosti postali važan prioritet za regulatorne službe i znanstvenu zajednicu (Shibamoto i Bjeldanes, 2009).



Slika 3. Metabolizam aflatoksina B₁ (Monson i sur., 2015)

2.2. Dekontaminacija mikotoksina

Iako bi najbolje rješenje kod kontrole mikotoksina u lancu proizvodnje hrane bilo samo sprječavanje onečišćenja, u praksi je to nemoguće. No, postoje različite preventivne mjere uz pomoć kojih se kontaminacija može svesti na najmanju moguću razinu. Neke od preventivnih mjera su upotreba hibrida žitarica otpornijih na plijesni, pravilan plodored, primjena fungicida, prikladno vrijeme sjetve i vrijeme berbe, adekvatno skladištenje uz optimalnu temperaturu i vlažnost žitarica. U slučaju onečišćenja koriste se fizikalne, kemijske i biološke metode za uklanjanje kontaminacije (Palfi i sur., 2020).

2.2.1. Fizikalne metode

Fizikalne metode uključuju primjenu visokih temperatura, UV, x i γ -zraka te mikrovalova. Primjena visokih temperatura, odnosno termička obrada uzrokuje toplinsku degradaciju nekih vrsta mikotoksina (većina je otporna). Međutim, vrijeme obrade obično je jako dugo i zahtijeva puno energije, pa je stoga vrlo skupa. Osim toga, toplinska obrada može značajno utjecati na kvalitetu tretiranih prehrambenih proizvoda. Iz tih razloga prehrambena industrija pokušava razviti nove metode kao što su UV i gama zračenje te obrada impulsnim svjetlom. Navedene metode obično utječu na kemijsku strukturu mikotoksina što dovodi do njihove degradacije. Njihova učinkovitost ovisi o prisutnosti vode u tretiranim prehrambenim proizvodima, opsegu onečišćenja mikotoksinima i intenzitetu izloženosti (Hojnik i sur., 2017).

Hojnik i suradnici (2017) proveli su dekontaminaciju aflatoksina B₁ uz pomoć gama zračenja. Rezultati su pokazali da je dekontaminacija mikotoksina bila značajno uspješnija kada su bili prisutni u otopini, dosežući do 90 % uklanjanja. Suprotno tome, dekontaminacija gama zračenjem proizvoda sa malim udjelom vlage (suhi prehrambeni proizvodi) bila je znatno manje učinkovita (Markov i sur., 2015). Nadalje, visoke doze gama zračenja mogu negativno utjecati na kvalitetu prehrambenih proizvoda poput žitarica i sjemenki, smanjujući njihovu sposobnost klijanja.

UV zračenje također je pokazalo visoku učinkovitost u dekontaminaciji mikotoksina. U postupcima u kojima je korištena valna duljina od 365 nm udio aflatoksina u raznim vrstama orašastih plodova smanjen je za više od 90 % (Jubeen i sur., 2012). Uočeno je da UV zračenje vjerojatno reagiralo s većinom aktivnih mjesta na aflatoksinu B₁, tj. vezama koje su odgovorne za toksičnost, te su te veze transformirane u stabilnije zasićene veze (Liu i sur., 2010). Zhu i

suradnici (2014) koristili su UV zračenje za uklanjanje patulina iz soka od jabuka te su postigli smanjenje udjela mikotoksina od 90 %. Međutim, taj postupak snizio je koncentraciju nekih drugih fotosjetljivih spojeva u soku, uključujući askorbinsku kiselinu.

Slično UV zračenju, Moreau i suradnici (2013) proučavali su dekontaminaciju mikotoksina, (zearalenona, deoksinivenola i aflatoksina B₁) iz destilirane vode pomoću pulsirajuće svjetlosti. Korišteni svjetlosni bljeskovi trajali su 300 sekundi sa širokim spektrom svjetlosti u rasponu od 180 do 1100 nm i svjetlosnim tokom 1 J/cm². Analiza je pokazala da osam svjetlosnih bljeskova gotovo u potpunosti uklonilo mikotoksine.

2.2.2. Kemijske metode

U kemijske metode ubrajamo tretiranje s različitim kemijskim sredstvima među kojima su najpoznatiji klor, ozon, amonijak, lužine i kiseline. Primjena kemijskih sredstva često nije ekonomski isplativa a učinkovitost ne zadovoljava standarde koji su kada je hrana u pitanju iznimno visoki. Također kod korištenja npr. sumporovog dioksida može doći do formiranja toksičnih epoksida.

Supstance koje su pokazale najbolje rezultate su mineralni adsorbensi. Oni prolaze kroz probavni sustav i adsorbiraju i/ili degradiraju mikotoksine. Kompleks mikotoksina i adsorbensa se izlučuje iz tijela preko mokraćne ili izmeta. Najčešći mineralni adsorbensi su aluminosilikatni minerali kao što su bentoniti, diatomljevska zemlja i zeolitni materijali (Bočarov-Stančić i sur., 2018). Bentoniti su hidratni aluminij-silikati koji se sastoje od minerala iz grupe smektitita. Kristalna struktura tih mineralnih adsorbensa sastoji se od silicijevog dioksida i aluminijevog (III) oksida. Dijatomit je silicijaska sedimentna stijena formirana u morskom okolišu. Sastoji se od malenih ljuštura školjki od silicija i jednostaničnih algi. Ima malu masu i visoku poroznost. Zbog velikog udjela silicijevog dioksida ima veliku mogućnost vezanja mikotoksina (Bočarov-Stančić i sur., 2018). Zeolit je kristalni mikroporozni oksid, čiju mrežastu strukturu čine spojeni tetraedri silicija i aluminijski, stvarajući tako kanale mikroporoznih dimenzija u kojima se mogu naći alkalijski i zemnoalkalijski ioni te molekule vode. Pokazuju visoku mogućnost vezanja mikotoksina na njihovu negativno nabijenu površinu. Problem kod mineralnih adsorbensa je kemijska struktura koja varira od jednog do drugog, što utječe na afinitet i kapacitet vezanja određenog mikotoksina. Također, ne vežu svi adsorbensi jednako dobro sve mikotoksine. Zato se najčešće koristi mješavina različitih adsorbensa jer je hrana često kontaminirana sa više vrsta mikotoksina. Detoksifikacija prehrambenih proizvoda kontaminiranih mikotoksinima

upotrebom fizikalnih i kemijskih metoda, ograničena je zbog sigurnosnih razloga, mogućeg gubitka nutritivne vrijednosti tretiranih namirnica te ograničene uspješnosti i troškova implementacije (Pleadin i sur., 2015).

2.2.3. Biološke metode

Zbog navedenih problema pri korištenju fizikalnih i kemijskih metoda istražuje se alternativan način detoksifikacije mikotoksina koji uključuje korištenje bioadsorbensa te živih, mrtvih ili liofiliziranih stanica određenih mikroorganizama. Kod korištenja mikroorganizma glavni predstavnici su kvasci i bakterije mliječne kiseline (BMK). Iako mehanizam djelovanja BMK na mikotoksine još nije potpuno jasan, pretpostavlja se da se mikotoksini fizički vežu na stanične stijenke stanica, točnije na peptidoglikan i određene polisaharide (Kuharić, 2021). Pretpostavka je da između molekula mikotoksina i bakterijskih stanica nastaju slabe Van der Waals-ove veze, vodikove veze ili hidrofobne interakcije (Pizzolitto i sur., 2011). Stanična stijenka mikroorganizama sastavljena je od polisaharida, proteina i lipida, koji sadrže mnogo različitih funkcionalnih grupa poput karboksilnih, hidroksilnih, fosfatnih, amino grupa i hidrofobnih mjesta pogodnih za adsorpciju toksina (Kuharić, 2021).

Jakopović i sur. (2018) su proveli istraživanje gdje su pomoću odabranih sojeva BMK ispitivali mogućnost vezivanja aflatoksina M₁ iz mlijeka. Rezultati su pokazali da je uspješnost vezanja AFM₁ stanicama BMK iznosila od 23,73-94,49 %, ovisno o korištenom soju, vremenu inkubacije i tretmanu stanica. Također, u eksperimentu u kojem su korišteni β-glukan izoliran iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te iz zobi, rezultati su pokazali da se početna koncentracija aflatoksina M₁ smanjila u trenutku dodataka adsorbensa. Dodavanjem β-glukana iz kvasca početna koncentracija smanjila se za 63,6 %, dok se dodavanjem β-glukana iz zobi početna koncentracija smanjila za 65 % (Jakopović i sur., 2018).

Yiannikouris i sur. (2006) navode kako je veza između β-glukana i istraživanih mikotoksina (aflatoksin B₁, deoksinivalenol i patulin) uključivala interakciju van der Waalsovih sila te vodikovih veza koje povezuju hidroksilne, ketonske i laktanske skupine koje su uglavnom prisutne u mikotoksinima, a doprinose stabilnosti kompleksa mikotoksin-β-glukan. Također, uvjeti okoline, kao što su stereokemija, pH vrijednost i hidrofobna svojstva mikotoksina od primarne su važnosti za stvaranje kompleksa mikotoksin-β-glukan te određuju afinitet mikotoksina prema β-glukanu.

Upotreba bioadsorbensa pokazala se kao učinkovita, isplativa i iznimno ekološki prihvatljiva. Naime, bioadsorbensi su najčešće nusproizvodi poljoprivredne (sijeno, mekinje, razne ljuske, kukuruzni klas, mahune itd.), prehrambene (pulpa voća, šećerne trske, koštice orašastih plodova, riblje ljuskice itd.), te drvne (lišće, drvena sječka, piljevina, iglice bora, kora) industrije. Nusproizvodi poljoprivredne industrije sadrže celulozu, lignin, hemicelulozu, pektin, lipide i ostale organske spojeve koji su bogati različitim funkcionalnim grupama odgovornim za vezanje kontaminanta (u ovom slučaju mikotoksina). Bočarov i sur. (2018) ispitali su sposobnost adsorpcije aflatoksina B₁(AFB₁), zearalenona(ZON), deoksinivalenola (DON), diacetoksiscirpenola (DAS) i T-2 toksina (T-2) na koštice trešnje i breskve. Rezultati su pokazali da navedeni bioadsorbensi efikasnije vežu OTA, ZON i T-2 dok su nešto slabije rezultate pokazali kod vezanja AFB₁ i DON-a. Assaf i suradnici (2018) također su proveli istraživanje vezanja aflatoksina (M₁) na hitin i ljušturu škampa (samljevene i nesamljevene). Najbolje vezanje nastupilo je kod najveće koncentracije adsorbensa, a produljenjem vremena inkubacije koncentracija vezanog mikotoksina blago je porasla. Zadovoljavajući rezultati ukazuju na mogućnost korištenja navedenih nusproizvoda u procesima dekontaminacije.

2.3. Zakoni i regulativa

Zbog sve veće osviještenosti potrošača kontaminacija mikotoksinima postala je važna tema. Osim što djeluju štetno na zdravlje ljudi i životinja, mikotoksini smanjuju prinose i kvalitetu proizvoda pa samim time uzrokuju velike ekonomske gubitke. Iznimno su stabilni spojevi, te ne dolazi do narušavanja strukture tijekom manje invazivnih metoda dekontaminacije i omogućava im zadržavanje u sirovinama i životinjskim proizvodima duže vremensko razdoblje (Palfi i sur., 2020). Europska unija ima visoke standarde kada je hrana u pitanju te je zbog toga uveden RASF sustav (The Rapid Alert System for Food and Feed). To je sustav brzog uzbunjivanja kojim zemlje članice razmjenjuju informacije o mogućim kontaminiranim namirnicama u prehrambenoj industriji. (Palfi i sur., 2020). RASFF sustav omogućuje svim članicama EU da poduzmu određene mjere u slučaju kontaminacije s mikotoksinima s ciljem zaštite zdravlja potrošača. Sve članice provode interne kontrole hrane na način da se kontinuirano uzorkuje hrana i provode testiranja na razne kontaminante (Palfi i sur. 2020). Uz redovitu i organiziranu kontrolu nužno je provoditi i preventivne mjere u proizvodnji i skladištenju kako bi se izbjegla kontaminacija i neiskoristivost proizvoda, a samim time i ekonomski gubitci. Za najvažnije mikotoksine, provedena je procjena sigurnosti i analiza rizika izloženosti i utvrđena vrijednost sigurne dnevne izloženosti (Tolerable Daily Intake, TDI) te su definirane najveće dopuštene količine (NDK) koje se mogu nalaziti u hrani (tablica 2) (EC 1881/2006; Palfi i sur., 2020).

Tablica 2. Najveće dopuštene količine AFB₁ u hrani i hrani za životinje (Samardžija i sur., 2017)

Hrana / hrana za životinje	AFB ₁ (µg/kg)
Hrana namijenjena prehrani ljudi	20
Kukuruz i žitarice kao krmiva u proizvodnji hrane za životinje	
Kukuruz i žitarice za uzgoj rasplodne junadi, svinja i peradi	100
Kukuruz i žitarice za ishranu svinja	200
Kukuruz i žitarice za uzgoj tovne junadi, svinja i peradi	300

2.4. Otpad riblje industrije

Otpad koji nastaje preradom ribe jedan je od većih problema prehrambene industrije. Naime, 50 % preostalog materijala kod ulova i prerade ribe nije korišten kao hrana već završava kao otpad (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008). Zbog toga se pokušava prenamijeniti što više nusproizvoda u neke druge svrhe kako bi se smanjila količina otpada te u isto vrijeme povećala isplativost samog procesa prerade.

U današnje vrijeme upotreba prehrambenog otpada kao stočne hrane alternativa je od velikog interesa, jer predstavlja dobrobit za okoliš i smanjuje troškove životinjske proizvodnje. Riblje iznutrice pokazuju vrijedan izvor visokokvalitetnih proteina i energije pa se koriste kao dodatak prehrani kod raznih životinja. Kotzamanis i sur. (2001) ispitivali su potencijal korištenja iznutrica pastrvi u prehrani orade (*Sparus aurata*). Iznutrice su samljevene, homogenizirane i pomiješane s ostalim sastojcima te su napravljeni peleti kojima je hranjena navedena riba. Rezultati su pokazali nisku mikrobiološku kontaminaciju i visok udio lipida u peletima. Riblje brašno je najzastupljeniji izvor životinjskih bjelančevina za proizvodnju obroka za domaće životinje, međutim svjetsko tržište oduvijek je tražilo učinkovitu alternativu ribljem brašnu (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008a).

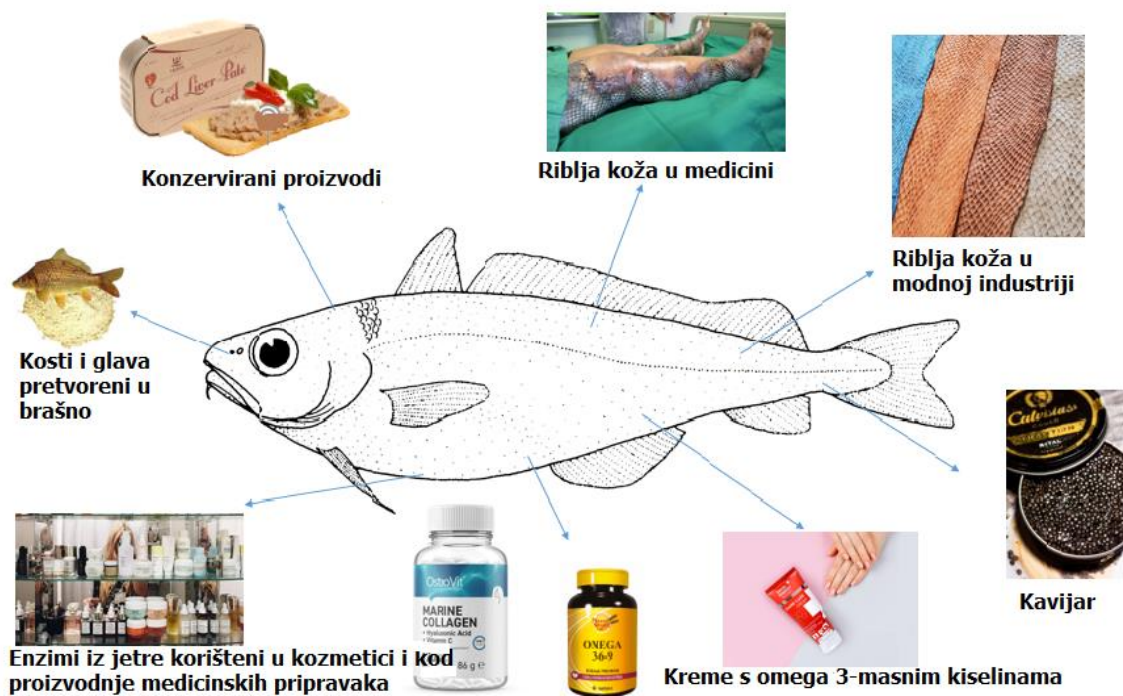
Riblja silaža privlačna je alternativa ribljem brašnu. To je tekući proizvod koji je rezultat likvefakcije cijele ribe ili njenih dijelova (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008a). Likvefakcija je autolitički postupak koji provode enzimi koji su već prisutni u ribi, a ubrzava ih kiselina koja inducira odgovarajuće uvjete razgradnje tkiva pomoću enzima i ograničava rast bakterija (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008a). Prednosti u proizvodnji silaže u odnosu na riblje brašno je jednostavna i jeftina tehnologija te je uz to postupak gotovo neovisan o mjerilu. Danas se prevođenje ribljeg otpada u silažu provodi sve rjeđe zbog visokog udjela vode, što prijevoz čini skupljim. Štoviše, silažu ribljeg otpada karakterizira neugodan miris i to može znatno ograničiti njezinu upotrebu u velikom udjelu krmnih formulacija (Hammoumi i sur., 1998). Silaži se može smanjiti udio vode ali, to podrazumijeva dodatne troškove sušenja.

Još jedan zanimljiv način recikliranja ribljeg otpada je proizvodnja biogoriva. Biodizelsko gorivo, dobiveno iz ulja i masti povrća i životinja, zamjena je ili dodatak dizel gorivu dobivenom iz nafte (Alcantara i sur., 2000). Kato i sur. (2004) su ispitivali moguću primjenu ulja od ribljeg otpada koje je tretirano ozonom kao transportno dizelsko gorivo. Dobivenom ulju testirana je gustoća, plamište, stinište, vrijednost grijanja, test destilacije i sadržaj sumpora. Prinos proizvedenog goriva bio je 95–96 %, nakon filtracije, primarnog i sekundarnog tretmana. Utvrđeno je da je dobiveno ulje imalo pogodna svojstva za

upotrebu u dizel motorima, poput gotovo identične vrijednosti grijanja i gustoće, nižeg plamišta i stiništa u usporedbi s komercijalnim dizelskim gorivom, bez stvaranja sumporovih oksida, smanjenih ili nikakvih emisija čađe, poliaromatskih i ugljikovih dioksida (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008). Ova svojstva sugeriraju da je dobiveno ulje imalo bolja svojstva od biljnog ulja i da je bilo pogodno za dizel motore, posebno na područjima s niskom temperaturom.

Karotenoidi su odgovorni za boju mnogih važnih proizvoda akvakulture. Najskuplji morski plodovi, kao što su škampi, jastozi, rakovi, pastrve, losos i tuna, imaju narančasto-crvenu kožu i/ili ljušturu koje sadrži karotenoidne pigmente (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008a). Otpad od škampa jedan je od najvažnijih prirodnih izvora karotenoida (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008a). Ekstrakcija karotenoida iz otpada riblje industrije daje zadovoljavajuće rezultate i dobiveni karotenoidi mogu se učinkovito koristiti umjesto sintetičkih karotenoida u formulaciji hrane za akvakulturu, a ostaci koji su dostupni nakon ekstrakcije mogu se koristiti za pripremu hitina/hitozana (Sachindra i Mahendrakar, 2010).

Kemijske komponente iz morskog otpada mogu se koristiti u drugim segmentima prehrambene industrije i one predstavljaju obećavajuće područje istraživanja i razvoja za uporabu nusproizvoda od morskih plodova. Istraživači su pokazali da se niz korisnih spojeva može izolirati iz morskog otpada, uključujući enzime, želatinu i proteine koji imaju antimikrobne i antitumorske sposobnosti. Hitozan, izoliran iz škampa i ljuštura rakova, pokazao je širok spektar primjene od kozmetičke do farmaceutske industrije (Arvanitoyannis i Kassaveti, 2008a). Primjena ribljih djelova i otpada u različitim industrijama prikazana je na slici 4.



Slika 4. Različita primjena ribe i ribljeg otpada u industriji (vlastita slika)

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorak

Za pripremu adsorbensa za vezanje AFB₁ nabavljena su dva uzorka svježeg lubina (*Dichentrarchus labrax*) od tvrtke Cromaris u sklopu trgovine mješovite robe. Uzorci su bili prosječne mase oko 300 g i izlovljeni na uzgajalištu tvrtke Cromaris, smještenom u blizini uvale Lamjana na otoku Ugljanu.

3.1.2. Standard AFB₁

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

3.1.3. Kemikalije

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

3.1.4. Pribor i oprema

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

3.2. Metode

3.2.1. Priprema adsorbensa

S uzorka lubina skalpelom su uklonjene ljuske, a kost (kralježnica) je dobivena filetiranjem svakog uzorka. Obje vrste adsorbensa (ljuske i kost) isprane su u destiliranoj vodi i osušene na sobnoj temperaturi u Petrijevim zdjelicama tijekom 2 dana. Kost je nakon sušenja dodatno usitnjena u mlincu na manje komade. Kao adsorbens su korištene i neoprane ljuske sa sluzi.

3.2.2. Vežanje AFB₁ na adsorbens

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

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

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

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

Uvjeti rada:

Gradijent mobilne faze:

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

Trajanje analize: 22 min

Protok mobilne faze: 1mL/min

Temperatura: 25°C

Početni tlak: 115 bar

Capillary current: 42 nA

Izvor: ESI

4. Rezultati i rasprava

Obzirom na još uvijek mali broj istraživanja u ovom području te nedostatak istraživanja adsorpcije mikotoksina primjenom otpada riblje industrije, u ovom radu ispitala se sposobnost adsorpcije aflatoksina B₁ na ljuske i kost svježeg lubina.

Vežanje AFB₁ praćeno je tijekom 24 sata, a koncentracije ne vezanog toksina prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Koncentracija nevezanog AFB₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) u umjetno kontaminiranom mediju tijekom 24 sata

Adsorbens	Vrijeme (h)	AFB ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ljuske (oprane)	0	0,18
	4	0,15
	24	<LOD
ljuske (neoprane)	0	0,19
	4	0,18
	24	<LOD
kost	0	0,18
	4	0,17
	24	<LOD

LOD= 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (limit detekcije)

Pozitivna kontrola= 0,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Početna koncentracija AFB₁ u puferu iznosila je 0,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ što predstavlja minimalno odstupanje od početno izračunate koncentracije od 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a može se objasniti ljudskom pogreškom tijekom pripreme. Dodatkom sve tri vrste adsorbensa u pufer na početku eksperimenta, koncentracija AFB₁ se neznatno smanjila i bila je u rasponu od 0,18-0,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nakon 4 sata inkubacije u uzorcima s opranim ljuskama i kosti došlo je do nešto većeg vezanja AFB₁ (0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tj. 0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$) u odnosu na neoprane ljuske (0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Assaf i sur. (2018) koji su ispitivanjem vezanja AFM₁ na ljuske škampa i hitina u puferu zaključili kako se adsorpcija mikotoksina povećava s vremenom. Međutim, Jakopović i sur. (2018) prema svojim rezultatima praćenja adsorpcije AFM₁ na β -glukan u mlijeku zaključuju da je vezanje navedenog toksina vrlo brz proces i svoj

maksimum dostiže u prvim satima. Razlike u brzini vezanja mogu se objasniti primjenom različitih medija (pufer i mlijeko) kao i različitom kemijskom strukturom AFB₁ i AFM₁.

Nakon 24 sata sva 3 adsorbensa vezala su skoro sav AFB₁ budući da je koncentracija određena HPLC metodom bila ispod limita detekcije od 0,03 µg/kg. Slične rezultate izrazito uspješnog vezanja zabilježili su Bočarov-Stančić i sur. (2018) prilikom istraživanja vezanja različitih mikotoksina uključujući i AFB₁ na organski otpad tj. koštice trešnje i breskve. Nakon samo 1 sat inkubacije pomoću ova dva biosorbensa uklonjeno je oko 58 % AFB₁ iz otopine pufera dok je najbolji postotak vezanja dobiven primjenom biomase morske trave *Myriophyllum spicatum* i iznosio je oko 95 %. Greco i sur. (2018) su također primjetili uspješnu adsorpciju nekoliko mikotoksina primjenom raznolikih vrsta poljoprivrednog otpada a kao najbolji biosorbens za AFB₁ se pokazao rogač gdje je nakon 90 minuta inkubacije u puferu došlo do 100 %-tnog vezanja. Na osnovu ovih istraživanja može se zaključiti kako otpad poljoprivredne industrije ima veliki potencijal za dekontaminaciju mikotoksina. Obzirom da su skoro sva dosadašnja istraživanja fokusirana na primjenu biljnog otpada, buduća istraživanja bi trebala obuhvatiti i otpad drugih industrija uključujući i riblju, te istražiti mehanizam djelovanja tj. način vezanja mikotoksina na takvu vrstu adsorbensa.

5. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Sve tri vrste korištenih bioadsorbensa (oprane ljuske, neoprane ljuske i kost) pokazale su zadovoljavajuće rezultate vezanja aflatoksina B₁
2. Najbolje vezanje zabilježeno je nakon 24 sata za sve 3 vrste adsorbensa, a količina nevezanog AFB₁ bila je ispod limita detekcije
3. Potrebno je provesti dodatna istraživanja s ciljem utvrđivanja mehanizma vezanja mikotoksina na ovakvu vrstu adsorbensa

6. Literatura

- Alcantara, R., Amores, J., Canoira, L., Fidalgo, E., Franco, M. J., Navarro, A. (2000) Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. *Biomass and Bioenergy*, **18(6)**, 515–527. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00014-3)
- Arvanitoyannis, I. S., Kassaveti, A. (2008b) Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology*, **43(4)**, 726–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x>
- Assaf, J. C., El Khoury, A., Atoui, A., Louka, N., Chokr, A. (2018) A novel technique for aflatoxin M₁ detoxification using chitin or treated shrimp shells: *in vitro* effect of physical and kinetic parameters on the binding stability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102(15)**, 6687–6697. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9124-0>
- Bočarov-Stančić, A., Lopičić, Z., Bodroža-Solarov, M., Stanković, S., Janković, S., Milojković, J., Krulj, J. (2018) *In vitro* removing of mycotoxins by using different inorganic adsorbents and organic waste materials from Serbia. *Food and Feed Research*, **45(7)**, 87–96. <https://doi.org/10.5937/ffr1802087b>
- Canel, R. S., Guerrissi, S., Sanchez, M., Mónaco, G., Laich, F., Wagner, J. R., Renaud, V., Ludemann, V. (2019). Microbiological and sensory characteristics of mould-ripened salami under different packaging conditions. *Food Technology and Biotechnology* **57**, 87–96.
- Jakopović Ž., Čanak I., Frece J., Bošnjir J., Ivešić M., Kuharić Ž., Pavlek Ž., Markov K. (2018) Uklanjanje kompleksa β-glukan-AFM₁ iz mlijeka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **13** (3-4), 136-139.
- Greco, D., D’Ascanio, V., Santovito, E., Logrieco, A. F., Avantaggiato, G. (2019) Comparative efficacy of agricultural by-products in sequestering mycotoxins: Multi-mycotoxin adsorption efficacy of agricultural by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **99(4)**, 1623–1634.
- Guevara-Gonzalez R. G. (2011) Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology, 1. izd., IntechOpen, 325-346.
- Hammoumi A., Faid M., Yachioui M. Amarouch H., (1998) Characterization of fermented fish waste used in feeding trials with broilers. *Process Biochemistry*, **33(4)**, 423-427.
- Hojnik, N., Cvelbar, U., Tavčar-Kalcher, G., Walsh, J. L., Križaj, I. (2017) Mycotoxin

- decontamination of food: Cold atmospheric pressure plasma versus "classic" decontamination. *Toxins*, **9(5)**. <https://doi.org/10.3390/toxins9050151>
- Jubeen F., Bhatti, I. A., Khan Z. M., Hassan Z. U., Shahid M. (2012) Effect of UVC Irradiation on Aflatoxins in Ground Nut (*Arachis hypogea*) and Tree Nuts (*Juglans regia*, *Prunus dulcis* and *Pistachio vera*). *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **34 (6)**, 1366–1374
- Mihovlić, M. (2014) Najznačajniji europski sirevi s plemenitim plijesnima. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet.
- Kato, S., Kunisawa, K., Kojima, T., Murakami, S. (2004) Evaluation of ozone treated fish waste oil as a fuel for transportation. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **37(7)**, 863–870.
- Knežević, N., Palfi, M., Vrandečić, K., Ćosić, J. (2020) Mikotoksini U Hrani – Zakonodavni Okvir. *Glasilo Biljne Zaštite*, **20(4)**, 472–483.
- Kotzamanis, Y. P., Alexis, M. N., Andriopoulou, A., Castritsi-Cathariou, I., Fotis, G. (2001) Utilization of waste material resulting from trout processing in gilthead bream (*Sparus aurata* L.) diets. *Aquaculture Research*, **32(1)**, 288–295.
- Kuharić, Ž. (2021) Uklanjanje aflatoksina M₁ i metala iz mlijeka primjenom bakterija mliječne kiseline i β-glukana. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
- Lešić, T., Šarkanj, B., Kiš, M., Frece, J., Zdravec, M., Markov, K., Kmetič, I., Pleadin, J. (2020) Toksični učinci mikotoksina. *Hrvatski Časopis Za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam*, **15(1–2)**, 3–10. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.15.1-2.9>
- Liu, R., Jin, Q., Tao, G., Shan, L., Huang, J., Liu, Y., Wang, X., Mao, W., Wang, S. (2010) Photodegradation kinetics and byproducts identification of the Aflatoxin B₁ in aqueous medium by ultra-performance liquid chromatography- quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **45(5)**, 553–559. <https://doi.org/10.1002/jms.1741>
- Markov, K., Pleadin J., Frece J., (2015) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **10 (1-2)**, 6-13.

- Monson, M., Coulombe, R., Reed, K. (2015) Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B₁ in Poultry. *Agriculture*, **5(3)**, 742–777. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030742>
- Moreau, M., Lescure, G., Agoulon, A., Svinareff, P., Orange, N., Feuilloley, M. (2013) Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation. *Journal of Applied Toxicology*, **33(5)**, 357–363. <https://doi.org/10.1002/jat.1749>
- Peraica M., Domijan A. M. (2001) Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, **52(1)**, 23–35.
- Peraica M., Rašić D. (2020) Rizik izloženosti najvažnijim mikotoksinima roda *Aspergillus* za ljudsko zdravlje, *Glasilo biljne zaštite* **3**, 340–345
- Peraica M., Rašić D., Gluščić, V. (2014) Utjecaj aflatoksina na zdravlje ljudi, *Glasilo biljne zaštite* **4**, 310–316.
- Sachindra, N. M., Mahendrakar, N. S. (2010) Stability of carotenoids recovered from shrimp waste and their use as colorant in fish sausage. *Journal of Food Science and Technology*, **47(1)**, 77–83. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0019-z>
- Samardžija, M., Jeličić, A., Mitak, M., Pleadin, J. (2017) Estrogeni učinci zearalenona u farmskih životinja i opasnosti za zdravlje ljudi i životinja. *Veterinarska Stanica*, **48(2)**, 109–118.
- Shibamoto, T., Bjeldanes, L. (2009) Introduction to food toxicology. 2.izd., Academic press. str. 159., 167.-176.
- Yiannikouris, A., André G., Poughon L., François J., Dussap C. G., Jeminet G., Bertin G., Jouany J. P. (2006). Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules*, **7(4)**, 1147–1155.
- Yitbarek, M., Tamir, B. (2013). Mycotoxines and / or Aflatoxines in Milk and Milk Products : Review. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, **4(1)**, 1–32.
- Zhu, Y., Koutchma, T., Warriner, K., Zhou, T. (2014). Reduction of patulin in apple juice products by uv light of different wavelengths in the uvc range. *Journal of Food Protection*, **77(6)**, 963–971.